



Identificación y análisis funcional de nuevos oncogenes amplificadas en cáncer de pulmón

Sandra Castillo Díez

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.

Tesis doctoral

2011

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Programa de Doctorado en Biomedicina

Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)

**Identificación y análisis funcional de nuevos
oncogenes amplificados en cáncer de pulmón**

Sandra Castillo Díez

Doctoranda:

Sandra Castillo Díez

Directora:

Montse Sanchez-Céspedes

Memoria presentada por Sandra Castillo Díez, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

La presente tesis doctoral ha estado realizada bajo la dirección de la Dra. Montse Sanchez-Céspedes en el Grupo de Cáncer de Pulmón del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) y en el Grupo de Genes y Cáncer dentro del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC) del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL, Barcelona).



*A mis padres, Juan F y Pili,
a mi hermana, Edurne*

Índice

Índice	11
Introducción	13
1. Cáncer de pulmón	15
1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón	15
1.1.1. Tabaquismo	16
1.2. Tipos histológicos	18
1.2.1. Lesiones preneoplásicas del cáncer de pulmón	20
2. Biología Molecular del Cáncer de Pulmón	21
2.1. Descripción de las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón	23
2.2. Vías biológicas alteradas en cáncer de pulmón	24
2.2.1. Receptores de membrana y vías de transducción de señales	25
2.2.2. Regulación de la transcripción y remodelación de cromatina	26
2.2.3. Ciclo celular	28
2.2.4. Reparación del DNA y apoptosis	28
2.3. Distribución de las alteraciones genéticas en los distintos tipos histopatológicos	30
3. Los oncogenes como dianas terapéuticas en cáncer de pulmón	31
3.1. Adicción oncogénica	31
3.2. Terapia molecular en cáncer de pulmón	32
3.2.1. Terapia molecular contra receptores tirosina-quinasa	32
3.2.2. Otras terapias moleculares en cáncer de pulmón	33
4. Identificación de nuevos oncogenes en cáncer de pulmón	34
4.1. Identificación de regiones amplificadas	34
4.2. Identificación de mutaciones somáticas	35
Objetivos	37
Artículo I	41
Artículo II	45
Artículo III	49
Resumen	53
Discusión	57
Conclusiones	73
Bibliografía	77
Informe de la Directora	99

Introducción

Introducción

1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón está provocado por un crecimiento anormal e incontrolado de las células del pulmón que en su progresión produce disfunciones respiratorias y puede invadir otros órganos como ganglios linfáticos, hueso, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado.

1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más común en hombres y el cuarto en mujeres, con más de un millón y medio millón de casos respectivamente, en un año en todo el mundo. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, detrás del cáncer de mama (figura 1).

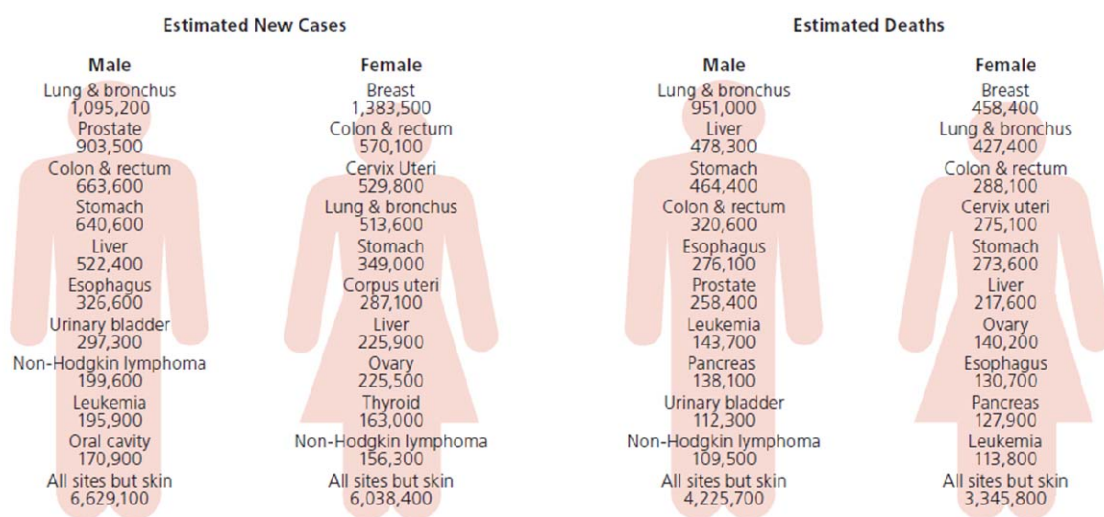


Figura 1. Estimación de casos nuevos y muertes por cáncer en el mundo en 2008, dividido por sexos. (*Global Cancer, Facts & Figures, American Cancer Society, www.cancer.org*)

A pesar de algunas mejoras en las técnicas quirúrgicas y terapias combinadas en las últimas décadas, el cáncer de pulmón es uno de los cánceres más letales. La tasa de supervivencia relativa a cinco años es la segunda más baja, por detrás del cáncer de páncreas, siendo de 16% para todos los estadios combinados en los Estados Unidos y del 53% en los casos detectados cuando la enfermedad está todavía localizada, aunque sólo el 15% de los cánceres de pulmón se diagnostican en esta etapa temprana. En Europa, las tasas de supervivencia a cinco años son generalmente similares a estas, que van desde el 7,9% a 16,5% (*Global Cancer, Facts & Figures, 2008; American Cancer Society, www.cancer.org*).

1.1.1. Tabaquismo

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más prevenibles ya que alrededor del 80% de los casos en hombres y 50% en las mujeres en todo el mundo son debidos al hábito de fumar, además, este hábito es el responsable del 30% de las muertes por cáncer y el riesgo aumenta con la cantidad y la duración del consumo de cigarrillos. Entre los años 1940 y 1950, tanto clínicos como investigadores, observaron un aumento alarmante de los casos de cáncer de pulmón y encontraron una relación clara entre estos casos y el hábito de fumar ya que este tipo de cáncer era muy raro antes del consumo generalizado de tabaco (Auerbach et al., 1957; Burney, 1959; Cornfield et al., 1959).

Entre los 4000 productos químicos identificados en el humo del tabaco, más de 60 son carcinógenos y dentro de estos, los más potentes son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), las N-nitrosaminas y las aminas aromáticas. Podría decirse que los carcinógenos más importantes en cáncer de pulmón son los HPAs como el benzo(a)pireno (BaP) y la nitrosamina específica del tabaco 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona, también conocida como nitrosamincetona derivada de la nicotina (NNK) (Hecht, 1999; Hoffmann et al., 2001). La respuesta del organismo a la exposición a estos carcinógenos es similar a la de cualquier otra sustancia extraña, las enzimas del citocromo P450 añaden un átomo de oxígeno al carcinógeno para aumentar su solubilidad en agua y así excretarlo más fácilmente. Estas reacciones metabólicas de detoxificación pueden generar productos intermedios electrofílicos que reaccionan con el DNA formando productos unidos covalentemente conocidos como aductos de DNA (figura 2). Este proceso por el cual un carcinógeno no reactivo se convierte en un producto que se une al DNA es conocido como activación metabólica (Hecht, 1999; Tang et al., 2001). Las células tienen sistemas de reparación de DNA que eliminan estos aductos (Hanawalt, 2001; Memisoglu and Samson, 2000; Norbury and Hickson, 2001; Pegg, 2000), aunque este sistema no es completamente eficiente y algunos escapan de la reparación, persisten en el DNA y pueden generar variaciones en el DNA durante la replicación. Este daño irreversible puede afectar a genes esenciales para la regulación de la homeostasis celular y conducir a un proceso oncogénico (figura 3). Por ejemplo, tras la activación metabólica de la NNK se forma un aducto de DNA que es malinterpretado por las polimerasas de DNA y produce una conversión permanente de guanina-citosina por adenina-timina, esta mutación puede activar el oncogén *KRAS* o inactivar el gen supresor de tumores *p53* (Hecht, 1999).

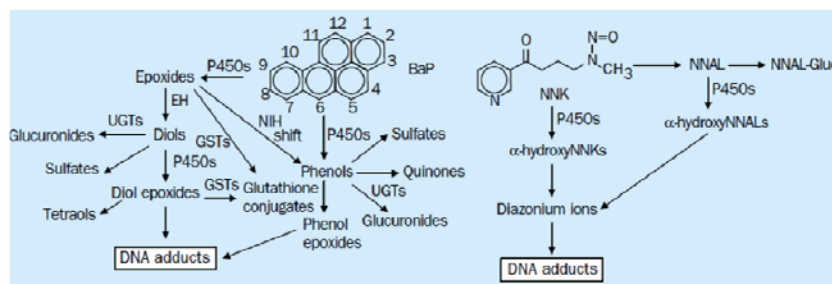


Figura 2. Rutas metabólicas de los carcinógenos del tabaco benzo(a)pireno y NKK. *EH*, epóxido hidrolasa; *BaP*, benzo(a)pireno; *GST*, glutatión S-transferasa; *NNAL*, 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanol; *UGT*, UDP-glucuronosil transferasa; *P450*, citocromo P450. (Hecht, 2002)

Menos del 20% de los fumadores desarrolla cáncer de pulmón, así pues, la epidemiología molecular ha demostrado que existe una susceptibilidad genética que contribuye al riesgo de padecer cáncer de pulmón, especialmente en aquellos que desarrollan la enfermedad a una edad temprana. Se ha sugerido que esta susceptibilidad se basa en la combinación entre polimorfismos genéticos de los componentes de los sistemas de activación metabólica y detoxificación de carcinógenos (Amos et al., 1999). Además, recientemente se han identificado regiones cromosómicas y polimorfismos que confieren predisposición a desarrollar cáncer de pulmón. Una de estas regiones es el locus 15q25 que contiene genes como *PSMA4* y *CHRNA5*, *CHRNA3* y *CHRNA4* que codifican subunidades de receptores nicotínicos (Amos et al., 2008; Hung et al., 2008). La identificación de este locus genera dudas sobre si estas variantes tienen un efecto carcinogénico directo o, indirectamente, aumentan la predisposición a fumar. Otros loci relacionados con la susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón son 5p15.33 que contiene los genes *TERT* y *CLPTM1L* y 6p21.33 (McKay et al., 2008; Wang et al., 2008).

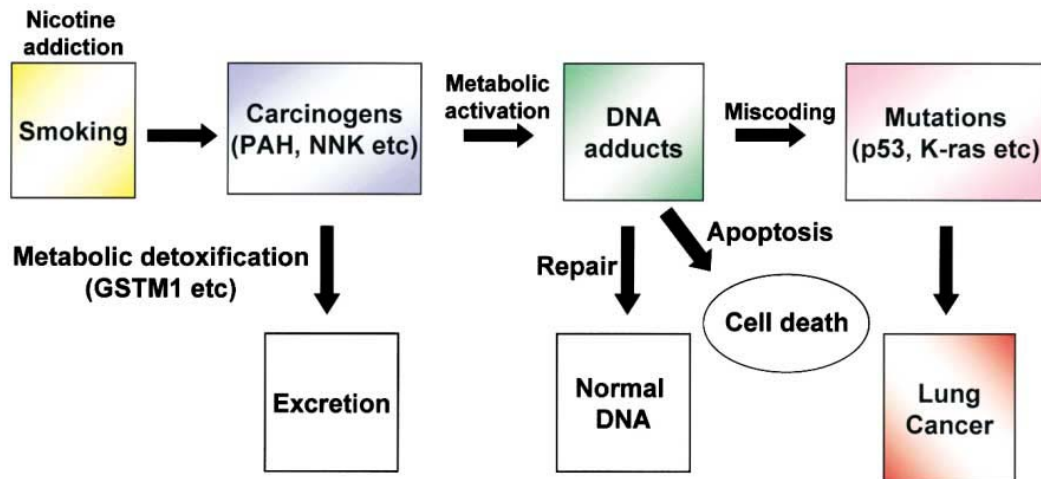


Figura 3. Esquema de la relación entre los carcinógenos del tabaco con los múltiples cambios genéticos en el tejido pulmonar y el desarrollo de cáncer de pulmón (Minna et al., 2002).

Las variaciones internacionales y temporales en las tasas de cáncer de pulmón reflejan en gran medida la epidemia del tabaquismo. En varios países occidentales donde la epidemia del tabaquismo alcanzó su punto máximo a mediados del siglo pasado la tasa de cáncer de pulmón han estado disminuyendo en los hombres. En cambio, en países donde la epidemia se ha establecido más recientemente esta tasa sigue aumentando. La diferencia en las tendencias de los casos entre hombres y mujeres también refleja la importancia de esta epidemia en la aparición de nuevos casos, ya que la tasa de hombres disminuye mientras que la de mujeres va en aumento, reflejando la incorporación tardía de la mujer al hábito de fumar. Así pues, la mayoría de los casos de cáncer de pulmón podría prevenirse mediante la no iniciación del tabaquismo entre los adolescentes y el abandono entre los adultos.

Otros factores de riesgo para el cáncer de pulmón incluyen el tabaquismo pasivo, exposición ocupacional o ambiental al radón y el asbesto (especialmente entre los fumadores), ciertos metales (cromo, cadmio, arsénico), algunos productos químicos orgánicos, la radiación, la contaminación atmosférica, el humo del carbón y las emisiones de interior de la quema de

otros combustibles (Global Cancer, Facts & Figures, 2008; American Cancer Society, www.cancer.org).

1.2. Tipos histológicos

Clásicamente, el cáncer de pulmón se divide en dos tipos histológicos principales: el cáncer de pulmón de célula pequeña (microcítico) (SCLC, del inglés *small cell lung cancer*) y el cáncer de pulmón de célula no pequeña (no microcítico) (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*). El NSCLC se subdivide a su vez en carcinoma escamoso (SCC, del inglés *squamous cell carcinoma*), adenocarcinoma (AC) y carcinoma de célula grande (LCC, del inglés *large cell carcinoma*) que es el menos diferenciado dentro de los NSCLC (figura 4). Además, dentro del grupo de los AC cabe diferenciar varios subtipos de entre los que destacan el carcinoma bronquioalveolar (BAC) no invasivo, por su relación con el cáncer de pulmón no asociado al hábito tabáquico.

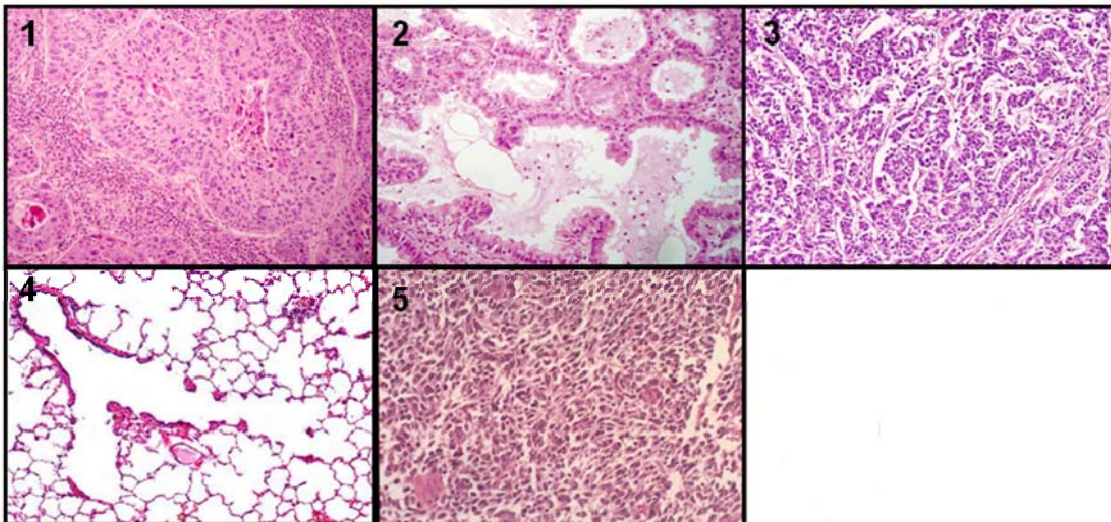


Figura 4. Tipos histológicos de cáncer de pulmón. 1) Carcinoma escamoso, H&E x200. 2) Adenocarcinoma, H&E x200. 3) Carcinoma de célula grande, H&E x100. 4) Tejido pulmonar normal, H&E x40. 5) Carcinoma microcítico, x200. 1-3 Imágenes cedidas por la Dra. Esther Conde. 4, 5 Imágenes del Atlas de Histología Funcional (Young B, Heath JW).

Una clasificación histológica más completa de los tipos de tumores pulmonares es la establecida por la Organización Mundial de la Salud en 2004 (tabla 1).

<p><u>MALIGNANT EPITHELIAL TUMOURS</u></p> <p><u>Preinvasive lesions</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Squamous carcinoma in situ Atypical adenomatous hyperplasia Diffuse idiopathic neuroendocrine cell hyperplasia <p><u>Squamous cell carcinoma (SCC)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Papillary Clear cell Small cell Basaloid <p><u>Adenocarcinoma (AD)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Adenocarcinoma, mixed subtype Acinar adenocarcinoma Papillary adenocarcinoma Bronchioalveolar carcinoma <ul style="list-style-type: none"> Nonmucinous Mucinous Mixed nonmucinous and mucinous Solid adenocarcinoma with mucin production <ul style="list-style-type: none"> Fetal adenocarcinoma Mucinous (colloid) carcinoma Mucinous cystadenocarcinoma Signet ring adenocarcinoma Clear cell adenocarcinoma <p><u>Large cell carcinoma (LCC)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Large cell neuroendocrine carcinoma / Combined Basaloid carcinoma Lymphoepithelioma-like carcinoma Clear cell carcinoma Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype 	<p><u>Adenosquamous carcinoma</u></p> <p><u>Sarcomatoid carcinoma</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Pleomorphic carcinoma Spindle cell carcinoma Giant cell carcinoma Carcinosarcoma Pulmonary blastoma <p><u>Small cell carcinoma (SCLC)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Combined small cell carcinoma <p><u>Carcinoid tumour</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Typical carcinoid Atypical carcinoid <p><u>Salivary gland tumour</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Mucoepidermoid carcinoma Adenoid cystic carcinoma Epithelial-myoepithelial carcinoma <p><u>BENIGN EPITHELIAL TUMOURS</u></p> <p><u>Papillomas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Squamous cell papilloma Glandular papilloma Mixed squamous cell and glandular papilloma <p><u>Adenomas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Alveolar adenoma Papillary adenoma Adenomas of the salivary gland type Mucinous cystadenoma 	<p><u>MESENCHYMAL TUMOURS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Epithelioid haemangioendothelioma Angiosarcoma Pleuropulmonary blastoma Chondroma Congenital peribronchial myofibroblastic tm Diffuse pulmonary lymphangiomatosis Inflammatory myofibroblastic tumour Lymphangioliomyomatosis Synovial sarcoma <ul style="list-style-type: none"> Monophasic Biphase Pulmonary artery sarcoma Pulmonary vein sarcoma <p><u>LYMPHOPROLIFERATIVE TUMOURS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Marginal zone B-cell lymphoma (MALT) Diffuse large B-cell Lymphoma Lymphomatoid granulomatosis Langerhans cell histiocytosis <p><u>MISCELLANEOUS TUMOURS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Hamartoma / Sclerosing hemangioma Clear cell tumour / Germ cell tumour Intrapulmonary thymoma / Melanoma <p><u>METASTATIC TUMOURS</u></p>
--	--	---

Tabla 1. Clasificación histológica de los tumores de pulmón. Modificado de (Travis et al., 2004).

El cáncer de pulmón puede surgir de los bronquios principales (tumores centrales) o de bronquios pequeños, bronquiolos o alveolos (tumores periféricos). Los carcinomas microcíticos y escamosos suelen aparecer como tumores centrales mientras que los adenocarcinomas y los carcinomas de célula grande se localizan periféricamente.

1.2.1. Lesiones preneoplásicas del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón aparece tras una serie de cambios progresivos moleculares y morfológicos en la mucosa respiratoria, las llamadas lesiones preneoplásicas o premalignas. Esta secuencia de cambios preneoplásicos está bien definida para los carcinomas escamosos pero no tanto para los otros tipos histológicos.

Los cambios en la mucosa de las vías respiratorias que preceden al carcinoma invasivo de célula escamosa incluyen hiperplasia, metaplasia escamosa, displasia escamosa y carcinoma in situ (CIS) (figura 5) (Colby et al., 1998; Kerr, 2001). Al no haber células escamosas en las vías respiratorias normales no se conocen con exactitud las células progenitoras del epitelio metaplásico escamoso, aunque la metaplasia escamosa suele preceder y acompañar la hiperplasia de células basales (Hirsch et al., 2001; Lee et al., 2001).

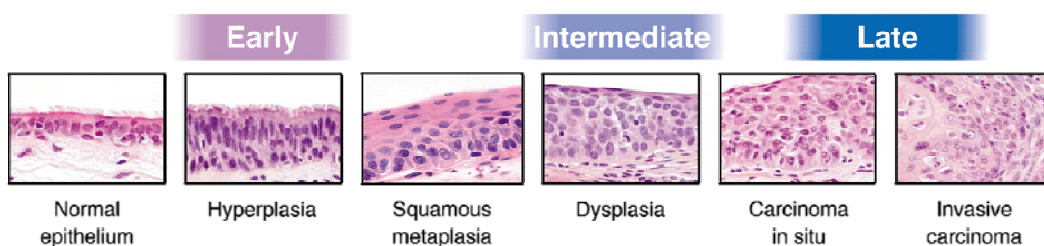


Figura 5. Cambios histopatológicos durante el desarrollo del carcinoma escamoso de pulmón (Wistuba and Gazdar, 2006).

El adenocarcinoma es el tipo histológico de cáncer de pulmón más frecuente, sobretodo en mujeres, no fumadores y jóvenes. Los adenocarcinomas pueden ser precedidos por cambios morfológicos que incluyen hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) en células de las vías aéreas periféricas y carcinoma bronquioalveolar (BAC) (figura 6) (Colby et al., 1998; Westra, 2000). En la zona de unión bronquioalveolar se localizan las células madre bronquioalveolares (BASCs, *bronchioalveolar stem cells*) que mantienen la población de células de Clara y neumocitos tipo II y la transformación de estas células originará el adenocarcinoma de pulmón (Kim et al., 2005).

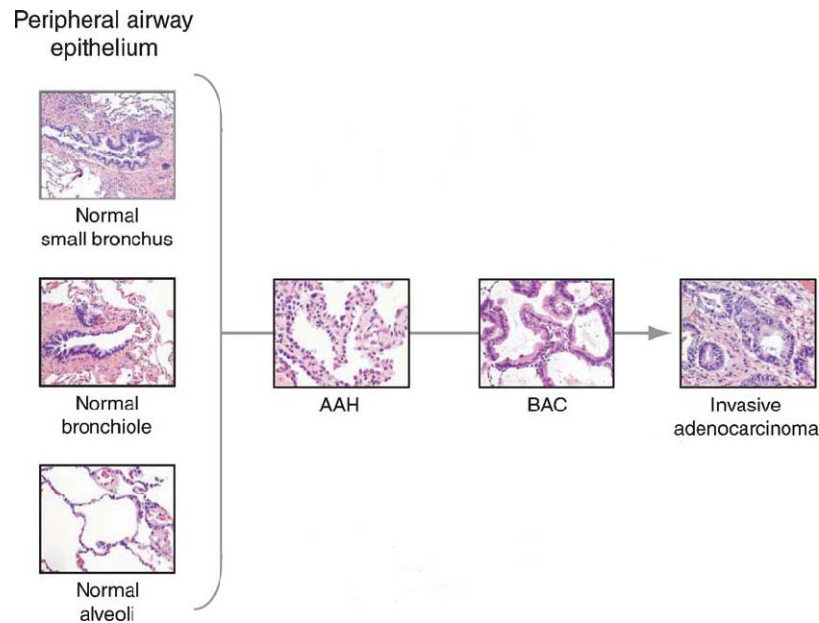


Figura 6. Cambios histopatológicos durante el desarrollo del adenocarcinoma de pulmón. AAH, hiperplasia adenomatosa atípica; BAC, carcinoma bronquioalveolar. Modificado de (Wistuba and Gazdar, 2006).

Los carcinomas microcíticos tienen características neuroendocrinas, por lo que provienen de células programadas para diferenciarse a este tipo celular. No se conocen las lesiones precursoras de este tipo histológico, que probablemente aparezca directamente de un epitelio normal o levemente anormal sin pasar por una secuencia de cambios histológicos. Aunque es sabido que una lesión rara, la hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas pulmonares (DIPNECH), está asociada al desarrollo de otros tipos de tumores neuroendocrinos de pulmón (Aguayo et al., 1992; Armas et al., 1995; Colby et al., 1998).

Las lesiones preneoplásicas de cáncer de pulmón suelen ser amplias y multifocales, la llamada “cancerización de campo”, lo que indica que gran parte del epitelio pulmonar ha sufrido mutagénesis, probablemente por la exposición a carcinógenos relacionados con el tabaco (Wistuba et al., 2002).

2. Biología molecular del cáncer de pulmón

El cáncer es un heterogéneo y complejo grupo de estados patológicos en el que las células se dividen anormalmente debido al mantenimiento de señales proliferativas y eludiendo las antiproliferativas, evadiendo la muerte celular y el sistema inmune, reprogramando el metabolismo energético celular y permitiendo una inmortalidad replicativa. Lo que confiere la característica de malignidad a esta proliferación es la capacidad angiogénica, la invasión y la metástasis provocando disfuncionalidades graves en el organismo. La inestabilidad genética genera la diversidad genética que precipita la adquisición de estas características y la inflamación también las fomenta (figura 7) (Hanahan and Weinberg, 2011).

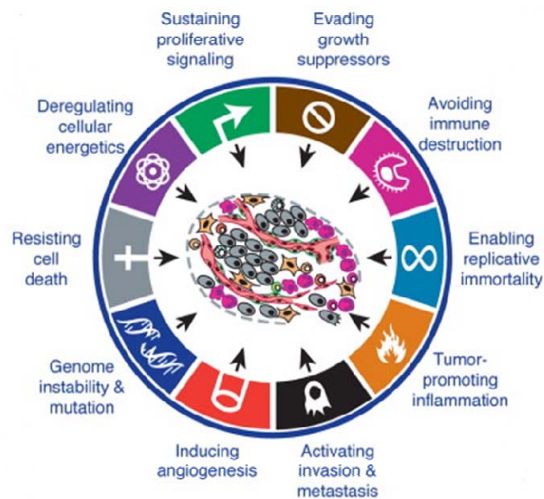


Figura 7. *Hallmarks of Cancer* (Hanahan and Weinberg, 2011).

El estudio de la biología molecular en cáncer de pulmón tiene una implicación directa con su clínica ya que permite conocer más la biología de este tipo de cáncer de tal forma que proporciona información útil para la prevención, detección temprana, el diagnóstico y pronóstico y las posibles respuestas al tratamiento (tabla 2). Gracias a ella es posible, por ejemplo, encontrar anomalías ya descritas en células bronquiales expuestas a carcinógenos e intervenir con un tratamiento temprano o preventivo. Por otro lado, la identificación de cambios moleculares comunes en la heterogeneidad del cáncer de pulmón también tiene implicaciones en el desarrollo de biomarcadores para el diagnóstico y la terapia (Fong et al., 2003).

Issue	Potential approaches
Molecular epidemiology	Genetic stratification of lung cancer risk; integration of this assessment into smoking cessation treatments, chemoprevention, and screening trials
Early detection	Detection of lung cancer specific genetic and epigenetic changes in sputum, blood, bronchial biopsies, brushings, and lavage specimens
Chemoprevention	Determination of the genetic and epigenetic abnormalities in specimens from bronchial epithelium to use as intermediate biomarkers for response to chemoprevention and smoking cessation
Diagnosis	Use of biomarkers as an adjunct to standard morphological and histological diagnosis and to assist in subtype differentiation
Treatment	Direct treatment at molecular targets abnormal in lung cancer but not in normal tissues. These include inhibitors of oncogenes, growth factors and their receptors such as tyrosine kinase inhibitors, farnesyltransferase inhibitors, cyclin dependent kinase inhibitors, cyclo-oxygenase inhibitors, antisense molecules, replacement gene therapy to correct tumour suppressor gene defects, apoptosis modulators, and inhibitors of angiogenesis and telomerase.
Prognosis	Use of molecular biomarkers to predict outcome including survival, metastatic potential, and probability of response to chemotherapy, radiotherapy or biological treatments

Tabla 2. Uso clínico de la información molecular en cáncer de pulmón (Fong et al., 2003).

El cáncer es la enfermedad genética más común. A lo largo de la vida, el DNA está expuesto a mutágenos que generan errores en la replicación, resultando cambios sutiles y progresivos en la secuencia de DNA de cada célula. A veces, una de estas mutaciones somáticas altera la función de un gen crítico proporcionando una ventaja en el crecimiento de la célula donde se da el cambio lo que promueve la expansión clonal de dicha célula. Mutaciones adicionales en genes relevantes y olas consecutivas de expansión clonal generan células que invaden los tejidos circundantes y metastatizan.

Desde un punto de vista genético, los genes del cáncer son aquellos que están alterados genéticamente en los tumores (Futreal et al., 2001; Haber and Harlow, 1997). Estas alteraciones genéticas derivarán en una ganancia de función o inactivación de la proteína codificada en oncogenes o genes supresores de tumores (TSGs, del inglés *tumor suppressor genes*) respectivamente. Generalmente, los oncogenes son activados a través de mutaciones puntuales, amplificación génica o translocaciones cromosómicas, mientras que los TSGs son inactivados por alteraciones bialélicas (Knudson, 1971) que pueden ser combinaciones de mutaciones puntuales, deleciones o hipermetilación del promotor.

Los oncogenes y los TSGs también se han definido desde una perspectiva funcional como la habilidad de un gen determinado de transformar una célula normal (oncogén) o de inhibir el crecimiento de una célula tumoral (TSG).

2.1. Descripción de las alteraciones genéticas en cáncer de pulmón

La carcinogénesis pulmonar es debida a la activación e inactivación de genes que son esenciales en el control de vías moleculares reguladoras de la transducción de señales, ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis, entre otras.

Es sabido que diversas alteraciones genéticas contribuyen al desarrollo del cáncer de pulmón (figura 8). Estas alteraciones incluyen la amplificación de genes de la familia *MYC*, mutaciones activadoras en *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* o *beta-catenina*, tanto amplificaciones como mutaciones en los genes *CMET* o *PIK3CA* y translocaciones cromosómicas que afectan el gen *ALK* (Sanchez-Cespedes, 2009). La inactivación de genes supresores de tumores en cáncer de pulmón se da mediante pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterocygosity*) y mutaciones que ocurren en los genes *APC* y *ATM*, este tipo de alteraciones junto con deleciones homocigotas se dan en los genes *RB*, *PTEN*, *TP53*, *SMAD4*, *LKB1* y *BRG1*. La hipermetilación de promotor es otro mecanismo de inactivación que, junto con otros genéticos, en cáncer de pulmón puede afectar a *P16* y *LRP1B* (Liu et al., 2000; Sanchez-Cespedes, 2009; Sonoda et al., 2004).

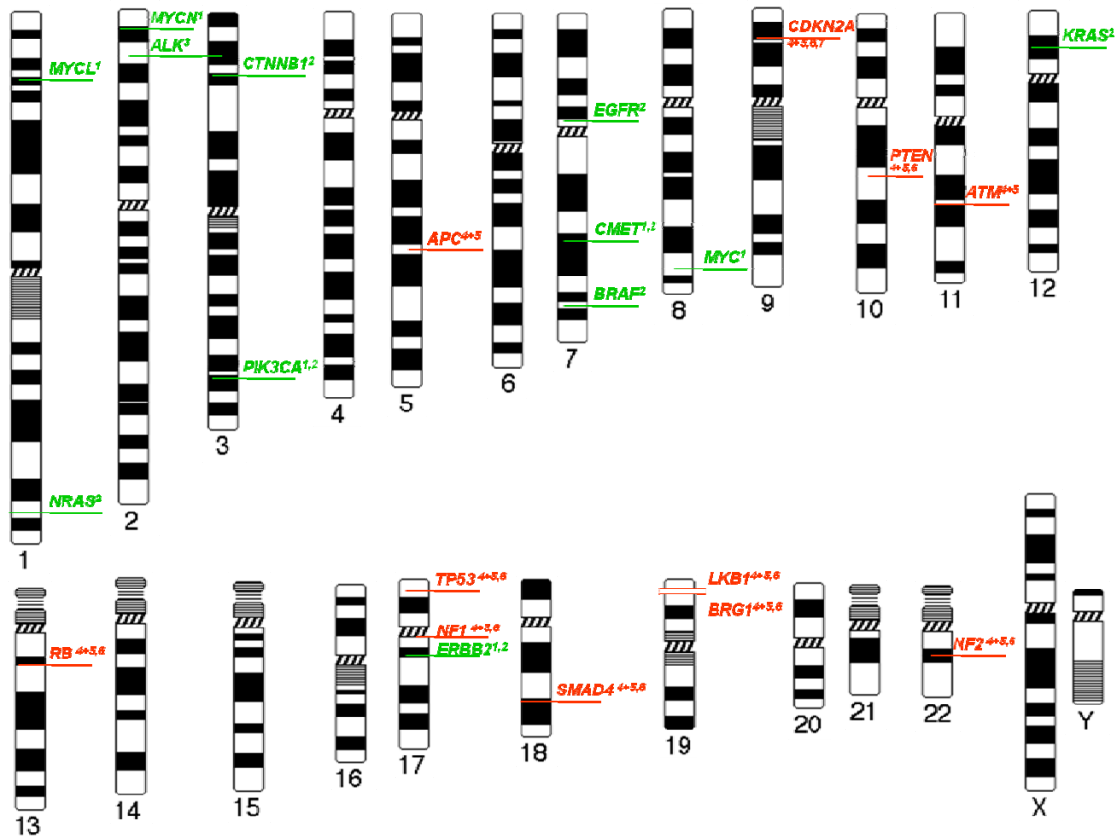


Figura 8. Localización cromosómica y tipo de alteración en genes supresores de tumores (rojo) y oncogenes (verde) en cáncer de pulmón. ¹Amplificación génica. ²Mutaciones activadoras. ³Translocaciones cromosómicas. ⁴LOH. ⁵Mutaciones inactivadoras. ⁶Deleciones homocigotas. ⁷Hipermetilación de promotor. (Sanchez-Céspedes, 2009)

Los genes alterados en cáncer se pueden adscribir a vías biológicas determinadas, tal y como se detalla a continuación.

2.2. Vías biológicas alteradas en cáncer de pulmón

Los genes alterados en cáncer de pulmón están involucrados en las vías moleculares que regulan la señalización mitogénica, la apoptosis, el ciclo celular y el metabolismo celular, entre otras. Es común encontrar en el mismo tumor alteraciones en genes que pertenecen a diferentes vías moleculares, lo que sugiere la existencia de una cooperación entre diferentes circuitos moleculares que conlleva al desarrollo tumoral. Sin embargo, alteraciones en ciertos genes nunca ocurren simultáneamente, lo que significa que son funcionalmente equivalentes y presumiblemente pertenezcan a la misma vía molecular, por lo que la alteración de uno de ellos es suficiente para mantener una activación constante de la vía molecular a la que pertenecen. La aparición de alteraciones secundarias en la misma vía molecular es la base de la aparición de una resistencia secundaria a terapias inicialmente efectivas.

2.2.1. Receptores de membrana y vías de transducción de señales

La familia ERBB es un grupo de receptores transmembrana con actividad tirosina-quinasa que junto con sus ligandos constituyen un bucle de estimulación de crecimiento y proliferación en cáncer de pulmón no microcítico. Los dos miembros más importantes de esta familia en cáncer de pulmón son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, *ERBB1*) y *HER2/neu* (*ERBB2*). *EGFR* regula la proliferación y diferenciación epitelial y está mutado y amplificado en un alto porcentaje de adenocarcinomas de pulmón, principalmente de no fumadores (Conde et al., 2006; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Scagliotti et al., 2004). Cuando *EGFR* se une a su ligando homodimeriza o heterodimeriza induciendo la actividad quinasa que inicia una cascada de señalización que diverge en otras vías moleculares a su vez interconectadas promoviendo la proliferación y crecimiento celular. Así pues, la alteración de los componentes de esta transducción de señales también puede iniciar y mantener la carcinogénesis pulmonar.

Otros receptores de membrana activados en cáncer de pulmón, aunque con menor frecuencia y preferencialmente en adenocarcinomas, son *CMET* y *ALK* que son nuevas dianas para el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos. El receptor *ALK* está activado debido a su fusión con *EML4* mediante translocaciones cromosómicas (Soda et al., 2007). La amplificación de *CMET* está relacionada con la adquisición de resistencia secundaria a inhibidores de *EGFR* (Engelman et al., 2007).

De entre las moléculas que participan en la transducción de la señalización producida por la unión ligando-receptor cabe destacar las proteínas *RAS*. La familia *RAS* incluye los genes *KRAS*, *HRAS* y *NRAS* (Barbacid, 1987) y están mutados en alrededor de un tercio de los adenocarcinomas de pulmón de fumadores y en más del 90% de estos casos está mutado *KRAS* (Westra et al., 1993). La mayoría de estas mutaciones son transversiones de guanina a timina que reflejan la influencia de los carcinógenos del tabaco (Slebos et al., 1991). La familia *RAS* codifica proteínas que se unen a nucleótidos de guanina (GTP y GDP) y están implicados en procesos de transducción de señales, incluyendo procesos mitogénicos (Wittinghofer et al., 1997). El gen *NF1*, que inhibe la actividad de *RAS* mediante la activación de su actividad GTPasa, es un *bona fide* gen supresor de tumores en cáncer de pulmón (Ding et al., 2008).

Las alteraciones en *EGFR* y *KRAS* predominan en adenocarcinomas con etiología diferente, aparecen en no fumadores y fumadores respectivamente, por lo que la existencia de estas mutaciones en el mismo tumor es rara e indica que ambas proteínas están involucradas en la misma vía molecular (Conde et al., 2006; Scagliotti et al., 2004). De la misma forma se sabe que alteraciones en *NRAS* y *ERBB2*, también presentes en tumores de pulmón, tampoco coexisten entre ellas y con las anteriores, indicando también que son funcionalmente equivalentes (Blanco et al., 2009; Conde et al., 2006; Ding et al., 2008).

Otros componentes de esta cascada de señalización alterados en cáncer de pulmón son *PIK3CA* y *PTEN*. El gen *PIK3CA* codifica la proteína p110 que es la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La PI3K fosforila el fosfoinosítido-3,4-difosfato (PIP2) a fosfoinosítido-3,4,5-trifosfato (PIP3), ambas son moléculas mensajeras que regulan la localización y función de múltiples efectores. El gen *PIK3CA* se encuentra activado en cáncer de pulmón preferentemente mediante amplificación génica y en menor medida por mutaciones

puntuales, especialmente en carcinomas escamosos (Angulo et al., 2008; Samuels et al., 2004). Por otro lado, el gen *PTEN* codifica una fosfatasa que desfosforila el PIP3. Las alteraciones genéticas en *PTEN* son frecuentes en cáncer de pulmón y se dan especialmente en carcinomas microcíticos y escamosos (Forgacs et al., 1998; Yokomizo et al., 1998).

Esta vía molecular converge aguas abajo con otra vía implicada en la regulación del metabolismo energético celular en la que uno de sus componentes, el gen *STK11* está altamente alterado en cáncer de pulmón. El gen *STK11* codifica la proteína LKB1, una serina-treonina quinasa cuyo sustrato mejor conocido es la quinasa AMPK, un sensor del estado energético celular. El aumento de la relación AMP/ATP promueve la fosforilación y activación de la AMPK que modula la actividad de otras proteínas como TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) (Corradetti et al., 2004; Hardie, 2003; Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). La inactivación congénita de este gen es la causa del síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizado por la aparición de hamartomas intestinales, hiperpigmentación mucocutánea y un riesgo elevado de padecer neoplasias gastrointestinales y otras no intestinales incluyendo adenocarcinomas de pulmón (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998). El gen *STK11* está mutado en un alto porcentaje de adenocarcinomas de pulmón, preferentemente de fumadores; estas mutaciones se dan junto con alteraciones en *KRAS* pero no en *EGFR* (Carretero et al., 2004; Matsumoto et al., 2007; Sanchez-Cespedes et al., 2002). *STK11* se encuentra en la misma región cromosómica que el TSG *BRG1* (19p) y es frecuente encontrar mutaciones inactivadoras en ambos genes en las mismas células tumorales indicando una cooperación en la carcinogénesis pulmonar (Medina and Sanchez-Cespedes, 2008; Sanchez-Cespedes, 2007).

Los genes *CTNNB1* y *CTNND1* que codifican las proteínas β -catenina y p120ctn respectivamente, están alterados en cáncer de pulmón. El primero, *CTNNB1*, está alterado en distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, mediante mutaciones somáticas activadoras (Ding et al., 2008). Ambas proteínas están involucradas tanto en la transducción de señales como en la regulación transcripcional. Se localizan mayoritariamente en la membrana celular estabilizando los complejos de unión célula-célula cadherina-catenina, mientras que una pequeña proporción se encarga de la transducción de señales y regulación de la transcripción. La β -catenina forma parte de la vía molecular canónica de Wnt. Cuando esta vía se activa, la β -catenina transloca al núcleo e interacciona con los factores de transcripción TCF/LEF para activar la transcripción (Logan and Nusse, 2004). La p120ctn regula también las señales de la vía de Wnt modulando la actividad de GTPasas de la familia Rho e inhibiendo el factor de transcripción Kaiso en el núcleo (Daniel and Reynolds, 1999; Grosheva et al., 2001; Kim et al., 2004).

2.2.2. Regulación de la transcripción y remodelación de cromatina

Las cascadas de señalización confluyen en efectores nucleares, como factores de transcripción y remodeladores de cromatina, que modulan la expresión génica para promover el crecimiento y la proliferación celular, angiogénesis y/o invasión de las células tumorales.

La familia *MYC* son factores de transcripción y los últimos efectores de la transducción de señales iniciada por RAS. *CMYC* es el miembro de esta familia más frecuentemente alterado en cáncer de pulmón ya que está sobre-expresado tanto en carcinomas microcíticos como no microcíticos, aunque preferentemente lo esté en no microcíticos, mientras que *MYCN* y *MYCL* lo están preferencialmente en microcíticos (Blanco et al., 2009). La activación de esta familia de oncogenes es debida a la sobre-expresión de la proteína causada por amplificación génica, desregulación transcripcional e incluso por aumento en la estabilidad de su RNA mensajero (Bernasconi et al., 2000; Grandori and Eisenman, 1997). La amplificación de *MYC* se da más frecuentemente en pacientes tratados con quimioterapia y se ha relacionado con un peor pronóstico (Kubokura et al., 2001; Volm and Koomagi, 2000).

El gen *BRG1* (BRM-Brahma/SWI2-related gene 1) es un componente del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF. Dependiendo del contexto celular, este complejo regula la transactivación o represión transcripcional remodelando la cromatina. *BRG1* está inactivado en carcinomas de pulmón no microcíticos, especialmente en adenocarcinomas (Medina et al., 2008; Medina and Sanchez-Cespedes, 2008).

La amplificación de *MYC* no ocurre en las mismas células de cáncer de pulmón en las que *BRG1* está mutado, sugiriendo que la función de ambas proteínas está conectada en el desarrollo de cáncer de pulmón. De hecho, es necesaria la actividad del complejo SWI/SNF para la correcta actividad transactivadora de *CMYC* ya que cuando *BRG1* está mutado se inhibe la habilidad de *CMYC* para transactivar sus genes diana (Cheng et al., 1999). Ambos genes están implicados en la regulación de la diferenciación celular y reprogramación de células somáticas, por tanto, es posible que las alteraciones en *MYC* o *BRG1* promuevan y mantengan la desdiferenciación característica de las células tumorales.

El factor de transcripción *SOX4* (*SRY-HMG box gene 4*) está amplificado y concomitantemente sobre-expresado en cáncer de pulmón. Algunos tumores, generalmente de tipo microcítico, expresan altos niveles del transcrito de *SOX4* en ausencia de amplificación sugiriendo otro mecanismo de sobre-expresión particularmente en este tipo histológico (Medina et al., 2009). El gen *SOX4* es un miembro de la familia de factores de transcripción SOX, los cuales tienen en común la homología en su dominio de unión al DNA, el dominio HMG-box (*high mobility group box*). El gen *SOX4* se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario en el sistema nervioso central, corazón, timo, pulmón, colon y páncreas y en adulto solo se ha encontrado expresión de *SOX4* en páncreas, gónadas y timo (Farr et al., 1993; Lioubinski et al., 2003; van de Wetering et al., 1993; Wegner, 1999). Estudios sobre *SOX4* demuestran que este gen tiene un papel fundamental en la diferenciación y destino celular durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y que un aumento de su expresión puede ser determinante para la progresión cancerígena ya que se ha observado sobreexpresión de este gen en diferentes tipos de cáncer además del de pulmón, tales como de vejiga, próstata y colon (Aaboe et al., 2006; Andersen et al., 2009; Liu et al., 2006). Asimismo, a *SOX4* se le han adjudicado propiedades pluripotentes principalmente en células hematopoiéticas, folículo piloso y sistema nervioso central (Bhattaram et al., 2010; Kobiela et al., 2007; Lee et al., 2010). Recientemente se ha identificado *SOX4* como responsable del mantenimiento de células iniciadoras de glioma mediante su capacidad de transactivar *SOX2* (Ikushima et al., 2009).

No obstante, aunque es sabido que SOX4 es un factor de transcripción que se une al DNA mediante su dominio HMG-box preferentemente al motivo AACAA (Scharer et al., 2009; van de Wetering et al., 1993), hasta el momento no se conoce en profundidad los genes que regula.

2.2.3. Ciclo celular

El gen *CDKN2A* codifica la proteína p16 que pertenece a la familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que inhibe la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (RB) provocando el secuestro del factor de transcripción E2F de tal forma que se inhibe la transición G1/S del ciclo celular y por tanto se detiene la proliferación celular (Chin et al., 1998). La inactivación de *CDKN2A* se da en el 40-60% de los tumores de pulmón, generalmente no microcíticos, mientras que la inactivación de *RB* es característica de los microcíticos (Gazzeri et al., 1998; Mori et al., 1990). Ambos genes están alterados en diferentes tipos histológicos y pertenecen a la misma vía molecular por lo tanto sus alteraciones son mutuamente excluyentes.

Otros genes involucrados en este control del ciclo celular también se encuentran alterados en cáncer de pulmón. La ciclina D1 inhibe la actividad de RB promoviendo su fosforilación por la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4). Por lo tanto, la sobre-expresión de la *ciclina D1* es un mecanismo alternativo para promover la transición G1/S y ocurre en un alto porcentaje de carcinomas de pulmón no microcíticos siendo un marcador de mal pronóstico (Betticher et al., 1996; Caputi et al., 1997). También *CDK4* se encuentra alterado en algunos carcinomas de pulmón no microcíticos (Zochbauer-Muller and Minna, 2000).

El gen *TFDP1*, que codifica la proteína DP1, está amplificado y sobre-expresado en cáncer de pulmón, especialmente en carcinomas escamosos (Castillo et al., 2010). DP1 pertenece a una familia de factores de transcripción que heterodimerizan con proteínas E2F para potenciar su capacidad de unión al DNA y promover la transcripción de los genes diana de E2F (Girling et al., 1993), asimismo, esta cooperación es necesaria para una interacción estable con RB (Helin et al., 1993).

2.2.4. Reparación del DNA y apoptosis

La proteína TP53 es un factor de transcripción que actúa en respuesta al daño en el DNA provocado por radiación gamma, luz ultravioleta o carcinógenos (Levine, 1997). El gen supresor de tumores *TP53* puede ser considerado como el gen más comúnmente mutado en cáncer, además, el cáncer de pulmón es uno de los tipos tumorales con mayores tasas de mutación en este gen (Hollstein et al., 1991). Las mutaciones de *TP53* en carcinoma de pulmón microcítico son extremadamente frecuentes (entre 75-100%) mientras que en no microcítico varían según los tipos histológicos (75% en SCC y 50% en AC) (Tammemagi et al., 1999). El daño del DNA es la principal señal para la fosforilación de TP53 que es catalizada por la quinasa codificada por el gen *ATM*, activando así la transcripción de los genes *p21/WAF1/CIP1*, *HDM2*,

GADD45, *BAX* y *ciclina G* entre otros, involucrados en la reparación del DNA, la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Sekido et al., 1998). *p19ARF* es la proteína codificada por una pauta de lectura alternativa del locus de *p16INK4A*. Esta proteína bloquea la ubiquitinación de TP53 por HDM2 para su posterior degradación (Pomerantz et al., 1998; Shieh et al., 1997). El gen *HDM2* está sobre-expresado en el 25% de carcinomas de pulmón no microcítico y *p19ARF* y *ATM* están comúnmente inactivados tanto genética como epigenéticamente (Ding et al., 2008; Higashiyama et al., 1997). En este caso, las alteraciones inactivadoras en los genes *TP53* y *p19ARF* no son mutuamente excluyentes aunque pertenezcan a la misma ruta bioquímica (Esteller et al., 2000; Sanchez-Cespedes et al., 1999).

Como se ha dicho anteriormente, es frecuente encontrar alteraciones en diferentes vías moleculares que cooperan en el desarrollo de la carcinogénesis pulmonar. En carcinomas de pulmón no microcíticos las mutaciones en *KRAS*, *TP53* y *STK11* o *p16INK4A* coexisten en el mismo tumor mientras que las alteraciones en *RB*, *TP53* y *MYC* lo hacen en tumores de pulmón microcíticos. También se dan casos en que alteraciones en diferentes vías moleculares convergen en un mismo efector celular. Este es el caso de la activación constitutiva de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) que es la consecuencia de la deregulación de las vías de estimulación de proliferación y crecimiento *EGFR/KRAS*, *PIK3CA/PTEN* y *STK11*, indicando que esta proteína es muy importante para la carcinogénesis pulmonar.

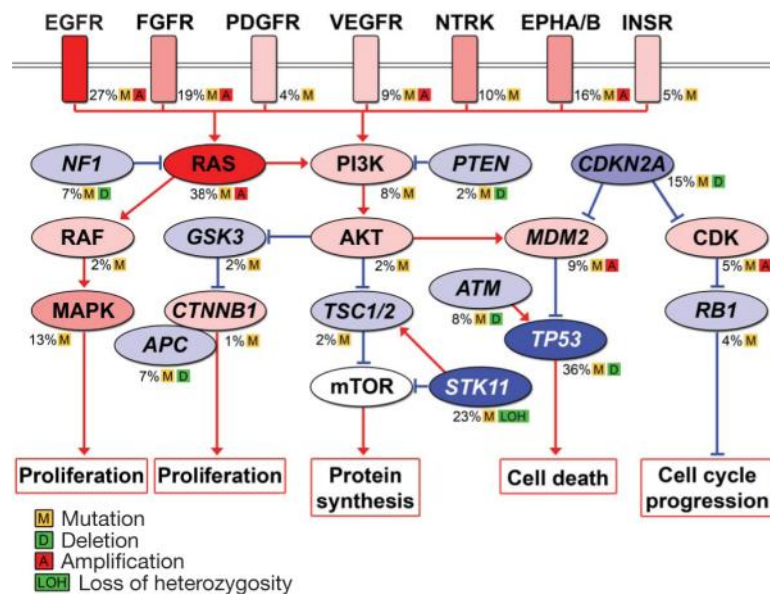


Figura 9. Resumen de las vías moleculares alteradas en adenocarcinoma de pulmón. Los oncogenes implicados están marcados en rojo y los TSGs en azul. La oscuridad de los colores está relacionada con el porcentaje de tumores con cada alteración. (Ding et al., 2008)

2.3. Distribución de las alteraciones genéticas en los distintos tipos histopatológicos

Es sabido que algunas alteraciones genéticas son específicas de uno o varios tipos histológicos lo que indica diferencias en la carcinogénesis y en el tipo celular de origen (figura 10). Por ejemplo, *RB* está inactivado en carcinoma microcítico, *EGFR*, *RAS*, *LKB1*, *BRG1*, *ERRB2*, *ALK* y *CMET* se encuentran alterados en adenocarcinomas, *PTEN* está inactivado tanto en carcinoma escamoso como microcítico, las alteraciones en *PIK3CA* y *P16* son específicas de carcinomas no microcíticos y la inactivación de *TP53*, que ocurre en la mayoría de los tumores pulmonares, junto con la amplificación de *MYC* son encontradas en todos los tipos histológicos (Sanchez-Cespedes, 2009).

Asimismo, dentro de los adenocarcinomas cabría diferenciar los provenientes de fumadores de los de no fumadores debido a sus diferencias moleculares que afectan en gran medida a la respuesta al tratamiento. Las mutaciones en *KRAS* aparecen en adenocarcinomas de fumadores mientras que *EGFR* está mutado en adenocarcinomas de no fumadores (Scagliotti et al., 2004; Slebos et al., 1991). La inactivación de *LKB1* ocurre preferencialmente en adenocarcinomas de fumadores concomitantemente con mutaciones en *KRAS* pero no en *EGFR* (Matsumoto et al., 2007) y la activación de *ALK* es más frecuente en no fumadores con *EGFR* salvaje (Horn and Pao, 2009).

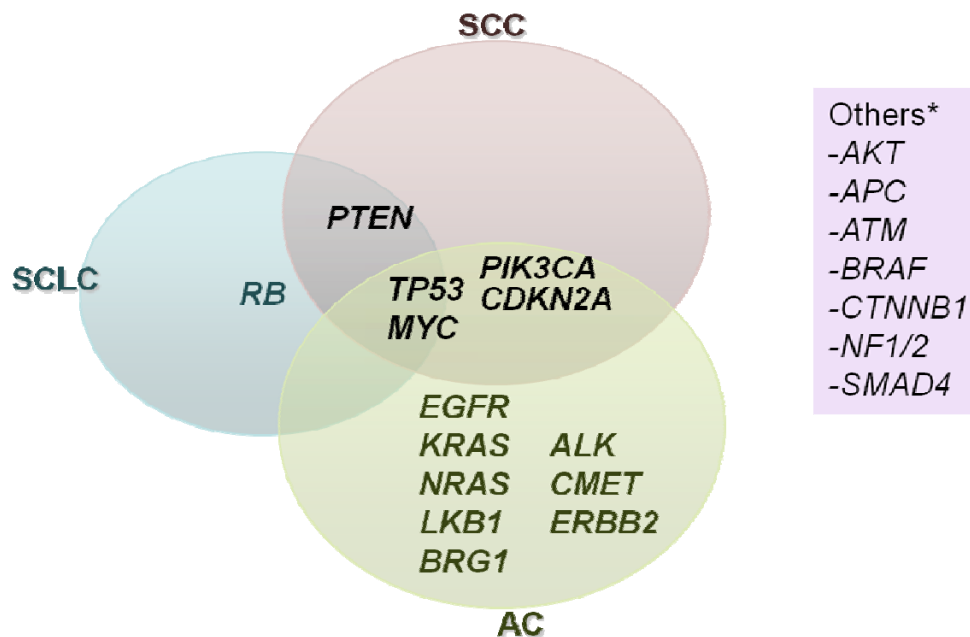


Figura 10. Distribución de las alteraciones genéticas en los tipos histológicos de cáncer de pulmón.

*Debido a la baja frecuencia de alteraciones, no es posible determinar el tipo histológico predominante. Modificado de (Sanchez-Cespedes, 2009).

3. Los oncogenes como dianas terapéuticas en cáncer de pulmón

3.1. Adicción oncogénica

Las células tumorales contienen múltiples anormalidades genéticas y epigénéticas, pero a pesar de esta complejidad, su crecimiento y supervivencia puede verse afectada por la inactivación de un solo oncogén. A este fenómeno se le ha llamado “adicción oncogénica” y es la base de la terapia molecular dirigida (Weinstein, 2002; Weinstein and Joe, 2006). Las evidencias que apoyan este concepto de dependencia oncogénica se han obtenido de estudios hechos con modelos de ratón modificados genéticamente (Chin et al., 1999; Felsner and Bishop, 1999; Jackson et al., 2001; Jain et al., 2002), líneas celulares de cáncer (Brummelkamp et al., 2002; Colomer et al., 1994; Sauter et al., 1999) y ensayos clínicos con agentes terapéuticos específicos (Lynch et al., 2004; Shepherd et al., 2005; Taron et al., 2005).

La adicción oncogénica se basa en que la célula cancerosa tiende a mantener una cierta homeostasis entre los factores promotores e inhibidores de la proliferación muy diferente a la de las células normales. En las células tumorales, un oncogén tiene un papel más importante y cualitativamente diferente en una determinada vía molecular que el que tiene el mismo gen en células normales. Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales la inactivación de un oncogén puede conducir a la inhibición de crecimiento, diferenciación y/o apoptosis en células cancerosas pero no en células normales. Uno de ellos se basa en que con el fin de mantener la homeostasis, los efectos promotores de la proliferación de un determinado oncogén pueden ser parcialmente amortiguados a través de mecanismos de retroalimentación negativa mediante un aumento de la expresión de inhibidores de la proliferación. Si este oncogén es inactivado, las células tumorales pueden sufrir un exceso relativo de las señales inhibitorias y sufrir apoptosis antes de que pueda alcanzarse un nuevo mecanismo de homeostasis (Weinstein, 2000). Otro mecanismo se basa en el concepto de “letalidad sintética” en el que dos genes son letales sintéticos si la inactivación en uno de ellos es compatible con la supervivencia celular pero la inhibición de los dos provoca la muerte celular. Por ejemplo, las células tumorales pueden ser muy dependientes de un cierto oncogén porque se haya perdido la función de otro gen que realizaba la misma función; por lo tanto, la inactivación de este oncogén provocará la muerte de las células tumorales y no de las normales (Kaelin, 2005).

La terapia molecular esta basada en este concepto de adicción oncogénica ya que las drogas utilizadas son moléculas dirigidas contra estos oncogenes, tanto pequeños inhibidores y anticuerpos que inactivan la proteína como RNAs interferentes que inactivan a nivel de RNA. Por lo tanto, el primer paso en el desarrollo de terapias moleculares es identificar dianas potenciales, es decir, oncogenes activados constitutivamente y que su inhibición conlleve la muerte selectiva de células tumorales.

3.2. Terapia molecular en cáncer de pulmón

Tradicionalmente, las estrategias de tratamiento del cáncer de pulmón se basaban únicamente en aspectos histológicos y las terapias consistían en tratamientos citotóxicos muy generalizados. En la última década, los grandes avances en los análisis masivos de expresión y mutacionales del cáncer de pulmón han permitido un desarrollo paralelo de las terapias moleculares ya que conforme se identifican nuevos oncogenes alterados en cáncer de pulmón se diseñan nuevos agentes terapéuticos contra los mismos.

Las terapias moleculares más desarrolladas hasta el momento son las dirigidas contra receptores tirosina-quinasa y moléculas de transducción de señales (figura 11).

3.2.1. Terapia molecular contra receptores tirosina-quinasa

Los agentes terapéuticos diseñados para inhibir los receptores tirosina-quinasa (TKRs) son pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosina-quinasa (TKIs) y anticuerpos monoclonales.

La terapia molecular más ampliamente usada en cáncer de pulmón es el uso de inhibidores de EGFR. Los agentes terapéuticos contra EGFR incluyen los TKIs gefitinib y erlotinib, y los anticuerpos monoclonales cetuximab y panitumumab. Es frecuente que se dé una resistencia secundaria a estos tratamientos debida a la aparición de mutaciones secundarias en *EGFR* y amplificación del receptor *MET* que activan la vía molecular de manera dependiente de *HER3* (Balak et al., 2006; Engelman and Janne, 2008; Engelman et al., 2007) por lo que se han desarrollado nuevas terapias contra estos mecanismos de resistencia como inhibidores Pan-HER, que inactivan varios miembros de la familia de receptores ERBB (Rabindran et al., 2004; Rosell et al., 2008), inhibidores de la forma mutada *EGFR* T790M (Zhou et al., 2009) e inhibidores del oncogén *MET* y su ligando HGF (Eder et al., 2009).

El receptor tirosina-quinasa codificado por la fusión de los genes *EML4-ALK*, no presente en tejido normal (Soda et al., 2007), es una diana prometedoras en la terapia contra el cáncer de pulmón ya que los tumores que expresan esta proteína de fusión son resistentes al tratamiento con inhibidores de EGFR (Horn and Pao, 2009). La molécula PF-0234106 inicialmente diseñada para la inhibición de CMET (Timofeevski et al., 2009) es también un inhibidor de esta proteína de fusión (Engelman and Janne, 2008; Rosell et al., 2009).

El VEGF es el factor de crecimiento más importante en el control de la angiogénesis y esta vía regulada por *VEGF* y su receptor *VEGFR* está frecuentemente activada en cáncer de pulmón (Fontanini et al., 1999). Los agentes terapéuticos dirigidos a la inactivación de esta vía molecular son los anticuerpos monoclonales contra VEGF bevacizumab y aflibercept (Riely and Miller, 2007) y los VEGFR TKIs sunitinib (Mendel et al., 2003), sorafenib (Adjei et al., 2007), vandetanib (Matsumori et al., 2006) y pazopanib (Sonpavde and Hutson, 2007).

La sobreexpresión del receptor tirosina-quinasa *IGFR-1* aparece en un alto número de tumores de pulmón no microcíticos. Algunas drogas dirigidas contra IGFR-1 se encuentran en

diferentes fases de ensayos clínicos, estas incluyen anticuerpos monoclonales como CP-751,871 (Karp et al., 2009) e IMC-A12 (Rowinsky et al., 2007) y pequeños inhibidores del dominio quinasa.

3.2.2. Otras terapias moleculares en cáncer de pulmón

La búsqueda de nuevas terapias moleculares se ha centrado principalmente en la inactivación de receptores tirosina-quinasa pero la aparición de resistencia secundaria a estas terapias ha fomentado el desarrollo de terapias dirigidas a la inactivación de proteínas transductoras de las señales de las vías moleculares alteradas en cáncer de pulmón.

BRAF es una serina-treonina quinasa que une la señalización entre RAS y la familia de MAP quinazas a través de MEK1. En cáncer de pulmón no microcítico *BRAF* y *MEK1* están mutados de forma mutuamente excluyente a *EGFR* y *KRAS* y entre ellos (Marks et al., 2008; Naoki et al., 2002). Se han estudiado algunos inhibidores de estas moléculas en diferentes ensayos clínicos, como GSK2118436 contra BRAF y CI-1040 contra MEK1 (Solit et al., 2006).

La serina-treonina quinasa mTOR tiene un papel crítico en cáncer de pulmón ya que es la quinasa donde convergen varias vías moleculares alteradas en cáncer de pulmón (Pal et al., 2008). Varios derivados de la rapamicina como everolimus, temsirolimus y deforolimus, inicialmente usados como inmunosupresores, están siendo testados como agentes terapéuticos en cáncer de pulmón (Mita et al., 2008; O'Donnell et al., 2008; Pandya et al., 2007). Otros inhibidores de la activación de mTOR incluyen moléculas inhibitoras de PI3K (Engelman et al., 2008) y AKT (Liu et al., 2011).

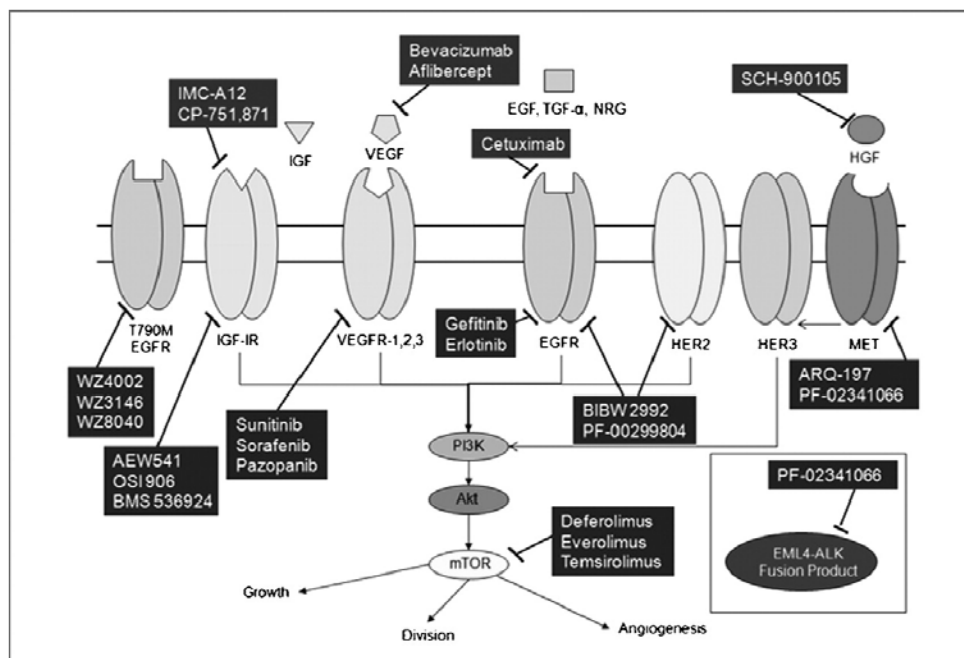


Figura 11. Esquema de las vías moleculares alteradas en cáncer de pulmón no microcítico y los agentes terapéuticos dirigidos contra sus componentes. (Pal et al., 2010)

4. Identificación de nuevos oncogenes en cáncer de pulmón

Como se ha demostrado anteriormente, la identificación de nuevos oncogenes es esencial para el desarrollo de nuevas terapias moleculares debido a su potencial terapéutico. Al mismo tiempo, esta identificación también suministra herramientas moleculares predictivas, útiles para predecir el pronóstico clínico y la respuesta a un tratamiento determinado, por tanto, es muy importante aunar esfuerzos para identificar nuevos oncogenes implicados en cáncer de pulmón.

En los últimos años ha habido un crecimiento exponencial en el desarrollo y mejora de técnicas de análisis genómico masivo. Estos análisis permiten un estudio mutacional del genoma completo, tanto de mutaciones somáticas puntuales como de amplificaciones y pérdidas de DNA en tumores primarios y líneas celulares de cáncer.

La búsqueda de nuevos oncogenes alterados en cáncer comienza generalmente mediante el análisis masivo de regiones amplificadas (amplicones) y sobre-expresadas o de mutaciones somáticas.

4.1. Identificación de regiones amplificadas

Las primeras herramientas para la identificación de regiones cromosómicas amplificadas incluían el cariotipo convencional, el pintado cromosómico y la hibridación genómica comparda (CGH, del inglés *comparative genomic hybridization*) (Kallioniemi et al., 1992) pero tienen muy baja resolución, a nivel de citobanda.

El desarrollo de microarrays de expresión inició el uso de técnicas de análisis masivo de un alto número de muestras. Actualmente, las plataformas de microarrays de expresión más usadas contienen oligonucleótidos sintéticos que abarcan todos los genes codificantes y RNAs no codificantes. El uso de estos microarrays de expresión ha propulsado un avance tecnológico que se ha aplicado al estudio de otros aspectos del genoma del cáncer como la medida del número de copias de DNA mediante arrays de CGH (aCGH) y arrays de SNPs (del inglés *single-nucleotide polymorphisms*).

Los aCGH combinan la CGH convencional, el DNA total de células tumorales y normales es marcado con diferentes fluorocromos, con los arrays de DNA, donde este DNA marcado no se hibrida en cromosomas metafásicos como en la CGH convencional, sino en plataformas similares a las usadas para los microarrays de expresión o en plataformas donde se hibrida con fragmentos genómicos grandes como cromosomas bacterianos artificiales (BACs) (Lucito et al., 2000; Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999). El ratio de la intensidad de fluorescencia en cada punto del array es proporcional al número de copias de la secuencia correspondiente. La comparación de ratios de secuencias solapantes permiten mapear amplificaciones y deleciones del DNA en el genoma. Por lo tanto, el aCGH es una técnica que analiza la variación relativa del número de copias entre dos genomas mediante hibridación competitiva.

En el genoma humano, los polimorfismos de un nucleótido (SNPs) son los más comunes y este hecho se ha aplicado al desarrollo de arrays para el estudio masivo del genoma (Wang et

al., 1998). Debido a que estos polimorfismos son muy frecuentes en el genoma permiten una alta resolución. Otra característica de estos polimorfismos es su alta heterocigosidad, que permite distinguir los diferentes alelos y, por lo tanto, determinar si una región específica del DNA ha sufrido tanto cambios en el número de copias como pérdida de heterocigosidad (Lin et al., 2004).

La búsqueda de oncogenes mediante identificación de regiones amplificadas puede iniciarse mediante arrays de expresión, de tal forma que al alinear los datos de expresión de los transcritos según su posición en los cromosomas se identifiquen regiones sobre-expresadas probablemente debido a una amplificación subyacente. Así pues, el análisis de expresión y de número de copias de DNA se puede hacer hibridando tanto el cDNA como el DNA respectivamente, de una misma muestra en la misma plataforma de oligonucleótidos (Pollack et al., 1999; Pollack et al., 2002).

Estos análisis masivos del genoma revelan regiones amplificadas y/o sobre-expresadas que contienen, según su resolución, un conjunto de genes. Para determinar cual o cuales de estos genes tienen un papel en el desarrollo tumoral se debe verificar la amplificación y expresión individual de los genes dentro de estas regiones mediante FISH y PCRs cuantitativas tanto de DNA como de cDNA y confirmar el papel de los genes seleccionados mediante estudios funcionales.

4.2. Identificación de mutaciones somáticas

La secuenciación masiva de última generación está adquiriendo en los últimos años gran importancia en la identificación de nuevos oncogenes. La secuenciación a gran escala comenzó con el análisis de determinadas familias de genes (Davies et al., 2002) pero las grandes mejoras en esta tecnología han permitido que la secuenciación se extienda a todos los genes codificantes conocidos (Lee et al., 2010). Además del avance que supone esta tecnología en la secuenciación del genoma completo de muestras tumorales se debe añadir la capacidad de este método de secuenciación de identificar mutaciones somáticas presentes en células tumorales que mediante la secuenciación automática convencional quedaban enmascaradas por la contaminación de DNA de tejido normal.

Objetivos

Objetivos

La alta tasa de morbilidad y mortalidad causada por el cáncer pulmón es debida a la falta tanto de herramientas para un diagnóstico temprano como de terapias efectivas. El progreso en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón ha permitido avances en el diagnóstico y en la terapia molecular contra este tipo de cáncer y, por consiguiente, cierto incremento en la supervivencia. En especial, la identificación de oncogenes activados en cáncer ha permitido el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que representan un gran avance en el tratamiento contra el cáncer. Aún así, la frecuencia de alteraciones genéticas en oncogenes que constituyen dianas terapéuticas para fármacos específicos es realmente baja. Es por ello que tan sólo unos pocos pacientes pueden beneficiarse de estos nuevos fármacos y por tanto es necesario continuar profundizando en el conocimiento de la biología del cáncer de pulmón. Con estos antecedentes, los objetivos principales de la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Identificación de nuevos genes amplificados en cáncer de pulmón.
 - Identificación de nuevos amplicones en cáncer de pulmón mediante el análisis de la expresión génica global y del número de copia de DNA.
 - Verificación y determinación de los niveles de amplificación.
 - Análisis de expresión de los genes contenidos en los amplicones identificados.

2. Estudio de la relevancia de los genes identificados en cáncer de pulmón.
 - Análisis de su frecuencia de amplificación y sobre-expresión.
 - Análisis de su relación con los distintos tipos histopatológicos.

3. Análisis funcional de los genes identificados.
 - Exploración de sus características oncogénicas mediante su depleción en líneas celulares de cáncer que muestren amplificación y sobre-expresión.
 - Identificación y estudio de las vías moleculares en los que están involucrados.

Artículo I

Amplificación génica del factor de transcripción DP1 y CTNND1 en cáncer de pulmón

La búsqueda de nuevos oncogenes es importante ya que pueden constituir dianas para las terapias moleculares dirigidas contra el cáncer. En este artículo se identifican nuevos genes amplificados en cáncer de pulmón mediante el análisis de expresión génica global de tumores primarios de pulmón. Para la búsqueda de amplicones se alinearon los datos de expresión génica según la posición de los transcritos en el genoma y se buscaron regiones con sobre-expresión de varios genes consecutivos, sugiriendo una amplificación genómica subyacente. Mediante análisis de microarrays de DNA y FISH de los cromosomas 11q12 y 13q34 en tumores primarios de pulmón se confirmó la presencia de amplificación que abarcaba 0.4 Mb y 1 Mb respectivamente. Se identificó la amplificación de estas regiones con una frecuencia del 3% cada una. Además, la expresión individual de los transcritos dentro de los amplicones verificó el aumento de la expresión de varios de estos genes. Las proteínas p120ctn y DP1, codificadas por los oncogenes candidatos *CTNND1* y *TFDP1*, en los amplicones 11q12 y 13q34, respectivamente, exhibieron una fuerte inmunotinción en los tumores de pulmón con amplificación génica. Para determinar las propiedades oncogénicas de DP1 se buscaron líneas celulares de cáncer de pulmón con amplificación de *TFDP1*. La depleción de la expresión de *TFDP1* mediante RNA pequeño de interferencia en la línea celular HCC33, que presenta amplificación de *TFDP1* y sobre-expresión de su proteína, redujo la viabilidad celular en un 50%. Como conclusión, se han identificado dos nuevos amplicones, en 11q12 y 13q34, cada uno con una frecuencia de 3% en cáncer de pulmón no microcítico. *TFDP1*, que codifica el factor de transcripción DP1 que heterodimeriza con E2F, es un oncogén candidato en cáncer de pulmón.

Sandra D. Castillo, Barbara Angulo, Ana Suarez-Gauthier, Lorenzo Melchor, Pedro P. Medina, Lydia Sanchez-Verde, Juan Torres-Lanzas, Guillermo Pita, Javier Benitez, Montse Sanchez-Cespedes. *Gene amplification of the transcription factor DP1 and the CTNND1 in human lung cancer. J Pathol. 2010 Sep;222(1):89-98.*

Artículo II

El gen *SOX4* es una diana de amplificación en el cromosoma 6p en cáncer de pulmón

La identificación de nuevos oncogenes está siendo cada vez más importante en el estudio de la genética del cáncer porque son dianas apropiadas para la terapia contra el cáncer. Para identificar nuevos oncogenes activados por amplificación génica se analizaron microarrays de cDNA mediante hibridación genómica comparada de alta resolución y se estudió el número de copias de DNA y los niveles de expresión en líneas celulares de cáncer de pulmón. Se identificaron varios amplicones: 5p13, 6p22-21, 11q13, 17q21 y 19q13, que presentaron simultáneamente un aumento de expresión génica. Estas regiones también se vieron amplificadas en tumores primarios de pulmón. Se acotó la región amplificada en el cromosoma 6p22 y se midieron los niveles de expresión de los transcritos dentro del amplicón. El gen *SOX4* (*sex-determining región Y box 4*) que codifica para un factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario estaba sobre-expresado en la línea celular con amplificación en 6p22 en comparación con células normales. El gen *SOX4* también está sobre-expresado en algunos tumores primarios y líneas celulares de cáncer de pulmón. Por otro lado, se identificaron variantes de *SOX4* en tumores primarios y líneas celulares, incluyendo una mutación somática que genera un codón de parada en el dominio rico en serinas localizado en el extremo carboxilo de la proteína. Aunque ninguna de las variantes incrementaba la capacidad de transactivación de *SOX4*, la sobre-expresión de la forma salvaje y de las variantes no truncadas en células NIH3T3 incrementaban la habilidad transformante del oncogén RHOA-Q63L en un ensayo de cooperación oncogénica. En conclusión, estos resultados muestran que, en cáncer de pulmón, *SOX4* está sobre-expresado por amplificación génica y dan pruebas de las propiedades oncogénicas de *SOX4*.

Pedro P. Medina, Sandra D. Castillo, Sandra Blanco, Marta Sanz-García, Cristina Largo, Sara Alvarez, Jun Yokota, Anna Gonzalez-Neira, Javier Benitez, Hans C. Clevers, Juan C. Cigudosa, Pedro A. Lazo, Montse Sanchez-Cespedes. *The Sry-HMG box gene, SOX4, a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer.* Hum Mol Genet. 2009 Apr 1;18(7):1343-52.

Artículo III

SOX4 y sus dianas transcripcionales están implicados en el desarrollo de cáncer de pulmón microcítico.

El gen *SOX4* pertenece a una familia de factores de transcripción y está amplificado y sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer, entre los que se encuentra el de pulmón. Para conocer mejor su relevancia en cáncer de pulmón se buscaron sus dianas transcripcionales y se estudió el papel de *SOX4* y el de sus dianas en el desarrollo y la carcinogénesis pulmonar. Se desarrolló un sistema inducible para inhibir la expresión de *SOX4* en la línea de cáncer de pulmón NCI-H522 que sobre-expresa *SOX4* debido a amplificación génica. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de expresión génica global lo que proporcionó una firma de expresión de *SOX4* que incluía alrededor de 90 genes, muchos de ellos relacionados con el desarrollo neural. Entre estos genes se demostró que *MYB*, *VASH2*, *TEAD2* y *TUBB3* reclutan a *SOX4* en sus promotores y suponen dianas transcripcionales directas de *SOX4*. Además, se demostró que *SOX4* es reclutado en la región de control del *cluster* de *PCDHBs* localizada a 320 Kb de este *cluster*.

La expresión de muchos de estos transcritos aumenta tras la sobre-expresión ectópica de *SOX4* y en tumores pulmonares con altos niveles de *SOX4*, mientras que su expresión es menor en fibroblastos embrionarios de ratones *Sox4*^{-/-} en relación con los *wild type*. Además, la expresión de *Sox4* y de sus dianas en pulmón disminuye durante el envejecimiento en ratones.

También se caracterizó la expresión de otros miembros de la familia SOX en los diferentes tipos histopatológicos de cáncer de pulmón y se encontró que la alta expresión de *SOX2*, *-4* y *-11* era característica del cáncer de pulmón microcítico, un tipo de tumor pulmonar con características neuroendocrinas. Finalmente, se observó que la firma de expresión génica de *SOX4* es significativamente similar a la de cáncer de pulmón microcítico.

En conclusión, este trabajo identifica nuevos genes diana de *SOX4*, muchos de ellos relacionados con el desarrollo neural. Ello apoya la implicación de la familia SOX, y en particular la de *SOX4*, en el desarrollo del cáncer de pulmón microcítico, lo que está de acuerdo con su origen neuroendocrino.

Sandra D. Castillo, Ander Matheu, Niccolo Mariani, Julian Carretero, Fernando Lopez-Rios, Robin Lovell-Badge, Montse Sanchez-Cespedes. *Novel transcriptional targets of the SRY-HMG box transcription factor SOX4 link its expression to the development of small cell lung cancer. Cancer Res. In press.*

Resumen

Resumen global

Introducción

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte debida a cáncer. La alta tasa de mortalidad se debe a la ausencia de terapias plenamente efectivas y a la falta de herramientas para un diagnóstico temprano. La caracterización de nuevas alteraciones genéticas nos ayuda a conocer mejor la biología tumoral y, por lo tanto, a identificar biomarcadores predictivos que nos indicarán una potencial respuesta a terapias específicas. A su vez, estos marcadores podrán ser dianas moleculares para el desarrollo de nuevas drogas. Así pues, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es la identificación de nuevos oncogenes amplificados en cáncer de pulmón para incrementar el conocimiento de la biología del cáncer de pulmón y ayudar en un futuro en el desarrollo de nuevas terapias moleculares contra este tipo de cáncer.

Resultados

El análisis de la expresión global y de número de copias de DNA en tumores primarios y líneas celulares de cáncer de pulmón reveló la presencia de amplificación génica en los cromosomas 11q12, 13q34 y 6p22. Estudiamos la expresión individual de los transcritos dentro de estos amplicones. En los cromosomas 11q12 y 13q34 se identificaron ocho y tres genes sobre-expresados, respectivamente, en los tumores con amplificación respecto a tejido pulmonar normal; globalmente, la expresión de los transcritos del amplicón 13q34 era bastante superior a la del amplicón 11q12. Debido a su función biológica y a su relevancia en otros tipos de cáncer se seleccionaron los genes *CTNND1* y *TFDP1*, en los cromosomas 11q12 y 13q34 respectivamente, para estudios posteriores. Estudiamos los niveles de expresión de *CTNND1* y *TFDP1* mediante inmunohistoquímica en tumores primarios de cáncer de pulmón no microcítico. El 1,4% y 2,7% de los tumores, todos de tipo escamoso, presentaron los niveles más altos de expresión de p120ctn y DP1, codificadas por los genes *CTNND1* y *TFDP1* respectivamente. El 10% de los tumores tenían una localización citosólica aberrante de p120ctn. Por otra parte, el gen *CTNND1* codifica diferentes isoformas de p120ctn por *splicing* alternativo. Se observó que la expresión de estas isoformas sigue un patrón similar entre los tumores y que ésta es diferente a la del correspondiente tejido normal. En general, los tumores están enriquecidos en la isoforma 3 de p120ctn. Las líneas celulares de cáncer de pulmón HCC33 y H1963 presentaron los niveles más altos de expresión de *TFDP1* y se confirmó la presencia de amplificación mediante FISH; además, la sobre-expresión de DP1 en la línea HCC33 se confirmó a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica y *western blot*. Se interfirió la expresión de DP1 mediante siRNA en la línea celular HCC33 y en las líneas H1299 y A549 (sin amplificación ni sobre-expresión de *TFDP1*). Se midió la proliferación celular mediante ensayos de MTT y se observó que la inhibición de la expresión de DP1 reduce alrededor de un 50% la viabilidad de células con amplificación de *TFDP1* mientras que no afecta a las células sin DP1 sobre-expresado.

El gen *SOX4* fue el único sobre-expresado respecto a tejido pulmonar normal en la línea celular con amplificación en 6p22. Se midió la expresión de *SOX4* en pulmones sanos, tumores primarios y líneas celulares de cáncer de pulmón. El 3,5% de las líneas celulares y el 6% de los tumores primarios tenían una expresión de *SOX4* como mínimo tres veces superior a la media

en tejido sano. Por otro lado, se midió también la expresión de otros miembros de la familia SOX y se encontró que tanto *SOX4* como *SOX2* y *SOX11* estaban sobre-expresados específicamente en células de cáncer de pulmón microcítico. A su vez, dentro de los tumores de cáncer de pulmón no microcítico, *SOX2* y *SOX9* estaban sobre-expresado en carcinomas escamosos respecto a adenocarcinomas y *SOX4* presentaba un patrón contrario.

El análisis de mutaciones de *SOX4* en cáncer de pulmón reveló dos variantes germinales en tumores primarios de pulmón, una de ellas se trataba de un polimorfismo presente en la población española y una mutación somática que codifica para una proteína truncada. En las líneas celulares se encontraron dos variantes de cambio de aminoácido y una delección en pauta. La capacidad de transactivación de *SOX4* no cambió en las formas no truncadas respecto a la forma salvaje, mientras que la forma truncada estaba incapacitada para activar la transcripción. Mediante un ensayo de cooperación oncogénica con RHOA-Q63L y HRAS-G12V se observó que la expresión creciente de la forma salvaje y las formas no truncadas de *SOX4* incrementaban significativamente la habilidad oncogénica de RHOA-Q63L y no afectaba la capacidad transformante de HRAS-G12V mientras que la forma truncada reducía el número de focos transformantes originados por HRAS-G12V. En experimentos independientes se observó una expresión mucho más elevada de la forma truncada de *SOX4* en comparación con las no truncadas.

Mediante la depleción de *SOX4* se identificaron nuevos genes regulados directa o indirectamente por este factor de transcripción, muchos de ellos relacionados con el desarrollo neural. A su vez, estos genes se sobre-expresaban tras la expresión ectópica de *SOX4* en líneas celulares y en tumores primarios de pulmón con altos niveles de *SOX4*, sugiriendo un papel en la carcinogénesis pulmonar. Por otro lado, estos genes tenían una expresión reducida en fibroblastos embrionarios de ratones *Sox4*^{-/-}. Además, en el tejido pulmonar sano de ratones, tanto los niveles de expresión de *Sox4* como los de sus genes diana se reducían durante el envejecimiento. Finalmente, se demostró el reclutamiento de *SOX4* en los promotores de los genes *MYB*, *VASH2*, *TEAD2* y *TUBB3* y en la región de control del cluster de *PCDHb5*. La firma de expresión génica de *SOX4* resultó compartir muchas similitudes con la de cáncer de pulmón microcítico, de origen neuroendocrino, por lo que hay una alta implicación de *SOX4* en el desarrollo de este tipo de cáncer.

Conclusiones

Se han identificado tres regiones cromosómicas altamente amplificadas y sobre-expresadas en cáncer de pulmón: 11q12, 13q34 y 6p22. En la región 11q12 varios genes se encontraban sobre-expresados y la falta de una línea celular con amplificación en 11q12 impidió apuntar un oncogén candidato en esta región. La amplificación en 13q34 subyace a la sobre-expresión de *TFDP1* en cáncer de pulmón. La interferencia de la expresión de *TFDP1* en células de cáncer de pulmón con amplificación reduce significativamente su viabilidad. *SOX4* es el gen conductor de la amplificación en 6p22. *SOX4* está amplificado y sobre-expresado en cáncer de pulmón y presenta propiedades oncogénicas lo que permite sugerir que *SOX4* es un oncogén candidato en cáncer de pulmón. Los genes *MYB*, *VASH2* y el cluster de *PCDHb5* son nuevas dianas transcripcionales directas de *SOX4*. Tanto *SOX4* como *SOX2* y *SOX11* están sobre-expresados en cáncer de pulmón microcítico y la firma de expresión génica de *SOX4* se asemeja a la de este tipo de cáncer, por lo que tiene una implicación en su desarrollo.

Discusión

Discusión

Las regiones de tinción homogénea (HSR, del inglés *homogeneously staining regions*) son un mecanismo común de amplificación génica en tumores por el cual varios genes contiguos están amplificados y, con frecuencia, sobre-expresados simultáneamente. En base a este mecanismo de amplificación génica, en el presente trabajo de tesis se ha llevado a cabo la búsqueda de regiones amplificadas en cáncer de pulmón. Para ello se han utilizado tecnologías de análisis masivo, combinando la detección del número de copias a partir del DNA genómico y la expresión génica global en tumores primarios y en líneas celulares de cáncer de pulmón.

En el artículo I se han utilizado datos del análisis de perfiles de expresión génica en 69 tumores primarios de pulmón no microcítico, procedentes de un trabajo previo (Angulo et al., 2008). Para identificar regiones sobre-expresadas y potencialmente amplificadas, se alinearon estos datos de expresión según su localización cromosómica y se seleccionaron aquellas regiones que contenían varios genes consecutivos sobre-expresados. De este análisis se seleccionaron nueve amplicones en siete regiones cromosómicas distintas. En el artículo II se analizó el número de copias de DNA genómico y la expresión génica global en ocho líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico, utilizando microarrays de cDNA. En este trabajo se identificaron siete regiones cromosómicas que presentaban, simultáneamente, amplificación génica y aumento en la expresión de múltiples genes del amplicón. Dentro de los amplicones seleccionados en ambos artículos se encontraba la región 17q12, conteniendo el oncogén *ERBB2*, que había sido previamente verificada mediante análisis de FISH, tanto en la línea celular como en tumores primarios (Conde et al., 2006). Estos resultados están de acuerdo con datos previos de otros grupos que observan amplificación de *ERBB2* en un grupo pequeño de tumores de pulmón (Liu et al., 2010) validando, por tanto, la robustez de nuestro estudio. Además, en un tumor se observó una región con sobre-expresión de varios genes en el cromosoma 1p34.2, que incluía al oncogén *MYCL*, el cual se ha descrito también activado por amplificación génica en un número pequeño de tumores pulmonares, preferentemente de tipo microcítico (Blanco et al., 2009). Otro tumor evidenció sobre-expresión simultánea de varios genes de la citobanda 4q12, también amplificada en cáncer de pulmón no microcítico y cuyos oncogenes diana pueden ser, probablemente, *KIT* y/o *PDGFRA* (Ramos et al., 2009). De entre todos los amplicones identificados se seleccionaron los amplicones en 6p22, 11q12 y 13q34 para ser analizados en profundidad.

Los amplicones en los cromosomas 11q12 y 13q34 no habían sido descritos anteriormente en este tipo de cáncer y fueron seleccionados para ser estudiados exhaustivamente. Las razones principales que justificaban la selección de estas regiones fueron su novedad y el hecho de que presentaban unos niveles muy altos de amplificación y de expresión génica en más de tres genes consecutivos. Varios estudios han descrito previamente amplificación y sobre-expresión en el cromosoma 11q, pero esta afecta concretamente a la región 11q12-13, situada a unas 12 megabases en dirección telomérica con respecto a la identificada en el presente trabajo. El amplicón en 11q12-13 se ha observado en distintos tipos de cáncer y, generalmente, el oncogén diana propuesto en esta región es el *CCND1* (ciclina D1) (Huang et al., 2002; Janjetovic et al., 2010; Kwek et al., 2009). Por su parte, el amplicón 11q12 identificado en el presente trabajo de tesis no se había descrito anteriormente en el cáncer de pulmón, aunque sí en carcinomas escamosos de otros tipos de cáncer (Bass et al., 2009; Choi et al., 2007) y en adenomas hepatocelulares (Skawran et al., 2008). En el presente estudio se

determinaron los niveles de expresión de los distintos genes incluidos en la región 11q12, concluyendo que *TIMM10*, *UBE2L6*, *CLP1*, *ZDHC5*, *MED19*, *TMX2*, *BTBD18* y *CTNND1* estaban sobre-expresados en aquellos tumores que presentaban amplificación. De entre estos genes, solo *UBE2L6*, *MED19*, *BTBD18* y *CTNND1* han sido relacionados previamente con el desarrollo tumoral. Poco se sabe del gen *BTBD18*, que codifica para una proteína con un dominio BTB/POZ (Stogios et al., 2005). La proteína BTBD18 podría estar implicada en el desarrollo del cáncer ya que se ha identificado una proteína de fusión, MLL-BTBD18, producida por una translocación del gen *MLL* (*myeloid/lymphoid leukemia*) con el dominio carboxi terminal de BTBD18, en la que se pierde el dominio BTB/POZ, en una leucemia linfoblástica aguda (Alonso, et al., 2010). El gen *UBE2L6* codifica la enzima conjugadora de ubiquitina UBCH8. Se ha demostrado que UBCH8 se une a P53RFP, una enzima ligasa de ubiquitina, para promover la apoptosis mediada por P53 (Huang et al., 2006). Por otra parte, al interferir el gen *BRCA2* en células de cáncer de mama la expresión de *UBE2L6* se reduce (Tripathi and Chaudhuri, 2005). Estos hechos podrían indicar un posible papel del gen *UBE2L6* como supresor tumoral, por lo que su amplificación y sobre-expresión en los tumores de pulmón podría ser una alteración pasajera (término traducido del inglés *passenger*, referido a aquellas alteraciones genéticas azarosas, sin relevancia biológica) en lugar de conductora (término traducido del inglés *driver*, referido a aquellas alteraciones genéticas seleccionadas durante el desarrollo tumoral con relevancia biológica). Por su parte, el gen *MED19* codifica una subunidad del complejo co-activador de la transcripción *Mediator*. Este complejo sirve de puente entre los factores de transcripción y la RNA polimerasa II, regulando su capacidad para expresar genes codificantes. Debido a la composición de este complejo, con 26 subunidades en humanos, su potencial regulador de la transcripción es ilimitado (Taates, 2010). *MED19* está sobre-expresado en cáncer de vejiga y de mama (Li et al., 2011; Zhang et al., 2011). La interferencia de la expresión de *MED19* en células de carcinomas de vejiga, hepatocelular, de mama y en osteosarcomas detiene el ciclo celular en fase G0/G1, reduce la proliferación de estas células e inhibe la formación de tumores (Li et al., 2011; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zou et al., 2011). Es interesante comprobar que el gen *MED19* está sobre-expresado en adenocarcinomas de pulmón, especialmente aquellos que están poco diferenciados (Sun et al., 2011). Así mismo, la inhibición de la expresión de *MED19* en una línea celular de cáncer de pulmón disminuye la proliferación y la capacidad de esta línea celular de invasión y formación de tumores en ratones inmunodeprimidos (Sun et al., 2011).

Además de los genes anteriormente discutidos, el amplicón 11q12 contiene el gen *CTNND1*. *CTNND1* codifica la catenina p120ctn, una proteína con repeticiones del dominio *Armadillo* (*Arm*), similar a β -catenina, involucrada en la adhesión intercelular. p120ctn es además sustrato de la quinasa Src (Reynolds et al., 1989) y ejerce múltiples funciones en los diferentes compartimentos celulares. En la membrana celular, p120ctn se une al dominio yuxtamembrana de las cadherinas, mientras que β -catenina se une al dominio de unión a catenina (Thoreson et al., 2000; Yap et al., 1998). La unión de p120ctn a las cadherinas es esencial para la estabilidad de estas últimas (Davis et al., 2003; Ireton et al., 2002; Xiao et al., 2003), mientras que la estabilidad de la β -catenina depende de su interacción con cadherinas (Nagafuchi et al., 1991), por lo que p120ctn dirige la regulación del complejo de unión cadherina-catenina. En el presente trabajo se comprobó que los tumores de pulmón con *CTNND1* amplificado y sobre-expresado exhibían una fuerte inmunotinción de p120ctn tanto en la membrana como en el citoplasma. Además, fue interesante observar que

aproximadamente 1 de cada 10 tumores evidenciaba una localización de p120ctn citoplasmática, en ausencia de amplificación o sobre-expresión, lo que podría sugerir la presencia de mutaciones en el gen *CTNND1*. La acumulación de p120ctn en el citoplasma da lugar a una desregulación de la actividad de Rho GTPasas, lo que podría afectar a la motilidad celular y promover la invasión tumoral y la metástasis. En el citoplasma, p120ctn regula miembros de la familia de Rho como RhoA, Rac1 y Cdc42, que son mediadores clave en la organización y dinámica del citoesqueleto (Anastasiadis et al., 2000; Grosheva et al., 2001; Noren et al., 2000). Estas características indican que p120ctn puede promover la adhesión intercelular o la motilidad celular a través de diferentes mecanismos. Mientras que es sabido que p120ctn activa Rac1 y Cdc42, su efecto en RhoA no está muy claro ya que depende del contexto celular. Por ejemplo, la inducción de la transición epitelio-mesénquima en células de carcinoma de colon está caracterizada por el aumento de p120ctn citoplasmática, la formación de un complejo p120ctn/RhoA y la reducción de la actividad de RhoA (Bellovin et al., 2005). Por otro lado, la depleción de p120ctn aumenta la actividad de RhoA endógeno tanto en células que expresan cadherina como en células deficientes en cadherina (Bellovin et al., 2005; Shibata et al., 2004; Yanagisawa and Anastasiadis, 2006). Por el contrario, la sobre-expresión de p120ctn en queratinocitos de ratón resulta en una inducción de la actividad de RhoA dependiente de PI3K (Cozzolino et al., 2003). Así pues, en última instancia, el aumento de p120ctn en el citoplasma promueve la motilidad celular que, en un contexto tumoral, puede facilitar la invasión y metástasis (Thoreson and Reynolds, 2002). Al igual que β -catenina, p120ctn regula la transcripción génica en el núcleo, aunque a diferencia de β -catenina (Willert and Jones, 2006) el papel de p120ctn en el núcleo está poco caracterizado. En el núcleo p120ctn se une a Kaiso, un represor de la transcripción bimodal (Daniel et al., 2002), e inhibe la unión de éste al DNA evitando la represión transcripcional de sus genes diana que incluyen las dianas de β -catenina/TCF, *ciclina D1*, *matrilysin* y *siamois*. Ello sugiere una implicación de p120ctn como regulador indirecto de la vía Wnt (Park et al., 2005; Spring et al., 2005). En el presente estudio, no se ha detectado p120ctn nuclear en los tumores de pulmón analizados, aunque su acumulación en el citoplasma podría llevar a un aumento del tráfico al núcleo. Por otra parte, el gen *CTNND1* codifica para diferentes isoformas por *splicing* alternativo, las isoformas más expresadas de p120ctn en tejido pulmonar normal son la 1 y la 3 (Liu et al., 2007). Las diferentes características de estas isoformas añaden un grado más de complejidad en el posible papel de p120ctn en cáncer de pulmón. Actualmente no hay un consenso sobre el papel que juegan las diferentes isoformas de p120ctn en cáncer. Se ha descrito que, en tumores de pulmón, hay un enriquecimiento de la isoforma 3 mientras que se reduce la expresión de la isoforma 1 (Liu et al., 2009); aunque estudios en líneas celulares de cáncer de pulmón mostraron que la isoforma 1 inhibe la capacidad invasiva mientras que la isoforma 3 inhibe el ciclo celular (Liu et al., 2009). Estas discrepancias pueden explicarse por la diferente capacidad de las distintas isoformas de regular las GTPasas Rho. En el presente trabajo de tesis se ha observado una expresión diferencial entre las isoformas de p120ctn en los tumores primarios de pulmón y sus correspondientes tejidos normales de pulmón. En general, los tumores pulmonares estaban enriquecidos en isoforma 3, mientras que la isoforma 1 se perdía, tal como se había descrito anteriormente (Liu et al., 2009). Cabe comentar que la presencia de amplificación y sobre-expresión de *CTNND1* no produjo cambios en este patrón de expresión. Por otra parte, la expresión reducida y la localización aberrante de p120ctn se ha asociado a tumores de próstata, mama, páncreas, colon, piel, vejiga y endometrio (Reynolds

and Roczniak-Ferguson, 2004; Thoreson and Reynolds, 2002; van Hengel and van Roy, 2007). Asimismo, diferentes estudios han demostrado una expresión reducida de p120ctn en cáncer de pulmón no microcítico (Liu et al., 2009; Liu et al., 2007; Mortazavi et al., 2010). Estas observaciones sugieren que p120ctn tendría un papel como supresor tumoral, y por tanto, *CTNND1* no sería un oncogen candidato del amplicón en 11q12. Para poder determinar el posible papel oncogénico del p120ctn en aquellos tumores que tienen amplificación en 11q12, no basta con determinar su expresión total, y deberían llevarse a cabo estudios exhaustivos de análisis de expresión y función, incluyendo localización sub-celular, análisis de la inhibición de su expresión con siRNAs, estudios con la sobre-expresión individual de cada isoforma, análisis de la expresión de cadherinas, etc. Desafortunadamente, en este trabajo no se identificó ninguna línea celular de cáncer de pulmón que tuviera altos niveles de amplificación y de sobre-expresión de *CTNND1*, similares a los hallados en los tumores primarios, por lo que no se pudieron llevar a cabo este tipo de análisis.

Otro de los amplicones identificados en el actual trabajo estaba en la región 13q34. Cabe resaltar que este amplicón contenía más de 20 copias, reflejando unos niveles de amplificación génica realmente muy elevados y perfectamente comparables a otros amplicones que activan oncogenes conocidos tales como *MYC*, *ERBB2* o *MYCN*. Es por ello que es poco probable que esta alteración sea una mera consecuencia de la degeneración y aneuploidía global del genoma de la célula tumoral. Este amplicón se ha descrito anteriormente en carcinomas cutáneos, gastroesofágicos, de mama, hepatocelulares y adenocarcinomas de intestino delgado (Abba et al., 2007; Diosdado et al., 2010; Isinger-Ekstrand et al., 2010; Melchor et al., 2009; Salgado et al., 2010; Yasui et al., 2002), aunque en algunos de estos trabajos la alteración consiste únicamente en un ligero aumento del número de copias. En cáncer de pulmón, este amplicón se había descrito en un estudio previo al nuestro, en carcinomas escamosos de pulmón (Choi et al., 2007) aunque sin llevar a cabo ningún tipo de análisis posterior. En el presente trabajo se analizó la expresión de los genes contenidos en el amplicón, *PCID2*, *CUL4A*, *LAMP1*, *GRTP1*, *ADPRHL1*, *DCUN1D2*, *TMCO3* y *TFDP1*, en los dos tumores de pulmón que presentaron amplificación en 13q34. Se observó que todos estos genes estaban sobre-expresados en ambos tumores. El gen *CUL4A* codifica una subunidad del complejo multifuncional ubiquitin-ligasa E3 y regula la ubiquitinación de algunos supresores tumorales como P53, por lo que cambios importantes en sus niveles de expresión podrían contribuir al desarrollo tumoral (Kopanja et al., 2009). La amplificación y sobre-expresión de *CUL4A* se ha detectado en tumores de mama, hepatocelulares y mesoteliomas (Abba et al., 2007; Hung et al., 2009; Melchor et al., 2009; Yasui et al., 2002). Por otra parte, el gen *DCUN1D2* codifica para una proteína que contribuye a la nedilación de culinas, entre las que se encuentra *CUL4A* (Meyer-Schaller et al., 2009). Aunque la amplificación y sobre-expresión de *DCUN1D2* no se ha descrito anteriormente en cáncer, no podemos descartar que ésta contribuya al desarrollo tumoral. El gen *LAMP1* codifica para una glicoproteína de membrana que se une a selectinas presentes en el endotelio vascular favoreciendo la adhesión de células tumorales al endotelio lo cual podría estar asociado a los procesos de metástasis (Saitoh et al., 1992; Sawada et al., 1993). La función de *PCID2* no es muy conocida, aunque se sabe que participa en el control de la mitosis durante la diferenciación de linfocitos B (Nakaya et al., 2010). Hasta el momento se desconoce la función biológica de las proteínas codificadas por los genes *GRTP1*, *ADPRHL1* y *TMCO3* y tampoco se han relacionado con ningún tipo de cáncer. Por su parte, el gen *ADPRHL1* codifica para una ADP-ribosil hidrolasa, involucrada por tanto en la

modificación postraduccional (Glowacki et al., 2002). Con respecto a *GRTP1* se conoce que sus niveles de expresión están regulados por la hormona del crecimiento (GH) y que estimula la actividad GTPasa de proteínas *Ras-like* (Lu et al., 2001).

Debido a su función biológica, uno de los principales candidatos a ser el conductor de la amplificación observada en 13q34 es *TFDP1* (*DRTF1-polypeptide-1*). *TFDP1* codifica para el factor de transcripción DP1 que heterodimeriza con E2F1 para regular la transición G1/S del ciclo celular. DP1 incrementa la capacidad de unión de E2F1 con el DNA para potenciar la transcripción de sus genes diana (La Thangue, 1994). Los genes regulados por DP1/E2F1 están involucrados en el control del ciclo celular, ciclina A (*CCNA2*), ciclina E (*CCNE1*) y *CDC2*; en la síntesis de DNA, timidina quinasa (*TK1*), timidilato sintetasa (*TYMS*), dihidrofolato reductasa (*DHFR*), antígeno nuclear de proliferación celular (*PCNA*) y ribonucleótido reductasa M1 (*RRM1*) y las oncoproteínas nucleares c-Myc (*MYC*) y b-Myb (*MYBL2*) (DeGregori et al., 1995; Wu et al., 1995). El factor de transcripción DP1/E2F1 está regulado por la unión a pRB que inactiva su capacidad transcripcional. Así pues, la capacidad de supresión tumoral del gen *RB* viene dada por su capacidad de unión con DP1/E2F1. Las oncoproteínas virales como el adenovirus E1a, el antígeno T de SV40 y las proteínas E7 del virus del papiloma humano ejercen su capacidad tumorigénica secuestrando a pRB de tal forma que DP1/E2F1 mantiene la expresión constitutiva de sus genes diana, por lo que se pierde el control de G2/S (Bandara and La Thangue, 1991; Hiebert et al., 1992; Nevins, 1992; Zamanian and La Thangue, 1992). En tumores, las mutaciones en *RB* aparecen principalmente en el dominio de unión a E2F1/DP1, dando lugar a una activación constitutiva de la transcripción mediada por DP1/E2F1. Pocos estudios han identificado alteraciones de *TFDP1* en cáncer. El primero de ellos identificó una elevada amplificación y sobre-expresión de *TFDP1* en un carcinoma escamoso del esófago (Shinomiya et al., 1999). Además, *TFDP1* se ha considerado un oncogén candidato alterado por amplificación y sobre-expresión en tumores de mama y hepatocelulares (Abba et al., 2007; Melchor et al., 2009; Yasui et al., 2002; Yasui et al., 2003). En el presente trabajo se identificaron dos tumores primarios de pulmón con amplificación y sobre-expresión de *TFDP1*. Además, el análisis posterior de los niveles de proteína DP1, que incluyó un número adicional de tumores, reveló niveles muy elevados de DP1 en los tumores con amplificación génica y en dos de los tumores adicionales incluidos en el estudio. Con respecto a estos últimos, uno de ellos fue negativo para amplificación génica, es decir, el incremento substancial de los niveles de DP1 no era debido a amplificación. Aunque el papel de DP1 junto con E2F1 en el control de la transcripción y regulación del ciclo celular se conoce con precisión, las posibles funciones de DP1 fuera de este contexto no han sido estudiadas. Se sabe que la co-expresión de DP1 con Ha-ras induce la formación de focos transformantes en fibroblastos embrionarios de rata, mientras que la transfección de DP1 con E2F1 y Ha-ras interfiere en la transformación celular. De la misma forma, la expresión de DP1 mutado en el dominio de unión a E2F1 también promueve la formación de focos transformantes en estas células (Jooss et al., 1995). Estos hechos indican que la sobre-expresión de DP1 tiene potencial oncogénico de forma independiente a E2F1. Además, se comprobó que la inhibición de la expresión de *TFDP1* sin alterar los niveles de E2F1 en una línea celular de cáncer de pulmón con *TFDP1* amplificado y sobre-expresado disminuyó su proliferación de forma significativa. Igualmente, la reducción extrema de la expresión de *TFDP1* en una línea celular sin sobre-expresión de *TFDP1* también provocó una disminución de la proliferación de estas células. Serían necesarios más estudios funcionales y análisis para poder dictaminar si el potencial oncogénico de *TFDP1* es

independiente de *E2F1* en estas células. La sobre-expresión de la proteína DP1 en ausencia de amplificación y sobre-expresión de RNA que se halló en un tumor de pulmón podría ser debida a fallos en su degradación ya que su expresión está regulada por ubiquitinación (Magae et al., 1999). De forma interesante, pero en menor medida, se ha estudiado el papel de DP1/E2F1 en apoptosis. El heterodímero DP1/E2F1 puede promover la apoptosis de manera dependiente o independiente de P53 (Hitchens and Robbins, 2003). Contrariamente, algunos estudios demuestran que la asociación de P53 con DP1/E2F1 inhibe la función de ambos (O'Connor et al., 1995). También ha sido descrito que P53 compite con E2F1 en su unión con DP1 reduciendo la afinidad del heterodímero con el DNA (Sorensen et al., 1996). Previamente se había comprobado que dos de los cuatro tumores primarios de pulmón con sobre-expresión de DP1 no expresaban P53 por lo que la capacidad de DP1/E2F1 en promover la apoptosis dependiente de P53 estaría mermada y E2F1 no competiría con P53 en su unión con DP1 en estos tumores.

Otros amplicones identificados en el estudio se localizaban en 5p13 y 6p21.1, presentes tanto en tumores primarios como en líneas celulares. El gen *SKP2* ha sido previamente descrito amplificado y sobre-expresado en el cáncer de pulmón. Se ha asociado a metástasis a nódulos linfáticos (Yokoi et al., 2004) y es uno de los oncogenes candidatos del amplicón 5p13. En el presente estudio se evaluaron los niveles de expresión de todos los genes contenidos en este amplicón y ninguno de ellos presentó niveles muy elevados, por lo que se descartó para un estudio más profundo. Existen varias posibles explicaciones para explicar la ausencia de sobre-expresión en presencia de amplificación génica tales como que la amplificación, en este caso, fuera un fenómeno espúreo y no conlleve una relevancia funcional o, alternativamente, que el gen diana de amplificación fuera algún miRNA o algún tipo de RNA no codificante. Este tipo de genes no fueron considerados como oncogenes candidatos en el presente trabajo de tesis. Con respecto a la región 6p22, se seleccionó para un estudio más detallado ya que presentaba unos niveles muy altos de amplificación génica y estaba amplificado con mayor frecuencia en tumores primarios de pulmón. El amplicón 6p22 tampoco había sido descrito anteriormente como diana de amplificación en cáncer de pulmón. Existe una publicación que describe amplificación en 6p21.1, en cáncer de pulmón, habiéndose propuesto el gen *VEGFA* como oncogén candidato (Weir et al., 2007). Pero esta región estaba excluida del amplicón 6p22 identificada en el presente estudio. Los genes *ID4* y *SOX4*, incluidos dentro de esta región amplificada en 6p22, presentaron los niveles más elevados de expresión en relación con el resto de genes del amplicón. La expresión de *ID4* en la línea celular con amplificación en 6p22 estaba reducida en comparación con su expresión en tejido pulmonar normal. De hecho, algunos trabajos han demostrado en cáncer gástrico, de mama y leucemias una disminución de la expresión de *ID4* causada por hipermetilación de su promotor, lo que sugiere un posible papel de *ID4* como supresor tumoral (Umetani et al., 2005; Yu et al., 2005). Así pues, a diferencia de lo que ocurría con los amplicones 11q12 y 13q34 donde varios genes dentro de estas regiones estaban sobre-expresados, *SOX4* fue el único gen sobre-expresado, en comparación con tejido normal, dentro del amplicón 6p22 lo que sugiere que es el gen conductor de esta amplificación. Además de estar amplificado y sobre-expresado en líneas celulares de cáncer de pulmón, también se pudo confirmar la presencia de esta alteración en tumores primarios de pulmón, lo que apoya su relevancia biológica en el desarrollo de este tipo de cáncer. El gen *SOX4* (*SRY-HMG box gene 4*) codifica para un miembro de la familia de factores de transcripción denominados SOX, los cuales tienen en común la homología en el

dominio HMG-box (*high mobility group box*) de unión al DNA. Durante el desarrollo embrionario el gen *SOX4* se expresa, principalmente, en el sistema nervioso central, corazón, timo, pulmón, colon y páncreas, mientras que en el adulto la expresión de *SOX4* se limita al páncreas, gónadas y timo (Farr et al., 1993; Liubinski et al., 2003; van de Wetering et al., 1993; Wegner, 1999). Los ratones *Sox4*^{-/-} mueren el día 14 del desarrollo embrionario debido a fallos en el desarrollo de sus sistema circulatorio (Schilham et al., 1996). Existen varias observaciones que sugieren que *SOX4* podría actuar como un oncogén. Por una parte, *SOX4* está sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer tales como vejiga, próstata, endometrio, colon y pulmón (Aaboe et al., 2006; Andersen et al., 2009; Evans et al., 2004; Friedman et al., 2004; Liu et al., 2006) y en un estudio previo en que se ha interferido la expresión de *SOX4* en células tumorales se observa una inducción de la apoptosis y disminución del crecimiento celular (Pramoonjago et al., 2006). Por otra parte, en estudios de identificación de nuevos oncogenes mediante mutagénesis por inserción retroviral se observó que *SOX4*, también nombrado como *Evi16* por *ecotropic viral integration site 16*, es una de las dianas de inserción retroviral más frecuente, promoviendo la transformación neoplásica de células hematopoyéticas de ratón (Boyd et al., 2006; Du et al., 2005; Shin et al., 2004; Suzuki et al., 2002). Además, la transfección de células hematopoyéticas normales de ratón con *Sox4* provoca leucemias mieloides (Boyd et al., 2006). Finalmente, el gen *SOX4* es una diana de los microRNAs miR-335 y miR-129-2, cuya expresión está disminuida en cáncer de mama y endometrio, respectivamente. La restauración de estos miRNAs en células tumorales deficientes disminuye la expresión de *SOX4* y consecuentemente la proliferación celular, la invasión y la metástasis de estas células tumorales (Huang et al., 2009; Tavazoie et al., 2008). No obstante, a *SOX4* también se le ha atribuido capacidad de supresión de tumores. La sobre-expresión de *SOX4* en células de tumores hepáticos promueve la apoptosis (Ahn et al., 2002) y la inhibición de la expresión de *SOX4* activa la migración e invasión de células de melanoma (Jafarnejad et al., 2010). Además, *SOX4* inhibe la tumorigénesis induciendo la detención del ciclo celular y la apoptosis mediante la estabilización y activación de P53 (Pan et al., 2009). Se ha sugerido que la sobre-expresión de *SOX4* es un indicador de buen pronóstico en meduloblastomas y melanomas (de Bont et al., 2008; Jafarnejad et al., 2010).

Además de la amplificación génica y sobre-expresión de *SOX4* en cáncer de pulmón, en el presente trabajo de tesis se describe cooperación oncogénica entre la sobre-expresión de *SOX4* y la forma activa de *RHOA* (*RHOA-Q63L*). Estos hechos apoyan la relevancia de *SOX4* en la carcinogénesis pulmonar, así como sus capacidades oncogénicas. Además, en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón microcítico, se observaron niveles muy elevados de *SOX4* en células tumorales de pulmón en ausencia de amplificación. Hasta el momento se desconocen los mecanismos responsables de este aumento de los niveles de *SOX4* en este tipo de cáncer de pulmón. La disminución de la expresión de algunos microRNAs, tales como miR-335 y miR-129-2, podría ser una de las causas. Tampoco cabe descartar la presencia de alteraciones genéticas en otros componentes de la vía en la que actúa *SOX4*, ni una característica específica de la célula de origen de este tipo de cáncer. Aunque *SOX4* haya sido crecientemente propuesto como oncogén en diversos tipos de cáncer, en todos los casos su capacidad oncogénica ha sido relacionada con su sobre-expresión. Pero existen otros mecanismos de activación de oncogenes, tales como las mutaciones activadoras. En este trabajo también se ha llevado a cabo, en varias líneas celulares y tumores primarios de cáncer de pulmón, la secuenciación del único exón que constituye la región codificante de *SOX4*, habiéndose

identificado varios polimorfismos en línea germinal. Además de polimorfismos, se identificaron varios cambios que daban lugar a sustituciones de aminoácidos, de los que no se pudo concluir su naturaleza germinal o somática al haber sido detectados en líneas celulares sin su tejido normal correspondiente disponible. Estas variaciones de origen desconocido presentaron la misma capacidad de potenciar la formación de focos transformantes de la forma activa de RHOA (RHOA-Q63L) que la forma salvaje de SOX4. Además, dichos cambios mantenían intacta su capacidad para activar la transcripción, lo que podría sugerir que se trata de polimorfismos poco frecuentes, teniendo en cuenta que no se detectaron en individuos sanos. Además de estas variaciones, se identificó una mutación somática de *SOX4* en un tumor primario. Curiosamente, esta mutación daba lugar a una proteína truncada en la que faltaba el dominio de transactivación. La expresión de esta forma truncada de *SOX4* en diferentes líneas celulares reveló su incapacidad para activar la transcripción, lo que estaba de acuerdo con observaciones previas de estudios de transactivación de la transcripción *in vitro* (van de Wetering et al., 1993). Esta forma truncada de *SOX4* tampoco fue capaz de aumentar el número de focos transformantes inducidos por RHOA-Q63L y dio lugar a una inhibición de la formación de focos transformantes inducida por la forma activa de HRAS (HRAS-G12V). Por otro lado, se observó que los niveles de la proteína *SOX4* truncada eran mucho más elevados que los de la forma salvaje y de las demás variantes cuando eran sobre-expresadas de forma ectópica en líneas celulares de cáncer, lo que podría sugerir que la proteína truncada es más estable. A *SOX4* se le han atribuido capacidades oncogénicas independientes de su papel como factor de transcripción. Mediante su capacidad para estabilizar la β -catenina mantiene activa la vía de Wnt (Kormish et al., 2010; Sinner et al., 2007) y es posible que la forma *SOX4* truncada, más estable, se acumule y potencie el desarrollo tumoral de forma alternativa en un contexto independiente a la activación de RHOA y HRAS. La falta de anticuerpos óptimos para inmunohistoquímica impidió determinar si los niveles de *SOX4* estaban aumentados en el tumor primario que presentaba la mutación que origina la proteína *SOX4* truncada. Por otro lado, el comportamiento diferente de la proteína truncada no se debía a una localización aberrante como se demostró mediante inmunofluorescencia tras la expresión ectópica de esta forma truncada. Asimismo, ninguna de las variaciones identificadas en *SOX4* se hallaba en el dominio HMG-*box* de unión al DNA, en el que también se encuentran las señales de localización y exportación nuclear (Malki et al., 2010). Por ello no cabe esperar que estas variantes alteren el tráfico al núcleo de *SOX4* o su unión al DNA.

Aunque *SOX4* fue el primer miembro de la familia *SOX* que demostró capacidad como factor de transcripción (van de Wetering et al., 1993), hasta el momento se desconocen la mayoría de los genes diana que regula. *SOX4* es un factor de transcripción modular, es decir, el dominio de unión al DNA (HMG-*box*) está separado del dominio transactivador. El dominio HMG-*box* se une al surco menor del DNA causando una fuerte torsión de la doble hebra de DNA. De hecho, se ha propuesto que factores de transcripción que contienen el dominio HMG-*box* también tienen una función estructural, ya que su interacción con el DNA permite el acceso de otros factores de transcripción y de elementos reguladores (Ferrari et al., 1992; Giese et al., 1992). Mediante ensayos del tipo EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*), se describió que el dominio HMG-*box* de *SOX4* se une preferentemente al motivo AACAAAG (van de Wetering et al., 1993). El primer gen diana de *Sox4* que se identificó fue *Tubb3*, un gen involucrado en la diferenciación neuronal. *Sox4* se une a las secuencias GACAATAG y CACAATG presentes en el promotor de *Tubb3* y activa su transcripción (Bergsland et al., 2006; Dy et al.,

2008; Hoser et al., 2008). Del mismo modo se ha propuesto que *Tead2*, un factor de transcripción también involucrado en la regulación del desarrollo neuronal, recluta a Sox4 en su promotor para regular su transcripción. Existe cierta controversia respecto a la regulación de *TEAD2* mediada por *SOX4*; mientras que un estudio demuestra la unión de Sox4 al promotor de *Tead2* y la consecuente activación de la transcripción (Bhattaram et al., 2010), otro reafirma la regulación de *TEAD2* por *SOX4* pero no consigue demostrar su reclutamiento al promotor (Liao et al., 2008). En nuestro estudio se han identificado *TUBB3* y *TEAD2* como genes regulados por *SOX4* en líneas celulares de cáncer de pulmón y además se ha demostrado su unión a las secuencias consenso de sus promotores previamente descritas. Asimismo, en el presente trabajo se ha comprobado que, en fibroblastos embrionarios de ratones *Sox4*^{-/-}, existía una disminución significativa de la expresión de estos genes en comparación con fibroblastos *Sox4*^{+/+}. Recientemente, se ha descrito una matriz de probabilidades de la composición de la secuencia consenso de DNA para la unión de *SOX4* y se ha utilizado para la identificación de genes diana de *SOX4* en un modelo de cáncer de próstata (Scharer et al., 2009). Cabe destacar que ninguno de los genes seleccionados por Scharer y colaboradores fue reproducido en el presente trabajo, lo que podría indicar que la regulación de la transcripción mediada por *SOX4* es dependiente de la célula de origen. En el presente trabajo se han utilizado varios modelos de estudio, la mayoría derivados del tejido pulmonar. Dichos modelos incluyen la expresión ectópica de *SOX4* en células tumorales de pulmón con bajos niveles de *SOX4*, tumores primarios y líneas celulares de cáncer pulmón con y sin expresión elevada de *SOX4*, tejido pulmonar normal de ratones jóvenes y viejos y MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) *knock outs* para *Sox4*. El requerimiento de *SOX4* para permitir la expresión génica de *CCNG2*, *DLG3*, *DOCK4*, *EGR3*, *GPC2*, *MLLT11*, *MTA2*, *MYB*, *PCDHBS*, *RBP1*, *RNF122*, *TMEFF1* y *VASH2* se comprobó en la mayoría de estos modelos. Los tumores primarios y las líneas celulares de cáncer de pulmón con sobre-expresión de *SOX4* presentaron unos niveles de expresión de estos genes significativamente superior a los tumores de pulmón con baja expresión de *SOX4*, por lo que estos genes podrían haber contribuido a la carcinogénesis de estos tumores ya que muchos de ellos ya se habían relacionado anteriormente con procesos cancerosos. Curiosamente, se encontró que muchos de estos genes son altamente específicos de tejidos de origen neural como cerebro, médula espinal y retina y muchos de ellos se han relacionado con el desarrollo de tejido nervioso. El gen *DLG3* codifica una proteína de membrana asociada a la sinapsis expresada durante el desarrollo temprano del cerebro y está relacionado al retraso mental ligado al cromosoma X (Muller et al., 1996; Tarpey et al., 2004; Zanni et al., 2010). *DOCK4* es un intercambiador de nucleótidos de guanina involucrado en la regulación de uniones adherentes entre células. Se han descrito mutaciones de este gen en líneas celulares de cáncer de ovario, próstata, colorrectal y gliomas (Yajnik et al., 2003). En un modelo de *Drosophila* se ha descrito que *DOCK4* es necesario para el desarrollo correcto del sistema nervioso central ya que su deficiencia provoca defectos axonales (Biersmith et al.). El gen *MLLT11* se ha encontrado translocado en leucemias y linfomas (Le Baccon et al., 2001; Lestou et al., 2003) y codifica para AF1Q, cuya sobre-expresión está involucrada en el desarrollo de leucemias, síndrome mielodisplásico y cáncer de tiroides y mama (Jacques et al., 2005; Li et al., 2006; So et al., 2000; Tse et al., 2005; Tse et al., 2004). De forma interesante se ha descrito que AF1Q aumenta su expresión durante la diferenciación neuronal a partir de células madre y progenitoras neurales y su expresión ectópica promueve la expresión de marcadores neurales en células embrionarias de riñón (Lin

et al., 2004). El gen *TMEFF1* codifica para una proteína transmembrana enriquecida en tejidos neuroendocrinos y preferentemente expresada en cerebro e involucrada en el desarrollo neural (Eib and Martens, 1996; Kanemoto et al., 2001). También, *TMEFF1* se ha relacionado con tumores cerebrales comportándose como un supresor tumoral (Gery et al., 2003). RBP1 fue la primera proteína identificada de unión a retinol (Napoli, 1999). Es sabido que el retinol es necesario para mantener el estado diferenciado del epitelio adulto, por lo que, en particular los tumores epiteliales, frecuentemente tienen una expresión alterada de los componentes involucrados en la disponibilidad de ácido retinoico, como RBP1 (CRBP1) (Esteller et al., 2002; Kuppumbatti et al., 2000; Williams et al., 2009). Al contrario de lo que ocurre en estos tumores, RBP1 está sobre-expresado y es un marcador de mal pronóstico en gliomas (Campos et al., 2011). Además, el metabolismo del ácido retinoico es indispensable para la maduración del sistema nervioso central y la diferenciación de las distintas estructuras cerebrales (Henion and Weston, 1994; Jacobs et al., 2006; Plum et al., 2001). Curiosamente, la expresión de RBP1 en gliomas se correlaciona con la de SOX2, la cual ya se había descrito anteriormente que estaba regulada también por SOX4 en este tipo de tumores (Campos et al., 2011; Ikushima et al., 2009). RBP1 se identificó como uno de los genes más altamente regulados por SOX4 ya que su expresión disminuía notablemente tras la depleción de SOX4 y la expresión ectópica de este último incrementaba hasta 20 veces la expresión de RBP1. Aun así, no se pudo demostrar el reclutamiento del factor de transcripción SOX4 en su promotor, ya sea porque se trate de una regulación indirecta o porque no se ha identificado correctamente la región específica de unión.

De entre las dianas transcripcionales de SOX4 identificadas en el presente trabajo se ha podido verificar la unión de SOX4 a los promotores de *TUBB3* y *TEAD2*, anteriormente ya descritos como genes directamente regulados por la unión de SOX4 a su promotor (Bergsland et al., 2006; Bhattaram et al., 2010). Por otra parte, la regulación de los niveles de *VASH2* y *MYB* por la unión directa de SOX4 a sus promotores constituye una nueva observación. El gen *VASH2* (*vasohibin-2*) fue inicialmente identificado como un homólogo de *VASH1* (Shibuya et al., 2006), por lo que se especuló que constituía un inhibidor de la angiogénesis. Posteriormente se demostró lo contrario, ya que *Vash2* se expresaba en las células endoteliales de los órganos en desarrollo durante los estadios medios de la gestación, momento a partir del cual disminuye su expresión (Kimura et al., 2009; Sato and Sonoda, 2007). El patrón de expresión de *Vash2* durante el desarrollo embrionario es muy similar al de *Sox4* (Mariani et al., 2002; Shibuya et al., 2006). Además, *VASH2* está presente en las células mononucleares derivadas de la médula ósea, promoviendo la angiogénesis. *VASH1* y *VASH2* controlan la activación y el cese de la angiogénesis de forma complementaria (Kimura et al., 2009). Así pues, la sobre-regulación de *VASH2* en células tumorales debida a la sobre-expresión de *SOX4* podría inducir la angiogénesis y ser este uno de los mecanismos por los que *SOX4* ejerce su capacidad oncogénica. Como se ha mencionado anteriormente, los ratones *Sox4*^{-/-} mueren durante el desarrollo embrionario debido a fallos en su sistema circulatorio, probablemente relacionado con la desregulación de *Vash2*. El oncogén *c-Myb* fue inicialmente identificado como el homólogo celular del gen transformante *v-Myb* inductor de leucemias y, como *Sox4*, *Myb* también es un sitio común de mutagénesis inducida por inserción retroviral (Klempnauer and Bishop, 1984; Shen-Ong et al., 1986; Weinstein et al., 1986). MYB es un factor de transcripción que se expresa principalmente en células madre y progenitoras de la médula ósea, colon y cerebro adulto, impidiendo su diferenciación (Emambokus et al., 2003; Malaterre et al., 2007;

Malaterre et al., 2008). Se ha observado que la activación constitutiva de *MYB*, mediante sobre-expresión o mutaciones activadoras, promueve el desarrollo de neoplasias (Drabsch et al., 2007; Hugo et al., 2006; Thompson et al., 1997). Asimismo, se han detectado reorganizaciones genéticas que afectan el gen *MYB* en leucemias (Clappier et al., 2007; Tomita et al., 1998) y amplificación génica en cáncer pulmonar, especialmente en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (Griffin and Baylin, 1985; Kiefer et al., 1987). Se han identificado alrededor de 80 dianas transcripcionales de *MYB*, de entre las que cabe destacar genes relacionados con la proliferación celular (*MYC*, *CCNA1*, *CCNB1*, *CCNE1* y *KIT*), la supervivencia (*BCL2*, *HSPA5* y *HSP70*) y la diferenciación (*GATA3*) (Lei et al., 2004). Como se ha observado con muchos de los genes regulados por *SOX4*, *MYB* también juega un papel importante en tejido nervioso. El patrón de expresión de *Myb* durante el desarrollo embrionario del cerebro es muy similar al observado con *Sox4*, ya que presenta una expresión elevada en las etapas iniciales del desarrollo mientras que se reduce significativamente en los estadios finales (Mariani et al., 2002; Rosenthal et al., 1996). En el cerebro adulto, la expresión de *Myb* coincide con la localización de células progenitoras neurales por lo que se le considera un factor clave en la neurogénesis adulta y su pérdida se corresponde con una disminución de la expresión de *Sox2* (Malaterre et al., 2008; Ramsay and Gonda, 2008). Se ha descrito un mecanismo de regulación de la expresión de *MYB* mediante elementos potenciadores de la transcripción dentro del primer intrón (Dooley et al., 1996; Manzella et al., 2000); la mayoría de las secuencias identificadas de unión a *SOX4* en este gen se encuentran en el primer intrón, lo que está de acuerdo con los resultados del presente trabajo.

De entre los genes con expresión aumentada por *SOX4* se encontraban varias protocaderinas, especialmente del tipo B (*PCDHB*). Aunque cada uno de los genes *PCDHB* tiene su propio promotor (Tasic et al., 2002; Wang et al., 2002), en el presente trabajo se observó que *SOX4* no era reclutado en sus promotores individuales, sino en una región de control del *cluster* de *Pcdhb* situado a 320-kb en dirección al telómero y dentro del gen *Diap1* (Yokota et al., 2011). La unión de *SOX4* a un elemento regulador común del *cluster* de *PCDHB* explica el incremento simultáneo en la expresión de varios de estos genes. Esta regulación a distancia podría darse por la formación de un *loop* de DNA entre la región de unión de *SOX4* y el sitio de iniciación de transcripción de estas *PCDHBs* (Ptashne, 1986). Las protocadherinas (*PCDH*) en *cluster* (-A,-B y -G), localizadas en tándem en el mismo cromosoma, codifican proteínas transmembrana involucradas en la unión célula-célula de neuronas. Estas *PCDHs* se expresan principalmente en cerebro, durante el desarrollo y en el adulto, y regulan la formación de los circuitos neuronales (Frank et al., 2005; Junghans et al., 2008; Takei et al., 2001). La expresión combinada de estas *PCDHs* contribuye a la alta diversidad neuronal en vertebrados (Yagi, 2008; Zipursky and Sanes, 2010). Las isoformas *PCDHA* y -G son productos del *splicing* alternativo de estos genes mientras que el *cluster PCDHB* lo componen genes independientes. En nuestro estudio descubrimos que *SOX4* regula la expresión de varias *PCDHBs* revelando la importancia de este factor de transcripción en la regulación global de este *cluster*.

Muchas proteínas involucradas en el desarrollo embrionario están a su vez implicadas en carcinogénesis, y de forma similar, muchos genes inicialmente identificados como oncogenes y genes supresores de tumores han resultado ser esenciales en el desarrollo embrionario, indicando que ambos procesos están íntimamente relacionados. Algunos ejemplos son los componentes de las vías de transducción de señales como la de SHh, Wnt y Notch (Classon and Harlow, 2002; Lustig and Behrens, 2003; Wicking et al., 1999) y miembros de las familias PAX y

HOX (Barr, 1997; Chang et al., 1997; Lu et al., 1995). Trabajos más recientes incluyen el envejecimiento como otro proceso biológico molecularmente ligado al cáncer. Estos estudios parecen indicar que estos procesos son complejos tapices biológicos que, frecuentemente aunque no siempre, están tejidos con los mismos hilos moleculares (Finkel et al., 2007). Un ejemplo claro de esta relación es el gen *p16INK4a* que es a la vez un gen supresor tumoral y un marcador de envejecimiento (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Matheu et al., 2009). Numerosos estudios han descrito la importancia de *SOX4* en el desarrollo de diferentes órganos. Los ratones *Sox4*^{-/-} mueren durante el desarrollo embrionario debido a fallos en su sistema circulatorio (Schilham et al., 1996). La interferencia de la expresión de *Sox4* en embriones de pollo bloquea la expresión de genes de diferenciación neuronal, mientras que su sobre-expresión promueve la expresión de estos genes (Bergsland et al., 2006). En consonancia con este hecho, en un estudio de expresión global durante el desarrollo de pulmón, se ha observado que la expresión de *Sox4* disminuye progresivamente durante el desarrollo embrionario, siendo muy elevada en las fases tempranas y disminuyendo de forma significativa en las últimas etapas y en adultos (Mariani et al., 2002). Por otro lado, la expresión ectópica de *Sox4* afecta la diferenciación de oligodendrocitos en ratón (Pötzner et al., 2007), sugiriendo que el gen *Sox4* promueve la diferenciación de células progenitoras en neuronas, impidiendo su diferenciación en glía. *Sox4* también es necesario para la diferenciación de linfocitos B ya que células hematopoyéticas *Sox4*^{-/-} injertadas en ratones salvajes se mantienen en estado pro-B (Schilham et al., 1996). Por otro lado, la inhibición de la expresión de *Sox4* reduce la proliferación y diferenciación de osteoblastos y el explante de páncreas *Sox4*^{-/-} muestra un reducido número de células beta productoras de insulina (Nissen-Meyer et al., 2007; Wilson et al., 2005). Debido a la clara relevancia de *SOX4* tanto en desarrollo como en cáncer, en el presente trabajo se estudió el posible papel de *SOX4* también en el envejecimiento. En este estudio se determinó que la expresión de *Sox4* en pulmón disminuye significativamente con el envejecimiento. A su vez, muchos de los genes regulados por *Sox4* también se reducen en cierta medida con la edad. Asimismo, *Sox2*, otro miembro de la familia Sox, esencial para la inducción de la pluripotencia y marcador de propiedades de células madre (*stemness*) (Takahashi and Yamanaka, 2006), se comportó de forma similar a *Sox4* pero sus niveles disminuyeron de forma menos acusada. Como cabría esperar, el gen *p16INK4a* incrementó, de manera muy significativa, sus niveles de expresión en pulmón con el envejecimiento. Así pues, se podría sugerir que *SOX4* también podría tener relevancia en procesos de envejecimiento, especialmente en el pulmón.

Como se ha dicho anteriormente, los miembros de la familia SOX están relacionados por homología al dominio HMG-*box*. La familia de genes SOX se divide en ocho grupos, de A a H en función de la similitud de sus proteínas; *SOX4*, -11 y -12 pertenecen al grupo SOX-C (Schepers et al., 2002). Numerosos miembros de esta familia de factores de transcripción se han relacionado con cáncer (Dong et al., 2004). En el presente trabajo se determinó que la expresión de *SOX4*, -2 y -11 era mas elevada en cáncer de pulmón microcítico que en el tipo no microcítico en su conjunto. Por otro lado, también se observó una expresión diferencial dentro de los subtipos histopatológicos del cáncer de pulmón no microcítico, destacándose niveles mas elevados de *SOX2* y *SOX9* en carcinomas del tipo escamoso. Mientras que la relación de *SOX9* con este tipo de carcinoma no se había descrito hasta el momento, la expresión alta de *SOX2* en carcinomas de tipo escamosos es conocida (Hussenet and du Manoir, 2010) y se asocia a amplificación del gen *SOX2*. No obstante cabe comentar que la amplificación de la

región incluye al oncogén *PIK3CA*, por lo que cualquiera de los dos podría ser la diana de la amplificación en este subtipo histopatológico (Angulo et al., 2008; Bass et al., 2009; Husenet et al., 2010; Yuan et al., 2010). Además, en un estudio reciente se ha descrito *SOX2* como marcador diferencial entre carcinomas escamosos y adenocarcinomas de pulmón (Tsuta et al., 2011). Por otro lado, previamente se había descrito que *SOX4* es una diana directa de la vía de TGF β y que activa la transcripción de *SOX2* para mantener las propiedades de célula madre en células iniciadoras de glioma (Ikushima et al., 2009), en nuestro estudio no se ha podido verificar la activación de la transcripción de *SOX2* mediada por *SOX4* en cáncer de pulmón.

Finalmente, el presente trabajo muestra que la firma de expresión de *SOX4*, que incluye un gran número de genes con expresión específica de tejido neural, y el perfil de expresión del cáncer de pulmón microcítico son significativamente similares. Estas observaciones, junto con el hecho cada vez más claro del origen neuroendocrino del cáncer de pulmón microcítico (Sutherland et al., 2011), apuntan a una clara implicación de *SOX4* en el desarrollo de este tipo de cáncer.

Conclusiones

Conclusiones

- Se han identificado 13 amplicones en cáncer de pulmón: 1p34.2, 4q12, 5p13, 5q14.1, 6p21.2, 6p22.3, 11q12, 11q13.2, 11q13.4, 13q34, 16p13, 17q12 y 19q13. Los amplicones en 11q12, 13q34 y 6p22.3 son los que se observan con mayor frecuencia y exhiben los mayores niveles de amplificación y sobre-expresión.
- La amplificación y sobre-expresión en 11q12 se observó en el 3% de los tumores de pulmón. La proteína p120ctn, codificada por el gen *CTNND1* dentro de esta región, presenta una localización celular aberrante. Los tumores de pulmón presentan enriquecimiento de la isoforma 3 de p120ctn con respecto al tejido pulmonar normal.
- La amplificación y sobre-expresión de la región 13q34 se detecta en el 3% de los tumores de pulmón. Debido a su función biológica, el gen *TFDP1* se propone como el oncogén candidato dentro de este amplicón.
- La proteína DP1, codificada por *TFDP1*, está sobre-expresada en aquellos tumores que presentan amplificación génica, todos ellos de tipo escamoso. Dos líneas celulares de cáncer de pulmón microcítico (HCC33 y H1963) exhiben amplificación y sobre-expresión de *TFDP1*.
- La depleción de DP1 reduce a la mitad la viabilidad de las células HCC33 apoyando su papel oncogénico.
- El gen *SOX4* es el único sobre-expresado en las células con amplificación en 6p22, por lo que se propone como oncogén diana de esta región. El 6% de los tumores primarios y el 3,5% de las líneas celulares de cáncer de pulmón exhiben sobre-expresión de *SOX4* con respecto a tejido pulmonar normal.
- Se identifican variaciones en la secuencia de *SOX4* en líneas celulares de cáncer de pulmón. Ninguna de estas variaciones es capaz de alterar la capacidad de transactivación de *SOX4*, sugiriendo que constituyen polimorfismos poco frecuentes.
- La sobre-expresión de *SOX4* y de sus variantes potencia la capacidad de RHOA-Q63L de transformar células NIH3T3 en un ensayo de cooperación oncogénica, indicando que *SOX4* tiene propiedades oncogénicas.

- Se identifica una mutación de origen somático en *SOX4* que codifica una proteína truncada. Dicha forma carece de actividad transactivadora, no potencia la capacidad transformante de *RHOA-Q63L* y disminuye la capacidad transformante de *HRAS-G12V*, indicando que la actividad transactivadora de *SOX4* es necesaria para incrementar la capacidad transformante de *HRAS* y de *RHOA*.
- La firma de expresión génica de *SOX4* incluye numerosos genes relacionados con el desarrollo neural. Asimismo, la mayoría de estos genes están sobre-expresados en tumores de pulmón con altos niveles de *SOX4*, sugiriendo su implicación en la carcinogénesis pulmonar.
- El análisis de inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo anti-*SOX4* evidencia que los genes *MYB* y *VASH2* y el *cluster* de genes *PCDHBs* constituyen dianas transcripcionales directas de *SOX4*.
- La expresión de *Sox4* y de sus dianas transcripcionales está significativamente disminuida en el tejido pulmonar de ratones viejos en comparación con el de ratones jóvenes, sugiriendo un papel de éstos en el proceso de envejecimiento.
- Los niveles de expresión de los genes *SOX2*, *-4* y *-11* son significativamente superiores en el cáncer de pulmón microcítico, con respecto al tipo no microcítico. Además, la firma de expresión génica de *SOX4* es significativamente similar a la firma del cáncer de pulmón microcítico, lo cual refleja una implicación de *SOX4* en el desarrollo de este tipo de cáncer de origen neuroendocrino.

Bibliografía

Bibliografía

A

Aaboe, M., Birkenkamp-Demtroder, K., Wiuf, C., Sorensen, F. B., Thykjaer, T., Sauter, G., Jensen, K. M., Dyrskjot, L., and Orntoft, T. (2006). SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. *Cancer Res* 66, 3434-3442.

Abba, M. C., Fabris, V. T., Hu, Y., Kittrell, F. S., Cai, W. W., Donehower, L. A., Sahin, A., Medina, D., and Aldaz, C. M. ((2007)). Identification of novel amplification gene targets in mouse and human breast cancer at a syntenic cluster mapping to mouse ch8A1 and human ch13q34. *Cancer Res* 67, 4104-4112.

Adjei, A. A., Molina, J. R., Mandrekar, S. J., Marks, R., Reid, J. R., Croghan, G., Hanson, L. J., Jett, J. R., Xia, C., Lathia, C., and Simantov, R. (2007). Phase I trial of sorafenib in combination with gefitinib in patients with refractory or recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2684-2691.

Aguayo, S. M., Miller, Y. E., Waldron, J. A., Jr., Bogin, R. M., Sunday, M. E., Staton, G. W., Jr., Beam, W. R., and King, T. E., Jr. (1992). Brief report: idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells and airways disease. *N Engl J Med* 327, 1285-1288.

Ahn, S. G., Kim, H. S., Jeong, S. W., Kim, B. E., Rhim, H., Shim, J. Y., Kim, J. W., Lee, J. H., and Kim, I. K. (2002). Sox-4 is a positive regulator of Hep3B and HepG2 cells' apoptosis induced by prostaglandin (PG)A(2) and delta(12)-PGJ(2). *Exp Mol Med* 34, 243-249.

Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-13747.

Alonso, C. N., Meyer, C., Gallego, M. S., Rossi, J. G., Mansini, A. P., Rubio, P. L., Medina, A., Marschalek, R., and Felice, M. S. BTBD18: A novel MLL partner gene in an infant with acute lymphoblastic leukemia and inv(11)(q13;q23). *Leuk Res* 34, e294-296.

Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P., Gu, J., Eisen, T., Dong, Q., Zhang, Q., Gu, X., Vijayakrishnan, J., *et al.* (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40, 616-622.

Amos, C. I., Xu, W., and Spitz, M. R. (1999). Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res* 151, 3-12.

Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., and Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2, 637-644.

Andersen, C. L., Christensen, L. L., Thorsen, K., Schepeler, T., Sorensen, F. B., Verspaget, H. W., Simon, R., Kruhoffer, M., Aaltonen, L. A., Laurberg, S., and Orntoft, T. F. (2009). Dysregulation of the transcription factors SOX4, CBFB and SMARCC1 correlates with outcome of colorectal cancer. *Br J Cancer* 100, 511-523.

Angulo, B., Suarez-Gauthier, A., Lopez-Rios, F., Medina, P. P., Conde, E., Tang, M., Soler, G., Lopez-Encuentra, A., Cigudosa, J. C., and Sanchez-Cespedes, M. (2008). Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol* 214, 347-356.

Armas, O. A., White, D. A., Erlandson, R. A., and Rosai, J. (1995). Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell proliferation presenting as interstitial lung disease. *Am J Surg Pathol* 19, 963-970.

Auerbach, O., Forman, J. B., Gere, J. B., Kassouny, D. Y., Muehsam, G. E., Petrick, T. G., Smolin, H. J., and Stout, A. P. (1957). Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress. *N Engl J Med* 256, 97-104.

B

Balak, M. N., Gong, Y., Riely, G. J., Somwar, R., Li, A. R., Zakowski, M. F., Chiang, A., Yang, G., Ouerfelli, O., Kris, M. G., *et al.* (2006). Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* *12*, 6494-6501.

Bandara, L. R., and La Thangue, N. B. (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* *351*, 494-497.

Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* *56*, 779-827.

Barr, F. G. (1997). Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer. *Int J Biochem Cell Biol* *29*, 1449-1461.

Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., Kim, S. Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gatt-Viks, I., *et al.* (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* *41*, 1238-1242.

Bellovin, D. I., Bates, R. C., Muzikansky, A., Rimm, D. L., and Mercurio, A. M. (2005). Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* *65*, 10938-10945.

Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., and Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev* *20*, 3475-3486.

Bernasconi, N. L., Wormhoudt, T. A., and Laird-Offringa, I. A. (2000). Post-transcriptional deregulation of myc genes in lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* *23*, 560-565.

Betticher, D. C., Heighway, J., Hasleton, P. S., Altermatt, H. J., Ryder, W. D., Cerny, T., and Thatcher, N. (1996). Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* *73*, 294-300.

Bhattaram, P., Penzo-Mendez, A., Sock, E., Colmenares, C., Kaneko, K. J., Vassilev, A., Depamphilis, M. L., Wegner, M., and Lefebvre, V. Organogenesis relies on SoxC transcription factors for the survival of neural and mesenchymal progenitors. *Nat Commun* *1*, 9.

Biersmith, B., Liu, Z. C., Bauman, K., and Geisbrecht, E. R. The DOCK protein sponge binds to ELMO and functions in *Drosophila* embryonic CNS development. *PLoS One* *6*, e16120.

Blanco, R., Iwakawa, R., Tang, M., Kohno, T., Angulo, B., Pio, R., Montuenga, L. M., Minna, J. D., Yokota, J., and Sanchez-Cespedes, M. (2009). A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* *30*, 1199-1206.

Boyd, K. E., Xiao, Y. Y., Fan, K., Poholek, A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Perkins, A. S. (2006). Sox4 cooperates with Evi1 in AKXD-23 myeloid tumors via transactivation of proviral LTR. *Blood* *107*, 733-741.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* *2*, 243-247.

Burney, L. E. (1959). Smoking and lung cancer: a statement of the Public Health Service. *J Am Med Assoc* *171*, 1829-1837.

C

Campos, B., Centner, F. S., Bermejo, J. L., Ali, R., Dorsch, K., Wan, F., Felsberg, J., Ahmadi, R., Grabe, N., Reifenberger, G., *et al.* Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. *Am J Pathol* *178*, 1953-1964.

Caputi, M., De Luca, L., Papaccio, G., D'Aponte, A., Cavallotti, I., Scala, P., Scarano, F., Manna, M., Gualdiero, L., and De Luca, B. (1997). Prognostic role of cyclin D1 in non small cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Eur J Histochem* *41*, 133-138.

Carretero, J., Medina, P. P., Pio, R., Montuenga, L. M., and Sanchez-Cespedes, M. (2004). Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene. *Oncogene* 23, 4037-4040.

Castillo, S. D., Angulo, B., Suarez-Gauthier, A., Melchor, L., Medina, P. P., Sanchez-Verde, L., Torres-Lanzas, J., Pita, G., Benitez, J., and Sanchez-Cespedes, M. Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer. *J Pathol*.

Chang, C. P., de Vivo, I., and Cleary, M. L. (1997). The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 81-88.

Cheng, S. W., Davies, K. P., Yung, E., Beltran, R. J., Yu, J., and Kalpana, G. V. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* 22, 102-105.

Chin, L., Pomerantz, J., and DePinho, R. A. (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci* 23, 291-296.

Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., *et al.* (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468-472.

Choi, Y. W., Choi, J. S., Zheng, L. T., Lim, Y. J., Yoon, H. K., Kim, Y. H., Wang, Y. P., and Lim, Y. (2007). Comparative genomic hybridization array analysis and real time PCR reveals genomic alterations in squamous cell carcinomas of the lung. *Lung Cancer* 55, 43-51.

Clappier, E., Cucuini, W., Kalota, A., Crinquette, A., Cayuela, J. M., Dik, W. A., Langerak, A. W., Montpellier, B., Nadel, B., Walrafen, P., *et al.* (2007). The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood* 110, 1251-1261.

Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 910-917.

Colby, T. V., Wistuba, II, and Gazdar, A. (1998). Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv Anat Pathol* 5, 205-215.

Colomer, R., Lupu, R., Bacus, S. S., and Gelmann, E. P. (1994). erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cells with erbB-2 oncogene amplification. *Br J Cancer* 70, 819-825.

Conde, E., Angulo, B., Tang, M., Morente, M., Torres-Lanzas, J., Lopez-Encuentra, A., Lopez-Rios, F., and Sanchez-Cespedes, M. (2006). Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res* 12, 710-717.

Cornfield, J., Haenszel, W., Hammond, E. C., Lilienfeld, A. M., Shimkin, M. B., and Wynder, E. L. (1959). Smoking and lung cancer: recent evidence and a discussion of some questions. *J Natl Cancer Inst* 22, 173-203.

Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A., and Guan, K. L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 18, 1533-1538.

Cozzolino, M., Stagni, V., Spinardi, L., Campioni, N., Fiorentini, C., Salvati, E., Alema, S., and Salvatore, A. M. (2003). p120 Catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 14, 1964-1977.

D

Daniel, J. M., and Reynolds, A. B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19, 3614-3623.

Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., and Baig, A. (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 30, 2911-2919.

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954.

Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-534.

de Bont, J. M., Kros, J. M., Passier, M. M., Reddingius, R. E., Sillevs Smitt, P. A., Luijck, T. M., den Boer, M. L., and Pieters, R. (2008). Differential expression and prognostic significance of SOX genes in pediatric medulloblastoma and ependymoma identified by microarray analysis. *Neuro Oncol* **10**, 648-660.

DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J. R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* **15**, 4215-4224.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D. M., Morgan, M. B., *et al.* (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**, 1069-1075.

Diosdado, B., Buffart, T. E., Watkins, R., Carvalho, B., Ylstra, B., Tijssen, M., Bolijn, A. S., Lewis, F., Maude, K., Verbeke, C., *et al.* ((2010)). High-resolution array comparative genomic hybridization in sporadic and celiac disease-related small bowel adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **16**, 1391-1401.

Dong, C., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2004). Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* **105**, 442-447.

Dooley, S., Seib, T., Welter, C., and Blin, N. (1996). c-myb intron I protein binding and association with transcriptional activity in leukemic cells. *Leuk Res* **20**, 429-439.

Drabsch, Y., Hugo, H., Zhang, R., Dowhan, D. H., Miao, Y. R., Gewirtz, A. M., Barry, S. C., Ramsay, R. G., and Gonda, T. J. (2007). Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13762-13767.

Du, Y., Spence, S. E., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2005). Cooperating cancer-gene identification through oncogenic-retrovirus-induced insertional mutagenesis. *Blood* **106**, 2498-2505.

Dy, P., Penzo-Mendez, A., Wang, H., Pedraza, C. E., Macklin, W. B., and Lefebvre, V. (2008). The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* **36**, 3101-3117.

E

Eder, J. P., Vande Woude, G. F., Boerner, S. A., and LoRusso, P. M. (2009). Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 2207-2214.

Eib, D. W., and Martens, G. J. (1996). A novel transmembrane protein with epidermal growth factor and follistatin domains expressed in the hypothalamo-hypophysial axis of *Xenopus laevis*. *J Neurochem* **67**, 1047-1055.

Emambokus, N., Vegiopoulos, A., Harman, B., Jenkinson, E., Anderson, G., and Frampton, J. (2003). Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. *Embo J* **22**, 4478-4488.

Engelman, J. A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A. R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S. A., Song, Y., *et al.* (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* **14**, 1351-1356.

Engelman, J. A., and Janne, P. A. (2008). Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 2895-2899.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039-1043.

Esteller, M., Guo, M., Moreno, V., Peinado, M. A., Capella, G., Galm, O., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2002). Hypermethylation-associated inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Res* 62, 5902-5905.

Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M. A., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60, 129-133.

Evans, A. J., Gallie, B. L., Jewett, M. A., Pond, G. R., Vandezande, K., Underwood, J., Fradet, Y., Lim, G., Marrano, P., Zielenska, M., and Squire, J. A. (2004). Defining a 0.5-mb region of genomic gain on chromosome 6p22 in bladder cancer by quantitative-multiplex polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 164, 285-293.

F

Farr, C. J., Easty, D. J., Ragoussis, J., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N. (1993). Characterization and mapping of the human SOX4 gene. *Mamm Genome* 4, 577-584.

Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4, 199-207.

Ferrari, S., Harley, V. R., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R., and Bianchi, M. E. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *Embo J* 11, 4497-4506.

Finkel, T., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.

Fong, K. M., Sekido, Y., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (2003). Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58, 892-900.

Fontanini, G., Boldrini, L., Chine, S., Pisaturo, F., Basolo, F., Calcinai, A., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C. A., and Bevilacqua, G. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 79, 363-369.

Forgacs, E., Biesterveld, E. J., Sekido, Y., Fong, K., Muneer, S., Wistuba, II, Milchgrub, S., Brezinschek, R., Virmani, A., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1998). Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene* 17, 1557-1565.

Frank, M., Ebert, M., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Colman, D. R., and Kemler, R. (2005). Differential expression of individual gamma-protocadherins during mouse brain development. *Mol Cell Neurosci* 29, 603-616.

Friedman, R. S., Bangur, C. S., Zasloff, E. J., Fan, L., Wang, T., Watanabe, Y., and Kalos, M. (2004). Molecular and immunological evaluation of the transcription factor SOX-4 as a lung tumor vaccine antigen. *J Immunol* 172, 3319-3327.

Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., and Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature* 409, 850-852.

G

Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1998). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 16, 497-504.

Gery, S., Yin, D., Xie, D., Black, K. L., and Koeffler, H. P. (2003). TMEFF1 and brain tumors. *Oncogene* 22, 2723-2727.

Giese, K., Cox, J., and Grosschedl, R. (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69, 185-195.

Girling, R., Partridge, J. F., Bandara, L. R., Burden, N., Totty, N. F., Hsuan, J. J., and La Thangue, N. B. (1993). A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* 365, 468.

Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kuhl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2002). The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* 11, 1657-1670.

Grandori, C., and Eisenman, R. N. (1997). Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 22, 177-181.

Griffin, C. A., and Baylin, S. B. (1985). Expression of the c-myc oncogene in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 45, 272-275.

Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., and Bershadsky, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114, 695-707.

H

Haber, D., and Harlow, E. (1997). Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet* 16, 320-322.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hanawalt, P. C. (2001). Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res* 485, 3-13.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16, 859-867.

Hardie, D. G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144, 5179-5183.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R., and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.

Hecht, S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1194-1210.

Hecht, S. S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 3, 461-469.

Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C., and Harlow, E. (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* 7, 1850-1861.

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., *et al.* (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184-187.

Henion, P. D., and Weston, J. A. (1994). Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. *Dev Biol* 161, 243-250.

Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* 6, 177-185.

Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., Yokouchi, H., Kasugai, T., Ishiguro, S., Takami, K., Nakayama, T., and Nishisho, I. (1997). MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer* 75, 1302-1308.

Hirsch, F. R., Franklin, W. A., Gazdar, A. F., and Bunn, P. A., Jr. (2001). Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. *Clin Cancer Res* 7, 5-22.

Hitchens, M. R., and Robbins, P. D. (2003). The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis* 8, 461-468.

Hoffmann, D., Hoffmann, I., and El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 14, 767-790.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

Horn, L., and Pao, W. (2009). EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27, 4232-4235.

Hoser, M., Potzner, M. R., Koch, J. M., Bosl, M. R., Wegner, M., and Sock, E. (2008). Sox12 deletion in the mouse reveals nonreciprocal redundancy with the related Sox4 and Sox11 transcription factors. *Mol Cell Biol* 28, 4675-4687.

Huang, J., Xu, L. G., Liu, T., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2006). The p53-inducible E3 ubiquitin ligase p53RFP induces p53-dependent apoptosis. *FEBS Lett* 580, 940-947.

Huang, Q., Yu, G. P., McCormick, S. A., Mo, J., Datta, B., Mahimkar, M., Lazarus, P., Schaffer, A. A., Desper, R., and Schantz, S. P. (2002). Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 34, 224-233.

Huang, Y. W., Liu, J. C., Deatherage, D. E., Luo, J., Mutch, D. G., Goodfellow, P. J., Miller, D. S., and Huang, T. H. (2009). Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer Res* 69, 9038-9046.

Hugo, H., Cures, A., Suraweera, N., Drabsch, Y., Purcell, D., Mantamadiotis, T., Phillips, W., Dobrovic, A., Zupi, G., Gonda, T. J., *et al.* (2006). Mutations in the MYB intron I regulatory sequence increase transcription in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 1143-1154.

Hung, M. S., Mao, J. H., Xu, Z., Yang, C. T., Yu, J. S., Harvard, C., Lin, Y. C., Bravo, D. T., Jablons, D. M., and You, L. (2009). Cul4A is an oncogene in malignant pleural mesothelioma. *J Cell Mol Med*.

Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., *et al.* (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452, 633-637.

Hussenet, T., Dali, S., Exinger, J., Monga, B., Jost, B., Dembele, D., Martinet, N., Thibault, C., Huelsken, J., Brambilla, E., and du Manoir, S. (2010). SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One* 5, e8960.

Hussenet, T., and du Manoir, S. (2010). SOX2 in squamous cell carcinoma: Amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis. *Cell Cycle* 9, 1480-1486.

I

Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5, 504-514.

Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159, 465-476.

Isinger-Ekstrand, A., Johansson, J., Ohlsson, M., Francis, P., Staaf, J., Jonsson, M., Borg, A., and Nilbert, M. (2010). Genetic profiles of gastroesophageal cancer: combined analysis using expression array and tiling array--comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 200, 120-126.

J

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.

Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., and Evans, R. M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3902-3907.

Jacques, C., Baris, O., Prunier-Mirebeau, D., Savagner, F., Rodien, P., Rohmer, V., Franc, B., Guyetant, S., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2005). Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 2314-2320.

Jafarnejad, S. M., Wani, A. A., Martinka, M., and Li, G. (2010). Prognostic significance of Sox4 expression in human cutaneous melanoma and its role in cell migration and invasion. *Am J Pathol* *177*, 2741-2752.

Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C. D., Bishop, J. M., and Felsher, D. W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* *297*, 102-104.

Janjetovic, S., Sticht, C., Knoepfle, K., Joos, S., Hofele, C., Lichter, P., and Freier, K. (2010). Comparative expressed sequence hybridization detects recurrent patterns of altered sequence expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* *24*, 369-374.

Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* *18*, 38-43.

Jooss, K., Lam, E. W., Bybee, A., Girling, R., Muller, R., and La Thangue, N. B. (1995). Proto-oncogenic properties of the DP family of proteins. *Oncogene* *10*, 1529-1536.

Junghans, D., Heidenreich, M., Hack, I., Taylor, V., Frotscher, M., and Kemler, R. (2008). Postsynaptic and differential localization to neuronal subtypes of protocadherin beta16 in the mammalian central nervous system. *Eur J Neurosci* *27*, 559-571.

K

Kaelin, W. G., Jr. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* *5*, 689-698.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* *258*, 818-821.

Kanemoto, N., Horie, M., Omori, K., Nishino, N., Kondo, M., Noguchi, K., and Tanigami, A. (2001). Expression of TMEFF1 mRNA in the mouse central nervous system: precise examination and comparative studies of TMEFF1 and TMEFF2. *Brain Res Mol Brain Res* *86*, 48-55.

Karp, D. D., Paz-Ares, L. G., Novello, S., Haluska, P., Garland, L., Cardenal, F., Blakely, L. J., Eisenberg, P. D., Langer, C. J., Blumenschein, G., Jr., *et al.* (2009). Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* *27*, 2516-2522.

Kerr, K. M. (2001). Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol* *54*, 257-271.

Kiefer, P. E., Bepler, G., Kubasch, M., and Havemann, K. (1987). Amplification and expression of protooncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* *47*, 6236-6242.

Kim, C. F., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R. T., and Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* *121*, 823-835.

Kim, S. W., Park, J. I., Spring, C. M., Sater, A. K., Ji, H., Otchere, A. A., Daniel, J. M., and McCrea, P. D. (2004). Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol* *6*, 1212-1220.

Kimura, H., Miyashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Watanabe, K., Sonoda, H., Ohta, H., Fujiwara, T., Shimosegawa, T., and Sato, Y. (2009). Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* *113*, 4810-4818.

Klempnauer, K. H., and Bishop, J. M. (1984). Neoplastic transformation by E26 leukemia virus is mediated by a single protein containing domains of gag and myb genes. *J Virol* *50*, 280-283.

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

Kobielak, K., Stokes, N., de la Cruz, J., Polak, L., and Fuchs, E. (2007). Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10063-10068.

Kopanja, D., Stoyanova, T., Okur, M. N., Huang, E., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2009). Proliferation defects and genome instability in cells lacking Cul4A. *Oncogene* *28*, 2456-2465.

Kormish, J. D., Sinner, D., and Zorn, A. M. (2010). Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn* *239*, 56-68.

Kubokura, H., Tenjin, T., Akiyama, H., Koizumi, K., Nishimura, H., Yamamoto, M., and Tanaka, S. (2001). Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* *7*, 197-203.

Kuppumbatti, Y. S., Bleiweiss, I. J., Mandeli, J. P., Waxman, S., and Mira, Y. L. R. (2000). Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* *92*, 475-480.

Kwek, S. S., Roy, R., Zhou, H., Climent, J., Martinez-Climent, J. A., Fridlyand, J., and Albertson, D. G. (2009). Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* *28*, 1892-1903.

L

La Thangue, N. B. (1994). DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* *6*, 443-450.

Le Baccon, P., Leroux, D., Dascalescu, C., Duley, S., Marais, D., Esmenjaud, E., Sotto, J. J., and Callanan, M. (2001). Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* *32*, 250-264.

Lee, H. M., Zhang, H., Schulz, V., Tuck, D. P., and Forget, B. G. (2010). Downstream targets of HOXB4 in a cell line model of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* *116*, 720-730.

Lee, J. J., Liu, D., Lee, J. S., Kurie, J. M., Khuri, F. R., Ibarguen, H., Morice, R. C., Walsh, G., Ro, J. Y., Broxson, A., *et al.* (2001). Long-term impact of smoking on lung epithelial proliferation in current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* *93*, 1081-1088.

Lee, W., Jiang, Z., Liu, J., Haverty, P. M., Guan, Y., Stinson, J., Yue, P., Zhang, Y., Pant, K. P., Bhatt, D., *et al.* (2010). The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* *465*, 473-477.

Lei, W., Rushton, J. J., Davis, L. M., Liu, F., and Ness, S. A. (2004). Positive and negative determinants of target gene specificity in myb transcription factors. *J Biol Chem* *279*, 29519-29527.

Lestou, V. S., Ludkovski, O., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., Lam, W. L., and Horsman, D. E. (2003). Characterization of the recurrent translocation t(1;1)(p36.3;q21.1-2) in non-Hodgkin lymphoma by multicolor banding and fluorescence in situ hybridization analysis. *Genes Chromosomes Cancer* *36*, 375-381.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, 323-331.

Li, D. Q., Hou, Y. F., Wu, J., Chen, Y., Lu, J. S., Di, G. H., Ou, Z. L., Shen, Z. Z., Ding, J., and Shao, Z. M. (2006). Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis. *Eur J Cancer* *42*, 3274-3286.

Li, L. H., He, J., Hua, D., Guo, Z. J., and Gao, Q. (2011). Lentivirus-mediated inhibition of Med19 suppresses growth of breast cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*.

- Liao, Y. L., Sun, Y. M., Chau, G. Y., Chau, Y. P., Lai, T. C., Wang, J. L., Horng, J. T., Hsiao, M., and Tsou, A. P. (2008). Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprinting-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 5578-5589.
- Lin, H. J., Shaffer, K. M., Sun, Z., Jay, G., He, W. W., and Ma, W. (2004). AF1q, a differentially expressed gene during neuronal differentiation, transforms HEK cells into neuron-like cells. *Brain Res Mol Brain Res* 131, 126-130.
- Lin, M., Wei, L. J., Sellers, W. R., Lieberfarb, M., Wong, W. H., and Li, C. (2004). dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics* 20, 1233-1240.
- Lioubinski, O., Muller, M., Wegner, M., and Sander, M. (2003). Expression of Sox transcription factors in the developing mouse pancreas. *Dev Dyn* 227, 402-408.
- Liu, C. X., Musco, S., Lisitsina, N. M., Forgacs, E., Minna, J. D., and Lisitsyn, N. A. (2000). LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 60, 1961-1967.
- Liu, L., Shao, X., Gao, W., Bai, J., Wang, R., Huang, P., Yin, Y., Liu, P., and Shu, Y. (2010). The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data. *J Thorac Oncol* 5, 1922-1932.
- Liu, P., Ramachandran, S., Ali Seyed, M., Scharer, C. D., Laycock, N., Dalton, W. B., Williams, H., Karanam, S., Datta, M. W., Jaye, D. L., and Moreno, C. S. (2006). Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 66, 4011-4019.
- Liu, R., Liu, D., Trink, E., Bojdani, E., Ning, G., and Xing, M. (2011). The Akt-Specific Inhibitor MK2206 Selectively Inhibits Thyroid Cancer Cells Harboring Mutations That Can Activate the PI3K/Akt Pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E577-585.
- Liu, Y., Dong, Q. Z., Zhao, Y., Dong, X. J., Miao, Y., Dai, S. D., Yang, Z. Q., Zhang, D., Wang, Y., Li, Q. C., *et al.* (2009). P120-catenin isoforms 1A and 3A differently affect invasion and proliferation of lung cancer cells. *Exp Cell Res* 315, 890-898.
- Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Miao, Y., Zhao, Y., Zhang, P. X., Jiang, G. Y., Zhang, J. Y., Han, Y., Lin, X. Y., *et al.* (2009). Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer* 63, 375-382.
- Liu, Y., Xu, H. T., Dai, S. D., Wei, Q., Yuan, X. M., and Wang, E. H. (2007). Reduction of p120(ctn) isoforms 1 and 3 is significantly associated with metastatic progression of human lung cancer. *Apmis* 115, 848-856.
- Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Lu, C., Kasik, J., Stephan, D. A., Yang, S., Sperling, M. A., and Menon, R. K. (2001). Grtp1, a novel gene regulated by growth hormone. *Endocrinology* 142, 4568-4571.
- Lu, Q., Knoepfler, P. S., Scheele, J., Wright, D. D., and Kamps, M. P. (1995). Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol* 15, 3786-3795.
- Lucito, R., West, J., Reiner, A., Alexander, J., Esposito, D., Mishra, B., Powers, S., Norton, L., and Wigler, M. (2000). Detecting gene copy number fluctuations in tumor cells by microarray analysis of genomic representations. *Genome Res* 10, 1726-1736.
- Lustig, B., and Behrens, J. (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 199-221.
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139

M

Magae, J., Illenye, S., Chang, Y. C., Mitsui, Y., and Heintz, N. H. (1999). Association with E2F-1 governs intracellular trafficking and polyubiquitination of DP-1. *Oncogene* 18, 593-605.

Malaterre, J., Carpinelli, M., Ernst, M., Alexander, W., Cooke, M., Sutton, S., Dworkin, S., Heath, J. K., Frampton, J., McArthur, G., *et al.* (2007). c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3829-3834.

Malaterre, J., Mantamadiotis, T., Dworkin, S., Lightowler, S., Yang, Q., Ransome, M. I., Turnley, A. M., Nichols, N. R., Emambokus, N. R., Frampton, J., and Ramsay, R. G. (2008). c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells* 26, 173-181.

Malki, S., Boizet-Bonhoure, B., and Poulat, F. Shuttling of SOX proteins. (2010). *Int J Biochem Cell Biol* 42, 411-416.

Manzella, L., Gualdi, R., Perrotti, D., Nicolaidis, N. C., Girlando, G., Giuffrida, M. A., Messina, A., and Calabretta, B. (2000). The interferon regulatory factors 1 and 2 bind to a segment of the human c-myb first intron: possible role in the regulation of c-myb expression. *Exp Cell Res* 256, 248-256.

Mariani, T. J., Reed, J. J., and Shapiro, S. D. (2002). Expression profiling of the developing mouse lung: insights into the establishment of the extracellular matrix. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 541-548.

Marks, J. L., Gong, Y., Chitale, D., Golas, B., McLellan, M. D., Kasai, Y., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Solit, D., *et al.* (2008). Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 68, 5524-5528.

Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Canamero, M., Borras, C., Flores, J. M., Klatt, P., Vina, J., and Serrano, M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* 8, 152-161.

Matsumori, Y., Yano, S., Goto, H., Nakataki, E., Wedge, S. R., Ryan, A. J., and Sone, S. (2006). ZD6474, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits growth of experimental lung metastasis and production of malignant pleural effusions in a non-small cell lung cancer model. *Oncol Res* 16, 15-26.

Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D., and Yokota, J. (2007). Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene* 26, 5911-5918.

McKay, J. D., Hung, R. J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., *et al.* (2008). Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 40, 1404-1406.

Medina, P. P., Castillo, S. D., Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Largo, C., Alvarez, S., Yokota, J., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Clevers, H. C., *et al.* (2009). The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum Mol Genet* 18, 1343-1352.

Medina, P. P., Romero, O. A., Kohno, T., Montuenga, L. M., Pio, R., Yokota, J., and Sanchez-Cespedes, M. (2008). Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 29, 617-622.

Medina, P. P., and Sanchez-Cespedes, M. (2008). Involvement of the chromatin-remodeling factor BRG1/SMARCA4 in human cancer. *Epigenetics* 3, 64-68.

Melchor, L., Saucedo-Cuevas, L. P., Munoz-Repeto, I., Rodriguez-Pinilla, S. M., Honrado, E., Campoverde, A., Palacios, J., Nathanson, K. L., Garcia, M. J., and Benitez, J. (2009). Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res* 11, R86.

Memisoglu, A., and Samson, L. (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451, 39-51.

Mendel, D. B., Laird, A. D., Xin, X., Louie, S. G., Christensen, J. G., Li, G., Schreck, R. E., Abrams, T. J., Ngai, T. J., Lee, L. B., *et al.* (2003). In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9, 327-337.

Meyer-Schaller, N., Chou, Y. C., Sumara, I., Martin, D. D., Kurz, T., Katheder, N., Hofmann, K., Berthiaume, L. G., Sicheri, F., and Peter, M. (2009). The human Dcn1-like protein DCNL3 promotes Cul3 neddylation at membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 12365-12370.

Minna, J. D., Roth, J. A., and Gazdar, A. F. (2002). Focus on lung cancer. *Cancer Cell* *1*, 49-52.

Mita, M. M., Mita, A. C., Chu, Q. S., Rowinsky, E. K., Fetterly, G. J., Goldston, M., Patnaik, A., Mathews, L., Ricart, A. D., Mays, T., *et al.* (2008). Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* *26*, 361-367.

Mori, N., Yokota, J., Akiyama, T., Sameshima, Y., Okamoto, A., Mizoguchi, H., Toyoshima, K., Sugimura, T., and Terada, M. (1990). Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* *5*, 1713-1717.

Mortazavi, F., An, J., Dubinett, S., and Rettig, M. (2010). p120-catenin is transcriptionally downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* *8*, 762-774.

Muller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., Lau, L. F., Veh, R. W., Haganir, R. L., Gundelfinger, E. D., and Garner, C. C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* *17*, 255-265.

N

Nagafuchi, A., Takeichi, M., and Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* *65*, 849-857.

Nakaya, T., Kuwahara, K., Ohta, K., Kitabatake, M., Toda, T., Takeda, N., Tani, T., Kondo, E., and Sakaguchi, N. (2010). Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression. *J Immunol* *185*, 5180-5187.

Naoki, K., Chen, T. H., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J., and Meyerson, M. (2002). Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* *62*, 7001-7003.

Napoli, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* *1440*, 139-162.

Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* *258*, 424-429.

Nissen-Meyer, L. S., Jemtland, R., Gautvik, V. T., Pedersen, M. E., Paro, R., Fortunati, D., Pierroz, D. D., Stadelmann, V. A., Reppe, S., Reinholt, F. P., *et al.* (2007). Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *J Cell Sci* *120*, 2785-2795.

Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *41*, 367-401.

Noren, N. K., Liu, B. P., Burrige, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* *150*, 567-580.

O

O'Connor, D. J., Lam, E. W., Griffin, S., Zhong, S., Leighton, L. C., Burbidge, S. A., and Lu, X. (1995). Physical and functional interactions between p53 and cell cycle co-operating transcription factors, E2F1 and DP1. *Embo J* *14*, 6184-6192.

O'Donnell, A., Faivre, S., Burris, H. A., 3rd, Rea, D., Papadimitrakopoulou, V., Shand, N., Lane, H. A., Hazell, K., Zoellner, U., Kovarik, J. M., *et al.* (2008). Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* *26*, 1588-1595.

P

Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.

Pal, S. K., Figlin, R. A., and Reckamp, K. (2010). Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Mol Cancer Ther* 9, 1931-1944.

Pal, S. K., Figlin, R. A., and Reckamp, K. L. (2008). The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 9, 340-345.

Pan, X., Zhao, J., Zhang, W. N., Li, H. Y., Mu, R., Zhou, T., Zhang, H. Y., Gong, W. L., Yu, M., Man, J. H., *et al.* (2009). Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3788-3793.

Pandya, K. J., Dahlberg, S., Hidalgo, M., Cohen, R. B., Lee, M. W., Schiller, J. H., and Johnson, D. H. (2007). A randomized, phase II trial of two dose levels of temsirolimus (CCI-779) in patients with extensive-stage small-cell lung cancer who have responding or stable disease after induction chemotherapy: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1500). *J Thorac Oncol* 2, 1036-1041.

Park, J. I., Kim, S. W., Lyons, J. P., Ji, H., Nguyen, T. T., Cho, K., Barton, M. C., Deroo, T., Vleminckx, K., Moon, R. T., and McCrea, P. D. (2005). Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* 8, 843-854.

Pegg, A. E. (2000). Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462, 83-100.

Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., *et al.* (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-211.

Plum, L. A., Parada, L. F., Tsoulfas, P., and Clagett-Dame, M. (2001). Retinoic acid combined with neurotrophin-3 enhances the survival and neurite outgrowth of embryonic sympathetic neurons. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 766-775.

Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., and Brown, P. O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 41-46.

Pollack, J. R., Sorlie, T., Perou, C. M., Rees, C. A., Jeffrey, S. S., Lonning, P. E., Tibshirani, R., Botstein, D., Borresen-Dale, A. L., and Brown, P. O. (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12963-12968.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., *et al.* (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.

Potzner, M. R., Griffel, C., Lutjen-Drecoll, E., Bosl, M. R., Wegner, M., and Sock, E. (2007). Prolonged Sox4 expression in oligodendrocytes interferes with normal myelination in the central nervous system. *Mol Cell Biol* 27, 5316-5326.

Pramoonjago, P., Baras, A. S., and Moskaluk, C. A. (2006). Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene* 25, 5626-5639.

Ptashne, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322, 697-701.

R

Rabindran, S. K., Discifani, C. M., Rosfjord, E. C., Baxter, M., Floyd, M. B., Golas, J., Hallett, W. A., Johnson, B. D., Nilakantan, R., Overbeek, E., *et al.* (2004). Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res* 64, 3958-3965.

Ramos, A. H., Dutt, A., Mermel, C., Perner, S., Cho, J., Lafargue, C. J., Johnson, L. A., Stiedl, A. C., Tanaka, K. E., Bass, A. J., *et al.* (2009). Amplification of chromosomal segment 4q12 in non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* 8, 2042-2050.

Ramsay, R. G., and Gonda, T. J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. *Nat Rev Cancer* 8, 523-534.

Reynolds, A. B., and Roczniak-Ferguson, A. (2004). Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 23, 7947-7956.

Reynolds, A. B., Roesel, D. J., Kanner, S. B., and Parsons, J. T. (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* 9, 629-638.

Riely, G. J., and Miller, V. A. (2007). Vascular endothelial growth factor trap in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, s4623-4627.

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., *et al.* (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361, 958-967.

Rosell, R., Robinet, G., Szczesna, A., Ramlau, R., Constenla, M., Mennecier, B. C., Pfeifer, W., O'Byrne, K. J., Welte, T., Kolb, R., *et al.* (2008). Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 19, 362-369.

Rosenthal, M. A., Thompson, M. A., Ellis, S., Whitehead, R. H., and Ramsay, R. G. (1996). Colonic expression of c-myc is initiated in utero and continues throughout adult life. *Cell Growth Differ* 7, 961-967.

Rowinsky, E. K., Youssoufian, H., Tonra, J. R., Solomon, P., Burtrum, D., and Ludwig, D. L. (2007). IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. *Clin Cancer Res* 13, 5549s-5555s.

S

Saitoh, O., Wang, W. C., Lotan, R., and Fukuda, M. (1992). Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem* 267, 5700-5711.

Salgado, R., Toll, A., Alameda, F., Baro, T., Martin-Ezquerria, G., Sanmartin, O., Martorell-Calatayud, A., Salido, M., Almenar, S., Sole, F., *et al.* (2010). CKS1B amplification is a frequent event in cutaneous squamous cell carcinoma with aggressive clinical behaviour. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 1054-1061.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., *et al.* (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.

Sanchez-Cespedes, M. (2007). A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 26, 7825-7832.

Sanchez-Cespedes, M. (2009). Lung cancer biology: a genetic and genomic perspective. *Clin Transl Oncol* 11, 263-269.

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J. M., Westra, W. H., Herman, J. G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 62, 3659-3662.

Sanchez-Cespedes, M., Reed, A. L., Buta, M., Wu, L., Westra, W. H., Herman, J. G., Yang, S. C., Jen, J., and Sidransky, D. (1999). Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 18, 5843-5849.

Sato, Y., and Sonoda, H. (2007). The vasohibin family: a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 37-41.

Sauter, E. R., Nesbit, M., Litwin, S., Klein-Szanto, A. J., Cheffetz, S., and Herlyn, M. (1999). Antisense cyclin D1 induces apoptosis and tumor shrinkage in human squamous carcinomas. *Cancer Res* 59, 4876-4881.

Sawada, R., Lowe, J. B., and Fukuda, M. (1993). E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels. *J Biol Chem* 268, 12675-12681.

Scagliotti, G. V., Selvaggi, G., Novello, S., and Hirsch, F. R. (2004). The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10, 4227s-4232s.

Scharer, C. D., McCabe, C. D., Ali-Seyed, M., Berger, M. F., Bulyk, M. L., and Moreno, C. S. (2009). Genome-wide promoter analysis of the SOX4 transcriptional network in prostate cancer cells. *Cancer Res* 69, 709-717.

Schepers, G. E., Teasdale, R. D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 3, 167-170.

Schilham, M. W., Oosterwegel, M. A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P. A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W. H., Kruisbeek, A. M., Cumano, A., and Clevers, H. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380, 711-714.

Sekido, Y., Fong, K. M., and Minna, J. D. (1998). Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1378, F21-59.

Shen-Ong, G. L., Morse, H. C., 3rd, Potter, M., and Mushinski, J. F. (1986). Two modes of c-myc activation in virus-induced mouse myeloid tumors. *Mol Cell Biol* 6, 380-392.

Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132.

Shibata, T., Kokubu, A., Sekine, S., Kanai, Y., and Hirohashi, S. (2004). Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am J Pathol* 164, 2269-2278.

Shibuya, T., Watanabe, K., Yamashita, H., Shimizu, K., Miyashita, H., Abe, M., Moriya, T., Ohta, H., Sonoda, H., Shimosegawa, T., *et al.* (2006). Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1051-1057.

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.

Shin, M. S., Fredrickson, T. N., Hartley, J. W., Suzuki, T., Akagi, K., and Morse, H. C., 3rd (2004). High-throughput retroviral tagging for identification of genes involved in initiation and progression of mouse splenic marginal zone lymphomas. *Cancer Res* 64, 4419-4427.

Shinomiya, T., Mori, T., Ariyama, Y., Sakabe, T., Fukuda, Y., Murakami, Y., Nakamura, Y., and Inazawa, J. (1999). Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DPI gene in the 13q34 amplicon. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 337-344.

Sinner, D., Kordich, J. J., Spence, J. R., Opoka, R., Rankin, S., Lin, S. C., Jonatan, D., Zorn, A. M., and Wells, J. M. (2007). Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 27, 7802-7815.

Skawran, B., Steinemann, D., Weigmann, A., Flemming, P., Becker, T., Flik, J., Kreipe, H., Schlegelberger, B., and Wilkens, L. (2008). Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions. *Mod Pathol* 21, 505-516.

Slebos, R. J., Hruban, R. H., Dalesio, O., Mooi, W. J., Offerhaus, G. J., and Rodenhuis, S. (1991). Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 83, 1024-1027.

So, C. W., Ma, S. K., Wan, T. S., Chan, G. C., Ha, S. Y., and Chan, L. C. (2000). Analysis of MLL-derived transcripts in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation (1;11;4)(q21;q23;p16). *Cancer Genet Cytogenet* 117, 24-27.

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., *et al.* (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-566.

Solit, D. B., Garraway, L. A., Pratilas, C. A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J. M., She, Y., Osman, I., *et al.* (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439, 358-362.

Sonoda, I., Imoto, I., Inoue, J., Shibata, T., Shimada, Y., Chin, K., Imamura, M., Amagasa, T., Gray, J. W., Hirohashi, S., and Inazawa, J. (2004). Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 64, 3741-3747.

Sonpavde, G., and Hutson, T. E. (2007). Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Curr Oncol Rep* 9, 115-119.

Sorensen, T. S., Girling, R., Lee, C. W., Gannon, J., Bandara, L. R., and La Thangue, N. B. (1996). Functional interaction between DP-1 and p53. *Mol Cell Biol* 16, 5888-5895.

Spring, C. M., Kelly, K. F., O'Kelly, I., Graham, M., Crawford, H. C., and Daniel, J. M. (2005). The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. *Exp Cell Res* 305, 253-265.

Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., and Prive, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6, R82.

Sun, M., Jiang, R., Li, J. D., Luo, S. L., Gao, H. W., Jin, C. Y., Shi, D. L., Wang, C. G., Wang, B., and Zhang, X. Y. (2011). MED19 promotes proliferation and tumorigenesis of lung cancer. *Mol Cell Biochem*.

Sutherland, K. D., Proost, N., Brouns, I., Adriaensen, D., Song, J. Y., and Berns, A. (2011). Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell* 19, 754-764.

Suzuki, T., Shen, H., Akagi, K., Morse, H. C., Malley, J. D., Naiman, D. Q., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2002). New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* 32, 166-174.

T

Taatjes, D. J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 315-322.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takei, Y., Hamada, S., Senzaki, K., Mutoh, T., Sugino, H., and Yagi, T. (2001). Two novel CNRs from the CNR gene cluster have molecular features distinct from those of CNR1 to 8. *Genomics* 72, 321-330.

Tammemagi, M. C., McLaughlin, J. R., and Bull, S. B. (1999). Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 625-634.

Tang, D., Phillips, D. H., Stampfer, M., Mooney, L. A., Hsu, Y., Cho, S., Tsai, W. Y., Ma, J., Cole, K. J., She, M. N., and Perera, F. P. (2001). Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 61, 6708-6712.

Taron, M., Ichinose, Y., Rosell, R., Mok, T., Massuti, B., Zamora, L., Mate, J. L., Manegold, C., Ono, M., Queralt, C., *et al.* (2005). Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* *11*, 5878-5885.

Tarpey, P., Parnau, J., Blow, M., Woffendin, H., Bignell, G., Cox, C., Cox, J., Davies, H., Edkins, S., Holden, S., *et al.* (2004). Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* *75*, 318-324.

Tasic, B., Nabholz, C. E., Baldwin, K. K., Kim, Y., Rueckert, E. H., Ribich, S. A., Cramer, P., Wu, Q., Axel, R., and Maniatis, T. (2002). Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing. *Mol Cell* *10*, 21-33.

Tavazoie, S. F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., Gerald, W. L., and Massague, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* *451*, 147-152.

Thompson, M. A., Flegg, R., Westin, E. H., and Ramsay, R. G. (1997). Microsatellite deletions in the c-myc transcriptional attenuator region associated with over-expression in colon tumour cell lines. *Oncogene* *14*, 1715-1723.

Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., and Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* *148*, 189-202.

Thoreson, M. A., and Reynolds, A. B. (2002). Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. *Differentiation* *70*, 583-589.

Timofeevski, S. L., McTigue, M. A., Ryan, K., Cui, J., Zou, H. Y., Zhu, J. X., Chau, F., Alton, G., Karlicek, S., Christensen, J. G., and Murray, B. W. (2009). Enzymatic characterization of c-Met receptor tyrosine kinase oncogenic mutants and kinetic studies with aminopyridine and triazolopyrazine inhibitors. *Biochemistry* *48*, 5339-5349.

Tomita, A., Watanabe, T., Kosugi, H., Ohashi, H., Uchida, T., Kinoshita, T., Mizutani, S., Hotta, T., Murate, T., Seto, M., and Saito, H. (1998). Truncated c-Myb expression in the human leukemia cell line TK-6. *Leukemia* *12*, 1422-1429.

Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H.K., Harris, C.C. (2004). *Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC.

Tripathi, M. K., and Chaudhuri, G. (2005). Down-regulation of UCRP and UBE2L6 in BRCA2 knocked-down human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun* *328*, 43-48.

Tse, W., Joachim Deeg, H., Stirewalt, D., Appelbaum, F. R., Radich, J., and Gooley, T. (2005). Increased AF1q gene expression in high-risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* *128*, 218-220.

Tse, W., Meshinchi, S., Alonzo, T. A., Stirewalt, D. L., Gerbing, R. B., Woods, W. G., Appelbaum, F. R., and Radich, J. P. (2004). Elevated expression of the AF1q gene, an MLL fusion partner, is an independent adverse prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* *104*, 3058-3063.

Tsuta, K., Tanabe, Y., Yoshida, A., Takahashi, F., Maeshima, A. M., Asamura, H., and Tsuda, H. (2011). Utility of 10 Immunohistochemical Markers Including Novel Markers (Desmocollin-3, Glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for Differential Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma from Adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol*.

U

Umetani, N., Mori, T., Koyanagi, K., Shinozaki, M., Kim, J., Giuliano, A. E., and Hoon, D. S. (2005). Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* *24*, 4721-4727.

V

van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K., and Clevers, H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *Embo J* 12, 3847-3854.

van Hengel, J., and van Roy, F. 2007. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta* 1773, 78-88.

Volm, M., and Koomagi, R. (2000). Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 7, 95-98.

W

Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., *et al.* (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280, 1077-1082.

Wang, T., Hao, L., Feng, Y., Wang, G., Qin, D., and Gu, G. (2011). Knockdown of MED19 by lentivirus-mediated shRNA in human osteosarcoma cells inhibits cell proliferation by inducing cell cycle arrest in the G0/G1 phase. *Oncol Res* 19, 193-201.

Wang, X., Su, H., and Bradley, A. (2002). Molecular mechanisms governing Pcdh-gamma gene expression: evidence for a multiple promoter and cis-alternative splicing model. *Genes Dev* 16, 1890-1905.

Wang, Y., Broderick, P., Webb, E., Wu, X., Vijayakrishnan, J., Matakidou, A., Qureshi, M., Dong, Q., Gu, X., Chen, W. V., *et al.* (2008). Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet* 40, 1407-1409.

Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409-1420.

Weinstein, I. B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 21, 857-864.

Weinstein, I. B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63-64.

Weinstein, I. B., and Joe, A. K. (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 448-457.

Weinstein, Y., Ihle, J. N., Lavu, S., and Reddy, E. P. (1986). Truncation of the c-myc gene by a retroviral integration in an interleukin 3-dependent myeloid leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5010-5014.

Weir, B. A., Woo, M. S., Getz, G., Perner, S., Ding, L., Beroukhi, R., Lin, W. M., Province, M. A., Kraja, A., Johnson, L. A., *et al.* (2007). Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450, 893-898.

Westra, W. H. (2000). Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Res* 1, 163-169.

Westra, W. H., Slebos, R. J., Offerhaus, G. J., Goodman, S. N., Evers, S. G., Kensler, T. W., Askin, F. B., Rodenhuis, S., and Hruban, R. H. (1993). K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 72, 432-438.

Wicking, C., Smyth, I., and Bale, A. (1999). The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 18, 7844-7851.

Willert, K., and Jones, K. A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.

Williams, S. J., Cvetkovic, D., and Hamilton, T. C. (2009). Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 112, 637-645.

Wilson, M. E., Yang, K. Y., Kalousova, A., Lau, J., Kosaka, Y., Lynn, F. C., Wang, J., Mrejen, C., Episkopou, V., Clevers, H. C., and German, M. S. (2005). The HMG box transcription factor Sox4 contributes to the development of the endocrine pancreas. *Diabetes* 54, 3402-3409.

Wistuba, II, and Gazdar, A. F. (2006). Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol* 1, 331-348.

Wistuba, II, Mao, L., and Gazdar, A. F. (2002). Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 21, 7298-7306.

Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M. R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett* 410, 63-67.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13, 2004-2008.

Wu, C. L., Zukerberg, L. R., Ngwu, C., Harlow, E., and Lees, J. A. (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* 15, 2536-2546.

X

Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 163, 535-545.

Y

Yagi, T. (2008). Clustered protocadherin family. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1, S131-140.

Yajnik, V., Paulding, C., Sordella, R., McClatchey, A. I., Saito, M., Wahrer, D. C., Reynolds, P., Bell, D. W., Lake, R., van den Heuvel, S., *et al.* (2003). DOCK4, a GTPase activator, is disrupted during tumorigenesis. *Cell* 112, 673-684.

Yanagisawa, M., and Anastasiadis, P. Z. (2006). p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J Cell Biol* 174, 1087-1096.

Yap, A. S., Niessen, C. M., and Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 141, 779-789.

Yasui, K., Arii, S., Zhao, C., Imoto, I., Ueda, M., Nagai, H., Emi, M., and Inazawa, J. (2002). TFDP1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 35, 1476-1484.

Yasui, K., Okamoto, H., Arii, S., and Inazawa, J. (2003). Association of over-expressed TFDP1 with progression of hepatocellular carcinomas. *J Hum Genet* 48, 609-613.

Yokoi, S., Yasui, K., Mori, M., Iizasa, T., Fujisawa, T., and Inazawa, J. (2004). Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* 165, 175-180.

Yokomizo, A., Tindall, D. J., Drabkin, H., Gemmill, R., Franklin, W., Yang, P., Sugio, K., Smith, D. I., and Liu, W. (1998). PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 17, 475-479.

Yokota, S., Hirayama, T., Hirano, K., Kaneko, R., Toyoda, S., Kawamura, Y., Hirabayashi, M., Hirabayashi, T., and Yagi, T. (2011). Identification of the Cluster Control Region for the Protocadherin- β Genes Located beyond the Protocadherin- γ Cluster. *J Biol Chem* 286, 31885-31895.

Yu, L., Liu, C., Vandeusen, J., Becknell, B., Dai, Z., Wu, Y. Z., Raval, A., Liu, T. H., Ding, W., Mao, C., *et al.* (2005). Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies ID4 as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* 37, 265-274.

Yuan, P., Kadara, H., Behrens, C., Tang, X., Woods, D., Solis, L. M., Huang, J., Spinola, M., Dong, W., Yin, G., *et al.* (2010). Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One* 5, e9112.

Z

Zamanian, M., and La Thangue, N. B. (1992). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from repressing the activity of a cellular transcription factor. *Embo J* 11, 2603-2610.

Zanni, G., van Esch, H., Bensalem, A., Saillour, Y., Poirier, K., Castelnau, L., Ropers, H. H., de Brouwer, A. P., Laumonnier, F., Fryns, J. P., and Chelly, J. (2010). A novel mutation in the DLG3 gene encoding the synapse-associated protein 102 (SAP102) causes non-syndromic mental retardation. *Neurogenetics* 11, 251-255.

Zhang, H., Jiang, H., Wang, W., Gong, J., Zhang, L., Chen, Z., and Ding, Q. (2011). Expression of Med19 in bladder cancer tissues and its role on bladder cancer cell growth. *Urol Oncol*.

Zhou, W., Ercan, D., Chen, L., Yun, C. H., Li, D., Capelletti, M., Cortot, A. B., Chirieac, L., Iacob, R. E., Padera, R., *et al.* (2009). Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* 462, 1070-1074.

Zipursky, S. L., and Sanes, J. R. (2010). Chemoaffinity revisited: dscams, protocadherins, and neural circuit assembly. *Cell* 143, 343-353.

Zochbauer-Muller, S., and Minna, J. D. (2000). The biology of lung cancer including potential clinical applications. *Chest Surg Clin N Am* 10, 691-708.

Zou, S. W., Ai, K. X., Wang, Z. G., Yuan, Z., Yan, J., and Zheng, Q. (2011). The role of Med19 in the proliferation and tumorigenesis of human hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 32, 354-360.

Informe de la directora del factor de impacto de los artículos publicados

L'Hospitalet de Llobregat, 15 de Junio 2011.

Por la presente certifico que la doctoranda SANDRA CASTILLO DIEZ leerá la tesis "Identificación y análisis funcional de nuevos oncogenes amplificados en cáncer de pulmón" por compendio de tres artículos. Su contribución en cada uno de los artículos se indica a continuación:

Publicación 1: Medina PP, CASTILLO SD, Blanco S, Sanz-Garcia M, Largo C, Alvarez S, Yokota J, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Clevers HC, Cigudosa JC, Lazo PA, Sanchez-Cespedes M.

TITULO: The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer.

REVISTA: Hum Mol Genet. 2009 Apr 1;18(7):1343-5. PMID:19153074

FI: 7.386 (D1, Biochemistry & Molecular Biology: 27/275)

En este trabajo la doctoranda Sandra Castillo llevo a cabo diversos experimentos clave. Entre ellos cabe destacar diversos western-blots de SOX4 en distintas líneas celulares de cáncer de pulmón (Figura 2E); medidas de expresión génica, mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, de SOX4 en líneas celulares y tumores primarios de pulmón (Figura 3A-B) y análisis mutacional de SOX4 (Figura 3 C-D). También contribuyó activamente al clonaje, en vectores de expresión en mamíferos, de la forma salvaje y de diferentes mutaciones de SOX4 (Figura 4A).

Publicación 2: CASTILLO SD, Angulo B, Suarez-Gauthier A, Melchor L, Medina PP, Sanchez-Verde L, Torres-Lanzas J, Pita G, Benitez J, Sanchez-Cespedes M.

TITULO: Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer.

REVISTA: J Pathol. 2010 Sep;222(1):89-98. PMID:20556744

FI: 7.274 (D1, Pathology: 2/71)

En este artículo Sandra Castillo realizó contribuciones esenciales, por lo que lidera la autoría del trabajo. Por una parte contribuyó muy significativamente en la figura 2, realizando mucho de los ensayos de FISH para determinar el número de copias en los distintos amplicones seleccionados (Figura 2A). Además, llevó a cabo la práctica totalidad de las PCRs y RT-PCRs cuantitativas en tiempo real para evaluar los niveles de expresión y número de copias de los diferentes genes seccionados (Figura 3A y figuras suplementarias 1, 2 y 3). Además se encargo de realizar los westerns-blots (Figura 3C y Figuras 5A y C). También llevó a cabo los experimentos de interferencia de TFDP1 en líneas celulares y los correspondientes estudios de viabilidad (Figura 5B-C). Finalmente, colaboró activamente en realizar las distintas figuras del manuscrito.

Publicación 3: CASTILLO SD, Matheu A, Mariani N, Lopez-Rios F, Carretero J, Lovell-Badge R, Sanchez-Cespedes M.

TITULO: Novel transcriptional targets of the SRY-HMG box transcription factor SOX4 link its expression to the development of small cell lung cancer.

REVISTA: Cancer Res. In press.

FI: 8.234 (D1, Oncology: 12/185)

En este trabajo, Sandra Castillo llevó la práctica totalidad de los experimentos que constituyen el artículo. Desde la generación de los clones que expresan el shSOX4 de forma estable e inducible en la línea H522, a todos los westerns-blot, RT-PCRs en tiempo real de líneas celulares y de tumores primarios, inmunoprecipitaciones de cromatina de SOX4, etc. Una parte del trabajo, especialmente la relacionada con los ratones heterocigotos y KO de Sox4, fue desarrollada por Sandra durante una estancia de tres meses en Londres, en el laboratorio de Robin Lovell-Badge. En algunos experimentos Sandra contó con la ayuda del estudiante de máster Nicolo Mariani.

Y para que así conste, a todos los efectos:



Cancer Epigenetics and Biology Program
Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer
Programa de Epigenètica y Biología del Cáncer

Montse Sanchez-Cespedes, PhD
Genes and Cancer Group Leader
Programa Epigenetica i Biologia del Cancer-PEBC
Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)
Hospital Duran i Reynals
Av. Gran Via del'Hospitalet, 199-203
08908-Hospitalet de Llobregat-Barcelona, Spain
email: mscspedes@idibell.cat
Phone number: +34.93.260.71.32.
Fax number: +34.93.260.72.19

***“... pero esa es otra historia
y debe ser contada en otra ocasión.”***

La Historia Interminable. *Michael Ende*

