



**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

Discussió

El model de xenoempelt en ratolins immunodeprimits

La obtenció de mostres tumorals per a la investigació, provinents de pacients que han sofert cirurgia, és de gran valor però suposa una limitació molt gran per la complexitat i el compromís ètic inherent. Quan això és possible, la quantitat de mostra acostuma a ser un factor limitant a l'hora de realitzar anàlisis a gran escala. La perpetuació dels tumors en ratolins atímics proporciona doncs, una font quasi inesgotable d'aquestes mostres tant preuades. Per al nostre treball, la utilització d'un model de xenoempelt en ratolí atímic ha perseguit dos propòsits molt concrets. El primer i més important, ha estat el d'enriquir en cèl·lula tumoral les nostres mostres. Cal aclarir que aquest enriquiment no es produeix per un increment de la proporció de cèl·lules malignes en el tumor, si no com a conseqüència de la substitució de les cèl·lules normals humanes acompanyants per cèl·lules d'origen murí. Això ens ha permès abordar de forma específica les alteracions genètiques de les cèl·lules tumorals. El segon propòsit responia al fet que la possibilitat d'aconseguir mostres aparellades de tumor primari / metastasi, es dona en una proporció molt baixa de pacients. Donat que un dels nostres objectius era validar la hipòtesi d'una possible selecció de la LOH en l'estadi metastàtic, i que quan la perpetuació es realitza per xenoempelt ortotòpic, es reproduïen de forma molt fidedigna els patrons de disseminació a distància (Fu et al., 1992; Reyes et al., 1996), l'ús d'atímics ens va semblar una forma de poder testar aquesta possibilitat.

Aquesta manca de contaminació per cèl·lules normals facilita les anàlisis genètiques incrementant la sensibilitat en la detecció de pèrdues al·lèliques, i va permetre a Vogelstein et al., la identificació de *TP53* (Baker et al., 1989), un dels gens supressors tumorals més importants i millor caracteritzat. A més, aquesta tècnica d'enriquiment és la única que permet la detecció inequívoca de pèrdues en homozigosi, com va ser el cas de la identificació del gens supressors *MTS1(p16)* (Caldas et al., 1994) i *DPC4(Smad4)* (Hahn et al., 1996; Hahn et al., 1995) en adenocarcinomes de pàncrees. Malgrat que s'han descrit biaixos en la representativitat d'algunes alteracions genètiques, com la sobrerrepresentació de mutacions de *TP53* (Reyes et al., 1996), es deuen probablement a processos de selecció similars als que s'han reportat per a les línies cel·lulars (Huang et al., 1996). Per a descartar que un biaix així pogués afectar les nostres anàlisis, hem implantat les mostres en dos ratolins i mai s'han analitzat tumors més enllà del tercer pas pel ratolí, ja que sembla ser

que és en els passes avançats, on es comencen a detectar les discrepàncies respecte dels tumors primaris (Capella et al., 1999).

La taxa d'acceptació i creixement dels xenoempelts de còlon ha estat del 63%. Alguns treballs han situat la taxa d'acceptació dels xenoempelts de CCR al voltant del 73 % (Dalerba et al., 2007). Tot i que la nostra és lleugerament inferior, val a dir que en molts dels treballs aquesta implantació es limita al teixit subcutani. Per a les MH l'acceptació del xenoempelt ha estat del 91 %. Hi ha diversos motius que poden explicar aquestes diferències entre CCR i MH. El primer, i probablement el més important, és la corba d'aprenentatge en la cirurgia que s'ha de realitzar als ratolins. El fet que el procés de transplantament comencés amb els CCRs, explicaria que en la implantació de les MH ja s'haguessin adquirit les habilitats tècniques necessàries, tant quirúrgiques, com d'anestèsia i postoperatòries. L'altre explicació podria tenir més a veure amb les característiques d'ambdues mostres. Les MH són el fruit de la disseminació hematògena del CCR. En aquest procés metastàtic, les cèl·lules tumorals pateixen una forta selecció que fa que puguin penetrar i colonitzar nous òrgans. D'altra banda, els tumors primaris són molt més heterogenis. Aquesta diferència podria afavorir que les MH tinguessin més habilitat per implantar-se i proliferar. Una última explicació és que, per a les MH es va fer servir sempre Matrigel, mentre que això no va ser així en el cas dels CCR. L'ús de Matrigel ha demostrat incrementar la taxa d'implantació de fragments de tumor sòlid en ratolins immunodeprimits (Hahn et al., 1995).

Quan un investigador es decanta per la utilització d'un model d'aquests, ha de tenir en compte però, les limitacions intrínseques que comporta. Hi ha moltes evidències de la importància de les interaccions tumor-estroma en la progressió tumoral i la metastasi. Per algunes d'aquestes interaccions, la especificitat d'espècie no permet el *crossstalk* entre la cèl·lula cancerosa humana i la cèl·lula estromal de ratolí, i aquest pot ser un inconvenient si el nostre objectiu és avaluar algun d'aquests mecanismes (Schmidt-Hansen et al., 2004). Només els implants ortotòpics al cec del ratolí han demostrat el potencial metastàtic ja que els implants subcutanis, són més deficients en aquest *crossstalk*, i no generen enzims de degradació de la matriu extracel·lular que permetin la disseminació (Fidler, 1991). D'altra banda, per facilitar el creixement dels tumors i/o línies cel·lulars xenoempeltades, cal que els ratolins tinguin compromès el sistema immunitari, la qual cosa elimina la possibilitat d'examinar el seu rol en la progressió tumoral en aquests

models. Finalment, s'han descrit diferències significatives pel que fa a l'angiogènesi entre tumors autòctons i xenoempeltats (Sikder et al., 2003). Tots aquests aspectes poden reduir el potencial predictiu d'aquests models en estudis pre-clínic.

En qualsevol cas, i per respondre als nostres objectius, vàrem poder generar una àmplia llibreria de tumors de CCR i MH, crescuts i perpetuats en ratolins immunocompromesos, que són de gran vàlua per a l'anàlisi de les alteracions genètiques somàtiques presents en les cèl·lules tumorals.

Anàlisi molecular de la regió 4p14-16

La participació de les alteracions del braç curt del cromosoma 4 en el desenvolupament de diversos tipus tumorals ha estat àmpliament documentada en els darrers anys. Aquests estudis s'han centrat en el valor pronòstic de les aberracions estructurals que pateix aquesta regió cromosòmica, analitzades mitjançant tècniques citogenètiques o moleculars.

Arribas *et al.*, van definir dues regions, una a cada braç del cromosoma 4, susceptibles de ser portadores d'un gen supressor tumoral. En el cas de 4p, a la regió 4p14-16, van localitzar una regió mínima de pèrdua, centrada en el marcador D4S2397, que s'associava a una menor supervivència lliure de malaltia i una major agressivitat (Arribas et al., 1999a; Arribas et al., 1999b). La freqüència de LOH en aquest marcador va ser del 35%. D'altra banda, els treballs realitzats per Shivapurkar *et al.*, suggereixen que les LOH a 4p són esdeveniments que es donen de forma molt prematura en la progressió tumoral. Analitzant pòlips adenomatosos de pacients amb CCR, van trobar que aquestes lesions benignes eren portadores de les LOH detectades en els carcinomes. I no només això, si no que la mucosa normal pròxima al tumor maligne, també tenia les mateixes LOH (Shivapurkar et al., 2001). A més, utilitzant un panell de marcadors microsatèl·lit una mica més gran, van definir dues regions recurrents de LOH a 4p, que van anomenar R3 (4p15.1-15.3) i R4 (4p16.3) amb unes incidències de LOH del 57 % i 50 %, respectivament.

La freqüència de LOH detectada en el nostre treball en el cas del CCR, ha estat del 28,2 % i en tots els casos hi ha estat involucrat el marcador D4S2397. El nostre és el primer treball que analitza els desequilibris al·lèlics d'aquesta regió cromosòmica en mostres tumorals xenoempeltades. A més, l'anàlisi

l'hem fet comparant el patró electroforètic de la mucosa normal (N), el tumor primari (Tp) i el tumor crescut al ratolí (Tx). Utilitzant controls negatius d'amplificació del genoma murí, aquest és l'únic abordatge que permet identificar de forma inequívoca les pèrdues d'heterozigositat i que hagués permès la identificació de pèrdues en homozigosi. El fet que la incidència de LOH que hem trobat sigui menor a les anteriorment descrites, possiblement sigui fruit de la dificultat d'interpretació que suposa la contaminació per cèl·lula normal. La tendència per part dels investigadors, a no subestimar el nombre de casos afectats de LOH, pot haver dut a considerar com a pèrdues casos poc clars o marcadors poc informatius. A més, cap estudi ha abordat la regió en qüestió amb un panell tant ampli de marcadors (30 per al CCR). Val a dir també, que moltes de les incidències de LOH reportades per a aquesta regió, i que són superiors a la nostra, s'han fet en altres tipus tumorals, i que no es pot descartar una major incidència en aquests casos.

El procés metastàtic implica l'adquisició, per part de la cèl·lula tumoral, de noves capacitats que li confereixin una avantatge selectiva. Alguns treballs han suggerit que desequilibris al·lèlics al cromosoma 4 podrien estar presents amb major proporció a les MH respecte dels seus tumors primaris (Malkhosyan et al., 1998). Per tal de validar aquesta hipòtesi vàrem ampliar la regió d'estudi de LOH en el cas de les MH. La regió cromosòmica analitzada fou de 32 Mb amb 57 marcadors. Aquesta regió suposa prop del 65 % del cromosoma 4p. La incidència que nosaltres hem trobat a les MH és del 25%, molt similars a les de CCR si tenim en compte que en aquests, hi ha un cas, CCR8 on trobem LOH en un sol marcador (D4S2397). També per a les MH, les LOH trobades han involucrat sempre al marcador D4S2397. El nostre model d'implantació ortotòpica de CCRs ens ha permès obtenir metàstasi *in vivo*. L'anàlisi de LOH a aquestes lesions -ni hepàtiques, ni pulmonars, ni peritoneals- a partir de CCR sense LOH a 4p14-16 han adquirit aquests desequilibris durant el procés metastàtic. A més, en els casos en que el CCR ja era portador de LOH, el patró de desequilibris s'ha mantingut en les metàstasi obtingudes. Val la pena destacar el cas de CCR8, que només té LOH a D4S2397; en cap dels implants peritoneals que s'hi van obtenir, vàrem trobar LOH en algun altre marcador. Amb els nostres resultats, podem descartar que aquesta hipotètica major incidència de LOH al cromosoma 4 es doni a 4p. És possible que aquesta pressió selectiva es doni en regions de 4q, on són moltes les regions

identificades coma a candidates a contenir gens supressors tumorals (Jin et al., 2006; Pershouse et al., 1997a; Shivapurkar et al., 1999b). En línia amb altres treballs ja esmentats, nosaltres creiem que aquests desequilibris són esdeveniments que es donen en fases molt inicials de la carcinogènesi colorectal.

Seguint una aproximació clàssica, basada en el model de Knudson, l'objectiu de l'estudi de LOH era el de seleccionar un subgrup de casos amb el primer *hit* d'inactivació del possible gen/s supressor tumoral. El fet que aquest estudi hagi estat tant ampli, i s'hi hagin utilitzat tants marcadors, respon a la voluntat de reduir al màxim una regió comú de pèrdua. D'aquesta manera, es pretenia reduir també el nombre de gens candidats. Hem de dir però, que el patró de LOH obtingut tant per als CCR com per les MH ha estat extremadament complex i que és pràcticament impossible definir una regió mínima de pèrdua. Així doncs, per seleccionar la regió en què es portaria a terme la cerca del segon *hit* d'inactivació, hem tingut en compte dos aspectes. D'una banda, D4S2397, que ja ha estat descrit com a marcador de la regió mínima de pèrdua en treballs anteriors (Arribas et al., 1999a), és l'únic marcador que presenta desequilibri en el 100% dels casos amb LOH. D'una altra, la retenció de l'heterozigositat a marcadors com D4S2941 (CCR9B) o D4S230 (CCR11), han fet que els consideréssim els límits de la regió d'estudi, a la que hem anomenat Regió A i a la qual hem seleccionat 10 gens candidats. Hem assumit un cert grau d'arbitrarietat en la definició de la regió d'estudi. El criteri ha estat el de no reduir a un sol gen l'estudi d'alteracions somàtiques i, al mateix temps, tenir un nombre raonable de gens a abordar.

Hem analitzat tant les regions codificants com les promotores dels nostres gens candidats per tal d'identificar-hi alteracions genètiques o epigenètiques, respectivament. El nostre estudi exhaustiu no ha aconseguit detectar el segon *hit* d'inactivació característic dels gens supressor tumorals clàssics. En alguns dels gens supressors més rellevants, mitjançant una estratègia similar (*TP53*, *p16*, *SMAD4*), s'hi han identificat aberracions genètiques com mutacions puntuals, microdelecions o delecions en homozigosi (Baker et al., 1989; Baker et al., 1990; Caldas et al., 1994; Hahn et al., 1996). No obstant això, en la majoria de candidats a supressors tumorals, l'estratègia de reduir al màxim una regió mínima de LOH, no ha comportat la troballa de les preuades alteracions inactivants. De ben segur que hi ha diverses explicacions per justificar aquests intents fallits. Probablement, el principal motiu sigui la

excessiva confiança, per part dels investigadors, en el model de Knudson de la inactivació bial·lèlica. Una altra, pot ser el fet que estiguem massa disposats a ignorar l'heterogeneïtat tumoral i la ingent quantitat de dades citogenètiques que mostren aneuploidies, poliploidies i cariotips molt complexes, que són incompatibles amb els dos *hits* (Dutrillaux et al., 1991; Tomlinson et al., 2002). En el nostre cas, i donat que el patró de LOH és altament complex, no podem descartar que les alteracions en els al·lèls retinguts, no es trobin en d'altres gens fora de la regió d'estudi.

En rigor, l'anàlisi de LOH mitjançant marcadors polimòrfics com els microsatèl·lits, és una mesura indirecta que pot donar pistes sobre la presència de pèrdues al·lèliques. Per a avaluar amb certesa la existència de les suposades delecions, calen estudis de la dosi al·lèlica. Així doncs, vàrem realitzar aquets experiments mitjançant CGH i FISH. Amb els nostres resultats a la mà, podem afirmar que la detecció de LOH a 4p mitjançant marcadors microsatèl·lit, no correlaciona amb la presència de pèrdues al·lèliques. Aquesta era una possibilitat que, sense haver-la demostrat, ja havien apuntat Arribas *et al.* (Arribas et al., 1999b). Dels 10 CCR amb LOH, només dos presenten pèrdua al·lèlica, i només 1 de les 5 MH amb LOH. Hi ha diversos mecanismes que poden explicar aquest fenomen; la conversió gènica, la delecio i reduplicació, la mutació, o la recombinació mitòtica. Mitjançant tècniques de pintat cromosòmic en tumors xenoempeltats de CCR amb LOH, Thiagalingam *et al.* han demostrat que les pèrdues de cromosomes sencers s'associen més freqüentment amb mecanismes de pèrdua i reduplicació, mentre que les pèrdues parcials estan relacionades amb canvis estructurals associats a recombinacions mitòtiques (Thiagalingam et al., 2001). En un altre treball, Gaasenbeek *et al.* van trobar que en el 67% de les línies de CCR que havien analitzat, els canvis genètics detectats com a LOH de cromosomes sencers mitjançant SNP-LOH, no eren detectats en estudis fets amb *array*-CGH. L'explicació que van suggerir, era la d'una possible reducció cap a la homozigosi per mecanismes de pèrdua i reduplicació. D'altra banda, van trobar que el 74 % de les línies cel·lulars presentaven recombinació mitòtica, i que aquesta afectava a regions entre 10 i 102 Mb. Van detectar que els punts de recombinació estaven molt freqüentment situats a prop de regions pericentromèriques, i per tant, donessin lloc a LOHs de braços cromosòmics complerts. La complexitat dels patrons tant de LOH com de pèrdua o guany al·lèlic va portar als autors a la següent afirmació: “[...].*This complex*

changes fitted no consistent pattern and involved varying combinations of gains, losses, and LOH events, involving all or part of chromosomes. The complexity of these changes helps to explain why attempts to map genes mutated in cancers, on the basis of LOH, have been largely unsuccessful.” (Gaasenbeek et al., 2006).

Sembla bastant clar que el patró de canvis estructurals i numèrics observats al braç curt del cromosoma 4 encaixa amb un rerefons d'instabilitat cromosòmica (CIN). Cal encara aprofundir en alguns mecanismes bàsics de la carcinogènesi colorectal. Determinar quina és la freqüència de CCR amb alteracions a 4p que presenten MIN. Probablement sigui la mateixa, ja que la recombinació mitòtica i la conversió gènica es dona de forma independent de la ploïdia o la MIN. Les dades al voltant dels canvis a 4p suggereixen que alguns tumors, manifesten una tendència o bé a la recombinació mitòtica o bé al LOH de cromosomes sencers. Aquests dos mecanismes d'instabilitat han de tenir-se en compte quan es parla de la CIN com el mecanisme responsable de les pèrdues i els guanys de material genètic en càncer.

D'es del punt de vista de la regulació epigenètica, les nostres anàlisis s'han limitat a una possible alteració dels patrons de metilació de les illes CpG de les regions promotores dels gens candidats. Recentment, Frigola *et al.*, van descriure un mecanisme pel qual, el silenciament epigenètic a les cèl·lules tumorals podia abraçar grans regions cromosòmiques en què, tant gens metilats com no metilats podien quedar coordinadament inactivats (Frigola et al., 2006). En el nostre cas, no hem trobat canvis en els patrons de metilació que facin pensar en una regulació d'aquest tipus. Com per l'anàlisi mutacional, no podem descartar que la sobreexpressió dels gens de la Regió A vingui determinada per alteracions en la metilació (hipometilació en aquest cas) de regions fora de l'analitzada. Tampoc no es poden descartar altres mecanismes de regulació com modificacions de les histones o l'acció de miRNAs. De fet, elements genòmics en el mateix cromosoma 4 o en d'altres, podrien estar actuant regulant l'expressió dels nostres gens.

Anàlisi de la expressió gènica i estudi del valor pronòstic.

Són molt escassos els treballs que, amb independència dels mecanismes moleculars que poden donar lloc a les alteracions numèriques i/o estructurals trobades a 4p, han analitzat, en mostres tumorals, els nivells d'expressió dels

gens que s'hi troben. Els estudis d'expressió gènica, poden ser a nivell de mRNA o a nivell de proteïna. L'estudi quantitatiu dels nivells de mRNA està sent una estratègia molt utilitzada actualment. El principal repte és l'estandardització dels resultats. La utilització dels apropiats *housekeeping genes* per a normalitzar les dades obtingudes es motiu de controvèrsia. Nosaltres hem fet servir el gen de la β -2 microglobulina perquè ja s'ha demostrat que la seva validesa per a la qPCR de mostres de CCR (Abal et al., 2007; Menendez et al., 2008). Diversos treballs emfatitzen la necessitat d'utilitzar més d'un d'aquests gens control en el maneig de les dades obtingudes de qPCR (Vandesompele et al., 2002). Si bé la normalització final es farà amb sol gen, cal un segon per a comprovar que l'expressió relativa entre els dos, al conjunt de les mostres, és estable. Així ho han descrit Van Wezel *et al.* en un estudi sobre candidats a gens supressor tumorals a 16q en càncer de mama (van Wezel et al., 2005). En el nostre estudi s'ha fet servir el gen de la ciclofilina com a gen control de l'estabilitat de l'expressió de β -2 microglobulina.

L'estudi d'expressió dels gens candidats s'ha reduït a 5 dels 10 gens de la Regió A. Aquests gens són *PI4K2B*, *STIM2*, *KIAA0746*, *RBPSUH* i *ANAPC4*. De l'anàlisi quantitatiu d'aquests gens a les mostres de CCR i MH se'n desprenen dues conclusions. La primera, que hi ha una sobreexpressió generalitzada dels gens analitzats, tant en CCR com en MH, i que aquesta és independent de la presència o no de LOH a la regió. La segona, que *PI4K2B* i *STIM2* estan significativament sobreexpressats, mentre que en la resta de casos, aquesta sobreexpressió és, o bé més discreta, o bé menys generalitzada, o ambdues. Intuïtivament, sembla contradictori pensar que gens ubicats en regions recurrents de LOH puguin estar sobreexpressats. Cal recordar que els resultats obtinguts en el Capítol 1 posen de manifest l'absència de pèrdua al·lèlica en aquestes regions de LOH. Val a dir que, inclús en casos on la haploinsuficiència està demostrada, l'al·lel salvatge conservat pot compensar la pèrdua de l'altre. Això és el que Prasad *et al.* varen descriure que succeïa amb el gen *ATP2A2*, que codifica per una ATPasa del reticle endoplasmàtic responsable del manteniment de l'homeòstasi del Ca^{2+} . Van trobar que als tumors escamosos apareguts als ratolins *ATP2A2 +/-*, els nivells d'expressió de *SERCA2*, la proteïna codificada per aquest gen, era igual o superior als dels teixits no tumorals (Prasad et al., 2005). Quelcom similar fou el que es trobaren Wezel *et al.* quan van voler validar, en línies cel·lulars i tumors de

mama, 4 candidats a gens supressor tumorals situats a 16q. Aquesta regió presenta freqüències de LOH de fins al 50 % en càncer de mama. Doncs bé, dos dels 4 gens avaluats no presentaven diferències en els nivells de mRNA ni en comparar línies normals i tumorals de mama, ni en teixits tumorals. Dels altres dos gens, *CBFA2T3* estava 122 cops sobreexpressat en les línies i casi 20 cops en els tumors, i *FANCA*, estava sobreexpressat 133 cops. En ambdós casos, l'expressió va ser independent de la presència LOH (van Wezel et al., 2005).

Respecte dels nostres 5 gens, poc o res se sap de *KIAA0746*, i encara menys relacionat amb càncer. Juntament amb *CCKAR*, un dels gens de la Regió A del qual no vàrem trobar expressió en còlon, anàlisis de lligament els han situat a una regió associada amb desordres bipolars i esquizofrènia (Christoforou et al., 2007). *ANAPC4*, és membre del complex anafase/ciclosoma (APC/C). Aquest complex és una ubiquitin-ligasa formada per 13 subunitats que regula els processos de segregació cromosòmica i sortida de la mitosi (Peters, 2006). S'han descrit mutacions en algunes de les subunitats, incloent-hi *ANAPC4*, en tumors i línies cel·lulars de CCR i mama (Sjoblom et al., 2006; Wang et al., 2003). APC/C ubiquitina i degrada *p21* a l'inici de la mitosi (Amador et al., 2007) i per tant, la seva sobreexpressió podria donar lloc a un increment de l'activitat de les CDK, concretament de CDK1, i un increment de la proliferació.

RBPSUH, també conegut com *RBP-JK*, és un factor de transcripció fonamental en la via de senyalització de Notch. Aquesta via està extremadament conservada en l'evolució i és un mecanisme àmpliament utilitzat en la regulació de la diferenciació en metazous. La interacció dels receptors de Notch amb els seus lligands (Delta-like o Jagged), dóna lloc a la ruptura del domini intracel·lular (NICD) que es transloca al nucli. Un cop al nucli, NICD s'associa amb el factor de transcripció codificat pel nostre gen, *RBPSUH*, i regula l'expressió dels gens diana principals de la via Notch, com per exemple *HES* (*Hairy and enhancer of split*) o *HERP* (*HES related protein*), que són dos repressors transcripcionals (Bray, 2006; Maillard and Pear, 2003). La via de Notch està implicada en processos d'angiogènesi, proliferació, migració, diferenciació muscular i diferenciació arterio-venosa (Li and Harris, 2005). Està activada a les cèl·lules progenitores de l'epiteli gastrointestinal, incloent-hi la base de les criptes del còlon. L'adquisició de la conformació així com el manteniment de l'integritat de les proteïnes d'aquesta via requereix

de la presència de Ca^{2+} (Aster et al., 1999). En cèl·lules de càncer de pròstata, en absència de Ca^{2+} , s'ha vist que el receptor Nox-1 està constitutivament activat (Dalrymple et al., 2005).

Segons el nostre coneixement del tema, només hi ha un altre treball, de Ruano *et al.*, en què es relaciona a *STIM2* amb càncer. Mitjançant *arrays* d'expressió i de CGH, els autors identifiquen una sèrie d'amplicons en tumors de glioblastoma multiforme. Un d'aquests amplicons mapa una regió de 6 Mb a 4p15. El grau de solapament amb la Regió A que nosaltres hem descrit és complet. Com en el nostre estudi, troben sobreexpressió de *STIM2*. També troben sobreexpressat *LOC203389*, present a la Regió A però pel qual no hem detectat expressió en el còlon (Ruano et al., 2006). *STIM2*, es va descriure per primer cop, juntament amb l'altre membre de la família, *STIM1*, al 2001 (Williams et al., 2001). La funció amb la qual se l'ha identificat és la de regular els nivells de Ca^{2+} intracel·lular mitjançant el control dels SOC (*store-operated channels*) (Brandman et al., 2007; Parvez et al., 2008). *STIM1* ha estat proposat com a candidat a gens supressor tumoral per la seva capacitat de segrestar el creixement cel·lular i la proliferació, quan és introduït en cultius cel·lulars de rhabdomyosarcoma (Sabbioni et al., 1997; Sabbioni et al., 1999). A més, també s'ha publicat que la inhibició de *STIM1* mitjançant siRNA dona lloc a un increment de la motilitat i la capacitat metastàtica en línies de melanoma (Suyama et al., 2004). El rol que els dos membres de la família juguen en el control dels nivells de Ca^{2+} és sens dubte el que més s'ha estudiat d'aquestes dues molècules. *STIM1* seria un activador de SOC i per tant, de l'entrada del Ca^{2+} extracel·lular a través de la membrana plasmàtica en resposta a la davallada en els nivells de Ca^{2+} al reticle endoplasmàtic. Contràriament, *STIM2* seria qui controlaria que els nivells basals de Ca^{2+} al citosol es mantinguessin entre uns marges estrets (Liou et al., 2005). Aquesta funció per a *STIM2* s'ha pogut comprovar en veure que inhibeix *STIM1* i per tant el flux d'entrada de Ca^{2+} (Hewavitharana et al., 2007; Soboloff et al., 2006). Així doncs, *STIM2* forma part dels components que regulen la senyalització a través de Ca^{2+} . Entre aquests hi ha *SERCA2*, que com ja hem explicat anteriorment, és la proteïna codificada per *ATP2A2*, i que en ratolins +/- dona lloc a l'aparició de tumors escamosos. Recentment, Oh-hora *et al.* han publicat que *STIM2* és fonamental per al manteniment de la via de senyalització de Ca^{2+} -calcineurina-NFAT, ja que en ratolins *knockout* per a *STIM2* o *STIM1* no hi ha translocació del factor de transcripció NFAT al nucli i

presenten un fenotip altament limfoproliferatiu. NFAT col·labora amb SMAD3 en l'activació de la transcripció de *FOXP3* que, al mateix temps és un factor de transcripció amb funció supressora (Oh-Hora et al., 2008).

El nostre és el primer treball que relaciona l'activitat de *PI4K2B* amb càncer. En les nostres mostres de CCR i MH, *PI4K2B* és el gen l'expressió del qual està més significativament incrementada. És un membre de la família de les fosfatidil-inositol 4 cinases (PI4K). Com a cinasa, catalitza la fosforilació de PI (fosfatidil-inositol) a PIP (fosfatidil-inositol monofosfat). Mitjançant l'activitat de PIP5-cinasa, PIP és convertit a PIP2 (bi-fosfat) (Fruman et al., 1998), que és el precursor d'importants segons missatgers així com el substracte de PI3K que el converteix a PIP3 (tri-fosfat) (Auger et al., 1989). La hidròlisi de PIP2 catalitzada per PLC (fosfolipasa C) dona lloc, per una banda a DAG (diacilglicerol) que activa la PKC (proteïna cinasa C) (Nishizuka, 1984a, b), i per l'altre a IP3 (inositol tri-fosfat) que és, curiosament, un dels principals responsables de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular (Berridge et al., 1984). Així doncs, juntament amb PIP2, *PI4K2B* està implicada en el control de l'activitat de la Fosfolipasa D, dels transportadors i canals iònics, del tràfic de vesícules, de la regulació del reordenament del citoesquelet d'actina, de procesos d'angiogènesi i de la via de senyalització del Ca^{2+} (Bunce et al., 2006; Janetopoulos and Devreotes, 2006).

Els nostres resultats, per primer cop, assenyalen una elevada expressió de *PI4K2B*, avaluada per immunohistoquímica, com un factor de bon pronòstic en CCR. Les dades apunten a un possible factor de protecció en l'activació de la senyalització per PI4K. A més, els nivells de mRNA de *PI4K2B*, determinats per qPCR, apunten també a un paper en la resposta al tractament quimioteràpic basat en el 5-FU. L'estudi de les sèries tumorals amb les que hem avaluat el valor pronòstic i predictiu d'aquests dos marcadors no han revelat cap associació pel que fa a *STIM2*. No obstant, i com ja discutirem una mica més endavant, la seva sobreexpressió té una clara repercussió en el fenotip proliferatiu en cèl·lules de CCR. A la vista dels nostres resultats, sembla molt evident que hi ha un rol central de l'homeòstasi del Ca^{2+} intracel·lular. Quin és el paper que juguen aquests dos gens està encara per aclarir. Nosaltres hipotetitzem que *PI4K2B* i *STIM2* convergeixen, mitjançant dos mecanismes independents, en la regulació dels nivells citosòlics de Ca^{2+} , i donem suport al rol de les vies de senyalització regulades per Ca^{2+} en el desenvolupament del CCR. La sobreexpressió de *PI4K2B* estaria modificant el

nivells intracel·lulars de PIP2 que, al mateix temps, afectaria la regulació de IP3 que interaccionant amb el seu receptor podria provocar una davallada en la concentració del Ca^{2+} al reticle endoplasmàtic. La sobreexpressió de *STIM2* podria ser un intent de la cèl·lula de compensar una eventual inactivació de *STIM1*, ja que s'ha demostrat que el seu mecanisme d'acció és independent de la presència de *STIM1*. D'aquesta manera, es podria garantir l'entrada, mitjançada pels SOC, de Ca^{2+} per la membrana plasmàtica, en resposta a la depleció dels nivells endoplasmàtics. Són moltes les evidències que assenyalen la regulació dependent de Ca^{2+} com una via de senyalització fonamental en càncer. BAX i BAK, dos factors proapoptòtics de la família de Bcl-2, regulen la proliferació mitjançant el control de la homeòstasi del Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic (Jones et al., 2007). Hi ha un gran nombre de factors de transcripció que són dependents de Ca^{2+} . Els senyals mitogènics, activen PLC que allibera Ca^{2+} i DAG que al mateix temps activa PKC. Però el Ca^{2+} també s'uneix a Ras, activant-lo. Ras i PKC activen Raf1 i per tant, inicien la cascada de MAPK, que eventualment activa la transcripció de gens de proliferació i diferenciació (Clapham, 2007).

La regulació transcripcional de *PI4K2B* i *STIM2* per Wnt/ β -catenina i la seva funció supressora de la proliferació.

La regió promotora de *PI4K2B* i *STIM2* presenta seqüències d'unió de diversos factors de transcripció, entre ells SOX, SMAD i TCF/LEF. Els nostres estudis, tant de bioinformàtica com d'immunoprecipitació de cromatines, han demostrat que existeix una regulació de l'expressió d'aquests dos gens pel complex TCF4/ β -catenina. A més, la ocupació dels llocs d'unió a aquests factors de transcripció és dóna exclusivament el les línies de CCR i no en les cèl·lules normals o que no són de CCR. Això és lògic si tenim en compte que la majoria de CCR esporàdics presenten algun tipus d'alteració en la via de Wnt, que fa que β -catenina passi a localitzar-se al nucli i activi la transcripció d'un gran nombre de gens. A més, s'ha proposat un paper rellevant de les alteracions en APC, i en conseqüència en tota la via, en la inestabilitat cromosòmica del CCR (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). La complexitat dels haplotips a 4p de les mostres de CCR del nostre estudi, posen de relleu un evident rerefons d'inestabilitat. Si a això li afegim que en aquest subgrup de mostres hi ha una clara desregulació de *PI4K2B* i *STIM2*,

resulta molt temptador hipotetitzar una relació entre les alteracions a la via de Wnt, la CIN i la regulació transcripcional dels nostres dos gens candidats.

Un dels gens de la via de Wnt que es troba freqüentment alterat en càncer és *WNT5A* (Liang et al., 2003; Weeraratna et al., 2002). S'ha hipotetitzat que la sobreexpressió de Wnt5a pot tenir un rol important en càncer de pulmó, mama o pròstata, mentre que el silenciament estaria implicat en càncer de pàncrees (Crnogorac-Jurcevic et al., 2001; Iozzo et al., 1995; Lejeune et al., 1995). Wnt5a és membre d'una de les tres vies de senyalització de Wnt independents de β -catenina. En el context dels nostres resultats, és fascinant comprovar que el Ca^{2+} ha estat proposat com a un segon missatger cabdal en aquestes tres vies alternatives. En la primera, homòlegs específics de Wnt i frizzled són els que activen la cinasa depenent de calci/calmodulina (CamKII) i la PKC que, com ja hem comentat, és un membre de la via de senyalització de PI4K2B. En la segona, altres receptors frizzled activen PLC i fosfodiesterasa. I finalment, en la tercera, frizzled activa la cinasa Jun-N-terminal (JNK) i proteïnes d'unió a GTP (Kohn and Moon, 2005).

Els assajos funcionals, tant d'introducció de còpies salvatges com d'inhibició mitjançant siRNA de *PI4K2B* i *STIM2*, mostren un fenotip supressor de la proliferació cel·lular. Tant DLD-1 com SW480 són línies de CCR que presenten formes truncades de la proteïna APC (Penman et al., 2005) i en conseqüència, cal esperar que hi estigui activada l'expressió mitjançada per TCF4/ β -catenina. El fet que en SW480 això no sigui així, indica que hi ha altres mecanismes que estan regulant, inhibint-la, aquesta expressió. Per això, vàrem introduir en aquesta línia les còpies funcionals dels nostres gens. El fenotip observat per *PI4K2B* és molt més contundent que el de *STIM2*. L'increment en l'expressió de *PI4K2B* inhibeix per complet la capacitat de formar colònies, mentre que per *STIM2* encara es manté una certa viabilitat cel·lular. Partint de la base que ambdós gens estan implicats en la carcinogènesi mitjançant la regulació del Ca^{2+} , sembla que a nivells basals d'aquest, la sobreexpressió de *PI4K2B* té un efecte supressor més important. Tot i així, caldria continuar els esforços per poder testar *in vivo*, la capacitat supressora del creixement cel·lular de *PI4K2B*. Possiblement, la sobreexpressió de *PI4K2B* en el *background* d'aquestes línies cel·lulars té un efecte tòxic i seria de gran interès desenvolupar models de sobreexpressió condicional per a validar els nostres resultats.

L'efecte supressor del creixement tumoral només s'ha pogut avaluar en el cas de *STIM2*. Si les diferències observades en els assajos clonogènics es reproduïssin *in vivo* amb models condicionals com els que hem comentat, valdria la pena considerar ambdós gens, però principalment *PI4K2B*, com a representants d'una nova categoria de gens supressors tumorals. Aquests compartirien amb els gens supressors clàssics la capacitat de suprimir el creixement i la proliferació tumoral, però amb mecanismes molt diferents. En ambdós casos, la pèrdua de l'expressió conferiria a les cèl·lules avantatges selectives. Malgrat tot, mentre que els supressors clàssics exerceixen el seu fenotip supressor en condicions d'expressió normals, aquests nous gens regularien el creixement tumoral quan es trobessin sobreexpressats.

La regulació dels nostres dos gens per la via de Wnt/ β -catenina, i el fet que aquests estiguin implicats en la homeòstasi del Ca^{2+} , posa de manifest que existeix un *crossstalk* entre aquestes dues rutes de senyalització. S'ha postulat al calci com un potent mediador de l'antagonisme entre les vies de Wnt dependents i independents de β -catenina (Kohn and Moon, 2005). De fet, hi ha qui anomena aquesta mediació com la via Wnt/ Ca^{2+} . Nosaltres hipotetitzem que *PI4K2B* i *STIM2* són membres reguladors d'aquest *crossstalk*. Increments en els nivells de Ca^{2+} intracel·lular provoquen inhibició de la senyalització per β -catenina en cèl·lules NIH3T3 i P19, que en conseqüència aturen el seu programa de transcripció de gens com *MYC* o *CICLINA-D1* (Maye et al., 2004). La senyalització per Wnt5a o Wnt11 dóna lloc a una sortida de Ca^{2+} del RE que, sumada a la sobreexpressió de *PI4K2B* i *STIM2*, generaria un *feedback* negatiu sobre la senyalització per β -catenina, ja que s'activa CamKII i PKC (Kuhl et al., 2001). Sembla clar, a més, que aquest *crossstalk*, no es restringeix a les vies de Wnt, sino que ras/raf1/MAPK també hi estaria implicada (Ishitani et al., 2003).

Els anàlisis bioinformàtics apunten a una regulació negativa de *PI4K2B* per part del complex TCF4/ β -catenina, mentre que seria positiva per a *STIM2*. En el nostre model, la correlació entre TCF4/ β -catenina i *PI4K2B* és casi el doble de potent que amb *STIM2*. Així doncs, la conseqüència d'una inhibició mitjançada per l'increment de Ca^{2+} seria una sobreexpressió de *PI4K2B*, mentre que hi hauria un certa davallada en els nivells de *STIM2* que, probablement mantindria la seva sobreexpressió a través d'algun mecanisme alternatiu a β -catenina i més relacionat amb la regulació del balanç de Ca^{2+} .

Discussió general

El nostre estudi valida la idea, generalment estesa, de que els gens localitzats en regions recurrents de pèrdua d'heterozigositat o altres alteracions estructurals són rellevants per al procés tumoral, independentment de la presència o no de pèrdues al·lèliques. És important però, parlar de tota la informació citogenètica, ja que sembla també bastant establert que un escenari de CIN és poc compatible amb l'acumulació de les alteracions genètiques somàtiques característiques dels gens supressors tumorals. Respecte a les alteracions a 4p, podem afirmar que, al menys en CCR, la elevada incidència de LOH és el resultat d'una inestabilitat genòmica subjacent. Cap dels 20 CCR xenoempeltats, analitzats tant per LOH com per FISH, presenten MIN. Seria interessant avaluar quina és la incidència de les pèrdues al·lèliques a la Regió A en aquest subgrup de CCR. Probablement, en el cas de donar-se en la mateixa proporció, serien millors candidats a patir les inactivacions bial·lèliques pròpies d'un gen supressor tumoral.

L'estratègia que hem dut a terme en aquest treball pot ser de gran utilitat per a la identificació de nous gens amb potencial oncogènic, supressor tumoral, o modulador de la resposta al tractament quimioteràpic. Quan les alteracions en les cèl·lules tumorals són subtils, els models de xenoempelt esdevenen de gran utilitat, ja que ofereixen la possibilitat de treballar amb la puresa d'una línia cel·lular en un model tridimensional, molt més fisiològic, amb presència de vasos i tots els components de la matriu extracel·lular. Malgrat els inconvenients que ja s'han esmentat, la capacitat de generar metàstasis *in vivo* a partir de tumors humans, permet estudiar la possible adquisició d'aberracions genètiques en aquest estadi de la carcinogènesi.

Aprofundir en els mecanismes moleculars de resposta i resistència als tractaments quimioteràpics o dirigits a dianes específiques, són un dels majors reptes de la investigació en càncer. El coneixement d'aquests mecanismes ha de conduir-nos a un millor enteniment de la biologia molecular del càncer i, el que és més important, al desenvolupament de nous agents o estratègies terapèutiques. Calen eines que permetin als facultatius clínics, poder destriar quins pacients es beneficiaran en major mesura d'un tractament, i al mateix temps, evitar l'acarnissament terapèutic en aquells que, pel seu perfil molecular d'expressió, formen part dels que no respondran a la teràpia. En aquest treball hem identificat dos gens que estan molt

freqüentment alterats en CCR. La sobreexpressió d'un d'ells *PI4K2B*, ha demostrat ser un bon marcador del pronòstic i de la resposta al tractament amb 5-FU. La validació dels nostres resultats per altres investigadors i amb altres sèries tumorals és fonamental per a una hipotètica futura incorporació de l'ús d'aquest biomarcador en la pràctica clínica. Tanmateix, els nostres resultats obren la porta a avaluar quina és la rellevància dels nivells d'expressió d'aquests dos gens en altres tipus tumorals.

Si bé es cert que no hem trobat cap associació entre l'expressió de *STIM2* i el pronòstic dels malalts de CCR no vol dir que no hi estigui implicat. Hem pogut demostrar que ambdós gens es troben sota control transcripcional de Wnt/ β -catenina. En el model de progressió tumoral proposat per Fearon i Vogelstein, l'alteració d'aquesta via, es troba en l'origen de l'aparició del CCR. Les conseqüències d'aquestes alteracions, tenen un impacte en el posterior desenvolupament i en l'aparició de metàstasis, i per suposat, contribueixen a la CIN. És per això que els nostres resultats amplien el coneixement sobre l'impacte de les alteracions de la via de Wnt, al mateix temps que apunten a la rellevància de les vies de Wnt independents de β -catenina i principalment a les vies de Ca^{2+} .

Els resultats dels anàlisis funcionals l'assenyalen *STIM2* com un mediador cabdal en la regulació de l'homeòstasi del Ca^{2+} , i per tant, de l'activació de cascades de senyalització fonamentals com Ras/Raf/MAPK, calci/calcineurina, i CamKII/PKC. Aquests mateixos experiments apunten també a *PI4K2B* com agent partícep d'aquesta senyalització per Ca^{2+} . El seu paper però, possiblement tingui més a veure amb les conseqüències de l'increment dels nivells intracel·lulars de Ca^{2+} , generats per un trencament d'aquesta homeòstasi.

El paper de la desregulació del Ca^{2+} en els diferents compartiments cel·lulars durant el desenvolupament del càncer, i concretament en el CCR, està poc estudiat. La majoria de treballs, de caire epidemiològic, fan referència als beneficis de la incorporació de dietes riques en calci en la prevenció de l'aparició de pòlips. Són molts els indicis que apunten a que aquest ió està jugant un paper central en el *crossstalk* entre diverses vies de senyalització. Com ja hem esmentat, nosaltres hipotetitzem que *PI4K2B* i *STIM2* són membres de la via anomenada Wnt/ Ca^{2+} . Pensem que seria de gran importància identificar els diferents membres d'aquesta via de cara a poder

entendre quin paper hi juga en processos com l'apoptosi, la proliferació, l'angiogènesi o la metàstasi.