

Identificació de nous marcadors moleculars en metàstasi hepàtica de càncer colorectal

Laura Padullés Mosella

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**IDENTIFICACIÓ DE NOUS MARCADORS MOLECULARS EN METÀSTASI
HEPÀTICA DE CÀNCER COLORECTAL**

Memòria presentada per
Laura Padullés Mosella

Per optar al grau de doctora 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 (ICO)

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la facultat de biologia
Universitat de Barcelona (UB)
Programa de genètica (bienni 2004-2006)

Alberto Villanueva
Director

Bru Cormand
Tutor

Laura Padullés
Doctoranda

Barcelona, febrer del 2010

Dedico aquesta tesi a tothom qui l'heu fet possible,
que sou molts, i especialment als meus pares.

Escriure una tesi no és fàcil, ningú em va dir mai que ho seria i potser per això quan finalment arriba el moment d'escriure els agraïments no pots evitar tenir una sensació de nostàlgia per aquests darrers anys. Diuen que com més esforç i dedicació necessites per aconseguir alguna cosa, més orgullós n'estàs. Tot i els entrebancs, estic contenta del resultat final.

Sempre havia pensat que aquesta primera pàgina de la tesi, que tothom sap que és la més llegida, em costaria molt escriure-la perquè els que em coneixeu, ja sabeu que sóc una persona de poques paraules. Però ara tinc ganes d'agrair per escrit la vostra ajuda i suport, doncs altrament potser hagués abandonat a mig camí.

Crec que serà complicat trobar un ambient de treball com el que hi ha al laboratori, la veritat és que aquesta feina és poc agraïda, cal tenir molta paciència, repetir experiments i tot això amb un sou de becari! Per això, quan no surten les coses, sobretot al principi, s'agraeix tenir companys com vosaltres. Trobaré a faltar aquest "bon rotllo" i m'enduc un bon record de tots.

Els meus inicis al laboratori podríem dir que van ser "tempestuosos", estava enmig de dues aigües, l'Alberto i el Gabi, i les coses no acabaven de sortir del tot bé. Gabi, gràcies per confiar en mi i donar-me la possibilitat d'aportar el meu granet de sorra en la recerca contra el càncer; tot i que al final em vaig establir al grup de CCR, sempre t'has preocupat que m'anés bé. Alberto, gracias por hacerme ver siempre el lado positivo de los resultados obtenidos, tu confianza, tu soporte y por este último empujón que has hecho levantándote a la tantas de la madrugada para corregir mi tesis y depositar a tiempo.

Ara em toca agrair l'ajuda que he rebut de la gent més propera a mi a la "poyata", el grup de CCR!!! Maria, has estat la meva referència des del dia que vaig entrar per la porta del laboratori, podríem dir que m'ho has ensenyat pràcticament tot i que sense tu hauria estat impossible arribar fins aquí. Gràcies per la teva complicitat i també pels teus coneixements científics i informàtics! David, no oblidaré mai la teva visió crítica de les coses, en ciència i en general. Álvaro, sempre amb les teves teories filosòfiques de la vida i el teu humor característic, m'has fet riure molt. I les últimes incorporacions al grup, la Clara, la meva veïna de "poyata", espero que et servissin les meves explicacions del "lightcycler", i la Mireia, sempre amb aquell "estira i arronsa" d'indirectes que feien que la feina fos menys avorrida. Sara, siempre dispuesta a ayudar y a trabajar con una sonrisa. Per cert, Mireia i Sara, un plaer haver compartit amb vosaltres el viatge a Tailàndia, va ser divertit. I finalment, tot i no veure-us al dia a dia, els "medicuxos" del grup, el Piuli, la Núria, la Virginia i la Cristina, també en tinc un bon record de vosaltres.

A la gent de RATG, i sobretot a la Sònia (tant ens assemblàvem?) i a l'Alena, a la gent d'Angio, al Marc, a la Gemma, a l'Ester, a la Laia, a la Griselda, a la Marga i a tothom

en general. Hem passat bons moments junts, a la muntanya, de festa, esquiant, jugant a volei, a la màquina de cafè... jo no n'he pres mai de cafè, però per riure una estona i desconnectar de la feina és el millor remei.

Tampoc m'oblido de la gent que ja ha marxat: l'Antònia, un petó cap a "ses illes"; el Felip, sempre tan singular; l'Ari, amb aquella il·lusió en tot el que fas, i el Josep Maria, sempre amb un somriure per davant. Us he trobat a faltar aquests últims mesos o anys que ja no hi éreu. A tu també Álvaro!

L'estadística no és ni serà mai el meu fort i sort n'he tingut del Toni que m'ha donat un cop de mà, junts hem après a saber interpretar els resultats.

No voldria oblidar-me del ratolinets, que són tan importants en la investigació i que tant m'heu fet patir a l'estabulari. Vosaltres sí que ho heu donat tot per la ciència!

També voldria mencionar les meves amigues, la Míriam, la Marta, l'Anna i l'Àngels, que tot i seguir camins diferents sempre trobem temps per sortir a sopar.

M'agradaria explicar que quan vaig entrar al LRT per primera vegada em vaig espantar una mica, era un laboratori tan gran que jo m'hi veia massa petita, però sempre recordaré les paraules del meu pare quan em deia que no podia deixar passar una oportunitat només perquè em fes por. Crec que és un bon consell, et vaig fer cas Papa i ara ja puc dir que sóc doctora!!! Mama, gràcies pel teu suport incondicional i per una abraçada sempre que l'he necessitat. Núria, tot i algun que altre crit, sempre fas bona cara i això és d'agrair.

A tota la meva família, i sobretot als meus avis, sempre orgullosos dels néts, gràcies per creure en el que faig.

Em falta mencionar una persona, en Ferran, tot i no entendre res del que t'explicava sobre els gens, la metilació, els "lightcyclers" i els meus maldecaps al laboratori, sempre has estat a prop per escoltar-me quan ho he necessitat. Gràcies per ser com ets.

Al final no ha estat tan dur com em pensava això d'escriure els agraïments, fins i tot crec que és necessari per poder tancar aquesta etapa. Però no vull que això soni a comiat, seguim en contacte.

Gràcies a tots!!!

A reveure.

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	5
1. ETIOLOGIA I BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER	7
1.1 Història del càncer.....	7
1.2 Genètica del càncer	8
1.3 Transició epiteli mesènquima (EMT).....	11
2. CÀNCER COLORECTAL (CCR)	12
2.1 Epidemiologia del càncer de còlon	12
2.2 Formes hereditàries.....	13
2.3 Anatomia del còlon i recte	14
2.4 Seqüència adenoma-carcinoma.....	17
2.5 Inestabilitat genètica/epigenètica.....	17
2.6 Estadiatge i classificació del càncer colorectal.....	19
2.7 Tractament del càncer de còlon.....	21
2.9 Perfils d'expressió en càncer colorectal	30
3. MODELS DE DISSEMINACIÓ A DISTÀNCIA	32
3.1 Seqüència tumor primari-metàstasi	32
3.2 Teories del desenvolupament metastàtic	34
3.3 Teoria de "seed and soil"	36
3.4 Equilibri homeostàtic entre cèl·lula tumoral i estroma.....	37
HIPÒTESI	41
OBJECTIUS	45
RESULTATS	49
ARTICLE 1	51
<i>LIVER METASTASIS SIGNATURE AS PROGNOSTIC GENES OF DISTANT DISSEMINATION IN STAGE III COLORECTAL CANCER</i>	
ARTICLE 2	119
<i>ALU ELEMENTS' METHYLATION ANALYSIS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER</i>	
DISCUSSIÓ	159
CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFIA	183
ANNEX	197



ABREVIATURES

ACF:	Focus de Criptes Aberrants
ADN:	Àcid desoxiribonucleic
AIMS:	<i>Amplification of Intermethylated Sites</i>
APC:	<i>Adenomatous Polyposis coli</i>
ARN:	Àcid ribonucleic
AUMA:	<i>Amplification of Unmethylated Alu</i>
AZA:	5-azacytidine / 5-aza-2'-deoxycytidine
CAFs:	<i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
CCR:	Càncer Colorectal
CCRm:	Càncer Colorectal metastàtic
CEACAM7:	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7</i>
CIMP:	<i>CpG island Methylator Phenotype</i>
CIN:	Inestabilitat cromosòmica
CLCA4:	<i>Chloride channel calcium activated 4</i>
CYP1B1:	<i>Cytochrome P450 family 1, subfamily B, polypeptide 1</i>
dMMR:	Deficiència del sistema "mismatch repair"
DNMTs:	<i>DNA methyltransferases</i>
DPD:	<i>Dihydropyrimidine dehydrogenase</i>
ECM:	Matriu extracel·lular
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT:	Transició Epiteli-Mesènquima
FAP:	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
FOLFIRI:	Irinotecà + 5-fluorouracil+ leucovorín
FOLFOX:	Oxaliplatí + 5-fluorouracil+ leucovorín
HNPCC:	<i>Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer</i>
LC:	LightCycler
LCM:	<i>Laser Capture/Cutting Microdissection</i>

LOH:	<i>Loss of Heterozygosity</i>
LOI:	<i>Loss of imprinting</i>
LV:	Leucovorín
MET:	Transició Mesènquima-Epiteli
MH:	Metàstasi Hepàtica
MMP:	<i>Matrix Metalloproteinasa</i>
mRNA:	Àcid desoxiribonucleic missatger
MS-HRM:	<i>Methylation-sensitive high-resolution melting</i>
MSI:	Inestabilitat de Microsatèl·lits
MSP:	<i>Methylation-specific PCR</i>
MS4A12:	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 12</i>
Pb:	Parells de bases
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET/CT:	<i>Positron Emission Tomography/Computerized Tomography</i>
qPCR:	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SPP1:	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
TAMs:	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TGFβ:	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
Tm:	Temperatura de “melting”
TP:	<i>Thymidine phosphorylase</i>
TS:	<i>Thymidylate synthase</i>
TSA:	Trichostatin A
uPA:	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth factor</i>
WT:	<i>Wild type</i>
5-FU:	5-fluorouracil



INTRODUCCIÓ

1. ETIOLOGIA I BIOLOGIA MOLECULAR DEL CÀNCER

El **càncer** és la proliferació accelerada, desordenada i incontrolada de determinades cèl·lules que envaeixen, desplacen i destrueixen, localment i a distància, teixits sans de l'organisme.

1.1 Història del càncer

La paraula "càncer" deriva del grec i significa "cranc" per la visió que els nostres avantpassats tenien de la malaltia capaç de ramificar-se i adherir-se a tot els òrgans sans que tocava trobant així el paral·lelisme amb el cranc marí.

Les primeres evidències de càncer en humans es troben en homínids fossilitzats de fa 4 milions d'anys i en mòmies de l'antic Egipte datades de l'any 3000 a.C. quan les creences religioses de l'època atribuïen l'etiologia de la malaltia als Déus. No va ser fins a la invenció del microscopi que va començar la idea revolucionària que el càncer era una malaltia caracteritzada per l'alteració de la integritat cel·lular.

Peyton Rous va descobrir l'any 1911 el virus del sarcoma de Rous (RSV) en pollastres fet que li va merèixer un premi Nobel l'any 1966 (Rous, 1911). Durant els anys següents els virus es veien com agents infecciosos capaços d'induir càncer però la realitat és que una baixa proporció dels tumors humans (15-20%) es poden atribuir a virus com a causa principal de la malaltia. Alguns exemples són el virus de l'hepatitis C (HCV) o el virus del papil·loma humà (HPV). Cal destacar la importància dels virus en l'oncologia doncs el nom de molts oncògens fan referència al virus on van ser identificats per primera vegada com per exemple *MYC* (Avian **MY**elo**C**ytomatosis virus) o *RAS* (**RA**t Sarcoma virus) (Javier and Butel, 2008).

1.2 Genètica del càncer

1.2.1 Els gens del càncer

El càncer és una malaltia genètica complexa que s'origina per l'acumulació al llarg del temps de múltiples alteracions (entre 5 i 10) en una única cèl·lula adquirint així el fenotip maligne. Existeixen variants hereditàries en alguns tipus de càncer com poden ser el de mama o el de còlon, on l'herència de determinades alteracions genètiques augmenta la predisposició o risc a patir la malaltia però en general no és correcte parlar del càncer com una malaltia hereditària.

Cal tenir present que al factor genètic de la malaltia s'hi ha de sumar la importància dels factors ambientals; així doncs, el tabac en càncer de pulmó, la dieta en càncer colorectal o l'exposició solar en melanoma, poden ser factors limitants a l'hora de desencadenar o no la malaltia.

Les alteracions genètiques del càncer les trobem en tres tipus de gens:

Oncògens: gens involucrats en el creixement cel·lular que es troben sobreactivats en tumors donant lloc a un creixement descontrolat. La mutació en aquests gens és de tipus dominant sent suficient l'alteració d'una còpia del gen per adquirir un guany de funció. Alguns oncògens implicats en càncer són *RAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR* i *CCND1*.

Gens supressors de tumors: també anomenats col·loquialment "guardians del genoma" ja que, quan es detecta algun dany al genoma, s'encarreguen d'aturar la divisió cel·lular i fins i tot de promoure l'apoptosi (mort cel·lular programada). Aquests gens són recessius, de forma que és necessària la inactivació d'ambdues còpies per silenciar-los. Alguns exemples són *RB*, *APC*, *TP53* o *SMAD4*.

Gens de reparació de l'ADN: la funció d'aquests gens és mantenir la integritat del genoma i corregir errors que succeeixen durant la replicació evitant la seva propagació. Quan el sistema de reparació és defectuós augmenta la taxa global de mutacions. Pertanyen a aquest grup gens com *MSH2*, *MLH1* o *BUB-1*.

El càncer és una malaltia complexa i són moltes les vies moleculars que participen en la transformació cel·lular fins a l'adquisició del fenotip tumoral. A més a més, existeixen múltiples interaccions entre les diferents vies formant xarxes interrelacionades.

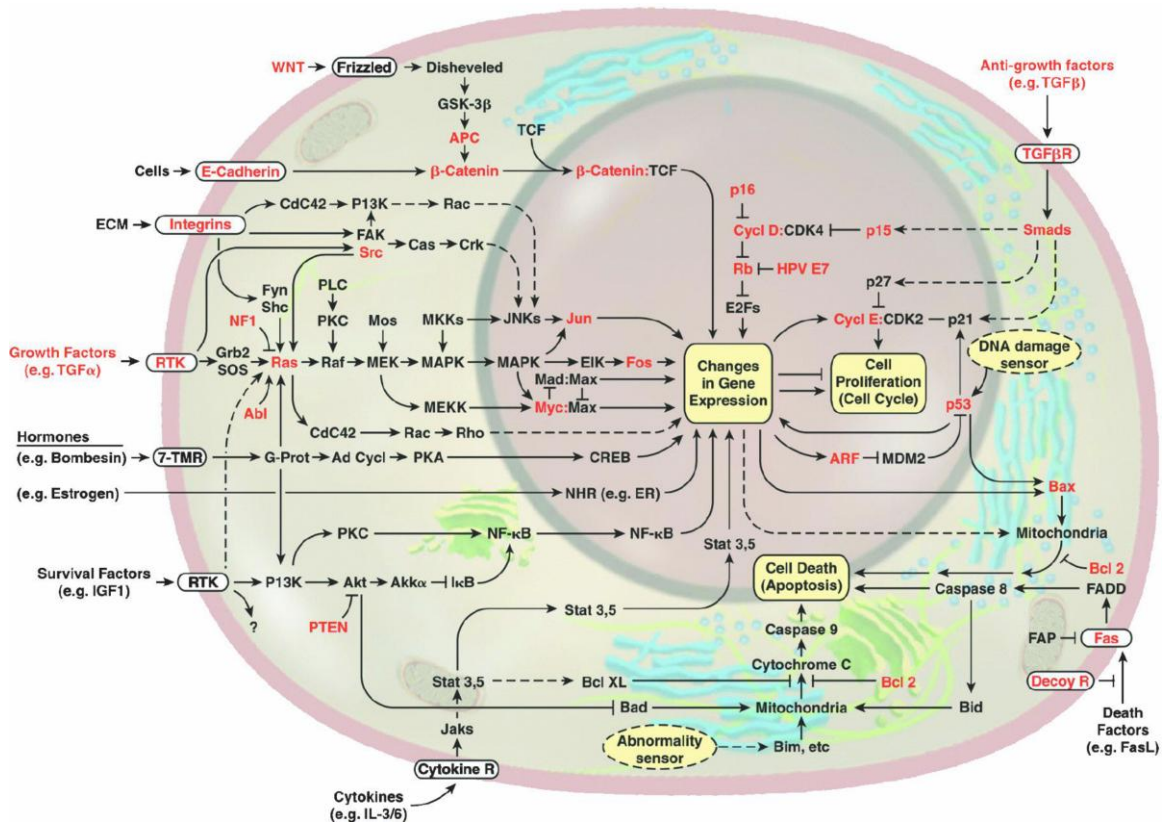


Figura 1: Vies metabòliques principals que participen en el càncer. Imatge extreta de (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.2.2 Equilibri de Hanahan & Weinberg

La tumorigènesi és un procés progressiu d'acumulació d'alteracions que confereixen avantatges selectius de creixement a una cèl·lula normal i la transformen fins obtenir un fenotip maligne. L'adquisició d'aquestes alteracions necessita temps, motiu pel qual es diu que la incidència d'alguns càncers és edat dependent.

S'ha descrit que la cèl·lula tumoral manifesta 6 alteracions essencials comuns en tots els tipus de càncers independentment de l'ordre cronològic i el mecanisme d'adquisició de cadascuna d'elles (Hanahan and Weinberg, 2000):

- **Independència a factors de creixement externs:** la cèl·lula tumoral és autosuficient ja que genera els seus propis factors de creixement i per tant no depèn de l'estimulació ambiental.

- **Insensibilització als senyals antiproliferatius:** l'organisme s'autoregula i manté l'homeòstasis (equilibri intern) mitjançant mecanismes capaços d'aturar el cicle cel·lular, fet que la cèl·lula tumoral ha d'evitar per poder prosperar. Mutacions a la via de *RB* (Retinoblastoma) estan implicades en aquesta insensibilització.

- **Evasió de l'apoptosi:** el creixement descontrolat dels tumors es deu a un augment de la proliferació però també a una disminució de la mort cel·lular programada (apoptosi). La mutació al gen *TP53* evita la cascada apoptòtica que es produeix en condicions normals quan es detecta danys a l'ADN.

- **Potencial replicatiu il·limitat:** les cèl·lules normals estan programades per replicar-se un nombre concret de vegades, fet que es coneix com a **senescència** i que es deu a l'escurçament dels telòmers (extrems dels cromosomes) en cada divisió cel·lular. La cèl·lula tumoral, en canvi, és capaç de mantenir els telòmers i així multiplicar-se sense límit.

- **Angiogènesis:** el tumor necessita aportacions regulars d'oxigen i nutrients per garantir la viabilitat cel·lular que aconsegueix amb la formació de nous vasos sanguinis (angiogènesis). Aquest procés de neovascularització és important durant el

desenvolupament embrionari però, en condicions normals, una vegada els òrgans estan formats l'angiogènesi és fortament regulada per l'organisme.

- **Invasió i metàstasi:** la capacitat d'invasió permet a la cèl·lula tumoral colonitzar nous òrgans, sent la disseminació a distància la principal causa de mort dels pacients amb càncer.

1.3 Transició epiteli mesènquima (EMT)

L'EMT és un programa cel·lular reversible i altament conservat que permet la transformació de les cèl·lules epitelials en mesenquimals. S'ha vist que aquest és un procés típic en el desenvolupament embrionari involucrat en processos tals com la formació del mesoderm, el desenvolupament de la cresta neural i la formació de la vàlvula cardíaca o el segon paladar.

L'EMT té un paper rellevant en processos tumorigènics promovent la capacitat de motilitat i invasió, típiques del fenotip metastàtic. Un cop la cèl·lula tumoral arriba a l'òrgan diana a metastatitzar, és necessària la reversió d'aquest procés que es coneix com MET (Transició Mesènquima-Epiteli) per tal de permetre el creixement tumoral al nou microambient (Bates and Mercurio, 2005) (Yang and Weinberg, 2008).

L'EMT es caracteritza per l'adquisició de 3 canvis fenotípics clars:

- Canvis morfològics: la conversió de cèl·lules estàtiques en cèl·lules mòbils és pot apreciar en la morfologia mesenquimal característica amb fil·lopodis i altres estructures migratòries que no existeixen en la cèl·lula epitelial.
- Marcadors de diferenciació: cada tipus cel·lular presenta diferents proteïnes d'unió cèl·lula-cèl·lula i els filaments intermedis passen a ser de citoqueratina a vimentina i fibronectina.
- Canvis funcionals: la cèl·lula epitelial només pot migrar lateralment a causa de les múltiples unions intercel·lulars i la seva polaritat apical-basal, mentre que la cèl·lula mesenquimal, és capaç de migrar i envair la matriu extracel·lular.

2. CÀNCER COLORECTAL (CCR)

2.1 Epidemiologia del càncer de còlon

El càncer és la segona causa de mort després de les malalties cardíaques als països desenvolupats on s'estima que una de cada tres persones acabarà manifestant un càncer en algun moment de la seva vida. Als països del tercer món, les principals causes de mort són les malalties cardiovasculars, els desordres intestinals i en tercer lloc trobaríem el càncer. A nivell mundial moren aproximadament 7 milions de persones cada any víctimes d'aquesta malaltia.

El càncer colorectal (CCR) és el tercer més freqüent a tot el món, després del càncer de pulmó i de mama, amb 1.023.256 casos nous i 529.020 morts anuals i per tant amb una mortalitat aproximada del 51% segons dades de l'estudi GLOBOCAN 2002 (Kamangar et al., 2006; Parkin et al., 2005).

El CCR és un tipus de tumor que afecta per igual ambdós sexes tot i que amb una incidència lleugerament més alta en homes (54%). La incidència creixent en els últims anys, sent més elevada en països desenvolupats, es deu a l'envelliment de la població i als nous estils de vida. La dieta és un dels factors ambientals més rellevants que pot influir en el risc de desenvolupar un tumor colorectal. S'ha vist que el consum de fibra pot tenir efectes preventius, mentre que la ingesta de carn vermella podria fer augmentar el risc de patir la malaltia (Marshall, 2008; Willett et al., 1990).

Com en tots els tipus de càncer la prevenció i el diagnòstic precoç són els dos factors clau en la lluita contra aquesta malaltia. La colonoscòpia, en el cas del CCR, és la tècnica utilitzada per detectar pòlips abans que esdevinguin carcinomes. La taxa de supervivència als 5 anys dels pacients diagnosticats de CCR en estadis primerencs és superior al 90% mentre que els casos de càncers disseminats la supervivència disminueix fins al 10%.

El 70% dels pacients amb CCR farà disseminació a distància en algun moment al llarg de la malaltia. La presència de metàstasis, principalment hepàtica (MH) i en menor

freqüència pulmonar, és la principal causa de mort en CCR. En un 10-25% dels casos la metàstasi es diagnostica alhora que el tumor primari o en els 6 mesos següents a la intervenció quirúrgica del còlon (colectomia) rebent el nom de metàstasi **sincrònica**; en canvi, quan és detectada passats 6 mesos des del diagnòstic del primari, que és el més habitual, parlem de metàstasi **metacrònica**.

2.2 Formes hereditàries

La gran majoria de tumors colorectals són d'origen **esporàdic** però existeix un 30% de pacients que tenen **familiars** directes afectats i un 5-10% que presenten mutacions a la línia germinal i que anomenem casos **hereditaris**. Tot i això, les formes hereditàries més habituals en CCR són (Gatalica and Torlakovic, 2008):

- **HNPCC** (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) o síndrome de Lynch: es tracta de la forma hereditària més comú tenint una prevalença del 3-5% del total de casos de CCR. Malaltia autosòmica dominant causada per mutacions germinals en gens del sistema MMR (*mismatch repair*) provocant un mal funcionament de la maquinària de reparació de mutacions a l'ADN. S'han descrit 5 gens implicats en la malaltia: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* i *PMS2*. Els dos primers són els causants del 90% dels casos de HNPCC. L'edat mitjana d'aparició és 40-45 anys i una característica típica d'aquests pacients és la presència d'inestabilitat en marcadors de tipus microsatèl·lits (MSI). (Lynch et al., 2004)
- **FAP** (*Familial Adenomatous Polyposis*): malaltia autosòmica dominant causant del 1% de casos de CCR i en la qual el 80% dels afectats tenen una mutació germinal al gen *APC* així com altres mutacions als oncògens *P53* o *KRAS*. Els pacients de FAP poden arribar a desenvolupar més de 100 adenomes o pòlips adenomatosos al còlon que, en cas de no ser tractats de forma profilàctica (colectomia), acaben desenvolupant CCR al voltant dels 40 anys. Aquests

tumors acostumen a presentar inestabilitat cromosòmica (CIN) i aneuploidia. Molts casos van acompanyats de lesions extracolòniques com hipertròfia congènita de retina o tumors desmoides. Existeix una forma atenuada de FAP, anomenada AFAP, que es caracteritza per la presència de múltiples adenomes (menys de 100), l'aparició de la malaltia en edats més tardanes, l'absència de lesions extracolòniques i per la manca de mutacions o presència de mutacions de significat incert (Rozen and Macrae, 2006).

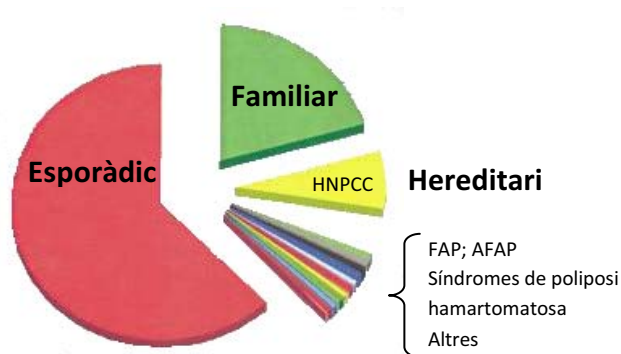


Figura 2: Tipus de CCR en funció dels antecedents familiars.

Imatge extreta de (Lynch et al., 2004).

2.3 Anatomia del còlon i recte

L'epiteli gastrointestinal, igual que l'epidermis, constitueix una barrera entre l'organisme i el món exterior. Mentre que l'epidermis està formada per múltiples capes cel·lulars, l'epiteli intestinal consisteix en una monocapa de cèl·lules epitelials que es poden classificar en 4 grups: **(a)** enterocits responsables de la secreció d'hidrolases i absorció de nutrients, **(b)** cèl·lules Globet secretores de mucines, **(c)** cèl·lules enteroendocrines productores d'hormones i **(d)** cèl·lules Paneth (només a l'intestí prim) secretores d'agents antibacterians com els lisoenzims.

Anatòmicament, el còlon es divideix en ascendent, transvers, descendent i sigmoide. A nivell clínic-patològic, en canvi, es simplifica en dues parts, el còlon proximal o

dret, que inclou el cec, l'ascendent i el transvers; i el còlon distal o esquerre, format pel còlon descendent, el sigmoide i el recte (**Figura 3A**).

Aproximadament el 23% de les neoplàsies colorectals es localitzen al recte, el 10% a la unió rectosigmoide, el 25% al sigma, el 6% al còlon descendent, el 13% al còlon transvers i el 22% al còlon dret. Alguns autors consideren que el CCR hauria d'estudiar-se com si fossin tres entitats diferents ja que segons la localització anatòmica del tumor existeixen diferències en varis aspectes, com per exemple el pronòstic de la malaltia que acostuma a ser pitjor pels tumors de recte (Li and Lai, 2009).

L'epiteli intestinal està compost per petites cavitats anomenades criptes de Lieberkühn on té lloc l'homeòstasi o renovació contínua de epiteli. Les cèl·lules mare pluripotents es troben a la base de les criptes colòniques i la proliferació cel·lular es dona a les dues terceres parts inferiors de les criptes, mentre que les cèl·lules ja diferenciades viatgen fins al terç superior. Quan les cèl·lules arriben a la superfície, uns 5 dies després, aquestes pateixen un procés d'apoptosi o extrusió al lumen (Radtke and Clevers, 2005) (**Figura 3B**).

La primera lesió identificable histològicament en la seqüència adenoma-carcinoma de CCR és el que s'anomena **focus de cripta aberrant** (ACF) que és una petita lesió displàsica a l'epiteli colònic. Existeixen dues teories sobre l'origen i creixement de les ACFs per acabar desenvolupant un tumor. El primer model en aparèixer va ser el "**top-down**" (Shih et al., 2001) que proposa una expansió lateral de les cèl·lules mutants per la superfície colònica envaint així les criptes veïnes. El segon model és l'anomenat "**bottom-up**" (Preston et al., 2003) que consisteix en la divisió de ACFs donant lloc a vàries criptes afectes expandint així la lesió tumoral des de la base de les criptes cap a la superfície epitelial.

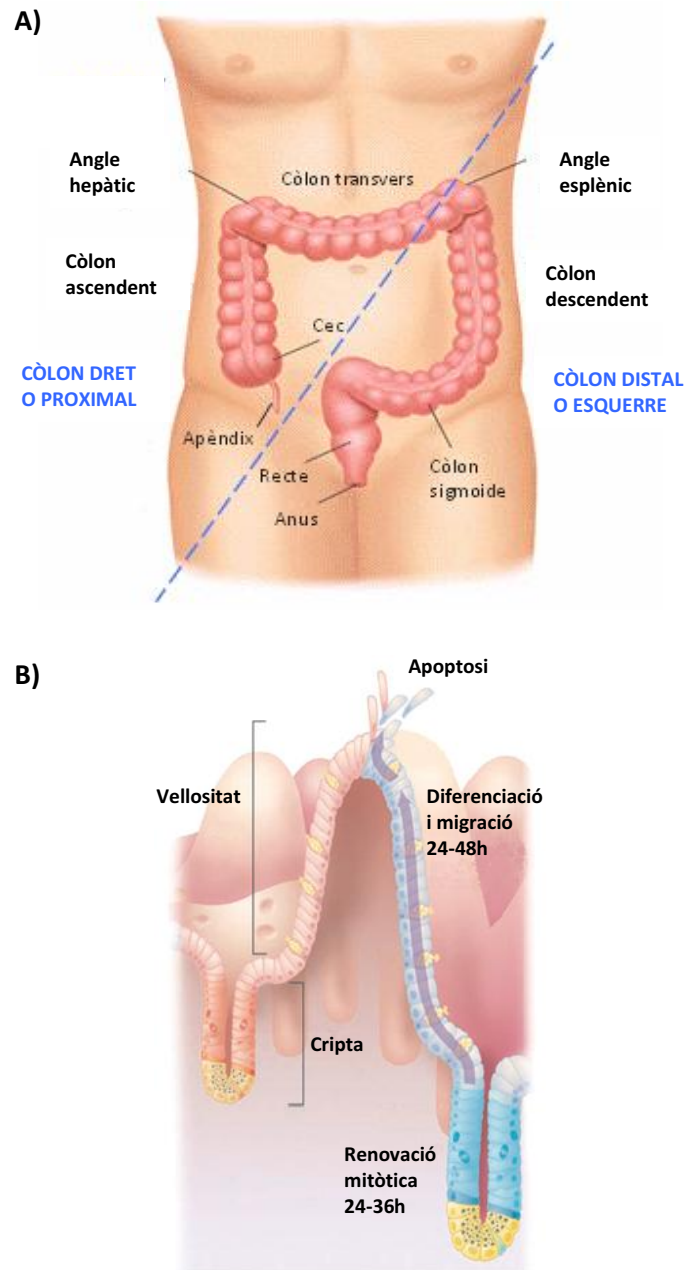


Figura 3: A) Anatomia de l'intestí gros. Divisions anatòmiques en negre i divisions clinicopatològiques en blau; **B) Renovació de l'epiteli intestinal.** Imatge extreta de (Radtke and Clevers, 2005).

2.4 Seqüència adenoma-carcinoma

La teoria que proposa el CCR com un procés seqüencial d'acumulació d'alteracions al genoma va aparèixer per primera vegada els anys 50 (Foulds, 1958) i ha estat acceptada per la comunitat científica fins a l'actualitat. Basant-se en aquesta teoria, Fearon i Vogelstein van proposar un model genètic per explicar la neoplàsia colorectal (Fearon and Vogelstein, 1990) que recull els següents punts:

- Els tumors colorectals apareixen com a resultat de l'activació d'oncògens junt amb la inactivació de gens supressors tumorals
- Són necessàries com a mínim mutacions en 4 o 5 gens per desenvolupar un tumor maligne
- Les propietats del tumor depenen del total d'alteracions acumulades més que de l'ordre en què es van adquirir
- En alguns casos, mutacions en heterozigosi de determinats gens supressors de tumors són suficients per donar efectes fenotípics

2.5 Inestabilitat genètica/epigenètica

El càncer sorgeix com a conseqüència de l'acumulació d'alteracions genètiques (mutacions, amplificacions, translocacions...) i epigenètiques (metilació aberrant, modificació de la cromatina...). La gran quantitat d'alteracions en tumors es creu que pot ser causa **(a)** d'un increment en la taxa d'adquisició degut a la inestabilitat tumoral o **(b)** d'un procés de selecció i expansió clonal anàleg a la teoria de l'evolució Darwiniana (Tomlinson et al., 1996). Tot i això, l'existència d'un nombre desmesurat d'alteracions en tumors no implica que aquests siguin inestables.

S'han identificat tres mecanismes que incrementen la inestabilitat en càncer:

- **Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI):** canvi en la llargada dels microsatèl·lits (seqüències curtes i repetitives al genoma). Succeeix en el 15-20% dels casos de CCR esporàdic i en >95% dels casos de CCR hereditari de tipus HNPCC. Es caracteritza per la inactivació del sistema *mismatch repair* (MMR) encarregat de

reconèixer i reparar mutacions puntuals a l'ADN. La MSI comporta per tant un increment en la taxa de mutacions ja que aquestes no podran ser reparades eficientment. En CCR s'ha arribat a un consens i la presència de MSI s'analitza mitjançant un panell de 5 marcadors microsatèl·lit (D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 i BAT26) aprovats pel NCI (*National Cancer Institute*) (Boland et al., 1998).

- **Inestabilitat cromosòmica (CIN):** es tracta del tipus d'inestabilitat més comú en CCR present en el 80-85% dels casos. Existeixen diverses formes de CIN: (a) canvis subtils com substitucions, delecions o insercions gèniques, (b) aneuploidia o alteracions en el nombre de cromosomes, (c) rearranjaments cromosòmics, (d) amplificacions gèniques. Els casos amb CIN presenten amb freqüència el fenomen de pèrdua d'heterozigositat o LOH (Loss of Heterozygosity).
- **Fenotip metilador d'illes CpG (CIMP):** a part de la inestabilitat genètica, la inestabilitat epigenètica també és molt comú en CCR. El CIMP es pot trobar en el 35-40% dels casos de càncer colorectal i es caracteritza per la metilació aberrant de la regió promotora de gens supressors tumorals que pot anar acompanyada de repressió transcripcional. La hipermetilació es dona majoritàriament en estadis primerencs de la tumorigènesi. Normalment el CIMP es correlaciona amb la presència de mutacions als gens *BRAF* i *KRAS* (Issa, 2004; Toyota et al., 1999).

S'ha demostrat que CIN i CIMP són dos mecanismes moleculars independents d'inestabilitat en CCR mentre que la presència d'inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) sembla estar lligada a CIMP (Goel et al., 2007). Així per exemple, la hipermetilació del gen *hMLH1* succeeix en >80% dels casos esporàdics de CCR amb MSI tot i que existeix també un 25% de casos amb CIMP sense MSI.

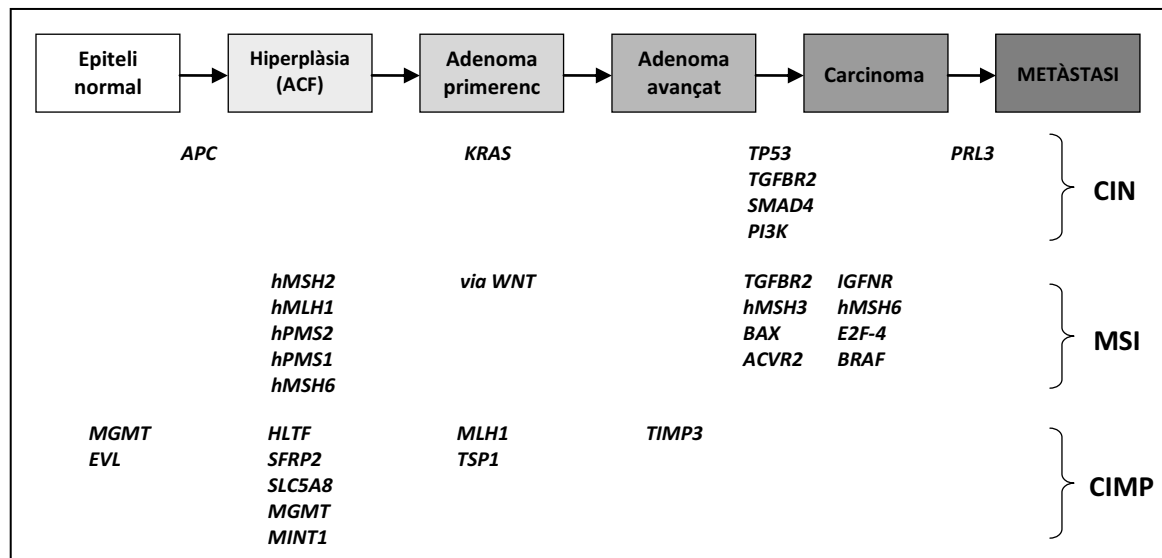


Figura 4: Gens típicament mutats/hipermetilats en CCR amb inestabilitat genètica/epigenètica del tipus CIN, MSI o CIMP. Imatge modificada de (Grady and Carethers, 2008).

2.6 Estadiatge i classificació del càncer colorectal

L'estadi d'un pacient amb CCR es defineix en funció del grau d'invasió i infiltració en les diferents capes de la paret intestinal, de l'afectació de ganglis limfàtics i de la presència de metàstasis a distància en el moment del diagnòstic. Aquests 3 paràmetres són utilitzats a la clínica per establir el pronòstic d'un determinat pacient; són per tant **factors pronòstic** de CCR.

L'any 1932 va aparèixer el primer intent de classificació de tumors de CCR (Dukes, 1932) a partir de l'observació de 215 casos de càncer de recte, els quals es van categoritzar en 3 grups: Tipus A quan la malaltia estava limitada a la paret intestinal, Tipus B quan la lesió s'estenia fins a teixits adjacents i Tipus C quan hi havia nòduls limfàtics afectats. No va ser fins l'any 1954 que la classificació de Dukes es va modificar lleugerament (Astler and Collier, 1954). Finalment, l'any 1987 l'*International Union Against Cancer* (UICC) (Hermanek et al., 1987) establí el sistema actual anomenat TNM que, a diferència dels anteriors sistemes de

classificació, té en compte el nombre de nòduls limfàtics afectats. Les sigles TNM fan referència a l'extensió del tumor primari (T), la presència de nòduls limfàtics afectats (N) i la presència de metàstasi a distància (M).

A)

Estadi	TNM	Dukes	Astler-Coller	Supervivència als 5 anys		
0	Tis	N0	M0	----	----	96-100%
I	T1 o T2	N0	M0	A	A i B1	90%
II	T3 o T4	N0	M0	B	B2 i B3	50-75%
III	Qualsevol T	N1 o N2	M0	C	C1, C2 i C3	25-45%
IV	Qualsevol T	Qualsevol N	M1	D	D	<10%

T: tumor primari

- Tis Carcinoma *in situ*. El tumor no travessa la mucosa
- T1 El tumor envaeix la submucosa
- T2 El tumor envaeix la muscularis pròpia
- T3 El tumor envaeix la subserosa sense arribar a cap teixit veí
- T4 El tumor envaeix altres òrgans o estructures

N: metàstasi ganglionar

- N0 No hi ha cap gangli afectat
- N1 Entre 1 i 3 ganglis afectats
- N2 Més de 3 ganglis afectats

M: metàstasi a distància

- M0 No hi ha metàstasi a distància
- M1 Presència de metàstasi a distància

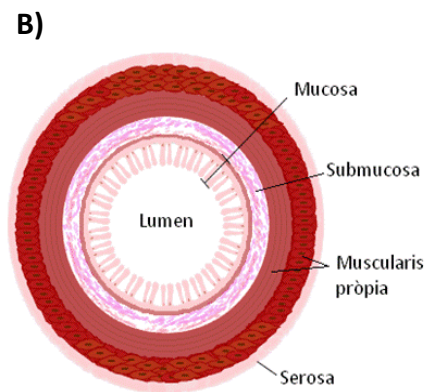


Figura 5: A) Estadiatge de CCR segons el sistema TNM, Dukes i Astler-Coller. **B)** Capes histològiques que es poden observar en una secció transversal del còlon.

Els paràmetres clínics tradicionals d'estadiatge no són sempre suficients per discriminar aquells pacients de CCR amb pitjor i millor pronòstic. Trobem per exemple pacients diagnosticats com T1N0, és a dir, en un estadi aparentment poc avançat de la malaltia però que en canvi acaben desenvolupant metàstasi i per tant són de mal pronòstic. Fins ara, no existeix cap marcador molecular utilitzat en la clínica que ajudi a una millor classificació dels casos de CCR sent per tant necessari invertir esforços en l'estudi de nous marcadors.

2.7 Tractament del càncer de còlon

Durant 35 anys l'únic agent quimioteràpic per tractar el CCR ha estat el **5-fluorouracil** (5-FU) sol o acompanyat de **leucovorín** (5-FU/LV), a partir dels anys 90. En els últims 10 anys han estat aprovats altres agents citotòxics com l'**irinotecà**, l'**oxaliplatí** o la **capecitabina** i agents biològics (anticossos monoclonals) com el **bevacizumab** (inhibidor de *VEGF*) o el **cetuximab** i el **panitumumab** (inhibidors de *EGFR*). Aquests nous agents han permès millorar el tractament, sobretot en CCR metastàtic, allargant la mitjana de supervivència fins a més de 20 mesos. Aquest increment ha suposat un canvi en la visió dels CCRs avançats, anteriorment poc esperançadora.

L'estratègia oncològica té l'objectiu d'allargar la supervivència dels pacients intentant evitar la toxicitat associada als tractaments i respectant la qualitat de vida d'aquests. Els pacients sense disseminació a distància (estadis II/III) reben tractament de 5FU/LV amb oxaliplatí. Un pacient metastàtic amb bones expectatives a ser curat (metàstasis operables en nombre i mida) acostuma a rebre un tractament agressiu amb 2 agents citotòxics i un agent biològic, normalment bevacizumab. Diferents estudis han demostrat que el percentatge de pacients tractats amb 5-FU/LV, irinotecà i oxaliplatí s'associen a una millor supervivència (Grothey and Sargent, 2005). S'ha vist també que els tractaments successius de FOLFOX i FOLFIRI (5-FU/LV + oxaliplatí o irinotecà) allarguen la mitjana de supervivència dels pacients fins a més de 20 mesos, existint controvèrsia sobre quin dels dos tractaments és preferible donar en primer lloc (Tournigand et al., 2004). Quan s'observa progressió tumoral es canvia la teràpia fins que el pacient hagi rebut tots els diferents agents terapèutics existents. En aquest punt, els pacients refractaris són candidats a participar en assajos clínics de nous medicaments en fase I o, en última instància, a rebre tractament pal·liatiu.

No tots els pacients responen igual a la quimioteràpia i per això cada vegada més es tendeix als tractaments personalitzats (els més eficaços per a cada cas) evitant la toxicitat innecessària així com les enormes despeses econòmiques que suposa el fet d'administrar quimioteràpia indiscriminadament. Seleccionar correctament els

pacients i conèixer prèviament la reacció que tindran davant un determinat fàrmac és possible gràcies a **factors predictius** de resposta. Entre els múltiples marcadors moleculars candidats a ser factors predictius trobem per exemple els nivells de TS, TP, DPD o la deficiència del sistema *mismatch repair* (dMMR), entre altres (Koopman et al., 2009). Actualment, coneixem que la mutació a *KRAS* és un factor predictiu de no resposta a cetuximab (erbitux), un anticòs monoclonal contra *EGFR* que s'administra en pacients amb alts nivells d'aquest gen (Siena et al., 2009).

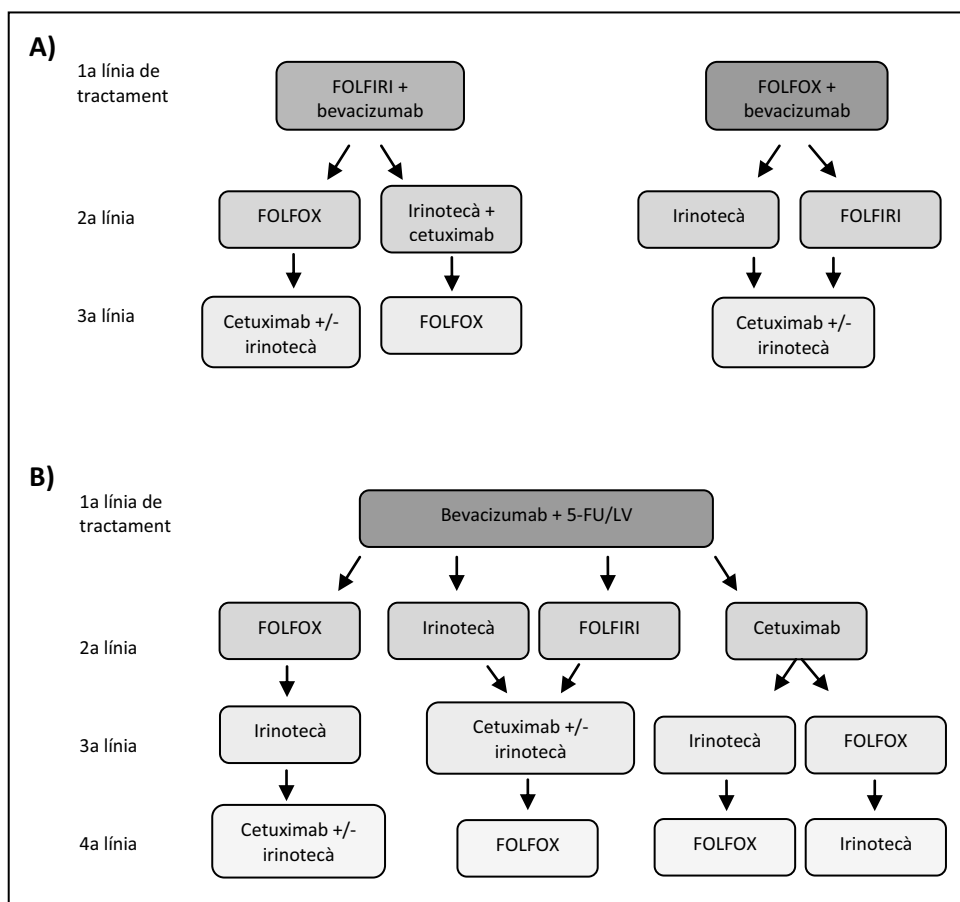


Figura 6: Esquema de quimioteràpia per a pacients amb CCR metastàtic. **A)** Teràpia intensiva; **B)** Teràpia poc intensiva. Imatge extreta de (Goldberg et al., 2007).

2.7.1 CCR no metastàtic

La cirurgia del tumor primari és el tractament escollit per a pacients de CCR no metastàtic. La quimioteràpia **adjuvant** (posterior a la cirurgia) només millora significativament la supervivència en pacients en estadi III i, de forma controvertida, en estadi II avançat sent no indicada en estadis inferiors. Existeixen molts treballs que conclouen que l'eficàcia del tractament adjuvant en estadi II no és clínicament rellevant pel que fa al temps de supervivència obtingut (Gill et al., 2004; Quasar Collaborative et al., 2007).

2.7.2 CCR metastàtic (CCRm)

En casos de CCRm amb presència de MH la resecció hepàtica resulta ser l'única opció terapèutica amb capacitat curativa sent possible l'extracció de fins al 50% del volum hepàtic total. La supervivència postoperatòria a 5 anys de pacients amb cirurgia radical (marges no afectats) és del 25-40%. Tot i això, cal actuar depenent del risc operatori i el benefici esperat en cada cas.

L'any 1896 ja es van proposar 3 contraindicacions per a la resecció hepàtica de CCRm: **(a)** presència de 4 o més metàstasis, **(b)** disseminació tumoral extrahepàtica i **(c)** marges de resecció sans menors d'1cm (Ekberg et al., 1986). Més endavant, s'ha vist que els dos factors independents i predictius de posterior recurrència hepàtica són la presència de múltiples nòduls metastàtics ($> o = 4$) i la malaltia extrahepàtica. Els marges de resecció menors d'1cm no influeixen directament en posteriors recaigudes (Figueras et al., 2007).

Recentment, aquestes contraindicacions han estat revisades i s'hi ha afegit l'afectació del nòdul limfàtic a l'hílum hepàtic. S'ha demostrat també que el nombre de metàstasis no és tan limitant sempre i quan es pugui fer una cirurgia amb marges no afectes fet que de vegades resulta ser impossible per qüestions de mida, número i localització de les metàstasis (Scheele and Altendorf-Hofmann, 1999). Finalment, també cal considerar contraindicacions mèdiques segons l'historial clínic i l'edat del pacient que puguin influir en el risc de l'operació.

Només el 10-25% dels casos de CCRm amb MH són candidats a ser operats. La resta de pacients tenen l'alternativa de la quimioteràpia/radioteràpia **neoadjuvant** que s'administra prèviament a la cirurgia per tal de disminuir la mida de les lesions metastàtiques i així poder rescatar pacients perquè puguin passar per quiròfan (Bismuth et al., 1996). Pel que fa a la quimioteràpia **adjuvant** (posterior a la cirurgia) en casos de CCRm existeixen diferents esquemes d'administració quimioteràpica (**Figura 6**).

2.8 Epigenètica i càncer de còlon

L'**epigenètica** és l'estudi dels mecanismes reguladors de la funció gènica que no impliquen canvis a la seqüència de nucleòtids de l'ADN.

2.8.1 Tipus d'informació epigenètica

Metilació de l'ADN

Els primers indicis de canvis epigenètics en càncer van ser descoberts per primera vegada l'any 1983 sent la pèrdua de metilació (hipometilació) en cèl·lules tumorals la primera evidència identificada (Feinberg and Vogelstein, 1983; Gama-Sosa et al., 1983).

La metilació de l'ADN és el procés d'addició post-replicativa d'un grup metil al carboni 5 de la citosina. Aquesta reacció està catalitzada per les DNMTs (*DNA methyltransferases*) i succeeix en citosines (C) localitzades a 5' d'una guanosina (G) amb el que es coneix com a dinucleòtids CpG. Els dinucleòtids CpG estan infrarepresentats al genoma però existeixen fragments relativament rics en C+G anomenats **illes CpG** i que es troben a la regió promotora d'aproximadament el 50% dels gens humans. El 80% dels dinucleòtids CpG no associats a illes CpG estan

metilats, mentre que els que es troben dins les illes CpG normalment no ho estan. Per tal que una seqüència sigui reconeguda com a illa CpG cal que compleixi els següents requisits: que el contingut de C+G sigui superior al 50%; que el quocient del dinucleòtid CpG observat respecte l'esperat sigui igual o més gran al 60% i que ambdós criteris es produeixin en una seqüència d'entre 500 i 4000 parells de bases (pb) (Gardiner-Garden and Frommer, 1987).

Els canvis en la metilació de l'ADN apareixen en estadis primerencs del procés tumoral, tal i com s'ha demostrat entre altres, amb el gen *P16* (Nuovo et al., 1999). Es tracta d'un procés edat dependent (igual que l'acumulació de mutacions) que comença a la mucosa de còlon normal i progressa fins a la hiper/hipometilació en càncer (Ahuja et al., 1998). L'estudi de la metilació en càncer pot ser una mica confús ja que trobem, de forma simultània, regions **hipometilades** (pèrdua de metilació) i **hipermetilades** (guany de metilació) en una mateixa cèl·lula tumoral.

La principal diferència entre els canvis en la seqüència de l'ADN i els epigenètics és que els primers són irreversibles, mentre que els segons es poden revertir. La utilització d'agents desmetilants com l'**AZA** (5-azacytidine) o inhibidors de les desacetilases d'histones com el **TSA** (Trichostatin A) que permeten reactivar l'expressió gènica, són noves opcions antitumorals a la clínica (Cameron et al., 1999).

Imprinting genètic

Mecanisme cel·lular de silenciament gènic que es produeix durant la gametogènesi, de forma que la descendència manifestarà una expressió monoal·lèlica de determinats gens d'origen patern o matern dependent de cada cas. Un exemple d'*imprinting* per metilació és la inactivació d'un dels dos cromosomes X en les dones fet que va ser descobert l'any 1981 (Mohandas et al., 1981).

S'ha descrit que la pèrdua d' *imprinting* (LOI) i conseqüent activació de determinats gens com pot ser *IGF2* incrementa el risc de patir CCR (Cui et al., 2003).

Modificació d'histones

Les histones (H1, H2A, H2B, H3 i H4) són proteïnes encarregades de la regulació de l'empaquetament de l'ADN en unitats repetitives anomenades **nucleosomes**. Les modificacions post-traduccionals de les histones, que tenen lloc a la regió amino-terminal, són les responsables de regular l'estructura de la cromatina. Depenent del grau d'empaquetament regulen també la transcripció gènica. Les possibles modificacions d'histones són: acetilació, metilació, fosforilació, ubiquitinació i ADP-ribosilació. La cromatina en estat relaxat i per tant transcripcionalment activa s'anomena **euromatina**, mentre que la cromatina replegada o **heterocromatina** té reprimida la transcripció gènica. Això succeeix perquè s'impedeix l'accés de factors de transcripció als promotors gènics (Jenuwein and Allis, 2001).

La hipoacetilació i hipermetilació d'histones són característiques de les seqüències d'ADN metilades. En cèl·lules tumorals les modificacions d'histones més freqüents són la desacetilació de les histones H3 i H4, la pèrdua de la trimetilació de la histona H3 a la lisina K4 i la metilació de la histona H3 a les lisines K9 i K27 (Esteller, 2007). Cal destacar la dualitat de la histona H3 ja que aquesta té patrons de metilació diferencials entre euromatina i heterocromatina. H3 està metilada a la lisina K9 en gens silenciats mentre que en gens activats la metilació és a la lisina K4 (Noma et al., 2001).

2.8.2 Funcions biològiques de l'epigenètica

Durant els darrers trenta anys s'han atribuït diferents funcions biològiques als processos epigenètics:

- **Regulació de l'expressió gènica:** durant la dècada dels anys 70 alguns treballs pioners van suggerir un possible paper de la metilació en la regulació transcripcional teixit específica durant el desenvolupament i diferenciació de teixits (Holliday and Pugh, 1975). Posteriorment, s'ha vist que la hipermetilació de promotors té associació amb el silenciament gènic mentre que la hipometilació de regions "imprintades" és una forma d'activació transcripcional (Herman and Baylin, 2003). Dels diferents treballs a favor d'aquesta teoria, cal destacar el realitzat amb el gen *SERPINB5* (Futscher et al., 2002), possiblement la prova més directa. Així doncs, la inactivació de gens supressors tumorals en càncer, tal i com va proposar Knudson amb la teoria de "two-hits" (Knudson, 1971), es produeix per l'afectació dels dos al·lels. Aquesta inactivació pot ser per mutació, deleció o **metilació**. Alguns exemples de gens supressors tumorals amb hipermetilació del promotor són *P16* i *MLH1*.

- **Integritat estructural del genoma:** tenint en compte que la majoria de dinucleòtids CpG metilats es troben dins de retrotransposons, que representen el 35% del genoma, s'entén la metilació de l'ADN com un mecanisme de defensa genòmica per silenciar aquests elements mòbils i disminuir la seva expansió. La repressió és necessària per prevenció del dany genòmic que provocaria una transposició no controlada (Yoder et al., 1997).

- **Expressió gènica al·lel específica:** finalment, la metilació de l'ADN és de gran importància biològica ja que és el mecanisme utilitzat en processos d'*imprinting* genètic (prèviament descrit).

2.8.3 Tècniques d'estudi de la metilació

En aquest treball hem estudiat la metilació de l'ADN deixant de banda l'estudi epigenètic de modificació d'histones.

Per a l'anàlisi de la metilació a l'ADN és necessari un pas previ de **conversió per bisulfit sòdic** de les citosines (C) no metilades a uracil (U) i posterior conversió per PCR dels uracils (U) a timines (T) de forma que s'obté més proporció de C/G en les mostres metilades. Un cop feta la conversió, es pot fer seqüenciació directa o aplicar alguna de les següents tècniques:

- **Corbes de *melting***: existeixen tres enllaços covalents entre C i G mentre que els aparellaments entre A i T només en tenen dos. Per tant, com major sigui la proporció de C/G en un mateix fragment de PCR més alta haurà de ser la temperatura de *melting* (T_m) per desnaturalitzar la doble hèlix d'ADN. Per PCR quantitativa i comparant els pics de la T_m podem distingir el grau de metilació d'una mostra (Guldberg et al., 2002). El principal inconvenient d'aquesta tècnica és la baixa sensibilitat que té. Tot i això, a afectes pràctics cal tenir en compte que canvis de metilació en pocs dinucleòtids CG tenen poca rellevància clínica. Recentment, han aparegut tècniques semblants amb més sensibilitat com per exemple la MS-HRM (*Methylation-sensitive high-resolution melting*) (Wojdacz et al., 2008).

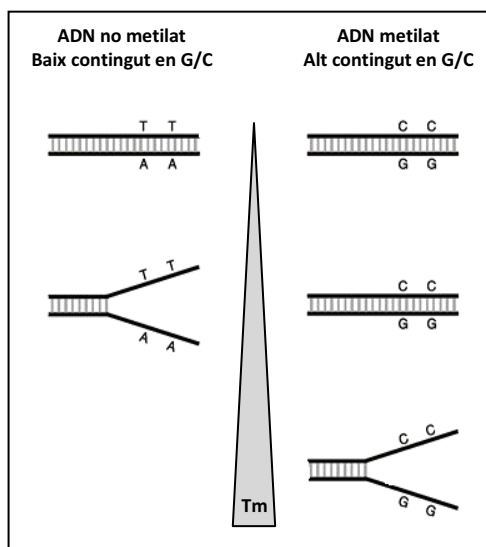


Figura 7: Principi de la tècnica de corbes de *melting*. Després de la conversió per bisulfit les mostres metilades tenen major contingut de C/G en comparació amb les no metilades sent necessària una major temperatura de *melting* (T_m).

- **MSP (*Methylation-specific PCR*):** Un cop feta la conversió per bisulfit es fa amplificació per PCR utilitzant *primers* específics per la mostra metilada i la no metilada. Tot i l'elevada sensibilitat de la tècnica (0,1%) l'inconvenient de la MSP és que només té en compte l'estat de metilació del parell de dinucleòtids CpG inclosos a la seqüència dels *primers* utilitzats fet que pot ser no significatiu (Herman et al., 1996) (Derks et al., 2004).
- **Restricció depenent de metilació:** La **AUMA** (*Amplification of Unmethylated Alu*) (Rodriguez et al., 2008) i la **AIMS** (*Amplification of Intermethylated Sites*) (Frigola et al., 2002; Jorda et al., 2009) són dos exemples de tècniques de *screening* que es basen en la utilització d'enzims de restricció sensibles a metilació i posterior amplificació per PCR. S'obtenen gels d'acrilamida de tipus *fingerprint* o patrons de bandes que permeten "pescar" canvis de metilació entre mostres. El màxim inconvenient d'aquest tipus de tècniques són els "falsos positius" que s'obtenen degut a l'amplificació per PCR de canvis de metilació que proporcionalment poden ser poc representatius.

L'AUMA és una de les tècniques que s'ha utilitzat en aquest treball i la podríem resumir, com la restricció de dianes CCCGGG no metilades mitjançant l'enzim SmaI i posterior amplificació per PCR específica de fragments flanquejats per **seqüències Alu** no metilades, les quals contenen aquesta diana de restricció. Les seqüències Alu són els elements mòbils repetitius més abundants del genoma. Contenen una tercera part del total de dinucleòtids CpG i normalment estan metilades per evitar-ne la transposició. Per aquest motiu, la detecció de seqüències Alu no metilades en tumors (poc habitual) poden ser indicatives de canvis importants pel procés tumoral (Batzer and Deininger, 2002; Hasler and Strub, 2006).

2.9 Perfils d'expressió en càncer colorectal

Les tècniques d'estudi massiu de dades, com són els *microarrays* d'expressió, són eines que permeten estudiar milers de gens simultàniament de forma ràpida, aprofundint així en l'anàlisi de malalties genètiques complexes on intervenen moltes vies com és el cas del càncer. Tot i tractar-se d'una tecnologia prometedora existeixen limitacions: **(a) Poca reproductibilitat** entre experiments. La variabilitat depèn del mètode de processament de les mostres, de la plataforma d'hibridació escollida i del tipus d'anàlisi estadístic utilitzat per processar les dades. L'heterogeneïtat cel·lular en tumors també és un factor a considerar. Un estudi recent (Lin et al., 2007) valida recíprocament dos classificadors generats a partir de dos grups de pacients de CCR independents. Comparant ambdós llistes de gens troben representades funcions biològiques i vies metabòliques relacionades i per tant, malgrat la variabilitat entre les llistes, arriben a la conclusió que les dues proporcionen dades informatives; **(b) Mida mostral petita** degut a l'elevat cost econòmic de la tècnica. Per aquest motiu els *microarrays* no són la millor opció pel diagnòstic molecular de pacients de forma rutinària. S'ha vist que per tal d'obtenir un solapament del 50% entre dues llistes de gens caldria realitzar perfils d'expressió amb milers de pacients (Ein-Dor et al., 2006); **(c) Dificultat per entendre les dades** i seleccionar aquelles realment útils.

Per tal de superar aquestes limitacions és necessària **(a) l'estandardització** dels protocols metodològics i d'anàlisi per tal de poder comparar experiments el més homogenis possibles, **(b) l'ús de bases públiques** per a l'emmagatzematge de les dades obtingudes i **(c) la validació** dels resultats per tècniques quantitatives convencionals.

En la literatura, la majoria d'estudis realitzats amb *microarrays* d'expressió a partir de mostres de CCR comparen tumors primaris entre ells o amb mucoses normals de còlon (Jorissen et al., 2009; Nadal et al., 2007; Nannini et al., 2009) sent poc comú l'anàlisi comparatiu amb metàstasis. Actualment, existeixen molts estudis sobre l'inici i progressió del desenvolupament tumoral però encara tenim poca informació

sobre el procés metastàtic tot i la seva importància clínica. Els gens involucrats amb la metastàsis continuen sent una incògnita.

Aparentment, no existeix una clara signatura metastàtica en CCR. Una única publicació recent compara per *microarrays* d'expressió tumors primaris de còlon i MH aparellades amb aquest objectiu (Ki et al., 2007). Un altre estudi de *microarrays* realitzat amb mostres de MH identifica signatures genètiques diferencials entre metastàsis sincròniques i metacròniques amb diferents nivells d'expressió d'*EGFR* i *COX2* (Pantaleo et al., 2008). Finalment, trobem també exemples de treballs que pretenen aconseguir signatures pronòstiques de metastàsis a partir de mucoses normals de còlon amb la hipòtesi que existeix una predisposició genètica a la disseminació metastàtica (Barrier et al., 2007).

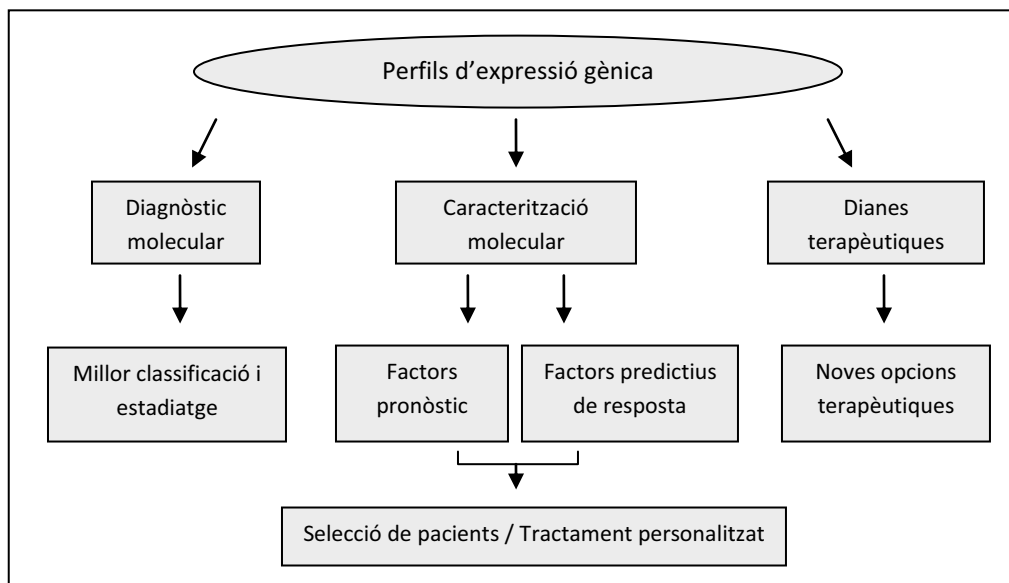


Figura 8: Aplicabilitat clínica dels anàlisis massius de dades. Depenent del disseny experimental realitzat podem respondre diferents qüestions d'interès clínic. Imatge extreta de (Nannini et al., 2009).

3. MODELS DE DISSEMINACIÓ A DISTÀNCIA

La **metàstasi** és la disseminació a distància, per via sanguínia o limfàtica, a òrgans distants del tumor primari.

3.1 Seqüència tumor primari-metàstasi

La disseminació a distància és un procés molt poc eficient ja que només unes poques cèl·lules tumorals aconseguiran créixer en òrgans distals al tumor primari a raó d'una cèl·lula entre milions (Weiss, 1994). Només aquelles cèl·lules capaces d'adquirir les habilitats necessàries podran colonitzar nous territoris. Entre aquestes habilitats que cal adquirir trobem (Rudmik and Magliocco, 2005):

- Adhesió: la pèrdua de molècules d'adhesió de les cèl·lules tumorals amb altres cèl·lules tumorals (immunoglobulines, cadherines), amb l'endoteli vascular (ICAM-1) o amb la matriu extracel·lular (integrines, laminina) facilitarà la capacitat de mobilitat i d'invasió.
- Proteòlisis: la cèl·lula tumoral per poder disseminar ha de ser capaç de degradar la matriu extracel·lular (ECM) mitjançant enzims proteolítics. Existeixen molts tipus de proteïnases involucrades com són les serinproteases o les metalloproteïnases (MMPs) entre altres (Asano et al., 2008; Zucker and Vacirca, 2004). Entre les proteïnases més estudiades per la seva associació amb CCR i MH destaquem MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13 i uPA (Urokinase Plasminogen Activator) (Sunami et al., 2000; Zeng et al., 2002) .
- Mobilitat: la cèl·lula tumoral metastàtica té capacitat per moure's activament gràcies a proteïnes com Rac1 o Rho i depèn també de factors autocrins/paracrins (HGF, IL8, IGF1...) que regulen aquesta mobilitat.
- Angiogènesi: el desenvolupament de la metàstasi és estrictament dependent de la formació de nous vasos. Les cèl·lules endotelials dels vasos proliferen per

estímuls de factors com FGF i VEGF (Takahashi et al., 1995) mentre que són inhibides per TIMP i trombospondina, entre altres.

- Colonització: la cèl·lula tumoral ha de ser capaç d'escapar-se del tumor primari, entrar al torrent sanguini o sistema limfàtic (intravasació), evadir el sistema immune, sortir dels vasos (extravasació), quedar retinguda a determinats òrgans i finalment adaptar-se per créixer a un nou entorn o microambient (**Figura 9**). La viabilitat de la cèl·lula tumoral al torrent circulatori és major a l'esperat gràcies a la interacció amb leucòcits, plaquetes i altres cèl·lules tumorals com a mètode de protecció contra l'estrès mecànic i el sistema immune de l'hoste.
- Desenvolupament de la macrometàstasi: el període de temps entre el diagnòstic del tumor primari i la detecció de la metàstasi s'anomena **període de latència**. Durant aquest temps la cèl·lula tumoral queda "adormida" o latent en forma de micrometàstasi fins que adquireix nous avantatges selectius per finalitzar la disseminació amb èxit formant la macrometàstasi. El període de latència pot tenir una duració variable depenent del tipus de tumor; per exemple, en CCR o càncer de mama té una durada d'anys mentre que en el càncer de pulmó és de pocs mesos. Existeixen 3 mecanismes de latència en la cèl·lula tumoral (Aguirre-Ghisó, 2007):
 - (a) Latència cel·lular: quiescència o aturada del cicle cel·lular en fase G0-G1 a l'espera d'unes condicions adaptatives favorables. L'equilibri entre proliferació i mort cel·lular impedeix el creixement de la macrometàstasi.
 - (b) Latència angiogènica: per tal d'augmentar el volum tumoral és necessària l'aportació de nutrients i oxigen mitjançant la creació de nous vasos al nou òrgan diana (angiogènesi).
 - (c) Latència immunològica: la metàstasi no es podrà desenvolupar fins que la cèl·lula tumoral no sigui capaç d'evadir el sistema immune de l'hoste al nou entorn de forma eficient.

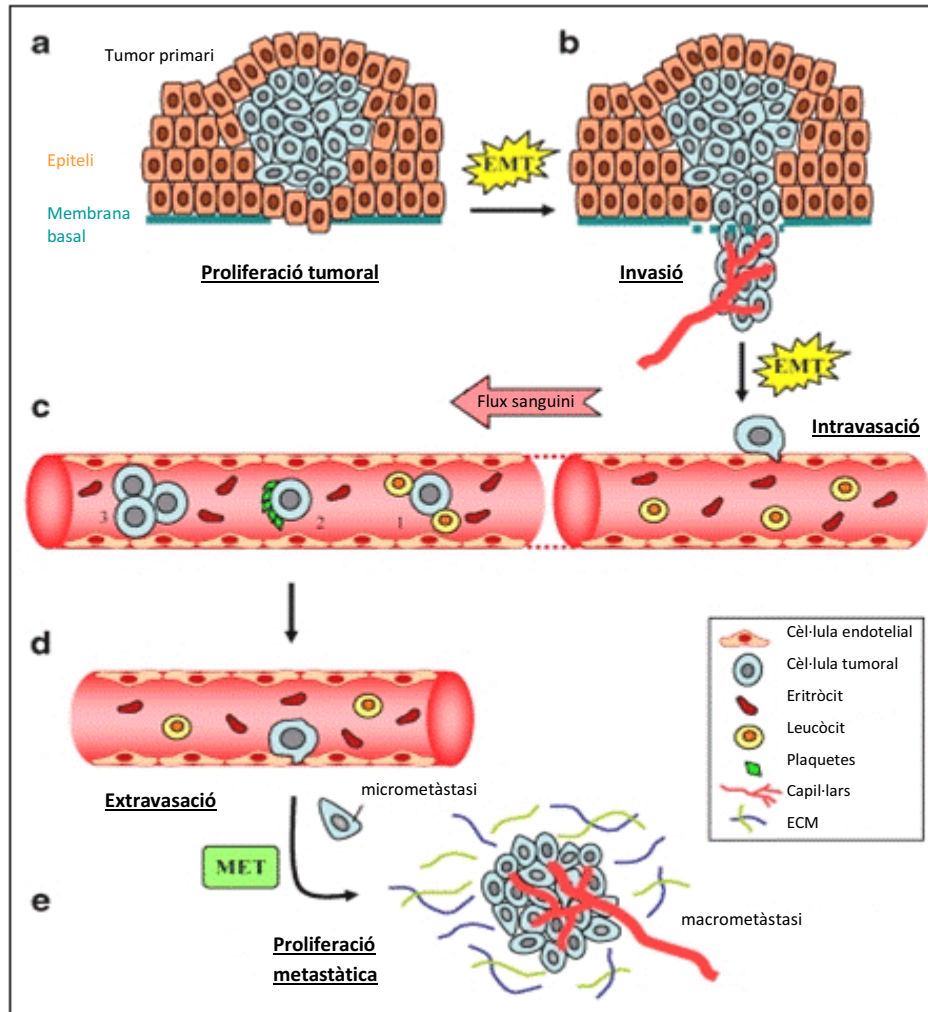


Figura 9: Etapes del procés metastàtic. ECM: Matriu extracel·lular; EMT: Transició Epiteli-Mesènquima; MET: Transició Mesènquima-Epiteli.

a) Desenvolupament del tumor primari, **b)** Invasió de la membrana basal i alliberament de les cèl·lules tumorals, **c)** Entrada al torrent sanguini (intravasació), **d)** Sortida dels vasos sanguinis (extravasació) i **e)** Adaptació i creixement de la metàstasi a l'òrgan diana. Imatge extreta de (Gout and Huot, 2008).

3.2 Teories del desenvolupament metastàtic

La teoria de la tumorigènesi de Fearon i **Vogelstein** dels anys 90 interpreta la progressió tumoral com un procés *multistep* d'acumulació d'alteracions al llarg del temps sent la metàstasi la conseqüència final. Segons aquesta teoria les cèl·lules del tumor primari adquireixen la malignitat necessària per tal de colonitzar altres teixits

en estadis ja avançats del procés tumorigènic. El principal inconvenient d'aquesta teoria és que no pot explicar com pot ser que tumors diagnosticats en estadis inicials de la malaltia, suposadament de bon pronòstic, de vegades resultin ser molt agressius i d'alt potencial metastàtic.

Recentment, ha aparegut un nou model que proposa l'inici de la disseminació en estadis primerencs del desenvolupament tumoral (Bernards and Weinberg, 2002; Husemann et al., 2008). D'altra banda, s'introdueix la idea que la progressió de la metastasi és independent o paral·lela a la del tumor primari i que per tant, tindriem divergència genètica/epigenètica entre tumor i metastasi. Aquesta divergència afectaria principalment a l'enfocament terapèutic del càncer ja que en aquest cas l'estudi del tumor primari podria no tenir valor pronòstic de la malaltia (Klein, 2009).

Finalment, el terme mig el trobem a la teoria que proposa l'adquisició de les diferents alteracions en diferents temps del desenvolupament tumoral (Nguyen and Massague, 2007). Així doncs, existirien **(a)** gens tumorals que actuen durant tot el procés tumorigènic inclòs en la disseminació a distància (útils com a factors pronòstic de metastasi) i **(b)** gens metastàtics que són alterats en fases posteriors del desenvolupament tumoral per tal de suplir les necessitats específiques de la metastasi (**Figura 10**).

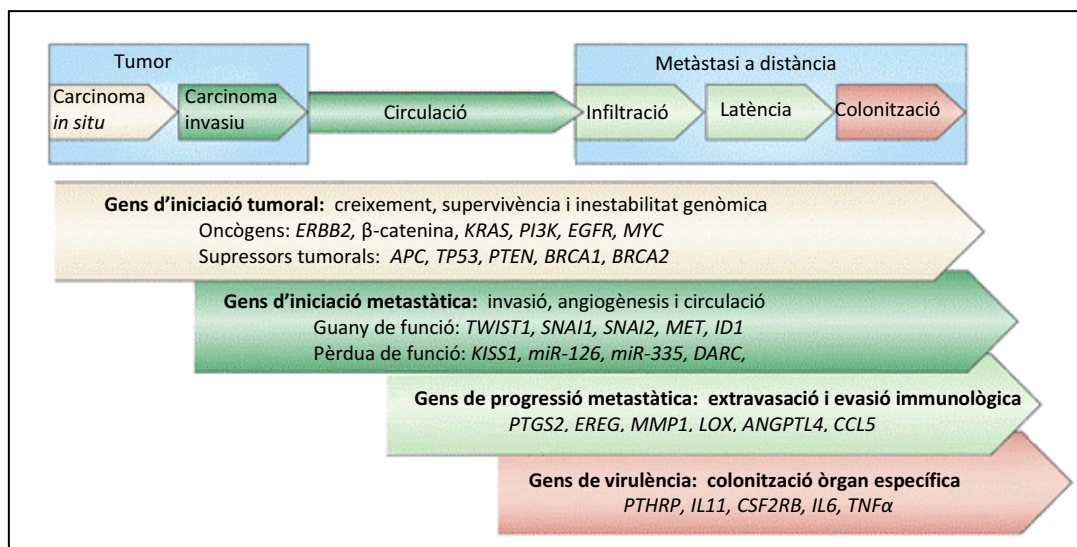


Figura 10: Hipotètics gens tumorals i específics de metastasi per a cada etapa del procés metastàtic. Imatge extreta de (Nguyen et al., 2009).

3.3 Teoria de “seed and soil”

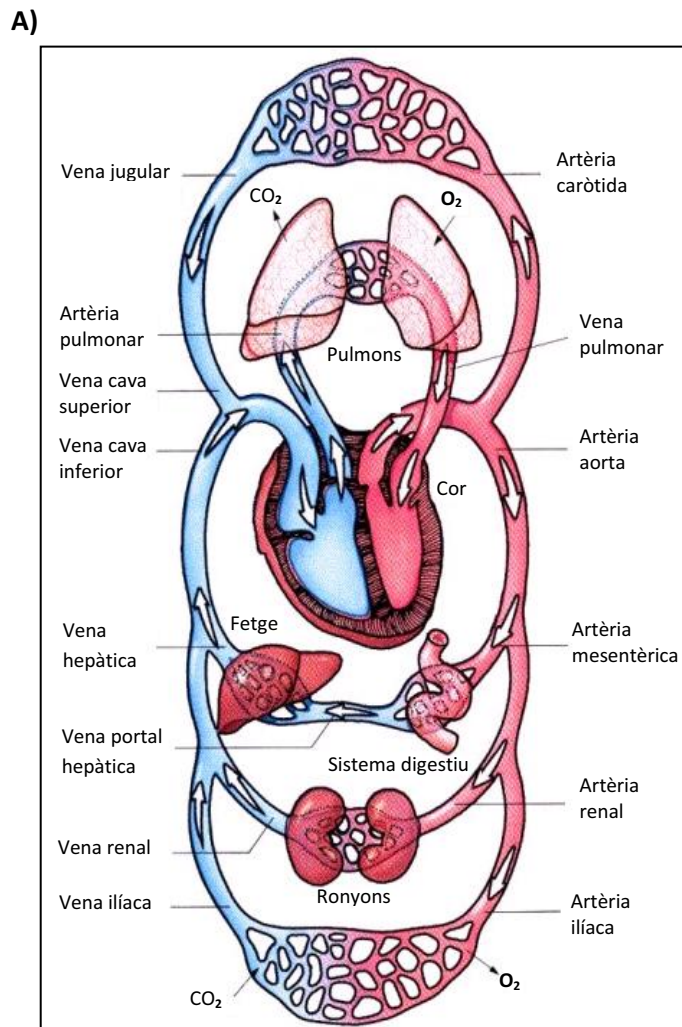
El **tropisme** de la metàstasi, és a dir, la capacitat de disseminació de determinats tumors a òrgans específics és un fet més que reconegut (**Figura 11B**). Així doncs, els tumors de còlon tendeixen a metastatitzar majoritàriament a fetge i en menor freqüència a pulmó.

La hipòtesis de “seed and soil” va ser proposada l’any 1889 per Stephen Paget qui defensava la idea que la metàstasi no succeeix a l’atzar sinó que la cèl·lula tumoral “seed” només és capaç d’establir-se en aquells teixits “soil” amb les característiques idònies pel seu creixement (Paget, 1889) (Fidler, 2003). No va ser fins l’any 1929 que James Ewing va desafiar aquesta teoria i va suggerir que la disseminació metastàtica succeïa simplement per factors físics o mecànics tals com **(a)** la restricció per mida: els capil·lars mesuren entre 3 i 8 µm de diàmetre i la cèl·lula tumoral uns 20 µm, **(b)** la pressió sanguínia o **(c)** la capacitat de deformació cel·lular (Ewing, 1928).

A favor de la teoria d’Ewing és lògic que el CCR tingui un tropisme hepàtic ja que el fetge és el primer òrgan per on passen les cèl·lules cancerígenes del còlon un cop extravasades al torrent sanguini. Ho fan pel sistema portal i si aconsegueixen passar aquest primer filtre van cap als pulmons que és precisament el segon lloc, en freqüència, de disseminació (**Figura 11A**). Tot i això, no hem d’oblidar que també existeix la disseminació limfàtica.

En el cas de la leucèmia la teoria de “seed and soil” de Paget té més sentit ja que els leucòcits o glòbuls blancs no tenen restricció per mida cel·lular ja que són cèl·lules sanguínies però tot i això són capaços de disseminar. Ho fan per sistemes d’adhesió i mitjançant interaccions lligand-receptor amb la paret dels vasos que són molt més grans en diàmetre (Chambers et al., 2002).

Actualment, encara existeix controvèrsia sobre quins són els mecanismes d’aquest tropisme de disseminació metastàtica sent la resposta una barreja de les dues teories anteriors.



B)

Tumor primari	Tropisme de disseminació
Mama	Os, pulmó, fetge i cervell
Pulmó	Cervell, os, glàndula adrenal i fetge
Pell	Pulmó, cervell, pell i fetge
Còlon i recte	Fetge i pulmó
Pàncrees	Fetge i pulmó
Pròstata	Os
Sarcoma	Pulmó

Figura 11: A) Sistema circulatori en humans. Fisiològicament, els intestins recullen els nutrients producte de la digestió i aquests viatgen pel sistema portal fins al fetge on es metabolitzen i es distribueixen a la circulació general. Les cèl·lules tumorals del còlon en sang passaran en primer lloc pel fetge i seguidament pels pulmons que són els dos llocs principals de metastasi en CCR. **B) Tropisme de disseminació metastàtica per a diferents tipus de tumors sòlids.**

3.4 Equilibri homeostàtic entre cèl·lula tumoral i estroma

El desenvolupament d'una metastasi és el resultat de múltiples factors, que en conjunt, aconseguixen proporcionar una condició favorable a la cèl·lula tumoral pel seu creixement a òrgans distants al tumor primari. Aquests factors són **(a)** el "background" genètic de l'individu o l'herència d'alteracions genètiques i epigenètiques, **(b)** les alteracions addicionals adquirides durant el desenvolupament tumoral que proporcionin nous avantatges selectius de creixement i **(c)** la influència del **microambient/estroma** acompanyant.

L'estroma tumoral està format per CAFs (*Cancer Associated Fibroblasts*), cèl·lules endotelials, components del sistema immune (macròfags, limfòcits i neutròfils) i la matriu extracel·lular (ECM) (**Figura 12A**).

Fins fa pocs anys no estava clar si la reacció desmoplàsica o estromal era un mecanisme d'estimulació del creixement tumoral o si es tractava d'un sistema de defensa de l'hoste contra el tumor. Actualment, la literatura es decanta per l'existència d'una interacció dinàmica entre la cèl·lula tumoral i el microambient mitjançant la secreció de citoquines, factors de creixement i quimioquines que promouen el creixement i la disseminació metastàtica (Gout and Huot, 2008; Joyce and Pollard, 2009).

Els **CAFs** constitueixen el component més abundant de l'estroma tumoral i estan involucrats en funcions com l'angiogènesi (formació de nous vasos sanguinis) o la proliferació tumoral mitjançant la secreció de VEGF i TGF β (Nakagawa et al., 2004) (Kalluri and Zeisberg, 2006).

Existeix una dualitat del **sistema immune** en el desenvolupament tumoral ja que aquest hi pot influir tant positiva com negativament. S'ha vist que la infiltració al tumor per macròfags o TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*) està relacionada amb un pitjor pronòstic mentre que la infiltració per limfòcits i cèl·lules dendrítiques és indicativa d'un pronòstic favorable. (Talmadge et al., 2007). Els TAMs tenen funcions tals com promoure l'angiogènesi o la migració de la cèl·lula tumoral (Condeelis and Pollard 2006). D'altra banda, les plaquetes juguen un paper molt important en l'evasió del sistema immune gràcies als agregats que formen al voltant de les cèl·lules tumorals mentre aquestes viatgen via sanguínia (Jurasz et al., 2004).

L'**ECM** està composta per 5 tipus de macromolècules diferents: col·lagen, laminina, fibronectina, proteoglicà i hialuronà. L'ECM té la funció de proporcionar suport mecànic i químic a la cèl·lula tumoral mitjançant unions a proteïnes de membrana com les integrines. La degradació de la membrana basal que envolta els tumors mitjançant enzims proteolítics és necessària per a la disseminació metastàtica sent les MMPs (Matrix Metalloproteinases) els principals enzims de degradació de l'ECM.

Els tumors es caracteritzen per tenir una alta heterogeneïtat cel·lular i l'estroma comprèn la major part de la massa tumoral en molts tipus de carcinomes. En les MH de CCR, per exemple, l'estroma és un component molt abundant que pot arribar a suposar, en alguns casos, fins al 90% del tumor. En els diferents estudis genètics/epigenètics que es realitzen, les alteracions importants de les cèl·lules tumorals, que estan en menys proporció dins el tumor, poden quedar emmascarades per la influència de l'estroma acompanyant. Per evitar això, mètodes de microdissecció manual per seleccionar el component tumoral i descartar l'estromal s'han utilitzat desde fa anys. Existeix també la tecnologia anomenada **LCM** (Laser Capture/Cutting Microdissection) (Emmert-Buck et al., 1996) que és una innovadora tècnica que permet aïllar de forma selectiva determinats tipus cel·lulars mitjançant un laser d'alta precisió que permet retallar una àrea de teixit desitjada (**Figura 2B**). S'ha utilitzat com a pas previ de múltiples estudis d'expressió gènica o proteòmica tot i la dificultat per obtenir mostres amb quantitat i qualitat suficients (Fink et al., 2006; Murray, 2007). El principal inconvenient d'aquesta tècnica és el temps invertit per processar una mostra fet que impedeix que sigui utilitzada com a eina de diagnòstic molecular.

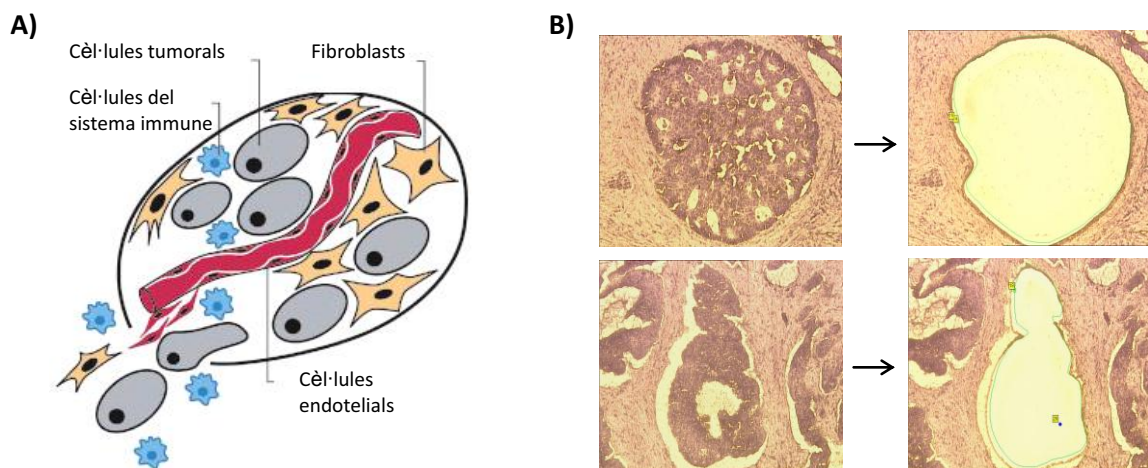


Figura 12: A) Heterogeneïtat tumoral. Imatge extreta de (Hanahan and Weinberg, 2000); **B)** Exemples de microdissecció per captura làser de la cèl·lula tumoral de dues MH de CCR.



HIPÒTESI

Existeix un ampli coneixement sobre les bases moleculars de la iniciació i progressió tumoral en càncer colorectal (CCR), però encara tenim poca informació referent al procés de disseminació a distància, i concretament de la metàstasi hepàtica (MH). Els gens implicats en la metàstasi continuen sent una incògnita.

D'altra banda, no hem d'oblidar la gran importància clínica del procés metastàtic, doncs es tracta de la principal causa de mort entre els pacients de càncer. Per aquest motiu, és necessari invertir esforços en investigar quines són les vies metabòliques implicades en aquesta última etapa de la tumorigènesi per tal de poder combatre-la amb èxit.

La hipòtesi d'aquest treball és que l'estudi d'alteracions específiques de metàstasi hepàtica en càncer colorectal, que difereixin del tumor primari, ens pot ajudar a entendre millor com es produeix el procés de disseminació i així, tenir els coneixements necessaris per tal de millorar el diagnòstic, pronòstic i tractament d'aquesta malaltia.



OBJECTIUS

Objectiu general

L'objectiu d'aquest treball és la identificació i posterior caracterització de les principals alteracions en metàstasi hepàtica de càncer colorectal tant a nivell d'expressió gènica com de metilació de l'ADN. Els resultats obtinguts han de servir per millorar la comprensió del procés metastàtic així com per aportar nous coneixements que puguin ser aplicats en el diagnòstic molecular i en la recerca de noves opcions terapèutiques.

Objectius específics

Per aconseguir els següents objectius, hem utilitzat una sèrie de 40 casos aparellats de mucosa normal de còlon, tumor primari i metàstasi hepàtica, que en si mateixa ja es pot considerar el primer repte o objectiu d'aquest treball.

- Realització d'un **estudi global** dels canvis en la metilació genòmica associats a càncer de còlon mitjançant la tècnica AUMA.
- Anàlisi i caracterització de les **alteracions recurrents** en la metilació de l'ADN associades a càncer de còlon.
- Elaboració d'una **signatura metastàtica** de gens específics de metàstasi hepàtica (MH) en càncer colorectal a partir de perfils d'expressió per *microarrays*.
- Avaluació de la **capacitat de pronòstic** de MH a partir dels nivells d'expressió de la signatura metastàtica prèviament descrita, en tumors colorectals i en mucosa de còlon normal.
- **Estudis *in-vivo*** a partir d'un model de metàstasi hepàtica de CCR en ratolins atímics que primerament cal establir.



RESULTATS

ARTICLE 1***LIVER METASTASIS SIGNATURE AS PROGNOSTIC GENES OF DISTANT DISSEMINATION IN STAGE III COLORECTAL CANCER***

Laura Padullés, Antoni Berenguer, María Martínez-Iñiesta, David G. Molleví, Núria Baixeras, Alvaro Aytés, Cristina Santos, Mireia Berdiel, Clara Muñoz, Sara Puertas, Teresa Serrano, Emilio Ramos, Víctor Moreno, Ramón Salazar, Gabriel Capellà, Alberto Villanueva.

Resum del treball:

L'objectiu d'aquest treball és la identificació de marcadors moleculars d'expressió gènica importants en el procés metastàtic de càncer colorectal (CCR) al fetge.

19 mostres aparellades de tumor primari de còlon i metàstasi hepàtica (MH) han estat hibridades en un *microarray* de cDNA (Affy HGU 133 plus 2.0, Affymetrix). Un cop eliminats els gens específics de fetge s'obté un llistat de 1374 sondes diferencialment expressades de forma significativa entre tumors i metàstasi (FDR 1%, $-0,5 > \log\text{-ratio} > +0,5$). La signatura metastàtica proposada segons l'algoritme de Golub consta de 7 gens específics de MH: *MMP3*, *MMP1*, *CYP1B1*, *CLCA4*, *MS4A12*, *SPP1* i *CEACAM7*.

La capacitat de pronòstic de MH a partir de l'expressió gènica de la signatura en tumors primaris i en mucosa normal de còlon també ha estat avaluada mitjançant RT-PCR quantitativa amb el LightCycler (Roche diagnostics). Segons l'anàlisi de regressió logística univariant, els gens *MS4A12* (OR=1.33, $p=1.65e-06$), *CYP1B1* (OR=1.23, $p=0.01634$) i *CLCA4* (OR= 1,15, $p=0,04192$) estan significativament sobreexpressats en la sèrie de tumors metastàtics (n=61) en comparació amb la sèrie de tumors no metastàtics en 5 o més anys des de la colectomia (n=40). L'anàlisi estadístic *Random Forest* a partir dels nivells d'expressió de *MS4A12* i *CYP1B1* (ja sigui amb mostres tumorals com de mucosa normal) permet pronosticar disseminació al fetge amb una probabilitat d'encerts aproximada del 80%.

Ambdós gens mostren més expressió gènica en el component estromal que en el tumoral quan s'analitzen els nivells transcripcionals de mostres processades per microdissecció de captura làser.

D'altra banda, s'ha desenvolupat un model murí per injecció intraesplènica de línies cel·lulars humanes de càncer de còlon (KM12C i HCT116) capaces de metastatitzar específicament a fetge reproduint així el procés de disseminació que succeeix en pacients de CCR. Aquest model serà utilitzat en posteriors experiments.

En conclusió, s'ha obtingut una signatura metastàtica de 7 gens específics de MH de CCR. Dos d'aquests gens, *MS4A12* i *CYP1B1*, han resultat tenir capacitat per pronosticar MH, fet de gran importància clínica.

LIVER METASTASIS SIGNATURE AS PROGNOSTIC GENES OF DISTANT DISSEMINATION IN STAGE III COLORECTAL CANCER

Laura Padullés ¹, Antoni Berenguer ², María Martínez-Iniesta ¹, David G. Molleví ¹, Núria Baixeras ³, Alvaro Aytés ¹, Cristina Santos ⁴, Mireia Berdiel ¹, Clara Muñoz ¹, Sara Puertas ¹, Teresa Serrano ³, Emilio Ramos ⁵, Víctor Moreno ², Ramón Salazar ⁴, Gabriel Capellà ¹, Alberto Villanueva ^{1#}

1 Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

2 Servei d'Epidemiologia i Registre del Càncer (SERC), Institut Català d'Oncologia (ICO), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

3 Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

4 Department of Clinical Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

5 Department of Surgery, Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Correspondence: Alberto Villanueva, Translational Research Laboratory 1 (LRT1), Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospitalet de Llobregat (08907), Barcelona, Spain.

E-mail: avillanueva@iconcologia.net

ABSTRACT

PURPOSE Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide being liver metastasis (LM) a significant prognostic factor and the main cause of cancer-related deaths. Despite of its clinical relevance, metastatic spread process is poorly understood. The aim of this study is to clarify the mechanisms of colorectal cancer LM, discovering new molecular markers with significant role in the metastatic process to improve its diagnostics, treatment and prevention.

PATIENTS AND METHODS 19 paired subjects (colorectal tumor/liver metastasis) have been used in cDNA microarrays (Affy HGU 133 plus 2.0, Affymetrix) in order to identify specific LM genes after liver-specific genes subtraction. LM prognosis capability for the 7-genes metastatic signature was assessed using a stage III/IV CRC series, comparing metastatic tumours (N=61) with non metastatic ones (N=40).

RESULTS 1374 probes were found to be differentially expressed between tumors and LMs (FDR 1%, $-0,5 > \log\text{-ratio} > +0,5$). Golub's classification algorithm identified a 7 liver metastasis genes signature including *MMP3*, *MMP1*, *CYP1B1*, *CLCA4*, *MS4A12*, *SPP1* and *CEACAM7* that correctly classified tumors and metastases with high accuracy (5.3% leave-one-out cross-validation error rate). *MS4A12* (OR=1.33, $p=1.65e-06$) and *CYP1B1* (OR=1.23, $p=0.01634$) were significantly overexpressed in metastatic tumors according to univariate logistic regression test. Metastatic signature expression data using Random Forest classification method was able to prognosticate liver metastasis with over 80% accuracy.

CONCLUSION A metastatic signature of 7 specific liver metastasis-related genes has been built. Two of them, *MS4A12* and *CYP1B1*, have an important liver metastasis prognosis capability which could be very useful in clinics.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related deaths in the Western world and is the third most common cancer worldwide after lung and breast cancer [1]. Prognosis of CRC is based on the extent of colon wall invasion and the presence of lymph node or distal metastases. Hepatic or pulmonary metastases are important determinants of survival [2, 3]. Liver metastases (LMs) are diagnosed in 10-25% of patients at the time of primary tumor resection (synchronous dissemination) and another 50-60% of patients will develop recurrent disease, most commonly in the liver, within the next 5 years (metachronous metastases).

Post-operative treatment of CRC is determined by lymph nodes status (invaded or disease-free). Usefulness of adjuvant chemotherapy has been clearly established for patients with invaded lymph nodes (stage III), and the standard treatment is 5-fluorouracil plus leucovorin, with the addition of oxaliplatin to this scheme [4]. In contrast, usefulness of adjuvant chemotherapy remains controversial in patients with disease-free lymph nodes (stage II) [5, 6]. Despite advances in chemotherapy, surgical resection is the only therapeutic approach offering a chance of cure for patients with LMs. However, this therapeutic option is restricted to confined metastases that represent only 10-15% of cases. Complete surgical resection of metastases selected with standard clinical criteria results in 30-40% 5-year survival rates [7, 8]. Current challenge is the identification of patients at high risk of recurrence by new and more accurate prognostic markers to guide postoperative treatment (adjuvant chemotherapy in required stage II patients and different chemotherapy regimens in stage III based on risk of recurrence).

While molecular mechanisms of early stages of carcinogenesis have been largely characterized, metastatic spread process is poorly understood. Metastasis is an inefficient process as very few cells achieve developing new tumours at distant organs, occurring on the order of one cell in many millions [9]. In order to metastasize, tumor cells must detach from primary tumor, invade, migrate and intravasate into lymphatic and/or blood vessels. During transportation they manage to survive mechanical stresses and escape from the immune system. Finally, being in

the liver parenchyma, tumor cells establish crosstalk with liver stroma and adapt themselves to proliferate in a new microenvironment. Only if this microenvironment is favorable to tumor cells, they will lead to develop macroscopic liver metastases.

Genetic background is considered an important factor but metastatic development also depends on the acquisition of further advantageous genetic alterations. We have to distinguish between dissemination pre-requisites (metastasis initiation/progression genes) and further events that specifically satisfy requirements of metastasis (virulence genes) [10].

Microarray technology allows expression levels assessment of thousands of genes simultaneously. Potential of expression profiling as a tool for outcome prognosis analysis in cancer has been applied for different tumor types. Recently, it has been identified different set of genes that mediate breast cancer metastasis to lung and brain [11, 12]. In CRC most studies have mainly focused on comparisons between normal mucosa, adenoma and primary carcinomas [13-15] and only few studies have been addressed to find differences between primary tumors and metastases [16, 17]. Profiling signatures in the bulk of primary tumor are able to predict poor patient prognosis. Genetic alterations acquired early in tumorigenesis are relevant for metastatic process [18, 19] and currently, it has been described cancer cells spreading from early stages of tumour development [20, 21].

In order to seek specific liver metastasis gene expression patterns in CRC, we have established transcriptional profiles in paired cases of primary tumors and matched LMs. We have built a 7-gene metastatic signature that successfully identifies stage III CRC patients at risk to develop distant liver metastases.

PATIENTS AND METHODS

Human tissue samples

Fresh specimens were obtained after surgical resection at the Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). Immediately after resection tissues were frozen and stored at -80°C until use. The main clinical data of these patients are summarized in table 1 and prospective clinical follow-up is available. All the patients were thoroughly informed about the study and provided their written consent, in accordance with the ethical guidelines of our institution.

Three independent sets of samples have been used: **a) Profiling samples**: Nineteen cases of matched triplets of normal colonic mucosa, primary colorectal tumor and liver metastasis were collected between 2001 and 2006. Of the 19 patients, 12 were colon cancer patients (6 left colon and 6 right colon) and 7 were rectal tumors. In 14 patients, LMs were synchronous (macroscopic metastases were diagnosed together with primary tumor or in the next six months) and the remaining 5 were metachronous. In two cases we have an additional second metachronic LM. None of the patients had received neoadjuvant chemotherapy prior to surgery. The histopathology of each specimen was reviewed by a pathologist (NB) to confirm diagnosis and establish tumor cells content. Primary tumor regions chosen for analysis did not contain normal or benign colon epithelium. Primary tumors were composed of at least 75% of tumor cells, while for most of the LM it was more than 50%; **b) Microarray validation samples**: Twelve independent triplets were also collected in the same period of time; **c) Series of stage III/IV CRC patients**: One hundred and one fresh-frozen primary colorectal tumors and their correspondent nonadjacent normal colonic mucosa were collected between 1996 and 2007. Sample characteristics are summarized in table 1B. Among the 101 CRCs, we have 40 CRCs which did not develop distant metastases for at least 60 months and 61 metastatic CRCs to liver (21 were synchronous and the remaining 40 were metachronous metastases). All patients received adjuvant chemotherapy.

RNA isolation and microarray analysis

Total RNA was obtained for all the cases using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and using Agilent 2100 Bioanalyser technology. Nineteen paired cases of primary colorectal tumor and LM (in two cases there are second metachronous metastases), showing optimum RNA quality for microarray analysis, were hybridized on the human cDNA GeneChip® HGU133 plus 2.0 arrays (Affymetrix) containing 54675 probes. Biotinylated antisense RNA (cRNA) target was generated from 3-15 µg of starting material using the cDNA Synthesis System kit (Roche Diagnostics) and MEGAscript (Ambion), followed by clean-up on a RNeasy spin column (Qiagen) and subjected to fragmentation (length 20–200 bp) according to the standardized procedures of manufacturer (Affymetrix Incorporated, Santa Clara, CA). Fragmented antisense RNAs were hybridized to GeneChip® HGU133 plus 2.0 arrays (Affymetrix Incorporated). Hybridization, washing, staining and scanner procedures were performed using a Genechip Affymetrix station (Fluidics station 450, GeneChip Scanner 3000) as recommended by manufacturer. Digitized image data files and CEL file were used for the subsequent statistical analysis.

Clustering and statistical analysis

Our dataset consists of 40 hybridizations, including 19 primary colorectal tumors and 21 paired LMs. In two cases, a second metachronic metastasis was also analyzed. All analysis were carried out with The R Package [22]. Expression data at the probe level were pre-processed using the Robust Multichip Average (RMA), which performs a convolution background correction and quantile normalization on the raw data, and a summarization based on a robust multi-array model fit [23, 24].

To perform a hierarchical clustering, we first selected the most variable genes among all samples. To do this, we put an arbitrary threshold of standard deviation (s.d) ≥ 0.8 , keeping 4670 (8.5%) probes from the original 54675 probe set. Although somehow arbitrary, there seems to be consistency in the resulting classification, since variations in the standard deviation threshold do not remarkably change the

clustering results. Unsupervised hierarchical clustering was then performed for the 40 samples and the 4670 probes using Pearson's correlation distance and Ward's agglomeration method.

SAM (Significant Analysis of Microarrays) method implemented in *samr* R package [25] was used to perform differential expression analysis between normal liver and primary tumor tissues, and between metastases and primary tumor tissues.

To obtain a reduced list of probes that better discriminate metastases from primary tumor samples, the classification method described by T. R. Golub in 1998 [26] was modified in order to accommodate paired samples in the algorithm. A 4-fold cross-validation process was carried out with the whole set of 19 subjects. We proceeded as follows at each of the four steps of the process: Golub's method was applied to the training set (14-15 samples) using leave-one-out cross-validation, producing a list of genes ordered by its classification ability; the number of discriminating genes were selected as it minimized the corresponding leave-one-out cross-validation error rate; the resulting classifier was then used to predict the tissue type of the remaining 4-5 samples test set, providing a test error rate as a measure of its classification power. Confusion tables for the final Golub's classifier as well as for the four pre-classifiers are available at supplementary table 2.

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) analysis

200 ng of total RNA was reverse transcribed to cDNA using recombinant ribonuclease inhibitor RNase out, oligo(dT)₁₁₋₁₈ and the M-MLV retrotranscriptase (Invitrogen). PCR was carried out with 2 µl of cDNA and LightCycler FastStart DNA Master SyBR Green I kit (Roche). Quantitative real-time RT-PCR was performed using the LightCycler 480 Roche System and data analysis was performed using LightCycler software (release 1.5.0 SP1). Independent validation series of 12 matched cases of normal colon mucosa, primary tumor and liver metastasis was used. For each of the twenty-one genes analyzed, the specificity of amplified PCR product was assured by melting curve analysis. For normalization of gene expression levels, we analyzed the expression of human $\beta 2$ -microglobulin, a housekeeping gene. All experiments were

performed in duplicate using two independent RTs. Non parametric sign test was applied to determine statistic data signification. Sequences of used primers are available at supplementary table 3.

Classifier as prognostic factor of distant dissemination

Prognostic value of the identified seven genes classifier was analyzed by qRT-PCR on an independent series of 101 paired cases of nonadjacent normal colon mucosa and primary tumor, from 61 metastatic colorectal tumours and 40 non metastatic ones at least for 60 months after colon resection. Association of each gene expression (logarithm transformed) with metastasis status was assessed by means of univariate logistic regression. Classifiers for three different outcomes (non metastatic vs. metastatic tumors, non metastatic vs. metachronous and non metastatic vs. synchronous) were built with Random Forest [27, 28] classification method using *Random Forest* R package [29] version 4.5-30. Each forest was built by 5.000 trees. The number of variables used at each split in the trees was selected as it optimized the out-of-bag (OOB) error rate. Capability of prediction was assessed using a leave-one-out and 1.000 repetitions of 4-fold cross-validation stratified by the outcome. Confusion tables for the Random Forest LM prognosis analysis are available at supplementary table 4.

Laser Capture/Cutting Microdissection (LCM)

OCT tissue sections (10µm thick) were cut on cryostat, collected on RNase-free membrane slides (Palm membrane slides; Palm Microlaser Technologies) and quickly stained with hematoxylin in DEPC (Diethyl pyrocarbonate) cold conditions to avoid RNA degradation. Tumor and stromal component from 13 colorectal tumours and from their paired liver metastases were obtained by laser capture (N=54). For each component microdissection of $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ of tissue was performed using laser microdissection system on Olympus IX71 inverted microscope, RNA extraction was performed using TRIzol Reagent (Invitrogen) and glycogen was added to increase the yield of the procedure.

Functional *in vitro* and *in vivo* assays

Tumor cell lines: Thirteen human colon cancer cell lines have been used. HCT116, LoVo, HT-29, KM12C, DLD-1, SW480, SW1116 and SW620 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Caco-2, Colo-205, RKO, Co115 and HCT-15 cell lines were gently provided by M. Esteller (IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). Known characteristics of each cell line are listed in supplementary table 1. Cells were grown and maintained in 10% FBS DMEM-F12 medium (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Evaluation of LM potential of CRC cell lines in nude mice by intrasplenic injection: The thirteen colorectal tumor cell lines (HCT116, LoVo, HT-29, KM12C, DLD-1, SW480, SW1116, SW620, Caco-2, Colo-205, RKO, Co115 and HCT-15) were suspended in 100 µl of PBS solution, and 2×10^6 cells were injected into the spleen (n= 5 for each cell line) of 5-week-old male *nu/nu* Swiss mice (Harlan, France) weighting 18-22 g. Animals were housed in a sterile environment, cages and water were autoclaved, and bedding and food were γ -ray sterilized. Mice were anesthetized by isoflurane inhalation, placed on the right side unstrained and the spleen was exposed through a 5-7 mm cut on the left side. Cells were injected into the middle of spleen using a tuberculin syringe with a 26G needle. To minimize local tumor growth, 48 hours after injection spleen was resected. Mice were inspected twice a week and animals were sacrificed when signs of disease were detected. Healthy mice were observed until a maximum of 3 months. At sacrifice, liver and lungs of all the animals were analyzed for presence of micrometastasis by hematoxylin and eosin staining. All experiments were approved by the Institutional Animal Care Committee.

Gene expression analysis of specific tumor and stromal components of LMs is possible using specific primers, as they are composed by human tumor cells and murine fibrosis. qRT-PCR of grown LMs in mice was performed and compared with wild-type cell lines gene expression.

Mammalian expression vectors and cell transfection: MS4A12 whole cDNA (804 bp) was amplified by PCR using: forward 5' ATATATAAGCTTAATGATGCTATCCAAGCCAAC 3' and reverse 5' ATATATGAATTCCTATTTAGGGGCATTAGCTG 3' primers and cloned

into the mammalian expression vector pHM6 (Roche) that contains HA tag sequence at N-terminus. By HindIII/EcoRI insertion it was created the pHM6-HA-MS4A12. CYP1B1 whole cDNA (1632 bp) was amplified by PCR using: forward 5' ATATATGGATCCATGGGCACCAGCCTCAG 3' and reverse 5' ATATATAAGCTTTTATTGGCAAGTTTCCTTGGC 3' primers and cloned into the mammalian expression vector pCMV2B (Stratagene) that contains FLAG tag sequence at N-terminus. By BamHI/HindIII insertion it was created the pCMV2B-FLAG-CYP1B1. Sequence of both plasmids was confirmed. Transfection of expression vectors into RKO, HCT116 and LoVo colon cancer cell lines was performed using Lipofectamine (Invitrogen). Stables clones expressing each protein were selected in 10% FBS DMEM (Gibco) medium supplemented with 1600µg/ml of G418/geneticin (Invitrogene).

Western blot analysis: To verify expression levels of both tagged proteins, 50 µg of whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Amersham-Pharmacia Biotech), probed with antibodies anti-HA (Roche) or anti-FLAG (Stratagene), with anti-mouse Ig (Amersham biosciences) and specific binding was detected by chemiluminescence method (Amersham Life Science). MS4A12 and CYP1B1 are 27 and 61 KDa proteins, respectively. Western blot image is available at supplementary figure 1.

(Experiments in progress) *Colony formation assay and wound healing assay:* for colony formation assay, 5×10^2 cells were plated in 6-well plates and incubated for 15 days in DMEM-F12 medium. Colonies were then stained for 15 minutes with methylene blue, washed with running water and counted. For wound healing assay, cells were seeded in 6cm diameter plates and cultured until confluent. After 24 hours of culture in serum free DMEM-F12 medium the plate was scratched with a yellow pipette tip to create the wound. After several PBS washes to remove floating cells, pictures were taken every 2 hours at the beginning and every 24 hours for 3 days. Distances were measured with Motic software.

(Experiments in progress) *Evaluation of LM potential of transfected cell lines overexpressing selected genes:* 2×10^6 of stably transfected LoVo, HCT116 and

SW620 cell lines with *MS4A12* or *CYP1B1* genes were intrasplenic injected in nude mice (n=5) as previously described.

RESULTS

Unsupervised hierarchical clustering

To identify differentially expressed genes during metastatic progression, we performed microarray gene expression analysis with 19 matched cases of primary colorectal adenocarcinomas and their LMs. The hierarchical relationship among them is displayed as a dendrogram at supplementary figure 2. Individualized characteristics of these 19 cases are available at supplementary table 5. Samples were separated into two main branches, although we did not identify any apparent pattern that clearly differentiates primary tumors vs. metastases. It is remarkable that in 8 out 19 cases (1, 7, 14, 15, 24, 29, 35 and 39) primary tumors and paired metastases clustered together in the same subgroup, although they did not locate in the same tree branch of the dendrogram. From these subjects, all the metastases but one (case 24) are synchronous, fact that may indicate that primary tumors and metastases which are closer in time share similar expression patterns. Nevertheless, distance increases for metachronous metastases. In case 8, both metachronous metastases (8C1 and 8C2) cluster together in the same subgroup of the dendrogram, while in case 21 (21C1 is a synchronous metastasis and 21C2 is a metachronous one) this fact did not replicate.

Differentially expressed genes in liver metastases

To improve identification of specific gene expression patterns associated with liver metastases, we subtracted in the microarray analysis the potential cross-contamination by normal liver tissue. Liver specific genes profiling was obtained from GSE7307 experiment which includes expression data of four normal livers on

the same microarray platform we used. Gene Express Omnibus (GEO) database [30, 31] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). We identified 28643 probes differentially expressed in normal liver tissue compared to our primary tumour samples at a False Discovery Rate (FDR) of 0.16% using SAM. Out of them, 18418 probes were overexpressed in normal liver and they were subtracted from the initial 54675 probe list for further analysis. Next, we performed the differential expression analysis with SAM algorithm between liver metastasis and primary colorectal tumors. A total of 2632 probes were identified as differentially expressed, after applying a 1% FDR. Of these, 1374 probes had a log-ratio > 0.5 in absolute value (Supplementary table 6). Most of the probes, 1268 (92%) had lower expression in LM (log-ratio range from -3.8 to -0.5) and only 106 (8%) had higher expression (log-ratio range from +0.5 to +2.7) compared with their paired colorectal primary tumors.

Functional analysis

Representation of Gene Ontology (GO) Biological Process terms was examined using the Onto-Express tool [32] with the reference including all genes in the microarray (Affy HGU 133 plus 2.0) and with P-values calculated based on the hypergeometric distribution and corrected using the false discovery rate (FDR) approach [33]. Some of the most interesting biological processes related with liver dissemination were cell communication, coagulation or wound healing.

Also transcription factor binding sites (TFBSs) were examined with GiTools (<http://www.gitools.org>) using TRANSFAC [34] and JASPAR [35] position frequency matrices. *E2F* transcription factor was one of the most relevant ones, previously described in breast cancer outcome [36].

In order to find some possible clusters of genetic expression, genomic distribution of the specific LM related genes has been analyzed. In accordance to GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) there was no chromosomal band significantly represented.

Generation of a liver metastasis classifier

Golub's classification method was modified in order to accommodate paired samples in the algorithm and used for identifying the minimum number of genes able to classify tumours from metastasis with the minimum error. The 4-fold cross-validation process (see Material and Methods) produced four different classifier gene lists with an average test error of 11%. The 28 genes (table 2) were then summarized in an optimal list prioritizing those present in most of the four gene lists and having highest position along them. Probes appearing in 3 or 4 different classifiers, or only in 2 but in a very high ranking position, have been selected. The resulting classifier included 8 probes corresponding to 7 genes (*MMP3*, *MMP1*, *CYP1B1*, *CLCA4*, *MS4A12*, *SPP1* and *CEACAM7*) with an leave-one-out cross-validation error rate of 5,3%. Heatmap for liver metastases classifier, shows that only two cases (34B and 30C) of the 40 analysed samples were misclassified (Supplementary figure 3).

Validation of expression changes by relative quantitative RT-PCR

To confirm mRNA expression levels obtained by the cDNA expression microarray, qRT-PCR using the LightCycler (Roche) was performed in an independent set of 12 paired cases of primary tumor and LM which had not been used before. The expression of 21 genes (3 up-regulated and 18 down-regulated), including the minimum set of 7 genes of the classifier, were analyzed. In 17 out the 21 genes, qRT-PCR experiments confirm the expected over/underexpression trend in liver metastasis (Figure 1A). In 8 genes changes were significant ($p \leq 0.05$) in accordance to the non parametric paired sign test performed. These genes were: *ACTG2*, *PDZD2*, *DIO2*, *MMP3*, *CYP1B1*, *SPP1*, *IGJ* and *FBN2*. The lack of significance for the others reflects the reduced number of samples analyzed (N=12 paired cases). Concerning the 7 genes of the classifier (five were underexpressed and two overexpressed in LM), high consistency exists between data generated by array and qRT-PCR experiments. However, only *MMP3*, *CYP1B1* and *SPP1* genes had significant results in the validation series (Figure 1B).

Prognostic value of distant dissemination in primary tumors

Based on the theory that metastatic expression changes may appear early in the bulk of primary tumor [18, 19], although less representatively than in liver metastases, we hypothesized that 7 genes classifier may be at primary colorectal tumors a prognostic factor of risk to develop LM. Thus, this classifier was applied to an independent cohort of 101 primary colorectal tumors (stage III/IV), all with positive lymph-node at diagnostic, and with potential power to develop distant dissemination. 61 CRCs developed LM, while the remaining 40 CRCs did not develop distant metastases for at least 60 months follow-up. Gene signature was analyzed by qRT-PCR and three out the seven genes, *MS4A12*, *CYP1B1* and *CLCA4*, were significantly overexpressed in metastatic CRC tumors by univariate logistic regression test (pvalues = 1.65e-06, 0.01634 and 0.04192 respectively) (Figure 2; Supplementary figure 4). Random Forest results showed that classifier has an outstanding capability for LM prognosis in primary CRC tumors (leave-one-out analysis 77% of accuracy; 4-fold analysis 73% of accuracy). When metastases were divided into two separated groups (synchronous and metachronous), higher accuracy was obtained for methacronic ones (leave-one-out accuracy of 80%; 4-fold accuracy of 74%). *MS4A12* and *CYP1B1*, were the two genes that most contributed to the discrimination of distant dissemination status (OOB error rate increased in 11.6% and 5.0% respectively when its expression values were permuted randomly in the classifier and less than 1.5% for the rest of the genes). When only these 2 genes were used for LM prognosis, accuracy improved notably respect to 7 gene signature analysis (leave-one-out 82%, 4-fold 80%). Likewise, it happens when methacronic metastases alone were considered (leave-one-out 80%, 4-fold 80%) (Table 3A).

Recently, it has been shown in CRC patients that normal colon mucosa gene expression may contribute to metastasis development [37, 38]. We assessed if classifier applied with normal colonic mucosa of these patients may predict LM. Similar results in terms of accuracy, sensitivity and specificity (~80%) were obtained for the 7-gene signature in normal mucosa samples (Table 3B). Likewise, it happens when only *MS4A12* and *CYP1B1* gene expression was taken into account as they retain the main prognosis power for the presence of LM (leave-one-out accuracy of

78%; 4-fold accuracy of 76%) and for the presence of methacronic metastasis (leave-one-out 84%, 4-fold 82%) (data not shown).

MS4A12 and CYP1B1 genes are mainly expressed in stromal component

Expression patterns of *MS4A12* and *CYP1B1* genes were analyzed in pure fractions of tumor cells and intratumoral stromal cells. Both components were isolated by laser microdissection from 13 cases of primary tumors and paired LMs. Difficulties on working with laser microdissection samples are obvious as from the initially N=54 isolated samples only some few (N=35 for *MS4A12*; N=26 for *CYP1B1*) have resulted with quantity and quality enough for qRT-PCR analysis. Both genes are expressed in both components, although overexpression mainly happens in stromal component, providing the higher levels in the stroma of LMs (figure 4). Moreover, when paired cases of primary tumor and liver metastasis (n=11 pairs for *MS4A12*; n=7 for *CYP1B1*) were compared, also higher stromal expression levels were identified in LM. Gene expression increases in stromal component through tumor-metastasis progression (Supplementary figure 5).

Stably transfected CRC cell lines overexpressing MS4A12 and CYP1B1 modulate/not modulate liver metastases spread *in vivo/in vitro*

MS4A12 and *CYP1B1* gene expression in primary colorectal tumors may confer a growth advantage in tumors as well as in distant sites. We have analyzed if expression of both genes are endogenously regulated through distant dissemination. For this purpose we have generated a liver metastasis model in nude mice based on intrasplenic injection of colorectal tumor cell lines. Similar strategies have been reported in the literature [39, 40]. Thirteen colorectal cancer cell lines, showing different basal expression of *MS4A12* and *CYP1B1* genes (supplementary figure 6), were injected in mice. After 12 weeks, macroscopic LMs were only identified for KM12C (in 5 mice), HCT116 (in 4 out 5) and SW620 (3 out 5) cell lines. However, SW620 administrated mice were not considered specific LM models as they also presented overall dissemination. For HCT116, besides of liver macrometastasis,

pulmonary micrometastases were also identified after hematoxylin and eosin staining.

Comparative analysis between *MS4A12* and *CYP1B1* gene expression of KM12C, HCT116 and SW620 wild-type cell lines and respective grown LMs in mice was performed. Surprisingly, wild-type *MS4A12* gene expression is lower than in LMs in most cases and, on the contrary, wild-type *CYP1B1* gene expression is higher than in LMs (supplementary figure 7). There is no correlation with previous results but it has been only studied tumor component as specific human primers were used and contribution of stromal gene expression in the LMs should not be discarded.

(Results in progress) We are investigating the role of *CYP1B1* and *MS4A12* overexpression into tumor cells by *in vivo* and *in vitro* experiments. Three cell lines showing different metastatic power (HCT116, LoVo and RKO) were stably transfected and they have been intrasplenic injected in nude mice. Changes in distant dissemination efficiency will be analyzed. Expression analysis for both genes in grown LMs will be performed using specific primers to recognize human cells (tumor component) and murine cells (stromal component).

DISCUSSION

One of the main challenges in cancer is to understand biological mechanisms of metastasis which is the cause of most of cancer-related deaths. We report the building of a liver metastasis classifier based on a 7-gene signature derived from differential microarray gene expression profiles between paired cases of primary colorectal tumors and liver metastases. Classifier was validated in an independent series of paired cases of tumors and LMs. It was also successfully used as prognostic tool in an independent series of stage III/IV CRC tumors to identify patients at risk to develop distant liver metastases.

Microarray gene expression profiling provides a valuable approach for CRC prognosis studies, by analogy with results reported in other type of tumors, mainly in breast cancer [11, 12, 41]. CRC expression profiles have mainly focused on comparisons between normal colonic mucosa, adenoma and primary tumors in order to distinguish normal and tumor tissue samples, different stages of disease or different colorectal tumor location [13-15]. Nevertheless, very few studies have been addressed on differences between primary tumors and metastases [16, 17].

We have found a striking transcriptional similarity between paired samples of primary tumors and matched liver metastases in accordance to unsupervised hierarchical dendrogram results. In 42% of the cases (8 out 19) primary tumors resemble their paired metastases more than other primary counterparts, fact that mainly happens with synchronous cases (7 out 8 cases). For the rest of synchronous metastases, we did not detect association with major time elapsed between primary tumor and LM resection that may explain separate classification.

Selection of homogeneous samples among heterogeneous tumors (right vs left colon, colon vs rectum, genetic instability status, *K-RAS* and *PI3KCA* mutation...) is a problem that may influence expression profiles. But, when the study also includes matched liver metastases, problem is magnified and it is especially complicated to generate a big cohort of samples with all groups well represented because of the difficulties for getting paired samples. In our expression profiling study, the only sample exclusion criteria applied was presence of genetic instability for its different

clinical and genetic tumor properties. Likewise, we did not apply any tumor cell concentration approach because our interest was considering tumors and metastases as entire units containing tumor cells and stroma. It is important to consider tumor/metastatic lesions as a whole because cancer is not only confined to tumor cells but also involve adjacent cells and it would be wrong despising stromal component. We thought that this approach may help to improve our signature by taking into account intratumoral role of tumor-stroma, tumor-endothelial cells and tumor-immune cells interactions. Most of the chosen primary tumors were composed of at least 75% of tumor cells, while in metastases it was more than 50%.

Expression data may be highly conditioned by host tissue genetic background. To minimize the influence of liver cross-contamination in liver metastases profile, liver-specific genes were subtracted from the analysis. Then, most of the genes differentially expressed between primary tumors and LMs (1374 probes) were underexpressed genes in LM and only less than 8% were overexpressed, being highly consistent results with previously reported literature [16]. Downregulation in liver metastases may be explained by: (a) the loss of specific functions of tumor suppressor genes is required for hepatic dissemination; (b) highly activated oncogenes are needed in primary tumor as metastasis initiation genes; (c) overexpression of metastatic genes yet at primary tumor is not so much different from LM expression.

Microarray data analysis was performed in order to obtain a more manageable specific LM gene list. 4 different sets of training and test samples were used to overcome the most limiting factor in microarrays technologies, the small sample size. Metastatic gene signature has been built considering as optimum the minimum number of genes able to classify primary tumors from LMs with the lowest cross-validation error. Initial list of 28 probes obtained from the 4 classifiers it was reduced to 7 genes taking into account in how many classifiers (up to 4) a specific probe appears and its rank-mean (mean position across rankings). Final classifier is based on 8 probes corresponding to a 7 gene set signature: matrix metalloproteinase 3 and 1 (*MMP3* and *MMP1*), cytochrome P450 family 1, subfamily B, polypeptide 1 (*CYP1B1*), chloride channel calcium activated 4 (*CLCA4*), membrane-

spanning 4-domains, subfamily A, member 12 (*MS4A12*), secreted phosphoprotein 1 (*SPP1*) and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7 (*CEACAM7*). According to microarray data, *CYP1B1* and *SPP1* are overexpressed genes in liver metastases whereas the others are underexpressed. Consistent data with microarray results has been obtained by quantitative RT-PCR validation but only 3 of the metastatic signature genes (*SPP1*, *CYP1B1* and *MMP3*) have been resulted significant in accordance to the non parametric paired sign test. Lack of significance could be due to the reduced validation series (n=12 paired cases).

When our 7-gene classifier was compared with other metastatic signatures previously reported in the literature, low coincidence among genes was observed although most of them are congruent biological functions related genes. Variability may be attributed to different experimental designs as the used microarray platform, data analysis methods, small samples size used to generate the gene list or the heterogeneity of CRC cohorts of patients [42]. To achieve an overlap of 50% between lists of genes, we would need expression profiles of several thousand of patients [43].

In absence of distant metastasis, first step in CRC treatment is the one-block removal of tumor and adjacent lymph nodes. Post-operative treatment is determined by lymph node status (invaded or disease-free). Usefulness of adjuvant chemotherapy has been clearly established in patients with invaded lymph nodes (stage III), while it remains controversial in patients with disease-free lymph nodes (stage II). We need more efficient CRC prognostic markers to avoid under/overtreatment especially in stage II/III patients [5, 6].

We hypothesized that LM specifically related genes could be detected yet in early tumour stages [18, 19] and therefore they could be used in colorectal cancer LM prognosis. Thus, we assessed in a series of stage III/IV CRC tumors if our 7-genes signature would provide a powerful tool to select patients at risk to develop LM. Classifier has prognostic power in primary CRC for the presence of LM (leave-one-out analysis 77% of accuracy; 4-fold analysis 73% of accuracy). Classifier also selects patients who are at risk to develop metachronous metastases, which are clinically

the more relevant ones. Identification of patients who need more intensive clinical intervention could improve CRC survival.

According to univariate logistic regression test of stage III/IV CRC series, 3 out the 7 genes of the LM signature, *MS4A12* ($p=1.65e-06$), *CYP1B1* ($p=0.016$) and *CLCA4* ($p=0.042$), were significantly overexpressed in metastatic tumors in comparison with non metastatic ones. Moreover, Random Forest analysis for LM prognosis assessment reinforces the relevance of *MS4A12* and *CYP1B1* tumor expression levels, in this stage III/IV CRC series. These two genes together are enough to prognosticate presence of LM with accuracy of 82% (leave-one-out cross-validation analysis) and of 80% (1000 repetitions of 4-fold cross-validation analysis) with similar sensitivity (87%) and specificity (75 and 70%) values.

It has been suggested that adjacent non-neoplastic colonic mucosa also shows prognosis capability [37, 38]. Potential usefulness of non-neoplastic mucosa in prognosis of stages II and III colon cancer patients is somewhat surprising and clearly, it is hardly explained. There is growing evidences that tumor microenvironment is involved in tumorigenic process, fostering cell proliferation, survival and migration [44, 45]. In our study, we have shown that the 7-genes signature also classifies patients at risk to develop distant metastasis using normal mucosa samples expression levels with similar accuracy, sensibility and specificity values than in primary tumor analyses. In this study, distant dissemination prognosis has been assessed using non-adjacent colonic mucosa. This fact suggests that in CRC tumorigenesis not only normal nearby tumor area is relevant. Our data support a prospective systematic analysis of *MS4A12* and *CYP1B1* genes as prognostic markers of distant dissemination by analyzing normal mucosa expression levels.

Recently, it has been revealed the existence of metastasis gene signatures expressed by primary tumors, fact that may confer growth advantage on the primary tumor as well as at distant sites. However, several aspects are still unclear such as at what point these metastatic gene signatures are acquired during tumorigenic process or which cell type is the responsible one. According with our expression data, *MS4A12* and *CYP1B1* metastatic genes seem to have a relevant role in CRC. Interestingly, in

paired cases of primary tumors and LMs after tumor/stromal cells concentration by laser microdissection technology, we demonstrated that both genes are expressed in the whole of primary tumors as well as LMs. Nevertheless, stroma of LMs showed the highest gene expression levels. Thus, it remains unclear whether this metastatic potential is only originated in cancer cells or also in stroma, and if there is some type of cross-talk between them.

(Results in progress) CRC liver metastasis model in nude mice has been obtained after intrasplenic injection of 13 different colorectal tumor cell lines. Only 3 of them (KM12C, HCT116 and SW620) have developed LM in a maximum period of 3 months. To investigate whether expression levels of *MS4A12* and *CYP1B1* genes may contribute to liver distant dissemination, we have performed two different approaches simultaneously: *in vitro* and *in vivo*. For both types of experiments, three colorectal cancer cell lines (LoVo, RKO and HCT116) have been used. We have demonstrated different dissemination capability to generate LMs after intrasplenic cell injection in nude mice. Cell lines were stably transfected with epitope-tagged *MS4A12* and *CYP1B1* genes. After that, these cell lines have been intrasplenic injected in nude mice and now we are waiting for results. Likewise, we are performing *in vitro* experiments using these cell lines such as cloning assay or wound healing assay. Together, we expect that our results will permit to answer if overexpression of these genes may modify liver metastasis spread ability of transfected cell lines.

Recently, it has been described that *MS4A12* is a cell surface colonic epithelial cell lineage gene confined to the apical membrane of colonocytes with strict transcriptional repression in all other normal tissues. *MS4A12* is a novel component of store-operated Ca^{+2} (SOC) entry in intestinal cells [46, 47]. Enhanced Ca^{+2} flux mediated by *MS4A12* expression lows the threshold concentration of *EGF* being a modulator of *EGFR* signaling, which is a dominant tumour-promoting factor in CRC proliferation and chemotaxis.

Otherwise, *CYP1B1*, a variant of cytochrome P450, is a carcinogen-metabolizing enzyme involved in the metabolism of carcinogens such as PAHs (Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons) found in overcooked meat. Certain genetic polymorphisms of *CYP1B1* may be associated with colorectal cancer risk [48, 49]. Moreover, methylation of *CYP1B1* promoter in CRC (5%) has been recently reported [50].

In conclusion, a 7-gene liver metastasis classifier was generated after differential microarray gene expression profiling between paired cases of primary colorectal tumors and LMs and it was validated in an independent tumor series. Classifier successfully identifies stage III CRC patients at risk to develop distant LM, being *MS4A12* and *CYP1B1*, the two genes that most contribute to discrimination of distant dissemination status and to improve accuracy. These findings may have relevant clinical implications because metastatic signature identification early in tumor development may help to select CRC patients with high risk to develop LM who will therefore benefit from adjuvant chemotherapy and to spare unnecessary treatment and its related side effects for low risk patients. This work will help to better understand liver metastatic process as well as to improve CRC prognosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

REFERENCES

1. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
2. Fong, Y., et al., *Liver resection for colorectal metastases*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 938-46.
3. Ohlsson, B., U. Stenram, and K.G. Tranberg, *Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience*. World J Surg, 1998. **22**(3): p. 268-76; discussion 276-7.
4. Goldberg, R.M., et al., *The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer*. Oncologist, 2007. **12**(1): p. 38-50.
5. Gill, S., et al., *Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?* J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1797-806.
6. Quasar Collaborative, G., et al., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study*. Lancet, 2007. **370**(9604): p. 2020-9.
7. Figueras, J., et al., *Resection rate and effect of postoperative chemotherapy on survival after surgery for colorectal liver metastases*. Br J Surg, 2001. **88**(7): p. 980-5.
8. Tomlinson, J.S., et al., *Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure*. J Clin Oncol, 2007. **25**(29): p. 4575-80.
9. Weiss, L., *Inefficiency of metastasis from colorectal carcinomas. Relationship to local therapy for hepatic metastasis*. Cancer Treat Res, 1994. **69**: p. 1-11.

10. Nguyen, D.X. and J. Massague, *Genetic determinants of cancer metastasis*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 341-52.
11. Bos, P.D., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1005-9.
12. Minn, A.J., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 518-24.
13. Jorissen, R.N., et al., *Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer*. Clin Cancer Res, 2009.
14. Nadal, C., J. Maurel, and P. Gascon, *Is there a genetic signature for liver metastasis in colorectal cancer?* World J Gastroenterol, 2007. **13**(44): p. 5832-44.
15. Nannini, M., et al., *Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(3): p. 201-9.
16. Ki, D.H., et al., *Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(9): p. 2005-12.
17. Yanagawa, R., et al., *Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray*. Neoplasia, 2001. **3**(5): p. 395-401.
18. Bernards, R. and R.A. Weinberg, *A progression puzzle*. Nature, 2002. **418**(6900): p. 823.
19. D'Arrigo, A., et al., *Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma*. Int J Cancer, 2005. **115**(2): p. 256-62.

20. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
21. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 302-12.
22. *R Development Core Team; R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2009.
23. Irizarry, R.A., et al., *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. e15.
24. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
25. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
26. Golub, T.R., et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science, 1999. **286**(5439): p. 531-7.
27. Breiman, L., *Random forests*. Machine learning, 2001. **45**: p. 5-32.
28. Breiman, L., *Manual On Setting Up, Using, And Understanding Random Forests* V3.1; http://oz.berkeley.edu/users/breiman/Using_random_forests_V3.1.pdf. 2002
29. Liaw, A. and M. Wiener, *Classification and Regression by randomForest*. R News, 2002. **2**((3)): p. 18-22.
30. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D885-90.

31. Edgar, R., M. Domrachev, and A.E. Lash, *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 207-10.
32. Khatri, P., et al., *Onto-Tools: new additions and improvements in 2006*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W206-11.
33. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. J Roy Statist Soc Ser B, 1995. **57**: p. 289-300.
34. Matys, V., et al., *TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D108-10.
35. Bryne, J.C., et al., *JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D102-6.
36. Vuaroqueaux, V., et al., *Low E2F1 transcript levels are a strong determinant of favorable breast cancer outcome*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(3): p. R33.
37. Barrier, A., et al., *Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2642-8.
38. Barrier, A., et al., *Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling*. Oncogene, 2005. **24**(40): p. 6155-64.
39. Flatmark, K., et al., *Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice*. Eur J Cancer, 2004. **40**(10): p. 1593-8.
40. Robertson, J.H., et al., *In vivo models for early development of colorectal liver metastasis*. Int J Exp Pathol, 2008. **89**(1): p. 1-12.

41. Mook, S., et al., *The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age*. Ann Oncol, 2009.
42. Lin, Y.H., et al., *Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 498-507.
43. Ein-Dor, L., O. Zuk, and E. Domany, *Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5923-8.
44. Gout, S. and J. Huot, *Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer*. Cancer Microenviron, 2008. **1**(1): p. 69-83.
45. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
46. Koslowski, M., et al., *MS4A12 is a colon-selective store-operated calcium channel promoting malignant cell processes*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3458-66.
47. Koslowski, M., et al., *Selective activation of tumor growth-promoting Ca²⁺ channel MS4A12 in colon cancer by caudal type homeobox transcription factor CDX2*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 77.
48. Cotterchio, M., et al., *Red meat intake, doneness, polymorphisms in genes that encode carcinogen-metabolizing enzymes, and colorectal cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(11): p. 3098-107.
49. Bethke, L., et al., *Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 123.
50. Habano, W., et al., *CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers*. Int J Oncol, 2009. **34**(4): p. 1085-91.

TABLES AND FIGURES**Table 1: Characteristics of samples**

A)	Profiling samples	Validation series	B)	Metastatic series	Non metastatic series
Number of patients	19	12	Number of patients	61	40
Gender (M:F)	12:7	8:4	Gender (M:F)	39:22	17:23
Median age, years (range)	65 (51-78)	61 (52-73)	Median age, years (range)	64 (45-85)	64 (45-85)
Tumour location:			Tumour location:		
Right colon	6	2	Right colon	14	10
Left colon	6	6	Left colon	25	18
Rectum	7	4	Rectum	22	12
Tumour T stage*:			Tumour T stage*:		
T1	1	0	T1	0	1
T2	0	1	T2	4	6
T3	16	11	T3	52	32
T4	2	0	T4	5	1
Lymph node invasion*:			Lymph node invasion*:		
N0	5	3	N0	0	0
N1	9	4	N1	31	28
N2	5	5	N2	30	12
Median liver metastasis free survival (range)	4 (0-30) months	5 (0-26) months	Median liver metastasis free survival (range)	13 (0-58) months	10 (5-12) years
Tumour content in liver metastases (%):			Tumour content in liver metastases (%):		
25-50	4	2	25-50	—	—
50-75	9	6	50-75		
75-100	6	4	75-100		
Type of metastases:			Type of metastases:		
Synchronous	14	9	Synchronous	21	—
Metachronous	5	3	Metachronous	40	

A) Paired colorectal tumours and LM series; **B)** LM prognosis series (stage III CRC patients).

*According to TNM staging system for colorectal tumours. N: normal colon; T: colorectal primary tumour; LM: liver metastasis

Table 2: Liver metastasis signature: gene set that classifies colorectal primary tumours and liver metastases.

PROBES	OVEREXPRESSION	NCLASS	RANK MEAN	GENE SYMBOL	GENE DESCRIPTION	CHROMOSOMAL LOCATION
205828_at	in primary	4	1,2	MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	Chr 11[-] 102211738-102219552 bp
204475_at	in primary	4	2	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	Chr 11[-] 102165861-102174104 bp
202437_s_at	in metastasis	4	11,2	CYP11B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp
202436_s_at	in metastasis	4	25,8	CYP11B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp
220026_at	in primary	3	1,8	CLCA4	chloride channel, calcium activated, family member 4	Chr 1[+] 86785349-86819025 bp
220834_at	in primary	3	9,8	MS4A12	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 12	Chr 11[+] 60016827-60031479 bp
209875_s_at	in metastasis	3	68	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Chr 4[+] 89115826-89123592 bp
206198_s_at	in primary	2	4	CEACAM7	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7	Chr 19[-] 46869073-46883936 bp
202435_s_at	in metastasis	2	59,2	CYP11B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp
229479_at	in metastasis	2	73,6	Hs.152812	Transcribed locus	
205626_s_at	in metastasis	2	89	CALB1	calbindin 1, 28kDa	Chr 8[-] 91140014-91164283 bp
1554195_a_at	in metastasis	2	95,4	MGC23985		Chr 5[-] 147252464-147266258 bp
213425_at	in primary	1	8	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Chr 3[-] 55474783-55496371 bp
210302_s_at	in primary	1	9,8	MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)	Chr 4[+] 151722699-151725295 bp
212592_at	in primary	1	9,8	IGJ	immunoglobulin J polypeptide	Chr 4[-] 71740548-71751128 bp
226834_at	in primary	1	10,8	Hs.504187	Transcribed locus	
1554436_a_at	in primary	1	11,4	REG4	regenerating islet-derived family, member 4	Chr 1[-] 120138164-120155806 bp
223122_s_at	in primary	1	12,6	SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	Chr 4[-] 154921192-154929678 bp
206664_at	in primary	1	15,4	SI	sucrase-isomaltase (alpha-glucosidase)	Chr 3[-] 166179380-166278976 bp
223597_at	in primary	1	17,4	ITLN1	intelectin 1 (galactofuranose binding)	Chr 1[-] 159112954-159121673 bp
207245_at	in primary	1	18,6	UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	Chr 4[-] 69085497-69116840 bp
225540_at	in metastasis	1	117,4	MAP2	microtubule-associated protein 2	Chr 2[+] 209997016-210307079 bp
210467_x_at	in metastasis	1	131,8	MAGEA12	melanoma antigen family A, 12	Chr 2[+] 151627399-151653840 bp
235229_at	in metastasis	1	165,2	AI694413	Transcribed locus, weakly similar to XP_219206.4 similar to olfactory receptor 472	
205625_s_at	in metastasis	1	205,6	CALB1	calbindin 1, 28kDa	Chr 8[-] 91140014-91164283 bp
236335_at	in metastasis	1	250,8	BC047463	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5274212.	Chr 11[-] 106049962-106052207 bp
236335_at	in metastasis	1	250,8	BC036599	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5273964.	Chr 11[-] 106049962-106052207 bp
1554018_at	in metastasis	1	304,6	GNPMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	Chr 7[+] 23252841-23281254 bp

The final liver metastasis signature includes the first 8 probes (in bold) for being in 3 or 4 classifiers. *CEACAM7* has also been selected as it has a high rank mean although it appears only in 2 classifiers. Including more probes in the final signature don't improve the cross-validation error. Nclass: number of classifiers (up to 4) where a specific probe appears; Rank mean: mean position across rankings.

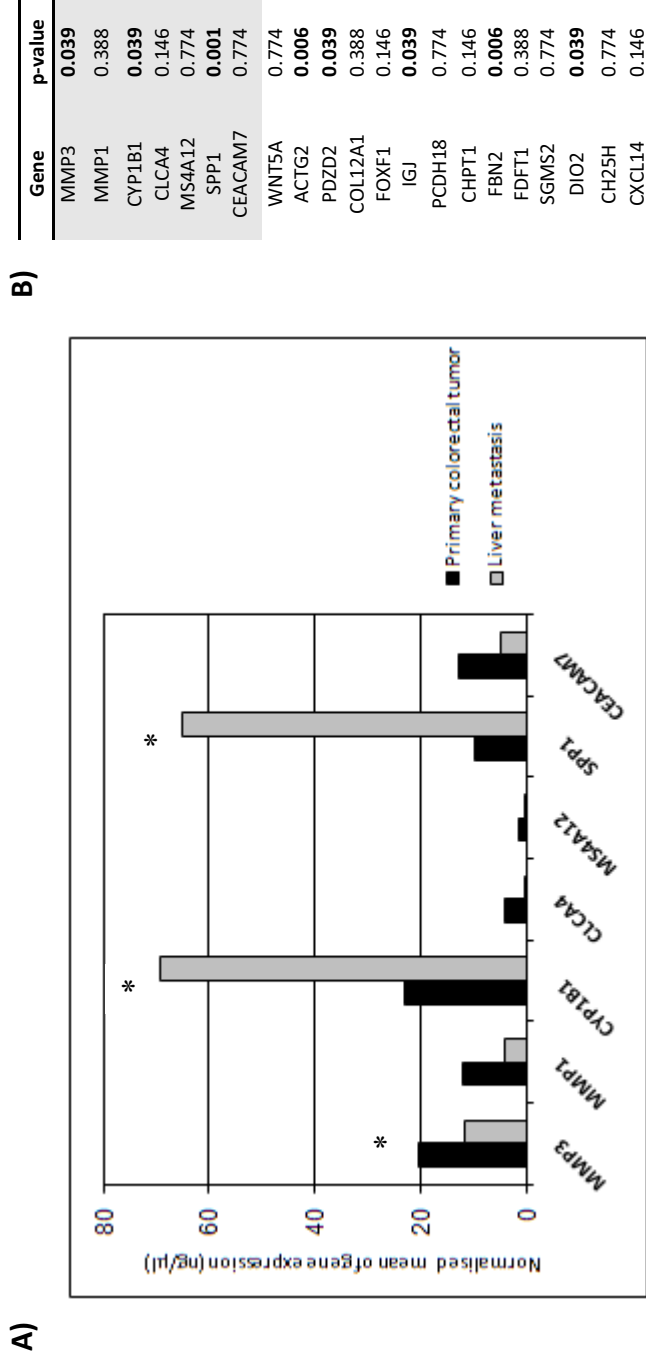


Figure 1: Validation of microarrays data by quantitative RT-PCR

A) qRT-PCR data are consistent with the microarray data for the 7 metastatic signature genes. Liver metastasis overexpressed genes (*CYP1B1* and *SPP1*), as well as underexpressed ones in accordance with microarray results, follow the same trend although only three of them (*MMP3*, *CYP1B1* and *SPP1*) do it in a significant way (*). **B)** 8 out of a total of 21 analysed genes (in bold) have significant p-value (<0,05) according to non parametric sign test.

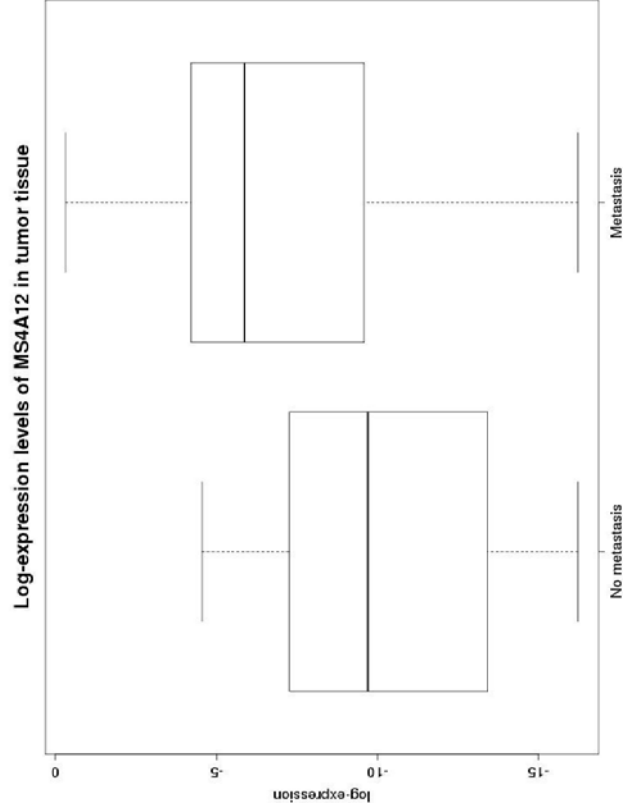
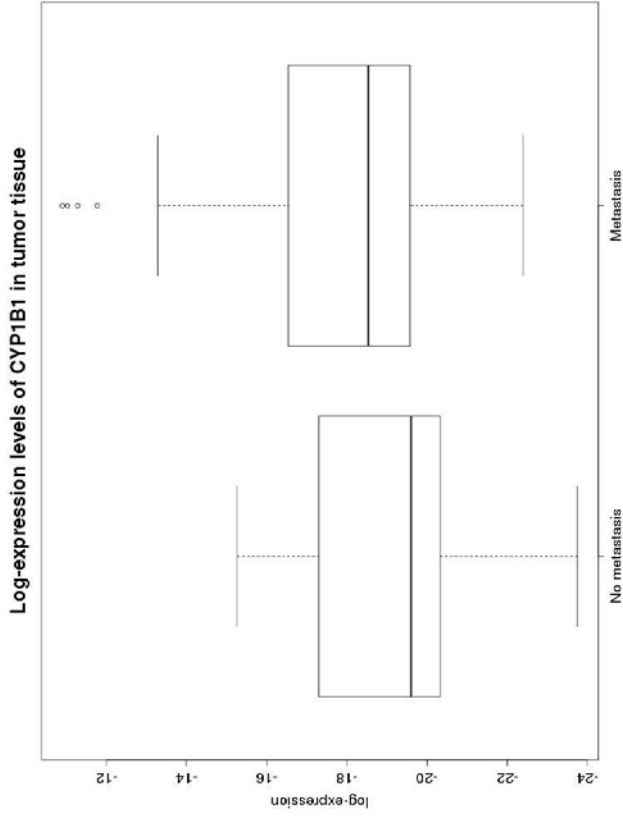


Figure 2: Colorectal tumours normalised gene expression

Metastatic primary tumours have significant higher gene expression of *MS4A12* ($p=1,65 \text{ E-}6$) and *CYP1B1* ($p=0,01634$) than non metastatic ones according to univariate logistic regression test. Otherwise, when normal colon univariate regression test is applied *CYP1B1* gene expression is not significant.

OR: Odds ratio

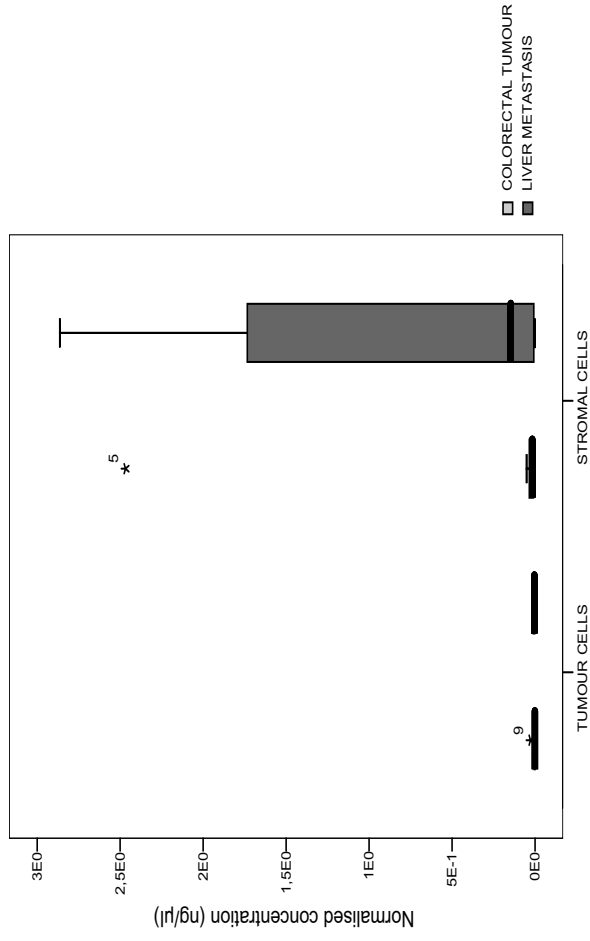
	PRIMARY TUMOUR		NORMAL COLON	
	OR	pvalue	OR	pvalue
CEACAM7	0,97	0,792	1.12	0.703
CLCA4	1,15	0,042	2.10	0.002
CYP1B1	1,23	0,016	1.01	0.945
MMP1	0,85	0,205	1.03	0.860
MMP3	1	0,996	0.93	0.306
MS4A12	1,33	1,65E-06	2.52	2,00E-05
SPP1	1,12	0,326	1.74	0.003

	7 genes signature analysis		Important genes analysis	
	leave-one-out cv	4-fold cv	leave-one-out cv	4-fold cv
Non metastatic series (n=40) versus metastatic series (n=61)	Accuracy	0,77	0,82	0,80
	Sensitivity	0,84	0,87	0,87
	Specificity	0,68	0,61	0,70
Non metastatic series (n=40) versus synchronous series (n=21)	Accuracy	0,75	0,79	0,78
	Sensitivity	0,38	0,52	0,51
	Specificity	0,95	0,93	0,91
Non metastatic series (n=40) versus metachronous series (n=40)	Accuracy	0,80	0,80	0,80
	Sensitivity	0,80	0,80	0,80
	Specificity	0,80	0,80	0,81
				Genes name
				<i>MS4A12, CYP1B1</i>
				<i>MS4A12, CYP1B1, CEACAM7</i>
				<i>MS4A12, CYP1B1</i>

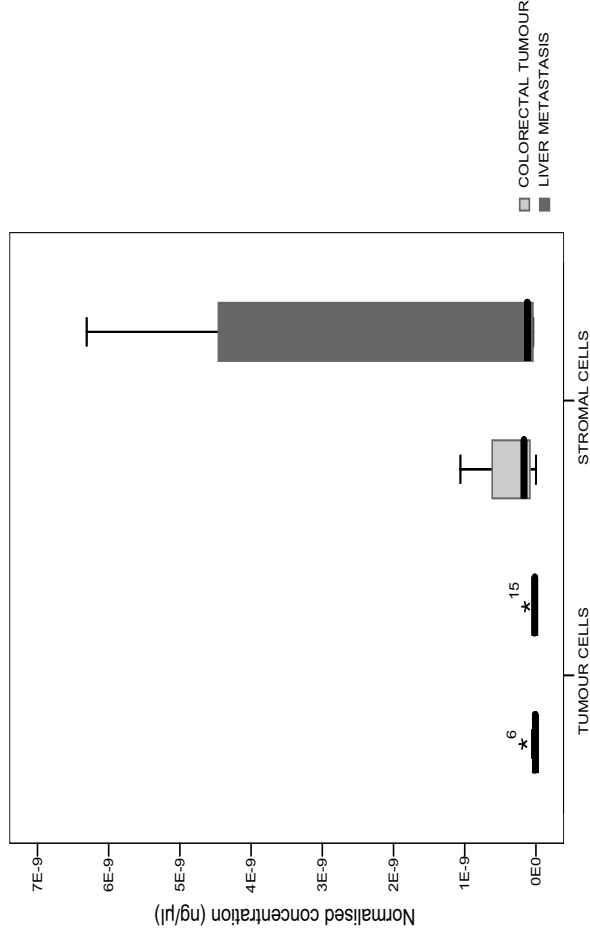
	7 genes signature analysis		Important genes analysis	
	leave-one-out cv	4-fold cv	leave-one-out cv	4-fold cv
Non metastatic series (n=40) versus metastatic series (n=61)	Accuracy	0,77	0,84	0,81
	Sensitivity	0,85	0,88	0,86
	Specificity	0,66	0,68	0,74
Non metastatic series (n=40) versus synchronous series (n=21)	Accuracy	0,74	0,78	0,71
	Sensitivity	0,50	0,67	0,50
	Specificity	0,86	0,83	0,82
Non metastatic series (n=40) versus metachronous series (n=40)	Accuracy	0,80	0,83	0,81
	Sensitivity	0,80	0,83	0,80
	Specificity	0,80	0,83	0,81
				Genes name
				<i>MS4A12, CYP1B1, CEACAM7</i>
				<i>MS4A12, CYP1B1, CLCA4, CEACAM7</i>
				<i>MS4A12, CYP1B1, SPP1, CLCA4</i>

A) LM prognosis capability of colorectal tumour gene expression data; **B)** LM prognosis capability of normal colon mucosa gene expression data. Accuracy: global correct prognosis; Sensitivity: metastatic tumours correctly predicted; Specificity: non metastatic tumours correctly predicted; cv: cross validation; LM: liver metastasis

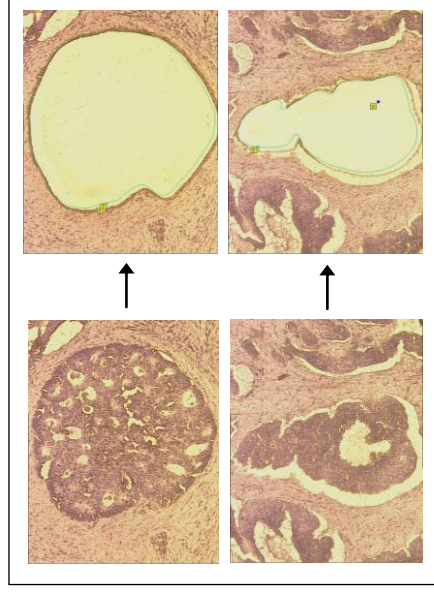
A) MS4A12 GENE EXPRESSION IN MICRODISSECTED SAMPLES



CYP1B1 GENE EXPRESSION IN MICRODISSECTED SAMPLES



B)



Mean of normalised <i>MS4A12</i> gene expression (ng/µl)		
Primary tumours (N=15)		
Tumour cells	Stroma	3,7E-01
5,1E-03	6,8E-03	7,9E-01

Mean of normalised <i>CYP1B1</i> gene expression (ng/µl)		
Primary tumours (N=12)		
Tumour cells	Stroma	3,2E-08
3,7E-11	3,8E-11	3,7E-07

Figure 3: Specific gene expression analysis with laser microdissected samples

- A)** *MS4A12* and *CYP1B1* genes are overexpressed in stromal component in comparison with tumour cells and specifically overexpressed in liver LM stroma.
- B)** Laser Cutting Microdissection (LCM) technology example of tumour cells collection.

SUPPLEMENTARY DATA**Supplementary Table 1:** Human colorectal cancer cell lines used

Cell line	Derived from	Patient (sex/age)
Caco-2	colorectal adenocarcinoma	male/72
HCT116	colorectal carcinoma	male/?
HT-29	colorectal adenocarcinoma	female/44
SW480	colorectal adenocarcinoma Dukes' B	male/50
SW620	colorectal adenocarcinoma Dukes' C from a metastatic lymph node of the same patient of SW480	male/51
SW1116	colorectal adenocarcinoma Dukes' A type III	male/73
KM12C	colorectal adenocarcinoma Dukes' B2. KM12SM was derived from liver metastasis of the same patient	?
DLD-1	colorectal adenocarcinoma Dukes' C	male/adult
LoVo	colorectal adenocarcinoma Dukes' C grade IV from a left supraclavicular metastatic region	male/56
Colo-205	colorectal adenocarcinoma Dukes' D from ascitic fluid of metastatic region	male/70
RKO	poorly differentiated colon carcinoma cell line	?
Co115	poorly differentiated colorectal carcinoma Dukes' C	female/77
HCT-15	colorectal adenocarcinoma Dukes' C	male/?

Supplementary Table 2: Confusion tables for the Golub's gene set classifier**Leave-one-out results for the final classifier:**

	LM	T
LM	19	0
T	2	17

Error: 0.05263158

Sensitivity: 1

Specificity: 0.8947368

Test set results for the 4 pre-classifiers:

Classifier 1

	LM	T
LM	5	0
T	0	5

Error: 0

Sensitivity: 1

Specificity: 1

Classifier 2

	LM	T
LM	5	0
T	1	4

Error: 0.1

Sensitivity: 1

Specificity: 0.8

Classifier 3

	LM	T
LM	5	0
T	1	4

Error: 0.1

Sensitivity: 1

Specificity: 0.8

Classifier 4

	LM	T
LM	4	0
T	2	2

Error: 0.25

Sensitivity: 1

Specificity: 0.5

Supplementary Table 3: Primers sequences

GENE NAME	MELTING TEMPERATURE	PRIMERS SEQUENCES
B2-MICROG_human	67/63°C	Forward 5' CCTGGAGGCTATCCAGC 3' Reverse 5' GTCGGATGGATGAAACCC 3'
MMP1_human	66/63°C	Forward 5' ACCTCTGACATTACCAAGG 3' Reverse 5' GCATGAGCAAGATTTCTCC 3'
MMP3_human	63°C	Forward 5' AGAACCTTTCTGGCATC 3' Reverse 5' CAACAGCAGAATCAACAGC 3'
CYP1B1_human	68°C	Forward 5' TGGATTGGAGAACGTACCG 3' Reverse 5'AATTCTGCCTGCACTCGAGT 3'
SPP1_human	65°C	Forward 5' CTCCTAGGCATCACCTGTG 3' Reverse 5' CTGAGATGGGTCAGGGTTA 3'
CLCA4_human	61°C	Forward 5' ACAGAATGGACATACAGAAG 3' Reverse 5' GCTATATCTGCCATTTCTG 3'
MS4A12_human	65°C	Forward 5' TAGGGGTGATCCAGATCATG 3' Reverse 5' ACAGAGAGAGCCAGAGAT 3'
CEACAM7_human	65°C	Forward 5' AAGCAAGTTCACCTGACCTC 3' Reverse 5' TGCCACCTCCAGCTTATAG 3'
CXCL14_human	61°C	Forward 5' GTGTCCAGGTACCGAGGT 3' Reverse 5' GTTTGGAGTTTTCCCTTCTGA3'
WNT5A_human	65°C	Forward 5' TCCTAGTGGCTTTGGCCATA 3' Reverse 5' AGAGAGGCTGTGCTCCTATA 3'
CH25H_human	67°C	Forward 5' AGACCCTCTACCAGCATG 3' Reverse 5' CAGAACAGGATGTGGTGC 3'
PDZD2_human	63°C	Forward 5' CCAATGGGAAGGGTTTGC 3' Reverse 5' CCCCATCCAGACTCAGT 3'
DIO2_human	66°C	Forward 5' GCACGTGGTGCTGCTGT 3' Reverse 5' TTGTCACCTCCTTCTGTAC 3'
ACTG2_human	66°C	Forward 5' TAAATCCCAAGCCAACAGG 3' Reverse 5' GCCATCACCTGAATCCAGG 3'
PCDH18_human	65°C	Forward 5' CTACCTTAGAAAGAGGGCAG 3' Reverse 5' AAGAAGCTGAGAGACCTGCT 3'
COL12A1_human	65°C	Forward 5' CTGTTAAGGACACAGAGCC 3' Reverse 5' AAGGTGACTTCCCGAACAG 3'
FOXF1_human	67°C	Forward 5' AGAACAGCCACAACGCC 3' Reverse 5' GGTGGTAGTAGGAGCCC 3'
CHPT1_human	62°C	Forward 5' CCTTCCAGTTCTTGGATTC 3' Reverse 5' GACACATCCAACATTAGGA 3'
IGJ_human	65°C	Forward 5' ACCTCACATTGAGAACCAGA 3' Reverse 5' GATTATCCAGCTCCACTTCTGT 3'
SGMS2_human	67°C	Forward 5' ATAGTGGGACGCAGATTCTGT 3' Reverse 5' CCAGTTATGGACAATCCACCA 3'
FDFT1_human	67°C	Forward 5' AACCAAGTGGCGTTTCATG 3' Reverse 5' CATCCCAATGCCATTCTCC 3'
FBN2_human	65°C	Forward 5' GTTCACTCAGGTCAACAAC 3' Reverse 5' AGTTTCCTCCTTGGCATATC 3'

B2-MICROG and MMP1 primers have 2 melting temperatures being the highest to amplify human and not murine tissue.

Supplementary Table 4: Confusion tables for Random Forest analysis

TUMOUR DATA

Metachronic cases (7 signature genes)

	NO LM	metachronic
NO LM	32	8
metachronic	8	32

Error: 0,2
Sensitivity: 0,8
Specificity: 0,8

Metachronic cases (CYP1B1, MS4A12)

	NO LM	metachronic
NO LM	32	8
metachronic	8	32

Error: 0,2
Sensitivity: 0,8
Specificity: 0,8

Metachronic + synchronic cases (7 signature genes)

	NO LM	LM
NO LM	27	13
LM	10	51

Error: 0,23
Sensitivity: 0,84
Specificity: 0,68

Metachronic + synchronic cases (CYP1B1, MS4A12)

	NO LM	LM
NO LM	30	10
LM	8	53

Error: 0,18
Sensitivity: 0,87
Specificity: 0,75

Synchronic cases (7 signature genes)

	NO LM	synchronic
NO LM	38	2
synchronic	13	8

Error: 0,25
Sensitivity: 0,38
Specificity: 0,95

NORMAL COLON DATA

Metachronic cases (7 signature genes)

	NO LM	metachronic
NO LM	28	7
metachronic	7	28

Error: 0,2
Sensitivity: 0,8
Specificity: 0,8

Metachronic cases (CYP1B1, MS4A12, CLCA4, SPP1)

	NO LM	metachronic
NO LM	30	6
metachronic	6	30

Error: 0,17
Sensitivity: 0,83
Specificity: 0,83

Metachronic + synchronic cases (7 signature genes)

	NO LM	LM
NO LM	23	12
LM	8	45

Error: 0,23
Sensitivity: 0,85
Specificity: 0,66

Metachronic + synchronic cases (CYP1B1, MS4A12, CEACAM7)

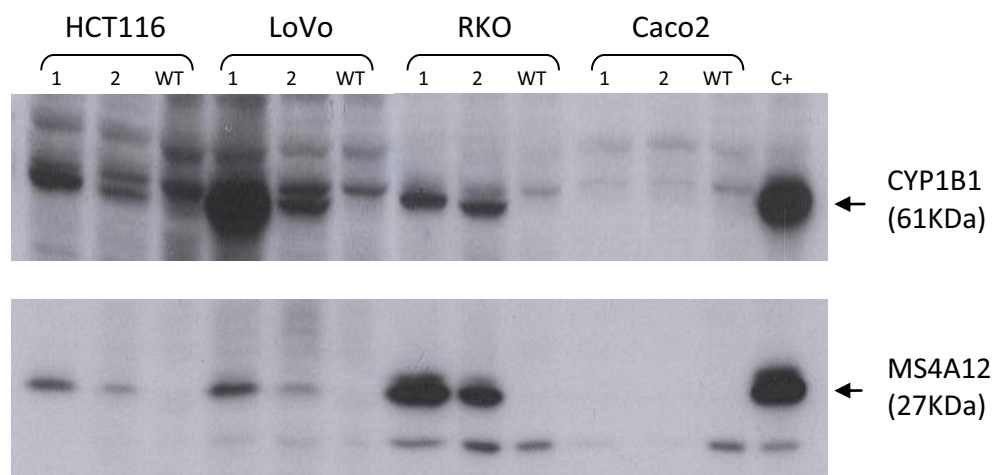
	NO LM	LM
NO LM	29	8
LM	7	50

Error: 0,16
Sensitivity: 0,88
Specificity: 0,78

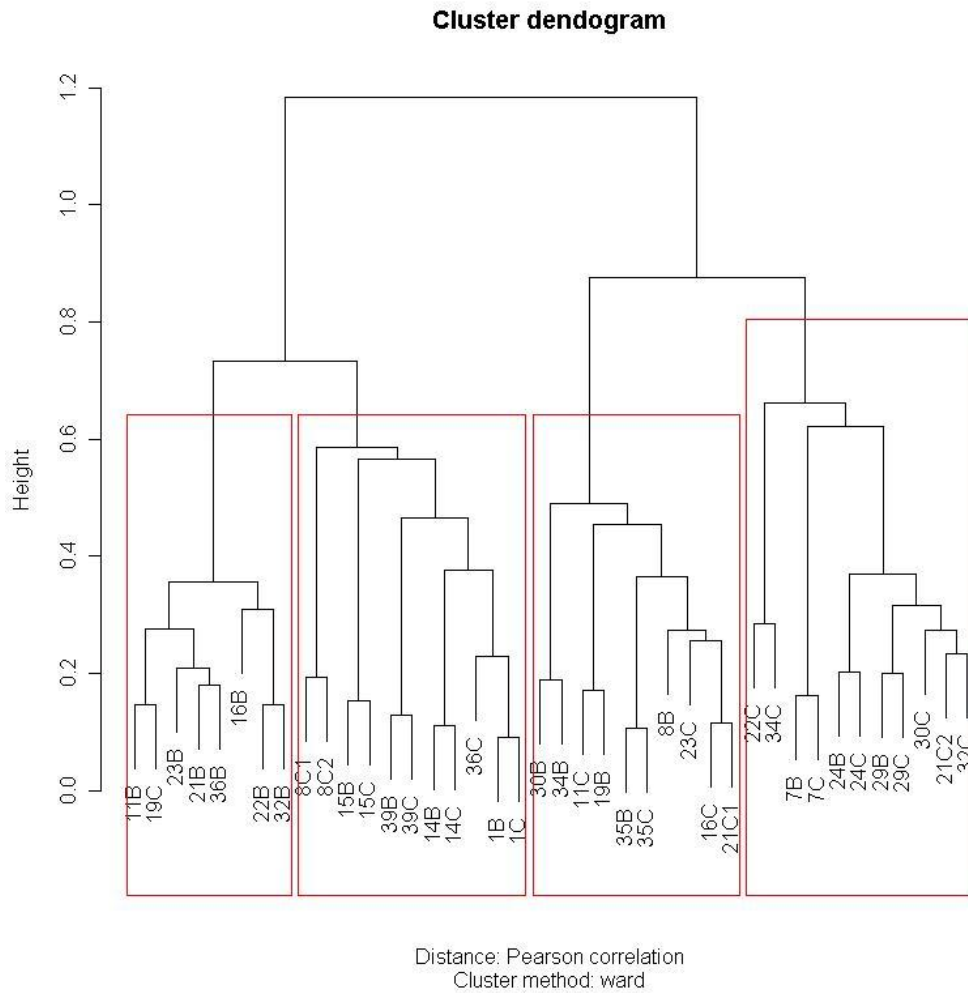
Synchronic cases (7 signature genes)

	NO LM	synchronic
NO LM	30	5
synchronic	9	9

Error: 0,26
Sensitivity: 0,5
Specificity: 0,86



Supplementary Figure 1: Western blot of transfected colon cancer cell lines. 1, 2: simple transfectant; WT: wild-type not transfected cell line; C+: positive control



Supplementary Figure 2: Unsupervised hierarchical clustering of microarray data

B and C represent colorectal tumours and liver metastases, respectively. There is not any apparent pattern that clearly differentiates primary tumour samples from metastases.

Supplementary Table 5: characteristics of samples (T and LM paired series)

Case	Age	Sex	OS	DFS from LM	T location	Dukes stage	TNM stage	Type of LM	Interval T-LM (months)	T content in LM (%)	Number of LM	T margins	Status	Affimetrix array	KRAS mutation
1	58	M	40	28	R	D	T3 N1	S	2	50-75	<3	-	D	Y	N
2	59	M	25	18	R	D	T3 N0	S	4	75-100	>3	-	D	N	Y
3	71	M	89	86	R	D	T3 N0	S	3	25-50	<3	-	A	N	N
4	66	M	2	2	LC	D	T3 N0	S	0	75-100	<3	-	D	N	N
5	44	M	76	76	LC	D	T3 N0	S	0	75-100	<3	-	A	N	N
6	49	M	85	80	R	D	T3 N0	S	5	75-100	>3	-	A	N	N
7	51	M	56	10	R	D	T3 N1	S	0	75-100	<3	-	D	Y	Y
8	64	M	33	19	RC	C	T3 N1	M	10	75-100	<3	-	D	Y	Y
9	58	F	25	10	LC	D	T3 N2	S	0	50-75	>3	-	D	N	Y
10	54	M	69	48	LC	D	T3 N1	S	1	50-75	<3	-	A	N	N
11	73	M	3	1	R	D	T3 N2	S	2	75-100	<3	-	D	Y	Y
12	66	M	66	66	RC	D	T3 N2	S	0	75-100	<3	-	A	N	N
13	54	F	47	26	LC	D	T2 N2	S	3	50-75	<3	-	D	N	N
14	56	F	73	72	LC	D	T3 N1	S	1	75-100	>3	-	A	Y	N
15	66	F	28	14	R	D	T4 N2	S	0	50-75	>3	-	D	Y	Y
16	60	M	40	22	RC	D	T1 N0	S	0	25-50	<3	-	D	Y	N
17	73	M	41	3	LC	B	T3 N0	M	24	25-50	<3	-	D	N	N
18	60	M	34	7	R	D	T3 N2	S	0	50-75	<3	-	D	N	N
19	74	M	29	10	LC	C	T3 N2	M	12	50-75	<3	-	D	Y	Y
20	49	F	36	5	RC	C	T3 N2	M	20	75-100	<3	-	D	N	N
21	60	M	58	21	R	D	T3 N1	S	0	50-75	>3	+	A	Y	N
22	71	F	12	3	RC	D	T3 N1	S	0	25-50	>3	-	D	Y	Y
23	65	F	54	54	R	D	T3 N0	S	0	25-50	>3	-	A	Y	N
24	60	F	66	36	LC	C	T3 N1	M	30	50-75	<3	+	A	Y	N
26	52	M	51	6	LC	D	T3 N1	S	6	50-75	>3	-	A	N	N
27	64	M	43	40	R	D	T3 N0	S	3	75-100	>3	-	A	N	N
28	58	M	67	22	LC	B	T3 N0	M	37	0-25	<3	-	A	N	N
29	59	M	24	9	RC	D	T3 N2	S	3	50-75	<3	-	D	Y	N
30	78	F	27	18	LC	B	T3 N0	M	8	50-75	<3	-	A	Y	Y
31	68	M	22	10	RC	D	T3 N2	S	4	50-75	<3	-	A	N	N
32	68	F	16	14	RC	D	T3 N2	S	2	50-75	>3	-	D	Y	N
33	58	M	36	3	LC	C	T3 N1	M	26	25-50	>3	+	D	N	Y
34	69	M	32	12	RC	D	T3 N0	S	0	25-50	<3	-	A	Y	N
35	54	M	32	32	LC	D	T3 N0	S	0	50-75	<3	-	A	Y	N
36	68	M	23	1	LC	C	T3 N1	M	22	75-100	<3	-	D	Y	N
37	72	M	33	21	LC	C	T4 N2	M	12	50-75	<3	-	A	N	N
38	67	F	45	24	R	C	T3 N1	M	10	75-100	<3	-	A	N	N
39	75	M	30	27	R	D	T4 N1	S	0	75-100	<3	-	A	Y	Y
40	52	F	31	29	R	D	T3 N1	S	0	50-75	<3	-	A	N	Y
41	59	F	25	6	R	C	T3 N1	M	10	75-100	>3	-	A	N	N

M: male, F: female, OS: Overall Survival, DFS: Disease Free Survival, R: rectum, LC: left colon, RC: right colon T: tumour, LM: liver metastasis,
S: synchronous metastasis, M: metachronous metastasis, A: alive, D: dead, N: no, Y: yes.

Supplementary Table 6: Differentially expressed probes between colorectal tumours and paired LM (FDR 1%; $-0,5 > \log\text{-ratio} > +0,5$)

Probe set	Gene symbol	Chromosomal location	meanlog2rat
204475_at	MMP1 *	Chr 11[-] 102165861-102174104 bp	-3,77910059
205828_at	MMP3 *	Chr 11[-] 102211738-102219552 bp	-3,3972955
222484_s_at	CXCL14	Chr 5[-] 134934274-134942868 bp	-3,33500984
212592_at	IGJ	Chr 4[-] 71740548-71751128 bp	-3,07024428
218002_s_at	CXCL14	Chr 5[-] 134934274-134942868 bp	-2,88032755
206198_s_at	CEACAM7 *	Chr 19[-] 46869073-46883936 bp	-2,86804459
217022_s_at	IGHA2	Chr 14[-] 105121536-105125776 bp	-2,84075367
217022_s_at	IGHA1	Chr 14[-] 105244520-105246046 bp	-2,84075367
206143_at	SLC26A3	Chr 7[-] 107193153-107230906 bp	-2,74737969
202274_at	ACTG2	Chr 2[+] 73973601-74000288 bp	-2,74702967
213425_at	WNT5A	Chr 3[-] 55474783-55496371 bp	-2,58373455
220026_at	CLCA4 *	Chr 1[+] 86785349-86819025 bp	-2,55583279
231766_s_at	COL12A1	Chr 6[-] 75850762-75972343 bp	-2,50398957
225664_at	COL12A1	Chr 6[-] 75850762-75972343 bp	-2,50253797
225975_at	PCDH18	Chr 4[-] 138660285-138673079 bp	-2,38614751
206199_at	CEACAM7	Chr 19[-] 46869073-46883936 bp	-2,35560777
205990_s_at	WNT5A	Chr 3[-] 55474783-55496371 bp	-2,32149661
215176_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-2,25315985
200795_at	SPARCL1	Chr 4[-] 88613511-88669530 bp	-2,24569987
207245_at	UGT2B17	Chr 4[-] 69085497-69116840 bp	-2,23183892
1554436_a_at	REG4	Chr 1[-] 120138164-120155806 bp	-2,189247
211848_s_at	CEACAM7	Chr 19[-] 46869073-46883936 bp	-2,17965344
223447_at	REG4	Chr 1[-] 120138164-120155806 bp	-2,13781593
220834_at	MS4A12 *	Chr 11[+] 60016827-60031479 bp	-2,12255327
212768_s_at	OLFM4	Chr 13[+] 52500831-52524197 bp	-2,07898446
201069_at	MMP2	Chr 16[+] 54070589-54098104 bp	-2,0671399
205935_at	FOXF1	Chr 16[+] 85101659-85105548 bp	-2,05477521
231879_at	COL12A1	Chr 6[-] 75850762-75972343 bp	-2,04961599
223597_at	ITLN1	Chr 1[-] 159112954-159121673 bp	-2,03855464
209301_at	CA2	Chr 8[+] 86563433-86580973 bp	-2,03351211
202450_s_at	CTSK	Chr 1[-] 149035311-149047436 bp	-2,01661997
210302_s_at	MAB21L2	Chr 4[+] 151722699-151725295 bp	-1,99630844
223122_s_at	SFRP2	Chr 4[-] 154921192-154929678 bp	-1,96489221
228640_at	PCDH7	Chr 4[+] 30331135-30753851 bp	-1,92429515
226147_s_at	PIGR	Chr 1[-] 205168486-205186434 bp	-1,92417207
202995_s_at	FBLN1	Chr 22[+] 44277383-44375678 bp	-1,88906289
225767_at	LOC554226	Chr 2[-] 132606863-132732012 bp	-1,88453049
229070_at	C6orf105	Chr 6[-] 11821895-11915239 bp	-1,86175231
214677_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-1,85144033
214677_x_at	IGLJ3	Chr 22[+] 21577168-21577209 bp	-1,85144033
214677_x_at	IGLV4-3	Chr 22[+] 21543718-21544214 bp	-1,85144033
214677_x_at	IGLV2-14	Chr 22[+] 21431404-21431700 bp	-1,85144033
214677_x_at	IGLV3-25	Chr 22[+] 21359233-21359745 bp	-1,85144033
214677_x_at		Chr 22[+] 21573156-21573475 bp	-1,85144033
226834_at	Hs.504187		-1,82752365
206932_at	CH25H	Chr 10[-] 90955366-90957051 bp	-1,8251204
229659_s_at	Hs.497589		-1,82419405
209138_x_at	IGLV2-14	Chr 22[+] 21431404-21431700 bp	-1,80493245
209138_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-1,80493245
209138_x_at	IGLJ3	Chr 22[+] 21577168-21577209 bp	-1,80493245
203240_at	FCGBP	Chr 19[-] 45045811-45132373 bp	-1,80090784
211645_x_at	IGKV1-9	Chr 2[-] 89090592-89091069 bp	-1,79302561
211645_x_at	IGKV1-17	Chr 2[-] 89197946-89198423 bp	-1,79302561
211645_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,79302561
202112_at	VWF	Chr 12[-] 5928301-6104097 bp	-1,79118604
206134_at	ADAMDEC1	Chr 8[+] 24297817-24319471 bp	-1,78897369
202994_s_at	FBLN1	Chr 22[+] 44277383-44375678 bp	-1,7814111
223952_x_at	DHRS9	Chr 2[+] 169629545-169660923 bp	-1,77592878
207214_at	SPINK4	Chr 9[+] 33208363-33238565 bp	-1,76526195
214669_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,75195403
224009_x_at	DHRS9	Chr 2[+] 169629545-169660923 bp	-1,74098908
204748_at	PTGS2	Chr 1[-] 184907546-184916179 bp	-1,73345146
206209_s_at	CA4	Chr 17[+] 55582079-55591686 bp	-1,72723075
221651_x_at	IGKV2-24	Chr 2[-] 89256925-89257729 bp	-1,71116673
221651_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,71116673
221651_x_at	IGKV1-5	Chr 2[-] 89027932-89028409 bp	-1,71116673

Resultats

218468_s_at	GREM1	Chr 15[+] 30797497-30814158 bp	-1,70407221
217378_x_at		Chr 2[+] 113880633-113880923 bp	-1,69222967
224795_x_at	IGKV2-24	Chr 2[-] 89256925-89257729 bp	-1,68464011
224795_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,68464011
224795_x_at	IGKV1-5	Chr 2[-] 89027932-89028409 bp	-1,68464011
206664_at	SI	Chr 3[-] 166179380-166278976 bp	-1,67610423
221671_x_at	IGKV2-24	Chr 2[-] 89256925-89257729 bp	-1,66962722
221671_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,66962722
221671_x_at	IGKV1-5	Chr 2[-] 89027932-89028409 bp	-1,66962722
219727_at	DUOX2	Chr 15[+] 43172144-43193651 bp	-1,66159146
215379_x_at	IGLV2-14	Chr 22[+] 21431404-21431700 bp	-1,66158902
215379_x_at	IGLV3-25	Chr 22[+] 21359233-21359745 bp	-1,66158902
215379_x_at	IGLJ3	Chr 22[+] 21577168-21577209 bp	-1,66158902
215379_x_at	IGLV4-3	Chr 22[+] 21543718-21544214 bp	-1,66158902
215379_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-1,66158902
227404_s_at	Hs.326035		-1,6380833
215121_x_at	IGLC1	Chr 22[+] 21567555-21567874 bp	-1,63481461
214974_x_at	CXCL5	Chr 4[-] 75080223-75083280 bp	-1,62900794
203649_s_at	PLA2G2A	Chr 1[-] 20174518-20179496 bp	-1,62834822
211644_x_at	IGKV3-20	Chr 2[-] 89223170-89223706 bp	-1,62073549
232504_at	DQ658414		-1,61398555
212097_at	CAV1	Chr 7[+] 115952075-115988466 bp	-1,61276758
214142_at	ZG16	Chr 16[+] 29697112-29700597 bp	-1,61040289
214142_at	LOC653808	Chr 16[+] 29697062-29700597 bp	-1,61040289
209493_at	PDZD2	Chr 5[+] 31675274-32146795 bp	-1,58117292
206561_s_at	AKR1B10	Chr 7[+] 133862884-133876700 bp	-1,57715392
234764_x_at	IGLV1-44	Chr 22[+] 21065249-21065716 bp	-1,57654395
234764_x_at	IGLV1-47	Chr 22[+] 21042143-21042610 bp	-1,57654395
238143_at	LOC646627	Chr 1	-1,56929168
205267_at	POU2AF1	Chr 11[-] 110728190-110755627 bp	-1,56896559
203065_s_at	CAV1	Chr 7[+] 115952075-115988466 bp	-1,56739071
227719_at	Hs.595130		-1,56734637
237206_at	MYOCD	Chr 17[+] 12509939-12607724 bp	-1,56205887
216576_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,55973854
209189_at	FOS	Chr 14[+] 74815284-74818685 bp	-1,55876302
1553808_a_at	NKX2-3	Chr 10[+] 101282700-101286271 bp	-1,54001943
203691_at	PI3	Chr 20[+] 43236912-43238599 bp	-1,53680896
217590_s_at	TRPA1	Chr 8[-] 73096040-73150373 bp	-1,52125302
41469_at	PI3	Chr 20[+] 43236912-43238599 bp	-1,52044638
203131_at	PDGFRA	Chr 4[+] 54790204-54859171 bp	-1,51112746
211430_s_at	IGHG2	Chr 14[-] 105178347-105182171 bp	-1,50435197
211430_s_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-1,50435197
211430_s_at	IFI6	Chr 1[-] 27865159-27871316 bp	-1,50435197
211430_s_at	IGH@	Chr 14	-1,50435197
211430_s_at	IGHV4-31	Chr 14[-] 105876252-105876689 bp	-1,50435197
211430_s_at	IGHG3	Chr 14[-] 105303296-105308787 bp	-1,50435197
211430_s_at	IGHG1	Chr 14[-] 105275144-105280452 bp	-1,50435197
211430_s_at	IGHG4	Chr 14[-] 105159294-105163447 bp	-1,50435197
204673_at	MUC2	Chr 11[+] 1064875-1094416 bp	-1,50341884
208937_s_at	ID1	Chr 20[+] 29656747-29657979 bp	-1,50324981
206268_at	LEFTY1	Chr 1[-] 224140605-224143469 bp	-1,49743107
216207_x_at	IGKV1D-13	Chr 2[+] 89830253-89830729 bp	-1,49650956
216207_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,49650956
212730_at	DMN	Chr 15[+] 97462771-97493311 bp	-1,45505585
1555203_s_at	SLC44A4	Chr 6[-] 31938946-31954753 bp	-1,44919053
205624_at	CPA3	Chr 3[+] 150065771-150097558 bp	-1,4476851
203680_at	PRKAR2B	Chr 7[+] 106472375-106589492 bp	-1,43680072
204213_at	PIGR	Chr 1[-] 205168486-205186434 bp	-1,4297879
209392_at	ENPP2	Chr 8[-] 120638500-120720287 bp	-1,41613725
202196_s_at	DKK3	Chr 11[-] 11941119-11987493 bp	-1,41474888
227070_at	GLT8D2	Chr 12[-] 102906895-102982091 bp	-1,40701005
206577_at	VIP	Chr 6[+] 153113626-153122593 bp	-1,40249728
218162_at	OLFML3	Chr 1[+] 114323553-114326399 bp	-1,39415527
219014_at	PLAC8	Chr 4[-] 84230239-84254935 bp	-1,38934568
231227_at	Hs.643085		-1,37410283
237215_s_at	TFRC	Chr 3[-] 197260553-197293343 bp	-1,36656751
214247_s_at	DKK3	Chr 11[-] 11941119-11987493 bp	-1,35959782
230147_at	F2RL2	Chr 5[-] 75947063-75954996 bp	-1,35849373
209070_s_at	RG55	Chr 1[-] 161378716-161454050 bp	-1,35119633
203184_at	FBN2	Chr 5[-] 127621500-127901634 bp	-1,34532211
210133_at	CCL11	Chr 17[+] 29636800-29639312 bp	-1,34105695
209114_at	TSPAN1	Chr 1[+] 46413346-46424217 bp	-1,33463673
201860_s_at	PLAT	Chr 8[-] 42151908-42184351 bp	-1,33202571
206115_at	EGR3	Chr 8[-] 22601117-22606760 bp	-1,33062531

204470_at	CXCL1	Chr 4[+] 74953973-74968249 bp	-1,32005907
214777_at	IGKV4-1	Chr 2[+] 88966203-88966786 bp	-1,31956256
212531_at	LCN2	Chr 9[+] 129951171-129956333 bp	-1,30440188
211367_s_at	CASP1	Chr 11[-] 104401445-104477368 bp	-1,29191629
200796_s_at	MCL1	Chr 1[-] 148813658-148818760 bp	-1,28948008
225762_x_at	LOC284801	Chr 20[-] 26115659-26137445 bp	-1,28776467
238750_at	CCL28	Chr 5[-] 43229915-43448250 bp	-1,28685286
229461_x_at	NEGR1	Chr 1[-] 71641213-72521005 bp	-1,2854424
204364_s_at	REEP1	Chr 2[-] 86294633-86418288 bp	-1,28398068
205950_s_at	CA1	Chr 8[-] 86427089-86478495 bp	-1,27429553
217148_x_at		Chr 22[+] 21431230-21431700 bp	-1,27183117
217148_x_at	IGLV2-14	Chr 22[+] 21431404-21431700 bp	-1,27183117
217148_x_at	IGLJ3	Chr 22[+] 21577168-21577209 bp	-1,27183117
217148_x_at	IGLV2-23	Chr 22[+] 21370436-21370906 bp	-1,27183117
213338_at	TMEM158	Chr 3[-] 45240962-45242758 bp	-1,27162135
228964_at	PRDM1	Chr 6[+] 106640888-106664507 bp	-1,26944015
226303_at	PGM5	Chr 9[+] 70161635-70335797 bp	-1,26912466
205476_at	CCL20	Chr 2[+] 228386814-228390494 bp	-1,26124105
212624_s_at	CHN1	Chr 2[-] 175372338-175578361 bp	-1,25912515
1558214_s_at	CTNNA1	Chr 5[+] 138117006-138298622 bp	-1,2553855
235201_at	Hs.282787		-1,24862337
205680_at	MMP10	Chr 11[-] 102146444-102156569 bp	-1,23360288
205259_at	NR3C2	Chr 4[-] 149219370-149582973 bp	-1,22666895
225442_at	DDR2	Chr 1[+] 160868852-161016879 bp	-1,22356976
225442_at		Chr 1[+] 161018525-161022986 bp	-1,22356976
223121_s_at	SFRP2	Chr 4[-] 154921192-154929678 bp	-1,22050785
219795_at	SLC6A14	Chr X[+] 115481818-115506653 bp	-1,21757328
1555326_a_at	ADAM9	Chr 8[+] 38973662-39081937 bp	-1,21209203
205009_at	TFF1	Chr 21[-] 42655460-42659713 bp	-1,20813901
219869_s_at	SLC39A8	Chr 4[-] 103401844-103485654 bp	-1,20772807
219064_at	ITIH5	Chr 10[-] 7641238-7748940 bp	-1,2045873
213994_s_at	SPON1	Chr 11[+] 13940814-14245926 bp	-1,19633718
226492_at	SEMA6D	Chr 15[+] 45797978-45853712 bp	-1,19310807
202780_at	OXCT1	Chr 5[-] 41765924-41906360 bp	-1,18912929
210935_s_at	WDR1	Chr 4[-] 9685061-9727671 bp	-1,18706633
202444_s_at	ERLIN1	Chr 10[-] 101899841-101979366 bp	-1,18651402
1555814_a_at	RHOA	Chr 3[-] 49371582-49424530 bp	-1,17396461
1554966_a_at	FILIP1L	Chr 3[-] 101034678-101316047 bp	-1,16867054
209596_at	MXRA5	Chr X[-] 3236606-3274682 bp	-1,16614943
1554768_a_at	MAD2L1	Chr 4[-] 121200029-121207411 bp	-1,15383981
219427_at	FAT4	Chr 4[+] 126534541-126632373 bp	-1,15341662
214836_x_at	IGKV1-5	Chr 2[-] 89027932-89028409 bp	-1,15195726
217110_s_at	MUC4	Chr 3[-] 196959307-197023545 bp	-1,14964841
226676_at	ZNF521	Chr 18[-] 20895889-21186114 bp	-1,14958602
203032_s_at	FH	Chr 1[-] 239727526-239749684 bp	-1,14679262
216491_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-1,14431409
216491_x_at	IGHV4-4	Chr 14[-] 105549153-105549584 bp	-1,14431409
221898_at	PDPN	Chr 1[+] 13782814-13817039 bp	-1,14004255
206641_at	TNFRSF17	Chr 16[+] 11966465-11969426 bp	-1,13758797
203708_at	PDE4B	Chr 1[+] 66030781-66612850 bp	-1,13665875
207850_at	CXCL3	Chr 4[-] 75121170-75123354 bp	-1,13335294
206637_at	P2RY14	Chr 3[-] 152412595-152478847 bp	-1,13297344
228592_at	MS4A1	Chr 11[+] 59979858-59994801 bp	-1,13280961
210643_at	TNFSF11	Chr 13[+] 42034872-42080148 bp	-1,13244408
209763_at	CHRD1L	Chr X[-] 109803740-109925695 bp	-1,13128252
201971_s_at	ATP6V1A	Chr 3[+] 114948598-115013593 bp	-1,13090049
201130_s_at	CDH1	Chr 16[+] 67328696-67426945 bp	-1,12943902
211368_s_at	CASP1	Chr 11[-] 104401445-104477368 bp	-1,12859263
219478_at	WFDC1	Chr 16[+] 82885822-82920951 bp	-1,12647354
227727_at	MRGPRF	Chr 11[-] 68528443-68537387 bp	-1,12587391
201667_at	GJA1	Chr 6[+] 121798487-121812571 bp	-1,12514882
201325_s_at	EMP1	Chr 12[+] 13240900-13260975 bp	-1,12505412
214768_x_at	IGKV1-5	Chr 2[-] 89027932-89028409 bp	-1,12403579
214768_x_at	IGKV2D-28	Chr 2[+] 89636130-89636863 bp	-1,12403579
214768_x_at	IGKV2-28	Chr 2[-] 89302292-89303027 bp	-1,12403579
214768_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,12403579
230214_at	MRV11	Chr 11[-] 10553869-10672111 bp	-1,12022198
211668_s_at	PLAU	Chr 10[+] 75340896-75347261 bp	-1,11341887
227230_s_at	KIAA1211	Chr 4	-1,111183
206377_at	FOXF2	Chr 6[+] 1335068-1340831 bp	-1,10874972
221276_s_at	SYNC1	Chr 1[-] 32918548-32933460 bp	-1,104785
204135_at	FILIP1L	Chr 3[-] 101034678-101316047 bp	-1,10453999
224215_s_at	DLL1	Chr 6[-] 170433219-170441486 bp	-1,10050124
217157_x_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,09937679

Resultats

214349_at	AV764378		-1,09726591
215813_s_at	PTGS1	Chr 9[+] 124173050-124197802 bp	-1,09557132
209436_at	SPON1	Chr 11[+] 13940814-14245926 bp	-1,09498509
215946_x_at		Chr 22[+] 24043888-24046192 bp	-1,08950377
227692_at	GNAI1	Chr 7[+] 79602076-79686661 bp	-1,08414488
213001_at	ANGPTL2	Chr 9[-] 128889432-128924983 bp	-1,0776472
202672_s_at	ATF3	Chr 1[+] 210805374-210860742 bp	-1,07755508
1555725_a_at	RG55	Chr 1[-] 161378716-161454050 bp	-1,07682506
210338_s_at	HSPA8	Chr 11[-] 122433410-122438054 bp	-1,07581318
204529_s_at	TOX	Chr 8[-] 59880531-60194321 bp	-1,07281971
216984_x_at	IGLV2-14	Chr 22[+] 21431404-21431700 bp	-1,07169983
216984_x_at	IGLJ3	Chr 22[+] 21577168-21577209 bp	-1,07169983
216984_x_at		Chr 22[+] 21431230-21431700 bp	-1,07169983
206224_at	CST1	Chr 20[-] 23676190-23679574 bp	-1,07156049
219148_at	PBK	Chr 8[-] 27723056-27751435 bp	-1,06922409
221577_x_at	GDF15	Chr 19[+] 18357968-18360987 bp	-1,06917231
223551_at	PKIB	Chr 6[+] 122834761-123089217 bp	-1,0689475
214433_s_at	SELENBP1	Chr 1[-] 149603402-149611833 bp	-1,06621862
227870_at	NOPE	Chr 15[-] 63460878-63502463 bp	-1,06511078
219799_s_at	DHRS9	Chr 2[+] 169629545-169660923 bp	-1,06511038
204069_at	MEIS1	Chr 2[+] 66516036-66653395 bp	-1,06498958
211643_x_at	IGKV3D-15	Chr 2[+] 89791050-89791565 bp	-1,0604836
207826_s_at	ID3	Chr 1[-] 23756996-23758872 bp	-1,05869425
211366_x_at	CASP1	Chr 11[-] 104401445-104477368 bp	-1,05777466
231240_at	Hs.202354		-1,05642249
218638_s_at	SPON2	Chr 4[-] 1150720-1156617 bp	-1,05589639
242277_at	Hs.659359		-1,05504253
216248_s_at	NR4A2	Chr 2[-] 156889194-156897474 bp	-1,05477131
201693_s_at	EGR1	Chr 5[+] 137829080-137832903 bp	-1,05471603
209576_at	GNAI1	Chr 7[+] 79602076-79686661 bp	-1,05431879
1554464_a_at	CRTPA	Chr 3[+] 33130483-33164269 bp	-1,05291494
224221_s_at	VAV3	Chr 1[-] 107915305-108309108 bp	-1,05245653
220342_x_at	EDEM3	Chr 1[-] 182925988-182990670 bp	-1,04800264
238017_at	RDHE2	Chr 8[-] 57375122-57395795 bp	-1,04093679
230493_at	TMEM46	Chr 13[-] 25516735-25523198 bp	-1,039349
217179_x_at	IGLV1-51	Chr 22[+] 21006864-21007325 bp	-1,03815195
229128_s_at	Hs.656466		-1,03649132
243278_at	Hs.282787		-1,03603211
213909_at	LRRC15	Chr 3[-] 195557273-195571761 bp	-1,03521192
238623_at		Chr 6[-] 161332500-161333018 bp	-1,03510833
216510_x_at	EXOC7	Chr 17[-] 71588682-71611451 bp	-1,03359742
216510_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-1,03359742
216510_x_at	SIX6	Chr 14[+] 60045622-60048282 bp	-1,03359742
216510_x_at	ZCWPW2	Chr 3[+] 28365664-28541637 bp	-1,03359742
216510_x_at	IL8	Chr 4[+] 74825139-74828297 bp	-1,03359742
204363_at	F3	Chr 1[-] 94767369-94779944 bp	-1,03226451
211637_x_at	IGHV4-59	Chr 14[-] 106154299-106154730 bp	-1,02955628
202202_s_at	LAMA4	Chr 6[-] 112536654-112682605 bp	-1,02617684
208983_s_at	PECAM1	Chr 17[-] 59754142-59817723 bp	-1,02509977
237625_s_at	IGKJ5	Chr 2[-] 88941191-88941232 bp	-1,02375168
237625_s_at	IGKC	Chr 2[-] 88937989-88938311 bp	-1,02375168
204622_x_at	NR4A2	Chr 2[-] 156889194-156897474 bp	-1,02344012
232591_s_at	TMEM30A	Chr 6[-] 76019360-76051221 bp	-1,02309265
223565_at	MGC29506	Chr 5[-] 138751074-138753669 bp	-1,02279815
226322_at	TMTC1	Chr 12[-] 29545024-29828959 bp	-1,0195736
210950_s_at	FDFT1	Chr 8[+] 11697573-11734227 bp	-1,01889858
221447_s_at	GLT8D2	Chr 12[-] 102906895-102982091 bp	-1,01814856
235102_x_at	AI684439		-1,01641944
201308_s_at	sep-11	Chr 4[+] 78089919-78178792 bp	-1,01611304
204368_at	SLCO2A1	Chr 3[-] 135134230-135231439 bp	-1,01083625
202768_at	FOSB	Chr 19[+] 50663093-50670276 bp	-1,01076022
209970_x_at	CASP1	Chr 11[-] 104401445-104477368 bp	-1,00890475
226677_at	ZNF521	Chr 18[-] 20895889-21186114 bp	-1,00730334
228186_s_at	RSP03	Chr 6[+] 127481442-127560603 bp	-1,00478441
211634_x_at	IGHV1-69	Chr 14[-] 106240967-106241412 bp	-1,00327378
211634_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-1,00327378
211634_x_at	IGHG1	Chr 14[-] 105275144-105280452 bp	-1,00327378
224410_s_at	LMBR1	Chr 7[-] 156166332-156378622 bp	-1,00321778
205927_s_at	CTSE	Chr 1[+] 204484082-204498727 bp	-1,00201719
201337_s_at	VAMP3	Chr 1[+] 7753916-7764079 bp	-1,00033155
227742_at	CLIC6	Chr 21[+] 34963558-35012389 bp	-0,99911446
204237_at	GULP1	Chr 2[+] 188864641-189168898 bp	-0,99712718
209209_s_at	PLEKHC1	Chr 14[-] 52393743-52487486 bp	-0,99602823
216401_x_at	IGKV1-37	Chr 2[-] 89378134-89378610 bp	-0,9946963

220955_x_at	RAB23	Chr 6 [-] 57161540-57195039 bp	-0,99376613
231822_at	CTTNBP2NL	Chr 1 [+] 112740326-112805309 bp	-0,99326425
228584_at	SGCB	Chr 4 [-] 52581629-52599222 bp	-0,9915706
223341_s_at	SCOC	Chr 4 [+] 141397890-141523154 bp	-0,99136986
210299_s_at	FHL1	Chr X [+] 135057290-135121184 bp	-0,9891165
218748_s_at	LOC644556	Chr 4 [+] 63365971-63367107 bp	-0,98847224
218748_s_at	EXOC5	Chr 14 [-] 56738947-56805370 bp	-0,98847224
1564053_a_at	YTHDF3	Chr 8 [+] 64243734-64287897 bp	-0,98636905
211881_x_at	IGU3	Chr 22 [+] 21577168-21577209 bp	-0,97229225
226932_at	Hs.657697		-0,97119886
216591_s_at		Chr 17 [-] 1707294-1708505 bp	-0,96969186
216591_s_at	SDHC	Chr 1 [+] 159550790-159601165 bp	-0,96969186
201647_s_at	SCARB2	Chr 4 [-] 77298918-77354059 bp	-0,96652541
211798_x_at	IGU3	Chr 22 [+] 21577168-21577209 bp	-0,96505338
223475_at	CRISPLD1	Chr 8 [+] 76059531-76109348 bp	-0,95844347
221268_s_at	SGPP1	Chr 14 [-] 63220687-63264526 bp	-0,95730393
211450_s_at	MSH6	Chr 2 [+] 47863725-47887596 bp	-0,95378629
217294_s_at	ENO1	Chr 1 [-] 8843648-8978713 bp	-0,95055507
206429_at	F2RL1	Chr 5 [+] 76150610-76166896 bp	-0,94952852
224342_x_at	IGLV1-51	Chr 22 [+] 21006864-21007325 bp	-0,94939033
204114_at	NID2	Chr 14 [-] 51541270-51605696 bp	-0,94837001
228707_at	CLDN23	Chr 8 [+] 8597076-8599026 bp	-0,94529522
216474_x_at	TPSB2	Chr 16 [-] 1218337-1220215 bp	-0,94412474
216474_x_at	TPSAB1	Chr 16 [+] 1230679-1232556 bp	-0,94412474
229554_at	Hs.597993		-0,94360218
1554997_a_at	PTGS2	Chr 1 [-] 184907546-184916179 bp	-0,94343551
217480_x_at		Chr 2 [+] 91369525-91370362 bp	-0,94340455
217480_x_at	LOC442423	Chr 9 [-] 69066931-69069133 bp	-0,94340455
217480_x_at		Chr 9 [-] 69634070-69634916 bp	-0,94340455
217480_x_at	LOC391405	Chr 2 [-] 91585906-91624511 bp	-0,94340455
217480_x_at		Chr 2 [+] 91042814-91043104 bp	-0,94340455
217480_x_at	LOC644704	Chr 9 [-] 69433592-69442677 bp	-0,94340455
203196_at	ABCC4	Chr 13 [-] 94470090-94751684 bp	-0,94311016
201259_s_at	SYPL1	Chr 7 [-] 105518187-105540293 bp	-0,94296681
219747_at	C4orf31	Chr 4 [-] 122176232-122213019 bp	-0,94150684
204427_s_at	TMED2	Chr 12 [+] 122635114-122648639 bp	-0,93812815
206667_s_at	SCAMP1	Chr 5 [+] 77692110-77810636 bp	-0,93769153
242447_at	LOC285382	Chr 3 [-] 186278532-186353496 bp	-0,93759423
202242_at	TSPAN7	Chr X [+] 38305553-38433118 bp	-0,9345802
203699_s_at	DIO2	Chr 14 [-] 79733622-79748278 bp	-0,92949345
213131_at	OLFM1	Chr 9 [+] 137106992-137152846 bp	-0,92702888
213428_s_at	COL6A1	Chr 21 [+] 46226091-46249391 bp	-0,9267919
233109_at	COL12A1	Chr 6 [-] 75850762-75972343 bp	-0,9259812
205529_s_at	RUNX1T1	Chr 8 [-] 93040328-93176619 bp	-0,9251628
205683_x_at	TPSAB1	Chr 16 [+] 1230679-1232556 bp	-0,92392883
205683_x_at	TPSB2	Chr 16 [-] 1218337-1220215 bp	-0,92392883
1555419_a_at	ASAH1	Chr 8 [-] 17958214-17986757 bp	-0,92267193
219572_at	CADPS2	Chr 7 [-] 121746687-122313750 bp	-0,92110636
1555465_at	MCOLN2	Chr 1 [-] 85163854-85235384 bp	-0,91941712
209758_s_at	MFAP5	Chr 12 [-] 8689807-8706700 bp	-0,91928062
227038_at	SGMS2	Chr 4 [+] 108965267-109051558 bp	-0,91750025
208116_s_at	MAN1A1	Chr 6 [-] 119540073-119712625 bp	-0,91679972
206208_at	CA4	Chr 17 [+] 55582079-55591686 bp	-0,9159328
203700_s_at	DIO2	Chr 14 [-] 79733622-79748278 bp	-0,91550377
205347_s_at	TMSL8	Chr X [-] 101655260-101658368 bp	-0,91237609
222932_at	EHF	Chr 11 [+] 34599244-34639657 bp	-0,91230989
212385_at	TCF4	Chr 18 [-] 51045967-51406858 bp	-0,91066861
1558015_s_at	ACTR2	Chr 2 [+] 65308406-65351891 bp	-0,90950404
1552610_a_at	JAK1	Chr 1 [-] 65071500-65204775 bp	-0,90856914
214279_s_at	NDRG2	Chr 14 [-] 20554762-20563775 bp	-0,90840786
204780_s_at	FAS	Chr 10 [+] 90739206-90765522 bp	-0,90677113
219326_s_at	B3GNT2	Chr 2 [+] 62276766-62305370 bp	-0,90652334
218974_at	SOBP	Chr 6 [+] 107918261-108088067 bp	-0,9057871
224311_s_at	CAB39	Chr 2 [+] 231285909-231394031 bp	-0,90492207
226534_at	KITLG	Chr 12 [-] 87410697-87498369 bp	-0,90475116
201435_s_at	EIF4E	Chr 4 [-] 100020235-100070139 bp	-0,90383413
201551_s_at	LAMP1	Chr 13 [+] 112999557-113025746 bp	-0,90119723
217235_x_at	IGL@	Chr 22 [+] 20710659-21595085 bp	-0,90041636
215719_x_at	FAS	Chr 10 [+] 90739206-90765522 bp	-0,89978426
207134_x_at	TPSB2	Chr 16 [-] 1218337-1220215 bp	-0,89441381
207134_x_at	TPSAB1	Chr 16 [+] 1230679-1232556 bp	-0,89441381
210298_x_at	FHL1	Chr X [+] 135057290-135121184 bp	-0,89422755
1555383_a_at	POF1B	Chr X [-] 84419058-84521404 bp	-0,8935159
211672_s_at	ARPC4	Chr 3 [+] 9748429-9852999 bp	-0,89333358

Resultats

207172_s_at	CDH11	Chr 16[-] 63538184-63713431 bp	-0,89280761
210084_x_at	TPSAB1	Chr 16[+] 1230679-1232556 bp	-0,89254806
210084_x_at	TPSB2	Chr 16[-] 1218337-1220215 bp	-0,89254806
210839_s_at	ENPP2	Chr 8[-] 120638500-120720287 bp	-0,89205545
201694_s_at	EGR1	Chr 5[+] 137829080-137832903 bp	-0,8910165
202746_at	ITM2A	Chr X[-] 78502537-78509703 bp	-0,89029211
214895_s_at	ADAM10	Chr 15[-] 56675802-56829469 bp	-0,88865425
225647_s_at	CTSC	Chr 11[-] 87666408-87710586 bp	-0,88644515
212977_at	CXCR7	Chr 2[+] 237143182-237155730 bp	-0,88427967
207003_at	GUCA2A	Chr 1[-] 42400949-42402982 bp	-0,88405951
216044_x_at	FAM69A	Chr 1[-] 93071041-93199645 bp	-0,88390931
1555334_s_at	SLC30A5	Chr 5[+] 68425574-68462648 bp	-0,88343398
228232_s_at	VSIG2	Chr 11[-] 124122580-124127378 bp	-0,88333489
204149_s_at	GSTM4	Chr 1[+] 110000226-110054413 bp	-0,88234955
1556427_s_at	LOC221091	Chr 11[-] 62210450-62213776 bp	-0,88195542
1564494_s_at	P4HB	Chr 17[-] 77394326-77411680 bp	-0,88003023
1564494_s_at	LOC728900		-0,88003023
201787_at	FBLN1	Chr 22[+] 44277383-44375678 bp	-0,87919965
222385_x_at	SEC61A1	Chr 3[+] 129253902-129273216 bp	-0,87809358
211814_s_at	CCNE2	Chr 8[-] 95961628-95976660 bp	-0,87704042
235341_at	DNAJC3	Chr 13[+] 95125276-95245243 bp	-0,87441924
211559_s_at	CCNG2	Chr 4[+] 78297551-78319319 bp	-0,87435667
213924_at	Hs.654995		-0,87157562
1554980_a_at	ATF3	Chr 1[+] 210805374-210860742 bp	-0,87075103
226066_at	MITF	Chr 3[+] 69871323-70100177 bp	-0,86812737
213993_at	SPON1	Chr 11[+] 13940814-14245926 bp	-0,86698649
214007_s_at	PTK9P	Chr 17[-] 24552736-24555689 bp	-0,86682887
214007_s_at	TWF1	Chr 12[-] 42473793-42486445 bp	-0,86682887
1556285_s_at	PPA2	Chr 4[-] 106509683-106614676 bp	-0,86470821
238478_at	BNC2	Chr 9[-] 16399501-16860786 bp	-0,86425902
201151_s_at	MBNL1	Chr 3[+] 153468519-153666259 bp	-0,86044903
1555167_s_at	PBEF2	Chr 10[-] 36851750-36853168 bp	-0,86026606
1555167_s_at	PBEF1	Chr 7[-] 105677892-105712603 bp	-0,86026606
204491_at	PDE4D	Chr 5[-] 58302468-59320301 bp	-0,85994461
228010_at	PPP2R2C	Chr 4[-] 6373206-6525074 bp	-0,85775236
212093_s_at	MTUS1	Chr 8[-] 17545583-17702666 bp	-0,85495646
223278_at	GJB2	Chr 13[-] 19659609-19665037 bp	-0,85243928
215707_s_at	PRNP	Chr 20[+] 4614996-4630236 bp	-0,85230988
203357_s_at	CAPN7	Chr 3[+] 15222737-15269427 bp	-0,85217134
204983_s_at	GPC4	Chr X[-] 132261797-132377184 bp	-0,85007531
1557910_at	HSP90AB1	Chr 6[+] 44322802-44329598 bp	-0,84934694
1557910_at	HSP90AB3P	Chr 4[+] 89031935-89034480 bp	-0,84934694
217811_at	SELT	Chr 3[+] 151803756-151830924 bp	-0,84933014
210904_s_at	IL13RA1	Chr X[+] 117745563-117812530 bp	-0,84734026
201476_s_at	RRM1	Chr 11[+] 4072587-4116682 bp	-0,84708656
202784_s_at	NNT	Chr 5[+] 43638582-43743264 bp	-0,84489779
216521_s_at	BRCC3	Chr X[+] 153952900-154004543 bp	-0,84455498
220266_s_at	KLF4	Chr 9[-] 109286954-109291748 bp	-0,84408564
204426_at	TMED2	Chr 12[+] 122635114-122648639 bp	-0,8434237
216607_s_at	CYP51A1	Chr 7[-] 91579402-91601946 bp	-0,84302354
203821_at	HBEGF	Chr 5[-] 139692612-139706359 bp	-0,84284611
208840_s_at	G3BP2	Chr 4[-] 76786990-76817629 bp	-0,84280046
233924_s_at	EXOC6	Chr 10[+] 94584447-94809241 bp	-0,84193135
212814_at	KIAA0828	Chr 7[+] 128652100-128857288 bp	-0,84164513
242019_at	LASS6	Chr 2[+] 169021081-169339398 bp	-0,84152397
211547_s_at	PAFAH1B1	Chr 17[+] 2443686-2535638 bp	-0,83892566
205479_s_at	PLAU	Chr 10[+] 75340896-75347261 bp	-0,83845469
205648_at	WNT2	Chr 7[-] 116704518-116750579 bp	-0,83666664
1552502_s_at	RHBDL2	Chr 1[-] 39124066-39180043 bp	-0,83507225
1553219_a_at	AMMECR1	Chr X[-] 109324070-109570117 bp	-0,83208922
204621_s_at	NR4A2	Chr 2[-] 156889194-156897474 bp	-0,83175619
239818_x_at	TRIB1	Chr 8[+] 126511745-126519827 bp	-0,83151301
230830_at	OSTbeta	Chr 15[+] 63124858-63132787 bp	-0,82989673
216100_s_at	TOR1AIP1	Chr 1[+] 178118000-178155834 bp	-0,82985757
207380_x_at	NOX1	Chr X[-] 99984969-100015990 bp	-0,82765904
1568603_at	CADPS	Chr 3[-] 62359061-62836094 bp	-0,82744021
232278_s_at	DEPDC1	Chr 1[-] 68712423-68735386 bp	-0,82716354
210148_at	HIPK3	Chr 11[+] 33235981-33332427 bp	-0,82640789
205808_at	ASPH	Chr 8[-] 62578374-62789681 bp	-0,82523537
226908_at	LRIG3	Chr 12[-] 57552204-57600529 bp	-0,82455944
218823_s_at	KCTD9	Chr 8[-] 25341280-25371900 bp	-0,82448013
218823_s_at	KCTD9L	Chr X[+] 104536840-104540217 bp	-0,82448013
208459_s_at	XPO7	Chr 8[+] 21833128-21918930 bp	-0,8229038
207601_at	SULT1B1	Chr 4[-] 70627275-70661019 bp	-0,82269573

230722_at	BNC2	Chr 9 [-] 16399501-16860786 bp	-0,82268667
224149_x_at	SLMAP	Chr 3 [+] 57718068-57889934 bp	-0,82174262
205084_at	BCAP29	Chr 7 [+] 107007946-107058401 bp	-0,82067628
220477_s_at	C20orf30	Chr 20 [-] 5028484-5041733 bp	-0,81993023
220477_s_at	LOC642975	Chr 11 [+] 56214270-56215740 bp	-0,81993023
214544_s_at	SNAP23	Chr 15 [+] 40575127-40612548 bp	-0,81792261
228708_at	AF131784	Chr 18 [+] 50711175-50713744 bp	-0,81748087
211162_x_at	SCD	Chr 10 [+] 102096762-102114578 bp	-0,81731029
211162_x_at	LOC645313	Chr 17 [+] 20628156-20631905 bp	-0,81731029
201116_s_at	CPE	Chr 4 [+] 166519538-166638926 bp	-0,81706359
233878_s_at	XRN2	Chr 20 [+] 21231942-21318463 bp	-0,81703845
231576_at	Hs.695021		-0,81690603
214440_at	NAT1	Chr 8 [+] 18111882-18273466 bp	-0,81429298
207332_s_at	TFRC	Chr 3 [-] 197260553-197293343 bp	-0,81363688
1559477_s_at	MEIS1	Chr 2 [+] 66516036-66653395 bp	-0,81350063
211633_x_at	IGHV1-2	Chr 14 [-] 105523714-105524151 bp	-0,81172016
230269_at	Hs.664557		-0,81134456
201235_s_at	BTG2	Chr 1 [+] 201541242-201545353 bp	-0,81115064
1555460_a_at	SLC39A6	Chr 18 [-] 31943197-31963203 bp	-0,80911238
222458_s_at	C1orf108	Chr 1 [+] 39229504-39244318 bp	-0,80799989
221004_s_at	ITM2C	Chr 2 [+] 231437865-231452207 bp	-0,80792378
226905_at	FAM101B	Chr 17 [-] 293027-295959 bp	-0,80754933
224550_s_at	MRV11	Chr 11 [-] 10553869-10672111 bp	-0,80741728
221286_s_at	MGC29506	Chr 5 [-] 138751074-138753669 bp	-0,80723776
214071_at	Hs.514713		-0,80705919
214347_s_at	DDC	Chr 7 [-] 50493628-50600537 bp	-0,80690769
234975_at	AK096386	Chr 16 [-] 11869487-11872120 bp	-0,80628518
234975_at	AK095367	Chr 16 [-] 11869735-11873109 bp	-0,80628518
210154_at	ME2	Chr 18 [+] 46659433-46728258 bp	-0,80603118
215236_s_at	PICALM	Chr 11 [-] 85346133-85457756 bp	-0,80558227
226632_at	CYGB	Chr 17 [-] 72035035-72045561 bp	-0,80520379
208097_s_at	TXNDC1	Chr 14 [+] 50776686-50792512 bp	-0,80513066
222507_s_at	TMEM9B	Chr 11 [-] 8925416-8942578 bp	-0,8045351
208687_x_at	HSPA8	Chr 11 [-] 122433410-122438054 bp	-0,80383909
200953_s_at	CCND2	Chr 12 [+] 4253199-4284777 bp	-0,80354478
224060_s_at	DPH5	Chr 1 [-] 101228105-101263959 bp	-0,80346065
203788_s_at	SEMA3C	Chr 7 [-] 80209790-80386603 bp	-0,80251201
211569_s_at	HADH	Chr 4 [+] 109130319-109175780 bp	-0,80230315
214973_x_at	IGHV3-9	Chr 14 [-] 105623329-105623774 bp	-0,80090951
214973_x_at	IGHA1	Chr 14 [-] 105244520-105246046 bp	-0,80090951
214973_x_at	IGHD	Chr 14 [-] 105374817-105383055 bp	-0,80090951
214973_x_at	IGHG1	Chr 14 [-] 105275144-105280452 bp	-0,80090951
203887_s_at	THBD	Chr 20 [-] 22974270-22978301 bp	-0,80028811
214483_s_at	ARFIP1	Chr 4 [+] 153920562-154052514 bp	-0,80019987
1554741_s_at		Chr 9 [-] 41951617-42009580 bp	-0,7995046
1554741_s_at	KGFLP2	Chr 9 [-] 41949736-42009477 bp	-0,7995046
1554741_s_at	FLJ20444	Chr 9 [-] 42007850-42011617 bp	-0,7995046
1554741_s_at	KGFLP1	Chr 9 [+] 46527458-46586496 bp	-0,7995046
1554741_s_at	FGF7	Chr 15 [+] 47502751-47566815 bp	-0,7995046
211681_s_at	PDLIM5	Chr 4 [+] 95592060-95808400 bp	-0,79949578
201044_x_at	DUSP1	Chr 5 [-] 172127707-172130809 bp	-0,79914133
213416_at	ITGA4	Chr 2 [+] 182029864-182110719 bp	-0,7988048
204931_at	TCF21	Chr 6 [+] 134251969-134258384 bp	-0,79847534
207265_s_at	KDELRL3	Chr 22 [+] 37194029-37209391 bp	-0,79846973
204128_s_at	RFC3	Chr 13 [+] 33290203-33438695 bp	-0,79796187
213110_s_at	COL4A5	Chr X [+] 107569810-107827431 bp	-0,79689744
1558093_s_at	MATR3	Chr 5 [+] 138637691-138694029 bp	-0,79673288
221618_s_at	TAF9B	Chr X [-] 77271901-77281859 bp	-0,79581702
221618_s_at	LOC728198		-0,79581702
214845_s_at	CALU	Chr 7 [+] 128166653-128198764 bp	-0,794139
235103_at	Hs.432822		-0,79326862
232568_at	MGC24103	Chr 9	-0,79309817
211635_x_at	IGHG1	Chr 14 [-] 105275144-105280452 bp	-0,79269219
211635_x_at	IGHM	Chr 14 [-] 105389082-105393367 bp	-0,79269219
211635_x_at	IGHV1-69	Chr 14 [-] 106240967-106241412 bp	-0,79269219
208750_s_at	ARF1	Chr 1 [+] 226336984-22633536 bp	-0,79225023
226766_at	ROBO2	Chr 3 [+] 77172621-77779351 bp	-0,79220501
211212_s_at	ORC5L	Chr 7 [-] 103554024-103635731 bp	-0,79153764
201236_s_at	BTG2	Chr 1 [+] 201541242-201545353 bp	-0,78957997
226931_at	TMTC1	Chr 12 [-] 29545024-29828959 bp	-0,78599939
1552612_at	CDC42SE2	Chr 5 [+] 130627601-130758282 bp	-0,78458957
211150_s_at	DLAT	Chr 11 [+] 111401381-111439799 bp	-0,78402263
218810_at	ZC3H12A	Chr 1 [+] 37712740-37722565 bp	-0,78393772
215177_s_at	ITGA6	Chr 2 [+] 173000616-173079256 bp	-0,78331332

Resultats

212009_s_at	STIP1	Chr 11[+] 63709320-63728591 bp	-0,78329449
1554417_s_at	APH1A	Chr 1[-] 148504428-148508327 bp	-0,78217252
214545_s_at	PROSC	Chr 8[+] 37738833-37756444 bp	-0,78132509
1553105_s_at	DSG2	Chr 18[+] 27332203-27380855 bp	-0,78064017
215253_s_at	RCAN1	Chr 21[-] 34810652-34909303 bp	-0,78009363
202742_s_at	PRKACB	Chr 1[+] 84316329-84476769 bp	-0,77946882
222457_s_at	LIMA1	Chr 12[-] 48855838-48963539 bp	-0,77759675
227506_at	SLC16A9	Chr 10[-] 61080529-61165766 bp	-0,7769899
226950_at	ACVRL1	Chr 12[+] 50587469-50601120 bp	-0,7745704
205573_s_at	SNX7	Chr 1[+] 98899801-98998644 bp	-0,77339455
202316_x_at	UBE4B	Chr 1[+] 10015630-10163884 bp	-0,77278552
213461_at	NUDT21	Chr 16[-] 55020549-55042766 bp	-0,77171256
38037_at	HBEGF	Chr 5[-] 139692612-139706359 bp	-0,771307
1554321_a_at	NFS1	Chr 20[-] 33720024-33750695 bp	-0,77065121
221029_s_at	WNT5B	Chr 12[+] 1596483-1626640 bp	-0,76880558
227364_at	Hs.644757		-0,76853668
201957_at	PPP1R12B	Chr 1[+] 200584443-200824320 bp	-0,76825591
1553725_s_at	ZNF644	Chr 1[-] 91153443-91260259 bp	-0,76799089
202458_at	PRSS23	Chr 11[+] 86189211-86199923 bp	-0,76653442
201118_at	PGD	Chr 1[+] 10381672-10402788 bp	-0,76643883
1554878_a_at	ABCD3	Chr 1[+] 94656584-94756807 bp	-0,76447556
213933_at	PTGER3	Chr 1[-] 71090624-71286079 bp	-0,76385634
216985_s_at	STX3	Chr 11[+] 59279108-59326755 bp	-0,76337418
213943_at	TWIST1	Chr 7[-] 19121616-19123820 bp	-0,76301219
219929_s_at	ZFYVE21	Chr 14[+] 103251898-103269757 bp	-0,76208327
200059_s_at	RHOA	Chr 3[-] 49371582-49424530 bp	-0,76180806
208450_at	LGALS2	Chr 22[-] 36296199-36306010 bp	-0,76127352
225946_at	RASSF8	Chr 12[+] 26003229-26124092 bp	-0,76104945
224407_s_at		Chr X[+] 130984974-131037652 bp	-0,76003005
225687_at	FAM83D	Chr 20[+] 36988369-37015117 bp	-0,75881529
224187_x_at	HSPA8	Chr 11[-] 122433410-122438054 bp	-0,75861689
201821_s_at	TIMM17A	Chr 1[+] 200191242-200206412 bp	-0,75796198
210868_s_at	ELOVL6	Chr 4[-] 111189992-111339220 bp	-0,75731726
1554510_s_at	GHITM	Chr 10[+] 85889176-85903291 bp	-0,75674317
1555434_a_at	SLC39A14	Chr 8[+] 22280737-22347587 bp	-0,75647755
1554577_a_at	PSMD10	Chr X[-] 107214093-107221504 bp	-0,75637184
200641_s_at	YWHAZ	Chr 8[-] 102000090-102034745 bp	-0,75510128
217281_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-0,75502604
217281_x_at	IGHV3-7	Chr 14[-] 105589443-105589898 bp	-0,75502604
213548_s_at	CDV3	Chr 3[+] 134775264-134791795 bp	-0,75401369
1552660_a_at	C5orf22	Chr 5[+] 31568151-31590671 bp	-0,75171208
217457_s_at	RAP1GDS1	Chr 4[+] 99401643-99582840 bp	-0,75142798
216560_x_at	IGLV3-10	Chr 22[+] 21484279-21484778 bp	-0,75142249
216560_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-0,75142249
216560_x_at	EXOC7	Chr 17[-] 71588682-71611451 bp	-0,75142249
231906_at	HOXD8	Chr 2[+] 176702714-176704977 bp	-0,75125699
221900_at	COL8A2	Chr 1[-] 36333424-36338437 bp	-0,75083669
220812_s_at	HHLA2	Chr 3[+] 109504022-109579816 bp	-0,75072057
230319_at	AKO93732	Chr 4[-] 122173936-122175833 bp	-0,74893563
202195_s_at	TMED5	Chr 1[-] 93387887-93418873 bp	-0,74730149
217188_s_at	C14orf1	Chr 14[-] 75185884-75197277 bp	-0,74671627
1555618_s_at	SAE1	Chr 19[+] 52325960-52405372 bp	-0,74658637
203360_s_at	MYCBP	Chr 1[-] 39101221-39119856 bp	-0,74584565
203360_s_at	GJA10	Chr 1[-] 39101223-39119876 bp	-0,74584565
213689_x_at	FAM69A	Chr 1[-] 93071041-93199645 bp	-0,74571736
1554747_a_at	sep-02	Chr 2[+] 241903396-241942115 bp	-0,74364662
203180_at	ALDH1A3	Chr 15[+] 99237580-99274352 bp	-0,74294622
1556834_at	BCO42986	Chr 18[-] 27376107-27390872 bp	-0,74076995
1563111_a_at	PIGX	Chr 3[+] 197923682-197946166 bp	-0,73985342
205196_s_at	AP151	Chr 7[+] 100584398-100591277 bp	-0,73981014
231786_at	HOXA13	Chr 7[-] 27203024-27206250 bp	-0,73902235
203293_s_at	LMAN1	Chr 18[-] 55148088-55177463 bp	-0,73891193
204141_at	TUBB2A	Chr 6[-] 3098899-3102808 bp	-0,7385037
217258_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-0,73827222
223010_s_at	OClAD1	Chr 4[+] 48527839-48558022 bp	-0,73815611
236979_at	C1orf178	Chr 1[-] 114222316-114231692 bp	-0,73773338
207782_s_at	PSEN1	Chr 14[+] 72672915-72756862 bp	-0,73749486
1555226_s_at	C1orf43	Chr 1[-] 152445807-152459728 bp	-0,737472
1554411_at	CTNNB1	Chr 3[+] 41216004-41256938 bp	-0,73732432
227278_at	TAF13	Chr 1[-] 109406644-109420147 bp	-0,7367598
204378_at	BCAS1	Chr 20[-] 51986723-52120490 bp	-0,73644393
227697_at	SOCS3	Chr 17[-] 73864454-73867753 bp	-0,73617173
1554897_s_at	RHBDL2	Chr 1[-] 39124066-39180043 bp	-0,73596587
226658_at	PDPN	Chr 1[+] 13782814-13817039 bp	-0,73569665

202732_at	PKIG	Chr 20[+] 42593840-42686302 bp	-0,73544922
205732_s_at	NCOA2	Chr 8[-] 71186821-71478574 bp	-0,73481802
221031_s_at	APOLD1	Chr 12[+] 12770130-12874176 bp	-0,7346677
217445_s_at	GART	Chr 21[-] 33798108-33837068 bp	-0,73425418
243357_at	NEGR1	Chr 1[-] 71641213-72521005 bp	-0,73413146
211749_s_at	VAMP3	Chr 1[+] 7753916-7764079 bp	-0,73311006
234884_x_at	IGLV3-1	Chr 22[+] 21553092-21553572 bp	-0,73302324
230730_at	SGCD	Chr 5[+] 155686334-156125639 bp	-0,7315991
203767_s_at	STS	Chr X[+] 7147497-7282851 bp	-0,73117367
213075_at	OLFML2A	Chr 9[+] 126579371-126616985 bp	-0,73014773
1553589_a_at	PDZK1P1	Chr 1[-] 47421848-47429303 bp	-0,72952035
224787_s_at	RAB18	Chr 10[+] 27833203-27869105 bp	-0,72913607
203214_x_at	CDC2	Chr 10[+] 62205690-62224616 bp	-0,72860109
222393_s_at	NAT13	Chr 3[-] 114920531-114947786 bp	-0,72815065
227335_at	DIDO1	Chr 20[-] 60979535-61039743 bp	-0,72764397
214959_s_at	API5	Chr 11[+] 43290109-43322655 bp	-0,72750119
216252_x_at	FAS	Chr 10[+] 90739206-90765522 bp	-0,7268195
233555_s_at	SULF2	Chr 20[-] 45719063-45848767 bp	-0,72486631
206383_s_at	G3BP2	Chr 4[-] 76786990-76817629 bp	-0,72431625
231918_s_at	GFM2	Chr 5[-] 74052785-74098952 bp	-0,72295454
202139_at	AKR7A2	Chr 1[-] 19503046-19511227 bp	-0,72278125
240277_at	Hs.606496		-0,72240229
225140_at	KLF3	Chr 4[+] 38342212-38379058 bp	-0,72196657
1553928_at	ELMOD2	Chr 4[+] 141664772-141694374 bp	-0,72149326
201688_s_at	TPD52	Chr 8[-] 81109658-81246425 bp	-0,7212247
228195_at	MGC13057	Chr 2[+] 190753453-190773185 bp	-0,72118151
1555830_s_at	FAM62B	Chr 7[-] 158216450-158315080 bp	-0,72106562
203087_s_at	KIF2A	Chr 5[+] 61637835-61718998 bp	-0,71973492
1553685_s_at	SP1	Chr 12[+] 52060246-52096497 bp	-0,71963681
207724_s_at	SPAST	Chr 2[+] 32142184-32236210 bp	-0,71928174
221423_s_at	YIPF5	Chr 5[-] 143517919-143530387 bp	-0,71874695
228706_s_at	CLDN23	Chr 8[+] 8597076-8599026 bp	-0,71847127
208960_s_at	KLF6	Chr 10[-] 3808188-3817467 bp	-0,71808994
229905_at	Hs.552082		-0,71734748
1554420_at	ATF3	Chr 1[+] 210805374-210860742 bp	-0,71652698
228661_s_at	BCO45807	Chr 1[+] 101310802-101325405 bp	-0,71565784
228661_s_at	BX538249	Chr 1[+] 101263996-101325407 bp	-0,71565784
228661_s_at	AK021551	Chr 1[+] 101320597-101325405 bp	-0,71565784
204342_at	SLC25A24	Chr 1[-] 108478965-108544421 bp	-0,7137665
231647_s_at	FCRL5	Chr 1[-] 155749791-155788934 bp	-0,71374518
223289_s_at	USP38	Chr 4[+] 144325548-144362090 bp	-0,71248305
242422_at	AK128316	Chr 5[+] 151166508-151171104 bp	-0,71220294
202533_s_at	DHFR	Chr 5[-] 79957801-79986857 bp	-0,70927546
202533_s_at	LOC643509	Chr 18	-0,70927546
202533_s_at		Chr 18[-] 22004685-22005248 bp	-0,70927546
202533_s_at	DHFR1L	Chr 3[-] 95259456-95264350 bp	-0,70927546
212409_s_at	TOR1AIP1	Chr 1[+] 178118000-178155834 bp	-0,70869848
208647_at	FDFT1	Chr 8[+] 11697573-11734227 bp	-0,70863693
230110_at	MCOLN2	Chr 1[-] 85163854-85235384 bp	-0,70753165
206116_s_at	TPM1	Chr 15[+] 61121891-61151167 bp	-0,70735056
220272_at	BNC2	Chr 9[-] 16399501-16860786 bp	-0,70668548
211985_s_at	CALM1	Chr 14[+] 89933126-89944363 bp	-0,70666053
214916_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-0,7065879
224173_s_at	MRPL30	Chr 2[+] 99164010-99180521 bp	-0,70643666
1555797_a_at	ARPC5	Chr 1[-] 181859024-181871608 bp	-0,70580887
224642_at	FYTTD1	Chr 3[+] 198961018-198995584 bp	-0,7053527
224582_s_at	NUCKS1	Chr 1[-] 203948570-203986027 bp	-0,70530034
211744_s_at	CD58	Chr 1[-] 116858680-116915184 bp	-0,70515975
203676_at	GNS	Chr 12[-] 63393489-63439479 bp	-0,70228579
1570523_s_at	ATG10	Chr 5[+] 81303600-81587714 bp	-0,70203602
1564064_a_at	ATP11B	Chr 3[+] 183993985-184122117 bp	-0,70143545
217859_s_at	SLC39A9	Chr 14[+] 68935208-68998851 bp	-0,7014303
200973_s_at	TSPAN3	Chr 15[-] 75125386-75150568 bp	-0,70134291
1555716_a_at	CXADR	Chr 21[+] 17807201-17861147 bp	-0,70061234
243495_s_at	BX641027	Chr 17[+] 44721575-44726016 bp	-0,70010656
243495_s_at	BX648398	Chr 17[+] 44715246-44726016 bp	-0,70010656
201790_s_at	DHCR7	Chr 11[-] 70823108-70837050 bp	-0,70008096
1552516_a_at	HIPK1	Chr 1[+] 114273493-114321949 bp	-0,69808905
225200_at	DPH3	Chr 3[-] 16274490-16281480 bp	-0,69807256
214336_s_at	COPA	Chr 1[-] 158525687-158580079 bp	-0,69752246
207439_s_at	SLC35A2	Chr X[-] 48645403-48654179 bp	-0,69709971
222558_at	P15RS	Chr 18[-] 31823785-31901518 bp	-0,6966001
202770_s_at	CCNG2	Chr 4[+] 78297551-78319319 bp	-0,69615622
215382_x_at	TPSAB1	Chr 16[+] 1230679-1232556 bp	-0,69566066

Resultats

215382_x_at	TPSB2	Chr 16[-] 1218337-1220215 bp	-0,69566066
201078_at	TM9SF2	Chr 13[+] 98951729-99013644 bp	-0,69398191
206917_at	GNA13	Chr 17[-] 60437295-60483216 bp	-0,69366217
211665_s_at	SOS2	Chr 14[-] 49654812-49767751 bp	-0,69291064
223686_at	PK1	Chr 7[-] 143779976-144164066 bp	-0,69257982
36920_at	MTM1	Chr X[+] 149487727-149592453 bp	-0,69209112
201571_s_at	DCTD	Chr 4[-] 184048238-184075624 bp	-0,69017569
201531_at	ZFP36	Chr 19[+] 44589293-44591885 bp	-0,68985852
215101_s_at	CXCL5	Chr 4[-] 75080223-75083280 bp	-0,68904658
204036_at	EDG2	Chr 9[-] 112675364-112840186 bp	-0,68763858
222538_s_at	APPL1	Chr 3[+] 57236894-57282536 bp	-0,68759926
210284_s_at	MAP3K7IP2	Chr 6[+] 149680756-149774442 bp	-0,68729162
226185_at	AKO26697	Chr 4[+] 85789456-85791510 bp	-0,68705615
216557_x_at	IGHV3-21	Chr 14[-] 105762716-105763169 bp	-0,68625485
222519_s_at	IFT57	Chr 3[-] 109362349-109423938 bp	-0,68549686
212815_at	ASCC3	Chr 6[-] 101062791-101435961 bp	-0,6845894
202143_s_at	COPS8	Chr 2[+] 237658823-237672228 bp	-0,68457733
228082_at	ASAM	Chr 11[-] 122448230-122571217 bp	-0,68348152
213901_x_at	RBM9	Chr 22[-] 34469593-34754495 bp	-0,68344355
212797_at	SORT1	Chr 1[-] 109653715-109742096 bp	-0,68270257
204105_s_at	NRCAM	Chr 7[-] 107575318-107884062 bp	-0,6810519
205185_at	SPINK5	Chr 5[+] 147423759-147497120 bp	-0,68088129
211737_x_at	PTN	Chr 7[-] 136562628-136679086 bp	-0,68077904
200008_s_at	GDI2	Chr 10[-] 5847192-5924101 bp	-0,67997189
1557918_s_at	SLC16A1	Chr 1[-] 113255992-113300498 bp	-0,67925802
203418_at	CCNA2	Chr 4[-] 122957975-122964505 bp	-0,67922019
201120_s_at	PGRMC1	Chr X[+] 118254244-118262457 bp	-0,67895831
217892_s_at	LIMA1	Chr 12[-] 48855838-48963539 bp	-0,67780798
207507_s_at	ATP5G3	Chr 2[-] 175749234-175757581 bp	-0,67767489
231955_s_at	HIBADH	Chr 7[-] 27531586-27669127 bp	-0,67728377
207686_s_at	CASP8	Chr 2[+] 201806426-201860677 bp	-0,67708574
224368_s_at	NDRG3	Chr 20[-] 34713583-34807895 bp	-0,67692908
202731_at	PDCD4	Chr 10[+] 112621555-112649754 bp	-0,67667941
209363_s_at	SURB7	Chr 12[+] 27066746-27073949 bp	-0,6765252
1566472_s_at	RETSAT	Chr 2[-] 85422733-85435166 bp	-0,6763136
208358_s_at	UGT8	Chr 4[+] 115739060-115817201 bp	-0,67604908
1555989_at	Hs.19156		-0,67561219
216048_s_at	RHOBTB3	Chr 5[+] 95092635-95157827 bp	-0,675
205067_at	IL1B	Chr 2[-] 113303808-113310827 bp	-0,67478403
1552921_a_at	FIGNL1	Chr 7[-] 50479325-50485542 bp	-0,67367406
201444_s_at	ATP6AP2	Chr X[+] 40325104-40350833 bp	-0,67321393
202539_s_at	HMGCR	Chr 5[+] 74668790-74693685 bp	-0,67265573
1555679_a_at	RTN4IP1	Chr 6[-] 107126539-107184055 bp	-0,67067759
201583_s_at	SEC23B	Chr 20[+] 18436188-18490059 bp	-0,67021718
205195_at	AP1S1	Chr 7[+] 100584398-100591277 bp	-0,66943725
39402_at	IL1B	Chr 2[-] 113303808-113310827 bp	-0,6693422
201646_at	SCARB2	Chr 4[-] 77298918-77354059 bp	-0,66856501
221127_s_at	RIG	Chr 11	-0,66830399
221127_s_at		Chr 11[+] 11938958-11941523 bp	-0,66830399
232296_s_at	GFM1	Chr 3[+] 159845011-159893055 bp	-0,66797878
202284_s_at	CDKN1A	Chr 6[+] 36754413-36763094 bp	-0,66778282
200951_s_at	CCND2	Chr 12[+] 4253199-4284777 bp	-0,66762831
211650_x_at	EXOC7	Chr 17[-] 71588682-71611451 bp	-0,66743354
211650_x_at	SIX6	Chr 14[+] 60045622-60048282 bp	-0,66743354
211650_x_at	IGHM	Chr 14[-] 105389082-105393367 bp	-0,66743354
211650_x_at	IL8	Chr 4[+] 74825139-74828297 bp	-0,66743354
222556_at	ALG5	Chr 13[-] 36421967-36471477 bp	-0,66737005
223879_s_at	OXR1	Chr 8[+] 107599987-107834097 bp	-0,66655991
223879_s_at	LOC645405	Chr 15[+] 46804627-46805848 bp	-0,66655991
208844_at	VDAC3	Chr 8[+] 42368547-42382572 bp	-0,66566775
218439_s_at	COMMD10	Chr 5[+] 115448622-115656882 bp	-0,66556946
228851_s_at	ENSA	Chr 1[-] 148839951-148868722 bp	-0,66533143
212720_at	PAPOLA	Chr 14[+] 96038471-96103201 bp	-0,66530151
234304_s_at	IPO11	Chr 5[+] 61744351-61960165 bp	-0,66526611
209709_s_at	HMMR	Chr 5[+] 162820241-162851525 bp	-0,66521732
211302_s_at	PDE4B	Chr 1[+] 66030781-66612850 bp	-0,664453
207791_s_at	RAB1A	Chr 2[-] 65167493-65210793 bp	-0,66361479
209276_s_at	GLRX	Chr 5[-] 95175309-95184465 bp	-0,66254151
204518_s_at	PPIC	Chr 5[-] 122386977-122400324 bp	-0,66244167
241872_at	AI149963		-0,66230275
214696_at	MGC14376	Chr 17[-] 1561553-1566255 bp	-0,66110588
212886_at	CCDC69	Chr 5[-] 150540806-150583847 bp	-0,66039343
204879_at	PDPN	Chr 1[+] 13782814-13817039 bp	-0,66031622
205770_at	GSR	Chr 8[-] 30655977-30704985 bp	-0,65971785

211574_s_at	CD46	Chr 1[+] 205992025-206035481 bp	-0,65969505
211080_s_at	NEK2	Chr 1[-] 209902737-209915590 bp	-0,65955466
205120_s_at	SGCB	Chr 4[-] 52581629-52599222 bp	-0,65943165
206544_x_at	SMARCA2	Chr 9[+] 2005342-2183624 bp	-0,65924574
204159_at	CDKN2C	Chr 1[+] 51199005-51212897 bp	-0,65782468
234366_x_at	IGLV3-1	Chr 22[+] 21553092-21553572 bp	-0,65742798
207974_s_at	SKP1A	Chr 5[-] 133520468-133540583 bp	-0,65595911
201946_s_at	CCT2	Chr 12[+] 68265475-68281624 bp	-0,65583054
1554167_a_at	GOLGA7	Chr 8[+] 41467238-41487656 bp	-0,65565662
1553112_s_at	CDK8	Chr 13[+] 25726276-25877375 bp	-0,65549844
221638_s_at	STX16	Chr 20[+] 56659734-56727701 bp	-0,65533444
202137_s_at	ZMYND11	Chr 10[+] 170643-290577 bp	-0,65324017
208370_s_at	RCAN1	Chr 21[-] 34810652-34909303 bp	-0,65322126
1552344_s_at	CNOT7	Chr 8[-] 17131108-17148758 bp	-0,65247532
218541_s_at	C8orf4	Chr 8[+] 40130146-40131950 bp	-0,65233818
223243_s_at	EDEM3	Chr 1[-] 182925988-182990670 bp	-0,65207049
1554757_a_at	INPP5A	Chr 10[+] 134201298-134446974 bp	-0,6514037
220581_at	C6orf97	Chr 6[+] 151856920-151984021 bp	-0,65114706
238421_at	RC3H2	Chr 9[-] 124646656-124707322 bp	-0,65109719
202675_at	SDHB	Chr 1[-] 17217804-17253252 bp	-0,64953311
200604_s_at	PRKAR1A	Chr 17[+] 64019705-64040506 bp	-0,6483848
225850_at	SFT2D1	Chr 6[-] 166653214-166676025 bp	-0,6478488
235766_x_at	BC078139	Chr 8[+] 141677257-141679024 bp	-0,64775531
1558014_s_at	MLSTD2	Chr 11[+] 13646834-13710469 bp	-0,64773
204944_at	PTPRG	Chr 3[+] 61522285-62255613 bp	-0,64725605
228218_at	AKO91573	Chr 3[-] 117006939-117008569 bp	-0,64641752
228956_at	Hs.144197		-0,64617274
201735_s_at	CLCN3	Chr 4[+] 170778297-170878732 bp	-0,64564606
225161_at	GFM1	Chr 3[+] 159845011-159893055 bp	-0,64518873
243042_at	FAM73A	Chr 1[+] 78017897-78116694 bp	-0,64498716
225990_at	BOC	Chr 3[+] 114413130-114488996 bp	-0,64484101
209424_s_at	AMACR	Chr 5[-] 34022040-34160396 bp	-0,64389059
1552978_a_at	SCAMP1	Chr 5[+] 77692110-77810636 bp	-0,64344607
225400_at	C1orf19	Chr 1[+] 182287434-182309969 bp	-0,64304189
204301_at	KBTBD11	Chr 8[+] 1909451-1942509 bp	-0,64263524
1553148_a_at	SNX13	Chr 7[-] 17798181-17946656 bp	-0,6423349
201580_s_at	TXNDC13	Chr 20[-] 7906024-7948476 bp	-0,64083409
216899_s_at	SKAP2	Chr 7[-] 26673212-26870866 bp	-0,64005763
234915_s_at	DENR	Chr 12[+] 121803324-121821906 bp	-0,6398197
222987_s_at	TMEM9	Chr 1[-] 199370523-199407325 bp	-0,63979089
214971_s_at	ST6GAL1	Chr 3[+] 188131210-188279035 bp	-0,63939838
207549_x_at	CD46	Chr 1[+] 205992025-206035481 bp	-0,63785787
223021_x_at	VTA1	Chr 6[+] 142510060-142583778 bp	-0,63780785
241666_at	C3orf23	Chr 3[+] 44354637-44425944 bp	-0,63685205
210639_s_at	ATG5	Chr 6[-] 106739044-106880388 bp	-0,63670815
225977_at	PCDH18	Chr 4[-] 138660285-138673079 bp	-0,63608022
208909_at	UQCRCF51	Chr 19[-] 34390007-34395954 bp	-0,63535881
228256_s_at	EPB41L4A	Chr 5[-] 111507433-111782909 bp	-0,63494516
209629_s_at	NXT2	Chr X[+] 108665666-108674575 bp	-0,63474317
235666_at	ITGA8	Chr 10[-] 15595954-15802130 bp	-0,63375968
1554918_a_at	ABCC4	Chr 13[-] 94470090-94751684 bp	-0,63359238
203626_s_at	SKP2	Chr 5[+] 36187946-36219904 bp	-0,63353599
206355_at	GNAL	Chr 18[+] 11679263-11871922 bp	-0,63251905
226319_s_at	THOC4	Chr 17[-] 77439016-77442758 bp	-0,63234017
226319_s_at	LOC644811		-0,63234017
216205_s_at	MFN2	Chr 1[+] 11962956-11996154 bp	-0,63199903
205014_at	FGFBP1	Chr 4[-] 15546290-15549461 bp	-0,63179653
204214_s_at	RAB32	Chr 6[+] 146906521-146917794 bp	-0,63141855
205371_s_at	DBT	Chr 1[-] 100432324-100487978 bp	-0,63138441
201490_s_at	PIPF	Chr 10[+] 80777226-80785096 bp	-0,63121236
208478_s_at	BAX	Chr 19[+] 54149929-54156867 bp	-0,63120609
201576_s_at	GLB1	Chr 3[-] 33013114-33113638 bp	-0,63078144
205128_x_at	PTGS1	Chr 9[+] 124173050-124197802 bp	-0,63065799
208848_at	ADH5	Chr 4[-] 100211152-100228954 bp	-0,6303666
210385_s_at	ARTS-1	Chr 5[-] 96122277-96169559 bp	-0,62978116
1552478_a_at	IRF6	Chr 1[-] 208025659-208046102 bp	-0,62956462
201581_at	TXNDC13	Chr 20[-] 7906024-7948476 bp	-0,6290519
213004_at	ANGPTL2	Chr 9[-] 128889432-128924983 bp	-0,62846612
233230_s_at	SLAIN2	Chr 4[+] 47991381-48122986 bp	-0,62821645
206113_s_at	RAB5A	Chr 3[+] 19963399-20001647 bp	-0,62768584
215983_s_at	UBXD6	Chr 8[+] 30721232-30744064 bp	-0,62642658
210993_s_at	SMAD1	Chr 4[+] 146622401-146699778 bp	-0,62562027
1554450_s_at	MIER3	Chr 5[-] 56251186-56292377 bp	-0,62527013
200778_s_at	sep-02	Chr 2[+] 241903396-241942115 bp	-0,62478128

Resultats

203157_s_at	GLS	Chr 2[+] 191453841-191538517 bp	-0,62466286
238567_at	SGPP2	Chr 2[+] 222997566-223131861 bp	-0,62453115
211434_s_at	CCRL2	Chr 3[+] 46423725-46426018 bp	-0,62441062
211434_s_at	LOC727811		-0,62441062
209095_at	DLD	Chr 7[+] 107318822-107348879 bp	-0,62400208
200760_s_at	ARL6IP5	Chr 3[+] 69216780-69237929 bp	-0,62391372
202069_s_at	IDH3A	Chr 15[+] 76228774-76249939 bp	-0,62341751
231826_at	C20orf74	Chr 20[-] 20320856-20641123 bp	-0,6233839
219197_s_at	SCUBE2	Chr 11[-] 8998511-9069731 bp	-0,62321292
220310_at	TUBAL3	Chr 10[-] 5425061-5436795 bp	-0,62290944
215723_s_at	PLD1	Chr 3[-] 172800889-173010929 bp	-0,62282276
1552613_s_at	CDC42E2	Chr 5[+] 130627601-130758282 bp	-0,62192149
204034_at	ETHE1	Chr 19[-] 48702711-48723236 bp	-0,62165256
221511_x_at	CCPG1	Chr 15[-] 53434730-53587724 bp	-0,62130623
235000_at	FAM79B	Chr 3[+] 190372457-190523964 bp	-0,62111387
211641_x_at	IGHV3-74	Chr 14[-] 106289719-106290174 bp	-0,62024888
211519_s_at	KIF2C	Chr 1[+] 44978079-45006026 bp	-0,62023209
204725_s_at	NCK1	Chr 3[+] 138063763-138150658 bp	-0,62011947
208800_at	SRP72	Chr 4[+] 57028547-57064604 bp	-0,62005492
216266_s_at	ARFGEF1	Chr 8[-] 68272451-68418466 bp	-0,61979827
228142_at	UCRC	Chr 22[+] 28493358-28496402 bp	-0,61938617
210087_s_at	MPZL1	Chr 1[+] 165957832-166026684 bp	-0,61933247
211599_x_at	MET	Chr 7[+] 116099695-116225676 bp	-0,61869064
226688_at	C3orf23	Chr 3[+] 44354637-44425944 bp	-0,6175594
238443_at	TFAM	Chr 10[+] 59814788-59828987 bp	-0,61723069
204781_s_at	FAS	Chr 10[+] 90739206-90765522 bp	-0,61719081
208881_x_at	IDI1	Chr 10[-] 1075848-1085110 bp	-0,61670808
244187_at	Hs.660564		-0,61655343
203359_s_at	MYCBP	Chr 1[-] 39101221-39119856 bp	-0,6157185
1554397_s_at	UEVLD	Chr 11[-] 18509820-18566828 bp	-0,61528028
212595_s_at	DAZAP2	Chr 12[+] 49918893-49923835 bp	-0,61500562
211755_s_at	ATP5F1	Chr 1[+] 111793081-111806918 bp	-0,61485585
228418_at	EXOC5	Chr 14[-] 56738947-56805370 bp	-0,61479249
1554148_a_at	SLC33A1	Chr 3[-] 157027032-157054889 bp	-0,61397707
225079_at	EMP2	Chr 16[-] 10529936-10582040 bp	-0,6134857
220199_s_at	C1orf80	Chr 1[-] 220900452-220952489 bp	-0,61288872
220199_s_at	LOC653631	Chr 1[-] 78048043-78050213 bp	-0,61288872
228636_at	BHLHB5	Chr 8[+] 65655368-65658740 bp	-0,61283962
229331_at	SPATA18	Chr 4[+] 52612350-52658215 bp	-0,61246094
224575_at	C3orf10	Chr 3[+] 10132333-10143874 bp	-0,61229376
204615_x_at	IDI1	Chr 10[-] 1075848-1085110 bp	-0,61093094
215984_s_at	ARFRP1	Chr 20[-] 61800447-61809809 bp	-0,61085813
201267_s_at	PSMC3	Chr 11[-] 47396896-47404565 bp	-0,610533
203261_at	DCTN6	Chr 8[+] 30133355-30160602 bp	-0,61039396
203165_s_at	SLC33A1	Chr 3[-] 157027032-157054889 bp	-0,61007597
210186_s_at	FKBP1A	Chr 20[-] 1297622-1321806 bp	-0,60999098
210186_s_at	FKBP1C	Chr 6[+] 63964538-63980909 bp	-0,60999098
210716_s_at	CLIP1	Chr 12[-] 121321934-121473069 bp	-0,60901597
208627_s_at	YBX1	Chr 1[+] 42920659-42940660 bp	-0,6081839
208627_s_at	YBX1P1	Chr 14[-] 65548862-65550416 bp	-0,6081839
208627_s_at		Chr 7[-] 105009953-105010935 bp	-0,6081839
210932_s_at	RNF6	Chr 13[-] 25604253-25694508 bp	-0,60803317
200712_s_at	MAPRE1	Chr 20[+] 30871395-30901872 bp	-0,60774136
202278_s_at	SPTLC1	Chr 9[-] 93833248-93917511 bp	-0,60761335
213331_s_at	NEK1	Chr 4[-] 170551004-170770308 bp	-0,60747878
217785_s_at	YKT6	Chr 7[+] 44207103-44220418 bp	-0,6073209
202873_at	ATP6V1C1	Chr 8[+] 104102445-104154461 bp	-0,60695395
206404_at	FGF9	Chr 13[+] 21143170-21176637 bp	-0,60694251
218042_at	COP54	Chr 4[+] 84175263-84215995 bp	-0,60671795
219558_at	ATP13A3	Chr 3[-] 195604692-195688677 bp	-0,6067177
224994_at	CAMK2D	Chr 4[-] 114593021-114902177 bp	-0,60653483
222712_s_at	MUC13	Chr 3[-] 126106979-126136270 bp	-0,60637975
202593_s_at	MIR16	Chr 16[-] 19420516-19440951 bp	-0,6056503
207456_at	HNF4G	Chr 8[+] 76482826-76641623 bp	-0,60549173
222525_s_at	CCDC25	Chr 8[-] 27646752-27686089 bp	-0,60525303
216064_s_at	AGA	Chr 4[-] 178588918-178600585 bp	-0,60508744
201554_x_at	GYG1	Chr 3[+] 150192024-150228109 bp	-0,60432059
229415_at	CYCS	Chr 7[-] 25124800-25131480 bp	-0,60404329
210875_s_at	ZEB1	Chr 10[+] 31647430-31858748 bp	-0,60386565
228962_at	Hs.117545		-0,60369858
223234_at	MAD2L2	Chr 1[-] 11657124-11674294 bp	-0,60330413
212166_at	XPO7	Chr 8[+] 21833128-21918930 bp	-0,60236583
214598_at	CLDN8	Chr 21[-] 30508196-30510223 bp	-0,60232342
238669_at	PTGS1	Chr 9[+] 124173050-124197802 bp	-0,6003312

210896_s_at	ASPH	Chr 8[-] 62578374-62789681 bp	-0,60018783
202604_x_at	ADAM10	Chr 15[-] 56675802-56829469 bp	-0,60011328
1568634_a_at	LOC339977	Chr 4[-] 52554621-52581234 bp	-0,59993753
202743_at	PIK3R3	Chr 1[-] 46278399-46371054 bp	-0,5999041
202899_s_at	SFRS3	Chr 6[+] 36670123-36679187 bp	-0,59987039
218078_s_at	ZDHHC3	Chr 3[-] 44941663-44992618 bp	-0,59979393
1567014_s_at	NFE2L2	Chr 2[-] 177803282-177965671 bp	-0,59902001
227307_at	TSPAN18	Chr 11[+] 44837628-44909463 bp	-0,59849883
239314_at		Chr 13[+] 38510455-38523205 bp	-0,59846227
205232_s_at	PAFAH2	Chr 1[-] 26158845-26197235 bp	-0,59835882
203333_at	KIFAP3	Chr 1[-] 168157091-168310503 bp	-0,59822088
228746_s_at	Hs.695093		-0,59768042
227231_at	KIAA1211	Chr 4	-0,59762391
209142_s_at	UBE2G1	Chr 17[-] 4119261-4216718 bp	-0,59734369
200798_x_at	MCL1	Chr 1[-] 148813658-148818760 bp	-0,59690953
212510_at	GPD1L	Chr 3[+] 32123027-32185209 bp	-0,59684942
224976_at	NFIA	Chr 1[+] 61103519-61701053 bp	-0,59631132
203086_at	KIF2A	Chr 5[+] 61637835-61718998 bp	-0,59575456
238512_at	Hs.660511		-0,59508733
1552370_at	C4orf33	Chr 4[+] 130234290-130253293 bp	-0,59467178
217725_x_at	SERBP1	Chr 1[-] 67646081-67668711 bp	-0,59417691
208666_s_at	ST13	Chr 22[-] 39550545-39582633 bp	-0,59357656
210092_at	MAGOH	Chr 1[-] 53465152-53476870 bp	-0,59343029
242332_at	LOC283904	Chr 16[-] 85078770-85100986 bp	-0,59332795
1568954_s_at	C16orf72	Chr 16[+] 9093038-9121056 bp	-0,59309532
211535_s_at	FGFR1	Chr 8[-] 38389406-38445296 bp	-0,59287327
225766_s_at	TNPO1	Chr 5[+] 72148171-72248316 bp	-0,59276829
225536_at	TMEM54	Chr 1[-] 33132781-33139590 bp	-0,5925274
209849_s_at	RAD51C	Chr 17[+] 54124962-54166691 bp	-0,59221867
202226_s_at	CRK	Chr 17[-] 1270733-1306302 bp	-0,59216707
233558_s_at	FLJ12716	Chr 4[+] 184817435-184871739 bp	-0,59203673
220773_s_at	GPHN	Chr 14[+] 66043878-66718278 bp	-0,59192833
225716_at	Hs.330495		-0,59156874
209147_s_at	PPAP2A	Chr 5[-] 54756260-54973626 bp	-0,59145153
201171_at	Hs.484188		-0,59136535
1553510_s_at	RQCD1	Chr 2[+] 219141775-219168717 bp	-0,59134433
201179_s_at	GNAI3	Chr 1[+] 109892756-109938498 bp	-0,59131625
208944_at	TGFBR2	Chr 3[+] 30622998-30710638 bp	-0,59121825
201284_s_at	APEH	Chr 3[+] 49686439-49695938 bp	-0,59118851
227610_at		Chr 12[+] 31036215-31040803 bp	-0,59088694
238561_s_at	Hs.86970		-0,59066258
203526_s_at	APC	Chr 5[+] 112101483-112209835 bp	-0,5899312
201096_s_at	ARF4	Chr 3[-] 57532130-57558175 bp	-0,58966885
205870_at	BDKRB2	Chr 14[+] 95740950-95780542 bp	-0,58926052
221082_s_at	NDRG3	Chr 20[-] 34713583-34807895 bp	-0,58782637
221679_s_at	ABHD6	Chr 3[+] 58198349-58255501 bp	-0,58762113
207620_s_at	CASK	Chr X[-] 41259131-41667660 bp	-0,58757411
210978_s_at	TAGLN2	Chr 1[-] 158108778-158162146 bp	-0,58739804
218465_at	TMEM33	Chr 4[+] 41631903-41652588 bp	-0,58704099
200722_s_at	CAPRIN1	Chr 11[+] 34029806-34080733 bp	-0,58664167
211114_x_at	SIP1	Chr 14[+] 38653239-38675928 bp	-0,58655207
204147_s_at	TFDP1	Chr 13[+] 113287056-113343789 bp	-0,5856394
213543_at	AF010236	Chr 5[+] 156125708-156127073 bp	-0,5851812
229465_s_at	Hs.644384		-0,58513378
208846_s_at	VDAC3	Chr 8[+] 42368547-42382572 bp	-0,58480102
222993_at	MRPL37	Chr 1[+] 54438428-54463725 bp	-0,5847633
211612_s_at	IL13RA1	Chr X[+] 117745563-117812530 bp	-0,58463735
222156_x_at	CCPG1	Chr 15[-] 53434730-53587724 bp	-0,5837276
217301_x_at	RBBP4	Chr 1[+] 32889336-32918845 bp	-0,58372716
217301_x_at	LOC648695	Chr 5	-0,58372716
213807_x_at	MET	Chr 7[+] 116099695-116225676 bp	-0,5836829
206075_s_at	CSNK2A1	Chr 20[-] 411338-472482 bp	-0,58357718
243141_at	SGMS2	Chr 4[+] 108965267-109051558 bp	-0,58345853
202101_s_at	RALB	Chr 2[+] 120726884-120768756 bp	-0,58330924
221194_s_at	LOC51136	Chr 17[-] 55384505-55396880 bp	-0,58327212
202488_s_at	FXYD3	Chr 19[+] 40298623-40307067 bp	-0,58293558
232432_s_at	SLC30A5	Chr 5[+] 68425574-68462648 bp	-0,5828658
1554482_a_at	SAR1B	Chr 5[-] 133969443-133996426 bp	-0,58285666
1563687_a_at	FRYL	Chr 4[-] 48314378-48350691 bp	-0,58246633
210667_s_at	C21orf33	Chr 21[+] 44377924-44390021 bp	-0,58157559
202516_s_at	DLG1	Chr 3[-] 198255819-198509844 bp	-0,58155634
222678_s_at	DCUN1D1	Chr 3[-] 184143253-184186414 bp	-0,58152003
210987_x_at	TPM1	Chr 15[+] 61121891-61151167 bp	-0,58085704
203890_s_at	DAPK3	Chr 19[-] 3909452-3922038 bp	-0,58060068

Resultats

203138_at	HAT1	Chr 2[+] 172487204-172556846 bp	-0,58029589
210337_s_at	ACLY	Chr 17[-] 37276705-37328798 bp	-0,58009148
223273_at	C14orf142	Chr 14[-] 92738990-92743192 bp	-0,57990313
201988_s_at	CREBL2	Chr 12[+] 12656098-12689308 bp	-0,57965471
214030_at		Chr 3[+] 99078327-99146500 bp	-0,57961361
210951_x_at	RAB27A	Chr 15[-] 53283084-53369293 bp	-0,57935305
1555935_s_at	HUNK	Chr 21[+] 32167499-32298248 bp	-0,57916074
1555240_s_at	GNG12	Chr 1[-] 67939737-68071738 bp	-0,57900434
204768_s_at	FEN1	Chr 11[+] 61316726-61321286 bp	-0,57815455
222559_s_at	P15RS	Chr 18[-] 31823785-31901518 bp	-0,57673679
204687_at		Chr 4[+] 76077322-76194347 bp	-0,57651876
1554696_s_at	TYMS	Chr 18[+] 647619-663492 bp	-0,57614944
225088_at	C16orf63	Chr 16[-] 15867077-15889969 bp	-0,57602905
205207_at	IL6	Chr 7[+] 22732028-22738141 bp	-0,57600751
214119_s_at	FKBP1A	Chr 20[-] 1297622-1321806 bp	-0,57563212
201529_s_at	RPA1	Chr 17[+] 1680016-1749598 bp	-0,57550368
203242_s_at	PDLIM5	Chr 4[+] 95592060-95808400 bp	-0,57535352
208351_s_at	MAPK1	Chr 22[-] 20443946-20551970 bp	-0,57443531
227605_at	Hs.592784		-0,57365993
220494_s_at		Chr 14[+] 73251587-73255246 bp	-0,57333705
217960_s_at	TOMM22	Chr 22[+] 37407900-37410711 bp	-0,57318533
225133_at	KLF3	Chr 4[+] 38342212-38379058 bp	-0,573172
223229_at	UBE2T	Chr 1[-] 200567408-200577731 bp	-0,57304659
221449_s_at	ITFG1	Chr 16[-] 45746798-46052519 bp	-0,57292319
201523_x_at	UBE2N	Chr 12[-] 92326219-92360157 bp	-0,57182152
201523_x_at	UBE2NL	Chr X[+] 142794839-142796028 bp	-0,57182152
231042_s_at	Hs.655330		-0,57145161
211885_x_at	FUT6	Chr 19[-] 5762885-5790703 bp	-0,5712511
224867_at	C1orf151	Chr 1[+] 19796054-19828901 bp	-0,5711286
211833_s_at	BAX	Chr 19[+] 54149929-54156867 bp	-0,57107655
220690_s_at	DHR57B	Chr 17[+] 20970850-21035428 bp	-0,57090136
225460_at	SEC22C	Chr 3[-] 42564476-42617576 bp	-0,57064445
221891_x_at	HSPA8	Chr 11[-] 122433410-122438054 bp	-0,5703965
221896_s_at	HIGD1A	Chr 3[-] 42800799-42820997 bp	-0,57014058
200756_x_at	CALU	Chr 7[+] 128166653-128198764 bp	-0,56998136
217889_s_at	CYBRD1	Chr 2[+] 172087229-172122885 bp	-0,56996087
1553962_s_at	RHOB	Chr 2[+] 20510316-20512687 bp	-0,56981749
217882_at	TMEM111	Chr 3[-] 9979221-10003804 bp	-0,56973367
1558254_s_at	SRPK2	Chr 7[-] 104544059-104816577 bp	-0,56921913
1553565_s_at	DDAH1	Chr 1[-] 85556756-85703415 bp	-0,56919693
225378_at	VPS37A	Chr 8[+] 17148851-17197438 bp	-0,56786095
220585_at	HKDC1	Chr 10[+] 70650065-70697321 bp	-0,56767793
206302_s_at	NUDT4P1	Chr 1[-] 143848636-143851200 bp	-0,56754916
206302_s_at	NUDT4P2	Chr 1	-0,56754916
206302_s_at	NUDT4	Chr 12[+] 92295833-92324182 bp	-0,56754916
215118_s_at	IGHA2	Chr 14[-] 105121536-105125776 bp	-0,56738559
218980_at	FHOD3	Chr 18[+] 32131678-32614016 bp	-0,5669275
212806_at	PRUNE2	Chr 9[-] 78593080-78710823 bp	-0,5664103
222645_s_at	KCTD5	Chr 16[+] 2672499-2699032 bp	-0,56639247
1552627_a_at	ARHGAP5	Chr 14[+] 31616246-31698685 bp	-0,56608666
206631_at	PTGER2	Chr 14[+] 51850863-51865074 bp	-0,56571884
211801_x_at	MFN1	Chr 3[+] 180548174-180593708 bp	-0,56546597
226416_at	THEX1	Chr 8[+] 8897764-8928139 bp	-0,56531769
1553694_a_at	PIK3C2A	Chr 11[-] 17067861-17147864 bp	-0,56521705
221428_s_at	TBL1XR1	Chr 3[-] 178221867-178397734 bp	-0,56414141
200883_at	UQCRC2	Chr 16[+] 21871482-21902174 bp	-0,56383136
207622_s_at	ABCF2	Chr 7[-] 150535856-150555250 bp	-0,56264179
1554835_a_at	B3GNT5	Chr 3[+] 184453726-184473873 bp	-0,56244512
1554390_s_at	ACTR2	Chr 2[+] 65308406-65351891 bp	-0,56174475
210732_s_at	LGALS8	Chr 1[+] 234748188-234782904 bp	-0,56159523
201942_s_at	CPD	Chr 17[+] 25730110-25819825 bp	-0,56154574
209444_at	RAP1GDS1	Chr 4[+] 99401643-99582840 bp	-0,56152927
217227_x_at	IGL@	Chr 22[+] 20710659-21595085 bp	-0,56143263
227148_at	PLEKHH2	Chr 2[+] 43717916-43848630 bp	-0,56135018
201048_x_at	RAB6A	Chr 11[-] 73064331-73149849 bp	-0,5613028
224630_at	C2orf30	Chr 2[+] 53867688-53899437 bp	-0,56112202
228813_at	Hs.20516		-0,560823
227897_at	Hs.98643		-0,56059514
223798_at	SLC41A2	Chr 12[-] 103722491-103846563 bp	-0,56015402
209463_s_at	TAF12	Chr 1[-] 28801949-28842172 bp	-0,5601129
1560916_a_at	DPY19L1	Chr 7[-] 34935018-35044178 bp	-0,55995518
211090_s_at	PRPF4B	Chr 6[+] 3966500-4010216 bp	-0,55974725
228725_x_at	PRMT2	Chr 21[+] 46879507-46909291 bp	-0,55950611
1569203_at	CXCL2	Chr 4[-] 75181620-75183874 bp	-0,55907027

217921_at	MAN1A2	Chr 1[+] 117711594-117873017 bp	-0,55902938
202300_at	HBXIP	Chr 1[-] 110745394-110752087 bp	-0,55892637
201823_s_at	RNF14	Chr 5[+] 141326621-141348938 bp	-0,55869587
204207_s_at	RNGTT	Chr 6[-] 89376704-89730034 bp	-0,5584659
211075_s_at	CD47	Chr 3[-] 109244631-109292625 bp	-0,55835829
202113_s_at	SNX2	Chr 5[+] 122138649-122193702 bp	-0,55768579
211852_s_at	ATRN	Chr 20[+] 3399676-3579765 bp	-0,55753374
209208_at	MPDU1	Chr 17[+] 7427698-7432532 bp	-0,55692871
1554433_a_at	ZNF146	Chr 19[+] 41397875-41421506 bp	-0,55660548
206141_at	MOCOS3	Chr 20[+] 49008570-49011227 bp	-0,55642315
202068_s_at	LDLR	Chr 19[+] 11061132-11105490 bp	-0,55623133
205078_at	PIGF	Chr 2[-] 46661580-46697708 bp	-0,55587513
212568_s_at	DLAT	Chr 11[+] 111401381-111439799 bp	-0,55507434
209249_s_at	GHITM	Chr 10[+] 85889176-85903291 bp	-0,55472889
221933_at	NLGN4X	Chr X[-] 5818067-6156904 bp	-0,55453691
223386_at	FAM118B	Chr 11[+] 125586894-125637751 bp	-0,55430714
211963_s_at	ARPC5	Chr 1[-] 181859024-181871608 bp	-0,55417827
206668_s_at	SCAMP1	Chr 5[+] 77692110-77810636 bp	-0,55414698
220442_at	GALNT4	Chr 12[-] 88437320-88442666 bp	-0,5540153
226089_at	RABL3	Chr 3[-] 121888764-121944074 bp	-0,55386394
226089_at	LOC653256		-0,55386394
200983_x_at	CD59	Chr 11[-] 33681132-33714600 bp	-0,55385413
221620_s_at	APOO	Chr X[-] 23761391-23835972 bp	-0,55380414
223785_at	FANCI	Chr 15[+] 87588198-87661366 bp	-0,55377014
202000_at	NDUFA6	Chr 22[-] 40811476-40816834 bp	-0,55319283
200889_s_at	SSR1	Chr 6[-] 7232802-7258434 bp	-0,55268572
212041_at	ATP6V0D1	Chr 16[-] 66029418-66072590 bp	-0,55242554
217927_at	SPCS1	Chr 3[+] 52714897-52717249 bp	-0,55202351
200658_s_at	PHB	Chr 17[-] 44836419-44847241 bp	-0,5517558
219600_s_at	TMEM50B	Chr 21[-] 33743312-33774155 bp	-0,55158716
212573_at	ENDOD1	Chr 11[+] 94462622-94505463 bp	-0,5510965
227193_at	BCO42520	Chr 15[-] 43559109-43560955 bp	-0,55076706
211016_x_at	HSPA4	Chr 5[+] 132415561-132468608 bp	-0,55023798
225262_at	FOSL2	Chr 2[+] 28469173-28493683 bp	-0,54982644
227782_at	ZBTB7C	Chr 18[-] 43807731-43821492 bp	-0,54966469
227022_at	GNPDA2	Chr 4[-] 44398913-44423369 bp	-0,54912695
221531_at	WDR61	Chr 15[-] 76362632-76378995 bp	-0,54890629
218884_s_at	GUF1	Chr 4[+] 44375203-44397700 bp	-0,54872574
1555639_a_at	RBM14	Chr 11[+] 66140673-66153961 bp	-0,54836434
210609_s_at	TP53I3	Chr 2[-] 24153807-24161589 bp	-0,54789723
1554740_a_at	IPP	Chr 1[-] 45932583-45988909 bp	-0,54789135
218129_s_at	NFYB	Chr 12[-] 103034988-103056170 bp	-0,54751217
201659_s_at	ARL1	Chr 12[-] 100311045-100325703 bp	-0,54711376
215891_s_at	GM2A	Chr 5[+] 150612837-150629000 bp	-0,54667092
242317_at	Hs.192124		-0,54665024
1555594_a_at	MBNL1	Chr 3[+] 153468519-153666259 bp	-0,5465722
200984_s_at	CD59	Chr 11[-] 33681132-33714600 bp	-0,54656778
217890_s_at	PARVA	Chr 11[+] 12355679-12508921 bp	-0,5465281
222474_s_at	TOMM22	Chr 22[+] 37407900-37410711 bp	-0,54597952
218027_at	MRPL15	Chr 8[+] 55210334-55223014 bp	-0,54596822
1554159_a_at	ZMYND11	Chr 10[+] 170643-290577 bp	-0,54541166
211776_s_at	EPB41L3	Chr 18[-] 5382388-5534280 bp	-0,5449579
222703_s_at	YRDC	Chr 1[-] 38041201-38046452 bp	-0,54492252
204832_s_at	BMPR1A	Chr 10[+] 88506376-88674925 bp	-0,54461154
204832_s_at	LOC283155	Chr 11[-] 120736263-120742575 bp	-0,54461154
204832_s_at	LOC643778	Chr 6[-] 129519362-129522190 bp	-0,54461154
203142_s_at	AP3B1	Chr 5[-] 77332105-77626286 bp	-0,54447935
208967_s_at	AK2	Chr 1[-] 33246173-33275180 bp	-0,54410021
215533_s_at	UBE4B	Chr 1[+] 10015630-10163884 bp	-0,54393063
209362_at	SURB7	Chr 12[+] 27066746-27073949 bp	-0,54256062
218534_s_at	AGGF1	Chr 5[+] 76361987-76396815 bp	-0,54253741
218209_s_at	P15RS	Chr 18[-] 31823785-31901518 bp	-0,54206575
201473_at	JUNB	Chr 19[+] 12763286-12765129 bp	-0,54186694
227246_at	PLRG1	Chr 4[-] 155675629-155690998 bp	-0,54145987
238816_at	AKO94186	Chr 14[+] 72756873-72760151 bp	-0,5413558
202164_s_at	CNOT8	Chr 5[+] 154218299-154236545 bp	-0,54125538
218832_x_at	ARRB1	Chr 11[-] 74654130-74740521 bp	-0,54093858
219321_at	MPP5	Chr 14[+] 66777774-66872289 bp	-0,54089815
221952_x_at	TRMT5	Chr 14[-] 60507922-60517528 bp	-0,54052859
231319_x_at	KIF9	Chr 3[-] 47244889-47299092 bp	-0,54036015
219931_s_at	KLHL12	Chr 1[-] 201126851-201164387 bp	-0,54031014
219931_s_at	LOC643102	Chr 22[+] 19133880-19137534 bp	-0,54031014
206473_at	MBTPS2	Chr X[+] 21767675-21813463 bp	-0,54021306
209778_at	TRIP11	Chr 14[-] 91505614-91576139 bp	-0,53977595

Resultats

218036_x_at	NMD3	Chr 3[+]	162421793-162452489 bp	-0,53958307
217465_at	Hs.603732			-0,53924577
216942_s_at	CD58	Chr 1[-]	116858680-116915184 bp	-0,53923489
235260_s_at	C4orf28	Chr 4[+]	20307003-20363628 bp	-0,53908973
236045_x_at	BC037919			-0,53903507
204344_s_at	SEC23A	Chr 14[-]	38570874-38642190 bp	-0,53890823
204591_at	CHL1	Chr 3[+]	213650-426098 bp	-0,53889657
222531_s_at	C14orf108	Chr 14[+]	56805380-56826545 bp	-0,53884642
233292_s_at	ANKHD1	Chr 5[+]	139761613-139909347 bp	-0,5383078
233292_s_at	MASK-BP3	Chr 5[+]	139761613-139909347 bp	-0,5383078
203641_s_at	COBLL1	Chr 2[-]	165249502-165406176 bp	-0,53775471
1554489_a_at	CEP70	Chr 3[-]	139695876-139795819 bp	-0,53774007
1554930_a_at	FUT8	Chr 14[+]	64947063-65279715 bp	-0,53756891
207319_s_at	CDC2L5	Chr 7[+]	39956634-40101679 bp	-0,5370574
243349_at	KIAA1324	Chr 1[+]	109458056-109551120 bp	-0,53699772
200615_s_at	AP2B1	Chr 17[+]	30938395-31077549 bp	-0,53697324
225366_at	PGM2	Chr 4[+]	37504723-37540953 bp	-0,53695518
222597_at	SNAP29	Chr 22[+]	19543292-19574109 bp	-0,53689752
211908_x_at	SIX6	Chr 14[+]	60045622-60048282 bp	-0,53592053
211908_x_at	IGHM	Chr 14[-]	105389082-105393367 bp	-0,53592053
211908_x_at	EXOC7	Chr 17[-]	71588682-71611451 bp	-0,53592053
202695_s_at	STK17A	Chr 7[+]	43589251-43632247 bp	-0,53543268
204566_at	PPM1D	Chr 17[+]	56032336-56096818 bp	-0,53535529
219679_s_at	WAC	Chr 10[+]	28861428-28949934 bp	-0,53504916
201211_s_at	DDX3C	Chr X[+]	41077595-41094471 bp	-0,53482899
229119_s_at	ZSWIM7	Chr 17		-0,53372425
222442_s_at	ARL8B	Chr 3[+]	5138665-5197701 bp	-0,5333593
225119_at	CHMP4B	Chr 20[+]	31862780-31905831 bp	-0,53255953
204186_s_at	PPID	Chr 4[-]	159849729-159864002 bp	-0,53204389
225591_at	FBXO25	Chr 8[+]	346808-409890 bp	-0,53184271
204351_at	S100P	Chr 4[+]	6745697-6749798 bp	-0,53150737
228834_at	TOB1	Chr 17[-]	46294583-46296412 bp	-0,53132786
226510_at	Hs.370299			-0,53114034
201239_s_at	LOC653566	Chr 1[-]	28294137-28299495 bp	-0,53087856
201239_s_at	SPCS2	Chr 11[+]	74337978-74367437 bp	-0,53087856
203294_s_at	LMAN1	Chr 18[-]	55148088-55177463 bp	-0,53020965
206288_at	PGGT1B	Chr 5[-]	114575476-114626449 bp	-0,53017817
224377_s_at	RAB18	Chr 10[+]	27833203-27869105 bp	-0,53009348
210959_s_at	SRD5A1	Chr 5[+]	6686456-6722675 bp	-0,53007312
211804_s_at	CDK2	Chr 12[+]	54646826-54652835 bp	-0,52975561
231580_at	LOC729464	Chr 16[+]	84786700-84790827 bp	-0,5296863
229994_at	R45950			-0,52935754
1554868_s_at	PCNP	Chr 3[+]	102775730-102795971 bp	-0,5290134
209149_s_at	TM9SF1	Chr 14[-]	23728193-23734722 bp	-0,5289776
208769_at	E1F4EBP2	Chr 10[+]	71833928-71858380 bp	-0,52841606
200620_at	TMEM59	Chr 1[-]	54269935-54291765 bp	-0,5282699
210653_s_at	BCKDHB	Chr 6[+]	80873083-81112706 bp	-0,52799392
1552312_a_at	MFAP3	Chr 5[+]	153398752-153414786 bp	-0,52768703
242172_at	Hs.526754			-0,52734804
225125_at	TMEM32	Chr X[-]	134871897-134883800 bp	-0,52718175
202058_s_at	KPNA1	Chr 3[-]	123623438-123716474 bp	-0,5267292
210534_s_at	EPPB9	Chr 17[-]	19187081-19211551 bp	-0,52655629
223585_x_at	KBTBD2	Chr 7[-]	32874309-32897897 bp	-0,52651235
209514_s_at	RAB27A	Chr 15[-]	53283084-53369293 bp	-0,52620481
228222_at	Hs.591571			-0,52576705
226060_at	RFT1	Chr 3[-]	53099850-53139503 bp	-0,52575777
217239_x_at	IGHV3-47	Chr 14[-]	106045551-106046006 bp	-0,52521508
222101_s_at	DCHS1	Chr 11[-]	6599134-6633656 bp	-0,525186
226661_at	CDCA2	Chr 8[+]	25372428-25421353 bp	-0,52513517
200813_s_at	PAFAH1B1	Chr 17[+]	2443686-2535638 bp	-0,52487533
220937_s_at	ST6GALNAC4	Chr 9[-]	129709986-129719126 bp	-0,52483972
208653_s_at	CD164	Chr 6[-]	109794412-109810353 bp	-0,52471034
234111_at	AK026716	Chr X[+]	47668061-47669966 bp	-0,52437465
209080_x_at	TXNL2	Chr 10[+]	131824653-131872775 bp	-0,52404987
200776_s_at	LOC151579	Chr 3[-]	117845406-117853028 bp	-0,52393066
200776_s_at	BZW1	Chr 2[+]	201384558-201396811 bp	-0,52393066
235134_at	AK054718	Chr 11[-]	75831569-75833372 bp	-0,52375014
235134_at	BC007851			-0,52375014
219819_s_at	MRPS28	Chr 8[-]	80993650-81105061 bp	-0,5234734
1555829_at	FAM62B	Chr 7[-]	158216450-158315080 bp	-0,52340728
202429_s_at	PPP3CA	Chr 4[-]	102163610-102487376 bp	-0,5227744
220183_s_at	NUDT6	Chr 4[-]	124033249-124063573 bp	-0,52273458
224819_at	TCEAL8	Chr X[-]	102394579-102396787 bp	-0,52235853
202741_at	PRKACB	Chr 1[+]	84316329-84476769 bp	-0,52220177

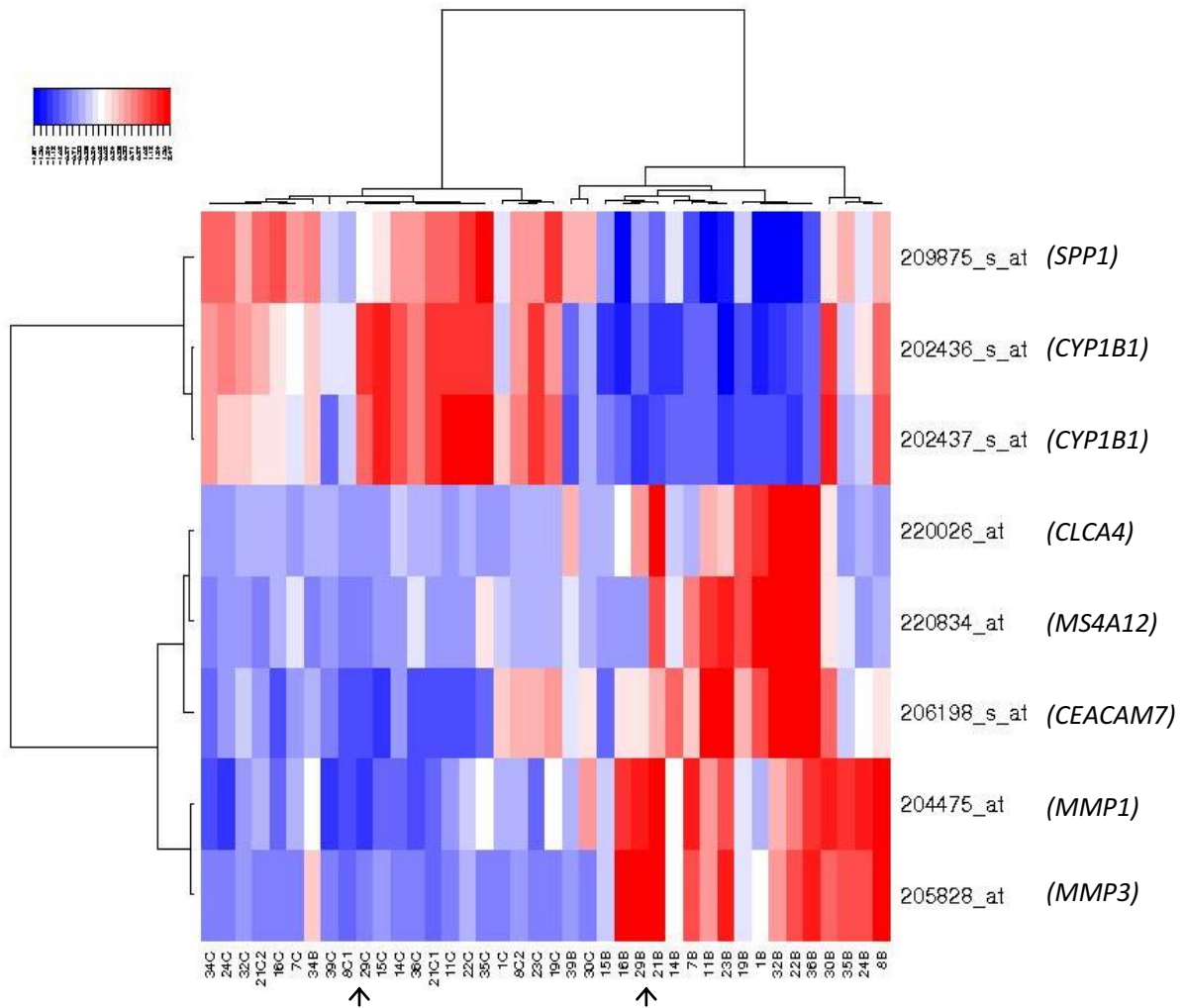
201274_at	PSMA5	Chr 1[-] 109745995-109770589 bp	-0,52161838
217818_s_at	ARPC4	Chr 3[+] 9748429-9852999 bp	-0,52115847
225114_at	AGPS	Chr 2[+] 177965731-178112411 bp	-0,52088135
208853_s_at	CANX	Chr 5[+] 179058536-179091248 bp	-0,52019596
223320_s_at	ABCB10	Chr 1[-] 227718952-227761065 bp	-0,52013703
209624_s_at	MCCC2	Chr 5[+] 70918910-70988981 bp	-0,51996849
212008_at	UBXD2	Chr 2[+] 136215808-136259096 bp	-0,51991864
205309_at	SMPDL3B	Chr 1[+] 28134091-28158255 bp	-0,51990156
220285_at	FAM108B1	Chr 9[-] 73667188-73715968 bp	-0,51979317
202790_at	CLDN7	Chr 17[-] 7103390-7107236 bp	-0,51955273
1555996_s_at	EIF4A2	Chr 3[+] 187984055-187990380 bp	-0,51945934
205190_at	PLS1	Chr 3[+] 143825034-143915191 bp	-0,51924001
204341_at	TRIM16	Chr 17[-] 15418138-15526918 bp	-0,51916457
204341_at	TRIM16L	Chr 17[+] 18542053-18580156 bp	-0,51916457
204119_s_at	ADK	Chr 10[+] 75580971-76139067 bp	-0,51911528
211797_s_at	NFYC	Chr 1[+] 40929829-41009864 bp	-0,51810707
1553132_a_at	MTAC2D1	Chr 14[-] 91316279-91403610 bp	-0,51803532
1555270_a_at	WFS1	Chr 4[+] 6322478-6355893 bp	-0,51781819
219927_at	FCF1	Chr 14[+] 74249603-74273147 bp	-0,51767867
1554691_a_at	PACSIN2	Chr 22[-] 41595721-41741095 bp	-0,51751101
203356_at	CAPN7	Chr 3[+] 15222737-15269427 bp	-0,5173513
228019_s_at	MRPS18C	Chr 4[+] 84596196-84601900 bp	-0,51708623
1554574_a_at	CYB5R3	Chr 22[-] 41344763-41375349 bp	-0,51682795
219161_s_at	CKLF	Chr 16[+] 65143967-65170463 bp	-0,51677949
206303_s_at	NUDT4P1	Chr 1[-] 143848636-143851200 bp	-0,5161941
206303_s_at	NUDT4P2	Chr 1	-0,5161941
206303_s_at	NUDT4	Chr 12[+] 92295833-92324182 bp	-0,5161941
201180_s_at	GNAI3	Chr 1[+] 109892756-109938498 bp	-0,51581217
202209_at	LSM3	Chr 3[+] 14195337-14214858 bp	-0,51551628
204312_x_at	CREB1	Chr 2[+] 208102931-208171818 bp	-0,51490569
1552264_a_at	MAPK1	Chr 22[-] 20443946-20551970 bp	-0,51466072
229500_at	Hs.479634		-0,51463492
213115_at	ATG4A	Chr X[+] 107221554-107284557 bp	-0,51457543
228013_at	Hs.652855		-0,51417837
218850_s_at	LIMD1	Chr 3[+] 45611355-45696569 bp	-0,51412081
1553587_a_at	POLE4	Chr 2[+] 75039283-75050367 bp	-0,51394701
211205_x_at	PIPSK1A	Chr 1[+] 149437651-149488636 bp	-0,51383786
210964_s_at	GYG2	Chr X[+] 2756863-2810859 bp	-0,51379712
203525_s_at	APC	Chr 5[+] 112101483-112209835 bp	-0,51284274
202561_at	TNKS	Chr 8[+] 9450832-9677266 bp	-0,51268497
213895_at	Hs.436298		-0,51264015
206468_s_at	KIAA0859	Chr 1[+] 170017384-170033480 bp	-0,51247799
218119_at	TIMM23B	Chr 10[+] 51041396-51064926 bp	-0,51236011
218119_at	TIMM23	Chr 10[-] 51262094-51293396 bp	-0,51236011
233750_s_at	C1orf25	Chr 1[-] 183353853-183392736 bp	-0,51226759
203869_at	USP46	Chr 4[-] 53155957-53220197 bp	-0,51183785
210802_s_at	DIMT1L	Chr 5[-] 61720108-61735485 bp	-0,51157881
225600_at		Chr 8[-] 93966740-94099077 bp	-0,51143585
226770_at	MAGI3	Chr 1[+] 113734894-114030068 bp	-0,51113038
204032_at	BCAR3	Chr 1[-] 93799935-94085294 bp	-0,51111862
36830_at	MIPEP	Chr 13[-] 23202328-23361558 bp	-0,5109938
226794_at	STXBP5	Chr 6[+] 147566565-147748588 bp	-0,51093661
34764_at	LARS2	Chr 3[+] 45405072-45565332 bp	-0,51077817
217771_at	GOLPH2	Chr 9[-] 87830876-87904903 bp	-0,51057027
206233_at	B4GALT6	Chr 18[-] 27457131-27518684 bp	-0,51027701
223451_s_at	CKLF	Chr 16[+] 65143967-65170463 bp	-0,50942503
223692_at	NMNAT1	Chr 1[+] 9926073-9968143 bp	-0,50890889
216542_x_at	IGHV3-20	Chr 14[-] 105738624-105739078 bp	-0,50877204
208055_s_at	HERC4	Chr 10[-] 69351671-69505046 bp	-0,5087666
203158_s_at	GLS	Chr 2[+] 191453841-191538517 bp	-0,50863503
217496_s_at	IDE	Chr 10[-] 94201421-94323813 bp	-0,50819828
200793_s_at	ACO2	Chr 22[+] 40195075-40254939 bp	-0,50802674
200790_at	ODC1	Chr 2[-] 10497545-10506081 bp	-0,50801124
219383_at	FLJ14213	Chr 11[+] 36274414-36443330 bp	-0,50723709
208852_s_at	CANX	Chr 5[+] 179058536-179091248 bp	-0,50720283
235472_at	FUT10	Chr 8[-] 33347884-33450206 bp	-0,5069298
202541_at	SCYE1	Chr 4[+] 107456302-107489097 bp	-0,50680705
205782_at	FGF7	Chr 15[+] 47502751-47566815 bp	-0,50678188
214764_at	RRP15	Chr 1[+] 216525252-216577948 bp	-0,50618754
1552737_s_at	WWP2	Chr 16[+] 68353749-68533144 bp	-0,50602798
205842_s_at	JAK2	Chr 9[+] 4975245-5118183 bp	-0,50523116
215905_s_at	WDR57	Chr 1[-] 31505004-31542204 bp	-0,5050665
222555_s_at	MRPL44	Chr 2[+] 224530378-224540668 bp	-0,50496424
230265_at	Hs.181300		-0,50485276

Resultats

200668_s_at	UBE2D3	Chr 4[-] 103936217-104009473 bp	-0,50473964
200668_s_at		Chr 20[-] 5219751-5221593 bp	-0,50473964
227717_at	FLJ41603	Chr 5[+] 148941328-148994720 bp	-0,50445903
1554806_a_at	FBXO8	Chr 4[-] 175394384-175441977 bp	-0,50430035
1554441_a_at	WAPAL	Chr 10[-] 88184993-88271552 bp	-0,50375227
216602_s_at	FARSA	Chr 19[-] 12894293-12905529 bp	-0,50351256
231819_at	BC051746	Chr 2[+] 37280348-37285388 bp	-0,5035033
226814_at	ADAMTS9	Chr 3[-] 64476370-64648405 bp	-0,50289191
202374_s_at	RAB3GAP2	Chr 1[-] 218388258-218512419 bp	-0,50288183
236123_at	WNT2B	Chr 1[+] 112810686-112866811 bp	-0,50275214
203511_s_at	TRAPPC3	Chr 1[-] 36374760-36387685 bp	-0,50260205
225875_s_at	NPAL3	Chr 1[+] 24614880-24672053 bp	-0,50232079
202939_at	ZMPSTE24	Chr 1[+] 40496366-40532443 bp	-0,50216517
226524_at	C3orf38	Chr 3[+] 88281583-88289801 bp	-0,50199128
217173_s_at	LDLR	Chr 19[+] 11061132-11105490 bp	-0,50170831
1554774_at	MINA	Chr 3[-] 99145885-99173621 bp	-0,50125351
222432_s_at	CCDC47	Chr 17[-] 59176342-59204668 bp	-0,50037435
201504_s_at	TSN	Chr 2[+] 122229591-122241899 bp	-0,50018161
226562_at	ZSCAN29	Chr 15[-] 41440508-41449538 bp	0,50661923
204771_s_at	TTF1	Chr 9[-] 134240756-134272042 bp	0,50773298
232363_at	AKO24516	Chr 9[+] 15456899-15458116 bp	0,50838164
215135_at	DNPEP	Chr 2[-] 219946512-219961842 bp	0,51038452
203468_at	CDK10	Chr 16[+] 88280579-88290263 bp	0,51389086
202935_s_at	SOX9	Chr 17[+] 67628756-67634156 bp	0,52098431
237881_at	Hs.653522		0,52348465
223802_s_at	RBBP6	Chr 16[+] 24458409-24606684 bp	0,52685655
213672_at	MARS	Chr 12[+] 56167344-56196700 bp	0,53452022
210103_s_at	FOXA2	Chr 20[-] 22509643-22514102 bp	0,53652391
225703_at	KIAA1545	Chr 12[+] 131577230-131671848 bp	0,53767876
204729_s_at	STX1A	Chr 7[-] 72751476-72771924 bp	0,5380141
40284_at	FOXA2	Chr 20[-] 22509643-22514102 bp	0,53908904
223134_at	Hs.124366		0,53952404
214790_at	SENP6	Chr 6[+] 76367945-76483649 bp	0,54209021
224979_s_at	USP36	Chr 17[-] 74295065-74348482 bp	0,55003532
1553703_at	ZNF791	Chr 19[+] 12582753-12601676 bp	0,55533374
226340_x_at	CXYorf1	Chr X[+] 154903161-154908521 bp	0,55622797
226340_x_at	FAM39B	Chr 2[+] 114058161-114073128 bp	0,55622797
226340_x_at	FLJ00038	Chr Y[+] 57764816-57767433 bp	0,55622797
226340_x_at	LOC376475	Chr X[+] 154903159-154911968 bp	0,55622797
226340_x_at		Chr 15[+] 100319118-100334282 bp	0,55622797
226340_x_at	FAM39DP	Chr 15[+] 100318539-100334331 bp	0,55622797
226340_x_at	LOC653635	Chr 1[-] 815-19836 bp	0,55622797
214457_at	HOXA2	Chr 7[-] 27106498-27108919 bp	0,56020238
1553704_x_at	ZNF791	Chr 19[+] 12582753-12601676 bp	0,56204659
215978_x_at	Hs.428360		0,56704808
218874_s_at	C6orf134	Chr 6[+] 30702600-30722582 bp	0,56871368
1554945_x_at	VIL1	Chr 2[+] 218992089-219022491 bp	0,57143045
219477_s_at	THSD1P	Chr 13[-] 51639848-51763681 bp	0,57552907
219477_s_at	THSD1	Chr 13[-] 51833080-51878630 bp	0,57552907
205180_s_at	ADAM8	Chr 10[-] 134925898-134940362 bp	0,58046825
233929_x_at	CXYorf1	Chr X[+] 154903161-154908521 bp	0,58078488
233929_x_at	FAM39B	Chr 2[+] 114058161-114073128 bp	0,58078488
233929_x_at	LOC376475	Chr X[+] 154903159-154911968 bp	0,58078488
233929_x_at	LOC653635	Chr 1[-] 815-19836 bp	0,58078488
233929_x_at	FAM39DP	Chr 15[+] 100318539-100334331 bp	0,58078488
233929_x_at	FLJ00038	Chr Y[+] 57764816-57767433 bp	0,58078488
233929_x_at		Chr 15[+] 100319118-100334282 bp	0,58078488
242361_at	Hs.148559		0,58089549
225035_x_at	CXYorf1	Chr X[+] 154903161-154908521 bp	0,58598432
225035_x_at	FAM39B	Chr 2[+] 114058161-114073128 bp	0,58598432
225035_x_at	LOC376475	Chr X[+] 154903159-154911968 bp	0,58598432
225035_x_at	LOC653635	Chr 1[-] 815-19836 bp	0,58598432
225035_x_at	FAM39DP	Chr 15[+] 100318539-100334331 bp	0,58598432
225035_x_at	FLJ00038	Chr Y[+] 57764816-57767433 bp	0,58598432
225035_x_at		Chr 15[+] 100319118-100334282 bp	0,58598432
1568834_s_at	CCDC90B	Chr 11[-] 82650150-82675045 bp	0,59013617
1555476_at	IREB2	Chr 15[+] 76517639-76579935 bp	0,591215
1568983_a_at	BC035091	Chr 15[+] 48443289-48447771 bp	0,59504421
1553099_at	TIGD1	Chr 2[-] 233121023-233123470 bp	0,5986719
238738_at	Hs.440604		0,59915637
226176_s_at	USP42	Chr 7[+] 6111102-6167720 bp	0,60172624
222796_at	PTCD1	Chr 7[-] 98852298-98874355 bp	0,61743374
238920_at	Hs.669067		0,62772728
212921_at	SMYD2	Chr 1[+] 212521091-212577097 bp	0,62935745

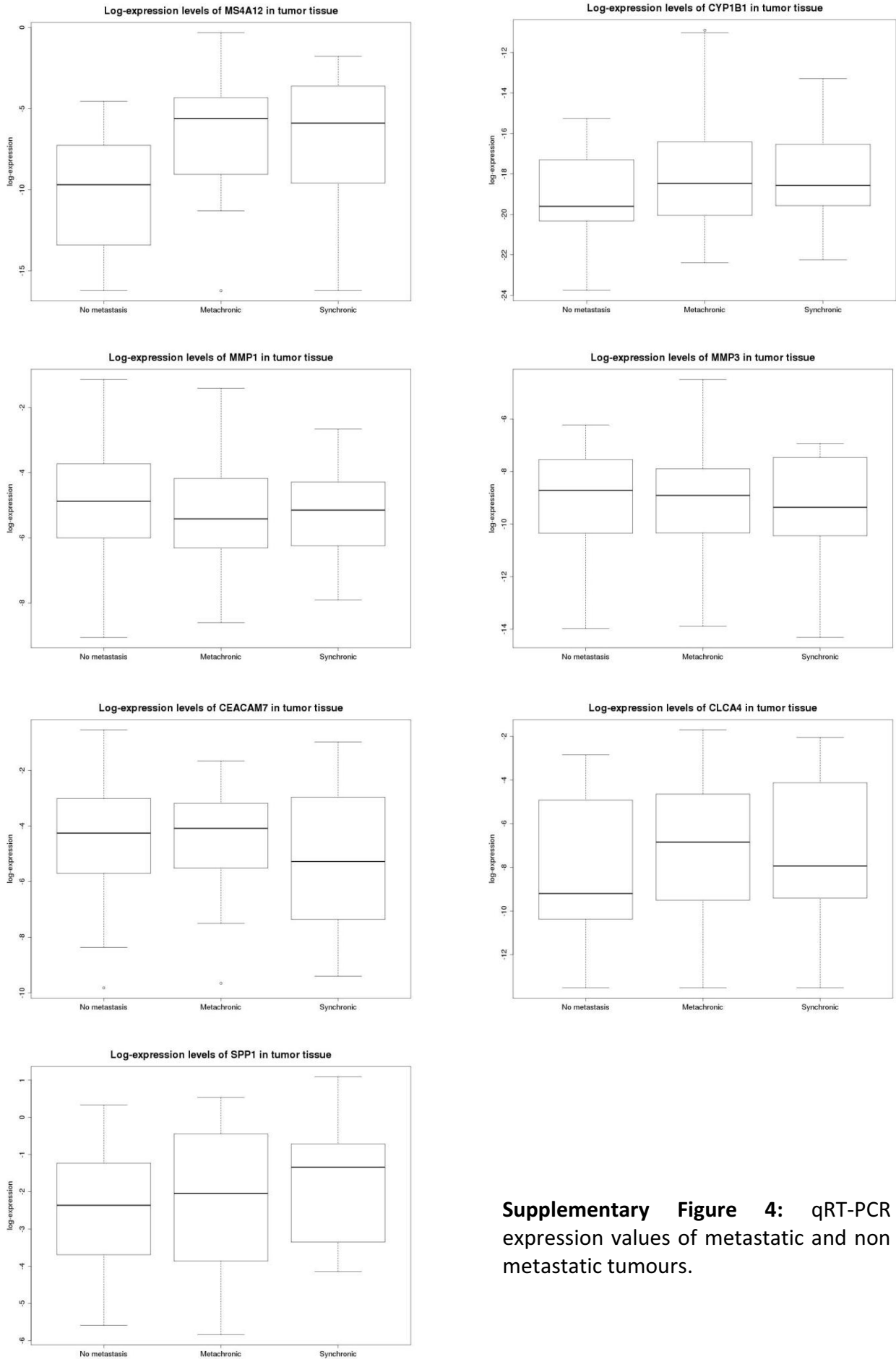
242738_s_at	ATBF1	Chr 16[-] 71378456-71639775 bp	0,63333536
210512_s_at	VEGFA	Chr 6[+] 43845924-43862202 bp	0,63436628
230588_s_at	LOC285074	Chr 2[-] 87111309-87156803 bp	0,63480248
223251_s_at	ANKRD10	Chr 13[-] 110328888-110365417 bp	0,63567136
243249_at	AL040360		0,63738144
204455_at	DST	Chr 6[-] 56430744-56927363 bp	0,64239371
1554943_at	VIL1	Chr 2[+] 218992089-219022491 bp	0,64656459
238295_at	Hs.317340		0,64855536
235112_at	Hs.660744		0,65292276
227368_at	Hs.663281		0,65479731
211732_x_at	HNMT	Chr 2[+] 138438278-138490404 bp	0,65575503
238892_at	AA703159		0,65600023
242498_x_at	AW771618		0,6681537
236607_at	Hs.665157		0,67497923
229274_at	Hs.125898		0,67628752
218847_at	IGF2BP2	Chr 3[-] 186844221-187025521 bp	0,68285057
231838_at	C20orf119	Chr 20[+] 42972117-43021090 bp	0,6867064
227384_s_at	LOC727820	Chr 1[-] 142529482-142537641 bp	0,68677534
215470_at		Chr 5[+] 69746935-69779641 bp	0,68847662
224835_at		Chr 20[-] 5473085-5539672 bp	0,69048379
232583_at	AK021497	Chr 2[+] 105751197-105753013 bp	0,69057694
242665_at	FMNL2	Chr 2[+] 152899997-153214594 bp	0,70114525
242111_at	Hs.168799		0,70485628
201294_s_at	WSB1	Chr 17[+] 22645233-22664772 bp	0,71947084
1556656_at	AF147343	Chr 2[+] 153150177-153150680 bp	0,72196904
210409_at	C6orf124	Chr 6[-] 167967405-167970286 bp	0,72813643
230060_at	CDCA7	Chr 2[+] 173927794-173941965 bp	0,73506747
212913_at	C6orf26	Chr 6[+] 31838752-31840606 bp	0,73915767
212913_at	MSH5	Chr 6[+] 31815720-31840604 bp	0,73915767
214833_at	TMEM63A	Chr 1[-] 224099860-224136692 bp	0,74777977
1555259_at	ZAK	Chr 2[+] 173648811-173840986 bp	0,75612828
1561155_at	AF086342	Chr 15[-] 41717797-41718240 bp	0,77605344
241036_at	AA215451		0,77792347
1559739_at	CHPT1	Chr 12[+] 100615548-100646977 bp	0,82802188
222366_at	Hs.660247		0,84107407
213668_s_at	SOX4	Chr 6[+] 21700979-21706829 bp	0,85868972
241797_at	AI904095		0,87493371
1563130_a_at	Hs.661154		0,88864794
232796_at	AK021556	Chr 9[-] 100589491-100591152 bp	0,90444981
1553613_s_at	FOXC1	Chr 6[+] 1555206-1559131 bp	1,06757063
201666_at	TIMP1	Chr X[+] 47326634-47331134 bp	1,14631796
229479_at	Hs.152812		1,2153021
213418_at	HSPA6	Chr 1[+] 159760392-159763324 bp	1,40778466
213418_at	HSPA7	Chr 1	1,40778466
1554195_a_at	MGC23985	Chr 5[-] 147252464-147266258 bp	1,41383771
235229_at	AI694413		1,42310016
202435_s_at	CYP1B1	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp	1,60611104
202437_s_at	CYP1B1	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp	2,18444871
202436_s_at	CYP1B1 *	Chr 2[-] 38148154-38156796 bp	2,37617648
209875_s_at	SPP1 *	Chr 4[+] 89115826-89123592 bp	2,65213859

* 7 gene signature able to classify colorectal primary tumours and liver metastasis.
In grey, the 21 genes used for microarray validation.

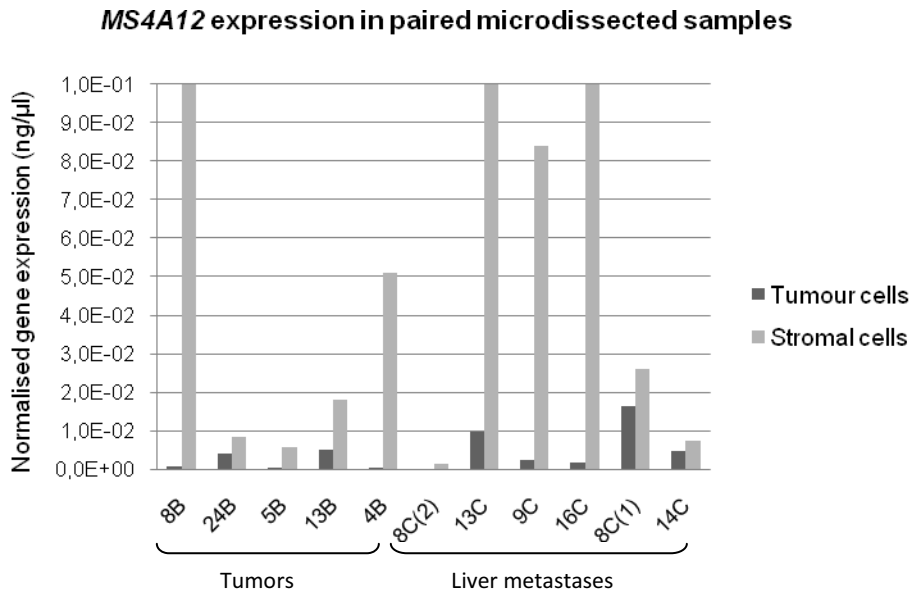


Supplementary Figure 3: Heatmap for the 8 probes included in the final metastatic signature

B and C are primary colorectal tumours and liver metastases, respectively. Clustering method is able to classify correctly all the samples except two (34B and 30C) marked with arrows.

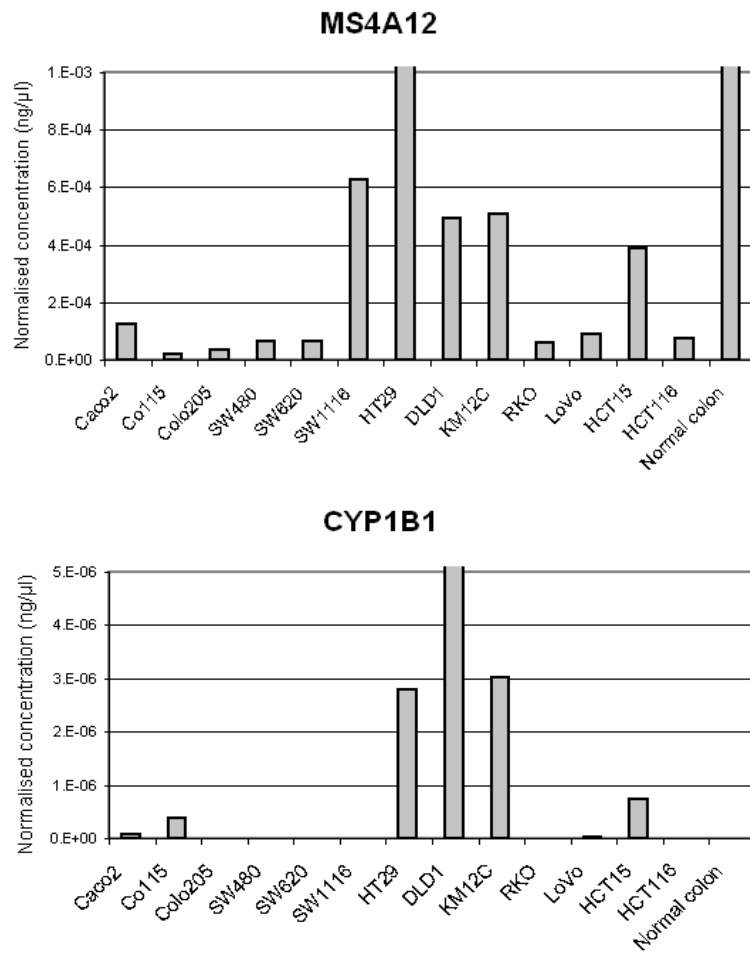


Supplementary Figure 4: qRT-PCR expression values of metastatic and non metastatic tumours.

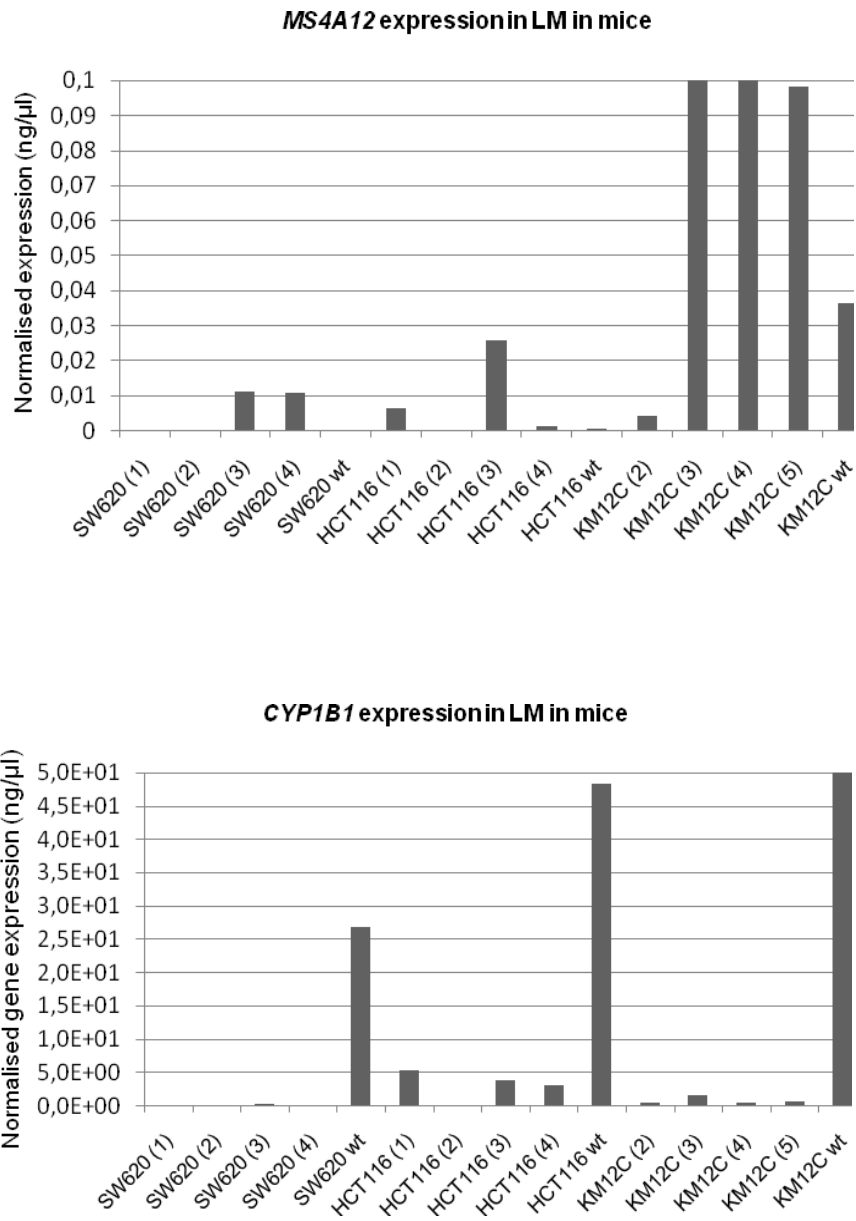


Supplementary Figure 5: Paired laser microdissected samples

MS4A12 and *CYP1B1* gene expression is higher in stromal component for all the samples. B: primary tumor; C: liver metastasis



Supplementary Figure 6: Normalised *MS4A12* and *CYP1B1* gene expression for the thirteen colorectal cancer cell lines



Supplementary Figure 7: Comparative analysis between wild-type cell lines and respective LMs grown in mice

After intrasplenic injection in mice, 3 of the 13 tested colorectal cell lines (SW620, HCT116 and KM12C) developed liver metastases (LMs). Four grown LMs in athymic mice from each cell line have been analysed.

ARTICLE 2***ALU ELEMENTS' METHYLATION ANALYSIS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER***

Laura Padullés, María Martínez-Iniesta, David G. Molleví, Álvaro Aytés, Antoni Berenguer, Javier Carmona, Manel Esteller, Víctor Moreno, Miquel A. Peinado, Gabriel Capellà, Alberto Villanueva

Resum del treball:

L'objectiu d'aquest treball és la identificació d'alteracions en la metilació de l'ADN específiques de metàstasi hepàtica (MH) en càncer colorectal (CCR) que ajudin en el coneixement i la comprensió del procés de disseminació a distància.

S'ha utilitzat dues metodologies diferents per dur a terme aquest objectiu: l'AUMA (Amplification of Unmethylated Alu) i l'*array* de metilació GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, Inc.). En cap cas s'ha trobat diferències de metilació entre tumors primaris i MHs aparellades indicant que els canvis epigenètics succeeixen en estadis inicials de la tumorigènesis.

Tot i això, s'ha validat mitjançant seqüenciació per bisulfit i corbes de *melting*, dues bandes d'AUMA amb canvis de metilació recurrents (28 i 33% dels casos) entre mucosa normal de còlon i tumor primari anomenades banda B (19q13.32) que es troba dins el gen *TMEM143* i banda C (16p13.3) que coincideix amb l'illa CpG63.

Per tal de delimitar l'àrea afectada per aquests canvis de metilació s'ha fet seqüenciació per bisulfit de les illes CpG veïnes a les bandes B i C conclouent que es tracta d'alteracions poc extenses dins el genoma.

L'anàlisi transcripcional dels gens propers a partir de l'*array* d'expressió Affy HGU 133 plus 2.0 (Affymetrix) ens ha permès afirmar que no existeix significació estadística respecte la regulació de l'expressió gènica per metilació de l'ADN dins una regió de fins a 2Mb lluny de les bandes d'AUMA B i C.

Tot i la manca de significació estadística, la línia cel·lular HCT116 prèviament tractada amb AZA (agent desmetilant de l'ADN) i TSA (acetilador d'histones) ha servit per analitzar una possible correlació entre la metilació de les bandes B/C i

l'expressió gènica de gens propers (els sobreexpressats en el grup de tumors no metilats). La majoria de gens analitzats mostren nivells transcripcionals més alts en la línia tractada en comparació amb la *wild-type*. De totes maneres, no podem dir que aquests canvis d'expressió estiguin directament relacionats amb les diferències de metilació a les bandes B i C.

Podem concloure que tot i no haver trobat canvis de metilació específics de MH, la metodologia d'AUMA pot ser de gran utilitat per identificar diferències de metilació a les seqüències Alu, fet que pot ser indicatiu de possibles alteracions de rellevància clínica en altres patologies. Finalment, aquest estudi ens permet afirmar que els canvis de metilació en CCR succeeixen en estadis inicials de la tumorigènesis.

ALU ELEMENTS' METHYLATION ANALYSIS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

Laura Padullés¹, María Martínez-Iniesta¹, David G. Molleví¹, Álvaro Aytés¹, Antoni Berenguer², Javier Carmona³, Manel Esteller³, Víctor Moreno², Miquel A. Peinado⁴, Gabriel Capellà¹, Alberto Villanueva^{1#}

¹ Translational Research Laboratory 1 (LRT1), Catalan Institute of Oncology (ICO), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

² Servei d'Epidemiologia i Registre del Càncer (SERC), Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

³ Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁴ Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer (IMPPC), Badalona, Spain

Correspondence: Dr. Alberto Villanueva, Translational Research Laboratory 1 (LRT1), Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospitalet de Llobregat (08907), Barcelona, Spain.

E-mail: avillanueva@iconcologia.net

ABSTRACT

PURPOSE

Epigenetic modification plays an important role in cancer. Silencing of tumor-suppressor genes by promoter hypermethylation, as well as hypomethylation at oncogenes, contributes to cancer phenotype. Alu sequences, the most abundant repetitive elements in human genome, may act as gene expression modifiers through their own methylation status. Specific liver metastasis (LM) epigenetic alterations would be interesting for better dissemination process understanding.

PATIENTS AND METHODS

We have performed an epigenetic screening approach called AUMA (Amplification of Unmethylated Alu) for Alu elements analysis in a series of 40 colorectal cancer (CRC) tumors and their paired LM. GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina) has been also performed in order to identify LM methylation alterations from a different way.

RESULTS

No methylation alterations between primary tumors and LM have been obtained but five differentially methylated AUMA bands between normal colon and tumors were validated by direct bisulfite sequencing. After melting peaks confirmation, accurate analysis of two AUMA bands, band C (16p13.3) coinciding with CpG63 and band B (19q13.32) inside *TMEM143* gene, was performed. Bisulfite sequencing of neighbouring CpG islands and expression analysis of closer genes has been performed, but no more extended differentially methylated area has been found.

CONCLUSION

AUMA approach is a straightforward DNA methylation screening methodology which, despite its high false positives rate, is a useful tool to identify methylation alterations in Alu elements. These, may be indicative of other relevant epigenetic alterations in clinics. Specific LM methylation changes have not been identified being, therefore, early events in CRC adenoma-carcinoma sequence.

INTRODUCTION

Cancer is a genetic disease in which both, genetic and epigenetic alterations, contribute to gene expression regulation [1]. Genetic changes include DNA mutations in tumor-associated genes and gene deletion or loss of heterozygosity (LOH). Besides genetic changes, epigenetics is also a common hallmark of cancer, with alterations in DNA and histones like methylation or acetylation status [2].

Methylation of the cytosine in the dinucleotids CpG is the most frequent epigenetic modification of DNA. Mammalian genome is depleted of CpG groups, but short CpG-dense DNA regions, known as CpG islands, also exist and these are typically associated with promoters of housekeeping and tissue specific genes. According to genome sequencing there are at least 29.000 CpG islands into human genome [3, 4]. Unmethylated state is associated with active gene transcription in normal cells. In contrast, CpG islands can become methylated in cancer cells leading gene silencing. Otherwise, hypomethylation at oncogenes, repetitive sequences, tissue-specific genes or imprinted regions is also known to contribute to cancer cell phenotype.

Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes is a well-characterized mechanism which is found in all type of neoplasms. Many silenced genes by promoter hypermethylation in tumors play important roles in carcinogenesis including genomic stability, cell-cycle regulation, proliferation or apoptosis. Therefore, epigenetic changes in tumors may have multiple clinical applications as prognostic markers or chemotherapy response predictor factors [5-8].

Alterations in DNA methylation are not always simply restricted to individual CpG islands, but also can encompass neighbouring CpG islands and genes. In a recent study, a genome-wide DNA methylation screening approach demonstrated a coordinated hypermethylation of multiple CpG islands spanning a 4 Mb region in colorectal cancer [9]. Hypermethylation was accompanied by a long-range epigenetic silencing (LRES) in a chromosomal region mapping at 2q14.2 and affecting expression of several genes. Later studies have been indentified LRESs also in other chromosomal regions and tumor types [10, 11]. Otherwise, most of the epigenetic studies have assumed that differential DNA methylation occurs at CpG islands of

gene promoters [12]. Nevertheless, it has been reported that methylation alterations in colon cancer may occur not only in promoters, neither in CpG islands, but also in sequences up to 2kb distant, which have been called “CpG island shores” [13]. For this reason, a part from identifying differentially methylated regions in CRC it is also important to analyze surrounding CpG islands and genes into an area likely to be also affected.

Screening of differentially methylated sequences in tumors appears as a key tool to further understand the molecular mechanisms underlying malignant cell transformation. Last years, the repertoire of global methylation screening methodologies has expanded [14-17]. One of them is the named AUMA (Amplification of UnMethylated Alu), which identifies unmethylated SmaI sites (CCCGGG) within Alu elements. AUMA, results in a complex representation of DNA sequences flanked by unmethylated SmaI sites which, once resolved by high-resolution electrophoresis, appear as a characteristic and reproducible fingerprint.

Alu sequences are the most abundant repetitive elements in human genome with more than one million copies and they are usually methylated to minimize their retrotransposition capability [18, 19]. One-third of all human CpG dinucleotids are located inside Alu sequences being reported that Alus methylation status may act as gene expression modifier [20, 21]. Identification of unmethylated Alus, because it is not their usual status [22, 23], are considered important methylation changes interesting to be characterized.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide after lung and breast cancer [24]. Epigenetic studies in CRC have been mainly focused on comparisons between normal mucosa, adenoma and primary tumors, and few studies have been developed about specific metastatic methylation differences. Aberrant gene methylation in CRC, as a tumor suppressor genes silencing mechanism, mainly happens at early stages of tumorigenesis, during the adenoma to adenocarcinoma transition [25-28].

Distant dissemination is a significant prognostic factor in CRC being the main cause of cancer-related deaths. Liver metastases (LMs) are diagnosed in 10-25% of CRC

patients at the time of primary tumor resection and another 50-60% of patients will develop recurrent disease, commonly in the liver, within the next 5 years [29, 30]. In spite of its clinical relevance, molecular mechanisms behind metastatic liver spread process in CRC are poorly understood.

In order to seek differentially methylated genes or regions in CRC liver metastases, we have applied AUMA approach and a methylation microarray for a series of 40 primary colorectal tumours and paired LMs.

MATERIAL AND METHODS

Human tissue samples

All the samples used in this study were obtained from the Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) (L'Hospitalet de Llobregat, Spain). Immediately after resection, tissues were frozen and stored at -80°C until use. Sample characteristics are summarized in table 1 and prospective clinical follow up is available for all of them. Informed consent was obtained from patients to use their surgical specimens and clinical-pathologic data for research purposes. 40 triplets of matched normal colonic mucosa, primary colorectal tumor and liver metastasis (LM) resected from 2001 to 2006 were included in this analysis (12 metachronic and 28 synchronic metastases derived from 15 rectal and 25 colon primary tumours). Tumour and fibrosis content of metastases was analyzed by a pathologist (NB).

The non metastatic series includes 40 fresh-frozen non metastatic colorectal tumours within at least 5 years after colon resection (from 1996 to 2000) and the paired nonadjacent areas of normal colon mucosa (12 rectal and 28 colon primary tumors).

DNA and RNA extraction

DNA from all the samples was obtained by conventional phenol-chloroform method and ethanol precipitation. Total RNA was obtained for all the cases using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. DNA and RNA purity/quality was checked in a 1% agarose gel electrophoresis and NanoDrop ND-1000 spectrophotometer was used for quantification.

AUMA (Amplification of Un-Methylated Alu)

AUMA applied protocol is the same as previously described [16]. Briefly, one microgram of DNA was digested with 20U of the methylation sensitive restriction endonuclease SmaI (Roche Diagnostics) for 16h at 30°C, leaving cleaved fragments with blunt ends (CCC/GGG). Adaptors were prepared incubating together (1:1) the Blue oligonucleotide (5' CCGAATTCGCAAAGCTCTGA 3') and the 5' phosphorilated MCF oligonucleotide (5' TCAGAGCTTTGCGAAT 3') at 65°C 2 min, and then cooling at room temperature for 1h. One microgram of the digested DNA was linked to 2nmol of adaptor using T4 DNA ligase (New England Biolabs) for 16h at 16°C. Products were purified using the PCR Product Purification Kit (Genomed) and eluted in 250µl of sterile water. PCR amplification was performed with only one primer (BlueAlu up5) (5' ATTCGCAAAGCTCTGAGGGTT 3') constituted by the 3' end of the Blue primer sequence (ATTCGCAAAGCTCTGA), the cut SmaI site (GGG) and two additional nucleotides (TT) at the 3' end to enrich for Alu sequences amplification. Products were visualised on a 6% acrilamide denaturing urea (8M) gel after 6 hours at 55W running electrophoresis and silver staining. Schematic diagram of AUMA methodology is available at supplementary data figure 1. AUMA fingerprints were visually compared for methylation differences between matched normal colon, primary tumour and liver metastasis.

Identification of AUMA bands

Bands excised from gels were amplified with the same primer (BlueAlu up5) used in AUMA and the product was cloned into plasmid vectors using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Sequencing of multiple colonies was performed using an internal plasmid primer and the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and corresponding gene sequence homology was found using the human Blat search program (<http://genome.ucsc.edu/>). In some cases more than one sequence has been obtained from, apparently, a single AUMA band isolation. Most sequences presented the target sequence CCCGGGTT including the unmethylated SmaI site at both ends although some cases presented it at only one end having unspecific primer hybridization to the other one.

Bisulfite sequencing

Sodium bisulfite treatment using EZ DNA Methylation Kit (Ecogen) was performed for AUMA bands methylation analysis. After bisulfite treatment DNAs were amplified by nested PCR and finally sequenced using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Bisulfite sequencing has also been performed for methylation analysis of band B and C surrounding CpG islands. Primers sequences for the 5 validated AUMA regions and the 15 CpG islands analysed are available at supplementary data table 1.

Melting curves analysis

For AUMA band B and C validation, the same 40 matched cases of normal colonic mucosa, primary colorectal tumour and liver metastasis were sodium bisulfite treated and amplified by nested PCR using the Light-Cycler 2.0 Roche System and LightCycler FastStart DNA Master SyBR Green I kit (Roche). Methylation status for all the samples was assessed according to melting peaks temperatures. Higher melting temperatures (T_m) are needed for denaturalization of methylated DNA which is cytosine (C) and guanidine (G) rich [31].

cDNA microarrays

Total RNA was obtained for all the tumours using TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and using Agilent 2100 Bioanalyser technology. 19 colorectal primary tumours were selected for having best RNA quality and were hybridised on the human cDNA platform Affy HGU 133 plus 2.0 (Affymetrix) containing 54675 probes. Sample characteristics of the included cases at the microarray analysis are summarized in table 1. Biotinylated cRNA target was produced starting from 3µg of total RNA in according to Affymetrix (Santa Clara, CA) instructions and for each sample 15µg were fragmented to a length of 20–200 bp before hybridization to Genechip HGU133 plus 2.0 arrays. All the hybridization, washing, staining and scanner procedures were done using a Genechip Affymetrix station (Fluidics station 450, GeneChip Scanner 3000) as recommended by manufacturer. Digitized image data files and CEL file were used for the subsequent statistical analysis.

Melting curves for bands B and C allowed primary tumours classification into methylated and non methylated cases. Relationship between methylation status and gene expression was analysed for all the genes within a genomic region 2Mb upstream/downstream from AUMA bands. Probes from the microarray data that mapped into these genomic regions were selected and differential expression was assessed using Significance Analysis of Microarrays (SAM) [32].

5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) and Trichostatin A (TSA) treatment

Human colon cancer cell line HCT116 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). HCT116, methylated cells at AUMA bands B and C, were treated with Aza (Sigma) 0,5µM for 48h and TSA (Sigma) 0,3µM for 16h. Transcription activation of initially methylated samples is achieved using both treatments as Aza is used for DNA demethylation and TSA is used for histone acetylation. Melting peaks for band C amplification of HCT116 cells before and after treatment are available at supplementary data figure 2. RNA of treated cells was obtained using TRIzol Reagent

(Invitrogen) and *EN1* and *SCTR* gene expression (known methylated genes in HCT116 cells) was analysed to confirm treatment efficacy. HCT116 cells treated with AZA, TSA, AZA+TSA and negative controls have been used for gene expression analysis of AUMA bands surrounding genes.

Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

Briefly, RNA was reverse transcribed to cDNA using recombinant ribonuclease inhibitor RNase OUT, M-MLV retrotranscriptase and oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen). For all the samples 2 independent RTs were performed and mixed. Microarray results validation has been performed using the Light-Cycler 2.0 Roche System and LightCycler FastStart DNA Master SyBR Green I kit (Roche). Expression data (duplicates of every sample) has been normalised with the housekeeping gene *b2-microglobuline* used as reference. Primers sequences are available at supplementary data table 1.

DNA methylation profiling

Microarray-based DNA methylation profiling was performed on 32 paired samples (colorectal tumour/liver metastasis) corresponding to 20 synchronic and 12 metachronic cases with the GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, Inc.). The panel is developed to assay 1505 CpG sites selected from 807 genes, which include oncogenes and tumour suppressor genes, previously reported as differentially methylated or differentially expressed genes, imprinted genes, genes involved in various signalling pathways, and genes responsible for DNA repair, cell cycle control, metastasis, differentiation and apoptosis.

Methylation assay was performed as described previously [17]. Briefly, for each CpG site, four probes were designed: two allele-specific oligos (ASO) and two locus-specific oligos (LSO). Each ASO-LSO oligo pair corresponded to either the methylated or unmethylated state of the CpG site. Bisulfite conversion of DNA samples was done using the EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Orange, CA). The array

hybridization was conducted under a temperature gradient program and arrays were imaged using a BeadArray Reader (Illumina Inc.).

RESULTS

Identification of differentially methylated AUMA bands in liver metastasis

To screen common methylation changes in CRC liver metastases, we have used a global methylation approach called AUMA (Amplification of UnMethylated Alu). AUMA methodology results in a complex representation of DNA sequences flanked by unmethylated SmaI sites. When resolved by high-resolution electrophoresis, a characteristic AUMA fingerprint for each sample is obtained (Figure 1). Because the technique is based on a primer sequence (AACCCGGG) that is found preferentially, but not exclusively in Alu elements, other unmethylated sequences may appear in fingerprints. AUMA bands showing gains of intensity represent hypomethylated regions since PCR amplifies sequences flanked by unmethylated SmaI sites, while losses of intensity are associated with hypermethylated regions. AUMA was assessed in a series of forty matched cases of normal colonic mucosa, primary colorectal tumor and liver metastasis (LM). We identified ten reproducible bands, named from A to J, differentially and recurrently methylated between (a) primary colorectal tumours and LMs, or (b) primary colorectal tumours and normal mucosa. Table 2 summarizes genomic locations of these ten bands. Presence of recurrent methylation changes in LM would suggest the existence of specific metastatic process related methylation. 4 out the 10 AUMA bands (A, C, E and J) were hypermethylated regions in colorectal tumour/LM in comparison with normal colon and 6 were hypomethylated (B, D, F, G, H and I) (Table 2). Most of the obtained AUMA changes occur between primary tumour and normal colon mucosa. Very few specific liver metastasis changes have been observed, happening in 18% of cases (band B) and 33% (band C). Faint bands with inconsistent display due to small intensity variation in gel electrophoresis were not considered.

To determine the identity of the 10 bands displayed by AUMA, they were gel purified, cloned and sequenced. Sequences, including the SmaI site at both ends, were matched with BLAST reference allowing the assignment of their chromosomal location. Different locations were obtained for some cases because two or more AUMA bands were very close each other in the electrophoresis gel.

Validation of methylation changes detected by AUMA

To confirm that changes observed in AUMA fingerprints corresponded to actual changes in methylation status, the 10 selected sequences were analyzed in matched cases of normal colon, primary tumor and LM (n=5 cases differentially methylated according to AUMA fingerprints) by direct sequencing of sodium bisulfite-treated DNAs. Methylation changes at SmaI restriction site was validated in 5 out 10 bands (B, C, D, H and I). Low validation rate (50%) obtained by bisulfite sequencing, suggests that changes could affect only a small fraction of tumor cells. Thus, PCR amplification of samples with proportionally very few unmethylated cells can be visualized at the AUMA fingerprint as unmethylated samples. However, they are not confirmed by sequencing because of different technique sensitivities. Presence of minor subpopulations could be detected using more sensitive techniques like Methylation Specific PCR (MSP). As quality control of our AUMA screening, we have identified several bands previously described in literature although using different sets of CRC samples [16].

Two bands were selected for further studies: **(a) Band C** (16p13.3) was hypermethylated in tumours/liver metastases as compared to normal colon. It was chosen because methylation changes affect not only the CpG group at SmaI site but also at other close CpG groups. It is located into a CpG island (CpG63) and inside a transfer RNAs (tRNAs) and CpG islands rich region. Supplementary figure 3 shows a bisulfite sequencing example for band C; **(b) Band B** (19q13.32) was recurrently hypomethylated in tumours/LMs. It was selected, despite not having so large differentially methylated region, by its location inside *TMEM143* gene. Band I, which

was also interesting by its location inside *MYOM2* gene, was not selected for further studies because it had been already analyzed previously [16].

Melting curves analysis of matched primary tumours and LMs

To confirm methylation status, AUMA bands B and C were analyzed by PCR-melting curves (MC) using the LightCycler 2.0 (Roche) and the same series of 40 matched cases used in AUMA. A heterogeneous methylation pattern, characterized by two melting peaks, was identified in most of the methylated cases for band C (Supplementary figure 4). It may be indicating the existence of differently methylated cell populations into the bulk of tumors. Notably differences were observed between methylated cases for bands B and C when AUMA and MC analyses were compared. Thus, band B was methylated in 58% of cases by AUMA and 28% by MC, while band C was methylated in 77% of cases by AUMA and 33% by MC analysis. Likewise, specific LM methylation was reduced from 18% (band B) and 33% (band C) to 5% when MC analysis was performed (Figure 2). Again, because of different sensitivities between techniques, methylation changes affecting only a small proportion of tumour cells cannot be distinguished using melting curves. Moreover, methylation changes at only a single or very few CG groups either cannot be seen by melting analysis.

Methylation status of the closest CpG islands

To determine if differential methylation also extends up/downstream from B and C AUMA bands, we analyzed methylation status of close CpG islands. Fifteen additional CpG islands for band C (CpG84, CpG65, CpG24, CpG27, CpG140, CpG18, CpG97, CpG30/1, CpG30/2 and CpG71) and band B (CpG25, CpG40, CpG17, CpG43 and CpG34) were analyzed by bisulphite sequencing in differentially methylated paired cases (normal/primary tumor) according to AUMA data (n=5). Band C resulted hypermethylated in tumours in CpG63 as well as in the following downstream CpG islands (CpG18, CpG97 and CpG30) at least in one of the analyzed cases. By contrast, band B hypomethylation was only identified in CpG25 (Figure 3).

Interestingly, band C localizes inside a tRNA rich region also containing a lot of CpG islands. This fact, suggested a plausible mechanism of translation process regulation by tRNA rich regions methylation. However, CpG island differential methylation was not reproduced in other two tRNA rich regions randomly selected from genome (17p13.1 and 6p22.1) (data not shown).

Correlation between methylation and genetic expression analysis

In order to find possible genes transcriptionally regulated by methylation status of AUMA bands, 19 tumours with previously known methylation status at bands B and C were hybridised on the human cDNA platform Affy HGU 133 plus 2.0 (Affimetrix). A range of 2Mb upstream and downstream from AUMA bands was analysed to find differentially expressed genes between methylated and non methylated tumors. No significantly overexpressed genes in non methylated tumours were found close to bands B and C. Moreover, all genes had a FDR (False Discovery Rate) around 50% being a very high rate (supplementary data table 2). Significant threshold was calculated for band B (p-value=1,9E-4) and band C (p-value=1,8E-4) as 0,05 / number of probes included in the 4Mb analysed area (being 265 for band B and 284 for band C). Lowest obtained p-values are far from being significant as they are 0,017 and 0,011 for bands B and C, respectively. Surprisingly, *TMEM143* which was the gene where band B was located, is not at first position of the significance list.

AZA/TSA treatment

qRT-PCR with LightCycler 2.0 was performed using HCT116 colorectal cancer cell line after AZA and TSA treatment. *LIG1*, *TMEM143*, *SYNGR4*, *KDEL1*, *GRIN2D*, *GRWD1* and *FAM83E* genes for band B analysis and *HCFC1R1*, *MMP25*, *ZNF213*, *ZNF75A* and *ZNF434* genes for band C analysis were selected for being close to bands B and C as well as for being overexpressed in non methylated tumors according to microarray data despite not being significant. All the analysed genes, in exception of *LIG1* and *HCFC1R1*, show higher transcription levels in HCT116 AZA treated cells in comparison with wild-type (WT) cells, what may be indicating a possible correlation

between methylation and gene expression in both genomic regions (figure 4). However, we cannot affirm that the characterized methylation changes by AUMA approach are the responsible of these modified transcription levels. The most interesting results are about *ZNF75A* gene (140Kb far from band C), as gene expression was increased the most in reference with wild type cells (3 and 6 fold after AZA and AZA+TSA treatment, respectively). These results suggest that *ZNF75A* gene expression is likely to be regulated by both DNA and histones modification as AZA treatment is used for DNA demethylation whereas TSA is used for histone acetylation.

DNA methylation profiling

In order to find specific liver metastasis differentially methylated genes, and after unsuccessful AUMA analysis attempt, a microarray-based DNA methylation profiling was performed on 32 paired samples (colorectal tumour / liver metastasis) with the GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina, Inc.). Again, no specific liver metastasis methylation pattern was obtained indicating that methylation occurs early in the adenoma-carcinoma sequence as previously described [26]. Therefore, there are no differences between primary tumors and LMs being metastatic process not correlated with specific methylation changes.

Unsupervised hierarchical clustering results for metachronic and synchronic cases do not seem to show any apparent classification that clearly differentiates primary tumors from LMs. In fact, 11 of the 20 synchronic cases (1, 2, 6, 14, 15, 21, 23, 31, 35, 39, 40) have both, primary tumor and LM, paired together in contrast with only 2 of the 12 methacronic ones (24, 36). It may be indicating that synchronic metastases and their respective primary tumors could have similar methylation patterns. Second additional resected LMs from cases 8 and 21 are paired together too (supplementary data figures 5 and 6).

Liver metastasis predictive marker

Comparative analysis between a metastatic series (N=40) and a non metastatic one within at least 5 years after colon resection (N=40) has concluded that there is no significant correlation between band C methylation and risk to develop LM. Briefly, 6 of 40 non metastatic tumours are methylated in contrast of 11 of 40 metastatic ones (data not shown).

DISCUSSION

Epigenetic modifications play an important role in cancer [33]. Silencing of tumour-suppressor genes by CpG island promoter hypermethylation as well as hypomethylation of oncogenes contributes to cancer cell phenotype. Alu sequences, which are the most abundant repetitive elements in human genome with more than one million copies, may act as modifiers of gene expression through changes in their own methylation status [20]. Alus as well as other repetitive elements tend to be highly methylated in most somatic tissues [22, 23] what is the clue of AUMA (Amplification of Unmethylated Alu) methodology. AUMA approach consists on the unmethylated Alu elements identification being relevant findings as it is not their usual methylation status. Once recurrent differentially methylated regions are identified, mostly inside or nearby CpG islands and genes, neighbouring genes must be studied for possible functional implications.

AUMA technique has been performed in order to identify specific liver metastasis methylation changes in paired human samples. Not many differences between primary tumours and paired LM were obtained indicating that epigenetic modifications must be early events in CRC tumourigenesis. It had been previously described that methylated alleles increase during the adenoma-carcinoma sequence in CRC but the proportion of methylated alleles was not different between

adenocarcinomas and metastases being the most substantial difference occurred between early and advanced adenomas [25-28].

After not obtaining specific liver metastasis methylation changes according to AUMA results, DNA methylation profiling with the GoldenGate Methylation Cancer Panel I microarray (Illumina, Inc.) was performed. Again, no differentially methylated genes between tumors and paired LM were found.

10 differentially methylated regions, most of them between primary tumors and normal colonic mucosa, have been identified in a recurrent way using AUMA technique and five of them (50%) have been validated at Smal sites by direct bisulfite sequencing. Previous studies had reported similar rates of AUMA results validation (6 of 8 bands; 75%) [16]. We can accept having false positives considering that it is a screening methodology.

AUMA approach is based in a PCR amplification of unmethylated regions although not necessarily being representative of the whole tumor. Not validated AUMA bands by direct sequencing are indicative of being epigenetic alterations of small proportion of cells having no clinical relevance. The presence of minor subpopulations could be detected using more sensitive techniques as MSP (*Methylation-specific PCR*) [34, 35] or by sequencing of multiple clones.

Only two of the five validated regions which have been called “band B” and “band C” located at 19q13.32 and 16p13.3, respectively, have been analysed by melting curves analysis using LightCycler 480 system (Roche Diagnostics). No discriminatory melting peaks were obtained for the rest of AUMA bands. AUMA results must be treated with caution because they refer to a single CpG site within the Alu element being not necessary methylation affection of close CpG groups. Two reasons may explain why some of the validated AUMA bands have not been validated by melting curves: **(a)** Not distinguished melting peaks are obtained for PCR sequences with only very few CG dinucleotids differentially methylated. Full, partial and not methylated clones show melting peaks differences. Similar but higher sensitivity methodologies like MS-HRM (*Methylation-sensitive high-resolution melting*) [36]

have recently appeared; **(b)** Coexistence of densely and poorly methylated cells (cellular heterogeneity) masks DNA methylation status.

We decided to use melting curves [31] instead of MSP technique despite its higher sensitivity, because we were more interested in large differentially methylated areas, for its biologic significance, than in specific CG groups analysis. For this reason further analyses have only been performed by AUMA bands B and C which are the ones with discriminatory melting peaks. 28% and 33% of differentially methylated tumors according with melting analysis (LightCycler 2.0.) were obtained for AUMA bands B and C, respectively.

Band B (19q13.32), hypomethylated in tumors, is located in the third intron of the *TMEM143* gene (Transmembrane protein 143); band C (16p13.3), hypermethylated in tumors, is in a CpG island and tRNA rich region and, accurately, it is located inside CpG63 being both interesting genomic locations.

It is well known in literature gene expression regulation capability of epigenetics [12]. Therefore, cDNA microarray hybridization (Affy HGU 133 plus 2.0; Affymetrix) of 19 colorectal primary tumors previously characterised as methylated or not methylated samples at bands B and C was performed. In order to search possible correlation between gene expression and bands B/C methylation status, data analysis of genes up to 2Mb far was done. No significantly overexpressed genes in non methylated tumours were found close to bands B and C regions. Neither *TMEM143* gene, where band B is located, was significantly overexpressed. According to microarray data, there is no gene expression regulation by methylation changes at bands B and C.

Nevertheless, 12 overexpressed genes (not in a significant way) in non methylated tumors as compared to methylated ones according to microarray data were selected. *LIG1*, *TMEM143*, *SYNGR4*, *KDEL1*, *GRIN2D*, *GRWD1* and *FAM83E* genes near band B and *HCFC1R1*, *MMP25*, *ZNF213*, *ZNF75A* and *ZNF434* genes near band C were included in AZA/TSA analysis. All of them, in exception of *LIG1* and *HCFC1R1*, show higher transcription levels in HCT116 AZA treated cells in comparison with wild type (WT). The most interesting results are about *ZNF75A* gene (Zinc finger protein

75a), which gene expression was increased the most in reference with wild-type cells (3 and 6 fold after AZA and AZA+TSA treatment, respectively). In spite of no gene expression regulation by methylation status in accordance of significant microarray data, AZA and TSA analysis shows a possible correlation in both genomic regions. However, we cannot affirm that characterized methylation changes by AUMA approach are the responsible of these modified transcription levels.

More accurate studies about *ZNF75A* gene, like promoter methylation status analysis in a large series, as well as *TMEM143* gene studies, would be interesting for better characterize them and their importance in colorectal cancer.

In summary, AUMA approach is a straightforward DNA methylation screening strategy which, in spite of its false positives rate, is a useful tool to identify methylation modifications at Alu elements indicative of possible epigenetic alterations in nearby genes. Otherwise, AUMA approach, as well as Illumina microarray, has clearly demonstrated no relevant epigenetic changes related on metastatic process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

REFERENCES

1. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
2. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
3. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
4. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 988-93.
5. Brock, M.V., et al., *Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2912-9.
6. Bullinger, L., et al., *Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia*. Blood. **115**(3): p. 636-42.
7. Tanemura, A., et al., *CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(5): p. 1801-7.
8. Su, H.Y., et al., *An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(2): p. 387-93.
9. Frigola, J., et al., *Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 540-9.
10. Novak, P., et al., *Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8616-25.
11. Clark, S.J., *Action at a distance: epigenetic silencing of large chromosomal regions in carcinogenesis*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R88-95.
12. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
13. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 178-86.

14. Frigola, J., et al., *Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS)*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(7): p. e28.
15. Jorda, M., et al., *Analysis of DNA methylation by amplification of intermethylated sites (AIMS)*. Methods Mol Biol, 2009. **507**: p. 107-16.
16. Rodriguez, J., et al., *Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(3): p. 770-84.
17. Bibikova, M., et al., *High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays*. Genome Res, 2006. **16**(3): p. 383-93.
18. Batzer, M.A. and P.L. Deininger, *Alu repeats and human genomic diversity*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(5): p. 370-9.
19. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
20. Hasler, J. and K. Strub, *Alu elements as regulators of gene expression*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(19): p. 5491-7.
21. Liu, W.M. and C.W. Schmid, *Proposed roles for DNA methylation in Alu transcriptional repression and mutational inactivation*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(6): p. 1351-9.
22. Yang, A.S., et al., *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. e38.
23. Hellmann-Blumberg, U., et al., *Developmental differences in methylation of human Alu repeats*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4523-30.
24. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
25. Bai, A.H., et al., *Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia*. Int J Cancer, 2004. **112**(5): p. 846-53.
26. Kim, Y.H., et al., *CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(8): p. 781-9.

27. Lee, S., et al., *Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia*. Lab Invest, 2004. **84**(7): p. 884-93.
28. Rashid, A., et al., *CpG island methylation in colorectal adenomas*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 1129-35.
29. Fong, Y., et al., *Liver resection for colorectal metastases*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 938-46.
30. Ohlsson, B., U. Stenram, and K.G. Tranberg, *Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience*. World J Surg, 1998. **22**(3): p. 268-76; discussion 276-7.
31. Guldberg, P., J. Worm, and K. Gronbaek, *Profiling DNA methylation by melting analysis*. Methods, 2002. **27**(2): p. 121-7.
32. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
33. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
34. Derks, S., et al., *Methylation-specific PCR unraveled*. Cell Oncol, 2004. **26**(5-6): p. 291-9.
35. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
36. Wojdacz, T.K., A. Dobrovic, and L.L. Hansen, *Methylation-sensitive high-resolution melting*. Nat Protoc, 2008. **3**(12): p. 1903-8.

TABLES AND FIGURES**Table 1: Samples characteristics**

	Metastatic series	Non metastatic series	cDNA microarray series	Illumina microarray series
Number of patients	40	40	19	32
Gender (M:F)	27:13	17:23	12:7	21:11
Median age, years (range)	62 (44-78)	64 (45-85)	65 (51-78)	63 (44-78)
Primary tumour location:				
Right colon	9	10	6	8
Left colon	16	18	6	12
Rectum	15	12	7	12
Primary tumour T stage*:				
T1	1	1	1	1
T2	1	6	0	0
T3	35	32	16	28
T4	3	1	2	3
Lymph node invasion*:				
N0	13	1	5	11
N1	15	27	9	13
N2	12	12	5	8
Median liver metastasis free survival (range)	6 (0-37) months	10 (5-12) years	4 (0-30) months	7 (0-37) months
Tumour content in liver metastases (%):				
0-25	1	—	0	1
25-50	7	—	4	6
50-75	17	—	9	12
75-100	15	—	6	13
Number of liver metastases:				
≤3	27	—	13	22
>3	13	—	6	10
Type of metastases:				
Synchronous	28	—	14	20
Metachronous	12	—	5	12

*According to TNM staging system for colorectal tumours
cDNA and Illumina microarray series consist on cases from metastatic series being not independent ones

Table 2: Characterized AUMA bands

Band ID	Chromosome location	Genomic position	Size (pb)	Gene	CpG island	Methylation status in liver matastasis
F	13q21.32	64681526 - 64682082	557	-	-	hypomethylated
	16q24.1	85551520 - 85552047	528	-	-	
G	20q13.12	42690821 - 42691257	437	ADA	-	hypomethylated
A	18q22.3	70314988 - 70315410	423	CNDP2	Yes	hypermethylated
	10q23.1	82275168 - 82275587	420	-	10000pb far	
	3p26.2	3789774 - 3790195	422	-	-	
	15q25.2	82456899 - 82457319	421	ADAMTSL3	-	
	22q12.3	35742024 - 35742450	426	TST	-	
H	19q13.12	40746991 - 40747399	409	ATP4A (~500pb far)	-	hypomethylated
	19p13.2	10745218 - 10745628	411	DNM2	-	
B	19q13.32	53550179 - 53550543	365	TMEM143	10000pb far	hypomethylated
	8q21.2	85949406 - 85949773	368	LOC138046	-	
I	8p23.3	2007343 - 2007682	340	MYOM2	-	hypomethylated
	6p12.3	45725379 - 45725717	339	-	-	
C	16p13.3	3160477 - 3160782	306	-	Yes	hypermethylated
J	19p13.3	5273526 - 5273814	289	PTPRS	-	hypermethylated
D	4q28.3	134147226 - 134147467	242	-	-	hypomethylated
E	8q13.3	71743842 - 71744016	175	LACTB2	Yes	hypermethylated

5 of the 10 AUMA bands (in grey) were validated at Smal sites by bisulfite sequencing

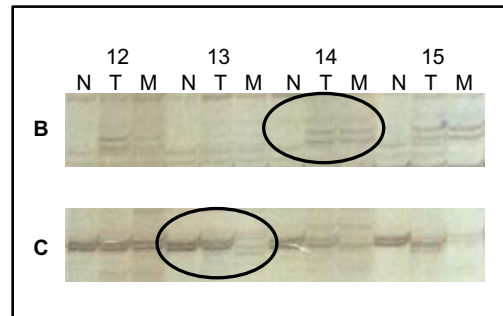
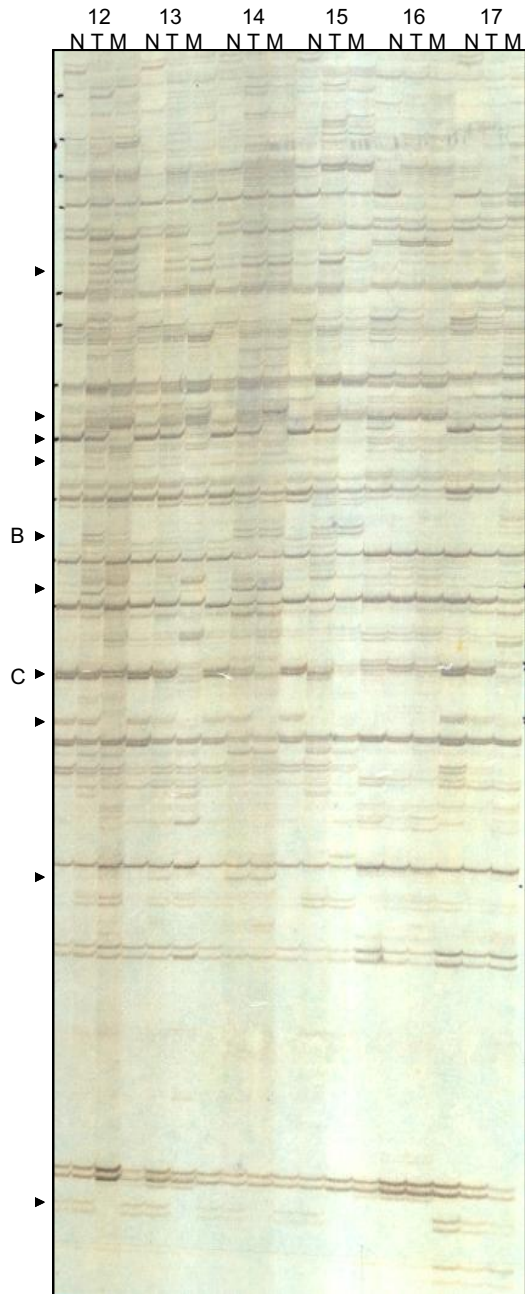


Figure 1: AUMA fingerprint

N, T and M are normal colonic mucosa, primary colorectal tumour and liver metastasis, respectively.

The 10 AUMA bands analysed for being recurrently altered are marked with arrows on the left.

Example of hypomethylation in band B (increased intensity in tumor and liver metastasis in comparison with normal colonic mucosa).

Example of hipermethylation in band C (decreased intensity in liver metastasis).

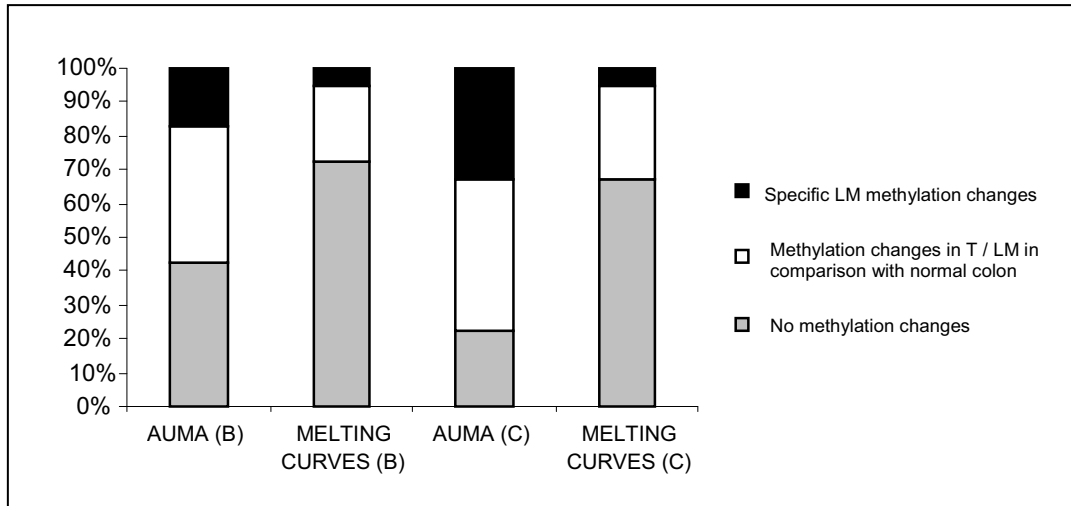


Figure 2: Specific liver metastasis methylation

Less differentially methylated cases in bands B and C are observed according to melting curves results in comparison with AUMA analysis. Only 5% of cases have specific LM methylation changes at both bands. N, T and LM are normal colonic mucosa, colorectal primary tumor and liver metastasis, respectively.

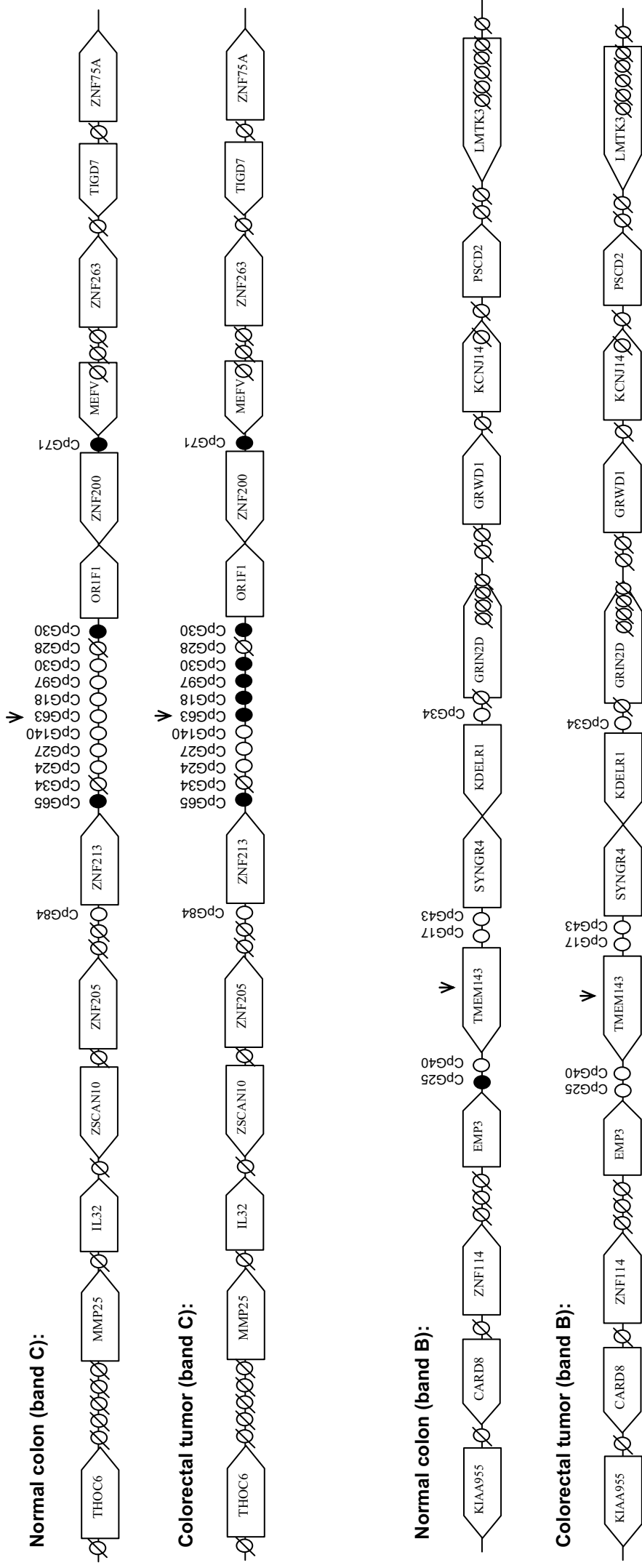


Figure 3: Methylation status analysis of CpG islands close to AUMA bands B and C. AUMA bands B and C are marked by arrows. Band C is hypermethylated in tumours at CpG63 (where band C is located) and at CpG18, 97 and 30 at least in one of the analysed cases. Band B is hypomethylated in tumours as well as in CpG25.

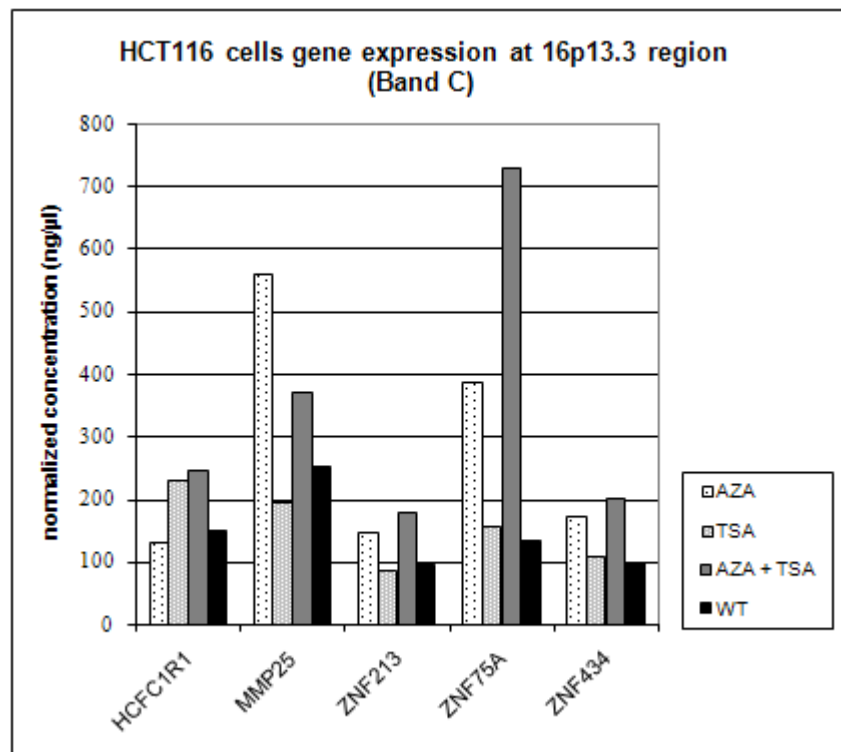
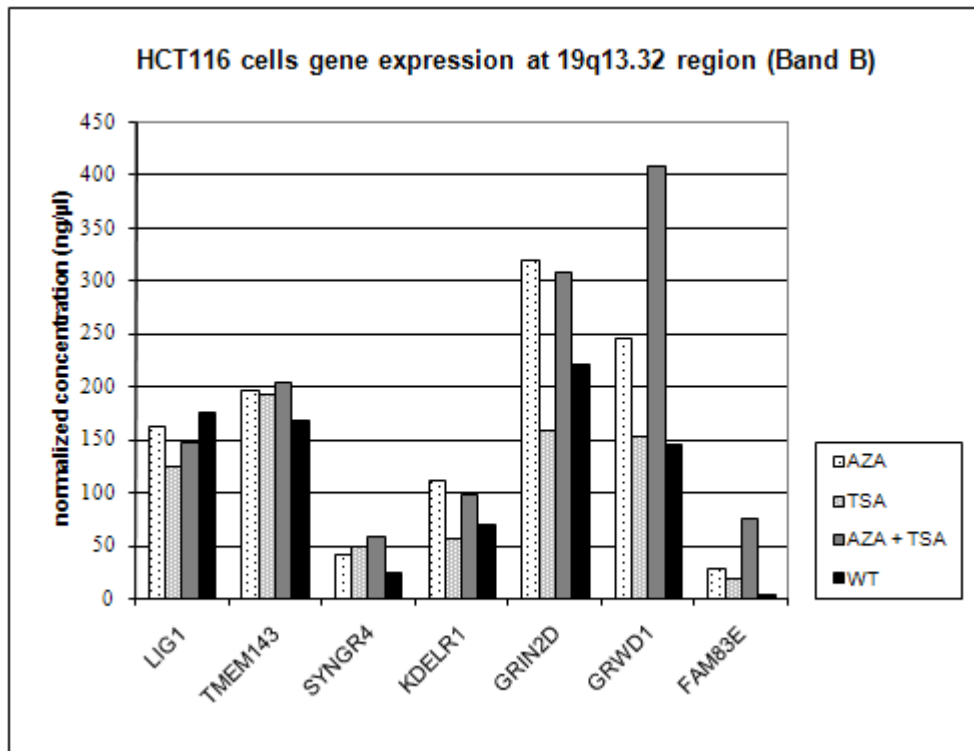
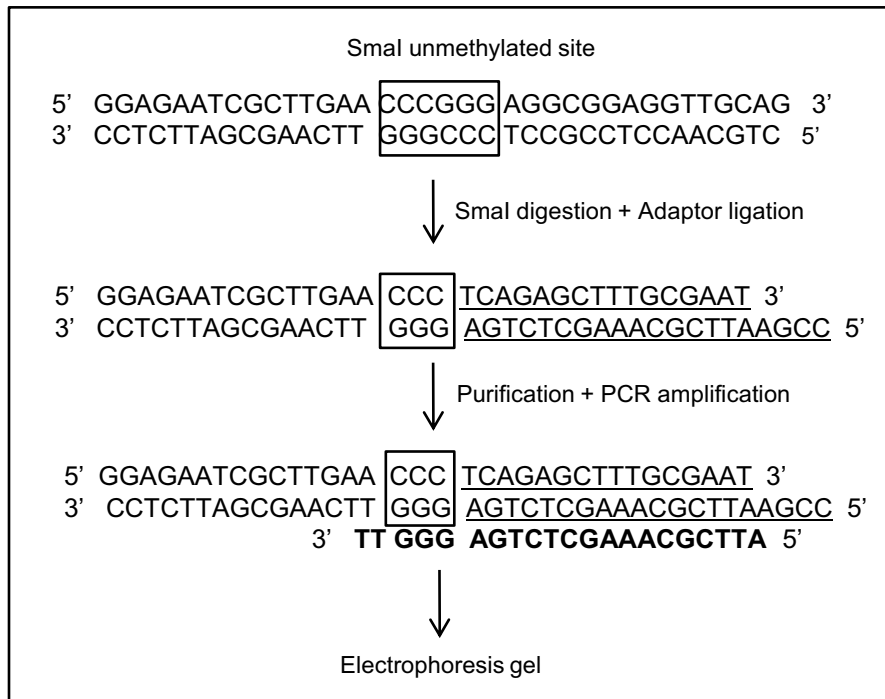


Figure 4: AZA/TSA treatment of HCT116 cell line

AZA treatment is used for DNA demethylation whereas TSA is used for histone acetylation. Treated cells with AZA have higher transcription levels in comparison with wild type (WT) cells for all the genes except of *LIG1* and *HCFC1R1*.

SUPPLEMENTARY DATA**Supplementary Figure 1:** Schematic diagram of AUMA methodology

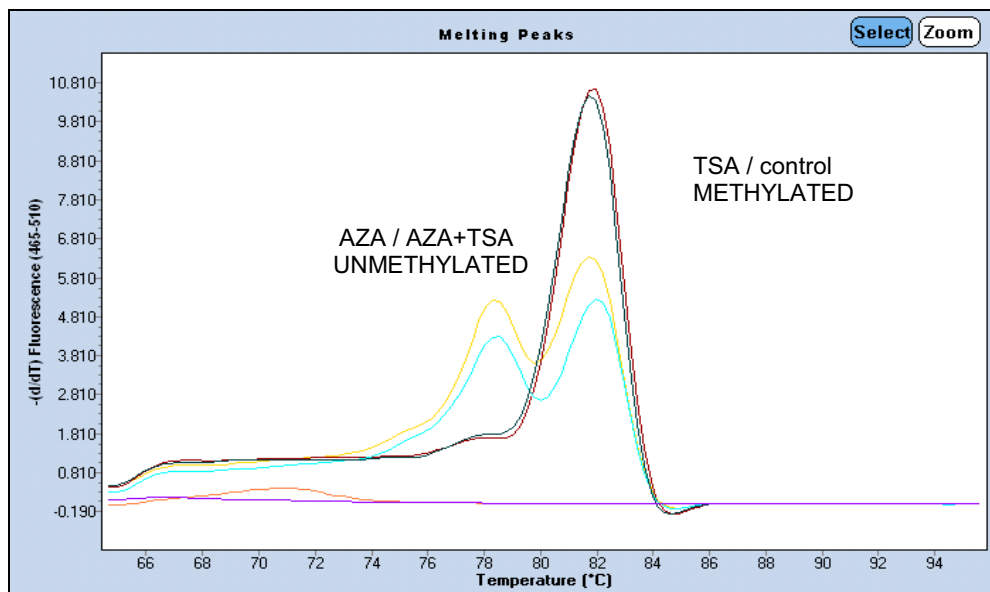
Methylation-sensitive restriction endonuclease SmaI can only digest unmethylated targets (rectangle), leaving blunt ends where adaptors (underlined) can be linked. Sequences flanked by two adaptors are amplified by PCR using a single primer called BlueAlu up5 (in bold) which is the same adaptor primer sequence plus SmaI site (GGG) and TT nucleotides for more specific Alu elements amplification.

Supplementary Table 1: Primers sequences

PRIMER NAME	Tm		PRIMERS SEQUENCES
BANDA B IN	56°C	Forward	5' TGGAGAAATTGAATGTTTTAGA 3'
		Reverse	5' TCTTAACCTACTACAACCTCCA 3'
BANDA B OUT	56°C	Forward	5' TTTGTTGTGTTTGGTTTATTGA 3'
		Reverse	5' CATCAACAAATAATCACCCAA 3'
BANDA C IN	56°C/LC 60°C	Forward	5' GGTTTTTAAATTGTAGGATGA 3'
		Reverse	5' AAATTAACCTCTAAACCCATT 3'
BANDA C OUT	56°C/LC 56°C	Forward	5' TTAGTTGTTGTTTGTAGTTTGG 3'
		Reverse	5' ATCCTAAATCAATTCAAATCC 3'
BANDA D IN	60°C	Forward	5' ATTAAGGAAGGAGGAGATTAT 3'
		Reverse	5' ATCATATCTTATCAAAAAACATAA 3'
BANDA D OUT	58°C	Forward	5' TATTATGAATGTTAAAATTAGTGGG 3'
		Reverse	5' ACCACAAAAATAAATTTTTTTTC 3'
BANDA H IN	56°C	Forward	5' TTTTTTTGAGATGGAGTGTATTT 3'
		Reverse	5' CTACAATAAAATTTAAATTTTCCATT 3'
BANDA H OUT	56°C	Forward	5' TGTTTGATTAATTGGAAGAGGA 3'
		Reverse	5' CACAAAATTTTTACAAAACCC 3'
BANDA I IN	56°C	Forward	5' TTTTTGTTTGGAGGTAGAAG 3'
		Reverse	5' AACAAAAACATCTTTCTTTTTT 3'
BANDA I OUT	56°C	Forward	5' AGGTTGGATTTAAATTTTGGTT 3'
		Reverse	5' AAAATAACCCCAAACCTCTCC 3'
C CpG84 OUT	54°C	Forward	5' GGATTTAAGAGGTTAGAAAAGAGT 3'
		Reverse	5' AACCAACACTTCTAACCAATAC 3'
C CpG84 IN	54°C	Forward	5' TTTTATTATTAGTTGGTAAAGAAAGA 3'
		Reverse	5' CCCAAAAATCCCACTTC 3'
C CpG71 OUT	55°C	Forward	5' GGTTTAAAGGAAGTAAGTTATTTTT 3'
		Reverse	5' TTAACTTTAAAAAAAACATTCATT 3'
C CpG71 IN	55°C	Forward	5' GGTGATTTTATAGGTTAGAGATGG 3'
		Reverse	5' AAAATAAAACCATCCCTACCC 3'
C CpG24 OUT	54°C	Forward	5' TGGGGATATGTTGGTTAGAG 3'
		Reverse	5' CCAATCCAACCCATATTAAT 3'
C CpG24 IN	54°C	Forward	5' TGGGTGTGTTTTAGGTTAA 3'
		Reverse	5' AAATAAACACAAACCCCAACT 3'
C CpG18 OUT	56°C	Forward	5' GGTTGGATGTTTAGGGTTG 3'
		Reverse	5' ATTACAACAAATCCAAAACCA 3'
C CpG18 IN	56°C	Forward	5' TTTTATGGGATTTGGTTGG 3'
		Reverse	5' CTCAAACCTACCCAAAAAC 3'
C CpG140 OUT	59°C	Forward	5' TTTTTTTAGGGTTGTGTGAGG 3'
		Reverse	5' CTAACCCCAACCCAAAAAT 3'
C CpG140 IN	59°C	Forward	5' GTAAATGTTGGTTTTTTG 3'
		Reverse	5' ACCCTAAAAAAAACCC 3'
C CpG65 OUT	52°C	Forward	5' GAGGTTGAGTTTGGGAG 3'
		Reverse	5' CACAATAAAAAAAAATCCCA 3'
C CpG65 IN	52°C	Forward	5' GGTTTTGGGTTTAGTGGTG 3'
		Reverse	5' CCAACCAACTACTCACCC 3'
C CpG97 OUT	52°C	Forward	5' TTTTTTTATTGGGGGAATTG 3'
		Reverse	5' ATAAATCCAACATCCCATCAC 3'
C CpG97 IN	52°C	Forward	5' GAATTTTTGTTTTAGTGGGAA 3'
		Reverse	5' CTAATAATAAATCCAACACTACCA 3'
C CpG30 OUT	54°C	Forward	5' AGGAGGATTTGATTTTTATTAAA 3'
		Reverse	5' ACATTTATTCAAAAAATATACCAA 3'
C CpG30 IN	54°C	Forward	5' TATAGTGGGTTGTTAAGGGTT 3'
		Reverse	5' TCAAAAAAATAATCTTAACCCAA 3'
C CpG27 OUT	54°C	Forward	5' AGAATAAAGTTTGGGGTAAAA 3'
		Reverse	5' ACAATCCCAATAAAAAATTT 3'
C CpG27 IN	54°C	Forward	5' GTAAGTATAGGGGTTGGGTAAG 3'
		Reverse	5' ACTCCCAACTATTCTCATAAAAC 3'
C CpG30(2) OUT	54°C	Forward	5' TTTGGTTTTTTGGGGAG 3'
		Reverse	5' CCAACAAAACCCAATAATA 3'
C CpG30(2) IN	54°C	Forward	5' AGGTAGGGTGTGGTAGTTG 3'
		Reverse	5' CAATCCAAAAAACCTAAATC 3'
B CpG17 OUT	56°C	Forward	5' GGGAATTATAATTTTTAGGAGG 3'
		Reverse	5' TCCTTAATAAACCTTAACCC 3'
B CpG17 IN	59°C	Forward	5' GGAGTAGTTGTTTTTGGAGAA 3'
		Reverse	5' CCATTTCTCTATTTAACTCC 3'
B CpG40 OUT	52°C	Forward	5' GGATTTTTGTAGGGGAGAGTGT 3'
		Reverse	5' AAAAAAACAAACCCAAAAAT 3'

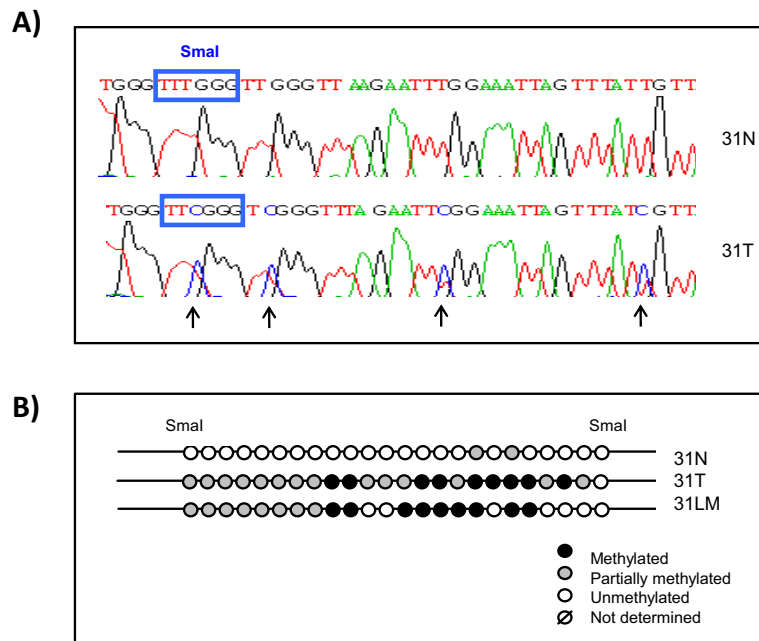
PRIMER NAME	Tm	PRIMERS SEQUENCES	
B CpG40 IN	52°C	Forward	5' GAGGTTAAGAAAGGTTGTAT 3'
		Reverse	5' AAATCTAAATAAACCTCCCC 3'
B CpG25 OUT	54°C	Forward	5' TTTTGATTTAAGGTGTAAGGGT 3'
		Reverse	5' AAAAAAATCAAAACAAAACCC 3'
B CpG25 IN	54°C	Forward	5' TAAAAATATTTTTGGATGGATAGAG 3'
		Reverse	5' AAAAAACCACCCAAACC 3'
B CpG34 OUT	54°C	Forward	5' GGTGGAATTTGTGTTTTAGTG 3'
		Reverse	5' TCTTCCAAAAACAACTACC 3'
B CpG34 IN	54°C	Forward	5' GTGGGAGAGGTTTTTAGGAAT 3'
		Reverse	5' ACCCTCCAAATTCCTATAAAA 3'
B CpG43 OUT	58°C	Forward	5' TAAAGGTTATTTAGGGGTGTAG 3'
		Reverse	5' ACCCTCCTAATCCCTAAC 3'
B CpG43 IN	56°C	Forward	5' AGGAGTGTTTTTTGTTAGTTTG 3'
		Reverse	5' CACCTCAACCTCTTTTAATTC 3'
B2-MICROG	63°C	Forward	5' CCTGGAGGCTATCCAGC 3'
		Reverse	5' GTCGGATGGATGAAACCC 3'
LIG1	65°C	Forward	5' AAGAGGAGGATGAAGCCCTT 3'
		Reverse	5' TTCCTGAATGGTCCGTTTCG 3'
TMEM143	65°C	Forward	5' TCATTCCTTCTCCAAGGAG3'
		Reverse	5' TCAGGGTTGATGGGGTCATA 3'
SYNGR4	65°C	Forward	5' TGAGAAGGCCCAAGACCATC 3'
		Reverse	5' CCACGCTGTTGCTGTTGAGA 3'
KDELR1	65°C	Forward	5' GCGTTCCTGGTCAATCATGA 3'
		Reverse	5' GTTGAAGAGATAGAGCGTGC 3'
GRIN2D	65°C	Forward	5' ATGGTTTCCTCCTGAGCTC 3'
		Reverse	5' AAGCCGTCCTCATTGAAGGA 3'
GRWD1	65°C	Forward	5' GAAGAAGAGCGGAAACCTCA 3'
		Reverse	5' GAAGGAGAAGATGGGCTTCA 3'
FAM83E	65°C	Forward	5' AGGGTCATCTCAGGATCCTA 3'
		Reverse	5' GGCTGAAGGCGTCAACAATT 3'
HCFC1R1	65°C	Forward	5' AATGACCACCCCTACTGCAG 3'
		Reverse	5' GCTCATTATGTCCCAGCT 3'
MMP25	65°C	Forward	5' TGAGGAGACCTGGACTTTTG 3'
		Reverse	5' AGAAGGGCCTCATAATGGAG 3'
ZNF213	65°C	Forward	5' TCAGCGGGATCTCTTCTGG 3'
		Reverse	5' AGGACACAGTCACGTCGCT 3'
ZNF75A	65°C	Forward	5' CCCAGGAAGAATGGGAGTTA 3'
		Reverse	5' CCTTGCTCTAGACAGGAGAT 3'
ZNF434	65°C	Forward	5' GTCAGCAAGAATGGATGTGC 3'
		Reverse	5' AAGAATAGCCAGGAGCGTCT 3'

LC: LightCycler; Tm: melting temperature



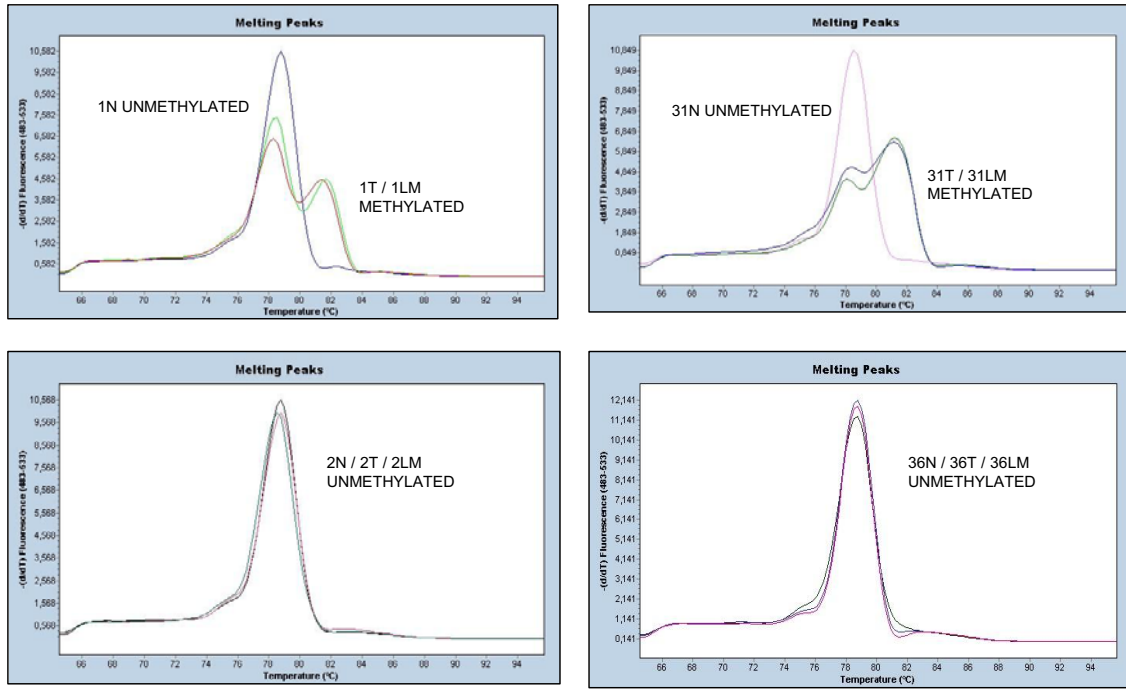
Supplementary Figure 2: Melting peaks for the AUMA band C after HCT116 cell line AZA/TSA treatment.

Cells treated with AZA or AZA+TSA, as expected, are partially unmethylated.



Supplementary Figure 3: Bisulfite sequencing of AUMA band C

A) Comparative bisulfite sequencing between normal and tumor tissue; **B)** Methylation status of the CG groups inside AUMA band C which is flanked by SmaI targets. N: normal colonic mucosa, T: colorectal tumor, LM: liver metastasis. Tumor and LM of case 31 are hypermethylated for band C. SmaI restriction site has different methylation status too.



Supplementary Figure 4: Melting peaks for AUMA band C

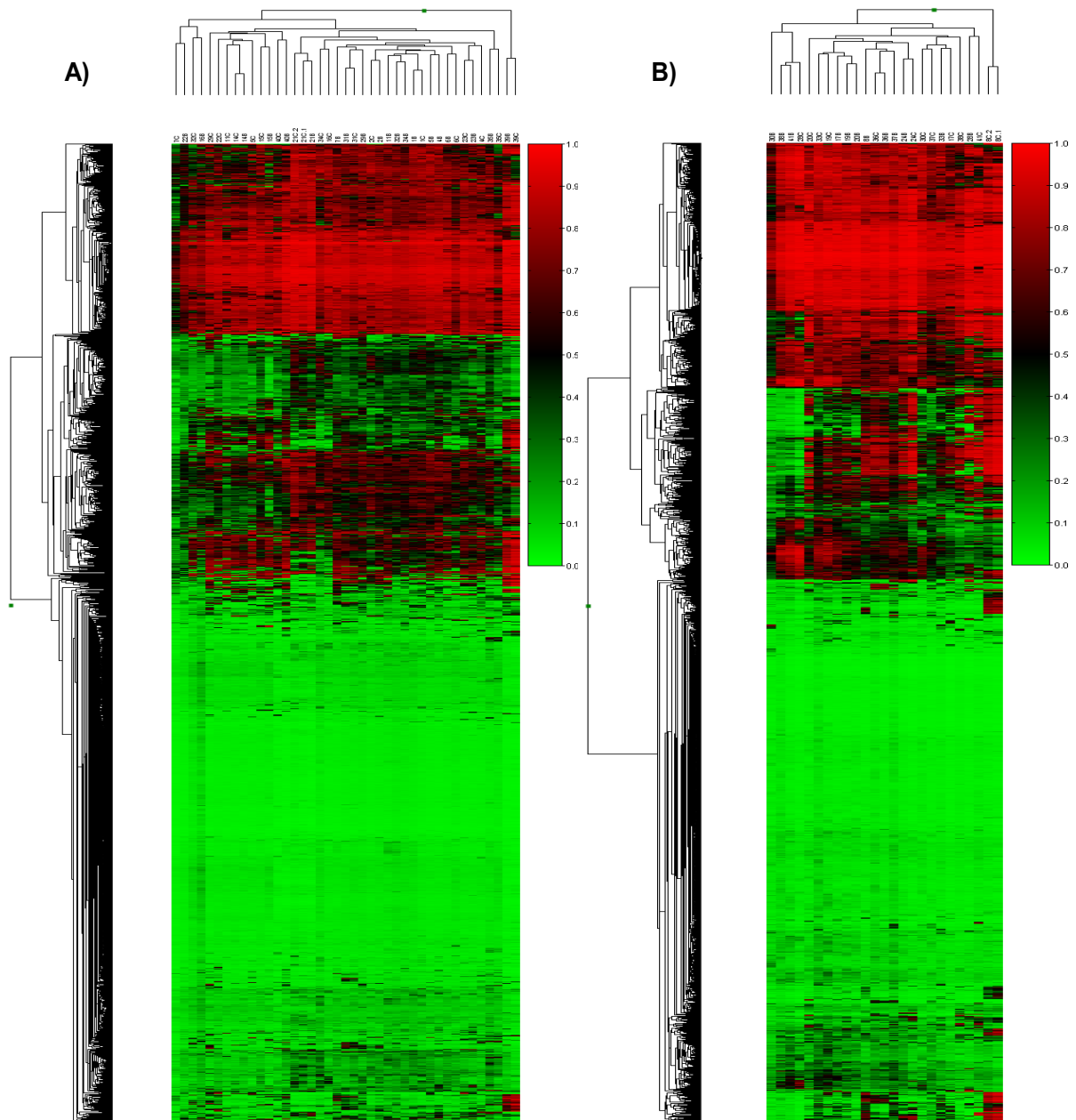
N, T and LM are normal colonic mucosa, colorectal primary tumor and liver metastasis, respectively. 1 and 31 cases are partially hypermethylated in both T and LM samples whereas cases 2 and 36 are unmethylated.

Supplementary Table 2: Most significant overexpressed genes in non methylated tumors within ± 2 Mb far from AUMA band B (Chr19) and C (Chr16)

Gene symbol	AUMA band	Chromosomal location	Sam p-values	q-values
LIG1	B (Chr19)	[-] 53310515-53365372 bp	0.017	0.504
AKT1S1	B (Chr19)	[-] 55064108-55072342 bp	0.025	0.504
PTOV1	B (Chr19)	[+] 55045823-55055809 bp	0.029	0.504
TMEM143	B (Chr19)	[-] 53527425-53559009 bp	0.030	0.504
SR-A1	B (Chr19)	[+] 54832203-54853711 bp	0.033	0.504
GLTSCR2	B (Chr19)	[+] 52940613-52952127 bp	0.035	0.504
C19orf7	B (Chr19)	[-] 52259287-52308849 bp	0.039	0.504
KCNC3	B (Chr19)	[-] 55507011-55528584 bp	0.042	0.504
PRR12	B (Chr19)	[+] 54785625-54821508 bp	0.044	0.504
FAM83E	B (Chr19)	[-] 53795879-53808631 bp	0.045	0.504
SULT2B1	B (Chr19)	[+] 53747241-53794496 bp	0.050	0.504

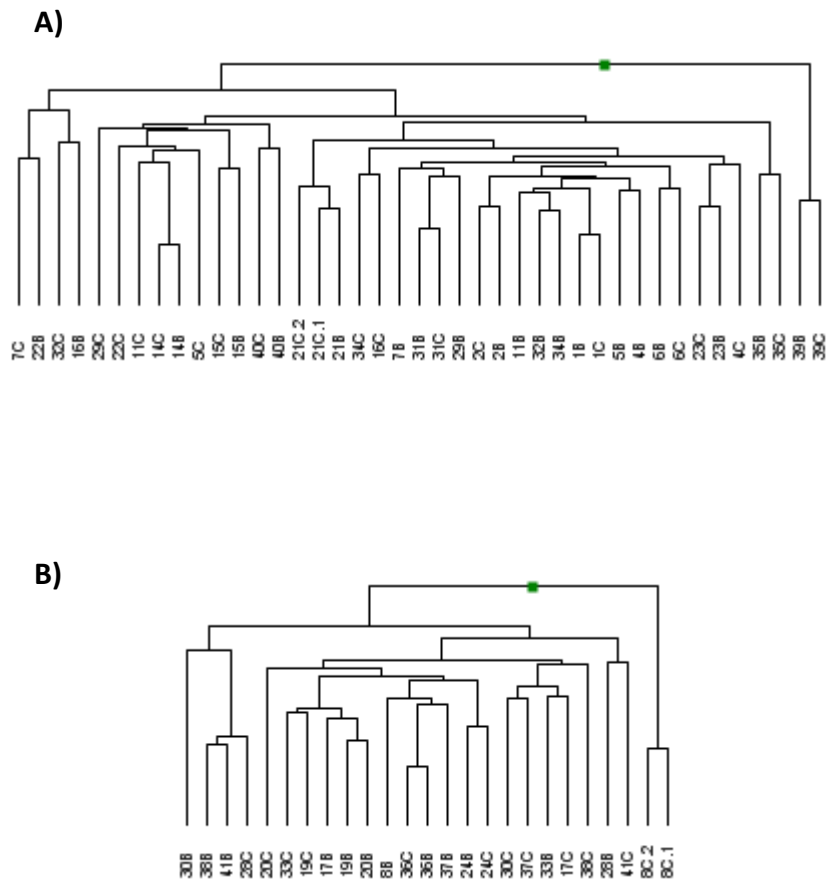
Gene symbol	AUMA band	Chromosomal location	Sam p-values	q-values
TPSB2	C (Chr16)	[-] 1218337-1220215 bp	0.011	0.561
TPSAB1	C (Chr16)	[+] 1230679-1232556 bp	0.011	0.561
ZNF75A	C (Chr16)	[+] 3295485-3308575 bp	0.020	0.561
NOXO1	C (Chr16)	[-] 1968919-1971441 bp	0.040	0.640

In grey, some of the analysed genes by qRT-PCR with AZA/TSA treated HCT116 cells



Supplementary Figure 5: Heatmaps of Illumina methylation microarray

Differential methylation analysis between colorectal primary tumors and paired liver metastases. **A)** Methylation heatmap for the synchronous cases (N=20); **B)** Methylation heatmap for the metachronous cases (N=12).



Supplementary Figure 6: Clustering of Illumina methylation microarray

Differential methylation analysis between colorectal primary tumors and paired liver metastases. **A)** Methylation clustering for the synchronous cases (N=20); **B)** Methylation clustering for the methachronous cases (N=12). Unsupervised hierarchical clustering does not show any apparent pattern that clearly differentiates the samples. B: colorectal primary tumor; C: liver metastasis.



DISCUSSIÓ

La **metàstasi** és la principal causa de mort dels pacients amb càncer i malgrat la gran rellevància clínica d'aquest procés, els gens i vies metabòliques implicades continuen sent bastant desconegudes. En els darrers anys, hi ha hagut avenços importants en la identificació de perfils genètics associats al procés metastàtic, sobretot en càncer de mama (Mook et al., 2009). Respecte a la metàstasi hepàtica (MH), que és la forma de disseminació a distància més habitual en càncer colorectal (CCR), aquests mecanismes no són tan coneguts.

En referència al tractament, tot i ser la cirurgia la millor alternativa per aquests pacients metastàtics, només un 10-25% seran candidats a passar per quiròfan. El tractament adjuvant (posterior a la cirurgia) administrat habitualment a pacients en estadis II/III és del tipus 5-FU/LV + oxaliplatí. Malgrat això, existeix controvèrsia sobre la utilitat clínica de la quimioteràpia adjuvant en pacients de càncer colorectal en estadi II (Gill et al., 2004; Quasar Collaborative et al., 2007). S'estima que aproximadament el 75% d'aquests pacients podrien ser curats de la malaltia gràcies només a la cirurgia sent innecessària la toxicitat associada a la quimioteràpia. Tot i ser un fet secundari, tampoc cal oblidar els elevats costos econòmics que comporta l'administració indiscriminada de fàrmacs. Davant d'aquesta problemàtica clínica i de cost-benefici, en els propers anys serà molt rellevant poder disposar de **factors pronòstic** que permetin seleccionar aquells pacients amb alt risc de disseminació i per tant clars candidats a rebre tractament post-operatori intensiu. Així doncs, queda palesa la necessitat d'invertir esforços en la recerca de nous marcadors metastàtics, sobretot per a aquests pacients en estadi II/III de CCR.

En la majoria d'estudis genètics realitzats en CCR, i en els darrers anys en els estudis genòmics globals, s'utilitzen mostres de tumors primaris, adenomes o mucoses de còlon normal sent poc freqüent l'ús de mostres metastàtiques (Jorissen et al., 2009; Li et al., 2004; Nadal et al., 2007).

En el present treball, hem estudiat les MHs utilitzant eines d'anàlisi global. Així, hem analitzat tant els canvis **epigenètics** com d'**expressió gènica** amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement de les bases moleculars de la disseminació del CCR al fetge. Està més que reconeguda a la literatura l'estreta relació entre grau de

metilació i nivells d'expressió (Herman and Baylin, 2003); és per aquest motiu que en aquest treball es vol integrar els dos conceptes i obtenir així una visió conjunta pel procés metastàtic.

Per dur a terme aquest estudi vam creure convenient la utilització de mostres de pacients aparellades de tumor primari de còlon i metàstasi hepàtica. Vam pensar que aquesta aproximació era una de les millors formes d'obtenir dades no esbiaixades, on la variabilitat entre mostres estaria minimitzada i els canvis identificats es donarien en un mateix *background* genètic. D'aquesta manera, ens assegurem que les possibles alteracions trobades siguin específiques de metàstasi. La sèrie de pacients utilitzada al primer *screening* tan de metilació com d'expressió consta de 40 mostres aparellades. Una sèrie d'aquestes característiques té un gran valor a nivell molecular i poder disposar d'aquest material biològic, tot i semblar fàcil, no ho és. La dificultat de trobar casos aparellats es fonamenta per diversos motius: **(a)** les cirurgies del tumor i de la metàstasi molt sovint es realitzen en hospitals diferents; **(b)** manca de banc de tumors en un dels dos hospitals; **(c)** falta de mostres al banc, ja sigui per una quantitat insuficient de teixit un cop agafat el necessari per al diagnòstic, o per les noves estratègies quirúrgiques utilitzades com la radiofreqüència (Knudsen et al., 2009) o els tractaments de quimioteràpia neoadjuvant que poden danyar el teixit o causar necrosi tumoral; **(d)** la qualitat dels teixits emmagatzemats de vegades no és prou bona.

La discussió d'aquesta tesi està organitzada segons la cronologia dels experiments realitzats al laboratori, és a dir, es va començar amb els estudis de metilació i després es va seguir amb els d'expressió. Tot i això, al llarg de la mateixa, s'intenta integrar ambdues visions obtingudes.

La tècnica d'AUMA (Amplification of Un-Methylated Alu) ens ha permès generar perfils de metilació diferencial entre tumors primaris i MHs. Quan vam començar aquesta part del treball, hi havia dades a la literatura que suggerien la no existència de canvis de metilació específics de metàstasi i proposaven que aquestes diferències succeïen en estadis inicials del procés tumoral (Bai et al., 2004; Kim et al., 2006; Lee et al., 2004; Rashid et al., 2001). Tot i això, i degut a la importància clínica que això

suposaria, junt amb la sèrie de mostres aparellades disponible, es va voler aplicar la tècnica de *screening* d'AUMA. Es tracta d'un abordatge diferent i innovador que en el nostre laboratori anteriorment ja havia demostrat la seva utilitat en la identificació de regions rellevants en tumors colorectals (Rodriguez et al., 2008). Tot això ens va encoratjar a fer aquest tipus d'abordatge per intentar identificar alguna regió cromosòmica diferencialment metilada en MHs. Malauradament, no s'han obtingut canvis importants entre tumors i MHs en els casos aparellats analitzats indicant que les diferències de metilació apareixen durant els estadis més inicials de la malaltia tal i com s'havia suggerit en prèvies publicacions.

De totes maneres, tot i no ser l'objectiu inicial del treball, s'ha volgut aprofundir en l'estudi d'algunes bandes d'AUMA diferencialment metilades entre mostres aparellades de tumors primaris i mucoses normals de còlon.

En el nostre estudi, el principal inconvenient de la metodologia d'AUMA, sense oblidar que es tracta d'una tècnica de "fishing", és clarament l'alta taxa de falsos positius que s'obtenen. Només la meitat de bandes seleccionades (5/10) amb canvis de metilació recorrents entre mucosa normal i tumor primari han pogut ser validades a la diana de restricció Smal. Això és degut a l'alta sensibilitat de la tècnica d'AUMA, que en definitiva es basa en una amplificació per PCR i que per tant permet amplificar/visualitzar fragments no metilats tot i trobar-se en baixes proporcions i sent no representatius del global de la mostra. La validació dels resultats d'AUMA s'ha fet mitjançant dues tècniques diferents amb previ tractament de l'ADN per bisulfit sòdic: **(a)** seqüenciació i **(b)** corbes de *melting*. Ambdues tècniques ens permeten discriminar els fragments amb diferències de metilació puntuals només a la diana Smal, probablement amb poca repercussió funcional, d'aquells canvis amb afectació dels grups CG propers i per tant de major importància biològica, ja que podrien ser indicadors de canvis en gens propers. Per aquest motiu, el nombre de mostres amb metilació diferencial segons els *fingerprints* d'AUMA és més elevat que l'obtingut segons les corbes de *melting* (LightCycler). Els resultats d'AUMA fan referència a canvis que afecten només a les dianes Smal que flanquegen un determinat fragment amplificat sense tenir en compte els grups CG del voltant.

En els darrers anys, ha anat adquirint rellevància el concepte de regulació coordinada de l'expressió gènica per metilació de regions cromosòmiques específiques. Recentment, s'ha demostrat l'existència d'aquests patrons a la regió 2q14.2 (Frigola et al., 2006; Mayor et al., 2009).

És preferible estudiar una metilació diferencial que afecti una regió genòmica gran i és per aquest motiu que es va decidir continuar els experiments amb dues de les 5 bandes d'AUMA amb canvis de metilació validats a la diana Smal, que són les anomenades banda B (19q13.32) i banda C (16p13.3) amb un 28% i 33% de tumors colorectals amb diferències de metilació segons corbes de *melting*, respectivament.

Per tal d'estudiar la magnitud de les diferències de metilació a les bandes B i C s'ha fet un anàlisi per seqüenciació d'ADN tractat prèviament amb bisulfit de les illes CpG veïnes i s'ha vist que no es tracta de canvis molt extensos al genoma. De totes maneres, ambdues bandes d'AUMA corresponen a canvis de metilació bastant recurrents (~30%) fet que ens fa pensar que podrien tenir algun significat biològic, de moment desconegut, i més tenint en compte la seva localització dins el genoma. La banda B cau just dins un gen anomenat *TMEM143*, una proteïna de transmembrana, mentre que la banda C es troba en una regió rica en illes CpG i concretament dins l'illa CpG63.

Tot i el handicap dels falsos positius, la tècnica d'AUMA és una enginyosa aproximació que pot ser de gran utilitat en altres patologies, permetent "pescar" diferències de metilació a les seqüències Alu i així, de forma indirecta, com a indicador genòmic, descobrir possibles canvis de metilació propers amb repercussió funcional. Serveix de precedent un estudi que amb la utilització d'una metodologia similar a l'AUMA anomenada AIMS (Amplification of InterMethylated Sites) es va descobrir una regió de 4Mb al cromosoma 2q14.2 recurrentment hipermetilada en càncer colorectal (Frigola et al., 2006).

En una etapa més tardana del treball, i en col·laboració amb el grup del PEBC, es va fer un segon intent per determinar diferències de metilació específiques de MH. Es va realitzar el *microarray* de metilació GoldenGate Methylation Cancer Panel I

(Illumina, Inc.) que permet analitzar la metilació del promotor de 807 gens relacionats amb càncer, però aquesta aproximació tampoc va donar resultats favorables. El *cluster* de classificació no supervisat dels 32 casos analitzats (els mateixos prèviament analitzats per AUMA) no mostra cap tipus de diferenciació entre tumors primaris i metàstasis. De fet, fins i tot es poden veure tumors primaris junts amb les corresponents MH aparellades suggerint un patró de metilació similar entre ells.

Paral·lelament a l'anàlisi de metilació, s'han obtingut perfils d'expressió utilitzant *arrays* d'Affimetrix (Affy HGU 133 plus 2.0) per tal d'identificar diferències en els nivells transcripcionals entre tumors primaris de còlon i MHs aparellades. La necessitat d'una molt bona qualitat de l'ARN ha fet que només hagi estat possible hibridar 19 dels 40 casos aparellats de què disposàvem inicialment. El procediment de recollida de mostres al banc de tumors podria ser la causa d'aquesta pèrdua de casos útils.

Si comparem els *clusters* de classificació obtinguts a partir dels *arrays* d'expressió i de metilació per aquestes 19 mostres aparellades veiem que els resultats concorden bastant. De les 8 parelles de tumor i MH que apareixen juntes en una mateixa branca del *cluster* d'expressió, 6 continuen estant juntes en el *cluster* de metilació. I d'altra banda, de les 11 parelles distants transcripcionalment parlant, 8 són també distants respecte a patrons de metilació. Curiosament, aquesta tendència de trobar patrons d'expressió/metilació semblants entre mostres aparellades és més habitual en casos **sincrònics** (diagnòstic simultani del tumor primari i de la MH), mentre que en els casos metacrònics existeix una major distància entre tumors i metàstasis, fet que pot indicar una evolució divergent al llarg del temps.

Recuperant el tema de l'AUMA i amb la intenció d'interrelacionar metilació amb nivells d'expressió s'ha aprofitat les dades del *microarray* d'Affimetrix (mateixa sèrie de tumors utilitzada en l'AUMA) per tal d'estudiar si els gens situats fins a 2Mb lluny de les bandes B i C estan afectats pels canvis de metilació trobats, entenent que en les mostres hipermetilades es podria donar silenciament gènic (Herman and Baylin,

2003). Dissortadament, no s'ha vist cap associació significativament estadística, suggerint que no existeix regulació gènica per metilació en aquests punts analitzats.

Tot i la manca de significació, han estat seleccionats 12 gens propers a les bandes B/C que estan sobreexpressats, segons dades de l'*array*, en el grup de tumors no metilats. Amb l'objectiu de saber si aquests gens estan regulats per metilació, s'ha fet RT-PCR quantitativa en cèl·lules HCT116 tractades amb AZA (agent desmetilant de l'ADN) i TSA (acetilador d'histones). S'ha pogut comprovar que la majoria d'ells, exceptuant *LIG1* i *HCFC1R1*, són gens d'expressió regulada per metilació ja que la línia desmetilada (tractada amb AZA) mostra nivells transcripcionals més elevats que la *wild-type*. De totes maneres, en cap cas podem afirmar que aquesta regulació sigui dependent de l'estat de metilació concret de les bandes B i C. És curiós que pel gen *TMEM143* no haguem obtingut uns resultats més favorables, tal i com esperàvem, doncs es tracta del gen dins el qual es troba localitzada la banda B. Per aquest gen veiem nivells d'expressió molt similars abans i després del tractament. Els resultats més rellevants els trobem pel gen *ZNF75A* (140Kb lluny de la banda C) l'expressió gènica del qual es triplica quan HCT116 rep tractament amb AZA i arriba a ser 6 vegades superior després del tractament amb AZA + TSA. No existeix informació a la literatura en referència a aquest gen, però sabem que pertany a la família d'enzims associats a zinc i que típicament actuen com a reguladors transcripcionals. Queda pendent en aquest estudi l'anàlisi de metilació de la regió promotora del gen *ZNF75A* amb una sèrie gran de tumors colorectals per tal d'avaluar-ne la seva possible implicació.

Pel que fa a l'anàlisi estadístic de les dades de l'*array* d'expressió d'Affimetrix s'ha obtingut una llista de 1374 sondes diferencialment expressades entre tumors primaris de còlon i MHs aparellades amb un False Discovery Rate (FDR) de l'1% i una *log-ratio* superior a 0,5 en valors absoluts. És a dir, que en la llista proposada acceptem una taxa d'error de l'1% i que, a més a més, tots els gens tenen canvis d'expressió moderats, amb diferències de com a mínim 1,4 vegades entre tumors i metàstasis ($fold\ change = 2^{log-ratio}$). Crida l'atenció que la majoria de sondes de la llista són d'infraexpressió en MH (1268 sondes amb *log-ratio* entre -3,8 i -0,5) en

comparació amb les de sobreexpressió (106 sondes amb *log-ratio* entre +0,5 i +2,7) que suposen només el 8% del total. Tot i ser curiosos, aquests resultats són similars als obtinguts en una publicació anterior on s'utilitzava una aproximació experimental semblant a la nostra (Ki et al., 2007). Els motius d'aquest desequilibri podrien ser: **(a)** la inactivació de gens supressors tumorals a la MH és necessària per permetre la disseminació a distància, **(b)** la sobreactivació d'oncògens al tumor primari fa que, comparativament, l'expressió gènica en la metàstasi sigui inferior, **(c)** alguns gens metastàtics estan ja sobreexpressats en el tumor primari sent poca la diferència amb la MH.

En un primer anàlisi de les dades vam obtenir gens sobreexpressats en MH que estaven típicament relacionats amb expressió específica de fetge normal, com per exemple l'albumina o el fibrinogen, entre altres. Per tal d'evitar aquest emmascarament de les dades possiblement a causa de la contaminació de les mostres amb hepatòcits normals o estroma, es va procedir a l'eliminació de les sondes específiques de fetge. Aquest fet que ens permet guanyar en especificitat, té el risc de la pèrdua de gens potencialment rellevants. Aquesta podria ser una altra causa que explicaria el baix nombre de sondes sobreexpressades en MH, però vam preferir perdre possibles gens metastàtics a canvi d'assegurar els resultats obtinguts. D'altra banda, aquest procés de substracció no el vam realitzar per als gens d'expressió específica del còlon normal, doncs entenem que la cèl·lula tumoral, tant al tumor primari com a la metàstasi, té el seu origen a l'epiteli normal del còlon, i per tant s'espera certa similitud transcripcional amb el còlon normal. A més a més, la reacció estromal al tumor primari és menys evident i generalitzada que en les MHs.

Per tal d'obtenir una llista de gens més reduïda i més manejable s'ha construït una signatura metastàtica (classificador) que inclou 7 gens específics de MH de CCR: *MMP3*, *MMP1*, *CYP1B1*, *CLCA4*, *MS4A12*, *SPP1* i *CEACAM7*. Tots ells són gens amb *log-ratios* majors a 2, es a dir, amb canvis d'expressió de més de 4 vegades entre tumors i metàstasis; *CYP1B1* i *SPP1* són gens sobreexpressats en MH mentre que la resta són gens infraexpressats. L'objectiu en l'elaboració de la signatura va ser obtenir el mínim nombre de gens capaços de classificar correctament tumors

primaris i MHs amb el mínim error possible, que ha estat del 5,3%. Nosaltres ens hem centrat en l'estudi d'aquests 7 gens però, de totes maneres, no hem de descartar la resta de candidats de la llista generada doncs són igualment interessants i cal tenir-los en compte per a posteriors estudis.

Gairebé tots els gens de la signatura proposada havien estat citats anteriorment a la bibliografia fent referència a la seva implicació en processos tumorals. **MMP1** i **MMP3** són dos metalloproteïnases clàssiques que intervenen en la metastasi degradant la matriu extracel·lular i permetent la mobilitat i invasió cel·lular (Asano et al., 2008; Sunami et al., 2000; Zucker and Vacirca, 2004). S'ha vist associació del gen **CYP1B1**, enzim metabolitzant de carcinògens, amb tumors de tot tipus com glaucoma (Suri et al., 2009), càncer d'endometri (Saini et al., 2009) o de pulmó (Su et al., 2009) i concretament en CCR, alguns polimorfismes de **CYP1B1** són factors de risc a patir la malaltia (Bethke et al., 2007; Cotterchio et al., 2008). **CLCA4** no s'havia relacionat mai abans amb tumorigènesis però és un transportador iònic encarregat de la regulació de l'epiteli intestinal (Comelli et al., 2009). **MS4A12** és un gen que intervé en l'entrada de calci a la cèl·lula fent disminuir el llindar de concentració d'**EGF** necessària per a l'activació de la via d'**EGFR**, una de les principals vies alterades en CCR que contribueix en el fenotip tumoral (Koslowski et al., 2008; Koslowski et al., 2009). El gen **SPP1**, també conegut com "osteopontina", és un marcador de progressió tumoral en càncer colorectal, així com en altres tipus de tumors, que és capaç d'interaccionar amb receptors de tipus integrines i participar en processos d'adhesió, mobilitat, invasió o angiogènesi (Agrawal et al., 2002; Irby et al., 2004). Finalment, **CEACAM7** s'ha vist infraexpressat en adenomes i pòlips hiperplàtics en comparació amb l'epiteli normal del còlon (Scholzel et al., 2000).

La validació de la signatura metastàtica s'ha fet per RT-PCR quantitativa a partir de mostres aparellades independents a les utilitzades en l'*array* d'expressió. Així evitem males interpretacions i ens assegurem que els casos validats són canvis significatius i reproduïbles amb una sèrie de mostres i una tècnica diferents. Tot i això, només 3 dels 7 gens de la signatura (**SPP1**, **CYP1B1** i **MMP3**) han estat validats de forma estadísticament significativa; l'expressió dels altres 4 gens, tot i no ser significativa,

segueix la tendència de sobre/infraexpressió esperada segons els resultats previs de l'*array*. No ens hauríem de preocupar gaire per la manca de significació doncs la causa més probable és la reduïda mida de la sèrie de validació (N=12). Si de les 40 mostres aparellades que teníem en un principi traiem les mostres hibridades a l'*array* (N=19) i les mostres descartades per ARN de baixa qualitat ens quedem amb una sèrie de validació de només 12 mostres aparellades de tumor primari i MH.

Un dels factors més importants en la supervivència dels pacients de CCR és la presència de MH. És per això que es va decidir avaluar si el nostre classificador tenia capacitat per pronosticar disseminació al fetge. Aquesta aproximació parteix de la hipòtesi que canvis d'expressió específics de MH, de fet, ja podrien ser presents al tumor primari, però d'alguna forma menys evident. Això ens indicaria que aquests canvis es troben "amplificats" a la MH. Es tracta d'una hipòtesi que ja havia estat suggerida anteriorment per diferents autors (Bernards and Weinberg, 2002; Nguyen and Massague, 2007).

Des d'un punt de vista clínic, seria interessant obtenir **factors pronòstic** de disseminació que d'alguna manera ajudessin als oncòlegs a determinar la necessitat d'aplicar un tractament més o menys agressiu per a cada pacient fomentant així els tractaments dirigits o individualitzats. Tot i això, a la pràctica, serien necessaris els corresponents estudis prospectius, i si pot ser randomitzats, abans de prendre cap decisió terapèutica. Per començar, podria ser útil fer un seguiment més continuat dels pacients amb risc de desenvolupar MH. La utilitat dels factors pronòstic existeix sobretot a l'hora de pronosticar metàstasis metacròniques i micrometàstasis. Per als casos sincrònics, les MH es poden detectar utilitzant eines de diagnòstic per imatge com la tecnologia de PET/CT o, fins i tot, al mateix moment de la cirurgia del còlon. A més, en els casos sincrònics, l'avantatge que comporta l'anticipació a la metàstasi deixa de tenir sentit.

Per aquest motiu, l'anàlisi sobre la capacitat pronòstica s'ha fet a partir d'una sèrie independent de tumors metastàtics a fetge (N=61), la majoria dels quals són casos metacrònics, i una altra de tumors no metastàtics (N=40) que en un període de 5 o més anys des del moment de la colectomia no han desenvolupat MH. Tots els casos

han estat seleccionats per tenir afectació dels nòduls limfàtics i per tant ser estadis avançats de la malaltia (estadis III/IV). Tots ells eren, des d'un punt de vista clínic, possibles candidats a fer metàstasi a distància mentre que és menys habitual que pacients sense afectació limfàtica siguin de mal pronòstic i acabin desenvolupant MH ja que acostumen a ser diagnòstics en estadis més inicials. Ambdues sèries utilitzades són també homogènies pel que fa a la localització del tumor (còlon o recte), edat i sexe dels individus. La homogeneïtat és necessària per tal d'obtenir resultats comparables.

La nostra hipòtesi es va confirmar ja que 3 dels 7 gens de la signatura *MS4A12* ($p=1.65e-06$), *CYP1B1* ($p=0.01634$) i *CLCA4* ($p=0.04192$) estan significativament sobreexpressats en el grup de tumors metastàtics en comparació amb els no metastàtics, segons un anàlisi de regressió logística univariant a partir dels resultats de RT-PCRq. Quan fem el mateix anàlisi a partir de les mucoses normals de còlon, *CYP1B1* deixa de tenir significació estadística però es manté per a *MS4A12* ($p=2e-5$) i *CLCA4* ($p=0.00207$) afegint a la llista *SPP1* ($p=0.00259$).

L'anàlisi de la capacitat de pronòstic (*Random forest*) es va fer de dues formes diferents. Es van comparar els tumors no metastàtics (N=40) amb **(a)** els tumors metastàtics sincrònics i metacrònics junts (N=61) i **(b)** només amb els tumors metacrònics (N=40), pels motius d'interès clínic ja descrits anteriorment. En ambdós casos l'aplicació estadística utilitzada va seleccionar automàticament *MS4A12* i *CYP1B1* com els gens més importants a l'hora de discriminar pacients amb risc de patir MH. Si s'agafen els casos metacrònics i sincrònics junts, aquests dos gens aconseguen una probabilitat d'encert del 82% quan s'aplica el mètode de *leave-one-out cross-validation* i del 80% si s'utilitza el *4-fold cross-validation*. El mètode de *leave-one-out* es basa en elaborar un predictor amb totes les mostres excepte una la qual s'utilitzarà per a la validació mentre que el mètode *4-fold* divideix les mostres a l'atzar en 4 grups utilitzant-ne 3 per fer el predictor i el quart per validar-lo. D'altra banda, s'obtenen alts percentatges de sensibilitat (87%) i especificitat (75 i 70%). Entenem com a sensibilitat la proporció de tumors metastàtics correctament classificats i com a especificitat la proporció dels no metastàtics. Des d'un punt de

vista clínic, és preferible equivocar-se i classificar malament un pacient no metastàtic com a metastàtic que no pas a l'inrevés. És a dir, que per a l'aplicabilitat clínica d'un marcador pronòstic és més important obtenir una sensibilitat alta, com en aquest cas s'obté, on a la vegada l'especificitat tampoc és dolenta. Per tal de millorar els percentatges d'encert una possibilitat seria afegir altres marcadors pronòstic que juntament amb *MS4A12* i *CYP1B1* permetessin una millor classificació dels pacients.

Si s'agafen només els casos metastàtics metacrònics, els percentatges són molt semblats situant-se també al voltant del 80% d'encerts.

Malgrat que *MS4A12* i *CYP1B1* eren els gens amb més potencial pronòstic segons el mètode de classificació estadístic utilitzat, es va voler comprovar quina era la probabilitat d'encerts quan s'utilitzaven les dades d'expressió dels 7 gens de la signatura metastàtica. Els percentatges van resultar ser bastant similars i fins i tot una mica inferiors als obtinguts al primer anàlisi ja que introduïm "soroll" o variables no informatives. Per tant, es va concloure que els gens *MS4A12* i *CYP1B1* eren suficients per pronosticar MH. A més a més, si algun dia s'arribés a fer diagnòstic molecular de rutina, per qüestions de temps i costos econòmics, sempre és preferible l'anàlisi del menor nombre de variables possible que permetin obtenir un mateix resultat i així és més fàcil aconseguir reproductibilitat tècnica.

Davant uns resultats tan favorables a partir dels nivells d'expressió dels tumors primaris, ens vam preguntar què passaria si intentéssim fer el mateix però ara amb els nivells d'expressió de les **mucoses normals de còlon** dels mateixos casos analitzats. Vam hipotetitzar que potser podria existir una predeterminació o predisposició a desenvolupar MH en el teixit normal epitelial dels pacients amb CCR. L'anàlisi de capacitat de pronòstic es va fer a partir de **(a)** els 7 gens de la signatura, **(b)** els gens importants segons el programa estadístic i **(c)** només *MS4A12* i *CYP1B1*. Aquesta vegada el programa va seleccionar *CYP1B1*, *MS4A12*, *SPP1* i *CLCA4* com a gens importants en l'anàlisi de casos metacrònics i, d'altra banda, *MS4A12*, *CYP1B1* i *CEACAM7* en l'anàlisi conjunt de casos sincrònics i metacrònics. Una altra vegada la probabilitat d'encert rondava el 80% en tots els anàlisis realitzats conclouent per

segon cop que els nivells d'expressió de *MS4A12* i *CYP1B1* són suficients per pronosticar MH. Aquests resultats suggereixen que alguns gens associats a CCR tenen la seva expressió gènica ja alterada al teixit no tumoral del còlon com alguns estudis previs ja havien proposat (Barrier et al., 2005; Barrier et al., 2007).

Vist l'èxit obtingut sobre la capacitat pronòstica de MH (~80% d'encerts) de *MS4A12* i *CYP1B1*, tant a partir de mostres tumorals com normals, creiem que seria convenient repetir l'experiment però aquesta vegada amb una sèrie de casos metastàtics i no metastàtics molt més àmplia que contingui tumors en diferents estadis, no només estadis III/IV, per tal de veure si aquests resultats són reproduïbles. Si es tornessin a confirmar els resultats en sèries independents, aquests podrien arribar a tenir importants repercussions en el tractament dels pacients de CCR. El tractament quimioteràpic podria ser més intensiu en els casos de risc de MH, juntament amb un seguiment més continuat, i a la vegada evitar toxicitats associades als fàrmacs en casos innecessaris (problemàtica cost-benefici). D'altra banda, la llista complerta de gens metastàtics obtinguda serà de gran utilitat clínica per la recerca de noves dianes terapèutiques dirigides a la metàstasi hepàtica de càncer colorectal.

Si ara recuperem el tema de l'*array* de metilació (GoldenGate Methylation Cancer Panel I, Illumina Inc.), veurem que es va mirar l'estat de metilació del promotor de 4 dels 7 gens de la signatura metastàtica (*CYP1B1*, *SPP1*, *MMP1* i *MMP3*). Tot i haver hibridat els mateixos casos utilitzats en l'estudi d'expressió, no s'ha vist cap canvi de metilació significatiu entre tumors i MHs ni per a *CYP1B1* ni per als altres gens. De totes maneres, s'ha descrit *CYP1B1* a la literatura com un gen relacionat amb metilació diferencial en diferents tipus de tumors (Habano et al., 2009; Tokizane et al., 2005) i per això estava inclòs a la plataforma d'Illumina (807 gens). Vam creure convenient estudiar la metilació de *MS4A12* per mètodes convencionals ja que aquest gen no estava inclòs a l'*array*, però al final no s'ha fet perquè es tracta d'un gen sense illa CpG a la regió promotora.

D'altra banda, seria interessant estudiar si el gen *MS4A12* podria servir com a possible **factor predictiu** de resposta a cetuximab (erbitux) (Koslowski et al., 2008),

un anticòs monoclonal contra *EGFR* que s'administra actualment a pacients metastàtics de CCR amb nivells elevats d'aquest gen. La via de senyalització d'*EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) està involucrada en el desenvolupament i progressió de molts tipus de tumors, inclosos els tumors colorectals, mitjançant la regulació de la proliferació, apoptosi, diferenciació i migració cel·lular (Nicholson et al., 2001). Recentment, s'ha descrit a partir d'experiments *in vitro*, que la sobreexpressió de *MS4A12*, regulada pel factor de transcripció *CDX2* (Koslowski et al., 2009), fa que sigui necessària menys quantitat d'*EGF* per a l'activació de la via de senyalització d'*EGFR* (Koslowski et al., 2008). D'altra banda, *MS4A12* fa augmentar la concentració de calci intracel·lular degut a la relació entre *EGF* i els mecanismes d'entrada de Ca^{+2} a la cèl·lula (Bryant et al., 2004). Així doncs, la concentració d'*EGF* requerida per tal d'activar *EGFR* sembla ser inversament proporcional a la de *MS4A12*. S'hauria d'estudiar si la presència de nivells alts de *MS4A12*, igual com succeeix amb la mutació de *KRAS* (Siena et al., 2009), podria ser un biomarcador predictiu de resposta a cetuximab indicant un possible efecte no positiu del fàrmac. Evidentment, varis experiments sobre el tema serien necessaris per confirmar aquesta hipòtesi.

Amb l'objectiu de conèixer millor on es produeix l'expressió gènica de *MS4A12* i *CYP1B1*, s'ha fet microdissecció per captura làser de mostres aparellades de tumors i MHs per tal de determinar si es tracta de gens d'expressió específica de cèl·lula tumoral i/o estromal. Ambdós gens s'expressen en els dos tipus cel·lulars trobant-se els nivells transcripcionals més elevats en l'estroma de la MH. Així doncs, aquests resultats recolzen la idea que la reacció estromal té un paper clau en la progressió i desenvolupament tumoral com prèviament ja s'havia descrit a la bibliografia (Gout and Huot, 2008; Joyce and Pollard, 2009). Cal destacar la dificultat de treballar amb mostres de microdissecció doncs és difícil obtenir bona qualitat i quantitat d'ARN. Així doncs, de les 54 mostres processades, només han estat útils 35 (65%) per l'anàlisi de *MS4A12* i 26 (48%) pel de *CYP1B1*.

Tot i no aparèixer en els articles adjunts en aquesta tesi, i per confirmar els resultats obtinguts amb les mostres de captura làser, s'ha fet RT-PCR quantitativa a partir de

fibroblasts en cultiu provinents de 4 tumors de CCR. S'ha vist que *MS4A12* i *CYP1B1* juntament amb *MMP1*, *MMP3* i *SPP1* són gens expressats tant en el component epitelial com en l'estromal. Els únics gens de la signatura específics de cèl·lula tumoral han estat *CLCA4* i *CEACAM7*. Aquests resultats confirmen que és important el concepte de metastasi com el conjunt de cèl·lula tumoral i fibrosi on ambdós components tenen papers igualment importants. És un error intentar estudiar només el tumor i menysprear el valor funcional de l'estroma acompanyant com alguns estudis previs han proposat (D'Arrigo et al., 2005).

Finalment, no hem d'oblidar la importància que implica haver establert un model murí específic de MH de càncer colorectal a partir de les línies cel·lulars humanes *HCT116* i *KM12C* injectades via intraesplènica, després d'haver realitzat els experiments pertinents amb 13 línies diferents de CCR. La finalitat del model animal és intentar reproduir o simular *in vivo* el procés metastàtic que pateixen els pacients a la realitat. Les condicions que millor reproduirien el procés metastàtic s'aconseguirien a partir d'un model ortotòpic (implant al mateix òrgan d'origen) en aquest cas al còlon i esperar que es produís la disseminació de forma natural (Flatmark et al., 2004). El màxim inconvenient d'aquest procediment és el temps que cal esperar i que es pot reduir amb la injecció intraesplènica (a la melsa) o intracardíaca via parenteral (Robertson et al., 2008).

En la comparació de l'expressió gènica *wild-type* (WT) de *MS4A12* i *CYP1B1* en les línies cel·lulars abans d'injectar-les i un cop crescuda la MH en ratolins atímics hem obtingut resultats inesperats. Tot i haver observat anteriorment sobreexpressió de *CYP1B1* en MH en comparació amb els tumors primaris aparellats, en aquest cas veiem majors nivells transcripcionals d'aquest gen en les cèl·lules WT. D'altra banda, en el cas de *MS4A12* prèviament descrit com un gen d'infraexpressió en MH, tot i que no validat significativament, veiem una tendència a una major expressió en les MH crescudes en ratolins. Aquests resultats que *a priori* semblen contradictoris han estat obtinguts amb *primers* específics d'humà i per tant només s'ha valorat els nivells d'expressió a la cèl·lula tumoral per si sola. Una possible explicació podria ser que *MS4A12* i *CYP1B1* són dos gens de gran importància al component estromal i

més tenint en compte els resultats obtinguts a partir de les mostres de microdissecció làser.

Aquest model de MH serà de gran utilitat en un futur pròxim. En aquests moments s'està duent a terme un experiment que es basa en l'estudi funcional dels gens *MS4A12* i *CYP1B1* en el desenvolupament metastàtic al fetge. S'ha obtingut transfeccions estables d'aquests gens en 3 línies cel·lulars humanes de càncer de còlon (*RKO*, *HCT116* i *LoVo*) que prèviament es van seleccionar perquè, en la forma *wild-type*, presentaven nivells transcripcionals baixos dels gens en qüestió. Es vol estudiar si la sobreexpressió de *MS4A12* i/o *CYP1B1* en aquestes línies exerceix algun tipus d'influència en l'agressivitat metastàtica al model *in vivo*. Aquest experiment juntament amb altres experiments *in vitro* de migració, proliferació, invasió, formació de colònies (*cloning assay*) i curació de ferides (*wound healing*) ens ajudaran a determinar la implicació funcional d'aquests gens en la metàstasi hepàtica de CCR.

Resumint, els anàlisis globals de dades amb *microarrays* de tot tipus, incloent els de metilació i d'expressió gènica utilitzats en aquest treball, són una eina molt valuosa en la recerca de nous gens candidats que permet avaluar de forma ràpida i simultània molts gens en un sol experiment. Malgrat els evidents inconvenients que existeixen com són l'elevat cost econòmic de la tècnica o la variabilitat interexperimental, en cap cas hauríem d'infravalorar el potencial d'aquestes noves tecnologies. Per tal d'evitar el problema de la variabilitat s'haurien de fer experiments a partir de sèries mostrals grans (Ein-Dor et al., 2006) fet que és complicat degut a la limitació econòmica. Tot i la manca de concordança entre llistes de gens proposades a la bibliografia, s'ha vist que els resultats obtinguts són congruents ja que es tracta de gens relacionats amb funcions biològiques semblants (Lin et al., 2007).

Així doncs, podem concloure que els anàlisis massius de dades utilitzats en aquest estudi ens han permès obtenir canvis específics de MH de CCR en l'expressió gènica, no en la metilació de l'ADN, que ens poden obrir moltes portes en el coneixement i comprensió del procés metastàtic. Encara són molts els experiments necessaris per

treure benefici de la gran quantitat de dades generades. De moment, la dada més rellevant que s'ha obtingut en aquest treball és la possible utilitat clínica de *MS4A12* i *CYP1B1*, dos gens que semblen tenir un important potencial com a factors pronòstic de metàstasi hepàtica en càncer colorectal.



CONCLUSIONS

- No existeixen diferències de metilació a l'ADN, segons resultats obtinguts amb les tècniques d'AUMA i d'arrays de metilació, entre mostres de tumors primaris de còlon i metàstasis hepàtiques (MHs) aparellades. Per tant, el nostre estudi ens indica que els canvis de metilació succeeixen en **estadis primerencs** del desenvolupament tumoral i no són específics del procés metastàtic.
- S'han identificat i validat canvis de metilació recurrents entre mucosa normal de còlon i tumor primari a les regions **19q13.32** (hipometilació en tumors) i **16p13.3** (hipermetilació en tumors) en un 28% i 33% dels casos, respectivament. No ha estat descrita la implicació funcional d'aquests canvis.
- El *microarray* d'expressió Affy HGU 133 plus 2.0 (Affymetrix) ha permès la identificació de 1374 sondes diferencialment expressades entre tumors i MHs aparellades ($FDR\ 1\%$, $-0,5 > \log\text{-ratio} > +0,5$). L'algoritme de Golub proposa una **signatura metastàtica de 7 gens** (*MMP3*, *MMP1*, *CYP1B1*, *CLCA4*, *MS4A12*, *SPP1* i *CEACAM7*) capaç de classificar correctament tumors i metàstasis amb una taxa d'error del 5,3%.
- La sobreexpressió gènica de *MS4A12* ($OR=1.33$, $p=1.65e-06$) i *CYP1B1* ($OR=1.23$, $p=0.01634$) en tumors primaris metastàtics en comparació amb els no metastàtics permet **pronosticar MHs** segons el mètode de classificació *Random Forest* amb una eficiència del 80%. Aquesta capacitat de pronòstic també s'aconsegueix a partir dels nivells d'expressió de la mucosa normal de còlon i ronda també el 80% d'encerts sent per tant, una expressió gènica ja alterada en teixit no tumoral.
- Segons l'anàlisi amb mostres de microdissecció làser, l'expressió gènica de *MS4A12* i *CYP1B1* és de tipus **estromal** tot i que també trobem expressió en la cèl·lula tumoral.
- S'ha establert un **model murí específic de MH** a partir de les línies humanes de càncer de còlon *KM12C* i *HCT116* que serà de gran utilitat en futurs experiments *in-vivo*. Igualment, estan previstos experiments funcionals *in-vitro* de sobreexpressió dels gens *MS4A12* i *CYP1B1*.



BIBLIOGRAFIA

A

Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A. F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D., and Yeatman, T. J. (2002). Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 94, 513-521.

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834-846.

Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer research* 58, 5489-5494.

Asano, T., Tada, M., Cheng, S., Takemoto, N., Kuramae, T., Abe, M., Takahashi, O., Miyamoto, M., Hamada, J., Moriuchi, T., and Kondo, S. (2008). Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *J Surg Res* 146, 32-42.

Astler, V. B., and Coller, F. A. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139, 846-852.

B

Bai, A. H., Tong, J. H., To, K. F., Chan, M. W., Man, E. P., Lo, K. W., Lee, J. F., Sung, J. J., and Leung, W. K. (2004). Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer* 112, 846-853.

Barrier, A., Lemoine, A., Boelle, P. Y., Tse, C., Brault, D., Chiappini, F., Breittschneider, J., Lacaine, F., Houry, S., Huguier, M., *et al.* (2005). Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 24, 6155-6164.

Barrier, A., Roser, F., Boelle, P. Y., Franc, B., Tse, C., Brault, D., Lacaine, F., Houry, S., Callard, P., Penna, C., *et al.* (2007). Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling. *Oncogene* 26, 2642-2648.

Bates, R. C., and Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 4, 365-370.

Batzer, M. A., and Deininger, P. L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3, 370-379.

Bernards, R., and Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle. *Nature* 418, 823.

Bethke, L., Webb, E., Sellick, G., Rudd, M., Penegar, S., Withey, L., Qureshi, M., and Houlston, R. (2007). Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 7, 123.

Bismuth, H., Adam, R., Levi, F., Farabos, C., Waechter, F., Castaing, D., Majno, P., and Engerran, L. (1996). Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 224, 509-520; discussion 520-502.

Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257.

Bryant, J. A., Finn, R. S., Slamon, D. J., Cloughesy, T. F., and Charles, A. C. (2004). EGF activates intracellular and intercellular calcium signaling by distinct pathways in tumor cells. *Cancer Biol Ther* 3, 1243-1249.

C

Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107.

Comelli, E. M., Lariani, S., Zwahlen, M. C., Fotopoulos, G., Holzwarth, J. A., Cherbut, C., Dorta, G., Corthesy-Theulaz, I., and Grigorov, M. (2009). Biomarkers of human gastrointestinal tract regions. *Mamm Genome* 20, 516-527.

Cotterchio, M., Boucher, B. A., Manno, M., Gallinger, S., Okey, A. B., and Harper, P. A. (2008). Red meat intake, doneness, polymorphisms in genes that encode carcinogen-metabolizing enzymes, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3098-3107.

Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N. R., and Feinberg, A. P. (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science (New York, NY)* 299, 1753-1755.

Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.

D

D'Arrigo, A., Belluco, C., Ambrosi, A., Digito, M., Esposito, G., Bertola, A., Fabris, M., Nofrate, V., Mammano, E., Leon, A., *et al.* (2005). Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 115, 256-262.

Derks, S., Lentjes, M. H., Hellebrekers, D. M., de Bruine, A. P., Herman, J. G., and van Engeland, M. (2004). Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol* 26, 291-299.

Dukes, C. E. (1932). The classification of cancer of the rectum. *JPath & Bact* 35, 323.

E

Ein-Dor, L., Zuk, O., and Domany, E. (2006). Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5923-5928.

Ekberg, H., Tranberg, K. G., Andersson, R., Lundstedt, C., Hagerstrand, I., Ranstam, J., and Bengmark, S. (1986). Determinants of survival in liver resection for colorectal secondaries. *Br J Surg* 73, 727-731.

Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., and Liotta, L. A. (1996). Laser capture microdissection. *Science* 274, 998-1001.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.

Ewing, J. (1928). *Neoplastic diseases* 6th edn WB Saunders, Philadelphia.

F

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.

Figueras, J., Burdio, F., Ramos, E., Torras, J., Llado, L., Lopez-Ben, S., Codina-Barreras, A., and Mojal, S. (2007). Effect of subcentimeter nonpositive resection margin on hepatic recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. Evidences from 663 liver resections. *Ann Oncol* 18, 1190-1195.

Fink, L., Kwapiszewska, G., Wilhelm, J., and Bohle, R. M. (2006). Laser-microdissection for cell type- and compartment-specific analyses on genomic and proteomic level. *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 2, 25-29.

Flatmark, K., Maelandsmo, G. M., Martinsen, M., Rasmussen, H., and Fodstad, O. (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer* 40, 1593-1598.

Foulds, L. (1958). The natural history of cancer. *J Chronic Dis* 8, 2-37.

Frigola, J., Ribas, M., Risques, R. A., and Peinado, M. A. (2002). Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res* 30, e28.

Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R. A., Peinado, M. A., and Clark, S. J. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 38, 540-549.

Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H., and Domann, F. E. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31, 175-179.

G

Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11, 6883-6894.

Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.

Gatalica, Z., and Torlakovic, E. (2008). Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer* 7, 15-26.

Gill, S., Loprinzi, C. L., Sargent, D. J., Thome, S. D., Alberts, S. R., Haller, D. G., Benedetti, J., Francini, G., Shepherd, L. E., Francois Seitz, J., *et al.* (2004). Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 22, 1797-1806.

Goel, A., Nagasaka, T., Arnold, C. N., Inoue, T., Hamilton, C., Niedzwiecki, D., Compton, C., Mayer, R. J., Goldberg, R., Bertagnolli, M. M., and Boland, C. R. (2007). The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 132, 127-138.

Goldberg, R. M., Rothenberg, M. L., Van Cutsem, E., Benson, A. B., 3rd, Blanke, C. D., Diasio, R. B., Grothey, A., Lenz, H. J., Meropol, N. J., Ramanathan, R. K., *et al.* (2007). The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 12, 38-50.

Gout, S., and Huot, J. (2008). Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 1, 69-83.

Grady, W. M., and Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079-1099.

Grothey, A., and Sargent, D. (2005). Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line. *J Clin Oncol* 23, 9441-9442.

Guldborg, P., Worm, J., and Gronbaek, K. (2002). Profiling DNA methylation by melting analysis. *Methods* 27, 121-127.

H

Habano, W., Gamo, T., Sugai, T., Otsuka, K., Wakabayashi, G., and Ozawa, S. (2009). CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. *Int J Oncol* 34, 1085-1091.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hasler, J., and Strub, K. (2006). Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* 34, 5491-5497.

Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9821-9826.

Hermanek, P., Scheibe, O., Spiessl, B., and Wagner, G. (1987). [TNM classification of malignant tumors: the new 1987 edition]. *Rontgenblatter* 40, 200.

Holliday, R., and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232.

Husemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmuller, G., and Klein, C. A. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58-68.

I

Irby, R. B., McCarthy, S. M., and Yeatman, T. J. (2004). Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression. *Clin Exp Metastasis* 21, 515-523.

Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 988-993.

J

Javier, R. T., and Butel, J. S. (2008). The history of tumor virology. *Cancer Res* 68, 7693-7706.

Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**, 1074-1080.

Jorda, M., Rodriguez, J., Frigola, J., and Peinado, M. A. (2009). Analysis of DNA methylation by amplification of intermethylated sites (AIMS). *Methods Mol Biol* **507**, 107-116.

Jorissen, R. N., Gibbs, P., Christie, M., Prakash, S., Lipton, L., Desai, J., Kerr, D., Aaltonen, L. A., Arango, D., Kruhoffer, M., *et al.* (2009). Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.*

Joyce, J. A., and Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**, 239-252.

Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., and Radomski, M. W. (2004). Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* **143**, 819-826.

K

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392-401.

Kamangar, F., Dores, G. M., and Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* **24**, 2137-2150.

Ki, D. H., Jeung, H. C., Park, C. H., Kang, S. H., Lee, G. Y., Lee, W. S., Kim, N. K., Chung, H. C., and Rha, S. Y. (2007). Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int J Cancer* **121**, 2005-2012.

Kim, Y. H., Petko, Z., Dzieciatkowski, S., Lin, L., Ghiassi, M., Stain, S., Chapman, W. C., Washington, M. K., Willis, J., Markowitz, S. D., and Grady, W. M. (2006). CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 781-789.

Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**, 302-312.

Knudsen, A. R., Kannerup, A. S., Mortensen, F. V., and Nielsen, D. T. (2009). Radiofrequency ablation of colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy. *Acta Radiol* **50**, 716-721.

Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-823.

Koopman, M., Venderbosch, S., Nagtegaal, I. D., van Krieken, J. H., and Punt, C. J. (2009). A review on the use of molecular markers of cytotoxic therapy for colorectal cancer, what have we learned? *Eur J Cancer*.

Koslowski, M., Sahin, U., Dhaene, K., Huber, C., and Tureci, O. (2008). MS4A12 is a colon-selective store-operated calcium channel promoting malignant cell processes. *Cancer Res* *68*, 3458-3466.

Koslowski, M., Tureci, O., Huber, C., and Sahin, U. (2009). Selective activation of tumor growth-promoting Ca²⁺ channel MS4A12 in colon cancer by caudal type homeobox transcription factor CDX2. *Mol Cancer* *8*, 77.

L

Lee, S., Hwang, K. S., Lee, H. J., Kim, J. S., and Kang, G. H. (2004). Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* *84*, 884-893.

Li, F. Y., and Lai, M. D. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* *10*, 219-229.

Li, M., Lin, Y. M., Hasegawa, S., Shimokawa, T., Murata, K., Kameyama, M., Ishikawa, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2004). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol* *24*, 305-312.

Lin, Y. H., Friederichs, J., Black, M. A., Mages, J., Rosenberg, R., Guilford, P. J., Phillips, V., Thompson-Fawcett, M., Kasabov, N., Toro, T., *et al.* (2007). Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* *13*, 498-507.

Lynch, H. T., Riley, B. D., Weissman, S. M., Coronel, S. M., Kinarsky, Y., Lynch, J. F., Shaw, T. G., and Rubinstein, W. S. (2004). Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and HNPCC-like families: Problems in diagnosis, surveillance, and management. *Cancer* *100*, 53-64.

M

Marshall, J. R. (2008). Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am* *37*, 73-82, vi.

Mayor, R., Casadome, L., Azuara, D., Moreno, V., Clark, S. J., Capella, G., and Peinado, M. A. (2009). Long-range epigenetic silencing at 2q14.2 affects most human colorectal cancers and may have application as a non-invasive biomarker of disease. *Br J Cancer* *100*, 1534-1539.

Mohandas, T., Sparkes, R. S., and Shapiro, L. J. (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science (New York, NY)* *211*, 393-396.

Mook, S., Schmidt, M. K., Weigelt, B., Kreike, B., Eekhout, I., van de Vijver, M. J., Glas, A. M., Floore, A., Rutgers, E. J., and van 't Veer, L. J. (2009). The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann Oncol*.

Murray, G. I. (2007). An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem* 109, 171-176.

N

Nadal, C., Maurel, J., and Gascon, P. (2007). Is there a genetic signature for liver metastasis in colorectal cancer? *World J Gastroenterol* 13, 5832-5844.

Nakagawa, H., Liyanarachchi, S., Davuluri, R. V., Auer, H., Martin, E. W., Jr., de la Chapelle, A., and Frankel, W. L. (2004). Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *Oncogene* 23, 7366-7377.

Nannini, M., Pantaleo, M. A., Maleddu, A., Astolfi, A., Formica, S., and Biasco, G. (2009). Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treat Rev* 35, 201-209.

Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.

Nguyen, D. X., and Massague, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8, 341-352.

Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S9-15.

Noma, K., Allis, C. D., and Grewal, S. I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293, 1150-1155.

Nuovo, G. J., Plaia, T. W., Belinsky, S. A., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1999). In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12754-12759.

P

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571-573.

Pantaleo, M. A., Astolfi, A., Nannini, M., Paterini, P., Piazzini, G., Ercolani, G., Brandi, G., Martinelli, G., Pession, A., Pinna, A. D., and Biasco, G. (2008). Gene expression profiling of liver metastases from colorectal cancer as potential basis for treatment choice. *Br J Cancer* 99, 1729-1734.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.

Preston, S. L., Wong, W. M., Chan, A. O., Poulson, R., Jeffery, R., Goodlad, R. A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W. F., *et al.* (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 63, 3819-3825.

Q

Quasar Collaborative, G., Gray, R., Barnwell, J., McConkey, C., Hills, R. K., Williams, N. S., and Kerr, D. J. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 2020-2029.

R

Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909.

Rashid, A., Shen, L., Morris, J. S., Issa, J. P., and Hamilton, S. R. (2001). CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 159, 1129-1135.

Robertson, J. H., Sarkar, S., Yang, S. Y., Seifalian, A. M., and Winslet, M. C. (2008). In vivo models for early development of colorectal liver metastasis. *Int J Exp Pathol* 89, 1-12.

Rodriguez, J., Vives, L., Jorda, M., Morales, C., Munoz, M., Vendrell, E., and Peinado, M. A. (2008). Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells. *Nucleic Acids Res* 36, 770-784.

Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 13, 397-399.

Rozen, P., and Macrae, F. (2006). Familial adenomatous polyposis: The practical applications of clinical and molecular screening. *Fam Cancer* 5, 227-235.

Rudmik, L. R., and Magliocco, A. M. (2005). Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 92, 347-359.

S

Saini, S., Hirata, H., Majid, S., and Dahiya, R. (2009). Functional significance of cytochrome P450 1B1 in endometrial carcinogenesis. *Cancer Res* 69, 7038-7045.

Scheele, J., and Altendorf-Hofmann, A. (1999). Resection of colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg* 384, 313-327.

Scholzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., and Thompson, J. (2000). Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and

CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol* 156, 595-605.

Shih, I. M., Wang, T. L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S. R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2640-2645.

Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Balfour, J., and Bardelli, A. (2009). Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 1308-1324.

Su, J. M., Lin, P., Wang, C. K., and Chang, H. (2009). Overexpression of cytochrome P450 1B1 in advanced non-small cell lung cancer: a potential therapeutic target. *Anticancer Res* 29, 509-515.

Sunami, E., Tsuno, N., Osada, T., Saito, S., Kitayama, J., Tomozawa, S., Tsuruo, T., Shibata, Y., Muto, T., and Nagawa, H. (2000). MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist* 5, 108-114.

Suri, F., Yazdani, S., Narooie-Nejhad, M., Zargar, S. J., Paylakhi, S. H., Zeinali, S., Pakravan, M., and Elahi, E. (2009). Variable expressivity and high penetrance of CYP1B1 mutations associated with primary congenital glaucoma. *Ophthalmology* 116, 2101-2109.

T

Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R., and Ellis, L. M. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55, 3964-3968.

Talmadge, J. E., Donkor, M., and Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* 26, 373-400.

Tokizane, T., Shiina, H., Igawa, M., Enokida, H., Urakami, S., Kawakami, T., Ogishima, T., Okino, S. T., Li, L. C., Tanaka, Y., *et al.* (2005). Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11, 5793-5801.

Tomlinson, I. P., Novelli, M. R., and Bodmer, W. F. (1996). The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14800-14803.

Tournigand, C., Andre, T., Achille, E., Lledo, G., Flesh, M., Mery-Mignard, D., Quinaux, E., Couteau, C., Buyse, M., Ganem, G., *et al.* (2004). FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22, 229-237.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8681-8686.

W

Weiss, L. (1994). Inefficiency of metastasis from colorectal carcinomas. Relationship to local therapy for hepatic metastasis. *Cancer Treat Res* 69, 1-11.

Willett, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A., and Speizer, F. E. (1990). Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 323, 1664-1672.

Wojdacz, T. K., Dobrovic, A., and Hansen, L. L. (2008). Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 3, 1903-1908.

Y

Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.

Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13, 335-340.

Zeng, Z. S., Shu, W. P., Cohen, A. M., and Guillem, J. G. (2002). Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 8, 144-148.

Z

Zucker, S., and Vacirca, J. (2004). Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 101-117.



ANNEX

INFORME DEL DIRECTOR SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA EN ELS MANUSCRITS EN PREPARACIÓ

Com a director de la tesi doctoral de Laura Padullés Mosella, titulada "Identificació de nous marcadors moleculars en metàstasi hepàtica de càncer colorectal", faig constar que la doctoranda ha participat activament en el disseny i realització experimental dels treballs que s'inclouen en aquesta tesi, en la discussió i obtenció de conclusions i en la preparació del manuscrit final. Les contribucions concretes de cada treball s'especifiquen a continuació.

Manuscrits en preparació:

ARTICLE 1: LIVER METASTASIS SIGNATURE AS PROGNOSTIC GENES OF DISTANT DISSEMINATION IN STAGE III COLORECTAL CANCER

Laura Padullés, Antoni Berenguer, María Martínez-Iñiesta, David G. Molleví, Núria Baixeras, Alvaro Aytés, Cristina Santos, Mireia Berdiel, Clara Muñoz, Sara Puertas, Teresa Serrano, Emilio Ramos, Víctor Moreno, Ramón Salazar, Gabriel Capellà, Alberto Villanueva.

Contribució de la doctoranda:

Recol·lecció dels casos aparellats al banc de tumors de l'hospital de Bellvitge, extracció i valoració de la qualitat de l'ARN prèvia a la hibridació de l'*array* (Affy HGU 133 plus 2.0, Affymetrix). Validació, amb una sèrie independent, dels gens diferencialment expressats de forma significativa segons l'anàlisi estadístic. Avaluació de la capacitat per pronosticar metàstasi hepàtica a partir dels 7 gens de la signatura metastàtica proposada mitjançant RT-PCR quantitativa amb el LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Microdissecció per captura làser de mostres aparellades de tumor primari i metàstasi hepàtica provinents de 13 pacients i posterior anàlisi de l'expressió gènica d'ambdós components, tumoral i estromal.

Desenvolupament d'un model murí capaç de metastatitzar específicament a fetge per ser utilitzat en posteriors experiments. Escripura i preparació del manuscrit pendent de ser enviat al *Journal of Clinical Oncology* JCO (impact factor 17,157).

ARTICLE 2: ALU ELEMENTS' METHYLATION ANALYSIS IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

Laura Padullés, María Martínez-Iniesta, David G. Molleví, Álvaro Aytés, Antoni Berenguer, Javier Carmona, Víctor Moreno, Miquel A. Peinado, Gabriel Capellà, Alberto Villanueva.

Contribució de la doctoranda:

Recol·lecció dels casos aparellats al banc de tumors de l'hospital de Bellvitge, extracció de l'ADN, anàlisi epigenètic mitjançant la metodologia d'AUMA, clonatge de les bandes recurrents i identificació de les mateixes, validació de la diferències de metilació per seqüenciació de bisulfit i per corbes de *melting* amb el LightCycler 2.0. Tractament amb AZA/TSA de la línia HCT116 i posterior RT-PCR quantitativa. Anàlisi de metilació i d'expressió gènica de les illes CpG i gens propers a les bandes d'AUMA prèviament validades. Escripura i preparació del manuscrit pendent de ser enviat al *Clinical Cancer Research* (impact factor 6,488).

Articles publicats en què també ha participat la doctoranda:

PRL-3 overexpression in epithelial cells is induced by surrounding stromal fibroblasts

Molleví DG, Aytés A, Berdiel M, **Padullés L**, Martínez-Iniesta M, Sanjuan X, Salazar R, Villanueva A.

Mol Cancer. 2009 Jul 8; 8:46. **Impact factor: 5.36**

PRL-3 is essentially overexpressed in primary colorectal tumours and associates with tumour aggressiveness

Molleví DG, Aytés A, **Padullés L**, Martínez-Iniesta M, Baixeras N, Salazar R, Ramos E, Figueras J, Capellà G, Villanueva A.

Br J Cancer. 2008 Nov 18; 99(10):1718-25. Epub 2008 Oct 28. **Impact factor: 4.85**

Atentament,

Dr. Alberto Villanueva Garatachea

Investigador del Laboratori de Recerca Translacional (LRT1)

ICO-IDIBELL

avillanueva@iconcologia.net