

**POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR I CÀNCER  
COLORECTAL**  
**Estudi genòmic i anàlisi d'alteracions de la via de Wnt**

Memòria presentada per

**Antònia Obrador Hevia**

Per optar al Grau de

**Doctor**

Tesi realitzada sota la direcció del  
Dr. Gabriel Capellà i Munar  
a l'Institut Català d'Oncologia

Tesi adscrita al departament de Genètica de la  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona  
Programa de Genètica (Bienni 2002-2004)  
Tutora: Dra. Marta Pascual

Gabriel Capellà

Marta Pascual

Antònia Obrador

Barcelona, Abril de 2007



A mon pare, *in memoriam*  
per ser com era i per recordar-me sempre "estudia molt"

A ma mare i al meu germà

A en Pere



*Julius Cesar and the Roman Empire couldn't conquer the blue sky*  
**Crowded House**



## AGRAÏMENTS

El fet que avui estigui escrivint aquestes paraules no és només la culminació d'una etapa que ha durat gairebé sis anys, sinó que és una parada més en el camí que començà molt abans de manera inconscient. Ara entenc que les paraules del meu pare i els seus amics metges varen despertar en mi la curiositat d'un món desconegut que he perseguit des de llavors: "la biologia molecular és el futur".

He tingut la sort de trobar molta gent que ha fet possible que aquesta llarga i difícil travessa arribés a bon port. Moltes gràcies a tots.

A en Gabriel Capellà que me va oferir la oportunitat de realitzar la tesi doctoral en el seu laboratori i me va obrir les portes al món de la recerca.

Als companys de "batalla", per les llargues converses encoratjadores i els cafès tan oportuns. No hi ha paraules.

A la resta de companys de l'ICO i de l'IRO per amenitzar les eternes jornades laborals, sempre amb el somriure i l'humor irònic (a vegades negre) a punt. Als investigadors més sènior, per escoltar les meves cabòries i donar sempre bons consells i un cop de mà.

A tots els professionals de l'àmbit de la recerca amb els qui he pogut fer el treball interdisciplinari en el que crec fermament: estadístics, patòlegs, cirurgians, digestòlegs, l'empresa farmacèutica, etc.

Als companys del laboratori de Cambridge: thank you very much for making my stay so easy and deligthful.

Als amics de biologia, la meva segona família. Gràcies per fer-me sentir com a casa.

A la família. En primer lloc al meu pare. Responsable principal que hagi arribat aquí. El seu coratge, dedicació a allò en el que creia, els seus principis han estat el millor

exemple a seguir. A la meva mare, pel recolzament incondicional que sempre m'ha brindat, per tot el que m'ha ensenyat de la vida i de la cultura, per fer-me veure que "com Mallorca no hi ha res". Junts formaven el millor equip, gràcies. Al meu germà, per la ironia que ens ajuda a entendre que no sempre el que sembla que és el més important, realment ho és. Al meu conco en Joan, per la seva inestimable ajuda en la redacció d'aquesta tesi. Als pares de'n Pere per donar-me tant de suport i ajuda. A tota la resta, gràcies.

A en Pere, per tenir tanta paciència amb jo, realment admirable. Moltes gràcies per ser sempre tan a prop (tot i que a vegades ens separava un mar) en els moments tan difícils que he passat al llarg de tots aquests anys i moltes gràcies també pels moments tan bons que hem compartit.



# Índex



<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
<b>Bases moleculars i cel·lulars del càncer</b>	<b>5</b>
<b>Alteració de l'homeòstasi de l'epiteli colònic per donar lloc al càncer colorectal</b>	<b>12</b>
Biologia de l'epiteli intestinal	12
Seqüència adenoma-carcinoma	13
La via de Wnt en l'epiteli intestinal	15
<b>Formes hereditàries del càncer colorectal: eines per a l'estudi del càncer</b>	<b>19</b>
<b>De la mutació en el gen <i>APC</i> a la poliposi adenomatosa Familiar</b>	<b>20</b>
Estructura del gen <i>APC</i>	22
Funcions del gen <i>APC</i>	28
Mutacions. El Ying-Yang d' <i>APC</i> : relacions genotip/fenotip i <i>first-hit/second-hit</i>	25
<b><i>APC</i> no només participa en la via de Wnt. Inestabilitat cromosòmica</b>	<b>27</b>
<b>Aplicació de les noves tecnologies a l'estudi del càncer colorectal</b>	<b>31</b>
Tècniques d'estudi del transcriptoma	31
Tècniques d'estudi del genoma	35
<b>OBJECTIUS</b>	<b>37</b>

<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>41</b>
<b>Pacients</b>	<b>43</b>
FAP	43
CCR esporàdic	43
<b>Mètodes</b>	<b>47</b>
<b>1. Tècniques d'anàlisi del DNA</b>	<b>47</b>
1.1 Anàlisi molecular del gen <i>APC</i>	47
Detecció de mutacions en l'MCR	47
Estudi de la pèrdua al·lèlica mitjançant l'anàlisi de microsatèl·lits	48
1.2 Anàlisi molecular del gen <i>KRAS</i>	50
1.3 <i>Array comparative genomic hybridization</i>	51
<b>2. Tècniques d'anàlisi de l'RNA</b>	<b>55</b>
2.1 PCRq	55
2.2 Transfeccions	58
2.3. <i>Microarrays</i> d'expressió	60
<b>3. Tècniques d'anàlisi de proteïnes</b>	<b>67</b>
3.1 Immunohistoquímica	67
$\beta$ -catenina	67
BUB1B i MAD2L1	68

# RESULTATS 69

## CAPÍTOL 1

### Caracterització molecular de la poliposi adenomatosa familiar 71

1. Alteracions somàtiques d'*APC* en la poliposi adenomatosa familiar 73
2. Determinació del nivell d'expressió i localització cel·lular de la  $\beta$ -catenina 77
3. Proteïnes de la via de Wnt i els seus nivells d'expressió en el càncer colorectal 78
4. Identificació de mutacions en el gen *KRAS* 83
5. Canvis en el genoma detectats per *array comparative genomic hybridization* 84
6. Representació global de les alteracions dels adenomes de FAP 88

## CAPÍTOL 2

### APC i inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal 89

1. Inactivació del gen *APC* i expressió dels gens *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1* 91
2. Canvis en la transcripció de *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1* per la modulació de l'expressió d'*APC* 98
3. Estudi de coregulació de gens de la via de Wnt amb els gens *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1* 101

## CAPÍTOL 3

### Perfils d'expressió del càncer colorectal 107

1. Detecció de gens diferencialment expressats entre els teixits de mucosa normal, adenoma i carcinoma de càncer

colorectal esporàdic. Anàlisi global.	109
2. Anàlisi de perfils d'expressió diferencials segons la Localització i l'estadi	115
3. Validació dels resultats dels <i>microarrays</i> amb la tècnica de la PCRq	118
<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>121</b>
<b>Caracterització molecular de la poliposi adenomatosa familiar</b>	<b>123</b>
<b>APC i la inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal</b>	<b>131</b>
<b>Perfils d'expressió del càncer colorectal</b>	<b>135</b>
<b>Discussió global</b>	<b>139</b>
<b>SUMARI</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>151</b>
<b>ANNEX 1</b>	<b>173</b>
Arbres de les famílies dels pacients de poliposi adenomatosa familiar	

Publicació:

Abal, M., Obrador-Hevia, A., Janssen, K.P., Casadome, L., Menendez, M., Carpentier, S., Barillot, E., Wagner, M., Ansorge, W., Moeslein, G., Fsihi, H., Bezrookove, V., Reventos, J., Louvard, D., Capella, G. & Robine, S. (2007) APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation, *Gastroenterology*, 132(7), pp. 2448-2458.





## ABREVIATURES

aCGH	<i>array-comparative genomic hybridization</i>
AFAP	<i>attenuated familial adenomatous polyposis</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APC/C	<i>anaphase promoting complex</i>
BUB1B	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homologue b</i>
CCR	càncer colorectal
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
CIN	<i>chromosomal instability</i>
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	deoxinucleòtids trifosfat
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
GDE	gens diferencialment expressats
GO	<i>gene ontology</i>
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAD2L1	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1</i>
MAP	<i>MYH associated polyposis</i>
Mb, kb, pb	megabase, quilobase, parell de bases
MCR	<i>mutation cluster region</i>
MIN	<i>microsatellite instability</i>
ml, µl	mil·lilitre, microlitre
mM	mil·limolar
MMR	<i>mismatch repair</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCRq	PCR cuantitativa
RMA	<i>robust multi-array analysis</i>
RNA	àcid ribonucleic
STMN1	<i>stathmin 1</i>

TCF	<i>transcription factor</i>
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i>
wt	<i>wild type</i>
μg, ng	microgram, nanogram
μm	micròmetre

## GLOSSARI

### A

**Adenoma (pòlip adenomatós):** tumor benigne que deriva de l'epiteli glandular, format per glàndules atípiques amb cèl·lules pseudostratificades. S'observa especialment a l'estómac (habitualment a l'antra, únic i gros) i al budell gros i al recte (on pot ésser sèssil o pediculat, únic o múltiple). També és anomenat adenoma polipoide.

**Aneuploïdia:** condició de la cèl·lula per la qual presenta adicions o delecions de un nombre petit de cromosomes sencers i, per tant, difereix de l'esperat nombre diploide de cromosomes.

**Apoptosi:** mecanisme de suïcidi cel·lular que permet l'eliminació de cèl·lules senescent, malmeses o que sobren. Es caracteritza, en contrast amb la citòlisi, per una mort cel·lular programada amb degradació del DNA i destrucció nuclear abans que es perdi la integritat de la membrana plasmàtica. Les cèl·lules tumorals han perdut la seva capacitat d'entrar en apoptosi quan contenen un dany genòmic augmentat.

### B

**Bandatge:** procés d'identificació cromosòmica mitjançant tècniques de tinció diferencial. Es realitza durant la metafase de cèl·lules cultivades *in vitro* amb la finalitat d'evidenciar les diferents bandes que permetran la identificació dels cromosomes, ja sigui individualment o bé per parelles, ja que cada cromosoma exhibeix un patró de bandes distint i característic. El bandatge cromosòmic representa un ajut important en la detecció d'algunes anomalies genètiques.

### C

**Carcinoma:** tumor epitelial maligne. El seu component essencial és l'epiteli proliferant, mentre que el teixit connectiu només proporciona l'estroma del tumor, pels intersticis del qual es disseminen les cèl·lules epitelials. El comportament maligne es manifesta per un creixement ràpid i destructor, una recidiva després de l'extirpació

quirúrgica i la facultat de produir metàstasis en els ganglis limfàtics regionals i, per via hematogènica, en òrgans distants.

**Cariotipatge:** descripció de la dotació cromosòmica d'una línia cel·lular o d'un organisme d'acord amb el nombre, la mida i la forma dels cromosomes de les seves cèl·lules.

**Cinetocor:** estructura proteica situada al centròmer on s'anclen els microtúbuls del fus mitòtic durant el procés de divisió cel·lular.

**Colectomia:** resecció quirúrgica del còlon, total o parcial. Hom practica més sovint la resecció parcial (hemicolectomia), la qual pot incloure el cec o el recte i és indicada en casos de neoplàsies, colitis ulcerosa greu, trombosi, vòlvul, etc.

## F

**Fus mitòtic:** estructura citoplasmàtica formada per fibres fines de natura proteica que s'estén entre els dos citocentres, i en la qual s'insereixen i orienten els centròmers i els cromosomes sencers durant la mitosi.

## G

**Gen supressor tumoral:** els gens supressors del càncer (oncosupressors o antioncogens) inhibeixen el desenvolupament del procés cancerós.

## I

**Inestabilitat de microsatèl·lits:** els microsatèl·lits són seqüències curtes repetides de DNA, que degut a la seva particular estructura, tendeixen a acumular errors en la replicació (especialment insercions o delecions). Quan múltiples errors no reparats en els microsatèl·lits són detectats en el tumor, comparat amb el teixit normal, es diu que aquest tumor presenta inestabilitat de microsatèl·lits. En genètica, tipus concret d'inestabilitat present en un subgrup de tumors, principalment còlon, estómac i endometri. Es fa evident per l'aparició, en el tumor, de nous al·lels en seqüències repetides tipus poli A o poli CA principalment. Aquesta inestabilitat s'associa amb alteracions en els gens implicats en la reparació dels errors simples d'aparellament del DNA.

**Inestabilitat cromosòmica:** tipus d'inestabilitat genòmica que es caracteritza per l'aparició d'anomalies en el nombre de cromosomes i per guanys i pèrdues de regions cromosòmiques.

## M

**Metàstasi:** aparició d'un procés patològic, infecció o tumoral, en algun punt de l'organisme, com a resultat de la translació d'un procés idèntic preexistent en algun altre lloc no contigu. La capacitat de produir metàstasis és característica de les neoplàsies malignes.

**Microsatèl·lit:** seqüència de DNA genòmic formada per múltiples repeticions en tàndem d'una unitat o nucli de menys de sis nucleòtids. El nombre de repeticions és variable entre els individus de la mateixa espècie, i aquest elevat grau de polimorfisme els fa molt útils com a marcadors moleculars tant en l'estudi de malalties genètiques com en la identificació d'individus en medicina forense i legal.

**Mitosi:** procés de divisió de les cèl·lules somàtiques dels eucariotes, que consisteix, fonamentalment, en una divisió longitudinal dels cromosomes replicats i en una divisió del citoplasma. Aquest procés dona com a resultat la formació de dues cèl·lules filles, cadascuna amb la mateixa constitució cromosòmica que la cèl·lula mare. En la mitosi hom pot distingir quatre fases: la *profase*, en què el material genètic es condensa i pren consistència en els cromosomes (que es fan visibles al microscopi), la membrana nuclear i el nuclèol comencen a desaparèixer, els dos centríols (que s'han duplicat durant la interfase prèvia a la mitosi) migren cap a pols oposats de la cèl·lula, i entre ells apareixen les fibres (microtúbuls) que formen el fus acromàtic; la *metafase*, en què cada centròmer s'uneix a una fibra del fus, i els cromosomes, cadascun dels quals és compost de dues cromàtides, es disposen alineats a la part equatorial de la cèl·lula; l'*anafase*, en què es divideixen longitudinalment els centròmers, i les cromàtides se separen i són arrossegades als pols oposats de la cèl·lula per les fibres del fus, i la *telofase*, en què una membrana nuclear envolta cadascun dels dos agrupaments de cromosomes fills, que inicien la descondensació, desapareixen les fibres del fus i es tornen a formar els nuclèols. Un cop dividit i reconstituït el nucli original en dos de nous, amb els nuclèols respectius, es produeix la divisió del citoplasma o citocinesi; això dona com a resultat la constitució de dues cèl·lules filles, que entren en una fase

de metabolisme actiu (interfase). La funció de la mitosi és d'assegurar el repartiment ordenat dels cromosomes a les cèl·lules filles, la dotació de les quals ha d'ésser idèntica a la de la cèl·lula mare.

## O

**Oncogèn:** gen que indueix la transformació de les cèl·lules sanes en canceroses; gen transformador. Els oncogens cel·lulars deriven de l'activació anòmala de gens cel·lulars normals, anomenats protooncogens, per mecanismes com la mutació puntual, la reordenació cromosòmica, l'amplificació gènica o la integració d'un retrovirus dins el mateix oncogèn o en una regió propera. Els oncogens vírics deriven de protooncogens cel·lulars capturats per un virus i activats posteriorment per mutació o bé per sobreexpressió en les cèl·lules infectades.

## P

**Proteosoma:** complex proteic del citosol que és responsable de la degradació de proteïnes prèviament marcades per diferents sistemes amb la finalitat d'ésser destruïdes.

## S

**Splicing alternatiu (empalmament alternatiu):** procés al qual se sotmet l'RNA heterogeni nuclear, format en la transcripció dels gens eucariotes discontinus, per tal que es converteixi en un RNA missatger madur. Consisteix bàsicament en l'eliminació dels introns i la subsegüent unió dels exons.

## T

**Tetraploïdia:** dit de la cèl·lula poliploide que posseeix una dotació cromosòmica formada per quatre jocs de cromosomes (4n). Habitualment s'origina quan la divisió nuclear no va seguida de la divisió cel·lular.

**Translocació:** anomalia cromosòmica estructural que es caracteritza per la transferència d'un fragment de cromosoma a un altre cromosoma no homòleg o, més habitualment, per l'intercanvi de fragments entre cromosomes no homòlegs.