



Identificació i estudi funcional de nous gens supressors tumorals implicats en càncer de pulmó

Ester Bonastre Llorc

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE
BELLVITGE



Universitat de Barcelona



Facultat de Farmàcia

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Programa de Doctorat en Biomedicina

Identificació i estudi funcional de nous gens supressors tumoral implicats en càncer de pulmó

Memòria presentada per Ester Bonastre Llord per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

Doctoranda,

Ester Bonastre Llord

Directora,

Montse Sanchez Cespedes

Ester Bonastre Llord, 2014

Pels de casa,

Qui no coneix res, no estima res. Qui no pot fer res, no comprèn res. Qui no comprèn res, no val res. Però qui comprèn, també estima, observa, veu... Com més gran és el coneixement inherent a una cosa, més gran és l'amor... Si algú creu que tota la fruita madura al mateix temps que les maduixes, no sap res sobre el raïm.

Paracelsus

Agraïments

Encara que no ho sembli, aquesta també és una part important de la tesi. El moment de donar les gràcies...

Gràcies als de casa, a tots els que em van fer gran i encara continuen fent-ho. Als meus pares, gràcies per ensenyar-me les coses més importants de la vida! La bondat, l'esforç, el compromís, la perseverança, el treball, a estimar totes les coses que fas i a agrair totes les coses que et fan; això és un bon aprenentatge! "Si alguna cosa no l'entens, pregunta", aquest era el lema a casa quan anava a l'escola, potser de tantes preguntes que sempre he tingut, he volgut fer una tesi. Però el que no sabia és que, de fet, les preguntes són increïbles portes a més preguntes! Gràcies per les preguntes!

Gràcies als del laboratori de recerca de Retinopatia i Diabetis de la Vall D'Hebron, Martes i Lídia, sense vosaltres no sé com m'hauria encaminat cap aquesta direcció.

Gràcies Montse, per confiar en mi, pel recolzament i per haver-me donat tantes oportunitats. Gràcies Eva, Salva i Pol, sempre sereu els tres postdocs del lab, un molt bon suport en tots els sentits. Gràcies Eva per ser com una mare, que al final sempre té raó i sap resistir tots els dilemes. Gracias Salva por tener siempre respuestas y por poderlas discutir sin cansarte. Gràcies Pol per l'optimisme i per l'amistat. Gràcies Albert, pels primers passos pel laboratori i pel bon rotllo. Gracias Octavio por el primer dia y por todas las historias con moraleja para el trabajo y la vida. Gracias Sandra, por estar siempre tan cerca aún estando lejos, por poder hablar de todo y hacer que todo parezca mucho mejor. Gracias Rossana, por ser pareja de inicio y de final. Gracias Manu y Carol, por hacerme sentir tan joven y tan vieja a la vez, a menudo viene bien. Gracias Patri, por los primeros que llegaron en el menor tiempo posible. Gràcies Sara, per aquest últim any, per la bona sintonia i per haver-me ajudat de tantes maneres diferents, ens havíem d'haver conegut abans!

Gràcies PEBC, per compartir tant! Gràcies especialment a tota la gent que m'ha ajudat en algun moment en alguna tècnica, en algun dubte o en alguna discussió. A les veïnes del PEBC4, per ser tant maques i generoses; a la Carme, per ensenyar-me la fascinació pel microscopi i el descobriment de les múltiples utilitats del FIJI; al Fer, que sempre està disposat; i podria anomenar més gent però crec que no acabaria! Gràcies a tots PEBCeros! Gràcies "New fanta de limon", per les cerveses i fantes fora del lab, per l'amistat i per la comprensió, sovint difícil de trobar en el "món exterior", per retrobar-nos sempre. New fanta de limon forever! Gràcies Amy, per com m'has ajudat amb la tesi, ha estat fantàstic, i per la teva serenitat i vitalitat.

Gràcies Neus i Núria, per haver suportat les meves històries cada tarda a l'arribar de la feina (i seguir-les suportant!), ens ho passàvem genial, i per ser les millor companyes de pis que he tingut mai! Gràcies nenes maques, pels bons dies diaris i per poder confiar-vos-ho tot. Gràcies colla de btteros, per fer-me desconnectar! Gràcies Miquel, Ramona i Ferran, pels sopars de verdura amb peix i les bones converses. Gràcies Wigmars, per fer-me sentir tan bé!

Thank you Suvi and Ilse to show me all MLPA tricks and to make me feel comfortable in Amsterdam. Thank you to all the people at MRC-Holland, because all of you are an important part of such an amazing company, and this was in the air!

Gracias Alberto, por ser tan próximo y hablar tan llanamente, por haberme abierto la puerta al trabajo de experimentación con animales. La veritat és que només mirant les coses que fas ja tens ganes de seguir treballant a l'estabulari. Gràcies.

Gràcies Montse, per ser la millor germana del planeta! Gràcies per ser tant pràctica i no acceptar més divagacions de les necessàries, gràcies per ensenyar-me que és de veritat important i que són tonteries. Gràcies pel Jordi i l'Ares. Gràcies Jordi, per ser l'exemple del perfecte treballador. Gràcies Ares, per ser tant petita i dir tantes coses només amb un somriure, per la pura vida que desprens, on tot és senzill.

Gràcies Francesc, per la paciència, per l'espera diària, per la quotidianitat de la compra i el sopar fet, per les converses, per parlar quan cal, per callar quan toca i per ser una font de tranquil·litat. Però gràcies per un munt de coses més! Tantes, que no puc escriure-les aquí i que saps millor que ningú!

Gràcies als que ja no hi són però que sempre hi seran.

Gràcies a tots els que esteu al meu voltant i que d'alguna manera o altra contribuïu en la meva vida, gràcies per interessar-vos per mi i per la meva feina.

Gràcies Vallfogona, per ser el lloc perfecte!

Índex

Índex	1
Acrònims	5
Introducció	11
1. ASPECTES GENERALS DE LA BIOLOGIA DEL CÀNCER	13
2. POLARITAT I CÀNCER	18
2.1. COMPLEXES QUE INTERVENEN EN LA POLARITAT	18
2.2. UNIONS COM A COMPONENTS DE POLARITAT	20
2.3. AFECTACIÓ DE LA POLARITAT EN CÀNCER	22
3. CÀNCER DE PULMÓ	27
3.1. EPIDEMIOLOGIA	27
3.2. CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA	30
3.3. ALTERACIONS GENÈTIQUES	36
3.4. ALTERACIONS EPIGENÈTIQUES	43
3.5. CRONOLOGIA DELS ESTUDIS GENÈTICS DEL CÀNCER DE PULMÓ	44
Objectius	49
Material i mètodes	53
1. MATERIALS	55
1.1. DNAs	55
1.2. LÍNIES CEL·LULARS	55
1.3. TUMORS I MICROARRAYS DE TEIXITS	55
1.4. RATOLINS ATÍMICS	56
2. MÈTODES	56
2.1. TÈCNiques PER L'ESTUDI GENÈTIC	56
2.2. TÈCNiques PER LA GENERACIÓ DE VECTORS I CÈL·LULES MODIFICADES	64
2.3. TÈCNiques PER ESTUDIAR L'EXPRESSIÓ	66
2.4. TÈCNiques PER ESTUDIS DE CARÀCTER FUNCIONAL	71
2.5. ESTUDIS IN VIVO	73
2.6. ANÀLISI ESTADÍSTIC	75
Resultats	77
1. IDENTIFICACIÓ DE GENS CANDIDATS	79
1.1. ESCRUTINI EN BASES DE DADES	79
1.2. COMPROVACIÓ DE LES DELECCIONS HOMOZIGOTES	80
1.3. CRIBATGES MUTACIONALS	81
2. PARD3 ESTÀ INACTIVAT EN TUMORS	82
2.1. EL GEN PARD3 PATEIX MUTACIONS PUNTUALS	82
2.2. LA REGIÓ QUE INCLOU PARD3 PERD FREQUÈNTMENT L'HETEROZIGOSITAT	87
2.3. EL GEN PARD3 ESTÀ INACTIVAT PER DELECCIÓ	88
2.4. L'EXPRESSIÓ DE PARD3 NO S'AFECTA PER L'ESTAT DE METILACIÓ DEL SEU PROMOTOR	93
2.5. ANÀLISI DEL PATRÓ D'IMMUNOTINCIÓ EN CÀNCER DE PULMÓ I DE CAP I COLL	96
3. LES FUNCIONS DE PAR3 S'ALTEREN EN TUMORS	99
3.1. DETERMINACIÓ DE LA VARIANT TRANSCRIPCIONAL MÉS ABUNDANT EN PULMÓ	99

3.2.	ESTABLIMENT DELS SISTEMES D'EXPRESSIONIÓ ECTÒPICA DEL GEN PARD3	101
3.3.	LA PROTEÏNA MUTANT D41_R74del ES DEGRADADA PEL PROTEASOMA	103
3.4.	LES PROTEÏNES PAR3 MUTANTS MOSTREN MENYS CAPACITAT COLONIGÈNICA	105
3.5.	ALTERACIONS EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR	106
3.6.	ALTERACIONS EN LA CAPACITAT D'UNIR-SE A LA QUINASA DEL COMPLEX PAR: aPKC	108
3.7.	ALTERACIONS EN LA FORMACIÓ D'UNIONS ESTRETES	109
3.8.	ALTERACIONS EN LA FORMACIÓ DE PROTRUSIONS	112
3.9.	EFFECTES EN L'ACTIVACIÓ DELS COMPONENTS DE LA VIA DE PAR3	113
4.	LA SIGNATURA D'EXPRESSIONIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS IMPLICATS EN L'ADHESIÓ CEL·LULAR I DIANES DE STAT3	115
4.1.	LA SIGNATURA D'EXPRESSIONIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS IMPLICATS EN L'ADHESIÓ CEL·LULAR	115
4.2.	LA SIGNATURA D'EXPRESSIONIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS QUE SÓN DIANES TRANSCRIPCIONALS DE STAT3	118
4.3.	PAR3 CONTROLA L'ACTIVACIÓ DE STAT3 EN UNA SITUACIÓ DE CONFLUÈNCIA CEL·LULAR	119
5.	LA RECUPERACIÓ DE PAR3 REDUEIX LA INVASIVITAT I METÀSTASI <i>IN VIVO</i>	123
5.1.	LA RECUPERACIÓ DE PAR3 NO ALTERA LA PROLIFERACIÓ EN UN MODEL SUBCUTANI <i>IN VIVO</i>	123
5.2.	LA RECUPERACIÓ DE PAR3 MOSTRA UN INCREMENT DE METÀSTASIS EN UN MODEL ORTOTÒPIC DE PULMÓ <i>IN VIVO</i>	124
6.	<i>PIK3R1</i>	127
6.1.	EL GEN <i>PIK3R1</i> ESTÀ MUTAT EN CÀNCER DE PULMÓ	127
6.2.	LA MANCA DE <i>PIK3R1</i> NO MANTÉ LA VIA DE LES PI3K CONSTITUTIVAMENT ACTIVA	129
6.3.	ESTABLIMENT DE SISTEMES MODEL PEL TREBALL AMB <i>PIK3R1</i>	132
6.4.	PERFELS D'EXPRESSIONIÓ DE <i>PIK3R1</i>	133
Discussió		135
1.	<i>PARD3</i>	138
2.	<i>PIK3R1</i>	148
Conclusions		151
Annex		155
Bibliografia		171

Acrònims

AAH: hiperplàsia adenomatosa atípica; de l'anglès, *Atypical Adenomatous Hyperplasia*.

AD: Adenocarcinoma.

AIS: Adenocarcinoma In Situ.

AJ: unió estreta; de l'anglès, *Adherent Junction*.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

ATP: Adenosina Trifosfat.

ATS: *American Thoracic Society*.

BAC: carcinoma broncoalveolar; de l'anglès, *Bronchioalveolar Carcinoma*.

Bp: parell de bases; de l'anglès, *Base Pair*.

BSA: albúmina bovina fetal; de l'anglès, *Bovine Serum Albumin*.

CC: bucle enrotllat; de l'anglès, *Coiled Coil*.

CGH: hibridació genòmica comparada; de l'anglès, *Comparative Genomic Hybridization*.

CIS: Carcinoma *In Situ*.

CSC: cèl·lula mare cancerosa; de l'anglès, *Cancer Stem Cell*.

Del: deleció.

DIPNECH: hiperplàsia idiopàtica difusa de cèl·lules neuroendocrines; de l'anglès, *Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia*.

DMSO: Dimetil Sulfòxid.

dNTP: Deoxinuclòtids Trifosfat.

Dup: duplicació.

ECM: matriu extracel·lular; de l'anglès, *Extracellular Matrix*.

EDTA: àcid etilendiamintetraacetic; de l'anglès, *Ethylene Diamide Tetracetic Acid*.

EMT: transició epiteli mesènquima; de l'anglès, *Epithelial to Mesenchymal Transition*.

ERS: *European Respiratory Society*.

FDR: *False Discovery Rate*.

FBS: serúm boví fetal; de l'anglès, *Fetal Bovine Serum*.

Fs: canvi de pauta de lectura; de l'anglès, *Frameshift*.

GDP: Guanosina Difosfat.

GEF: factor intercanviador de guanosina; de l'anglès *Guanine Exchange Factor*.

GO: ontologia de gens; de l'anglès, *Gene Ontology*.

GSEA: anàlisi de l'enriquiment en grups de gens; de l'anglès, *Gene Set Enrichment Analysis*.

GTP: Guanosina Trifosfat.

HD: deleció homozigota; de l'anglès, *Homozygous Deletion*.

HNSCC: carcinoma escamós de cap i coll; de l'anglès, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*.

IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*.

KDa: KiloDalton

LCC: carcinoma de cèl·lula gran; de l'anglès, *Large Cell Carcinoma*.

LOH: pèrdua d'heterozigositat; de l'anglès, *Loss Of Heterozygosity*.

NA: No Analitzat.

NCM: medi amb concentració normal de calci; de l'anglès, *Normal Calcium Medium*.

NES: índex d'enriquiment normalitzat; de l'anglès, *Normalized Enrichment Score*.

NGS: seqüenciació de pròxima generació; de l'anglès, *Next Generation Sequencing*.

NK: assassina natural; de l'anglès, *Natural Killer*.

NNK: cetona nitrosamina derivada de la nicotina; de l'anglès, *Nicotine derived Nitrosamine Ketone*.

NNN: N-nitrosornicotina.

NOS: no especificat; de l'anglès, *Not Otherwise Specified*.

NSCLC: carcinoma de pulmó macrocític; de l'anglès, *Non Small Cell Lung Cancer*.

ON: tota la nit; de l'anglès, *Over Night*.

PAH: hidrocarburs aromàtics policíclics; de l'anglès, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*.

PBS: buffer salí fosfatat; de l'anglès, *Phosphate Buffered Salin*.

PDZ: (sigles de tres proteïnes amb aquest domini) *Post Synaptic Density, Disc Large Giant i Zonula Occludens*.

RT: temperatura ambient; de l'anglès, *Run Temperature*.

SD: desviació estàndard; de l'anglès, *Standard Deviation*.

SCC: carcinoma escamós; de l'anglès, *Squamous Cell Carcinoma*.

SCLC: càncer de pulmó de cèl·lula petita; de l'anglès, *Small Cell Lung Cancer*.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

SNP: polimorfisme d'únic nucleòtid; *Single Nucleotid Polymorphism*.

TBE: Tris-Borat EDTA.

TBS: solució salina amb Tris; de l'anglès, *Tris Buffer Saline*.

TGF β : factor de creixement transformant beta; de l'anglès, *Transforming Growth Factor beta*.

TGS: seqüenciació de tercera generació; de l'anglès, *Third Generation Sequencing*.

TJ: unió estreta; de l'anglès, *Tight Junction*.

TMA: microarrays de teixits; de l'anglès, *Tissue Microarrays*.

WES: seqüenciació de tot l'exoma; de l'anglès, *Whole Exome Sequencing*.

WGS: seqüenciació de tot el genoma; de l'anglès, *Whole Genome Sequencing*.

WHO: *World Health Organization*.

Introducció

1. ASPECTES GENERALS DE LA BIOLOGIA DEL CÀNCER

El càncer és la principal causa de mort en països desenvolupats. La seva incidència està incrementant com a resultat de l'envelliment de la població i també de canvis en l'estil de vida, com l'alta incidència del tabaquisme, el sedentarisme o les dietes poc saludables (Jemal et al., 2011). Només a Europa, l'estima pel 2012 va ser de 3,45 milions de nous casos i 1,75 milions de morts; i els tipus de càncer més comuns són els de mama, còlon, pròstata i pulmó (Ferlay et al., 2013).

El càncer és un grup de malalties caracteritzades per un creixement cel·lular descontrolat i per la capacitat d'invasió de les cèl·lules, des del lloc d'origen cap a altres llocs del cos. Es diu que són un grup de malalties perquè n'hi ha una classificació de més de cent tipus i tots tenen característiques diferents. Hi ha molta diversitat generada per variabilitat en els teixits d'origen, factors ambientals causants, perfils mutacionals o patrons de migració a altres teixits; i això fa que requereixin diversitat en els tractaments. El creixement cel·lular descontrolat és provocat per un guany net en el número de cèl·lules; aquest guany és degut a un increment en la proliferació, a la inhibició de la mort cel·lular i a l'estímul de processos com la diferenciació, que aturen la divisió. Finalment, la capacitat de les cèl·lules d'escapar del seu lloc de creixement primari és el que confereix la malignitat i la denominació de càncer; mentre les cèl·lules, tot i créixer descontroladament, es quedin confinades, es parla de tumor benigne (Pecornio, 2008).

El càncer també es defineix com una malaltia genètica, doncs és la conseqüència d'un procés d'acumulació de mutacions i alteracions epigenètiques que confereixen avantatges proliferatius i de supervivència a les cèl·lules. D'aquesta manera els tumors acaben acumulant moltes alteracions en el seu material genètic, des de mutacions puntuals fins a grans aberracions cromosòmiques com aneuploïdies, passant per delecions, insercions, translocacions i canvis en la metilació i acetilació d'histones. Freqüentment, les mutacions dels tumors són somàtiques, és a dir, apareixen en el teixit tumoral però no en el teixit sa d'un mateix individu. Tot i així, en els tumors també hi ha una petita proporció de mutacions germinals, normalment lligades a síndromes que comporten una predisposició a patir càncer.

Tot i la diversitat dels tumors, hi ha convergència en trets bàsics característics, Hanahan i Weinberg l'any 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011) van sintetitzar tots els treballs de càncer per definir els trets identificatius del càncer, que són els següents: senyals proliferatives sostingudes, evasió de senyals supressores de creixement, resistència a mort cel·lular, immortalitat, inducció d'angiogènesi i capacitat d'invasió i metàstasi. Recentment també s'han afegit a aquests punts clau del càncer la reprogramació del metabolisme energètic, l'evasió a atacs del sistema immunològic i la capacitat de generar un microambient tumoral (figura 1).

1.1. SENYALS PROLIFERATIVES SOSTINGUDES

La proliferació de les cèl·lules tumorals no depèn dels estímuls de creixement extern, i per tant, no està limitada. Les estratègies de les cèl·lules per aconseguir aquest avantatge proliferatiu són la producció de lligands pels receptors de creixement (estimulació autocrina de

la proliferació), l'estímul de cèl·lules properes perquè produeixin més factors de creixement de l'habitual o la desregulació de les vies de resposta a factors de creixement (activant-les constitutivament). També poden inhibir la retroalimentació negativa que tenen de forma natural les vies d'estímul de la proliferació.

En una mateixa via podem trobar clars exemples d'aquesta desregulació: les mutacions activadores de la subunitat catalítica de la PI3K (gen *PIK3CA*, codifica per la proteïna p110 α), que es troben en diversos tumors, provoquen una activació constitutiva d'aquesta via independentment dels estímuls externs (Samuels et al., 2005); un altre exemple són les mutacions que inactiven la funció de *PTEN*, que constitueix un mecanisme per regular negativament la via, i que també es troben en molts tumors (Li et al., 1997).

1.2. EVASIÓ DE SENYALS SUPRESSORES DE CREIXEMENT

Les cèl·lules tumorals també han de sobrepassar els mecanismes per aturar la proliferació que tenen les cèl·lules sanes. L'alteració de l'activitat dels gens que orquestren aquests programes permetrà aquesta evasió. En són clars exemples els controladors del cicle cel·lular davant situacions anòmales com *TP53* (inactivat en un 50% dels càncers) o *RB*. El mecanisme d'inhibició per contacte en cèl·lules amb alta densitat o el procés de senescència també són mecanismes inhibidors de la proliferació que es veuen abolits en càncer (McClatchey and Yap, 2012).

1.3. RESISTÈNCIA A MORT CEL·LULAR

Quan parlem de mort cel·lular com a mecanisme inhibidor del procés oncogènic, hem d'incloure la mort cel·lular programada (apoptosi), l'autofàgia i la necrosi. La més coneguda és l'apoptosi, i pot ser evadida per les cèl·lules tumorals mitjançant l'increment de l'expressió de reguladors antiapoptòtics (com *BCL2*) o de senyals de supervivència, també amb la disminució de l'expressió de factors proapoptòtics (com *BAX* o *BIM*) o via l'eliminació de sensors de dany (com *P53*) (Lowe et al., 2004).

1.4. IMMORTALITAT

Les cèl·lules tumorals requereixen un potencial replicatiu il·limitat per generar els tumors. Aquest fet està totalment contraposat amb el que fan les cèl·lules del cos, la majoria de les quals poden fer un nombre limitat de divisions i després moren. La telomerasa té un paper molt important en el control d'aquest nombre màxim de divisions, doncs la mida dels telòmers es la que ho marcarà. S'ha descrit que l'activació de la telomerasa i el manteniment dels telòmers són requisits per la progressió de la majoria de tumors (Bernardes de Jesus and Blasco, 2013).

1.5. INDUCCIÓ D'ANGIOGÈNESI

Els tumors quan tenen més d'uns pocs mil·límetres de diàmetre ja pateixen hipòxia i privació de nutrients, per això necessiten produir vasos que els abasteixin. Els mecanismes naturals d'angiogènesi que es donen en el desenvolupament o en el tancament de ferides són explotats i induïts pels tumors, procés anomenat *angiogenic switch*.

S'ha vist que en els tumors hi ha dos orígens de neovascularització: *sprouting* o vasculogènesi. En el primer cas, les cèl·lules endotelials dels vasos es desuneixen de les seves veïnes i creixen seguint gradients de factors proangiogènics, proliferen i formen vasos. En la vasculogènesi, es creu que les cèl·lules tumorals imiten les cèl·lules de vasos. En tots dos casos sempre és en resposta a un microambient tumoral ple de factors de creixement i citocines produïts per les pròpies cèl·lules tumorals (Weis and Cheresh, 2011).

Aquest microambient està contínuament canviant i evoluciona amb el creixement del tumor, però bàsicament és la conseqüència de processos de remodelació de la matriu extracel·lular, hipòxia i inflamació. La matriu extracel·lular (ECM, *Extracellular Matrix*) es remodela per donar suport a l'angiogènesi i la degradació dels seus components per metal·loproteases de la matriu extracel·lular (MMP, *Matrix Metalloproteinases*) pot generar factors estimulants del procés, en aquest sentit les integrines també tenen un paper crucial en integrar les senyals provinents de la ECM. La hipòxia induïx l'expressió de HIF1 α i alhora la producció i secreció de VEGF, VEGFR, PDGF, FGF i angiopoietines, que estimulen el procés angiogènic (Liekens et al., 2001).

1.6. CAPACITAT D'INVASIÓ I METÀSTASI

La metàstasi resistent a quimioteràpia és la major causa de mort per càncer. Aquest tret diferencia els tumors benignes, que creixen encapsulats per una càpsula fibrosa i que no són invasius, dels malignes. La metàstasi implica una successió de canvis biològics en les cèl·lules tumorals: invasió local inicial, seguida d'intravasació en petits vasos sanguinis i limfàtics, les cèl·lules circulen pels vasos fins arribar al parènquima de teixits distants, on hauran d'extravasarse, i finalment instal·lar-se i créixer en els teixits externs (colonització). Tots els esglaons impliquen canvis en les molècules d'adhesió cel·lular i adhesió a la matriu extracel·lular, i també canvis que permetin envair, resistir l'apoptosi i disseminar. Moltíssimes molècules estan implicades en el procés i un dels programes més conegut és el de transició epiteli-mesènquima (EMT). Cal dir també que entre els passos d'infiltració en l'òrgan secundari i colonització del mateix pot haver-hi un període més o menys llarg de latència (Talmadge and Fidler, 2010).

En els tumors hi ha subpoblacions cel·lulars també pel que fa a la millor capacitat de metastatitzar. Moltes cèl·lules tumorals seran posades en circulació, però la majoria seran eliminades ràpidament. En escollir el teixit a colonitzar, la dinàmica del flux sanguini pot afectar, però també hi ha certes preferències segons el tipus tumoral, fet que suggereix l'existència d'interaccions moleculars específiques que afavoreixen la retenció. S'ha descrit l'expressió de molècules d'adhesió per part de les cèl·lules endotelials i dels receptors que els corresponen per part de les cèl·lules tumorals circulants (van Zijl et al., 2011), que poden aturar-se i intravasarse. A més, les estructures de les parets dels capil·lars també poden afectar

la infiltració, per exemple, els capil·lars del moll de l'ós són endotelis fenestrats que permeten fàcilment el pas de cèl·lules, mentre que els capil·lars del pulmó tenen una membrana basal rodejada per les cèl·lules alveolars, per sobrepassar aquesta barrera calen mecanismes actius (Nguyen et al., 2009). En l'arribada a un teixit nou, les cèl·lules tumorals es troben en un nou microambient, al qual s'han d'adaptar i per això despleguen diferents programes de colonització.

Així, finalment, el resultat del procés dependrà de les característiques de les cèl·lules tumorals i de l'òrgan receptor, fent encara prevalent la teoria del *seed and soil* formulada per Paget el 1889 (Paget, 1889).

1.7. REPROGRAMACIÓ DEL METABOLISME ENERGÈTIC

La taxa de creixement de les cèl·lules tumorals és extremadament elevada, per poder donar-hi resposta hi ha ajustos en el metabolisme. L'any 1930, Warburg va observar que les cèl·lules canceroses reprogramen el metabolisme de la glucosa i utilitzen majoritàriament la glicòlisi per produir ATP, en lloc de la fosforilació oxidativa mitocondrial (Elf and Chen, 2014). Aquest procés és molt menys eficient però dóna l'avantatge d'utilitzar els intermediaris per vies biosintètiques que afavoriran la formació de noves cèl·lules.

1.8. EVASIÓ A ATACS DEL SISTEMA IMMUNOLÒGIC

La implicació de la resposta immunitària en el procés oncogènic està bastament evidenciada. Els tumors creixen millor i més ràpid en ratolins immunodeficients, comparant-los amb els seus controls immunocompetents, cosa que explica els efectes protectors del sistema immunitari.

Inicialment, les cèl·lules tumorals poden ser eliminades per una resposta immunitària innata (per exemple, per cèl·lules *Natural Killer* (NK)). Després, durant la progressió del tumor, hi ha una resposta immunològica adaptativa per cèl·lules T específiques d'antigen. Simultàniament, es produeixen variants de cèl·lules tumorals que perden els complexos majors d'histocompatibilitat i els antígens. I es generen factors solubles derivats de tumors que faciliten la fugida de l'atac immunològic, tots aquests mecanismes permeten la progressió tumoral (Kim et al., 2007).

També s'ha vist que les mateixes cèl·lules, creixent en ratolins immunocompetents o immunodeficients, són molt més eficients en iniciar tumors nous en altres animals si han crescut en els ratolins immunocompetents. Aquesta observació fa palès que les cèl·lules adquireixen capacitats per evitar la detecció o els efectes del sistema immunològic. Els mecanismes pels quals les cèl·lules tumorals sobrepassen el sistema de defensa es poden dividir en inducció de tolerància o resistència als atacs del sistema immunològic, revisats per Drake i col·laboradors (Drake et al., 2006). Un exemple d'aquests mecanismes és la generació de respostes inflamatòries cròniques, per citar-ne alguns: en cèl·lules tumorals hi ha un increment de la producció de TGF β , que és immunosupressor; o també hi ha un increment de

STAT3, que estimula la producció de IL10, i aquest inhibeix l'activitat de les cèl·lules NK sobre els tumors.

1.9. MICROAMBIENT TUMORAL

En contra del concepte simplista que defineix un tumor com un conjunt de cèl·lules relativament homogènies amb alta proliferació i capacitat metastàtica, recentment s'està descobrint que les cèl·lules pròpiament tumorals interaccionen de manera molt activa i recíproca amb les cèl·lules que les envolten. En un tumor podem trobar els tipus cel·lulars següents:

- Cèl·lules tumorals i cèl·lules mare tumorals (CSC, de *Cancer Stem Cells*): són les que contenen pròpiament les mutacions en oncogens i gens supressors tumorals. Formen una població heterogènia sotmesa a un procés de selecció darwiniana.
- Cèl·lules endotelials i perícits: són les cèl·lules que formen la vasculatura.
- Cèl·lules inflamatòries del sistema immunològic: són cèl·lules que donen suport al tumor mitjançant la producció de senyals proangiogèniques i proinvasives.
- Fibroblasts càncer associats.

Entre tots aquests tipus cel·lulars es forma una xarxa complexa i crítica per la progressió tumoral, amb interaccions recíproques i evolució constant.

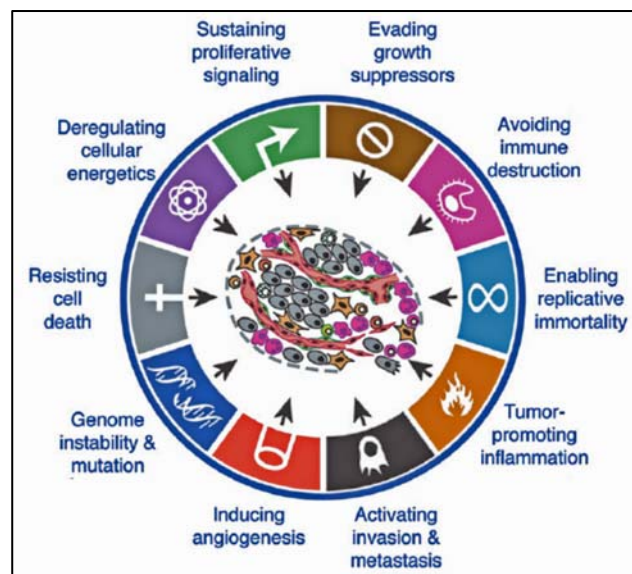


Figura 1. Hallmarks of càncer. Modificada de Hanahan and Weinberg, 2011.

2. POLARITAT I CÀNCER

Tenint en compte els resultats que es presenten en aquest treball de tesi doctoral, resulta convenient entrar en detall en el paper que juga la polaritat en el desenvolupament del càncer.

2.1. COMPLEXES QUE INTERVENEN EN LA POLARITAT

Es defineix com a polaritat cel·lular la distribució asimètrica de proteïnes i lípids a la membrana i al citoplasma, per tal de regular l'estructura cel·lular i la transducció de senyals. La polaritat permet l'organització cel·lular i tissular i és crucial per la regulació de les unions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu i pels processos de morfogènesi, controlant les divisions asimètriques. Processos com la migració transendotelial, les respostes a antígens i citocines, la formació d'axons i dendrites en neurones o el tancament de ferides requereixen polarització.

Es pot dir que hi ha quatre tipus diferents de polaritat (Huang and Muthuswamy, 2010):

- Polaritat apicobasal.
- Polaritat planar: és la capacitat que tenen les cèl·lules d'orientar-se.
- Polaritat dorso-frontal: utilitzada majoritàriament en la migració.
- Polaritat de la divisió cel·lular asimètrica.

La polaritat la defineixen 3 complexos: el CRUMBS, el PAR i l'SCRIBBLE. La seva localització i els seus components es resumeixen en la taula següent:

COMPLEX	LOCALITZACIÓ	COMPONENTS
CRUMBS	Apicobasal	CRB, PALS1, PATJ/MUPP1
PAR	Apicobasal	PAR3, PAR6, aPKC
SCRIBBLE	Basolateral	LGL, SCRIB, DLG

Taula 1. Els complexos de polaritat.

El complex CRUMBS pertany a la zona apicobasal de les cèl·lules i consta d'una proteïna transmembrana, CRB, i de dos proteïnes bastida citoplasmàtiques, PALS1 i PATJ/MUPP1. CRB està codificada per tres gens: *CRB1*, *CRB2* i *CRB3*. Cadascuna es troba en un teixit diferent, es pot dir que tenen especificitat funcional de teixit. En la seva part extracel·lular té dominis laminina i dominis EGF-like (*CRB1* i *CRB2*) i en les seves cues citoplasmàtiques destaca el domini FERM, que constitueix un adaptador entre proteïnes transmembrana i proteïnes del citoesquelet d'actina. CRB contribueix en l'estabilització de les unions apicals. PALS1 és una proteïna adaptadora que possibilita les interaccions entre PATJ1 i CRB, pertany a la família de proteïnes MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) i està implicada en les unions estretes i la localització d'E-cadherina. El gen *PATJ* s'expressa majoritàriament en teixits epitelials i la proteïna PATJ1 localitza a les unions estretes, interacciona amb PALS1, amb ZO3 i amb Claudina1, està implicada en l'estabilització de les unions estretes i en regular la localització dels altres membres del complex. MUPP1 té força homologia amb PATJ1 i també s'uneix a PALS1, però és una proteïna menys estudiada.

El complex PAR està compost per dues proteïnes bastida, PAR3 i PAR6, i per una quinasa, aPKC. La proteïna PAR6 està codificada per 3 gens: *PAR6C* o *PAR6A*, *PAR6B* i *PAR6G*. *PAR6G* s'expressa per tots els teixits, mentre que la resta no, *PAR6G* col·localitza amb marcadors d'unions estretes, *PAR6C* es present al citosol i a les unions estretes i *PAR6B* és al citosol. La funció d'aquesta proteïna, que no té activitat enzimàtica, és mantenir unides altres proteïnes i situar-les als llocs correctes, en aquest cas, permet la interacció entre aPKC i PAR3, entre altres. Per la proteïna PAR3 que també tenen funció estructural, similar a PAR6, s'han identificat dos gens: *PARD3* (10p11) i *PARD3B* (2q33). *PARD3* s'expressa en tots els teixits, mentre que *PARD3B* està limitat a ronyó, pulmó i múscul esquelètic. És per això i perquè a *PARD3B* no se li ha trobat capacitat d'unió a aPKC, que dels dos gens que codifiquen per PAR3 el més estudiat en cèl·lules epitelials i que s'ha vist implicat en la formació de les unions estretes és *PARD3*. aPKC és la quinasa del complex, l'únic membre que mostra activitat catalítica, codificada pels gens *PRKCι* i *PRKCξ*; constitueixen un grup de proteïnes quinasa C (PKC) que no s'activen per calci, diacilglicerols i fosfolípids (com les PKC clàssiques) i tampoc per diacilglicerols únicament (noves PKC), per això s'anomenen les PKC atípiques. A aPKC se li coneixen diverses proteïnes diana, les més populars són LGL i PAR3.

Finalment, el complex SCRIBBLE, a diferència dels anteriors, es localitza a la part basolateral. Aquest complex està compost per SCRIB, DLG i LGL. SCRIB és una proteïna citoplasmàtica que s'uneix a ZO2 i que està relacionada amb les unions adherents. La família de les proteïnes DLG, codificades per 5 gens diferents (*DLG1-5*), mostren les característiques típiques de les proteïnes MAGUK. S'uneixen a metal·loproteases, a APC, a PTEN i també a PI3K i una de les seves funcions és mantenir el citoesquelet d'actina. La proteïna LGL està codificada per dos gens: *LGL1* i *LGL2*, que es reparteixen l'expressió en diferents òrgans. Per la seva localització basolateral, LGL ha de fosforilar-se per aPKC, i això produeix canvis en el complex PAR, per tant està involucrat en el manteniment correcte de la localització dels altres complexos.

Els diferents complexos interaccionen i es coordinen de manera espaciotemporal per formar un epiteli completament funcional. A més, també estan enllaçats amb la senyalització de les GTPases petites de la família RHO i amb altres proteïnes del citoesquelet. Alguns exemples d'aquestes interaccions (figura 2) són:

- CRUMBS-PAR: LGL1 i LGL2 competeixen amb PAR3 per unir-se a aPKC. aPKC fosforila LGL, i això fa que aquest últim es separi del dímer PAR3-PAR6 i es localitzi a la zona basolateral amb les altres subunitats del complex SCRIBBLE (Plant et al., 2003). També permet la formació del complex PAR actiu: PAR3-PAR6-aPKC.
- CRUMBS-PAR: Crumbs competeix amb Par3 per la unió a Par6 en un model de *Drosophila* (Morais-de-Sá et al., 2010). A més, també s'ha observat que Par6 pot interaccionar amb Pals1 (Hurd et al., 2003).
- PAR3 s'uneix i afecta l'activitat de TIAM1 (Chen and Macara, 2005).
- RAC i CDC42 activen aPKC via unió a PAR6 (Lin et al., 2000). Això passa perquè PAR6 deixa lliure aPKC i elimina la inhibició que hi exercia.
- ROCK pot suprimir l'activitat del complex PAR fosforilant PAR3 (Nakayama et al., 2008).

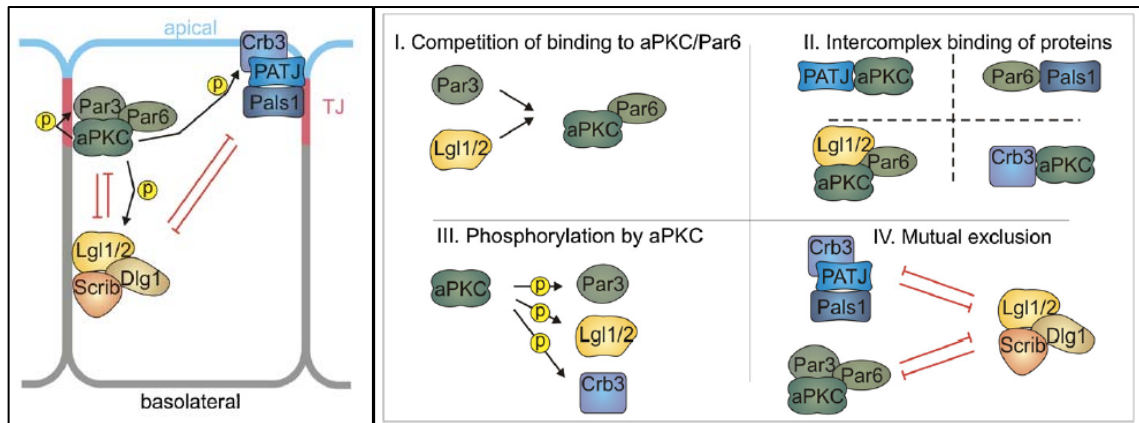


Figura 2. Interaccions entre els complexos de polaritat. Modificada de Ellenbroek et al., 2012.

2.2. UNIONS COM A COMPONENTS DE POLARITAT

Els diversos tipus d'unions entre les cèl·lules (unions adherents, unions estretes, unions GAP i desmosomes) també formen part de la polaritat cel·lular. Doncs en les cèl·lules polaritzades, els complexos juncionals estan localitzats asimètricament: les unions estretes estan localitzades a la bora apicobasal i les unions adherents estan localitzades una mica més basalment que les estretes; així, les membranes apical i basolateral estan separades. Aquestes unions estan formades per proteïnes transmembrana que permeten que les senyals extracel·lulars arribin a les proteïnes del citoesquelet (figura 3).

UNIONS ADHERENTS (AJ, *Adherens Junctions*):

Aquestes unions mantenen unides les membranes cel·lulars de cèl·lules veïnes. Les conformen dos complexos clàssics, nectina-afadina i catenina-cadherina. L'expressió específica d'aquestes proteïnes determinarà la força i l'adhesió de les unions. Les AJ estan relacionades amb el citoesquelet d'actina a través de les catenines, cadherines i afadina, proteïnes que poden unir-se directament a actina. Les proteïnes Arp2-3, que regulen l'activitat de l'actina, també s'uneixen a cadherines i això és important per la formació de lamel·lopodis i fil·lopodis (Niessen, 2007). A més, les cadherines i nectines poden regular l'activitat de GTPases petites de la família RHO, alhora aquestes GTPases regulen la contractilitat de l'actomiosina, que al seu torn tornarà a regular l'estabilitat de les AJ (Braga and Yap, 2005).

UNIONS ESTRETES (TJ, *Tight Junctions*):

Aquest tipus d'unions formen una barrera intercel·lular. Clouen l'espai extracel·lular, i això permet la separació dels fluids dels compartiments basolateral i apical, generant gradients químics i elèctrics. Formen una barrera de difusió entre cèl·lules, un punt de fusió selectiu entre membranes adjacents, pel que transdueixen senyals. Les proteïnes de les TJ actuen també com a proteïnes d'adhesió cèl·lula-cèl·lula i constitueixen un impediment per la migració cel·lular (Martin and Jiang, 2009). Podem separar la seva estructura en tres regions:

- Proteïnes transmembrana: occludines, claudines i molècules d'adhesió juncional (JAM), entre altres. Cal destacar que les claudines són les proteïnes que marquen l'especificitat de la barrera i que les JAM també es troben en cèl·lules que no tenen

- unions (com en leucòcits), contribuint en la seva migració transendotelial (Ebnet, 2004).
- Proteïnes ancorades que formen la placa (sovint contenen motius PDZ): *Zonula occludens* (ZO1-3) i MAGI-1, entre altres. Aquestes proteïnes són necessàries perquè no s'han descrit interaccions directes entre les proteïnes transmembrana anteriors; és el cas de les ZO que poden interaccionar amb les claudines i ocludines i també amb l'actina, vinculant així les TJ al citoesquelet (Schneeberger and Lynch, 2004).
- Proteïnes associades o reguladores: catenina, cingulines, etc. Són destacables perquè tenen la capacitat d'interaccionar amb moltes altres proteïnes, com miosines i actines (Niessen, 2007).

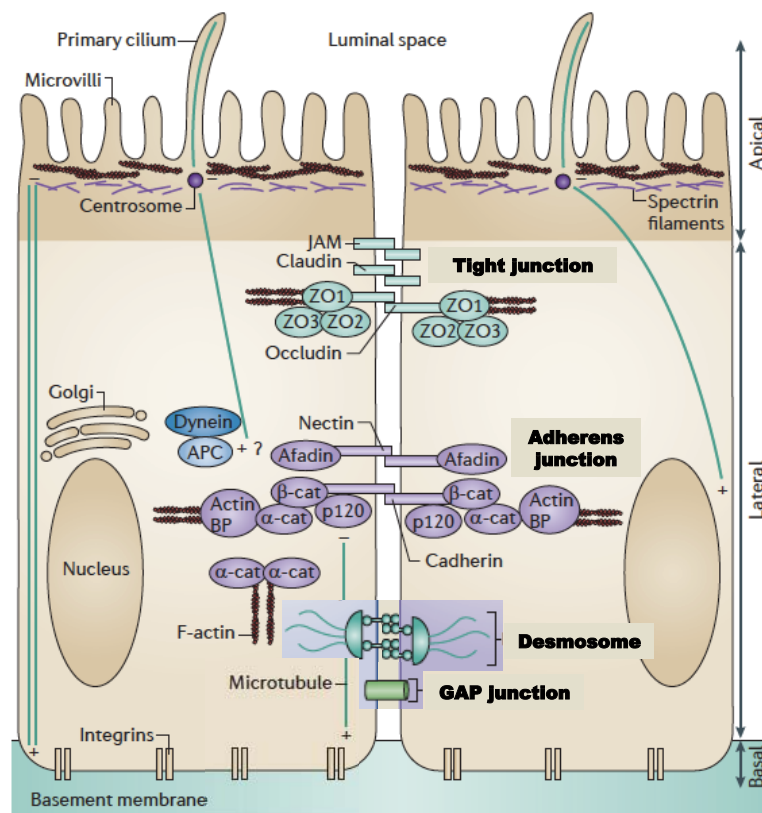


Figura 3. Esquema que mostra la localització cel·lular dels complexos juncionals i les seves interaccions amb els components del citoesquelet. Modificada de Lamouille et al., 2014 i Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012.

UNIONS GAP:

Són agregats de canals intercel·lulars que permeten la transferència directa de ions i petites molècules entre cèl·lules. Els canals estan formats per hexàmers de connexines, que són proteïnes integrals de membrana que constitueixen una família de 21 gens. Els canals poden ser homomèrics o heteromèrics i és aquesta variabilitat, la mescla de diferents connexines, que determina la permeabilitat de diferents molècules (Goodenough and Paul, 2009).

DESMOSOMES (O *MACULA ADHERENS*):

Són unions intercel·lulars crucials per teixits amb estrès mecànic i dependents de calci. Uneixen els filaments intermedis a la membrana plasmàtica. Estan formats per les desmogleïnes i desmocolines, glicoproteïnes transmembrana de la família de les cadherines que s'uneixen a membres de la família Armadillo (intracel·lular) i que medien l'adhesió (extracel·lular) dels desmosomes entre sí, entre els de altres cèl·lules. Són les proteïnes Armadillo les que permeten la interacció de les cadherines amb els filaments intermedis i també la transducció de senyals (Delva et al., 2009).

2.3. AFECTACIÓ DE LA POLARITAT EN CÀNCER

Un 90% de tots els càncers són carcinomes, és a dir, càncers d'origen epitelial. La pèrdua de la polaritat cel·lular resulta en defectes en la morfogènesi i pot iniciar processos tumorogènics en models animals (Xue et al., 2013). De fet, està àmpliament assumit que la pèrdua de polaritat és un punt clau en el procés tumorogènic, sobretot en els processos invasius, on cal desunir les cèl·lules tumorals de les seves veïnes i de la matriu extracel·lular, canviar el fenotip epitelial cap a mesenquimal i activar proteïnes del citoesquelet que en permetran la mobilitat.

ELS GENS DE POLARITAT S'ALTEREN EN TUMORS

L'evidència inicial de la implicació dels gens de polaritat en càncer prové d'observacions fetes en *Drosophila*, on s'ha vist que la pèrdua de *lgl*, *dlg* i *scrib* indueix transformació i un creixement anormal dels discos imaginals (Bilder, 2004). Això està en acord amb el que passa en humans, on l'expressió de moltes proteïnes de polaritat està alterada en càncer. Per exemple, el cas de SCRIBBLE, la pèrdua del qual s'ha relacionat amb un increment en el creixement tumoral, s'ha descrit que està regulat a la baixa en càncers epitelials (Gardiol et al., 2006), però també sobreexpressat en altres (Nakagawa et al., 2004). Això s'explica per les moltes interaccions que hi ha entre els complexos de polaritat, que fan que una desregulació de l'equilibri en l'expressió de diferents proteïnes pugui acabar tenint el mateix efecte tumorogènic. També és molt interessant destacar que són proteïnes amb funcions vinculades molt estretament a la seva localització, per tant no només la pèrdua o guany d'expressió pot estar afectant les seves competències, sinó que els canvis en la localització també poden alterar-les.

En la taula següent, obtinguda fent un compendi de les revisions de Huang i Ellenbroek (Ellenbroek et al., 2012; Huang and Muthuswamy, 2010), es resumeixen els treballs que descriuen alteracions en els gens/proteïnes de polaritat durant el procés tumoral. No s'inclouen els articles, que tot i ser proves de concepte de la implicació d'aquestes proteïnes en el tumor i il·lustrar la seva funció oncogènica, no són observacions fetes en tumors primaris o línies cel·lulars humanes:

GEN	TIPUS TUMORAL	ONCOGEN/ SUPPRESSOR TUMORAL	ALTERACIÓ	REFERÈNCIA
PRKCl/λ	Pulmó (NSCLC)	Oncogen	Sobreexpressió Amplificació	(Regala et al., 2005)
	Ovari	Oncogen	Sobreexpressió Amplificació	(Eder et al., 2005)
	Mama	Oncogen	Sobreexpressió	(Kojima et al., 2008)
PRKCζ	Hepatocel·lular	Oncogen	Sobreexpressió	(Tsai et al., 2000)
	Bufeta	Oncogen	Sobreexpressió	(Langzam et al., 2001)
	Cap i coll (SCCHN)	Oncogen	Hiperactivació	(Cohen et al., 2006)
PARD3	Esòfag (ESCC)	Supressor tumoral	Deleció	(Zen et al., 2009)
	Pròstata	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Kunnev et al., 2009)
	Glioblastoma, cap i coll (SCCHN), esòfag (ESCC), pulmó	Supressor tumoral	Deleció	(Rothenberg et al., 2010)
	Mama	Supressor tumoral	Baixa expressió	(McCaffrey et al., 2012)
PARD6B	Mama	Oncogen	Sobreexpressió Amplificació	(Nolan et al., 2008)
PARD6G	Pulmó, adrenal	?	Deleció	(Rothenberg et al., 2010)
SCRIB	Cèrvix	Oncogen	Sobreexpressió	(Nakagawa et al., 2004)
	Còlon	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Gardiol et al., 2006)
	Endometri	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Ouyang et al., 2010)
	Pròstata	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Pearson et al., 2011)
DLG(1-5)	Cèrvix	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Cavatorta et al., 2004)
	Còlon, ronyó	Supressor tumoral	Mala localització	
DLG2	Còlon	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Gardiol et al., 2006)
	Pulmó, cèrvix	?	Deleció	(Rothenberg et al., 2010)
LGL1	Melanoma	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Kuphal et al., 2006)
	Mama, pulmó, ovari, pròstata i melanoma.	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Grifoni et al., 2004)
LGL2	Colorectal	Supressor tumoral	Baixa expressió	(Schimanski et al., 2005)
	Gàstric	Supressor tumoral	Baixa expressió Mala localització	(Lisovsky et al., 2009)

Taula 2. Els gens de polaritat s'alteren en càncer. Resum dels treballs que descriuen alteracions en gens i proteïnes dels complexos de polaritat en càncer. S'inclouen només observacions fetes en tumors primaris o línies cel·lulars.

PÈRDUA DE LES UNIONS

La pèrdua de les unions entre cèl·lules és necessària per permetre la invasió. Filtracions en les TJ permeten que factors de creixement vagin cap a compartiments extracel·lulars que no els corresponen, i són aquests factors els que alhora promouen la invasió. És el cas de HGF (*hepatocyte growth factor*), que inhibeix la funció de les TJ (baixa la resistència transepitelial) disminuint els nivells de la proteïna ZO1. Donant suport a la necessitat de la pèrdua d'unions, s'ha descrit que els vasos de tumors són molt més permeables que els vasos de teixits sans o que les TJ de tumors de colon són molt més permeables que les dels colons sans (revisat per Martin & Jiang 2009).

AFECTACIÓ EN L'ORIENTACIÓ DEL FUS MITÒTIC

Després del desenvolupament hi ha epitelis que segueixen proliferant i renovant-se contínuament, amb cèl·lules progenitores capaces de donar lloc a tots els tipus cel·lulars que formen l'epiteli estratificat, un dels paradigmes és l'epiteli intestinal. Quan hi ha un tumor, les cèl·lules que estaven formant diferents capes funcionals ordenadament, ara ho fan en forma de pòlips desorganitzats. Hi ha diversos mecanismes que ho expliquen: la pèrdua de les unions intercel·lulars, la pèrdua de les unions a la membrana basal o la mala orientació del fus mitòtic.

Les maquinàries que controlen la divisió i la polaritat estan relacionades. Aquesta relació s'ha descrit molt bé en les divisions asimètriques dels neuroblasts de *Drosophila*, on els determinants de destí cel·lular que es distribueixen asimètricament i les seves relacions es coneixen, el complex PAR és un d'aquests determinants. En concret, les proteïnes de complexos de polaritat lgl, par6, apkc i baz hi estan implicades; formen part d'un seguit d'interaccions que donen lloc al moviment dels microtúbuls astrals i a l'orientació del fus mitòtic (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012).

En mamífers, de forma resumida, el cor de la maquinària de divisions cel·lulars orientades el formen dos complexos: el complex PAR i el complex d'orientació del fus. Els fusos mitòtics s'orienten per l'anclatge dels microtúbuls astrals al còrtex cel·lular, i en les cèl·lules epitelials, aPKC prevé l'orientació vertical del fus. CDC42 recluta PAR6-aPKC al còrtex apical i activa aPKC, que prevé la unió entre LGN i Gai excloent LGN de la regió. Després, LGN localitza apicalment amb Gai i NuMA. L'activitat de NuMA (proteïna unida als microtúbuls) juntament amb el complex de proteïnes motores dineïna-proteïnes activadores de dineïna exerceixen forces als microtúbuls astrals i aquests reorienten el fus mitòtic a la polaritat necessària per la divisió (Williams and Fuchs, 2013).

En *Drosophila*, quan els determinants del destí cel·lular estan deletats o mutats, el neuroblast es divideix asimètricament, donant lloc a sobrecreixement del teixit (Januschke and Gonzalez, 2008). En mamífers, sembla que hi ha més redundància en la regulació de la divisió, però alteracions en els nivells d'aquestes proteïnes, tot i no alterar la proliferació directament, pertorben l'orientació de les divisions i la diferenciació epitelial.

NEXES ENTRE POLARITAT I GENS ALTERATS EN CÀNCER

La senyalització de vies importants en càncer coordina la desregulació de la polaritat amb la de la proliferació, possiblement perquè una no pot sostenir-se sense l'altra. En els teixits, el manteniment correcte de la polaritat a nivell cel·lular i tissular és un mecanisme de control de la proliferació. En el cas dels tumors, formats per cèl·lules amb taxes de proliferació molt altes, també cal impossibilitar l'acció d'aquest mecanisme. La interacció de vies afectades en càncer i polaritat ens la mostren els exemples següents:

- ERBB2: alteracions en la senyalització d'aquest receptor afecten la proliferació a través de RAS i PI3K, però també alteren la polaritat. L'activació d'ERBB2 fa que ERBB2 s'uneixi a PAR6 i aPKC però no a PAR3. Aquesta interacció està relacionada amb la pèrdua de l'estructura apicobasal, doncs proteïnes com ZO1 es deslocalitzen, i també amb la inhibició de l'apoptosi. Tot i que aquesta interacció d'ERBB2 no afecta la seva capacitat d'estimular

- la proliferació, si que inhibeix l'efecte proapoptòtic produït per la polarització cel·lular (Aranda et al., 2006).
- PTEN: PTEN és un ben conegut supressor tumoral que té la funció de mantenir els nivells de fosfatidilinositols bifosfats (PtdIns(4,5)P₂), evitant així que hi ha hagi un excés de senyalització cap a vies proliferatives a través dels fosfatidilinositols trifosfats (PtdIns(3,4,5)P₃). S'ha vist que durant la morfogènesi epitelial, la funció de PTEN és clau per mantenir els PtdIns(4,5)P₂ a la zona apical de la cèl·lula, perquè a ells s'unirà l'Annexina-2, que reclutarà CDC42 a la membrana apical, permetent que CDC42 s'uneixi a aPKC. Així, sense PTEN, la localització de les proteïnes de polaritat a la zona que els correspon es veurà afectada (Martin-Belmonte et al., 2007).
 - LKB1: és una proteïna tirosina quinasa supressora tumoral, però també és l'homòleg de la proteïna de polaritat Par4 en *Drosophila* i *C.elegans*. LKB1 és una *master* quinasa i entre les seves múltiples dianes hi ha AMPK (*AMP-activated protein kinase*) o PAR1 (*MARK1-4, microtubule affinity-regulating kinase 1-4*). S'ha descrit que AMPK està més actiu en el procés de formació de les unions estretes, que la seva activació en aquest context es deguda a LKB1, i que és necessari per la formació correcta d'aquestes unions (Zhang et al., 2006). AMPK fosforila directament la proteïna del citoesquelet MRLC (*myosin regulatory light chain*), que regula l'activitat de la cadena lleugera de la miosina (Lee et al., 2007). A més també s'han descrit interaccions entre LKB1 i CDC42, implicant la primera en la correcta localització i activació de la segona (Zhang et al., 2008).
 - La via Hippo: aquesta via es va descriure en *Drosophila* i regula la mida dels òrgans. Igl, apkc i crb regulen la correcta localització dels components de Hippo i si s'alteren hi ha sobrecreixement (Parsons et al., 2010). En mamífers, el cor d'aquesta via està format per dos quinases, MST i LATS, i dos factors de transcripció, YAP i TAZ, regulats per les primeres i que activaran gens de proliferació. MST i LAST responen a senyals de receptors de membrana i d'unions cel·lulars, com Crumbs, α i β -catenines o ZO-2; aquesta és una de les maneres de regular la inhibició per contacte (Low et al., 2014).
 - RHO GTPases: les RHO GTPases estan alterades en càncer. Factors del microambient tumoral poden activar-les i tenen múltiples rols en l'oncogènesi, estan implicades en la progressió del cicle cel·lular, la invasió, la motilitat i el tràfic vesicular. Com ja s'ha comentat anteriorment, els complexos de polaritat tenen una relació molt estreta amb les RHO GTPases, per exemple: al complex PAR sol incloure's la proteïna RHO CDC42 com a component, PAR3 regula l'activació de RAC1 a través del factor intercanviador de guanina (GEF, *Guanine Exchange Factor*) TIAM1 (Chen and Macara, 2005), s'ha proposat que ROCK regula el manteniment del complex PAR via fosforilació de PAR3 (Nakayama et al., 2008) i que alhora aquest complex regula la fosforilació de ROCK (Ishiuchi and Takeichi, 2011). Les RHO GTPases tenen modificacions lipídiques que les dirigeixen a la membrana cel·lular i poden trobar-se unides a GTP o a GDP, quan estan unides a GTP s'uneixen a altres proteïnes efectores i en modulen la seva activitat. Algunes de les proteïnes efectores són ROCK, MLK2, PAK o PAR6 i regulen funcions de contractilitat de miosines, organització de l'esquelet d'actina, endocitosis, etc. (Sahai and Marshall, 2002).
 - La via de les MAPK: els efectors canònics de la via de la senyalització de les MAPK sota RAS són: MEK/ERK, JNK i p38. En *Drosophila*, les mutacions en *scrib* activen jnk que causa apoptosi; però quan l'alteració a *scrib* s'acompanya d'alteracions en *ras*, l'activació de les dos vies afavoreix el creixement (Uhlirova et al., 2005). En cèl·lules d'epitelis humans amb

alteracions en RAS, s'ha observat que la inactivació de SCRIB incrementa l'activació d'ERK i això afavoreix la invasió (Dow et al., 2008).

- TGF β : L'activació de la senyalització per aquest factor de creixement fosforila PAR6, que interacciona amb la lligasa de ubiquitines, SMURF1. SMURF1 envia RHOA a degradació, i com que RHOA ajuda al manteniment de les unions intercel·lulars, aquestes es veuen perjudicades (Ozdamar et al., 2005).
- Gens implicats en el procés de la transició epiteli-mesènquima (EMT): els trets característics del procés de EMT són la dissolució de les unions, la pèrdua de la polaritat apicobasal i guany de polaritat dorsofrontal, la reorganització del citoesquelet amb canvis de la forma de la cèl·lula, l'increment de protrusions cel·lulars i mobilitat i, en alguns casos, l'adquisició de l'habilitat de degradar la matriu extracel·lular i de resistir processos de senescència i apoptosi.

El procés de EMT requereix transformació de la polaritat, tant a nivell de regulació a la baixa de tot tipus d'unions com de canvis en el citoesquelet. Pel que fa a les unions, hi ha disminució dels nivells de claudines, ocludines i ZO-1 (disrupció de TJ), degradació d'E-cadherina (disrupció d'AJ), regulació a la baixa dels nivells de connexina (disrupció d'unions GAP) i disrupció dels desmosomes. En segon lloc, els canvis en el citoesquelet aconseguen migració direccional i bàsicament són mediat per RAC1, CDC42 i RHOA. Resumint, es podria dir que RAC1 i CDC42 es localitzen al front i s'encarreguen de la formació de lamelopodis i fil·lopodis mitjançant l'activació de PAK-1 i la polimerització d'actina. A més, al front de migració també s'hi localitzen els complexos de polaritat. RHOA s'encarrega d'incrementar la contracció d'actomiosina (via ROCK i MLC) i també es localitza a la zona dorsal per fomentar la retracció cel·lular i trencar les unions (Lamouille et al., 2014).

LA POLARITAT TISSULAR COM A MECANISME DE SUPRESSIÓ TUMORAL

Una de les funcions més importants de la polaritat cel·lular és integrar cèl·lules individuals en un teixit. La localització i funcionalitat de les unions determinen la configuració correcta de l'estructura tridimensional, la qual juga un paper clau en regular la proliferació, supervivència i apoptosi de les cèl·lules epitelials individuals.

És molt rar que cèl·lules amb algunes alteracions genètiques puguin convertir un teixit sencer en un tumor, suggerint que és molt més fàcil malignitzar-les si creixen com a cèl·lules independents en una placa de cultiu. Exemples com el dels embrions de pollastre infectats amb el virus v-Src, que no mostraven un fenotip tumoral a diferència de les seves mateixes cèl·lules disgregades i creixent en una placa (Dolberg and Bissell, 1984), evidencien que les estructures tissulars tenen alguna cosa a veure amb la inhibició de la malignitat. Lee i col·laboradors proposen un model de mecanisme de supressió tumoral (mediat per la polaritat en estructures tridimensionals) en el que es poden donar quatre escenaris (figura 4) (Lee & Vasioukhin 2008): homeòstasi tissular normal; normalitat forçada, quan una cèl·lula esdevé tumoral les seves veïnes poden forçar una polaritat normal a través de les unions intercel·lulars i atenuar el fenotip maligne; i expulsió, si la situació anterior no pot donar-se perquè la cèl·lula maligna és incapaç de formar unions intercel·lulars, les unions actuaran com a sensors extracel·lulars i les cèl·lules veïnes activaran un mecanisme mediat per contraccions

d'actina-miosina, que eliminarà la cèl·lula maligna. Finalment, si cap dels mecanismes anteriors és possible, la cèl·lula maligna progressarà dins el teixit i formarà un tumor.

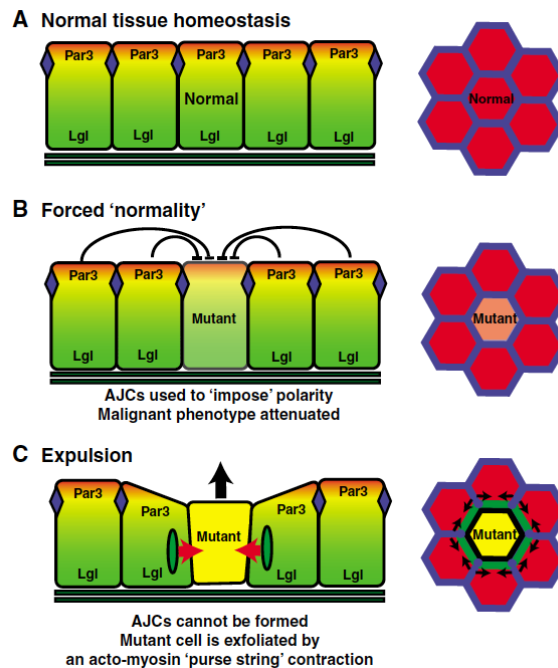


Figura 4. La polaritat tissular com a mecanisme de supressió tumoral. A, homeòstasi normal en un teixit. B, apareix una mutació en una de les cèl·lules del teixit i els complexos junctivals i la polaritat del teixit impedeixen que aquesta cèl·lula prolifere de manera aberrant. C, es dona la mateixa situació que en B però en aquest cas les cèl·lules veïnes no poden formar-hi unions i activen mecanismes per expulsar la cèl·lula anòmla. Obtinguda de Lee and Vasioukhin, 2008.

3. CÀNCER DE PULMÓ

El càncer de pulmó és un tumor maligne que sorgeix a l'epiteli respiratori. Per definició, els tumors provinents de cèl·lules no epitelials (sarcomes i limfomes) o del mesoteli (mesotelioma) del pulmó n'estan exclosos.

3.1. EPIDEMIOLOGIA

INCIDÈNCIA

El càncer de pulmó va ser la causa més freqüent de mort per càncer a Europa el 2012 (Ferlay et al., 2013). L'any 2008, i a nivell mundial, va ser el tipus tumoral més diagnosticat i més mortífer en homes; mentre que en dones, va ser el quart més diagnosticat i el segon causant de morts per càncer. Globalment, l'any 2008, va representar el 13% (1,6 milions de persones) respecte el total de casos de càncer diagnosticats i el 18% de les morts per càncer (1,4 milions de persones) (Jemal et al., 2011).

Hi ha variacions pel que fa a la incidència del càncer de pulmó entre els diferents països i entre sexes. Aquestes observacions s'expliquen, en bona part, per la distribució del tabaquisme. Així,

en països plenament desenvolupats, la incidència de càncer de pulmó està disminuint en els homes, fet que contrasta amb el que passa en països de l'Àsia o Àfrica, on la incidència de càncer de pulmó incrementa degut a que l'hàbit del tabac s'ha generalitzat més tard (Jemal et al., 2011).

A Espanya l'any 2012, el càncer de pulmó va ser el més diagnosticat en homes i el tercer en dones, representant un 13% del total de casos de càncer. Se'n van diagnosticar 24.500 nous casos l'any 2012, sent la relació home:dona de 4:1. Aquestes dades representen un lleuger increment en la incidència total respecte l'any 2006, amb 23.200 nous casos, i també un increment en l'afectació de càncer de pulmó en dones, ja que la relació home:dona de l'any 2006 era de 7:1 (Sánchez et al., 2010).

CAUSES AMBIENTALS: EL TABAC

El càncer de pulmó és un dels càncers més prevenibles, ja que aproximadament un 75-85% dels casos són deguts al tabac. De fet, si es considerés el càncer de pulmó dels no fumadors com una malaltia independent al dels fumadors, passaria del primer al setè tipus de tumor més mortífer (Sun et al., 2007).

El tabaquisme s'ha relacionat amb alteracions en la funció reproductiva, amb una major incidència de malalties cardiovasculars i respiratòries i també amb diversos tipus de càncer, tals com pulmó, bufeta, laringe, esòfag, ronyó, boca, pàncrees i estómac.

El fum del tabac és una mescla molt complexa, conté més de 4000 compostos, 250 dels quals són tòxics i, com a mínim, 50 són carcinògens. A més hi ha agents irritants, inflamatoris i cocarcinògens. La figura 5 mostra un resum dels passos pels quals el tabac acaba generant càncer de pulmó. Els carcinògens més potents que es troben en el fum del tabac són els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH) i les nitrosamines com el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK) i l'N-nitrosornicotina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNN) (Hecht and Hoffmann, 1988; Zaridze et al., 1991). Els PAH són productes de la piròlisi incompleta de les fulles del tabac i les nitrosamines són els metabòlits de la nicotina. En els dos casos es requereix activitat enzimàtica per convertir-los en intermediaris amb capacitat d'unir-se al DNA, aquest procés s'anomena activació metabòlica, i en realitat es dona accidentalment com a conseqüència del procés de detoxificació. La necessitat d'activació metabòlica s'ha demostrat de forma molt elegant en ratolins sense l'enzim NADPH-P450 reductasa exposats a NNK, aquests animals presentaven molta menys activació de NNK i molts menys tumors que els seus companys amb l'enzim actiu (Weng et al., 2007).

Els carcinògens del tabac seran eliminats per l'organisme mitjançant l'activitat dels enzims de la família de citocrom P450, que els hi afegiran àtoms d'oxigen, i de les sulforonil/glucoronil/glutatio transferases, per fer-los més hidrosolubles i excretables. Inicialment, aquest procés és protector, però pot generar productes intermediaris amb capacitat d'unir-se al DNA i formar-hi adductes covalentment units. Els adductes es generen per tres mecanismes: metilació, dany oxidatiu o addició d'adductes gegants. La cèl·lula té mecanismes de reparació del DNA per eliminar aquests adductes, però si aquests mecanismes fallen, la cèl·lula els introduirà al genoma i hi haurà alteracions en la seqüència (Memisoglu and Samson, 2000). Per exemple, un dels adductes que es forma per NNK és la O6-

metilguanina, que durant la replicació es confon per una deoxiadenosina i la base que s'incorpora com a complementaria és una timina; d'aquesta manera s'ha introduït una mutació, del parell de bases G-C es passa a A-T. El resultat final és la introducció d'alteracions permanents en els pulmons dels fumadors, especialment en els gens *TP53* i *KRAS* (Pfeifer et al., 2002; Sun et al., 2007).

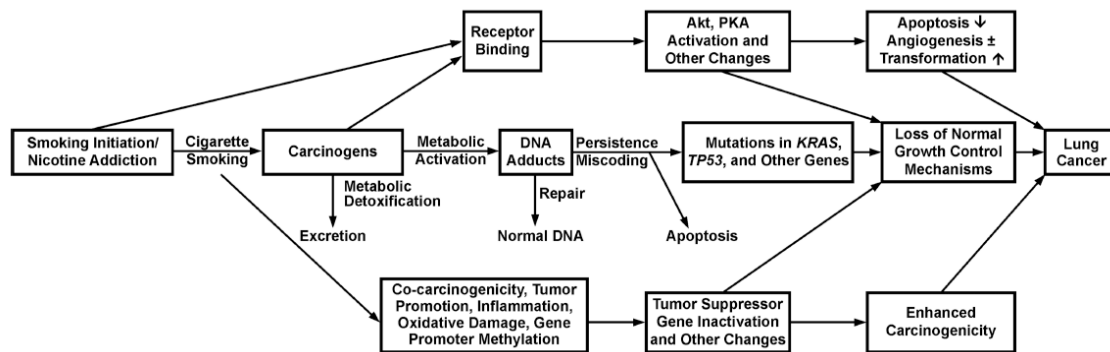


Figura 5. El fum del tabac causa càncer. Esquema mecanístic de tots els passos, que en fumadors poden donar-se simultàniament. Obtinguda de Hecht, 2012.

S'han descrit també altres vies per les que els compostos del fum del tabac poden promoure l'oncogènesi: molts d'ells, sense necessitat d'activar-se metabòlicament, poden unir-se a receptors de membrana i activar vies com les de la PI3K; la nicotina, per exemple, s'ha vist que pot induir l'expressió de factors de creixement com VEGF (Chen et al., 2011); a més, cal tenir en compte els efectes proinflamatoris d'aquests compostos, que poden provocar hiperproliferació de pneumòcits o inducció de factors proangiogènics (Takahashi et al., 2010).

Tot i els efectes devastadors del tabac en la promoció del càncer de pulmó, no totes les persones fumadores acabaran desenvolupant càncer de pulmó. En aquest punt intervé la susceptibilitat genètica de cada individu, que determina l'addicció a la nicotina, el metabolisme dels carcinògens, la capacitat de detoxificació i l'eficàcia dels mecanismes de reparació del DNA. Destaquen polimorfismes en els gens *CYP2A6*, *CYP1A1* i *GSTM1*. El primer gen està relacionat amb la degradació de la nicotina, si l'activitat de l'enzim és major, els nivells de nicotina en sang disminuiran més ràpid i l'individu haurà de fumar més per mantenir els nivells. *CYP1A1* codifica per un enzim de l'activació metabòlica. I *GSTM1* s'encarrega d'excretar els productes tòxics, per tant a menys activitat enzimàtica, més possibilitat de patir un càncer (Shields, 2002).

Pel que fa a l'heretabilitat del càncer de pulmó, estudis genòmics recents han evidenciat l'existència d'una regió al cromosoma 15q25.1 considerada una regió de susceptibilitat. La regió conté tres gens que codifiquen per receptors acetilcolina-nicotínics, *CHRNA3*, *CHRNA5* i *CHRNA4*; variacions en aquest locus estan relacionades amb més dependència al tabac, i per tant el risc estaria relacionat amb aquest hàbit (Thorgeirsson et al., 2008). En el cas de no fumadors, s'han descrit variacions en altres regions, la més significativa és 13q31.3, on les diferents variants al·lèliques afecten l'expressió del gen *GPC5*. Aquest gen forma part de la família *glypican* de proteoglicans que regulen les senyalitzacions de membrana, s'ha descrit

que la seva expressió a la baixa podria contribuir al desenvolupament de càncer de pulmó (Li et al., 2010).

Recentment també s'estan correlacionant els efectes del tabac amb la resposta a tractaments pel càncer. L'alteració que el tabac produeix en l'activitat dels enzims del metabolisme pot afectar a la farmacocinètica de certs fàrmacs, com per exemple l'erlotinib (Petros et al., 2012).

CAUSES AMBIENTALS: ALTRES

A part del tabac, que és el carcinogen més important pel càncer de pulmó, també hi ha altres carcinògens que hi contribueixen notablement (Hubaux et al., 2012), són:

- Asbestos: són fibres naturals que es troben en roques i que s'han utilitzat àmpliament en la indústria. La seva pols és inhalada i accedeix al pulmó, però les seves fibres són molt grans i no poden ser fagocitades, per això produeixen inflamació, fibrosi i càncer.
- Arsènic: és un metal·loide natural de l'escorça terrestre. L'exposició es dona per beure aigua contaminada i cal activar-lo metabòlicament perquè sigui nociu.
- Radó: és un gas radioactiu que prové naturalment de l'urani i que constitueix el 50% de tota l'exposició radioactiva natural dels humans. És un gas químicament inert però es barreja amb altres aerosols i arriba a l'epiteli pulmonar, on emet partícules α , les quals produeixen trencaments de doble cadena i aberracions cromosòmiques al DNA.

En tots els casos es produeix també dany al DNA per la producció d'espècies reactives d'oxigen.

Sortosament, en els darrers anys s'estan detectant geogràficament els llocs on pot haver-hi concentracions majors d'aquests compostos i s'està protegint a la població. En el cas de l'asbestos, hi ha directrius marcades per la seva manipulació i limitació de l'ús, però encara es segueix utilitzant en molts països.

3.2. CLASSIFICACIÓ HISTOPATOLÒGICA

TIPUS HISTOLÒGICS

Les avaluacions histològiques poden fer-se sobre biòpsies petites i citologies o sobre resecions. L'objectiu es poder fer millors classificacions amb el mínim de material possible. Així, la classificació actual de dels tumors de pulmó és la proposada per l'Organització Mundial de la Salut (WHO) l'any 2004 (Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, 2004) amb una actualització feta per l'Associació Internacional per l'Estudi del Càncer de Pulmó (IASLC), la Societat Toràcica Americana (ATS) i la Societat Respiratòria Europea (ERS) (2011) (Travis et al., 2011). Aquesta classificació defineix quatre grans tipus histològics de càncer de pulmó: l'adenocarcinoma, el carcinoma escamós, el carcinoma de cèl·lula gran, i el carcinoma de cèl·lula petita (SCLC). Els tres primers grups formen part del carcinoma de cèl·lula no petita (NSCLC). Podem trobar-los revisats per Saeed i Travis, entre altres (Saeed and Anderson, 2011; Travis, 2011; Travis et al., 2013). La classificació actual es mostra en la taula 3.

Squamous cell carcinoma	Large cell carcinoma
Variants	Variants
Papillary	Large cell neuroendocrine carcinoma
Clear cell	Combined large cell neuroendocrine carcinoma
Small cell	Basaloid carcinoma
Basaloid	Lymphoepithelioma-like carcinoma
Small cell carcinoma	Clear cell carcinoma
Combined small cell carcinoma	Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype
Adenocarcinoma	Adenosquamous carcinoma
Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)	Sarcomatoid carcinomas
Nonmucinous, mucinous, mixed mucinous/non-mucinous	Pleomorphic carcinoma
Invasive Adenocarcinoma	Spindle cell carcinoma
Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with > 5 mm invasion)	Giant cell carcinoma
Acinar predominant	Carcinosarcoma
Papillary predominant	Pulmonary blastoma
Micropapillary predominant	Other
Solid predominant	Carcinoid tumor
Variants of invasive adenocarcinoma	Typical carcinoid
Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)	Atypical carcinoid
Colloid	Preinvasive lesions
Fetal (low and high grade)	Squamous dysplasia/carcinoma in situ
Enteric	Atypical adenomatous hyperplasia
	Adenocarcinoma in situ (nonmucinous, mucinous or mixed nonmucinous/mucinous)
	Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia

Taula 3. Classificació histològica actual de tots els tipus i subtipus de càncer de pulmó. Obtinguda de Travis, 2011.

ADENOCARCINOMA (AD)

Representa un 40-45% dels casos, sent el tipus més diagnosticat de tots. Té diverses variants que poden tenir una arquitectura acinar, papil·lar o lipídica. Es caracteritza per tenir un citoplasma escumós o vacuolar, nucli no centrat i nuclèols prominents (figura 6). El seu marcador és el factor transcripcional tiroide 1 (TTF-1).

CARCINOMA ESCAMÓS (LSCC)

Representa el 30% de casos respecte el total. Es caracteritza per ponts intercel·lulars, formació de perles escamoses i queratinització. Els seus marcadors típics són p40 o p63. Molt associat al tabaquisme.

CARCINOMA DE CÈL·LULA GRAN (LCC)

Representa un 5-10% del total. Són tumors típicament necròtics amb fulles i nius de cèl·lules grans poligonals amb el nucli vesicular i nuclèols grans (figura 6). Té diverses variants, entre les que destaca el carcinoma de cèl·lula gran neuroendocrí. Té un pronòstic dolent i dissemina aviat a altres òrgans.

CARCINOMA DE CÈL·LULA PETITA (SCLC)

És un 15-20% del total de càncers de pulmó. Les cèl·lules que el formen són petites, amb forma d'arrodonida a fusiforme, molt poc citoplasma i quasi sense nuclèols (figura 6). Sol haver-hi bastanta necrosi i mitosis i presenta els patrons neuroendocrins típics de rosetes, organització de les cèl·lules en nius i embolcall perifèric. Molt associat al tabaquisme. És un tumor molt agressiu, que normalment es diagnostica quan ja està estès i que rarament es pot tractar amb cirurgia.

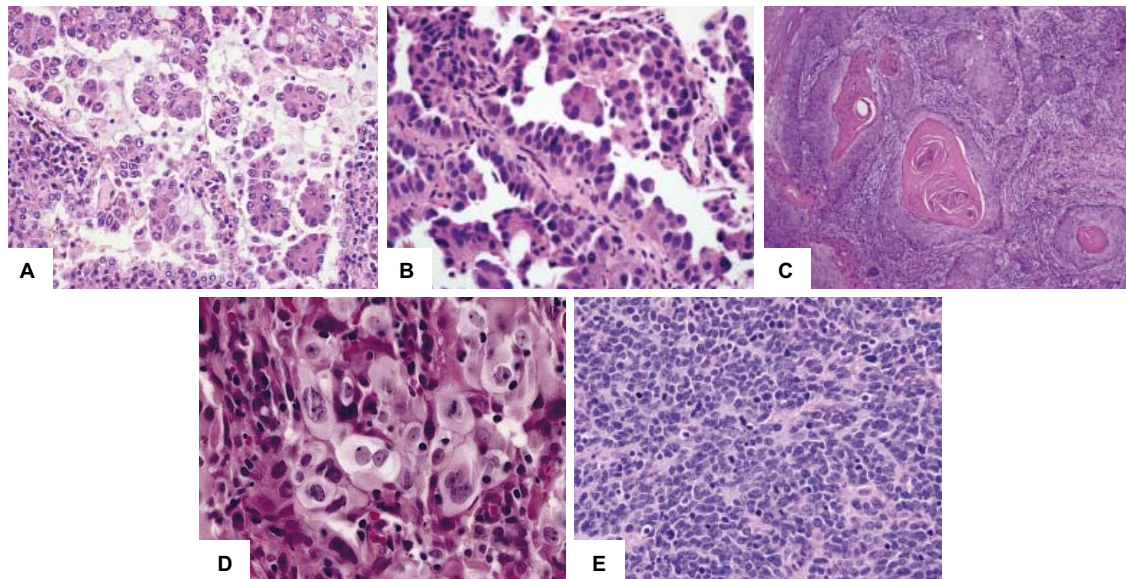


Figura 6. Diferents tipus histològics del càncer de pulmó. A, adenocarcinoma micropapil·lar. B, adenocarcinoma acinar i micropapil·lar. C, carcinoma escamós. D, carcinoma de cèl·lula gran. E, carcinoma de cèl·lula petita. Modificada de Travis, 2011 i Travis et al., 2013.

A més d'aquests quatre grans grups i les seves subclassificacions, també hi ha el carcinoma adenoescamós (que ha de contenir un mínim del 10% d'algun dels dos subtipus), el sarcomatós (té components de carcinoma i sarcoma amb cartílag/múscul/ós malignitzat) i el tumor carcinoide (representa entre 1-2% del total dels tumors).

El diagnòstic histopatològic del càncer de pulmó està sent cada vegada més necessari. Abans, el més important era distingir entre NSCLC i SCLC, sense prestar massa atenció en el subtipus concret. Recentment, i degut a les implicacions en el tractament que té, cal classificar cada subtipus, especialment distingir entre NSCLC adenocarcinoma o escamós: s'ha vist que mutacions a *EGFR* i translocacions de *ALK* són gairebé exclusives d'adenocarcinoma, i la identificació d'aquestes anomalies dona resposta a inhibidors tirosina kinasa (EGFR) i a crizotinib (ALK); a més, els pacients amb carcinoma escamós poden tenir hemorràgies quan són tractats amb l'inhibidor de VEGF bevacizumab (Johnson et al., 2004); i també s'ha descrit que pacients amb NSCL-NOS/LCC responen a pemetrexed (inhibidor de la síntesi de nucleòtids), mentre que els escamosos no (Scagliotti et al., 2009). D'aquesta manera l'avaluació del patòleg determinarà els testos que es faran a les mostres i el tractament del pacient.

LESIONS PRENEOPLÀSIQUES

L'alta mortalitat del càncer de pulmó es deu al fet que la majoria de casos es diagnostiquen tard, quan les opcions de tractament són poques. Es per això que el diagnòstic precoç del càncer de pulmó representaria una gran millora en el pronòstic de la malaltia, i en aquest punt cal identificar molt bé i poder tractar les lesions preneoplàsiques, aquelles que es donen en el període de latència tumoral. Cal tenir en compte que el càncer de pulmó és un tumor complex, i que segurament té diverses vies preneoplàsiques.

COMPARTIMENTS CENTRALS I PERIFÈRICS EN EL PULMÓ

El pulmó és un dels pocs òrgans en els que s'han reconegut diferents compartiments anatòmics, histològics i també funcionals.

El compartiment central consisteix en els bronquis grans i mitjans implicats en la conducció de l'aire. Histològicament, té epitelis pseudoestratificats amb cèl·lules basals (possiblement són les cèl·lules mare que donen lloc a la resta), cèl·lules ciliades, cèl·lules neuroendocrines i cèl·lules secretores de mucositat. El compartiment perifèric el formen els bronquíols i els alvèols. En aquest cas, en els bronquíols terminals trobem cèl·lules ciliades i cèl·lules secretores de Clara, mentre que en els alvèols trobem pneumòcits de tipus I (fan l'intercanvi gasós) i de tipus II (secreten surfactant). Les úniques cèl·lules amb capacitat de divisions continuades en el compartiment perifèric són les cèl·lules de Clara i els pneumòcits de tipus II, per tant a aquestes se'ls atribueix el manteniment de la resta (Sullivan et al., 2010). Aquestes estructures es mostren a la figura 7.

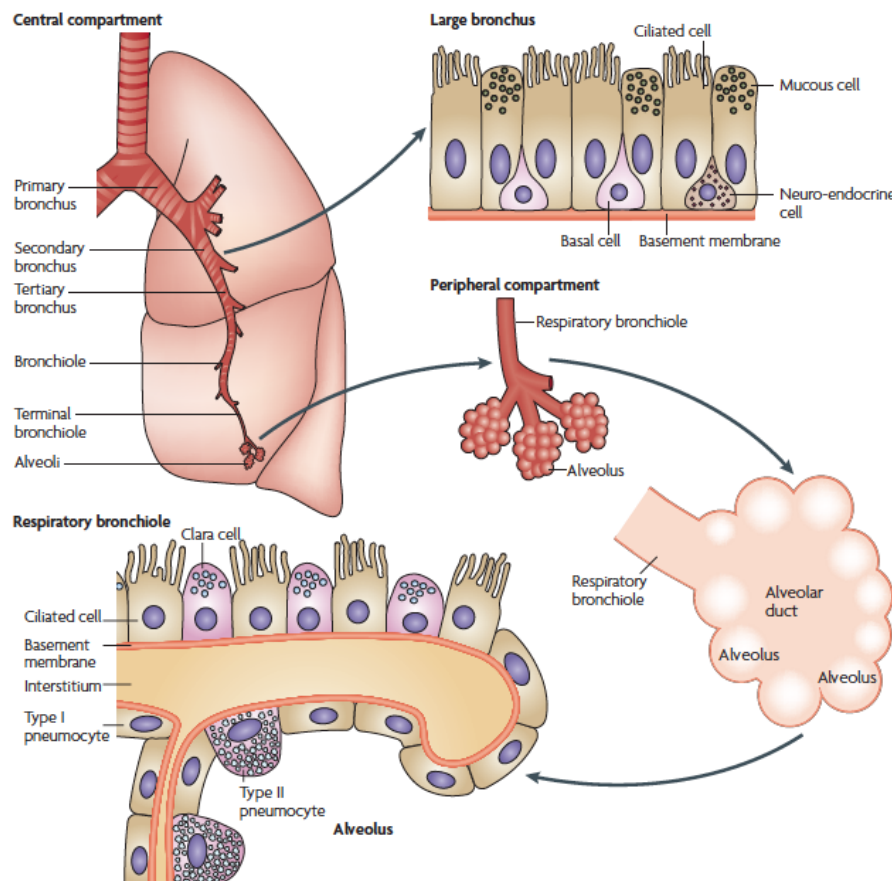


Figura 7. Anatomia del pulmó. En el compartiment central: els bronquis amb parets musculars i cartílag i els bronquíols amb parets musculars discontinues; en els bronquis destaquen les cèl·lules basals que són les putatives cèl·lules mare. En el compartiment perifèric: bronquíols terminals i alvèols; les cèl·lules de Clara (secretores de la proteïna de les cèl·lules de Clara) i els pneumòcits de tipus II (secretors de surfactant) poden dividir-se continuament. Obtinguda de Sun et al., 2007.

La majoria de tumors escamosos i de cèl·lula petita sorgeixen al compartiment central, mentre que els adenocarcinomes ho fan al compartiment perifèric (Gazdar and Brambilla, 2012; Sullivan et al., 2010).

FORMES DE LESIONS PRENEOPLÀSIQUES

Segons l'última classificació histològica de la WHO (2004) (Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, 2004) i les posteriors modificacions de IASLC/ATS/ERS (2011) (Travis et al., 2011), hi ha quatre tipus de lesions preneoplàsiques pulmonars: displàsia de carcinoma escamós/ Carcinoma *in situ* (CIS); hiperplàsia atípica adenomatosa (AAH), hiperplàsia idiopàtica difusa de cèl·lules neuroendocrines (DIPNECH), adenocarcinoma *in situ* (AIS) (Travis, 2011).

Es creu que les AAH donen lloc a adenocarcinomes. El subtipus escamós té un origen marcadament en múltiples fases, a més com que es dona a les vies centrals és més fàcil de seguir, les lesions preneoplàsiques que se li associen són la displàsia de carcinoma escamós i el CIS. Als tumors de cèl·lula petita no se'ls reconeixen lesions preneoplàsiques, però es creu que sorgeixen d'epitelis altament danyats (Wistuba and Gazdar, 2006).

CANVIS PRENEOPLÀSICS SEQÜENCIALS EN ESCAMÓS

En les vies perifèriques l'extracció de mostres s'ha de fer per via invasiva, en canvi en els compartiments centrals és molt més senzilla (esputs, rentats del fluid o raspats i biòpsies), és per això que es coneix molt més de les lesions preneoplàsiques situades a la zona central del pulmó. El procés esglaonat que es descriu pel carcinoma escamós és el paradigma i inclou canvis en l'epiteli des de normal a hiperplàsia, metaplàsia, displàsia (mitja, moderada i severa), carcinoma *in situ*, i finalment carcinoma invasiu (figura 8). Les característiques atípiques de les cèl·lules en totes aquestes etapes inclouen variacions en la mida, forma i disposició del nucli i de la cèl·lula, variacions en la tinció nuclear, irregularitats en la membrana nuclear; i també es detecten major número de mitosis i irregularitats en la disposició de les capes cel·lulars en els epitelis (Ishizumi et al., 2010).

Ja es diu que hi ha hiperplàsia quan la capa epitelial basal té més de tres cèl·lules de gruix. Però els criteris que estableix la WHO en lesions preneoplàsiques d'escamós són les següents (Kerr, 2001; Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, 2004): displàsia mitja, que presenta mínimes alteracions; displàsia moderada, encara hi ha una capa de cèl·lules aplanades superficials, ja s'hi observen mitosis; displàsia severa, les cèl·lules ja són polimorfes; i CIS, on tot és completament aberrant i ple de mitosis, no hi ha cap tipus d'ordre i es perd la capa cel·lular superficial.

Segons un estudi fet en 511 fumadors d'una mitja d'edat de 56 anys, la prevalença d'aquestes alteracions és de més d'un 60%, la majoria de les quals són displàsies mitges (44%); a més no hi ha canvis en la freqüència d'aquestes alteracions després de deu anys d'haver deixat el tabac (Lam et al., 2000). S'ha vist que el CIS és molt més predictiu de risc de patir carcinoma escamós que les displàsies, més del 50% de les quals reverteixen (Bota et al., 2001; Venmans et al., 2000). Tot i així, aquest valor predictiu és molt difícil de posar a la pràctica, doncs en les broncoscòpies convencionals aquest tipus d'alteracions no seran detectades, caldria utilitzar

altres mètodes que ofereixen més contrast com el LIFE (*Lung Imaging Fluorescence Endoscopy*) (Hirsch et al., 2001).

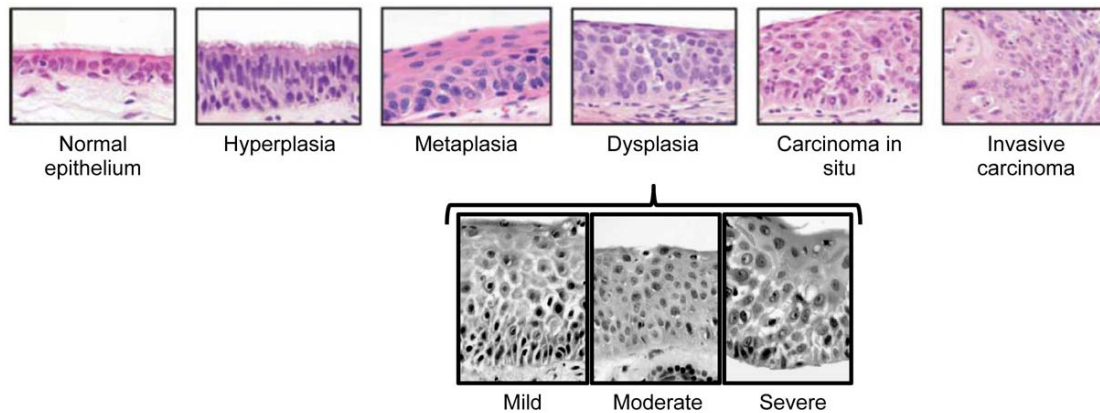


Figura 8. Seqüència de canvis histològics que es donen durant el desenvolupament del carcinoma escamós. Adaptat de Breuer et al., 2005 i Wistuba and Gazdar, 2006.

EFFECTES DE CAMP

Les lesions preneoplàsiques són sovint extenses i multifocals, la qual cosa indica que gran part de l'epiteli s'ha malignitzat. En els pulmons dels fumadors s'observen moltes lesions d'aquesta mena, i tendeixen a ser més grans i avançades quan estan properes als tumors, mentre que en els pulmons de no fumadors les lesions són més limitades, fet que evidencia un efecte de l'exposició a mutàgens del fum del tabac. Aquestes lesions es troben en altres tipus tumorals i no només s'associen a lesions preneoplàsiques, sinó que a vegades formen part del mateix tumor i constitueixen un problema en la resecció i recaigudes de la malaltia (Chai and Brown, 2009).

CARCINOMES ESCAMOSOS DE CAP I COLL I CARCINOMES ESCAMOSOS DE PULMÓ

Els carcinomes escamosos de cap i coll (HNSCC) són molt similars als carcinomes escamosos de pulmó. De fet amb les tècniques tradicionals d'histologia són pràcticament indistingibles, a més presenten els mateixos marcadors de carcinoma escamós, com p63 (Lal et al., 2013). Tots dos carcinomes es donen en epitelis escamosos de zones molt pròximes i això fa que les fases de desenvolupament dels tumors escamosos de cap i coll siguin com les del carcinoma escamós de pulmó: hiperplàsia, displàsia, CIS i carcinoma escamós invasiu ben diferenciat (Tanaka and Ishigamori, 2011). La seva etiologia és pràcticament igual, amb els factors ambientals i exògens jugant un paper molt important i amb el tabac com a causa majoritària, a més, la implicació d'aquests factors promou l'aparició d'efectes de camp.

A part de les semblances entre aquests tumors, en molts dels casos els pacients d'un dels dos tipus tumorals ho seran també de l'altre. Doncs, un 5% dels pacients de HNSCC faran metàstasis al pulmó, i una altra part desenvoluparan tumors primaris al pulmó (Leong et al., 1998). El tractament de la malaltia en els dos supòsits anteriors serà molt diferent i el pronòstic també, els nòduls inicials de LSCC el tenen molt millor que els HNSCC amb metàstasis pulmonars. Per tot això s'estan investigant mètodes per la distinció dels dos tipus de tumors,

especialment quan es presenten en pulmó, com els perfils d'expressió gènica (Vachani et al., 2007)

3.3. ALTERACIONS GENÈTIQUES

Com s'ha comentat anteriorment, el càncer és l'última causa de la inactivació o activació de gens clau que permeten la transformació de cèl·lules normals de pulmó en cèl·lules canceroses. En la culminació d'aquest procés, el càncer de pulmó presentarà totes les marques del càncer, incloent autosuficiència pel que fa a senyals de creixement, insensibilitat a les senyals antiproliferatives, evasió de la mort cel·lular, potencial replicatiu il·limitat, angiogènesi, invasió de teixits i metàstasi.

El càncer de pulmó té una de les taxes mutacionals més elevades de tots els càncers, 4,21 mutacions somàtiques per Mb (mitja d'alteracions en càncer: 1,8 per Mb) (Greenman et al., 2007), possiblement deguda a la continuada exposició a agents externs, alguns d'ells mutàgens. Aquest fet contribueix a una alta heterogeneïtat en els tumors i explica la manca d'efecte de teràpies convencionals amb efectes generals. Afegida a la complexitat mutacional que comporta l'heterogeneïtat i l'evolució del càncer hi ha la resposta dels tumors a la pressió selectiva que representa la teràpia, un problema actual en la pràctica clínica.

Els gens alterats en càncer es classifiquen en oncogens i supressors tumorals segons les seves funcions. Els oncogens es defineixen com a gens que poden transformar una cèl·lula normal (Futreal et al., 2001) mentre que els supressors tumorals són els que poden inhibir el creixement cel·lular (Sherr, 2004). Des d'un punt de vista genètic, els oncogens estan amplificats, hipometilats, fusionats amb gens que tenen promotors més forts o pateixen mutacions puntuals que els hiperactiven. Per altra banda, els supressors tumorals estan bial·lèlicament inactivats en càncer mitjançant mutacions puntuals, delecions o hipermetilació del promotor. La pèrdua d'heterozigositat (LOH) en un al·lel combinada amb una segona alteració en l'al·lel que queda (*two hit hypothesis*) és el mecanisme més comú d'inactivació de gens supressors tumorals (Knudson, 1971).

El concepte que s'aplica en tots els càncers en resposta als canvis genètics és l'addicció oncogènica, que es pot definir com la dependència dels tumors a un oncogen clau per la seva supervivència, és a dir, que el guany de funció d'un sol oncogen és més important que tota la resta d'alteracions que pugui presentar, i que si s'elimina aquest efecte la proliferació cel·lular es veurà profundament inhibida. El concepte d'addicció oncogènica és la base de les teràpies dirigides, en què un fàrmac es capaç d'inhibir la proteïna clau per la proliferació. Aquest concepte però no serveix per alteracions de pèrdua de funció, les que es donen en els supressors tumorals i pels quals és difícil restituir la funció. En aquests casos la teràpia es pot fer indirectament a través d'una altra proteïna que estigui a la mateixa via o en una via solapada a la de la proteïna amb pèrdua de funció, i que pugui inhibir-se; aquest és el concepte de letalitat sintètica. La letalitat sintètica descriu una relació entre dos gens per la qual la pèrdua d'un gen dóna avantatge proliferatiu i permet la viabilitat, però la pèrdua dels dos gens alhora causa mort cel·lular; d'aquesta manera serveix per la teràpia, perquè en una cèl·lula tumoral ja tindrem el primer gen perdut, cosa que no passarà en les cèl·lules normals (Hartwell, 1997; Rehman et al., 2010).

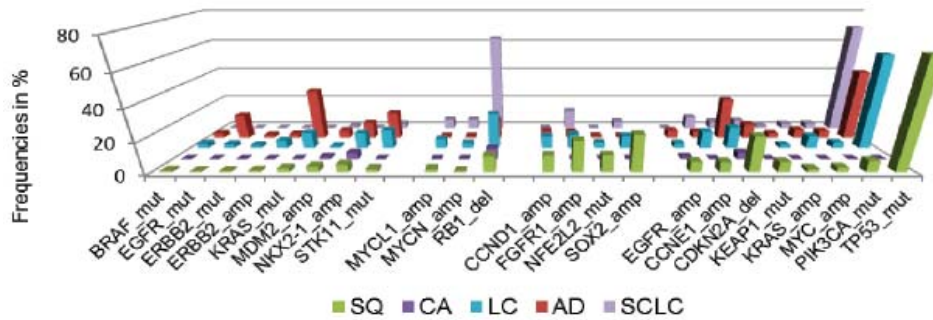


Figura 9. Representació gràfica de les alteracions genètiques més freqüents en els diferents tipus histològics de càncer de pulmó. Obtinguda de (Kloth and Buettner, 2014).

Seguidament es resumeixen els gens alterats de manera més important en càncer de pulmó (figures 9 i 11), que s'han classificat en cinc grups: receptors de membrana, via de RAS/RAF/MEK/ERK, via de PI3K/AKT/TOR, proteïnes reguladores de la transcripció i proteïnes reguladores del cicle cel·lular.

RECEPTORS DE MEMBRANA

EGFR i *HER2*:

La família de receptors ERBB inclou *ERBB1* (*EGFR*), *ERBB2* (*HER2*), *ERBB3* (*HER3*) i *ERBB4* (*HER4*). Són receptors transmembranals tirosina quinasa. S'activen en resposta a factors de creixement i formen dímers que s'autofosforilen i activen vies com RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, les quinases Src i els factors de transcripció STAT (Arteaga and Engelman, 2014).

EGFR està sobreexpressat o hiperactivat en un 10-15% o en un 30-40% dels càncers de pulmó depenent de l'ètnia dels pacients (Cooper et al., 2013). La majoria d'alteracions en *EGFR* es donen en adenocarcinomes de no fumadors i donen resposta a inhibidors tirosina quinasa com erlotinib o gefitinib (Paez et al., 2004; Pao et al., 2004), és per això que la determinació de l'*status* d'*EGFR* ja es testa de rutina en pacients d'adenocarcinoma. Cal destacar que tot i la bona resposta del tumor a aquests inhibidors, hi ha malalts que hi desenvolupen resistències. El gen *EGFR* pateix mutacions secundàries en resposta al tractament, en concret la mutació T790M es dona en un 50% dels malalts que desenvolupen resistència i impedeix la unió dels inhibidors tirosina quinasa al receptor (Balak et al., 2006). Alteracions en *HER2* també es donen majoritàriament en adenocarcinomes i solen aparèixer en tumors amb *EGFR* i *KRAS* no mutats (Stephens et al., 2004).

ALK:

ALK és un receptor tirosina quinasa que normalment no s'expressa en pulmó. La seva activació està associada a proliferació cel·lular mediada per les vies RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT/TOR. El 2007 es van descriure fusions entre *ALK* i *EML4* en NSCLC (Soda et al., 2007). Les fusions resulten de petites inversions en el cromosoma 2 i generen una proteïna de fusió que activa constitutivament la quinasa. S'han descrit diverses variants de la fusió *ALK-EML4* i recentment, també s'han trobat noves parelles de fusió de l'oncogen *ALK* (Takeuchi et al., 2009).

Alteracions a ALK es donen majoritàriament en adenocarcinomes i en no fumadors, amb una freqüència 3-7% dels NSCLC (Soda et al., 2007). L'ús d'inhibidors tirosina quinasa com el crizotinib funciona molt bé en pacients amb alteracions en *ALK*, però mutacions en aquest gen també s'han descrit com a mecanismes d'adquisició de resistències (Choi et al., 2010; Sasaki et al., 2011).

ROS1:

Codifica per un receptor tirosina quinasa que indueix l'activació de la senyalització per les vies de STAT, RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT/TOR. La seva alteració en càncer de pulmó és molt similar a la de *ALK*, també s'altera per fusió i és dóna majoritàriament en no fumadors, però la seva freqüència és més baixa (Bergethon et al., 2012; Takeuchi et al., 2012).

MET:

Aquest oncogen codifica per un receptor tirosina quinasa (HGFR), que després d'unir-se als seus lligands, dimeritza, activa la quinasa i activa les vies RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR i les quinases Src. Està amplificat en 1-7% dels NSCLC i les seves mutacions són més comunes en el subtipus escamós (Go et al., 2010). L'amplificació de *MET* s'associa al desenvolupament de resistències a inhibidors de tirosina quinasa (Engelman et al., 2007) i a nivells elevats d'activació de S6 (Pros et al., 2013).

DDR2:

Aquest és un receptor transmembrana tirosina quinasa que s'uneix i s'activa per col·làgens fibril·lars. Aquests receptors, pels seus lligands, s'han relacionat amb la migració i la regulació de l'adhesió i capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals (Vogel et al., 2006). Recentment se li han trobat mutacions activadores en un 3,8% dels casos de càncer de pulmó del tipus escamós i també sensibilitat a inhibició amb desatinib (Hammerman et al., 2011).

VIA DE RAS/RAF/MEK/ERK

KRAS:

Forma part de la família d'oncogens *RAS*, que també inclou *NRAS* i *HRAS*, codifiquen per una proteïna G que pot estar unida a GTP (forma activa) o a GDP (forma inactiva). Actua per sota de receptors de factors de creixement i activa vies com RAF/MEK/ERK o PI3K/AKT/TOR (Karnoub and Weinberg, 2008). *KRAS* està mutat en adenocarcinomes, en un 25-40% dels casos, essencialment en pacients fumadors (Riely et al., 2008; Rodenhuis and Slebos, 1992). Com que la funció de la proteïna *KRAS* està per sota de la de EGFR, la presència de mutacions a *KRAS* confereix resistència a inhibidors de tirosina quinasa.

BRAF:

BRAF codifica per una serina-treonina quinasa que és l'efector corrent avall de *KRAS* i activa la via de transducció de les MAPK, implicada en la regulació de proliferació i supervivència, mitjançant fosforilació de MEK1 i MEK2 (Davies et al., 2002). La seva activació és molt comú en melanoma. En càncer de pulmó es troba freqüentment en adenocarcinomes, i representa un

3% del total de NSCLC. Forma part de les mateixes vies d'activació que EGFR i KRAS, i normalment les seves alteracions són mútuament excloents (Marchetti et al., 2011).

VIA DE PI3K/AKT/TOR

El complex PI3K converteix les senyals extracel·lulars en molècules de senyalització intracel·lulars. Les PI3K de la classe I s'activen per receptors de membrana, les de la classe IA per receptors tirosina quinasa i les de la classe IB per receptors acoblats a proteïnes G. En el cas de les PI3K de classe IA, després de l'activació dels receptors tirosina quinasa, PI3K s'uneix a ells mitjançant la seva subunitat reguladora i activa la subunitat catalítica que fosforila lípids (inositols de la membrana). Els fosfatidilinositols seran els missatgers secundaris per altres vies, com la de AKT, i podran ser defosforilats i inactivats per la fosfatasa PTEN. Els fosfatidilinositols medien l'activació d'AKT per PDK, una *master* quinasa dependent de fosfatidilinositols, que s'activarà i fosforilarà AKT, entre altres substrats. AKT activa BAD i prevé dels seus efectes proapoptòtics, inactiva FOXO i promou l'avançament del cicle cel·lular, o fosforila TSC2 de manera que prevé la unió TSC1-TSC2 i manté actiu mTOR, estimulants la síntesi proteica i el creixement cel·lular (figura 10) (Engelman et al., 2006).

PIK3CA:

Aquest gen codifica per la proteïna p110 α , que és una de les subunitats catalítiques del complex PI3K IA. S'altera per amplificació o mutacions puntuals que produeixen una activació constitutiva de la via sense considerar la unió de lligands als receptors (Samuels et al., 2005). Està hiperactivat en un 2% dels casos de NSCL i la seva incidència és similar en escamosos i adenocarcinomes, però majoritàriament en fumadors (Angulo et al., 2008; Samuels et al., 2004).

STK11:

Codifica per la proteïna LKB1, una serina-treonina quinasa que inhibeix mTOR. És una quinasa mestra i està implicada en el metabolisme energètic, però també en polaritat cel·lular i altres (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012; Rodriguez-Nieto and Sanchez-Cespedes, 2009). Aquest gen supressor tumoral s'ha trobat mutat en un 30% dels adenocarcinomes i està molt lligat al tabaquisme (Carretero et al., 2004; Sanchez-Cespedes et al., 2002).

PTEN:

Aquest gen dóna lloc a una fosfatasa que elimina els fosfats dels fosfatidilinositols, revertint d'aquesta manera l'acció del complex PI3K. Es troba mutat en un 5% dels NSCLC i és més comú en escamosos; molt associat al tabaquisme (Jin et al., 2010).

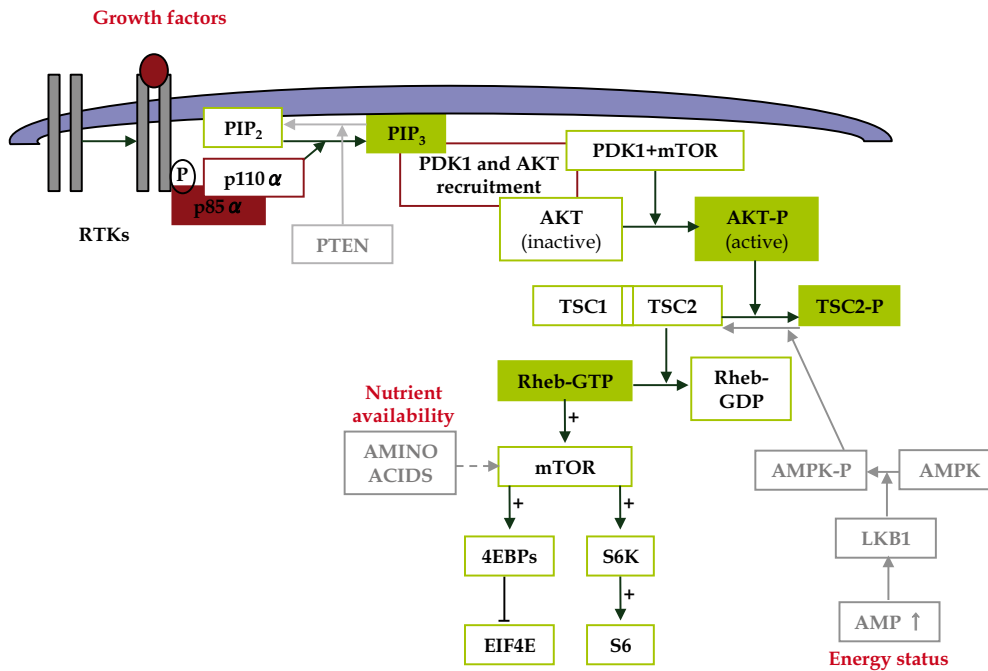


Figura 10. Representació de la via dels fosfatidils inositols trifosfats. L'estat energètic de la cèl·lula i les senyals de factors de creixement hi convergeixen.

PROTEÏNES REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓ

MYC i MAX:

La família MYC conté tres membres: *MYC*, *MYCN* i *MYCL*. L'oncogen MYC és un factor de transcripció que té l'expressió molt finament regulada per les vies RAS/RAF/MEK/ERK, WNT i TGF β -SMAD. MYC dimeritza amb MAX i regula l'expressió de molts gens implicats en proliferació i creixement cel·lular unint-se a les seves *E-boxes*. La seva expressió anormalment alta desregula l'expressió dels seus gens diana i també impedeix la funció de p53 en el *checkpoint* de cicle cel·lular (Dang, 2012).

MYC està freqüentment amplificat en NSCLC, mentre que els tres membres estan hiperactivats en SCLC (Blanco et al., 2009). *MAX* s'ha descrit alterat recentment en càncer de pulmó, concretament en el subtipus SCLC amb una freqüència del 5%. Cal destacar el fenomen de letalitat sintètica que es dona entre BRG1 i MAX (Romero et al., 2014).

SMARCA4:

Aquest gen codifica per la proteïna BRG1, que és la subunitat catalítica del complex remodelador de cromatina SWI/SNF. Aquest complex regula l'expressió gènica modificant les unions entre histones i DNA dependent d'ATP. En un estudi en línies cel·lulars, BRG1 es va trobar alterat en un 30% dels NSCLC, i també s'ha descrit mutat en tumors primaris de pulmó (Medina et al., 2008; Rodriguez-Nieto et al., 2011). És interessant destacar que les seves alteracions són mútuament excloents amb les de *MYC*, i que BRG1 regula a la baixa l'expressió de *MYC* i controla l'expressió dels gens diana de *MYC* (Romero et al., 2012).

SOX2 i SOX4:

Els gens de la família *SOX* són factors de transcripció que regulen l'expressió de gens específics de llinatge durant el desenvolupament embrionari, en concret s'encarreguen de la determinació sexual, el desenvolupament de la cresta neural, l'esqueletogènesis i l'hematopoesi. Com molts altres gens amb funcions en l'embriogènesi, els gens de la família *SOX* també estan implicats en la carcinogènesi (Castillo and Sanchez-Cespedes, 2012).

L'amplificació de *SOX2* s'ha trobat específicament en escamosos. *SOX4* s'ha descrit amplificat i mutat en càncer de pulmó i la seva signatura d'expressió està relacionada amb el desenvolupament de SCLC (Castillo et al., 2012; Medina et al., 2009).

PROTEÏNES REGULADORES DEL CICLE CEL·LULAR***TP53:***

Aquest gen codifica per una fosfoproteïna que prevé l'acumulació de dany. En resposta a una situació d'estrès, p53 indueix l'expressió de gens com inhibidors de les quinases dependents de ciclina (CDKs), fet que farà aturar el cicle cel·lular en G1 permetent que hi hagi reparació del DNA o apoptosi. *TP53* és un dels gens més alterats en càncer de pulmó i pateix mutacions inactivadores o delecions en un 90% dels SCLC i en un 65% dels NSCLC (Mogi and Kuwano, 2011; Wistuba II et al., 2000). Està associat a fumadors i dona mal pronòstic (Steels et al., 2001).

CDKN2A i RB1:

Les proteïnes producte d'aquests dos gens, p16 i RB controlen la progressió del cicle cel·lular de G1 a S. RB està unit a la família de factors de transcripció E2F, durant la progressió del cicle, RB es fosforilat per les CDKs i allibera E2F permetent que es produeixi la replicació del DNA. Per altra banda, p16 és un inhibidor de les CDKs que fosforilen RB (Ohtani et al., 2004).

RB va ser el primer gen supressor tumoral identificat en càncer de pulmó (Harbour et al., 1988) i està alterat en un 90% dels SCLC i en un 10-15% dels NSCLC; p16 es troba alterat fonamentalment en NSCLCs, en un 70-80% dels casos (Larsen and Minna, 2011). Com que formen part de la mateixa via, la seva alteració és mútuament excloent.

La figura 11 mostra un resum de les alteracions genètiques més freqüents en càncer de pulmó comentades anteriorment. Hi apareixen les proteïnes afectades contextualitzades en la seva via d'actuació i relacionades entre sí.

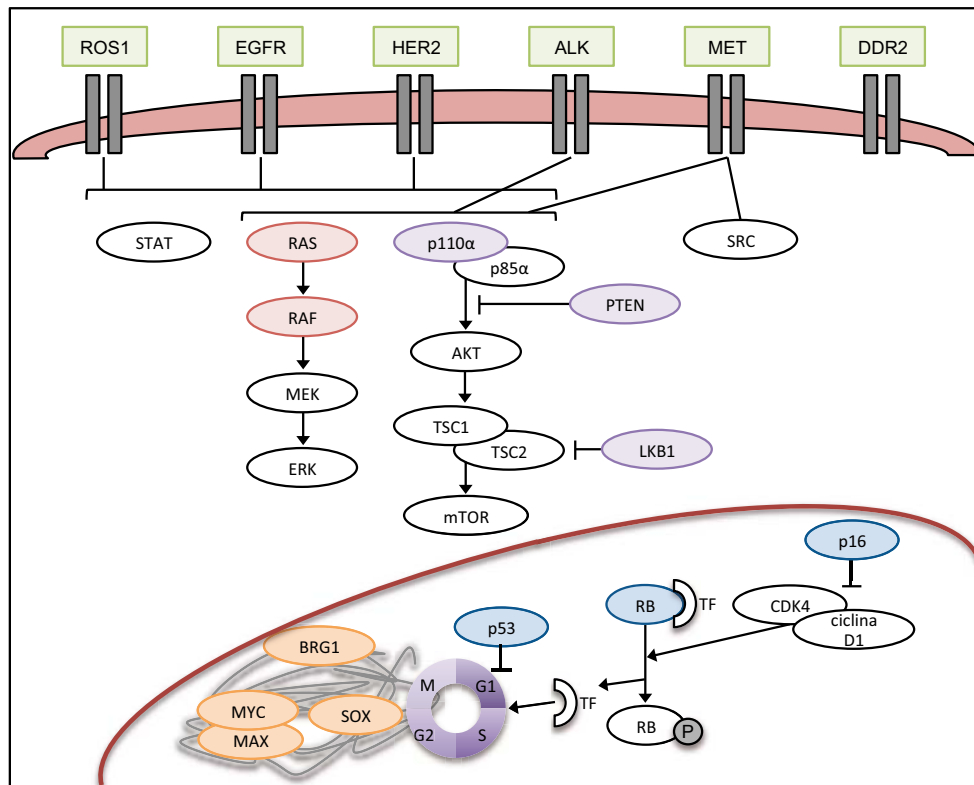


Figura 11. Representació de les principals vies implicades en càncer de pulmó. S'hi troben totes les proteïnes citades anteriorment. En verd, receptors membrana. En vermell, components de la via de RAS/RAF/MEK/ERK. En lila, proteïnes de la via de PI3K/AKT/TOR. En taronja, proteïnes reguladores de la transcripció. En blau, proteïnes reguladores del cicle cel·lular.

VARIACIONS DE LES ALTERACIONS GENÈTIQUES

Les alteracions en càncer de pulmó canvien segons el tipus histològic del tumor (es resumeixen en la figura 12). Com s'ha pogut comprovar, estan més ben definides en els adenocarcinomes que en qualsevol altre tipus de tumor de pulmó. Segurament això es deu a que és el tipus histològic més freqüent i a que hi ha moltes més línies cel·lulars tumorals establertes d'aquest tipus.

Si ens centrem en el tipus histològic escamós, les alteracions més freqüents afecten *TP53*, *MYC*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *SOX2* i *DDR2*, com ja s'ha comentat anteriorment. Però també s'han descrit altres gens mutats en aquest tipus tumoral, destacant (Heist et al., 2012):

- *AKT1*, pateix mutacions activadores, és una de les quinases que està per sota de PI3K.
- *FGFR1*, amplificat, és un receptor tirosina quinasa (Pros et al., 2013).
- *EPHA2*, està sobreexpressat i és un receptor tirosina quinasa.
- *PDGFRA*, també és un receptor que apareix amplificat.

Un altre factor important a tenir en compte és el tabac, que està relacionat amb els SCLC i els carcinomes escamosos. En un estudi recent s'ha trobat que la freqüència mutacional dels tumors de fumadors és deu vegades més elevada que la de no fumadors (Govindan et al., 2012). El tipus de mutacions puntuals també és diferent: en fumadors predominen les transversions CG a AT, i en no fumadors el canvi de CG a TA. I el que és més important, el perfil

mutacional també és diferent: alteracions en *EGFR* són molt menys comunes en fumadors (13% *versus* 58%), mentre que en *KRAS* i *TP53* es troben incrementades en fumadors (21% *versus* 4% i 71% *versus* 48%, respectivament) (Sun et al., 2007).

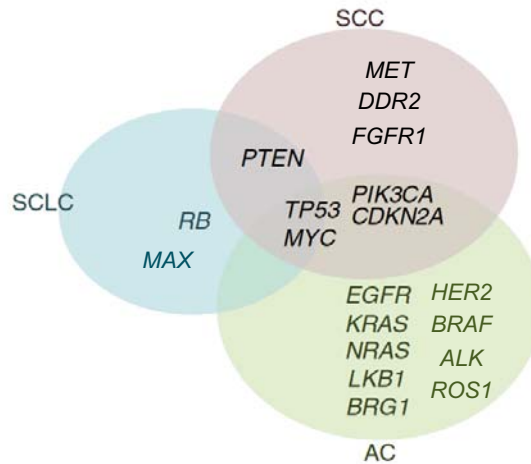


Figura 12. Gens alterats en càncer de pulmó dividits segons el tipus histològic en el que tenen més incidència. Modificada de Sanchez-Cespedes, 2003.

3.4. ALTERACIONS EPIGENÈTIQUES

Els canvis epigenètics donen canvis d'expressió sense canviar la seqüència del DNA i ho fan de manera reversible cap a les dos direccions: en càncer hi ha una hipometilació general i una hipermetilació de CpGs específica, els canvis epigenètics incrementen l'expressió d'oncogens i disminueixen l'expressió de supressors tumorals, tot i que el més conegut és el segon cas; a més s'ha vist que els canvis epigenètics són més acusats amb l'avançament del procés oncogènic (Esteller, 2008). L'expressió dels gens es pot regular directament mitjançant canvis en el grau de metilació de les illes CpG que contenen els seus promotors i també a través de canvis en l'estructura de la cromatina, que es pot modificar per acetilació, fosforilació, metilació o ubiquitinació de les cues de les histones.

Les alteracions epigenètiques són més freqüents que les genètiques però estan relacionades entre sí, les primeres poden donar lloc a les segones. Per exemple, la metilació a les CpGs pot induir mutacions puntuals via la desaminació de les 5-metilcitosines produint transicions de C a T, pot incrementar l'efecte mutagènic de carcinògens externs, afavorir la recombinació mitòtica i generar inestabilitat cromosòmica, reactivar transposons i fer perdre zones imprintades (Brzezińska et al., 2013; Esteller, 2008).

Són molts gens els que s'han descrit alterats per metilació en càncer de pulmó, entre ells destaquen:

- *CDKN2A* (p16): es troba hipermetilat i s'ha descrit que els seus nivells de metilació incrementen amb l'avançament del càncer de pulmó escamós, és a dir en les fases de displàsia inicials està metilat amb menys freqüència que en el carcinoma escamós en sí (Belinsky et al., 1998). La metilació en aquest gen, i en concret, la que pot detectar-se

als espus de malalts de càncer de pulmó podria ser un biomarcador per aquest càncer, doncs metilacions s'han detectat fins a 3 anys abans del diagnòstic i han mostrat molt bona correlació entre metilació-cas de càncer de pulmó i no metilació-control sa (Palmisano et al., 2000).

- *MGMT*: codifica per la proteïna O⁶-metilguanina metiltransferasa de DNA encarregada d'eliminar adductes del DNA formats en aquestes posicions. S'ha descrit també hipermetilada (Esteller et al., 1999), amb bona correlació grau d'alteració-estadi del tumor i amb valor predictiu en els espus de malalts, tal i com p16 (Palmisano et al., 2000).
- *PAX5*: és un gen de diferenciació i implicat en la progressió del cicle cel·lular que s'ha descrit hipermetilat (Palmisano et al., 2003).
- *CASP8*: el gen de la caspasa-8, de la cascada apoptòtica, està hipermetilat en SCLC (Shivapurkar et al., 2002).
- *CDH1*, *TIMP3*, *LAMB3*: E-cadherina, l'inhibidor de metal·loproteases i la laminina 3, gens implicats en la restricció de processos invasius, també estan inactivats per hipermetilació (Sathyanarayana et al., 2003; Zöchbauer-Müller et al., 2001).

La metilació del promotors és la marca epigenètica més ben coneguda, però també s'ha descrit que les DNA metiltransferases, les histona deacetilases i membres del complex regulador epigenètic polycomb estan sobreexpressades en càncer de pulmó (Belinsky, 2004).

3.5. CRONOLOGIA DELS ESTUDIS GENÈTICS DEL CÀNCER DE PULMÓ

Des de la hipòtesi de Knudson de la doble inactivació dels supressors tumorals (Knudson, 1971), la tècnica clàssica per buscar-los ha estat la cerca de regions amb pèrdua d'heterozigositat: des de la determinació d'aquestes zones amb els polimorfismes de restricció (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*), passant pels microsatèl·lits i fins els polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*). Pel que fa als oncogens, es buscaven zones amplificades o sobreexpressades per Southern o Northern blot, i més tard per hibridació genòmica comparada (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*). A més, des de que es va descriure la primera mutació somàtica en tumors va ser clar que calia seqüenciar per trobar quins eren els gens del càncer. El mètode de seqüenciació de Sanger s'ha agilitzat molt des dels seus inicis i les tècniques de búsqueda de nous gens implicats en el procés tumoral també, s'han implementat estratègies com els *arrays* de SNPs o els *arrays* d'expressió (figura 13). Els *arrays* de SNPs permeten detectar zones amb pèrdua d'heterozigositat i delecionades, mentre que els *arrays* d'expressió, a banda de determinar signatures d'expressió de certs gens, determinen gens sobreexpressats o que han perdut l'expressió en tumors.

Els avenços més destacables han estat els que ha fet la seqüenciació. La seqüenciació del genoma humà, el 2001 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), va implicar un canvi d'era en la genòmica. Va impulsar infinits estudis que han contribuït a conèixer l'arquitectura i funció del genoma, va canviar el concepte de gen i va establir les seqüències de referència. Actualment ja s'ha entrat en una altra era, és la de les noves tecnologies de seqüenciació (NGS, *Next Generation Sequencing*) o seqüenciació

massiva que permeten llegir paral·lelament centenars de seqüències, amb una fidelitat molt alta i amb menys temps i cost. Aquestes noves tecnologies s'han aplicat a la seqüenciació del genoma i l'exoma sencers (WGS, *Whole Genome Sequencing* i WES, *Whole Exome Sequencing*, respectivament), i han substituït els mètodes que es basaven en *microarrays*, és el cas del ChIP-Seq, RNA-Seq o Methyl-Seq. Les NGS estan reemplaçant el mètode tradicional de seqüenciació per Sanger, encara que per certes aplicacions segueix sent el més avantatjós, com per avaluar regions molt concretes (pocs gens o *hot-spots*) o número mostral petit i per confirmar resultats obtinguts amb NGS (Naidoo et al., 2011).

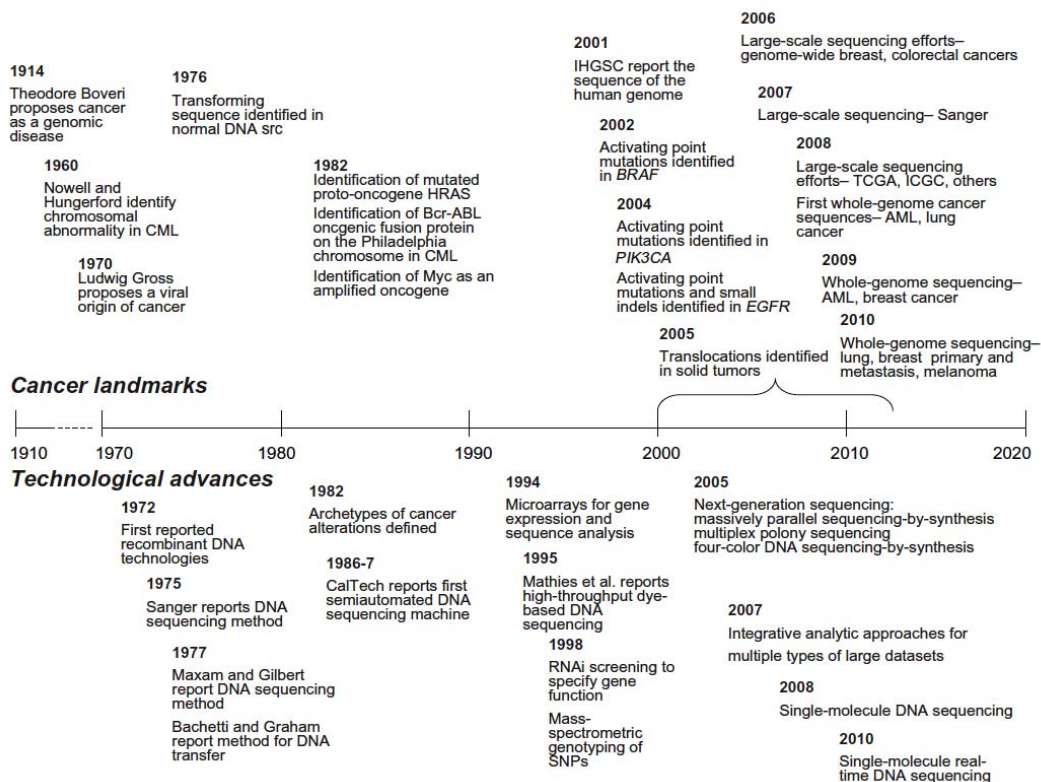


Figura 13. Línia del temps amb els avenços més importants de la tecnologia de la seqüenciació juntament amb els descobriments destacats en el camp de la investigació molecular del càncer. Obtinguda de (MacConaill et al., 2011)

Els avantatges més notoris que aporta l'ús de NGS en l'avaluació de tumors són la capacitat de detectar delecions, translocacions, insercions i alteracions en el número de còpies, a més de mutacions, al mateix temps (Ross and Cronin, 2011). També permet detectar mosaicismes, i això és molt important en la seqüenciació de tumors perquè sovint trobem la població de cèl·lules tumorals barrejada amb la població de cèl·lules normals i segons la proporció pot ser que les alteracions del tumor quedin emmascarades i indetectables utilitzant els mètodes de seqüenciació tradicionals. Les subpoblacions es detecten perquè en NGS es llegeixen molècules de DNA individuals, a diferència del que es fa en la seqüenciació de Sanger, que llegeix una població de molècules.

Actualment ja hi ha tecnologies de seqüenciació de tercera generació (TGS, *Third Generation Sequencing*), que ja no necessiten passos previs d'amplificació del genoma; i també s'estan

dedicant molts esforços en la seqüenciació d'una sola cèl·lula (Macaulay and Voet, 2014), que en tumors seria importantíssim per determinar-ne l'heterogeneïtat i per conèixer quins són els avantatges que donen alteracions concretes a les cèl·lules tumorals.

Tots aquests avenços han servit per trobar nous gens implicats en càncer de pulmó. La primera aplicació dels *arrays* de SNPs a tot el genoma en càncer de pulmó va ser el 2005, es va aplicar a unes 100 línies cel·lulars, va confirmar alteracions de número de còpies en gens ja coneguts i va determinar noves regions delecionades homozigòticament i amplificades (Zhao et al., 2005). Per exemple, va identificar una regió delecionada que contenia un putatiu supressor tumoral (*PTPRD*) i a aquest gen se li van trobar nivells baixos d'expressió, mutacions no sinònimes i delecions en un treball posterior fet amb *arrays* de CGH i que buscava específicament delecions homozigotes (Kohno et al., 2010).

Altres treballs es basen en la seqüenciació massiva però encara amb mètodes tradicionals, com el de Ding i col·laboradors, que va seqüenciar 623 gens en 188 adenocarcinomes (Ding et al., 2008). Aquest treball va correlacionar els estudis mutacionals amb dades de número de còpies i expressió i va identificar la implicació de nous receptor tirosina quinasa (*KDR*, *FGFR4* o *NTRK*) en la carcinogènesi pulmonar, a més de confirmar l'altíssima heterogeneïtat de gens afectats en aquest tipus de tumor i la variabilitat d'aquestes alteracions. Paral·lelament es publicaven articles que volien comprendre els perfils mutacionals en tot tipus de tumors: seqüenciació convencional es barrejava amb *arrays* de SNPs i de CGH i amb anàlisi bioinformàtic per trobar clústers de gens. És el cas de Bignell i els seus col·laboradors (Bignell et al., 2010) que buscaven clústers de supressors tumorals per delecions homozigotes i els distingeixen dels grups de gens que estan en llocs fràgils del genoma. Un treball similar però que ja inclou NGS és el de Kan (Kan et al., 2010), es centra en mutacions somàtiques i les contextualitza en les seves vies de senyalització, concloent que hi ha altíssima variabilitat mutacional entre els diferents tumors (pulmó, pàncrees, mama, ovari i pròstata), que en pulmó la taxa mutacional és especialment elevada, posa de manifest la via de les proteïnes G acoplades a receptors (GPCR) com una nova via alterada en càncer i, pel que fa a pulmó, confirma alguns dels resultats de Ding i identifica 239 nous gens afectats per mutacions somàtiques en adenocarcinoma.

Els mètodes de NGS també han evolucionat, i el 2008 es va publicar un estudi que mostrava la importància de la seqüenciació de *paired-end* per detectar arranjaments del genoma amb molta resolució, com fusions o duplicacions en tàndem (Campbell et al., 2008). Les fusions havien estat restringides a càncers hematopoiètics però des de llavors i després de la troballa de les fusions de *ALK*, han estat objecte de búsqueda activa en càncer de pulmó mitjançant NGS (Imielinski et al., 2012; Lee et al., 2010; TCGA, 2012).

Aquests treballs han anat en paral·lel amb el sorgiment de bases de dades disponibles públicament que aglutinen informació de tot tipus d'alteracions i que resulten molt útils per contextualitzar les mutacions en cada tipus tumoral: Sanger (Bamford et al., 2004; Forbes et al., 2006), Omnibus (Edgar et al., 2002) o Encyclopedia (Barretina et al., 2012), entre altres.

La implicació de les noves tecnologies en el camp de la genòmica és i seguirà sent de crucial importància per l'evolució dels diagnòstics i tractaments del càncer, fins a poder determinar el

perfil mutacional de cada pacient de forma eficient i poc costosa i tractar-lo amb el fàrmac més efectiu tenint en compte aquestes alteracions.

Objectius

El càncer de pulmó afecta 1,6 milions de persones a tot el món, i és la primera causa de mort per càncer. El promig de l'índex de supervivència als 5 anys per tots els càncers està al voltant del 50%, mentre que en el cas del càncer de pulmó no arriba a un 10%, és un dels més baixos.

El mal pronòstic del càncer de pulmó es deu al diagnòstic en fases avançades i a la manca de teràpies específiques pels seus subtipus. Tot i així ja hi ha teràpies basades en alteracions genètiques que es donen sobretot en adenocarcinomes d'individus no fumadors i que estan funcionant de manera exitosa. Malgrat que el número de pacients que avui en dia es poden beneficiar d'aquestes noves teràpies és baix, aquests avenços posen en relleu la importància del coneixement de les bases moleculars del càncer des d'un punt de vista de la biologia d'aquesta malaltia. Per tant, és necessari descobrir les alteracions genètiques del càncer de pulmó, les implicacions funcionals i les possibilitats de tractament molecular per millorar el pronòstic d'aquesta malaltia.

És en aquest context en el que es basen els objectius d'aquesta tesi doctoral, que són els següents:

- Objectiu principal:
 - Trobar nous gens supressors tumorals implicats en la carcinogènesis pulmonar.

- Objectius específics:
 - Objectius de caràcter genètic:
 - Estudiar el tipus i la freqüència de les alteracions d'aquests gens en tumors.
 - Estudiar el context en el que es produeixen aquestes alteracions. Per exemple, si tenen predilecció per algun tipus histopatològic o si coexisteixen o no amb alteracions en altres gens.

 - Objectius de caràcter funcional i bioquímic:
 - Establir un model en el que es restableixi l'expressió dels gens d'interès per estudiar la implicació d'aquests gens en la carcinogènesi.
 - Estudiar l'efecte fenotípic de la reintroducció dels gens en el model establert: proliferació, invasió, morfologia.
 - Identificació i/o estudi de les vies de senyalització cel·lular de les que forma part.

Material i mètodes

1. MATERIALS

1.1. DNAs

Els DNAs utilitzats en aquest treball, ja siguin de tumors primaris o bé de línies cel·lulars estables, provenien de quatre fonts diferents: *The Johns Hopkins University School of Medicine* (Baltimore, EEUU), la *Red del Banco de Tumores del CNIO* (Madrid, Espanya), la *Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori* (Milà, Itàlia) i *The National Cancer Center Research Institute* (Tokyo, Japó).

1.2. LÍNIES CEL·LULARS

Es van utilitzar línies cel·lulars de càncer de pulmó, de mama, de glioblastoma i de còlon. La majoria d'aquestes línies estan disponibles comercialment a l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les seves característiques es mostren detallades en la taula següent:

Nom	Lloc d'obtenció	Tipus de tumor	Creixement	Medi de cultiu
Calu3	Pulmó	AC	Adherent	DMEM
NCI-N417 (N417)	Pulmó	SCLC	En suspensió	RPMI
NCI-H2171 (H2171)	Pulmó	SCLC	En suspensió	HITES
NCI-H1573 (H1573)	Pulmó	AC	Adherent	ACL-4
NCI-H1299 (H1299)	Pulmó	LCC	Adherent	RPMI
NCI-H460 (H460)	Pulmó	LCC	Adherent	RPMI
NCI-H441 (H441)	Pulmó	AC	Adherent	RPMI
NCI-H1975 (H1975)	Pulmó	AC	Adherent	RPMI
SW1417	Colon	AC colorectal	Adherent	DMEM
T47D	Mama	Carcinoma ductal	Adherent	RPMI
NCI-H157 (H157)	Pulmó	SCC	Adherent	RPMI
T98G	Cervell	Glioblastoma multiforme	Adherent	DMEM
Platinum A (293T)	Ronyó	Epiteli	Adherent	DMEM*
NCI-H2170 (H2170)	Pulmó	SCC	Adherent	RPMI
Lu134	Pulmó	SCLC	En suspensió	RPMI

Taula 4. Línies cel·lulars utilitzades en aquesta tesi doctoral. *Aquesta línia creix suplementada amb puromicina (1 µg/ml) i blasticidina (10 µg/ml).

1.3. TUMORS I MICROARRAYS DE TEIXITS

Els tumors, conservats en blocs de parafina o de OCT, dels que disposàvem provenien de la *Red del Banco de Tumores del CNIO* (Madrid, Espanya).

Els TMAs estudiats estaven formats per mostres procedents de pacients de NSCLC en estadis I-II, de l'Hospital Universitari 12 de Octubre (Madrid, Espanya).

1.4. RATOLINS ATÍMICS

Van utilitzar-se ratolins mascles nu/nu de 4-5 setmanes d'edat (Harlan). Aquest ratolins no tenen limfòcits T madurs. Aquesta característica els fa ideals per ser models de càncer perquè no fan resposta immunitària en introduir-los cèl·lules tumorals no pròpies.

Tots els protocols de manipulació i disseny experimental van ser aprovats pel comitè del servei d'estabulari de l'IDIBELL.

2. MÈTODES

2.1. TÈCNiques PER L'ESTUDI GENÈTIC

EXTRACCIONS DE DNA I RNA

DNA:

Per les extraccions de DNA genòmic s'utilitzava el kit Genomic DNA Purification (Promega) i es seguien les instruccions del fabricant. De manera simple, inicialment es lisen les cèl·lules, després es tracta la mostra amb RNasa per eliminar l'RNA, es descarten les proteïnes mitjançant una precipitació salina i finalment es precipita el DNA amb isopropanol.

Alternativament, quan s'havia d'extreure DNA de teixits parafinats el protocol a seguir era el següent:

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: xilol, etanol absolut, isopropanol, buffer de la proteïnasa K (50 mM Tris pH 8,8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1% SDS), proteïnasa K (10 mg/ml), fenol:cloroform:isoamílic i aigua Braun.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Fer talls de la parafina que conté la peça d'interès.
2. Afegir 1 ml de xilol a l'ependorf que conté els talls de parafina i vortejar-ho.
3. Centrifugar 5 min, 12000 g.
4. Eliminar molt bé el xilol. Si ha quedat molta parafina, es poden repetir els passos 2 i 3.
5. Afegir 1 ml d'etanol i centrifugar 15 min, 12000 g (x2).
6. Eliminar l'etanol i afegir 400 µl de buffer i 7 µl de proteïnasa K a cada tub.
7. Deixar-ho 16-24 h a 58 °C.
Segons com ho vegem el dia següent, podem afegir 3 µl més de proteïnasa K i deixar-ho 1 h més.
8. Posar els tubs 8 min a 95°C per inactivar la proteïnasa K.
9. Deixar temperar els tubs.
10. Afegir 400 µl de fenol:cloroform:isoamílic. Agitar i centrifugar 15 min a 10000 g.
11. Agafar la fase aquosa i transferir-la a un altre tub per precipitar el DNA.
12. Afegir 2,5 volums d'isopropanol. Mesclar-ho i deixar-ho en fred (-20°C).
13. Centrifugar 30 min 13000 g.

14. Eliminar el sobrenedant i afegir etanol 70% al pellet. Barrejar-ho.
15. Centrifugar 30 min, 13000 g.
16. Eliminar l'etanol i deixar-ho assecar.
17. Resuspendre el DNA amb aigua Braun.

Finalment, per comprovar que la quantitat i qualitat del DNA és òptima, es mesura al NanoDrop la seva concentració i es corre una agarosa al 1% per visualitzar-lo.

RNA:

Depenent de l'ús posterior de l'RNA, l'extracció podia fer-se amb el kit Total RNA Isolation de Macherey-Nagel o amb mètode clàssic del Trizol.

El principi bàsic del kit són les seves 2 columnes diferents: en la primera es filtra el lisat, s'hi queden retengudes les proteïnes; i en la segona, s'hi enganxen l'RNA i el DNA. El DNA es degradat mitjançant l'addició de DNasa i després es precipita l'RNA amb aigua. Pel que fa al del Trizol, hi ha cinc passos generals: l'homogenització del teixit o les cèl·lules; la separació en fase aquosa (conté RNA), interfase (conté DNA) i fase orgànica (conté proteïnes); l'aïllament de l'RNA, el seu rentat, i finalment, la resuspensió.

PROTOCOL DEL TRIZOL PER EXTRACCIÓ D'RNA:

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: Trizol (Invitrogen), cloroform, isopropanol, etanol absolut, DNasa i el seu buffer (10x) (Maherey-Nagel), Phase Lock Gel Tubes (5 Prime) i aigua Braun.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Homogenitzar el pellet o de les cèl·lules en la placa amb 1 ml de Trizol. Passar a un eppendorf.
2. Incubar 5 min a temperatura ambient (RT).
3. Afegir 200 µl de cloroform i invertir-ho durant 15 s.
4. Incubar 2-3 min, RT.
5. Centrifugar 15 min, 12000 g, 4°C.
6. Transferir la fase aquosa en un eppendorf nou.
7. Afegir 0,5 ml d'isopropanol i barrejar-ho.
8. Incubar 10 min, RT.
9. Centrifugar 10 min, 12000 g, 4°C.
10. Eliminar l'isopropanol del pellet.
11. Afegir 1 ml d'etanol al 75% i centrifugar 5 min, 7500 g, 4°C. Repetir aquest rentat un altre cop.
12. Eliminar tot l'etanol del pellet i deixar que s'assequi parcialment.
13. Resuspendre el pellet amb aigua Braun.

Opcionalment, seguir el protocol amb una digestió del DNA i repurificació de l'RNA. Llavors, resuspendre l'RNA en 180 µl d'aigua.

14. Afegir 18 µl de buffer de la DNasa i 2 µl de DNasa als 180 µl d'RNA.

15. Incubar 10 min, 37°C.
16. Centrifugar els tubs amb fase abans d'utilitzar-los, 30 s, 12000 g.
17. Afegir la mostra al tub de fase i Trizol:cloroform a igual volum que la mostra (200 µl de mostra + 100 µl de Trizol + 100 µl de cloroform) i barrejar per inversió.
18. Centrifugar 5 min, 13000 g, 4°C.
19. Afegir 200 µl de cloroform i barrejar-ho bé.
20. Centrifugar 5 min, 13000 g.
21. Transferir 200 µl de la fase superior en un nou eppendorf (sense fase).
22. Afegir 160 µl d'isopropanol i barrejar-ho bé.
23. Centrifugar 1 h, 13000 g, 4°C.
24. Eliminar l'isopropanol i afegir 150 µl d'etanol al 70%.
25. Centrifugar 5 min, 13000 g, 4°C.
26. Eliminar tot l'etanol del pellet i deixar que s'assequi parcialment.
27. Resuspendre el pellet amb aigua Braun.

Finalment, per comprovar que la quantitat i qualitat de l'RNA és òptima, es mesura al NanoDrop la seva concentració i es corre una agarosa al 1% per visualitzar-lo. En un RNA no degradat es veuen dos bandes molt marcades corresponents als RNAs ribosomals 28S i 18S a una proporció de 2:1 (28S:18S).

TRANSCRIPCIÓ REVERSA DE L'RNA

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: Kit SuperScript II (Invitrogen, conté polimerasa (200 U/µl), buffer (5x) i DTT (0,1M)), hexàmers aleatoris (250 µg/ml), dNTPs (10mM), aigua Braun i RNAsin (40 U/µl; Promega).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Posar en un tub la quantitat necessària de RNA segons la concentració de RT que vulguem (1-3 µg). Afegir aigua Braun fins a 10 µl.
2. Afegir 1 µl de dNTPs i 1 µl d'hexàmers aleatoris a la mescla anterior.
3. Incubar 5 min a 65°C.
4. Deixar en gel durant 2 min.
5. Afegir a la reacció: 4 µl de buffer, 2 µl de DTT i 1 µl de RNAsin.
6. Incubar 2 min a 25°C.
7. Afegir 1 µl de la polimerasa SuperScript a cada tub.
8. Incubar-ho: 25°C, 10 min
42°C, 50 min
70°C, 15 min

SEQÜENCIACIÓ PEL MÈTODE DE SANGER

REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: aigua Braun, Taq polimerasa (1 U/µl) i el seu buffer (10x) (Biotools), *primers forward* i *reverse* (12,5 µM), dNTPs (10 mM), DMSO, DNA

motlle, buffer de càrrega 6X, SYBR Safe (Invitrogen), agarosa i TBE 5X (s'utilitza 0,5X; Tris-Bòric-EDTA; 54 g Tris, 27,5 g d'àcid bòric, 20 ml EDTA pH 8 0,5M, fins 1 l d'aigua).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Barrejar en un tub de PCR: 17,25 µl d'aigua Braun, 2,5 µl de buffer, 2 µl de dNTPs, 0,75 µl de cada *primer*, 0,75 µl de polimerasa i 1 µl de DNA motlle (30 ng).
2. Posar els tubs al termociclador amb unes condicions de temperatures i temps determinades. El que canviarem segons el fragment a amplificar seran la temperatura d'anellament dels *primers* i la durada de la fase d'extensió. Es mostren unes condicions estàndard.

Desnaturalització inicial:	94°C, 4 min
Reacció cíclica (35 cicles):	94°C, 30 s
	58-62 °C, 30 s
	72 °C, 30-60 s
Extensió final:	72°C, 10 min

3. Córrer els productes de PCR en una agarosa i comprovar si hi ha hagut amplificació, si la mida del fragment és la correcta i si el producte és únic i específic.

A cada electroforesis es carreguen 5 µl de producte barrejats amb buffer de càrrega i els gels es tenyeixen amb 5 µl de SYBR Safe /100 ml d'agarosa-TBE. Els gels es visualitzen en un G-BOX Chemi XT.

PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

Un cop es té el producte amplificat, cal eliminar les restes de components de la PCR que no ens interessin per poder continuar. S'ha realitzat de dos maneres diferents.

Principalment es purifiquen els productes de manera enzimàtica, molt àgil i senzilla, similar a com es fa amb el kit ExoSAP. S'utilitza una fosfatasa que elimina els dNTPs de la reacció i una exonucleasa per eliminar els *primers* de cadena senzilla.

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: exonucleasa I (20000 U/ml; BioLabs), fosfatasa antàrtica (5000 U/ml; BioLabs), buffer de la fosfatasa antàrtica (10x; BioLabs) i aigua Braun.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Preparar la mescla d'enzims: 50 µl d'exonucleasa I, 40 µl de fosfatasa antàrtica, 16 µl de buffer de la fosfatasa antàrtica, 144 µl d'aigua Braun.
2. Vortejar.
3. Afegir 2 µl de la mescla anterior per cada 8 µl de producte de PCR.
4. Posar-ho al termociclador: 37°C, 15 min
80°C, 15 min

Alternativament, quan es purifica d'una banda d'agarosa, es carrega tot el producte de PCR al gel i s'utilitza el kit GE Healthcare PCR DNA and gel band purification kit, seguint les instruccions del fabricant.

REACCIÓ DE SEQÜENCIACIÓ I PURIFICACIÓ

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: aigua Braun, buffer del BidDye (Applied Biosystems), ABI Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems), *primers forward* i *reverse* (3,2 µM), etanol/X-Terminator (Applied Biosystems) i Hi-Formamide (Applied Biosystems; si utilitzem etanol per precipitar).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Barrejar en un tub de PCR: 5,5 µl d'aigua Braun, 1,5 µl de buffer, 1 µl de cada *primer*, 1 µl de BigDye, 1 µl de producte de PCR motlle.
2. Posar els tubs al termociclador amb les següents condicions de temperatures i temps.

Desnaturalització inicial:	96°C, 4 min
Reacció cíclica (25 cicles):	96°C, 15 s
	50 °C, 15 s
	60 °C, 2-4 min
Extensió final:	60°C, 4 min
3. Un cop acabada la reacció de seqüenciació cal purificar els productes, ja sigui precipitant les plaques amb etanol o utilitzant X-Terminator (Applied Biosystems).
4. Córrer les reaccions en un seqüenciador: ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS

Les seqüències s'analitzen comparant-les amb la seva seqüència de referència. El programa més utilitzat és el MutationSurveyor (Softgenetics), que permet visualitzar els electroferogrames de les seqüències problema i control alhora, especialment útil per veure canvis en heterozigosi, dobles pics. També s'utilitza el programa BioEdit i es fan alineaments de seqüències amb l'aplicació en xarxa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Els *primers* utilitzats per l'amplificació i seqüenciació dels gens *SMARCA2*, *SFMBT1*, *SMAD2*, *PIK3R1* i *PARD3* es detallen al material annex (taules A1-5).

ESTUDI DE LA PÈRDUA D'HETEROZIGOZITAT (LOH)

Per determinar si una regió ha patit pèrdua d'heterozigositat s'amplifiquen zones que contenen microsatèl·lits altament polimòrfics utilitzant *primers* marcats fluorescentment. Després hi ha una separació i detecció d'aquests productes, cosa que ens permetrà distingir els al·lels segons la seva mida i intensitat.

Com que s'assumeix que en el teixit tumoral hi ha contaminació de teixit sa, mostres provinents de teixit sa i de teixit tumoral del mateix pacient es comparen per cada marcador de microsatèl·lit; s'analitza la diferència en la proporció dels al·lels en cada parella de mostres i així es determina si en el tumor hi ha LOH somàtica.

Per seleccionar els marcadors que flanquegen la nostra regió d'interès utilitzem el MapViewer i les bases de dades Genethon, deCODE o Marshfield.

El protocol és exactament el mateix que el d'una PCR convencional, excepte en tres punts:

- Els *primers* estan marcats fluorescentment i sovint ja es troben dissenyats a UniSTS (NCBI).
- No pot arribar al punt de saturació, per això es fa entre 28-32 cicles.
- Després de la PCR els productes es visualitzen en una agarosa i es corren directament en un seqüenciador.

Per analitzar els resultats només ens donen informació els al·lels que són heterozigots en el teixit sa, s'utilitza l'altura de pic de cada al·lel i es fan les següents ràtios:

$$\text{Ratio d'altura de pic} = \frac{\text{altura de pic de l'al·lel 1}}{\text{altura de pic de l'al·lel 2}}$$

$$\text{Ratio de LOH} = \frac{\text{Ratio d'altura de pic de la mostra tumoral}}{\text{Ratio d'altura de pic de la mostra normal}}$$

Ràtios de LOH majors o iguals a 1,35 o menors o iguals que 0,67 es consideren clarament indicatives de LOH.

Els microsatèl·lits de *PARD3* es distribueixen al llarg de 4 Mb al braç petit del cromosoma 10. Els *primers* utilitzats per la seva amplificació es detallen al material annex (taula A6).

MS-MLPA

MS-MLPA (de l'anglès, Methylation Specific-Multiplex Ligation dependent Probe Amplification), és una tècnica que ens permet avaluar l'estat de metilació i de número de còpies d'un gen determinat (Nygren et al., 2005; Schouten et al., 2002).

Per a la realització d'aquesta tècnica és necessari el disseny d'una barreja de sondes. La barreja de sondes produïda per *PARD3* consta de 33 sondes: 15 detecten canvis de número de còpies, i entre aquestes, 3 també permeten detectar metilació en el promotor; 7 són sondes adjacents al gen d'interès, i 8 són sondes de referència. A més, en totes les mesclades hi ha sondes control per la quantitat de DNA, per la desnaturalització i pel gènere de la mostra.

Els experiments de MS-MLPA es fan sempre amb mostres de referència, que consisteixen en DNA comercial masculí i femení, i en DNA extret de teixit normal per als tumors primaris. Resumint, el DNA es desnaturalitza i es deixa hibridant amb les sondes, a continuació, els híbrids DNA-sondes són lligats o lligats i digerits, i finalment, sobre els productes d'aquestes reaccions es fa una PCR, que té com a resultat productes de diferents mides. D'aquesta manera, s'obté més o menys amplificat de cada sonda segons la seva abundància de DNA a la mostra. A més, com que la digestió és dependent de metilació, comparant els productes digerit i no digerit de la mateixa mostra, es pot conèixer l'estat de metilació del promotor (figura 14).

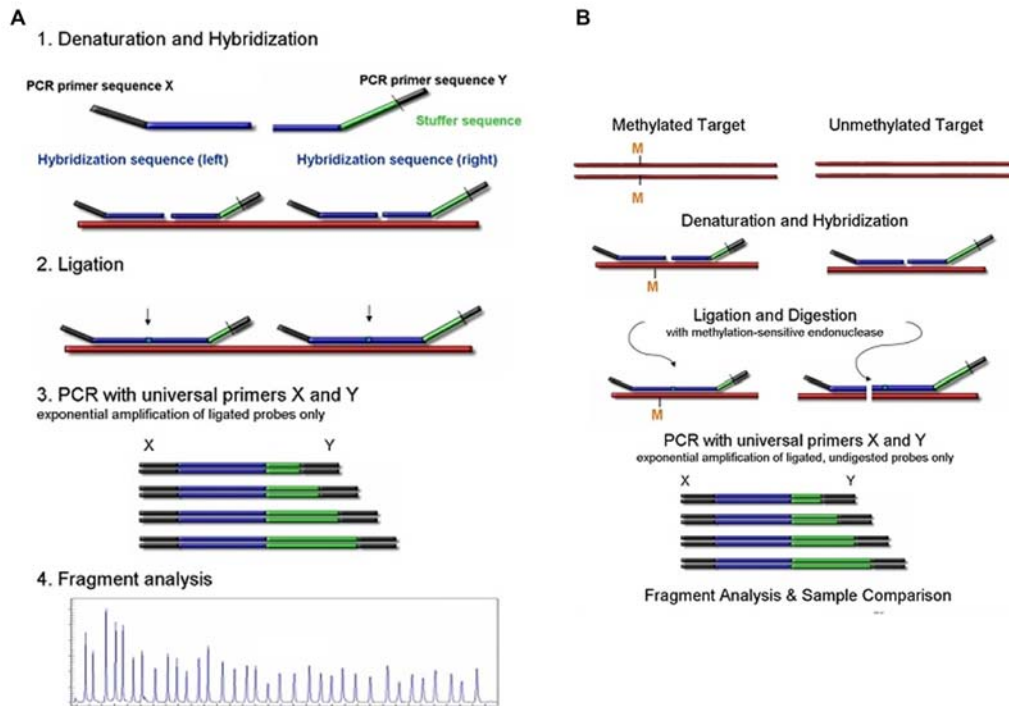


Figura 14. Representacions de les tècniques de MLPA i MS-MLPA. **A.** MLPA, la quantitat d'amplificat depèn de la presència de la seqüència en la mostra i del pas de lligació. **B.** MS-MLPA, la digestió és el pas que determina si hi haurà amplificat o no, cosa que dependrà de l'estat de metilació. Obtingut de la web de la companyia MRC-Holland (www.mlpa.com).

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: aigua Braun, MLPA buffer (MRC-Holland), *probemix* (MRC-Holland), buffer A de la lligasa (MRC-Holland), buffer B de la lligasa (MRC-Holland), lligasa (MRC-Holland), enzim de restricció HhaI (Promega), SALSA mix de primers (MRC-Holland), SALSA polimerasa (MRC-Holland) i DNA motlle (20 ng/μl).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Posar 5 μl de la mostra en un tub de PCR. Fer una desnaturalització inicial a 98°C, 5 min.
2. Afegir: 1,5 μl de buffer MLPA i 1,5 μl de *probemix*.
Deixar al termociclador: 95 °C, 1 min
60 °C, 16 h
3. Afegir: 3 μl de buffer de la lligasa A i 10 μl d'aigua.
Subdividir el contingut de l'ependorf en 2 amb 10 μl a cada alíquota.
4. Al tub 1 (serà on determinarem número de còpies), afegir: 8,25 μl d'aigua, 1,5 μl de buffer de la lligasa B i 0,25 μl de lligasa.
Al tub 2 (serà on determinarem l'estat de metilació), afegir: 7,75 μl d'aigua, 1,5 μl de buffer de la lligasa B, 0,25 μl de lligasa i 0,5 μl de HhaI.
Deixar al termociclador: 48 °C, 30 min
98 °C, 5 min
5. Finalment, afegir a cada eppendorf: 3,75 μl d'aigua, 1 μl de SALSA mix de primers i 0,25 μl de polimerasa.

Deixar al termociclador:

Reacció cíclica (35 cicles):	95°C, 30 s
	60 °C, 30 s
	72 °C, 30 s
Extensió final:	72°C, 20 s

6. Córrer els productes de PCR en uns seqüenciador i interpretar els resultats mitjançant el programa Coffalyser (Coffa et al., 2008). El programa normalitza les altures de pic de cada amplificat problema amb les altures de pic dels amplificats pertanyents a gens de referència dins de la mateixa mostra. També normalitza tots els resultats als resultats de les mostres de referència. Donant un valor final per cada amplificat relacionat amb el número de còpies del gen en qüestió: valors majors o iguals a 1,2 es consideren indicatius d'amplificació i valors menors o iguals a 0,8, de deleció. Pel que fa a l'avaluació de la metilació, les altures de pic són normalitzades de la mateixa manera, però el que determina si hi ha o no metilació és la ratio entre la mostra digerida i no digerida (figura 14). La mostra digerida és la que indica l'estat de metilació, doncs si hi ha metilació l'enzim de restricció no podrà actuar, i hi haurà producte amplificat (valor final=1); contràriament, si no hi ha metilació, el producte de la lligació serà digerit i no es produirà amplificat (valor final=0). La relació d'aquests valors amb el valor de la mateixa sonda en la mostra no digerida, que tindrà un amplificat normal (valor final=1), serà de 1 si hi ha metilació i de 0 si no n'hi ha. Per cada sonda s'estableix el seu grau de metilació, que serà absent (valors $\leq 0,2$); mitja (valors $>0,2$ i $\leq 0,5$); moderada (valors $>0,5$ i $\leq 0,8$); i alta (valors $>0,8$ i ≥ 1).

SEQÜENCIACIÓ DE BISULFIT

Aquesta seqüenciació s'utilitza per determinar la metilació de les illes CpG i consisteix en tractar el DNA amb bisulfit abans de seqüenciar-lo. El bisulfit desamina les citosines i les converteix en uracils, però aquesta conversió no es pot donar en les citosines metilades. D'aquesta manera, en seqüenciar, sabrem si hi ha o no metilació segons si hi ha o no canvi de base.

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: Kit DNA Methylation Gold (Zymo Research), Kit del *pGEM-T easy* (Promega), Kit de minipreps (Plasmid DNA Purification; Macherey-Nagel), *primers* (per amplificar la illa CpG (taula de l'annex A7) i per seqüenciar el vector *pGEM-T easy*), DNA problema i reactius comuns de PCR, seqüenciació i transformació de bactèries.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. El DNA es modifica amb el kit DNA Methylation Gold, seguint les indicacions del fabricant.
2. Es fa una PCR amb *primers* que flanquegin la regió d'interès.
3. El producte es purifica i s'insereix en el vector *pGEM-T easy*, es transforma i es creixen colònies.
4. Es piquen un mínim de 8 colònies per cada amplicó per obtenir la freqüència de metilació de cada CpG. Es creixen i se n'extreu el DNA plasmídic.
5. Seqüenciació dels inserts, que contenen la nostra seqüència d'interès.

6. Les seqüències s'alineen amb el programa BioEdit i es representen els mapes utilitzant l'aplicació BSmappR.

2.2. TÈCNiques PER LA GENERACIÓ DE VECTORS I CÈL·LULES MODIFICATEDES

CLONATGE

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: reactius comuns de PCR, seqüenciació, RT-PCR, Kit pGEM-T easy, Kit de minipreps (Macherey-Nagel) enzims de restricció i els seus buffers (Fermentas), lligasa T4 (20000 U/ μ l) i els seu buffer (New England Biolabs), bactèries JM109 i DH5 α , medi de cultiu LB, plaques de LB-agar, ampicil·lina, IPTG, X-Gal, glicerol, kit de maxipreps (Macherey-Nagel).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Amplificar el gen d'interès, a partir de cDNA, amb la polimerasa Phusion i purificar el producte. Els *primers* es dissenyen per amplificar tot el gen i incorporar dianes d'enzims de restricció a cada extrem.
2. *A-TAILING*: La polimerasa Phusion no deixa extrems cohesius, per això cal afegir-li una adenina al producte per clonar en el vector pGEM-T easy.
Barrejar en un tub de PCR: 1-7 μ l de fragment de PCR purificat, 1 μ l buffer de la polimerasa 10X, 0.2 mM dATP, 5U de polimerasa (EcoStart) i aigua fins a 10 μ l.
Incubar la reacció: 94°C, 5 min
70°C, 30 min
5. Lligació amb T4 al vector (pGEM-T easy): 5 μ l del buffer 2X de la lligasa, 1 μ l (50ng) del vector pGEM-T easy, 3 μ l del producte de *a-tailing* i 1 μ l de la lligasa T4.
Incubar la reacció 1 h, RT o tota la nit (ON), 4°C.
6. Transformar en bactèries JM109 i plaquejar en plaques de LB-ampicil·lina/X-gal/IPTG.
7. Després del cultiu, les colònies d'interès són les de color blanc. D'entre les que han crescut, les blaves poden metabolitzar la X-gal perquè tenen l'operó LacZ sencer, mentre que les de color blanc, no poden metabolitzar aquest compost perquè el nostre insert s'ha posat enmig de l'operó LacZ i l'ha partit. Picar colònies i fer un cultiu líquid ON en LB-ampicil·lina.
8. Picar mitja colònia per créixer en un cultiu líquid ON en LB-ampicil·lina i l'altra mitja per fer una PCR i comprovar si amplifica l'insert d'interès.
9. Fer una miniprep per obtenir moltes còpies del vector amb l'insert. Segons instruccions del fabricant.
10. Digestions del plàsmid acceptor final en el que posaré el gen d'interès i del pGEM-T easy per obtenir l'insert. Seran digestions dobles amb els enzims de restricció que tallen les dianes que flanquegen el gen d'interès.
11. Purificació de les bandes que m'interessen: insert i vector digerits.
12. Lligació del plàsmid final i de l'insert amb la lligasa T4 seguint el protocol de l'enzim. Utilitzant la ratio insert-plàsmid 1/3 i fent els càlculs amb la fórmula:

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng vector} \times \text{Kb insert}}{\text{kb vector}} \times \frac{3}{1}$$

13. Transformació dels productes de lligació en bacterïes DH5 α , cultiu en placa i cultiu líquid ON.
14. Seqüenciació de tot l'insert per garantir que no s'ha introduït cap mutació.
15. Cultiu líquid més gran, reserva de *stock* en glicerol i maxiprep. Segons instruccions del fabricant.

MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Per generar els diferents mutants de PAR3 es segueix la tècnica de mutagènesis dirigida emulant el que es faria amb el kit de mutagènesis de la Phusion. Es generen *primers* que ens permetin fer les delecions o inserir canvis puntuals i s'amplifica el vector sencer per PCR; posteriorment es purifica el fragment amplificat, es lliga i es transforma en bacterïes. Finalment, es comprova si la mutagènesis és correcta i es procedeix a amplificar els vectors mitjançant maxipreps.

TRANSFECCIONS I INFECCIONS

TRANSFECCIÓ AMB LIPOFECTAMINA

S'utilitza aquesta transfecció pels vectors no virals. La lipofectamina empaqueta el DNA i forma liposomes, que poden fusionar-se amb les membranes cel·lulars i introduir els plàsmids a les cèl·lules de manera molt eficient.

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: vector, cèl·lules d'interès a modificar, lipofectamina 2000 (Invitrogen) i OptiMEM (Gibco).

El protocol a seguir és el recomanat pel fabricant, utilitzant una ratio optimitzada de μg de vector: μl de lipofectamina de 1,5:1.

PRODUCCIÓ DE PARTÍCULES VÍRIQUES I INFECCIÓ

S'utilitza aquest protocol pels vectors del tipus viral. Els nostres vectors virals no contenen els gens gag, pol i env, necessaris per la replicació vírica. Per permetre l'encapsidació i replicació viral del nostre constructe cal utilitzar cèl·lules empaquetadores que contenen aquests gens o cotransfectar les cèl·lules empaquetadores amb plàsmids pels mateixos.

Per vectors del tipus retroviral s'utilitza el protocol detallat a continuació; mentre que per vectors del tipus lentiviral s'utilitzen les cèl·lules empaquetadores 293-T i es cotransfecten amb els vectors pM2G i pSPAX.

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: cèl·lules Platinum A (Amfotròpiques; Cell Biolabs), cèl·lules d'interès a modificar, polietilenimina (PEI), medi de cultiu comú, OptiMEM (Gibco), vectors virals, polibré (Sigma-Aldrich), puromicina i geneticina (G418).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

Primer dia:

1. Sembrar 2.500.000 cèl·lules Platinum en una placa P10. Pel següent dia volem una confluència del 80-90%.

Segon dia: transfectar les cèl·lules Platinum.

2. Preparar una mescla de transfecció amb 10 µg de vector, 60 µl de PEI i fins a 200 µl d'OptiMem. Deixar-la incubant a RT 20 min.
3. Canviar el medi de les cèl·lules Platinum per 5 ml de medi fresc i afegir-hi la barreja anterior.
4. Després de 6 h, canviar el medi per medi fresc i deixar-ho a l'incubador 48 h.

Tercer dia:

5. Sembrar les cèl·lules d'interès perquè en 24 h tinguin una confluència del 60-70%.

Quart dia:

6. Recollir el medi de la placa de les Platinum, ara ja és sobrenedant víric amb una concentració elevada de partícules virals. Filtrar-lo amb un filtre de 0.45 µm. I afegir-hi 0,5 µl de polibré per cada ml de medi.
7. Aspirar el medi de les cèl·lules a infectar i canviar-lo pel sobrenedant víric.
8. Després de 6 h, afegir un volum de medi normal a la placa de cèl·lules a infectar.

Sisè dia:

9. En 48-72 h, podem eliminar el sobrenedant viral i afegir medi amb antibiòtic de selecció per estabilitzar els constructes a la cèl·lules: puromicina (1-3 µg/ml) o geneticina (400-800 µg/ml).

2.3. TÈCNiques PER ESTUDIAR L'EXPRESSIÓ

WESTERN BLOT

Aquesta tècnica serveix per detectar nivells de proteïna en extractes de teixits o cèl·lules. Consisteix en la separació electroforètica de proteïnes en gels d'acrilamida, la transferència de les proteïnes a una membrana i la posterior detecció de les proteïnes d'interès utilitzant anticossos específics.

EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES

Per aquesta tècnica es va utilitzar buffer de lisi (amb detergents suaus; 10mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,5% Tritó X-100, 0,5% NP-40 (RT de Nonidet), 5mM EDTA, 10% sucrosa; just abans d'utilitzar, afegir 10 mM NaF, 5mM NaVO₄, mescla d'inhibidors Roche Complet Mini) i PBS fred.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Netejar les cèl·lules amb PBS.
2. Lisar-les en buffer de lisi i recuperar el volum en un eppendorf.
3. Sonicar 10 min al màxim de potència amb intervals de 30 s/30 s.
4. Centrifugar durant 15 min a màxima velocitat, 4°C.
5. Les proteïnes són al sobrenedant, descartar el pellet.

Posteriorment, la concentració de les proteïnes en cada extracte es mesurava amb el kit DC Protein Assay (BioRad), que es basa en el mètode de quantificació de Lowry. Aquest mètode tradueix la concentració de proteïna a color, perquè produeix espècies reduïdes de color blau que té màxima absorbància a 750 nm.

L'escala es fa amb BSA diluït (entre 5 i 0,06 µg/µl) i les mesures es realitzen seguint les instruccions del fabricant del kit.

EL WESTERN BLOT

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: acrilamida, aigua destil·lada, buffer concentrador (0,5M Tris-HCl, pH 6,8), buffer separador (1,5M Tris-HCl, pH 8,8), SDS 10%, TEMED, PSA (persulfatamoni) 10%, buffer de càrrega (utilitzat a 1X; per preparar 100 ml de 6X: 36 ml glicina, 12,8 g SDS, 35 ml tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 5 ml beta-mercaptoethanol, aigua fins 100 ml, blau de fenol), membrana de PVDF, paper Whatman, laemli 5X: 720 g glicina, 15,1 g tris, 50 g SDS, fins a 10 l d'aigua, etanol, Ponceau, llet en pols, TBS-tween, albúmina bovina fetal (BSA), azida sòdica, anticossos primari i secundari i revelador Illuminata / Immobilon (Millipore).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Fer el gel d'acrilamida. La seva concentració dependrà de la mida de les proteïnes que volem detectar.
2. Calcular el volum necessari de cada mostra segons la quantitat de proteïna que volguem carregar (20-50 µg). Afegir el buffer de càrrega i bullir la mescla 5 min a 95 °C.
3. Posar el gel d'acrilamida a la cubeta amb Laemmli i carregar les mostres.
4. Córrer el gel.
5. Activar la membrana:
 - Etanol absolut, 15 s.
 - Aigua destil·lada, 2 min.
 - Buffer de transferència (Laemmli amb el 20% d'etanol), 5 min.
6. Preparar el Sandwich per posar el gel a transferir. Del pol positiu al negatiu, posarem: esponja-2 papers Whatman-gel-membrana activada-2 papers Whatman-esponja.
7. Córrer la transferència: 400 mA, 100 min. Mantenir en fred i en agitació el buffer de transferència.
8. Treure la membrana i tenyir-la amb Ponceau per veure si la transferència ha estat correcta.
9. Bloquejar la membrana 45 min amb llet al 5% en TBS-tween.
10. Netejar la membrana amb TBS-tween.
11. Hibridar l'anticòs primari, dilució depenent de l'anticòs en BSA al 2% amb azida sòdica, ON a 4°C o 1 h a RT.
12. Rentat amb TBS-tween (3x5 min).
13. Hibridar l'anticòs secundari, dilució 1:5000 en llet al 5%, 1 h a RT.
14. Rentat amb TBS-tween (3x5 min).
15. Afegir revelador a la membrana i revelar-lo en una màquina reveladora en sala fosca.

Els resultats s'avaluen directament o les bandes poden quantificar-se utilitzant l'aplicació que té el programa ImageJ per tal fi.

ANTICÒS	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓ D'ÚS
PAR3	Millipore	1:2000/1:500*
P85 α	Millipore	1:1000
P85 α +P85 β	Millipore	1:1000
aPKC	Santa Cruz	1:500
p-aPKC (T410)	Abcam	1:200*
STAT	Cell Signaling	1:2000
p-STAT (Y705)	Cell Signaling	1:2000
HA	Sigma-Aldrich	1:2000/1:300*
TUBULINA-HRP	Abcam	1:15000
ACTINA	Santa Cruz	1:10000
GAPDH	Producció del CNIO	1:2000
RAC1	Millipore	1:500
AKT	Cell Signaling	1:2000
p-AKT Thr (T308)	Cell Signaling	1:2000
p-AKT Ser (S473)	Cell Signaling	1:2000
p-S6 (S235/S236)	Cell Signaling	1:1000
S6	Cell Signaling	1:1000
PTEN	Cell Signaling	1:1000
P110 α	Cell Signaling	1:1000
P110 β	Cell Signaling	1:1000
P110 γ	Cell Signaling	1:1000
p-ERK (T183/Y185)	Sigma-Aldrich	1:5000
ZO-1	Invitrogen	1:200*

Taula 5. Anticossos utilitzats. *Utilitzats per immunofluorescència.

ARRAYS D'EXPRESSIONÓ

Són una tècnica d'anàlisi massiu de l'expressió gènica, consistent en un suport de vidre que conté milers d'àcids nucleics adherits formant spots. L'RNA d'interès es marca i s'hibrida i la senyal que queda es llegeix; depenent de la intensitat de cada *spot* es determina el nivell d'expressió del gen en qüestió en la mostra problema.

En el nostre cas s'utilitza la plataforma d'Agilent, SurePrint G3 GE 8x60K, que detecta 60.000 transcrits.

L'array va realitzar-se als serveis científic-tècnics del Centre de Regulació Genòmica (CRG) i allà es van enviar 100 ng d'RNA extret amb trizol i de molt bona qualitat, analitzat amb Bioanalyser (RIN >9) i amb Nanodrop (Valor de ratio A260/A280 >1.8 i valor de ratio A260/A230 >1.5).

Les motres que es van analitzar, en triplicat, van ser: H157tr, H157tr-wtPAR3, H157tr-D41-R74del totes tres induïdes 24 h amb doxiciclina; i H2171-*mock*, H2171-PIK3R1.

Els resultats ja ens van arribar normalitzats i es van seleccionar els gens que canviaven l'expressió seguint els següents criteris:

- En la comparativa entre H157tr i H157tr-wtPAR3: pValor ajustat <0,05; i que aquest criteri es complís en més de la meitat de les sondes del mateix gen.
- En la comparativa entre H157tr i H157tr-wtPAR3: Fold Change >1,5

Als gens que canvien d'aquesta manera amb l'addició de PAR3 els anomenem la signatura de PAR3.

Posteriorment aquesta llista va analitzar-se amb el Gene ontology ([david.abcc.ncifcrf.gov/](http://www.ebi.ac.uk/GO/)) o amb l'aplicació String (<http://string-db.org>), per trobar diferents relacions funcionals. I també es va utilitzar el programa d'enriquiment de sets de gens (GSEA)

(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), per veure similituds i diferències en els gens que incrementen o disminueixen l'expressió en diferents condicions.

PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: cDNA de les mostres problema, cDNA *pool* (Stratagene), mescla de *primers* per cada gen (50 µM cada *primer*) i SYBR green (Applied Biosystems).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Preparació de les mostres: els cDNAs problema es deixaven a 1 µg/µl i els cDNAs de la recta patró (que provenien del *pool* d'RNA) es deixaven a diferents concentracions; des de 12,5 µg/µl, fins a 0,012 µg/µl, fent dilucions seriadades 1:4.
2. Mix per cada pouet: 4,95 µl SYBR green, 0,05 µl *primer* mix i 5 µl de cDNA mostra (5-20 ng).
Les reaccions es fan en triplicat per cada punt.
3. Amplificació en el detector ABI Prism 7900.
Desnaturalització inicial: 95°C, 10 min
Reacció cíclica (40 cicles): 95°C, 15 s
60 °C, 15 s
4. Els resultats s'interpreten utilitzant el programa SDS 2.4 i el mètode de recta patró. Amb l'escala, es generen corbes per cada gen que relacionen ng-Ct i els resultats de cada mostra s'interpolen. Després els ng es relativitzen amb els dels gens ACTB i PP1A (utilitzats com a gens *housekeeping*).
5. Posteriorment s'avaluen les diferències d'expressió entre mostres utilitzant el programa Prism.

IMMUNOHISTOQUÍMICA

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: talls de teixit en parafina o de microarrays de teixits (TMAs), xilol, etanol, peròxid d'hidrògen, citrat sòdic, PBS, anticòs (PAR3), diluent bloquejador (DAKO), Super sensitive TM Link-Label IHC Detection System (Biogenex), DAB (Invitrogen) i hematoxilina.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Incubar els talls (3 µM) 56°C, ON.
2. Desparafinar: Xilol (3x10 min) - EtOH 100% (3x5 min) - EtOH 96% (3x5 min) - EtOH 70% (1x5 min).
3. Eliminació de la peroxidasa endògena: H₂O₂ 1% en PBS 1x 15 min.
4. Desemmascament de l'epítot: buffer citrat 10mM, pH 9 (0,1M = 29,4 g de citrat sòdic en 1l aigua destil·lada). En un bany bullent 30'. Després temperar mínim 1 h a RT.
5. PBS 1x (3x5 min).
6. Anticòs primari: Rb-PAR3 1:1000 diluït en diluent bloquejador. ON a 4°C i en cambra humida.
7. PBS 1x (3x5 min).

8. Anticòs secundari en cambra humida: Link (20' RT) - PBS 1x (3x5') – Label (20' RT).
9. PBS 1x (3x5 min).
10. DAB: 1 gota de cromogen/1 ml buffer. Afegir la mescla a les mostres i deixar-la fins que pugi el color marró, màxim 10 min.
11. PBS 1x (3x5 min).
12. Hematoxilina 1:10, aproximadament 1 min.
13. Esbandir amb aigua de l'aixeta.
14. Deshidratació i muntatge: EtOH 70% (1x5 min) - EtOH 96% (3x5 min) - EtOH 100% (3x5 min) - Xilol (3x10 min). Sense deixar que s'assequi, afegir DPX i el cubre.

Les imatges de les immunohistoquímiques de PAR3 en tumors primaris van avaluar-se en un microscopi Leica DM-1000. Quatre investigadors, entre ells dos patòlegs, van avaluar les seccions utilitzant criteris uniformes. La tinció de PAR3 es va avaluar de la manera següent: tinció negativa, (-); baixa tinció, (+); tinció moderada, (++); i tinció alta, (+++).

IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: paraformaldehid (Electron Microscopy Sciences), BSA, Triton X-100, PBS, anticòs primari, anti-mouse IgG-Alexa488 i IgG-Alexa594 (Molecular Probes), DAPI i Mowiol (Sigma-Aldrich).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Rentar en PBS.
2. Fixar amb paraformaldheid al 4%, 20 min, RT.
3. Rentar amb PBS (3x5 min).
4. Permeabilització: 2% BSA, 0,1% Triton; 30 min, RT.
5. Bloquejar: 2% BSA, 5% sèrum de cabra; 3 h.
6. Rentar amb PBS (3x5 min)
7. Anticòs primari: dilucions 1:200-1:500 diluït en solució de bloqueig. ON a 4°C i en cambra humida.
8. Rentats amb PBS-0,1% tween (3x5 min)
9. Anticòs secundari: AntiRb Alexa-488 1:200 diluït en solució de bloqueig. 1 h a RT i en cambra humida.
10. Rentats amb PBS-0,1% tween (3x5'). En el segon rentat es posa el DAPI 1 µM.
11. Esbandir ràpid amb aigua.
12. Muntar amb Mowiol.

La fluorescència es va analitzar utilitzant el microscopi confocal Leica TCS SP5 i el microscopi Zeiss Axio Observer Z1 Apotome. Posteriorment es va treballar amb les imatges utilitzant el programa FIJI.

2.4. TÈCNIQUES PER ESTUDIS DE CARÀCTER FUNCIONAL

IMMUNOPRECIPITACIÓ

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: anticòs anti HA (Sigma-Aldrich), A-agarose *beads* (Millipore), buffer de lisi, RIPA buffer (50mM tris HCl pH8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 0.5% DOC, 0.1% SDS), buffer 6X de càrrega de proteïnes.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Transfectar les cèl·lules.
2. Preparar del lisat. Quantificar i preparar 400 µg en 500 µl de buffer de lisi.
3. Preparar les *beads*: preparar tot el volum que necessitem per l'experiment. Fer-los-hi 3 rentats amb 1 ml de buffer de lisi de 30" a 5000g. Resuspendre-les amb buffer de lisi en el seu mateix volum. 50% *beads*+50% buffer=*beads*, a partir d'ara.
4. Prerentat: afegir 50 µl de *beads* al lisat i incubar-ho 1 h a 4°C en nòria.
5. Centrifugar: 30 s, 5000g. Conservar el sobrenedant i apartar-ne 1:15 part del volum, serà l'*input*.
6. Immunoprecipitació: afegir l'anticòs al sobrenedant (3 µl). Incubar-ho ON a 4°C a la nòria.
7. Afegir 50 µl de *beads* al lisat i incubar-ho 2 h a 4°C en nòria.
8. Centrifugar 30 s, 5000g i conservar el sobrenedant, serà el *flow-through*.
9. 4 rentats de 30 s a 5000g: 3 rentats amb 1 ml de buffer de lisi i un rentat amb 1 ml de buffer RIPA. Mantenir els sobrenedants, seran els *wash*.
10. Conservar les *beads* i resuspendre-les en buffer 2x de proteïna. Bullir-les a 95°C, 5 min i fer el *western blot*.

De la mateixa manera, per determinar l'activació de RAC1 (RAC1-GTP) es va utilitzar la immunoprecipitació, amb un kit específic RAC1/CDC42 activation assay (Millipore). En aquest cas, s'utilitza una resina especial, unida a PAK-1, per immunoprecipitar GTP i després es detecta la proteïna RAC1 coimmunoprecipitada mitjançant *western blot*.

ASSAIG DE FORMACIÓ DE COLÒNIES

Els assajos de formació de colònies es van fer utilitzant els vectors d'expressió pcDNA4/TO de forma transitòria.

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: cultiu cel·lular, medis i reactius per transfecció, PBS i cristall violeta (0,07 g/100 ml).

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Sembrar 3.000.000 de cèl·lules de la línia H157 en plaques de 100 mm de diàmetre.
2. 24 h després, transfectar cada placa amb un constructe diferent de PAR3.
3. 24 h després, comptar les cèl·lules i sembrar-ne 1.000.000 per triplicat en plaques de 100 mm de diàmetre.
4. Posteriorment, les cèl·lules es sotmeten a pressió antibiòtica (zeocina).

5. Quan les colònies han crescut, aproximadament al cap de dos setmanes, tenyir-les amb cristall violeta: eliminar el medi i fer 2 rentats amb PBS, fixar 5 min amb paraformaldèhid 1% en PBS, rentar amb PBS. Afegir el cristall violeta i deixar-ho 2 h a RT en agitació. Finalment, rentar amb aigua destil·lada i deixar-ho assecar.

El número de colònies es va contar visualment. Cada assaig es va realitzar per triplicat, i les diferències en el número final de colònies per cada condició es van analitzar estadísticament amb el programa Prism.

ESTÍMULS AMB FACTORS DE CREIXEMENT I INHIBIDORS

Els tractaments fets a les cèl·lules es mostren resumits en la taula següent:

REACTIU	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓ FINAL D'ÚS	DIANA
IGF1	PeproTech	10 nM	Factor de creixement
LY294002	Calbiochem	100 µM	Inhibidor de PI3K
MG-132	Sigma-Aldrich	10 i 20 µM	Inhibidor del proteasoma
ALLN	Sigma-Aldrich	20 i 60 µM	Inhibidor del proteasoma i calpaïnes
TOCILIZUMAB	Roche	25-700 µg/ml	Inhibidor del receptor de IL6

Taula 6. Compostos utilitzats en tractaments cel·lulars en aquest treball.

Els tractaments amb IGF1 i LY294002 es feien després de deprivar les cèl·lules ON i duraven 5 h.

Els tractaments amb inhibidors del proteasoma es feien 9 h després de la inducció en els models induïts i durant 8 h i 24 h. En els models transitoris es posaven els inhibidors després de 24 h de la transfecció i duraven 5 h i 15 h.

Els tractaments amb tocilizumab es van provar en un rang temporal d'entre 6 i 24 h.

EL CALCIUM SWITCH

El *Calcium Switch* consisteix en eliminar el calci del medi de cultiu cel·lular i reintroduir-lo posteriorment, com que el calci és necessari per les unions entre cèl·lules, es força que les cèl·lules es desenganxin entre sí i de la placa i en tornar a afegir calci pot avaluar-se la dinàmica de formació d'unions (Izumi et al., 1998). En el nostre cas, el calci s'elimina mitjançant l'addició al medi d'EGTA 4mM, i aproximadament 30 min després, s'elimina el medi i se n'afegeix de nou sense EGTA. Els assajos es fan sobre cubres de cèl·lules i es treuen mostres a diferents temps. Posteriorment es fan immunofluorecències contra la proteïna PAR3 i el marcador d'unions estretes, ZO1. En les imatges s'avalua la localització d'ambdós proteïnes i la seva intensitat.

RECOMPTE DE LES PROTUSIONS I DE LA TINCIÓ DE PAR3 A LA MEMBRANA CEL·LULAR

Per la quantificació, totes les imatges s'obtenien amb les mateixes configuracions del microscopi.

Per comptar les protusions, les cèl·lules es sembraven a una confluència baixa i les imatges s'obtenien en camp clar 24 h després del tractament amb doxiciclina. Els assajos es van fer per triplicat i en cadascun d'ells es comptaven 3 camps per cada condició, escollint els camps que

tinguessin un grau similar de confluència i comptant 100-120 cèl·lules per condició. Es contaven un màxim de dues protrusions per cèl·lula i es tenia en compte que la seva llargada fos, com a mínim, $\frac{1}{4}$ del diàmetre de la cèl·lula.

Per avaluar la localització de PAR3 a les cèl·lules es van fer immunofluorescències en contra HA o PAR3. Els recomptes es van fer per triplicat i es contaven camps a l'atzar de cada imatge assegurant que hi hagués 100-120 cèl·lules per cada condició. El número de cèl·lules amb una tinció major a la membrana que al citoplasma s'expressa com a percentatge respecte el total de cèl·lules examinades.

2.5. ESTUDIS IN VIVO

Per tots els estudis *in vivo* es van utilitzar ratolins atímics nu/nu d'entre 4 i 5 setmanes d'edat (Harlan-Laboratories) mantinguts en un ambient estèril. Els dissenys experimentals van ser aprovats pel Comitè de l'IDIBELL. La inducció de l'expressió del gen *PAR3* s'aconseguia a través de la beguda, els animals van beure aigua amb un 2% de sucrosa i 2 mg/ml de doxiciclina *ad libitum*.

IMPLANTACIÓ DE CÈL·LULES PER GENERAR TUMORS SUBCUTANIS

Aquest model es va utilitzar per generar els tumors necessaris per implantar ortotòpicament. Els ratolins s'anestesiaven amb un flux continu del 1%-3% de barreja de isoflurà en oxigen (2 l/min). Se'ls injecta per via subcutània i al lloc de l'esquena, 1,5 milions de cèl·lules H157tr i H157tr-wtPAR3, respectivament.

En el model per avaluar el creixement subcutani, la implantació va fer-se en 9 animals per cada tipus cel·lular, es van prendre mesures dels volums dels tumors cada 3 dies. Finalment, quan els tumors aconseguien aproximadament 1500 mm³, els ratolins eren sacrificats, es prenen els pesos dels tumors i eren processats.

Prèvia a la realització dels models ortotòpics, aquesta implantació es feia en 3 animals per cada tipus cel·lular. Quan el creixement del tumor aconseguia 600-800 mm³, els ratolins eren sacrificats. Els tumors s'extirpaven i es tallaven en petits fragments de la mateixa mida, de 3x3 mm³, mantinguts en DMEM amb sèrum boví fetal al 10% i penicil·lina/estreptomicina. Es seleccionaven els fragments sòlids amb presència absent o mínima d'àrees necròtiques per la implantació ortotòpica al pulmó.

GENERACIÓ DE TUMORS ORTOTÒPICS

Per aquest model es van utilitzar 8 ratolins per cada tipus de cèl·lules, H157tr i H157tr-wtPAR3. Els ratolins van ser anestesiats i es van sotmetre a una toracotomia del costat dret. Se'ls feia una petita incisió transversal a la paret toràcica dreta (5-8 mm), es separaven els músculs del tòrax via dissecció i s'exposaven els músculs intercostals. En ells es feia una petita incisió (2-4 mm), a la tercera o quarta costella, i s'introduïa a la cavitat un tros de tumor. La mostra de tumor s'ancorava a la superfície del pulmó (en el segon o tercer lòbul) amb prolene 7,0. Després, la incisió de la paret toràcica es tancava amb grapes de cirurgia, i finalment els músculs del pit i la pell es tancaven també (Hidalgo et al., 2014). 48h després de l'operació es

donava als animals aigua amb doxiciclina. Els ratolins s'inspeccionaven diàriament per detectar la presència de problemes respiratoris, i quan mostraven una dificultat respiratòria greu, color blavós i mobilitat reduïda es sacrificaven. Posteriorment, els pulmons i els fetges es fixaven i s'embevien en parafina.

GENERACIÓ DEL MODEL DE MELSA

Per al model de metàstasi de la melsa es van injectar 1 milió de cèl·lules a la melsa de 13 ratolins (6 i 7 ratolins per les cèl·lules H157tr i H157tr-wtPAR3, respectivament). Els ratolins s'anestesiaven i se'ls feia una incisió per deixar a la vista la melsa. Les cèl·lules s'injectaven per via intraesplènica amb una xeringa de tuberculina enmig de l'òrgan dels ratolins. Per minimitzar el creixement local del tumor, 48 h després de la injecció, els animals s'anestesiaven i la melsa es resectava quirúrgicament. Quatre dies després de la injecció de cèl·lules, s'indueïa l'expressió de PAR3. Tots els ratolins es van sacrificar 5 setmanes més tard i es van examinar les metàstasis hepàtiques i pulmonars macroscòpicament i microscòpicament.

HISTOLOGIA

FIXACIÓ DEL TEIXIT I INCLUSIÓ EN PARAFINA

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: formol, etanol, xilol, parafina, teixit i cassets d'histologia.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Posar l'òrgan en un casset i deixar-lo ON en formol 3,7%.
2. Passar els cassets a aigua destil·lada durant 30 min. Alternativament, si es vol aturar el protocol en aquest pas, es pot deixar en PBS i a 4°C.
3. Deshidratació. Passar els cassets per una bateria d'alcohols i xilol: EtOH 70% (1x1 h) - EtOH 96% (2x1 h) – EtOH 96% (1xON) - EtOH 100% (2x1,5 h)) - EtOH 100% (1x1 h) – Xilol (1x1,5 h).
4. Passar els cassets a parafina i deixar-los ON a 56°C.
5. Fer els blocs.

TINCIÓ D'HEMATOXILINA-EOSINA

Per aquesta tècnica es van utilitzar els següents reactius: talls de teixit, xilol, etanol, PBS, hematoxilina.

A continuació es detallen els diferents passos del protocol:

1. Incubar els talls (4 µM) 56°C, ON.
2. Desparafinar i hidratar: Xilol (4x10 min) - EtOH 100% (3x5 min) - EtOH 96% (3x5 min) - EtOH 70% (1x5 min) – Aigua (1x5 min).
3. Hematoxil·lina 20 s.
4. Aigua corrent (2x5 min).
5. HCl 0,5% 5 s.
6. Aigua corrent 5 s.

7. Aigua amoniacal 5 s.
8. Aigua corrent 5 s.
9. Alcohol 96% 5 min.
10. Eosina 10 min.
11. Deshidratació: EtOH 96% (2x5 min) - EtOH 100% (1x5 min) - Xilol (4x10 min). Sense deixar que s'assequi, afegir DPX i el cubre.

Les imatges van avaluar-se en un microscopi Leica DM-1000. Dos investigadors independents van realitzar el recompte dels focus metastàtics per cada animal i òrgan en 10 talls seriatos de 4 μ M i separats entre sí 120 μ M.

2.6. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic es va fer utilitzant els testos de Chi-quadrat, t de Student no aparellades, Mann-Whitney, ANOVA i Kaplan-Meier. Es considerava significatiu qualsevol resultat dels testos amb un p valor <0,05.

Resultats

1. IDENTIFICACIÓ DE GENS CANDIDATS

1.1. ESCRUTINI EN BASES DE DADES

Per tal de detectar regions que poguessin contenir putatius gens supressors tumorals es van utilitzar les bases de dades de l'Institut de Sanger; en concret es va utilitzar l'aplicació que conté dades d'arrays de polimorfismes d'únic nuclòtid (SNPs; de l'anglès, *Single Nucleotid Polymorphism*) de línies cel·lulars. Aquestes bases de dades permeten avaluar el número de còpies a nivell genòmic i la presència de pèrdua d'heterozigositat (CONAN, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/conan/search>). Per identificar gens candidats a ser supressors tumorals es van seleccionar aquells que complissin el requisit de tenir inactivació dels dos al·lels. Una manera relativament comuna de doble inactivació que elimina la funcionalitat de la proteïna és la deleció homozigota del gen (HD, de l'anglès, *homozygous deletion*). Per tant, es van utilitzar les bases de dades per detectar gens que estiguessin deleccionats homozigòticament. Per evitar la contaminació amb teixit sa, que pot emascarar la detecció de HD, es van fer servir línies cel·lulars de càncer de pulmó. El teixit sa pot estar present en la mostra i fer que aquesta sigui heterogènia, per això, si no s'utilitza una tècnica específica, es pot no detectar una deleció homozigota per la presència de DNA provinent de teixit sa. De fet, en càncer de pulmó s'han establert més de 160 línies cel·lulars, moltes de les quals estaven ja analitzades genòmicament en el moment de començar aquest treball de tesi. En la figura 15 es mostra una imatge obtinguda de la base de dades del CONAN, que mostra una HD en el cromosoma 10 en la línia cel·lular H157.

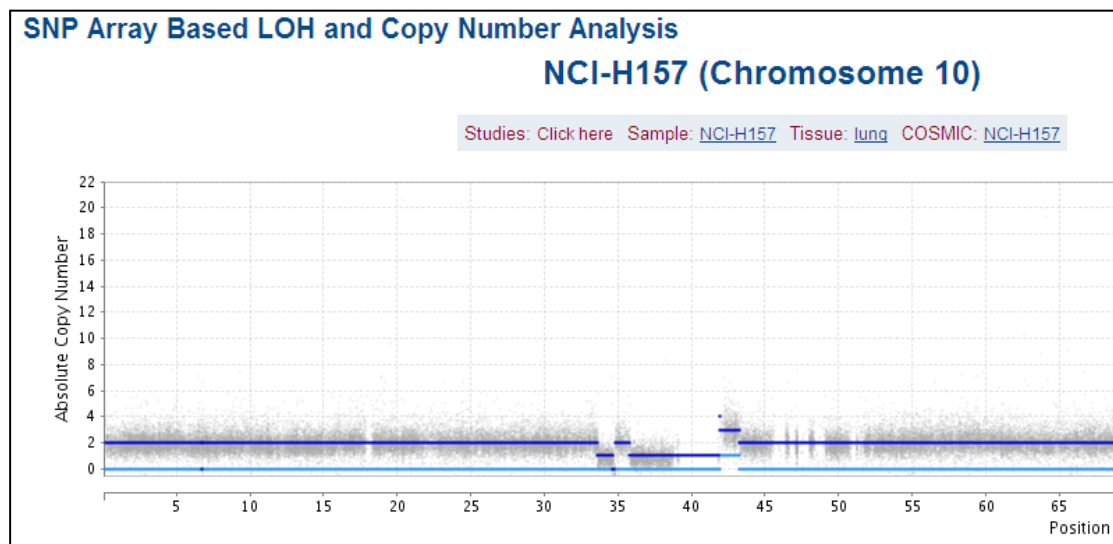


Figura 15. Imatge de la base de dades del CONAN. Deleció homozigota (blau fosc a valor 0) i pèrdua d'heterozigositat (blau clar a valor 0) en el cromosoma 10 de la línia cel·lular H157. En blau fosc es mostren el número de còpies totals i en blau clar l'heterozigositat, el número d'al·lels que són diferents.

En paral·lel a l'escrutini de les bases de dades de número de còpies, es va utilitzar la base de dades GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), que proporciona

informació sobre els nivells d'expressió gènica. Els gens candidats a supressors tumorals hauran de tenir també nivells molt baixos d'expressió gènica.

Així doncs, utilitzant les bases de dades esmentades, es van identificar més de 100 regions que contenien possibles HD en un total d'aproximadament 140 línies cel·lulars de càncer de pulmó. D'entre aquestes regions, es van eliminar les que estaven en regions intergèniques i les delecions de gran tamany que abarcaven més d'un gen. Tots els gens candidats es mostren en la taula 8 de l'annex (taula A8). D'entre tots els gens candidats, i aplicant els criteris que s'esmenten a continuació, es van escollir *SMARCA2*, *SFMBT1*, *SMAD2*, *PIK3R1* i *PARD3*, les característiques dels quals es resumeixen a la taula 7.

Criteris utilitzats per la selecció de gens candidats:

- Gens pels que no s'haguessin descrit polimorfismes de variació de número de còpies (CNV, de l'anglès, *Copy Number Variation*).
- Gens amb una elevada freqüència de pèrdua d'heterozigositat (LOH, de l'anglès, *Loss Of Heterozygosity*) en línies de càncer de pulmó.
- Baixos nivells d'expressió del gen candidat en línies cel·lulars de càncer de pulmó, a part de en les que tenen HD, segons la base de dades de GEO.
- Funció biològica d'interès de la proteïna que codifica el gen.

GENE	FUNCTION	LUNG HD	%LUNG LOH	OTHER HD
<i>SMARCA2</i>	SWI/SNF ATPase	LK2	57,7	3
<i>SMAD2</i>	TGF- β receptor substrate	H1648	30,9	0
<i>PIK3R1</i>	PI3K class I regulatory subunit	H2171	51,7	1
<i>SFMBT1</i>	Postulated as a polycomb protein	H1304, H1522, H1882, H209, H23, H526, SK-MES, SW900	76,5	9
<i>PARD3</i>	PAR complex component	NCI-H157	44,3	4

Taula 7. Els gens candidats escollits com a putatius supressors tumorals en càncer de pulmó. S'indica la funció de cada proteïna, les línies cel·lulars de pulmó amb delecions homozigotes, el percentatge de LOH en pulmó i el número de línies amb delecions homozigotes en altres tipus de tumors.

1.2. COMPROVACIÓ DE LES DELECIONS HOMOZIGOTES

Per tal de confirmar i precisar la localització de les HD es van amplificar amb *primers* intrònics tots els exons dels gens seleccionats. La presència de HD s'evidencia com l'absència de producte de PCR en un gel d'agarosa. Per tant, per descartar que una absència de producte de PCR fos deguda a un problema tècnic, les reaccions de PCR van ser repetides un mínim de dues vegades. A més, quan va ser possible, la presència de les delecions es va confirmar a nivell d'RNA (cDNA).

D'aquesta manera, es va poder confirmar la presència de HD en les següents línies cel·lulars: H1648, procedent d'un adenocarcinoma pulmonar, en el gen *SMAD2* (c.136-?_685+?del); a H2171, procedent d'un tumor de tipus microcític, en *PIK3R1* (c.1-?_2175+?del); i a H157, procedent d'un tumor de tipus escamós, en *PARD3* (c.715-?_2570+?del) (figura 16). Les HD en

els gens *SMARCA2* i *SFMBT1* no van poder ser confirmades i, per tant, aquests gens es van descartar com a candidats a gens supressors tumorals en càncer de pulmó.

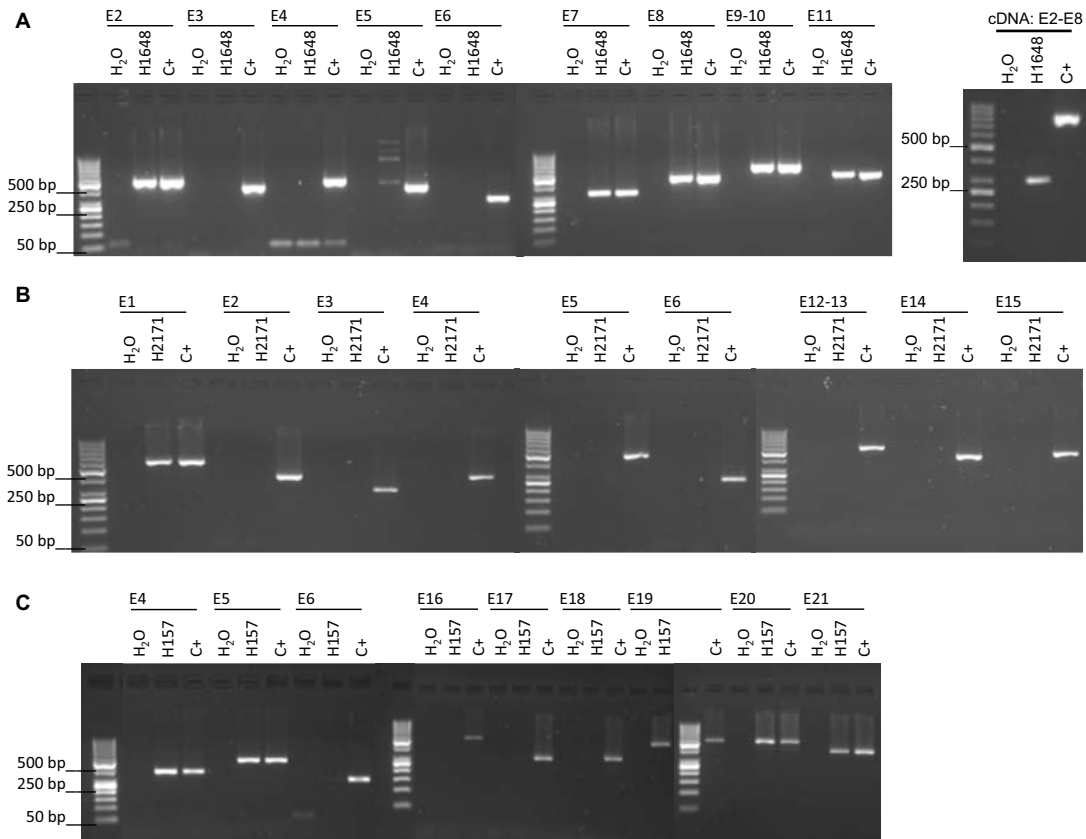


Figura 16. Comprovació de les delecions homozigotes. Imatges d'agarosa amb els fragments de productes de PCR amplificats en genòmic. **A.** Deleció intragènica del gen *SMAD2* (c.136-?_685+?del) en la línia H1648. La deleció es va comprovar també a nivell de cDNA (dreta). **B.** Deleció intragènica a H2171 de *PIK3R1* (c.1-?_2175+?del). **C.** Deleció intragènica a H157 al gen *PARD3* (c.715-?_2570+?del).

1.3. CRIBRATGES MUTACIONALS

Per tal de determinar la rellevància dels gens seleccionats es van realitzar cribratges mutacionals pels gens amb delecions homozigotes confirmades en línies de càncer de pulmó: *SMAD2*, *PARD3* i *PIK3R1*. Els cribratges es feien preferencialment amb línies amb LOH per aquests locus; aquesta preselecció permet incrementar la possibilitat de trobar mutacions inactivadores. És poc probable (encara que no impossible) que els tumors sense LOH en un gen supressor tumoral, tinguin mutacions en aquest gen. Això és així perquè la LOH sol ser un dels mecanismes més freqüents per inactivar un dels dos al·lels en qualsevol gen supressor tumoral. A continuació es mostra el cribratge mutacional que va realitzar-se amb *SMAD2*, i més endavant en aquesta tesi es mostren els treballs amb els altres dos gens, que tenen una freqüència mutacional major.

SMAD2:

El gen *SMAD2* (*Mothers against decapentaplegic homolog 2*) es troba al cromosoma 18 i està compost per 11 exons, que donen lloc a tres variants transcripcionals NM_001135937, NM_005901 i NM_001003652. La proteïna SMAD2 és una proteïna SMAD regulada pel receptor de TGF β (SMAD-R), de fet és el substrat pel receptor. En ser fosforilada va a nucli i pot ser reconeguda per SMAD4. Al nucli, es forma un complex de SMADs actiu que regularà l'expressió de gens que fomenten la proliferació cel·lular i la invasió, entre altres funcions.

La presència de mutacions al gen *SMAD2* ja havia estat estudiada prèviament en càncer de pulmó (Tsujiuchi et al., 2000; Uchida et al., 1996), havent trobat 2 mutacions en 12 mostres d'adenocarcinomes de pulmó generats per inducció en rates i 2 mutacions en un total de 57 tumors primaris de pulmó, respectivament. La informació existent en la bibliografia era molt escassa i, a més, tots els treballs s'havien realitzat en tumors primaris, per tant la presència de delecions homozigotes podia haver passat desapercibuda. En aquest treball es va dur a terme la seqüenciació de 24 línies cel·lulars de càncer de pulmó que tenien LOH en la regió del gen *SMAD2*.

La seqüenciació de *SMAD2* es va realitzar a nivell genòmic, amplificant per PCR tots els exons. Els resultats de la cerca mutacional van ser negatius. És a dir, cap de les línies cel·lulars de càncer de pulmó examinades, llevat de la línia cel·lular d'adenocarcinoma en que s'havia descrit una delecio homozigòtica H1648, va presentar alteracions bial·lèliques del gen *SMAD2*. En vista dels resultats, i tot i que el gen mostra inactivació en càncer de pulmó, es va concloure que la freqüència d'alteracions era molt baixa. Per aquest motiu es va decidir no continuar el treball amb *SMAD2*.

2. PARD3 ESTÀ INACTIVAT EN TUMORS

2.1. EL GEN PARD3 PATEIX MUTACIONS PUNTUALS

El gen *PARD3* (*Partitioning defective 3 homolog*) està situat al braç petit del cromosoma 10 (10p11.22-p11.21) i s'expandeix al llarg de més de 700 parells de bases. El gen consta de 26 exons, dos dels quals codifiquen per llocs de poliadenilació. Dóna lloc fins a 11 isoformes diferents que presenten moltes variacions, amb 5 exons que fan *splicing* alternatiu (figura 17).

Es van seqüenciar, a nivell genòmic i per tots els exons codificants de *PARD3* (NM_019619.1), 51 línies cel·lulars de càncer de pulmó. Es van intentar representar tots els tipus histològics de càncer de pulmó, per això es van incloure 18 línies cel·lulars de carcinoma de cèl·lula petita, 15 línies cel·lulars del tipus escamós, 15 línies cel·lulars del tipus adenocarcinoma i 3 línies cel·lulars que corresponen a altres subtipus.

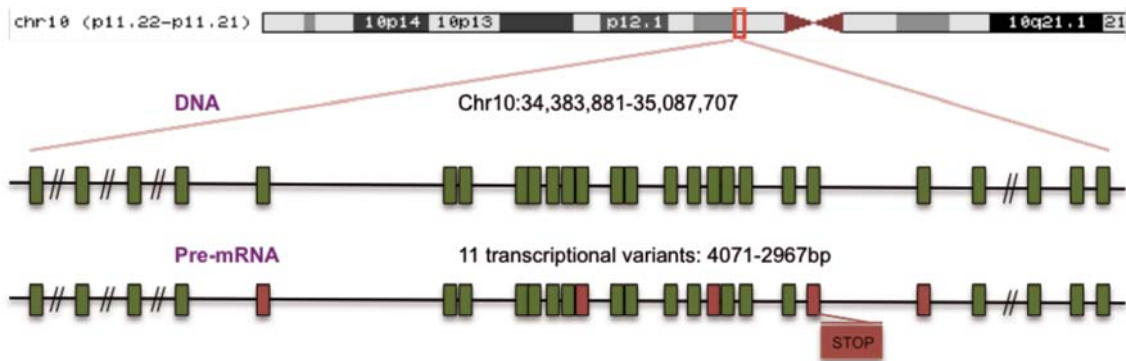


Figura 17. El gen *PARD3*, al braç petit del cromosoma 10, codifica per 11 variants transcripcionals. Cada exó es mostra com un rectangle verd o vermell, el vermell indica que és un exó que pateix *splicing* alternatiu.

L'anàlisi va constatar que hi ha una altra línia cel·lular, a part de la H157, que està inactivada bial·lèlicament pel gen *PARD3*. Es tracta de dos canvis puntuals en la línia cel·lular PC10: c.2581A>T, que provoca una substitució aminoacídica, i el canvi intrònic, c.223-4C>G, d'efecte desconegut. Les dues alteracions estan en heterozigosi, però tot i així, el canvi d'aminoàcid predomina a nivell de missatger (figura 18A). Això suggereix que el canvi c.223-4C>G està produint una variant de *splicing* que es degradaria pel mecanisme anomenat *non sense mediated decay* (NMD), i per tant, la línia PC-10 tindria una inactivació bial·lèlica del gen. L'NMD és un mecanisme conservat en eucariotes mitjançant el qual els mRNAs que contenen codons *stop* prematurs són degradats. Constitueix un control de qualitat dependent de traducció i que es dona post transcripció.

La freqüència d'alteracions en el gen *PARD3* en el total de 51 línies cel·lulars de càncer de pulmó examinades és del 4%. Malgrat això, si es té en compte només el grup de NSCLC (càncer de pulmó no microcític; de l'anglès, *Non Small Cell Lung Cancer*) de tipus escamós, donat que les dues línies cel·lulars afectades per aquestes mutacions formen part d'aquest tipus histològic, la freqüència d'alteracions de *PARD3* s'incrementa fins al 9%.

Així doncs, tenint en compte que en línies cel·lulars de càncer de pulmó les mutacions a *PARD3* predominen en el tipus escamós, que en treballs anteriors s'ha descrit que les mutacions a *PARD3* apareixien més freqüentment en càncers de tipus escamós (Rothenberg et al., 2010) i que, d'entre totes les línies cel·lulars de càncer de pulmó disponibles, el tipus escamós està infrarepresentat, es va decidir estendre l'estudi mutacional i els estudis genètics posteriors a tumors de pulmó primaris del tipus escamós. Es van seqüenciar 107 tumors i es van trobar 18 canvis en regions codificants i 22 canvis en regions no codificants pròximes als llocs de *splicing*. Es van determinar quines eren les variacions, incloent polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs), i la seva freqüència global en les mostres analitzades (taula 8). Per cada mostra amb un canvi, i si era possible, es va seqüenciar DNA del mateix pacient de teixit sa; d'aquesta manera es va determinar si els canvis eren somàtics (no estaven presents al DNA normal del mateix individu) o no. També va analitzar-se la pèrdua d'heterozigositat en aquestes mostres (apartat 2.2) per determinar si els canvis eren heterozigots o homozigots. D'entre tots els canvis trobats, 4 van ser d'origen somàtic i homozigots: c.3129A>G (p.I1043M) en el tumor 273, c.1492dup (p.A498Gfs*9) en el tumor 200; c.121-2A>G en el tumor 141; i c.1034G>A (p.R345H) en el tumor 269 (figura 18).

cDNA NUCLEOTIDE CHANGE	PUTATIVE PROTEIN	SNP	FREQUENCY (%)
c.121-2A>G	p.D41_R74del	no reference	0,69
c.223-4C>G	P.=	no reference	0.69
c.258C>T	p.H86H	rs112281243	0.69
c.321G>C	p.E107D	rs1436731	1.38
c.339C>G	p.V113V	rs41276096	0.69
c.581A>G	p.K194R	no reference	0.69
c.582+36C>G	P.=	rs150161748	0.69
c.714+26C>T	P.=	rs1370084	0.69
c.714+79A>G	P.=	rs982687	6.21
c.714+117C>T	P.=	rs74134137	0.69
c.861T>C	P.=	rs2796011	0.69
c.891-95C>T	P.=	rs117300707	2.76
c.1034G>A	p.R345H	no reference	0,69
c.1045C>T	p.R349C	rs201536019	0,69
c.1492dup	p.A498Gfs*9	no reference	0,69
c.1539+31G>A	P.=	rs10740890	72.41
c.1669-91C>G	P.=	rs10763987	35.86
c.1749C>G	p.T583T	rs61735565	6.90
c.1896+116C>T	P.=	rs78468914	0.69
c.2227+64G>A	P.=	rs7077783	28.97
c.2228-40G>T	P.=	no reference	0.69
c.2402G>A	p.S801N	rs118153230	0.69
c.2569+10A>G	P.=	rs58731858	0.69
c.2604C>G	p.N868E	no reference	0,69
c.2581A>T	p.T861S	no reference	0,69
2614+26 C>T	P.=	TMP_ESP_10_346251	0.69
c.2667G>A	p.S889S	rs.3781128	71.72
c.2843+99T>G	P.=	rs10740885	58.62
c.2810C>T	p.A937V	rs16935326	2.07
c.2615-62A>G	P.=	rs11009737	1.38
c.3129A>G	p.I1043M	no reference	0,69
c.3185+12T>A	P.=	no reference	1.38
3186-12C>T	P.=	rs41276094	4.14
c.3549+23C>T	P.=	rs116214419	0.69
c.3550-77T>G	P.=	rs3004928	71.72
c.3582A>G	p.R1191R	rs11009651	26.21
c.3550-133G>A	P.=	rs143734834	0.69
c.3569C>T	p.T1190M	rs61735568	0.69
c.3678-28A>G	P.=	no reference	0.69
c.3765G>A	p.E1255E	rs144844232	0.69
c.4019C>T	p.A1340V	rs144433754	0.69
c.*29C>T	p.?	rs150058603	0.69

Taula 8. Canvis de nucleòtid trobats al gen *PARD3*: SNPs, variants de significat biològic desconegut i mutacions. Se'n detalla la freqüència trobada en les mostres analitzades.

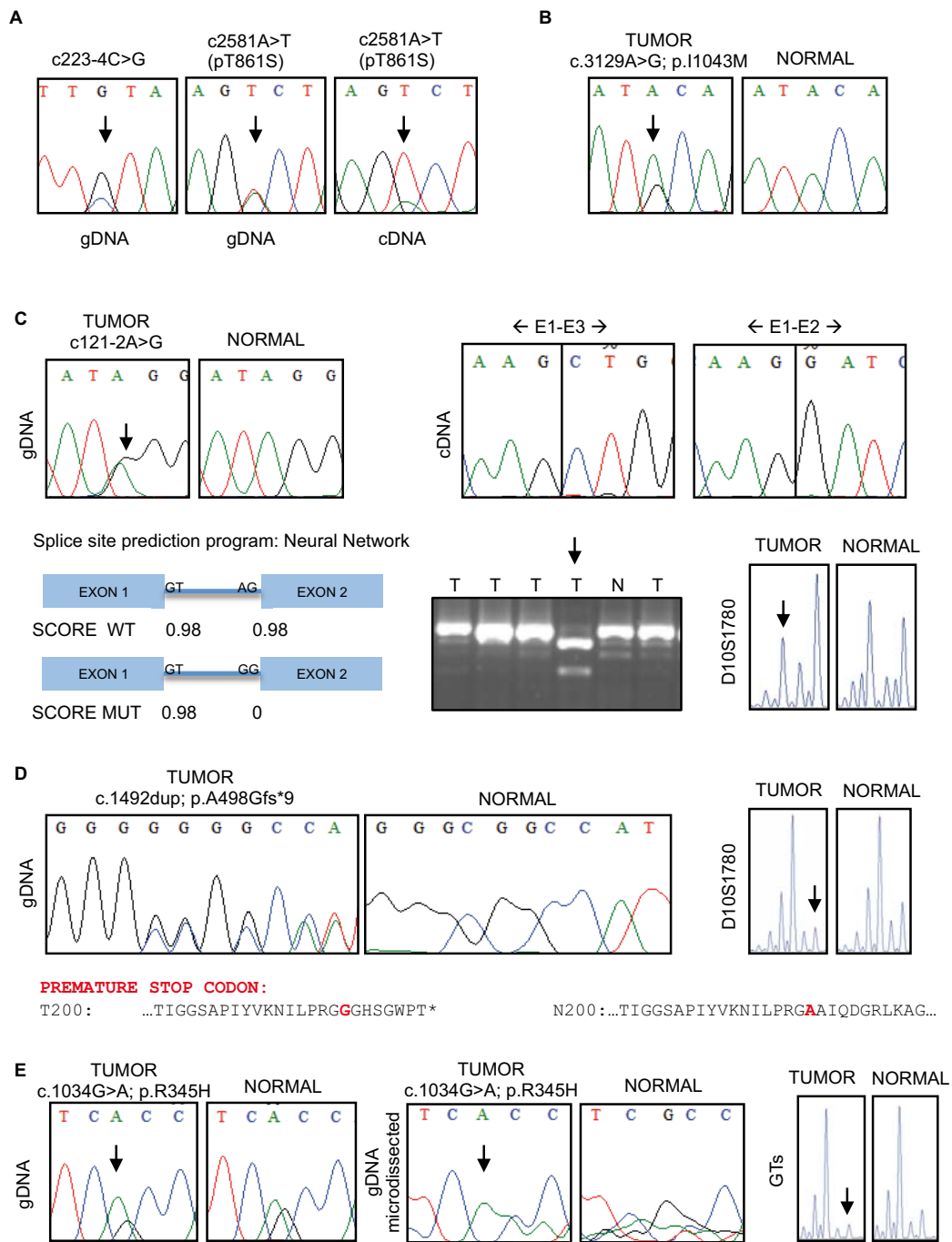


Figura 18. Mutacions inactivadores en el gen *PARD3* en carcinoma escamós de pulmó. **A.** Cromatogrames de les mutacions trobades en la línia cel·lular PC-10, a nivell de DNA i mRNA. **B.** Cromatogrames de la mutació c.3129A>G trobada en el carcinoma pulmonar de tipus escamós 273. **C.** Cromatogrames de la mutació c.121-2A>G trobada en el carcinoma pulmonar del tipus escamós 141, a nivell de DNA i mRNA. Efecte en l'*splicing* predit pel programa. Agarosa que mostra la deleció a nivell de cDNA. Un dels microsatèl·lits que reflexa LOH en aquesta mostra. **D.** Cromatogrames de la mutació c.1492dup trobada en el carcinoma pulmonar del tipus escamós 200. Traducció del transcrit alterat, on apareix un *stop* prematur. Un dels microsatèl·lits que reflexa LOH en aquesta mostra. **E.** Cromatogrames de la mutació c.1034G>A trobada en el carcinoma pulmonar del tipus escamós 269, a nivell genòmic, seqüències de tot el DNA extret o de DNA microdissectat (dreta). Microsatèl·lit que mostra la LOH d'aquest tumor.

La mutació c.1492dup (p.A498Gfs*9) és inactivadora completament, doncs produeix un codó *stop* prematur que genera un transcrit amb pauta de lectura anòmala i que, molt probablement, serà detectat i degradat pel mecanisme de NMD. Per confirmar això últim, es van realitzar immunohistoquímiques de la proteïna PAR3 en un ampli panell de tumors de pulmó, que inclou el tumor que pateix aquest canvi. No es va detectar proteïna PAR3 en aquest tumor. D'altra banda, el canvi intrònic c.121-2A>G, situat en una de les bases consens de *splicing*, s'ha analitzat amb el programa de predicció de canvis en el *splicing* *Splice Site Prediction by Neural Network* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) i prediu la pèrdua del lloc acceptor de l'intró 1. Això s'ha comprovat a nivell de RNA i s'ha trobat un transcrit en el que manca l'exó 2 (figura 18C). Pel que fa a la resta de canvis, l'efecte fenotípic de les mutacions de canvi d'aminoàcid es va predir amb el programa PolyPhen Impact (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), i es va determinar que la mutació c.1034G>A (p.R345H) és altament perjudicial.

La freqüència de mutacions trobada en els tumors primaris del tipus histopatològic escamós ha estat d'un 3,7%.

A més d'aquests canvis en regions exòniques o canòniques de *splicing*, també es van trobar altres canvis intrònics no descrits i allunyats dels exons. El seu efecte va ser considerat utilitzant el programa de predicció de canvis en l'*splicing* utilitzat anteriorment i per cap cas hi havia probabilitat d'alterar el procés de *splicing*.

D'entre aquells canvis que no són somàtics i que, per tant, constitueixen mutacions germinals o polimorfismes, cal destacar els casos c.581A>G (p.K194R) en el tumor 186 i c.2604C>G (p.D868E) en el tumor 156 (figura 19). El canvi del tumor 186 està en un dels llocs donadors de *splicing* i podria generar un transcrit alterat. El programa lliure de predicció va indicar que el canvi no alterava l'*splicing*. Per tal de descartar una doble inactivació en el tumor es va avaluar la LOH d'aquestes mostres. Mentre que el tumor 186 no va resultar positiu per LOH, el tumor 156 sí que presentava LOH. Finalment, per determinar si aquests canvis podien constituir polimorfismes es van seqüenciar aquestes regions en un total de 70 DNAs procedents de teixit normal, i en cap d'ells, es van trobar aquests canvis. Així doncs freqüència d'aquests canvis és inferior a un 0,5%.

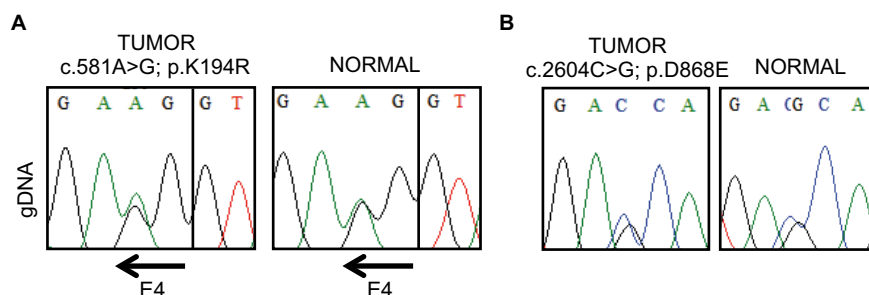


Figura 19. Canvis no somàtics i no coneguts en el gen *PAR3* en carcinoma pulmonar escamós. **A.** Cromatogrames del canvi c.581A>G trobat en el carcinoma pulmonar del tipus escamós 186, en una de les bases del lloc canònic de *splicing*. **B.** Cromatogrames del canvi c.2604C>G trobat en el carcinoma pulmonar del tipus escamós 156.

2.2. LA REGIÓ QUE INCLOU *PARD3* PERD FREQUÈNMENT L'HETEROZIGOSITAT

Un dels mecanismes per la inactivació de gens supressors tumorals acostuma a ser la LOH. És per aquest motiu, i perquè ens ajuda a predir quins seran els tumors candidats a tenir alteracions genètiques a *PARD3*, que es va determinar la freqüència de LOH a la zona de *PARD3*. Es van utilitzar marcadors de microsatèl·lits. Els microsatèl·lits són repeticions en tàndem de número variable, en concret són entre 2 i 5 parells de bases que es repeteixen en la seqüència del DNA i són altament polimòrfics pel que fa al número d'aquestes repeticions. Es van analitzar quatre microsatèl·lits que cobreixen una regió de 5 Mb, en un total de 40 tumors pulmonars. Exemples dels resultats per cadascun dels microsatèl·lits i per cada tumor es resumeix en la figura 20. La freqüència de LOH trobada, tenint en compte el resultat dels microsatèl·lits més pròxims a *PARD3*, ha estat aproximadament d'un 50%.

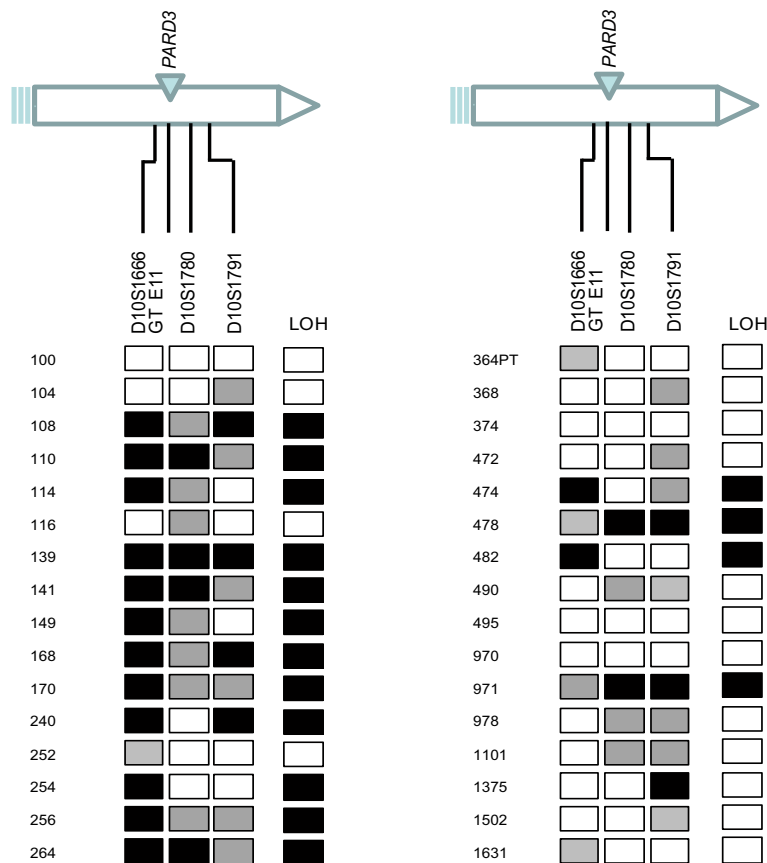


Figura 20. Representació de la localització dels microsatèl·lits utilitzats respecte el gen *PARD3* i de l'estat de zigositat de cadascun dels microsatèl·lits per les mostres indicades. Els microsatèl·lits D10S1666 i GT E11 es mostren junts per ser molt pròxims i en ocasions utilitzats alternativament. En blanc, microsatèl·lit heterozigot; en gris, microsatèl·lit no informatiu; en negre, microsatèl·lit homozigot.

2.3. EL GEN PARD3 ESTÀ INACTIVAT PER DELECIÓ

El fet que la freqüència de LOH sigui comparativament molt més elevada que la de mutacions, va fer sospitar de l'existència d'alteracions en *PARD3* del tipus HD. Com ha estat comentat anteriorment, les HD solen passar inadvertides en molts tumors primaris, degut a la presència de DNA normal contaminant el DNA del teixit tumoral. També es va pensar en la possibilitat que *PARD3* estigués inactivat per hipermetilació de les illes CpG del promotor, que constitueix també un mecanisme d'inactivació de gens supressors tumorals (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). Per això es va decidir utilitzar la tècnica de MLPA (*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) (Schouten et al., 2002) i una variant de la mateixa, MS-MLPA (*Methylation Specific MLPA*) (Nygren et al., 2005) per detectar delecions i metilació de promotor.

L'estudi es va realitzar en col·laboració amb l'empresa MRC-Holland, que va dissenyar un conjunt de sondes (*probemix*) específiques per *PARD3*. Es van avaluar 51 línies cel·lulars i 107 tumors primaris de càncer de pulmó.

En la línia cel·lular control H157 que, com totes les línies cel·lulars de càncer no presenta contaminació de DNA normal, es va detectar perfectament la HD. La claredat dels resultats en línies cel·lulars va permetre comprovar el bon funcionament de la tècnica (figura 21). Pel contrari, l'anàlisi en els tumors primaris és més complex perquè a l'inconvenient del DNA normal contaminant s'afegeix el problema de l'aneuploidia (intrínsec a tots els tipus de càncer) que genera confusió en MPLA. Així doncs, és freqüent que, en un determinat tumor, regions o gens que s'utilitzen com a control puguin estar alterats a nivell de número de còpies, encara que per funcionar com a controls es seleccionin gens no alterats en càncer. Per exemple, podia succeir que en un determinat tumor hi hagués tres còpies dels gens de referència i cap alteració en el número de còpies de *PARD3*. En aquest escenari, el càlcul del programa hagués indicat una pèrdua del gen *PARD3*. Malgrat aquestes dificultats, tenint en compte que moltes de les HD no afecten tot el gen, sinó varis exons contigus, l'anàlisi relatiu del número de còpies dels diferents exons i regions que bordegen *PARD3* va permetre dur a terme l'anàlisi i identificar vàries HD.

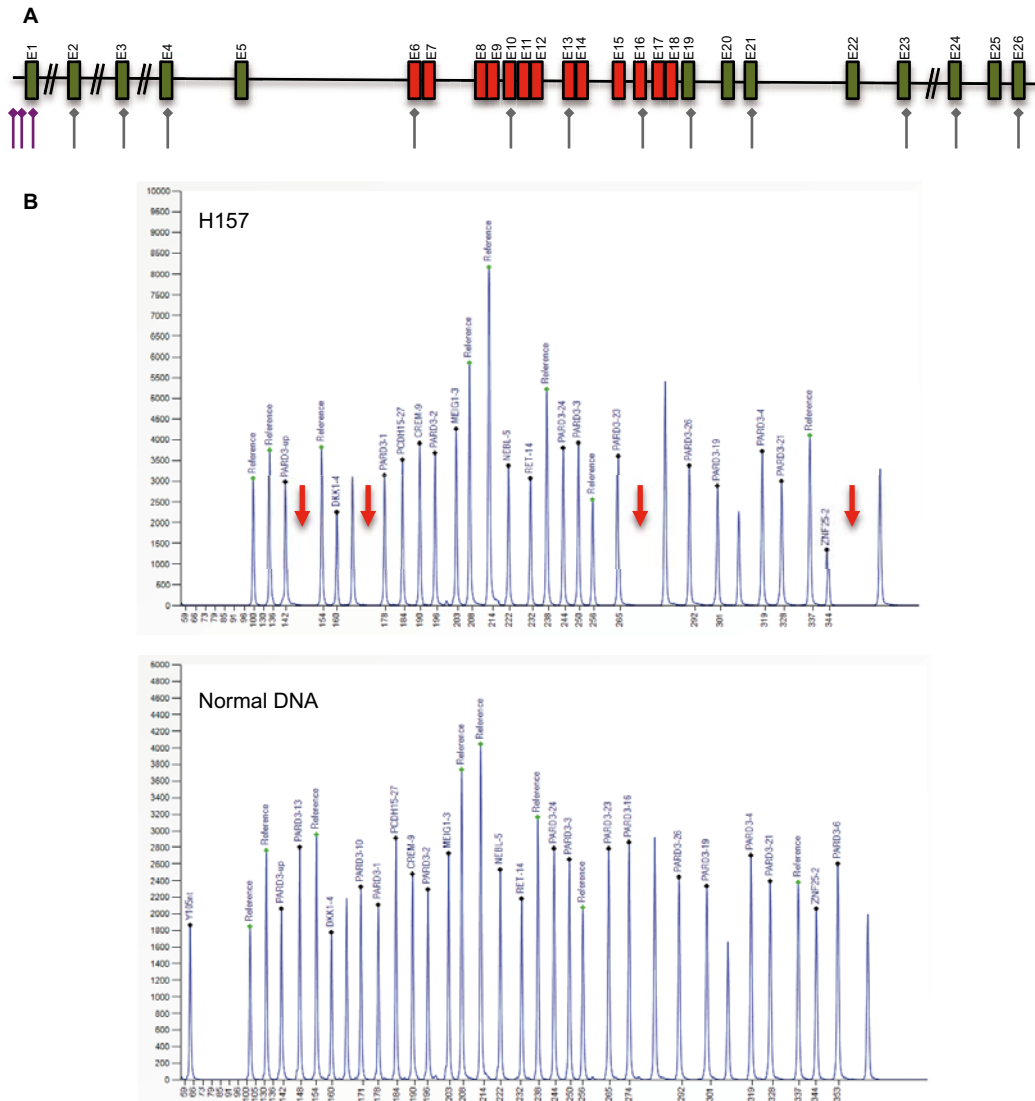


Figura 21. MS-MLPA de la línia H157. **A.** Representació del gen *PARD3* amb la situació de les sondes de MS-MLPA. Els exons es mostren en verd o vermell (delecionats). Les sondes de MS-MLPA es troben sota els exons, en lila les específiques per avaluar canvis en la metilació. **B.** Electroferogrames de la línia H157 i de DNA normal. Les sondes no donen un producte amplificat en la zona de la deleció.

Es van detectar deleccions intragèniques en 4 tumors primaris diferents (figures 22-25 i taula de l'annex A9). El tumor 114 presentava una deleció de l'exó 2 al 13 (resultats de MLPA) que és somàtica i homozigota. La deleció es va confirmar seqüenciant el cDNA del tumor. Aquesta deleció dóna lloc a un transcrit al que li falten els exons que van del 2 al 14 (exó 14 no avaluat per MLPA) però no perd la pauta de lectura. D'altra banda, el tumor 181 presenta una deleció de l'exó 4, que dóna lloc a un canvi en la pauta de lectura i a un codó *stop* prematur. Aquesta deleció també es va confirmar a nivell de cDNA, però no va poder fer-se la comprovació a nivell de teixit normal perquè no estava disponible. El tumor 1529 presentava una deleció homozigota i somàtica que va des de l'exó 4 fins a l'exó 23. Aquesta deleció no va ser comprovada a nivell de cDNA perquè no es disposa del material. Finalment, el tumor 1681 tenia una deleció homozigota i somàtica que va des de l'exó 3 i fins al 23. Com en el cas anterior, l'avaluació no va poder realitzar-se a nivell de cDNA per manca de RNA d'aquesta mostra.

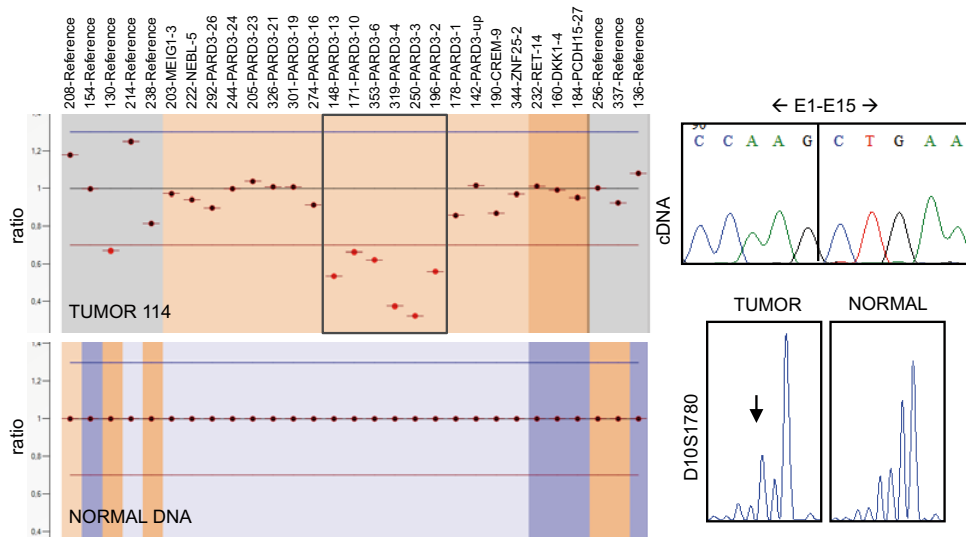


Figura 22. MS-MLPA del carcinoma pulmonar del tipus escamós 114. Panells amb els ràtios de l’anàlisi de MLPA per cada sonda, a dalt la representació de la deleció dels exons 2-13 del tumor; a baix, DNA parella normal com a control. A la dreta, cromatograma que mostra la seqüenciació del transcrit amb la deleció dels exons 2-14, que genera una proteïna PAR3 en pauta més petita (p.D41_E689del). I a baix, microsatèl·lit que mostra la LOH en aquest tumor.

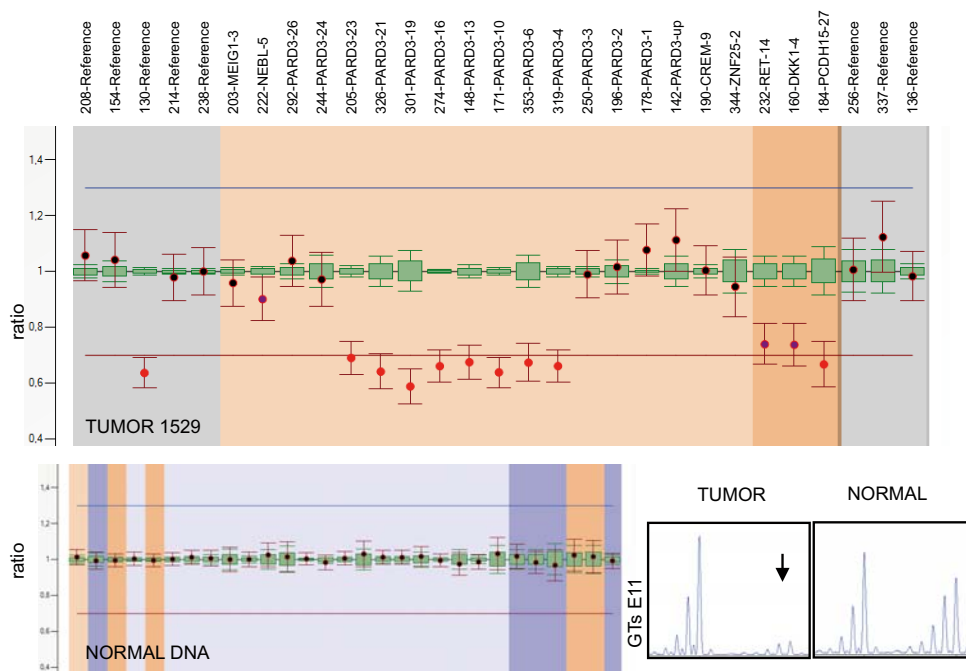


Figura 23. MS-MLPA del carcinoma pulmonar del tipus escamós 1529. Panells amb els ràtios de l’anàlisi de MLPA per cada sonda. A dalt, tumor 1529, representació de la deleció dels exons 4-23. A baix, el DNA parella control. El microsatèl·lit D10S1780 indica la LOH del tumor.

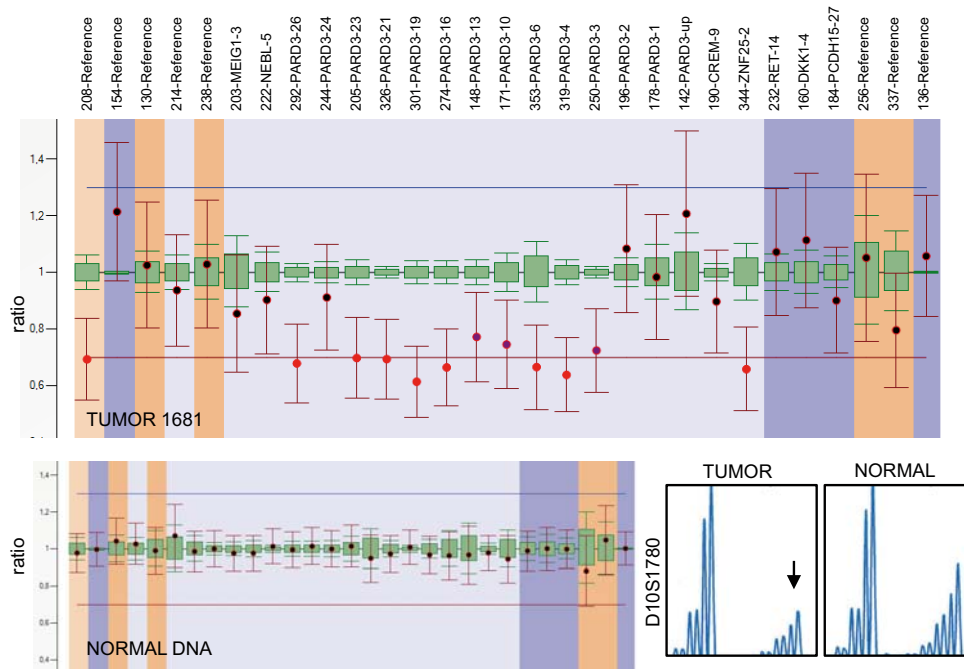


Figura 24. MS-MLPA del carcinoma pulmonar del tipus escamós 1681. Panells amb els ràtios de l'anàlisi de MLPA per cada sonda. A dalt, tumor 1681, representació de la deleció dels exons 3-23. A baix, el DNA parella control. El microsatèl·lit D10S1780 indica la LOH del tumor.

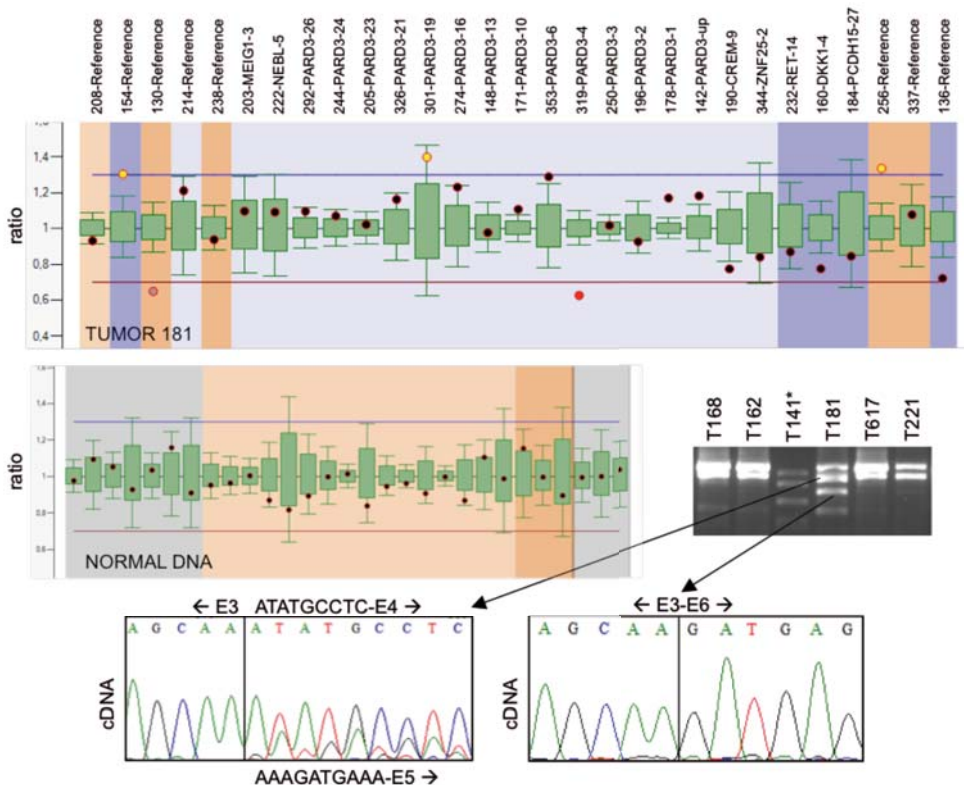


Figura 25. MS-MLPA del carcinoma pulmonar del tipus escamós 181. Panells amb els ràtios de l'anàlisi de MLPA per cada sonda. A dalt, tumor 181, representació de la deleció de l'exó 4. A baix, el DNA control. A la dreta, agarosa que mostra el resultat d'amplificació del cDNA de PARD3 E1-E7 en diversos tumors, tots mostren dos bandes a la mateixa altura excepte el tumor 141 (figura 18) i el 181. En el cas del 181 els cromatogrames de baix mostren que el transcrit no té exó 4, això es veu clarament en el cas en que l'E5 pateix *splicing* alternatiu.

En casos concrets en els que es creia que podia haver-hi una deleció puntual d'un o dos exons, es va fer la pertinent comprovació a nivell de cDNA per descartar-ho. En altres casos, pels que no es disposava d'RNA de la mostra, es feia l'anàlisi de LOH, la qual cosa indicava major o menor probabilitat de trobar el segon event.

També es van detectar pèrdues més grans, de tot el braç petit del cromosoma o de tot el cromosoma 10 sencer. Aquestes pèrdues, que representen un 11% de tots els tumors analitzats, indiquen la presència de LOH causada per pèrdua d'una de les dos còpies. Finalment, en un 5% dels tumors es van detectar increments en el número de còpies, que en molts casos abarcaven tot el cromosoma 10. Exemples del resultat de MLPA per cada sonda es troben en la taula annexa 9 (taula A9); s'hi inclou un exemple de cada cas possible i les mostres que presenten alteracions de número de còpies i altres. Els resultats de número de còpies de cada tumor es troben a la taula annexa 10 (taula A10).

Tenint en compte totes les alteracions, deleccions intragèniques, mutacions de canvi de pauta de lectura, mutacions de canvi de sentit i mutacions que afecten l'*splicing*, es van detectar canvis en un 8% del total de tumors escamosos analitzats. Totes les alteracions trobades es sintetitzen a la taula 9 i a la figura 26 es mostra una representació esquemàtica dels dominis que es veuen afectats per les mutacions que no prediuen proteïnes truncades.

Identification	Nucleotide change	Predicted effect	Exon/Intron	Status	Somatic	Predicted impact**
LSCC cancer cell lines (n=18)						
H157	c.715-?_2614+?del	No protein	E6-E18	LOH	NA	NA
PC10	c.223-4C>G	No protein	I2	NO LOH	NA	NA
PC10	c.2581A>T	p.T861S	E18	NO LOH	NA	Damaging
LSCC primaries (N = 108)						
1681 (T1)	c.223-?_3549+?del	No protein	E3-23	LOH	Yes	NA
141 (T2)*	c.121-2A>G	p.D41_R74del	I1	LOH	Yes	NA
181 (T3)*	c.404-?_582+?del	No protein	E4	NA	NA	NA
269 (T4)	c.1034G>A	p.R345H	E9	LOH	Yes	Damaging
200 (T6)	c.1492dup	p.A498Gfs*9	E10	LOH	Yes	NA
273 (T7)	c.3129A>G	p.I1043M	E21	LOH	Yes	Benign
114 (T8)*	c.121-?_2067+?del	p.D41_E689del	E2-E13	LOH	Yes	NA
1529 (T9)	c.404-?_3549+?del	No protein	E4-E23	LOH	Yes	NA

Taula 9. Alteracions trobades en el gen *PARD3* en línies cel·lulars i en tumors primaris de carcinoma pulmonar del tipus escamós, considerant com a seqüència de referència NM. 019619. LSCC, carcinoma pulmonar del tipus escamós; NA, No Analitzat; * Confirmat a nivell de mRNA; ** impacte segons PolyPhen.

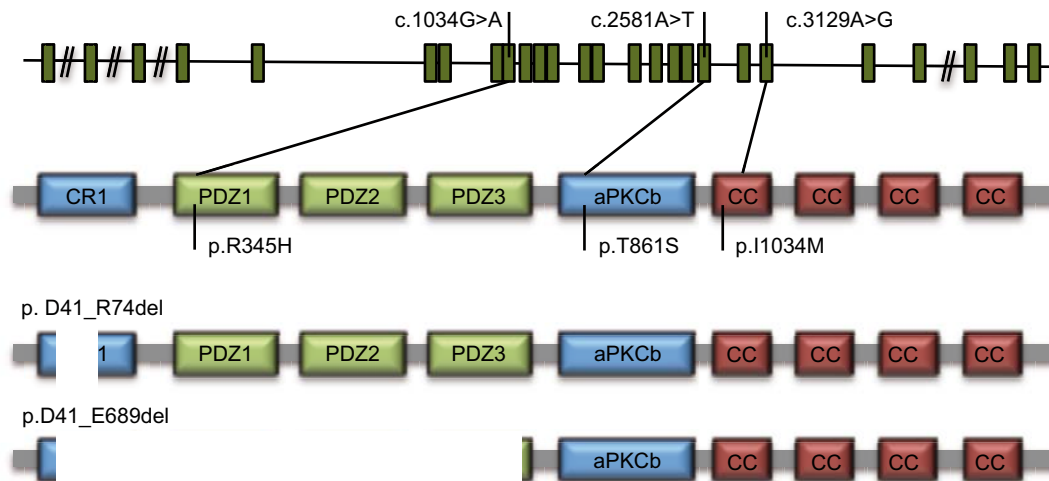


Figura 26. Representació esquemàtica de l'estructura de la proteïna PAR3 on es mostren les mutacions que no prediuen proteïna truncada. CR1, Regió de Control 1; PDZ, domini PDZ; aPKCb, domini d'unió a aPKC; CC, domini *Coiled-Coil*.

2.4. L'EXPRESSIÓ DE *PAR3* NO S'AFECTA PER L'ESTAT DE METILACIÓ DEL SEU PROMOTOR

La tècnica de MS-MLPA va avaluar 3 CpGs del promotor de *PAR3*. Utilitzant aquesta tècnica, es va trobar metilació en 14 de 51 línies cel·lulars. Aquest resultat indica que hi ha metilació en un 27,5% del total de línies (taula 10). Si s'avaluen els percentatges de metilació per tipus histològics s'observa un enriquiment de metilació en línies cel·lulars del tipus escamós. Aquest enriquiment es reflecteix en la següent observació: el percentatge de línies cel·lulars escamoses en l'estudi és del 35,3%, per tant, aquestes línies haurien de tenir una representació similar en el total de línies metilades, però en realitat són un 50% del total de línies que presenten metilació en el promotor de *PAR3* (taula 10). La hipermetilació en tumors primaris era molt baixa, doncs menys d'un 1% del total de tumors presentava hipermetilació del promotor, bàsicament només s'observava en una única sonda (*PAR3*-up). Cal dir que si només tinguéssim en compte la metilació d'aquesta sonda, la freqüència pujaria al 17% (taula 11). La quantificació final de la metilació per cada tumor es troba a la taula de l'annex 10 (taula A10).

Havent observat metilació en algunes línies cel·lulars i tumors primaris, i veient que la metilació en una de les tres CpGs era més freqüent que en la resta, es va voler determinar l'extensió de la hipermetilació i el seu possible efecte en la regulació de l'expressió gènica. En primer lloc es van avaluar els nivells de proteïna PAR3 en línies cel·lulars a través de *western blot* i posteriorment es va comprovar l'estat de metilació de totes les CpGs de la zona de les que s'havien avaluat a través de MS-MLPA, posant més atenció en la zona de la única CpG que apareixia metilada en tumors primaris segons MS-MLPA.

CELL LINE	PARD3-1	PARD3-1	PARD3-up	AVERAGE	INTERPRETATION	LUNG HISTOLOGY
A427	0,07	0,00	0,86	0,31	Mild	AC
H1573	-0,02	0,00	0,91	0,29	Mild	AC
H1703	0,04	0,00	1,02	0,35	Mild	AC
H1993	0,00	0,00	0,53	0,18	Abs	AC
PC9	0,00	0,00	0,40	0,13	Abs	AC
RERFLCMS	0,12	0,00	1,01	0,38	Mild	AC
H1299	0,07	0,00	1,00	0,36	Mild	LCC
H460	0,03	0,16	1,05	0,41	Mild	LCC
EBC1	0,01	0,00	0,93	0,31	Mild	SCC
H2170	0,02	0,00	0,59	0,2	Abs	SCC
H520	0,03	0,00	0,56	0,20	Abs	SCC
H596	-0,05	0,66	0,80	0,47	Mild	SCC
HCC95	-0,04	0,00	0,86	0,27	Mild	SCC
LC1SQ	-0,04	0,20	0,90	0,35	Mild	SCC
LK2	-0,05	0,00	0,94	0,30	Mild	SCC
LUDLU1	0,00	0,00	0,42	0,14	Abs	SCC
PC10	-0,04	0,04	0,95	0,32	Mild	SCC
SQ1	-0,04	0,00	-0,03	-0,02	Abs	SCC
SQ5	0,08	0,00	0,96	0,35	Mild	SCC
DMS273	-0,05	0,00	0,34	0,10	Abs	SCLC
H345	-0,05	0,00	1,00	0,32	Mild	SCLC

Taula 10. Estat de metilació en línies cel·lulars de pulmó. Es mostren les ràtios entre mostra digerida i no digerida per les línies que presenten metilació en alguna de les CpGs testades. En blanc, metilació absent; en verd, nivell de metilació mig; en groc, nivell de metilació moderat; i en verd, nivell alt de metilació (veure material i mètodes).

LENGTH	PARD3-1	PARD3-1	PARD3-up	AVERAGE	INTERPRETATION
139	-0,12	-0,02	0,55	0,14	Abs
143	0,00	0,00	0,34	0,11	Abs
170	-0,11	-0,05	0,24	0,03	Abs
184	-0,14	-0,08	0,39	0,06	Abs
214	-0,04	-0,03	0,29	0,07	Abs
221	-0,08	-0,05	0,60	0,16	Abs
238	0,00	0,00	0,46	0,15	Abs
264	0,01	-0,02	0,39	0,13	Abs
269	-0,09	-0,04	0,58	0,15	Abs
388	-0,13	0,00	0,46	0,11	Abs
471	-0,05	0,00	0,33	0,09	Abs
847	-0,01	0,07	0,71	0,26	Mild
857	-0,01	0,00	0,34	0,11	Abs
961	-0,02	0,04	0,21	0,08	Abs
1529	0,21	0,00	-0,02	0,06	Abs
T3	0,05	0,00	0,23	0,09	Abs
T5	-0,05	0,00	0,22	0,06	Abs

Taula 11. Estat de metilació en carcinomes pulmonars del tipus escamós. Es mostren les ràtios entre mostra digerida i no digerida pels tumors que presenten metilació en alguna de les CpGs testades. En blanc, metilació absent; en verd, nivell de metilació mig; en groc, nivell de metilació moderat; i en verd, nivell alt de metilació (veure material i mètodes).

Es va observar que línies cel·lulars amb hipermetilació del promotor expressaven nivells similars de proteïna PAR3 que les línies cel·lulars que no tenien alteracions en la metilació. Posteriorment, la seqüenciació de bisulfit en algunes d'aquestes línies va confirmar que les CpGs avaluades per MS-MLPA coincidien amb l'estat de metilació de tota la part d'illa a la que pertanyien. Tot i així, la manca de relació entre la hipermetilació en aquesta illa CpG i la pèrdua

d'expressió de la proteïna PAR3, indica que aquesta alteració epigenètica no constitueix un mecanisme d'alteració de *PAR3* en càncer de pulmó (figura 27).

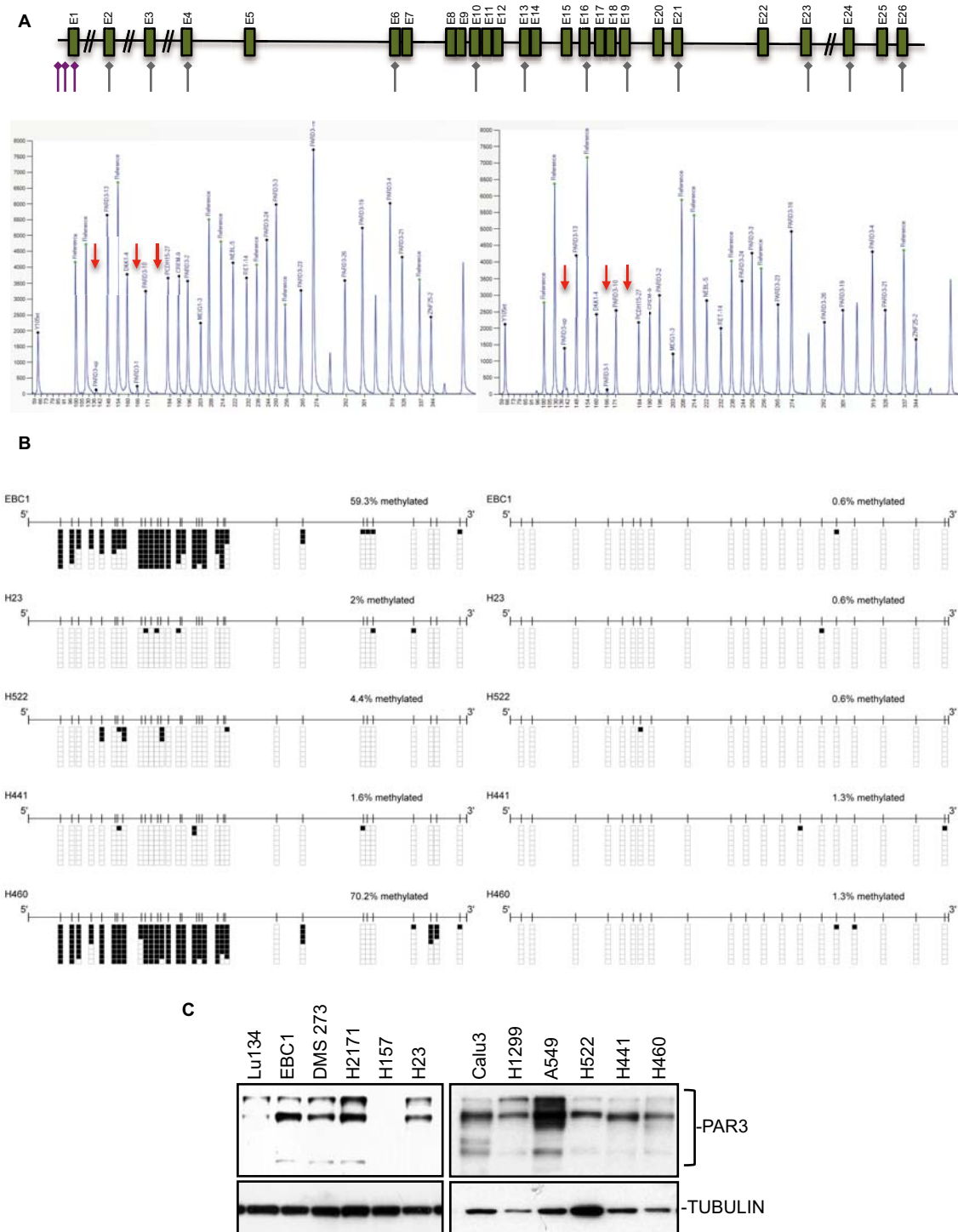


Figura 27. Exemples de l'estat de metilació de *PAR3* i correlació entre aquest i els nivells d'expressió de la proteïna PAR3. **A.** MS-MLPA per determinar la presència de metilació al promotor de *PAR3*. Al panell superior s'indiquen les sondes per testar el nombre de còpies situades al gen, en lila les que determinen canvis en la metilació. A baix, electroferogrames de les mostres digerides en dues línies cel·lulars, la de la dreta té metilació en el promotor en una de les CpGs testades, la de l'esquerra no presenta metilació. S'indiquen amb fletxes els pics corresponents a les sondes de metilació. **B.** Seqüenciació de bisulfit de la regió promotora de *PAR3*. Es representen vuit clons per cada mostra. Els quadrats blancs i negres indiquen no metilació i metilació, respectivament, i cada barra vertical és una CpG. **C.** *Western blot* de PAR3 en les línies cel·lulars indicades.

2.5. ANÀLISI DEL PATRÓ D'IMMUNOTINCIÓ EN CÀNCER DE PULMÓ I DE CAP I COLL

Per avaluar els nivells i patrons d'expressió de la proteïna PAR3 es van realitzar immunohistoquímiques en tumors primaris de pulmó i de cap i coll (HNSCC, de l'anglès, Head and Neck Squamous Cell Carcinomas). Es va trobar pertinent incloure en l'estudi els tumors de cap i coll perquè aquest tipus de càncer és, des d'un punt de vista histopatològic i etiològic, molt similar al càncer de pulmó de tipus escamós. A més, en els tumors de cap i coll s'havien descrit mutacions inactivadores de *PAR3* (Rothenberg et al., 2010). Així doncs, es van avaluar 190 tumors primaris de pulmó de cèl·lula no petita, incloent adenocarcinoma i carcinoma escamós, i 262 tumors de cap i coll continguts en *microarrays* de teixits (TMA, de l'anglès, *Tissue MicroArray*).

Les úniques immunohistoquímiques trobades en la bibliografia van ser a la web de *atlas antibodies* (<http://atlasantibodies.com/>) on es mostra que la localització intracel·lular de PAR3 és al nucli, citoplasma o membrana, depenent del teixit. En el present treball de tesi es va trobar que PAR3 es localitza essencialment al citoplasma i a la membrana plasmàtica. La localització en la membrana, més marcada en els tumors de cap i coll, coincideix amb la funció de PAR3 en la formació d'unions estretes.

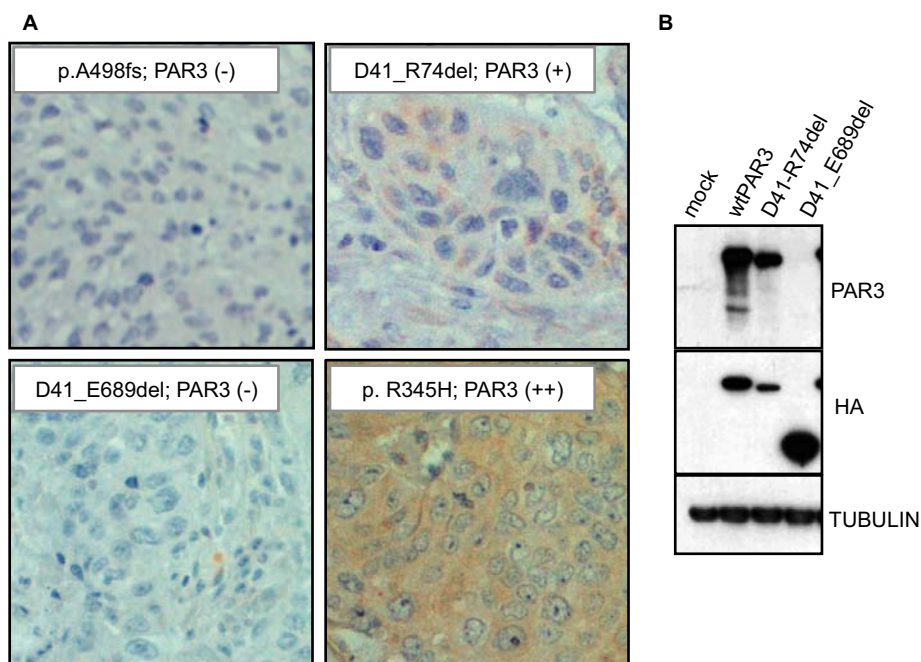


Figura 28. Avaliació de l'expressió de PAR3 en diferents mutants. **A.** Immunohistoquímiques de PAR3 dels mutants indicats. **B.** *Western blot* que mostra l'expressió ectòpica de les proteïnes indicades en la línia cel·lular H157 detectades amb els anticossos HA i PAR3. Els mutants D41_R74del i D41_E689del donen lloc a proteïnes més curtes.

Com era d'esperar, els tumors amb mutacions a *PAR3* del tipus grans deletions o mutacions de canvi de pauta de lectura van ser negatius per immunohistoquímica (figura 28A). D'altra banda, tumors amb deletions en pauta, com p.D41_R74del i p.D41_E689del, van mostrar immunotinció moderada i completament negativa de PAR3, respectivament (figura 28A). En

aquest últim cas, la immunotinció negativa s'explica perquè l'anticòs utilitzat detecta la seqüència aminoacídica entre els residus 457 i 744, i la proteïna que genera aquesta deleció no els conté. Això és consistent amb els resultats de *western blot* després de l'expressió ectòpica d'aquestes proteïnes mutants, tal i com s'exposa en la figura 28B.

Les immunohistoquímiques es van avaluar establint els rangs de tinció de negatiu, baix, moderat o alt (figura 29A). Trobant-se els teixits normals en el rang moderat de tinció. En la classificació dels tumors segons el seu grau d'expressió per immunotinció, el percentatge de tumors en cada grup és diferent segons el tipus histològic. Hi ha diferències significatives pel que fa a l'expressió, que és major en adenocarcinomes de pulmó que en escamosos o en tumors de cap i coll (figura 29C).

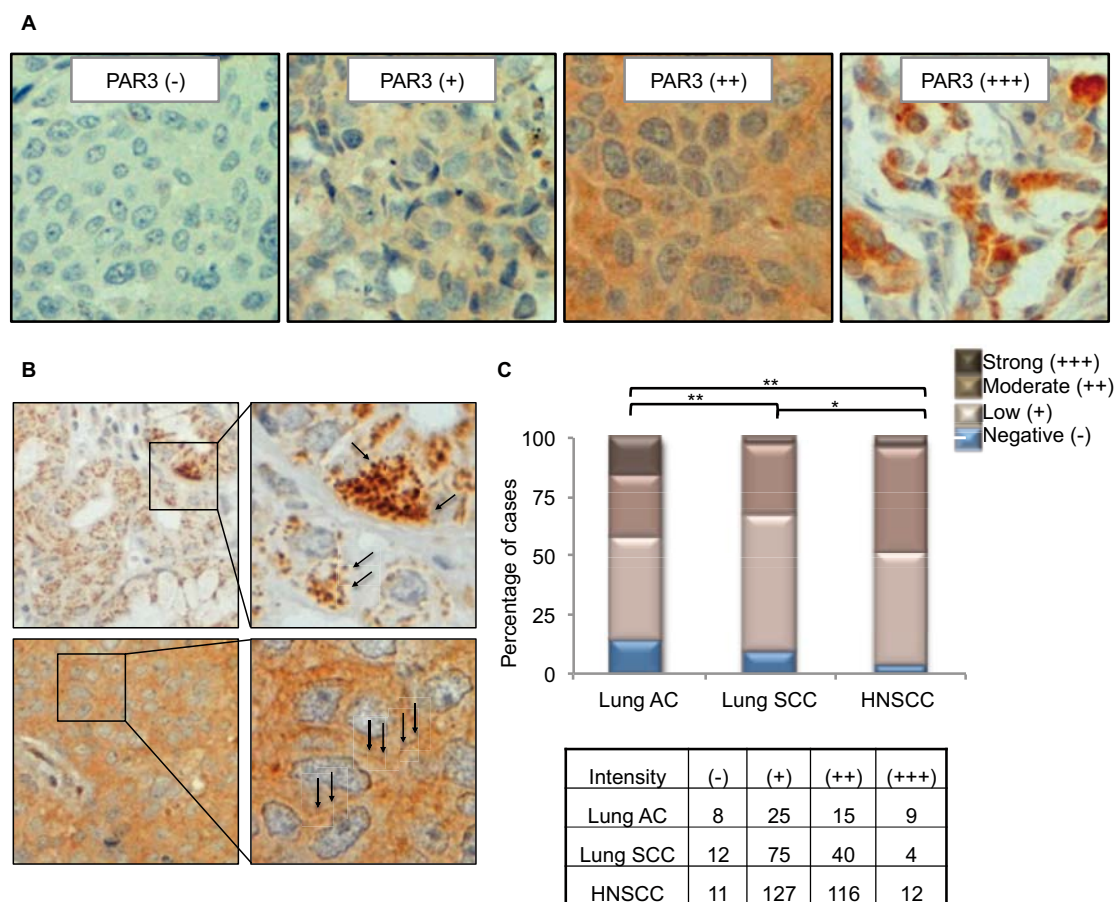


Figura 29. Immunohistoquímiques de PAR3 en LSCC. **A.** Rang de tinció establert per l'avaluació de les immunohistoquímiques. (-) negatiu, (+) baix, (++) moderat, (+++) alt. **B.** A dalt, mostres dels acúmuls de sobreexpressió de PAR3 en vesícules. A baix, localització de PAR3 a les zones de la membrana cel·lular, clar reforç membranós. **C.** Distribució dels graus d'immunotinció de PAR3 segons el tipus histològic. AC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma escamós; HNSCC, carcinoma escamós de cap i coll. Significança estadística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

S'observava expressió alta de la proteïna PAR3 en un terç dels tumors, tot i que molts d'ells no presenten cap alteració genètica a *PARD3*. Això indica la possible existència d'una desregulació de la via a un altre nivell (Rothenberg et al., 2010) que acabaria afectant el grau d'expressió de PAR3 a nivell proteic. Entre aquests tumors amb alta expressió, apareixen sovint zones de més concentració de proteïna englobades en punts o vesícules (figura 29B). El significat biològic

d'aquests cúmuls no es coneix, però han estat descrits per PAR3 en treballs previs: en cèl·lules Caco-2 derivades d'un adenocarcinoma de còlon (Schumann et al., 2012) i en sistemes de sobreexpressió (Mizuno et al., 2003), en aquest darrer treball s'atribueixen a sobreexpressió excessiva de la proteïna. En els casos que es presenten en aquesta tesi doctoral es tracta d'expressió endògena, segurament aberrant, la qual cosa concorda perfectament amb els articles citats anteriorment.

En alguns tumors de cap i coll va observar-se un patró d'expressió heterogeni, de tal manera que hi havia una tendència en el tumor d'incrementar l'expressió de PAR3 en les seves zones més invasives (figura 30A-B).

En el cas dels tumors de cap i coll, a més de l'estudi en tumors, es van avaluar els nivells d'expressió de la proteïna PAR3 en lesions preneoplàsiques, adjacents a la zona tumoral. En els epitelis normals, la tinció de PAR3 disminuïa amb l'avançament de les capes epitelials, és a dir, apareixia més tenyit a les zones basals, i es localitzava concretament a la zona apical de la cèl·lula. Les lesions hiperplàsiques i displàsiques presentaven el mateix patró de tinció: elevada expressió a les zones basals i molt baixa o nul·la a les capes més superficials de l'epiteli (figura 30C).

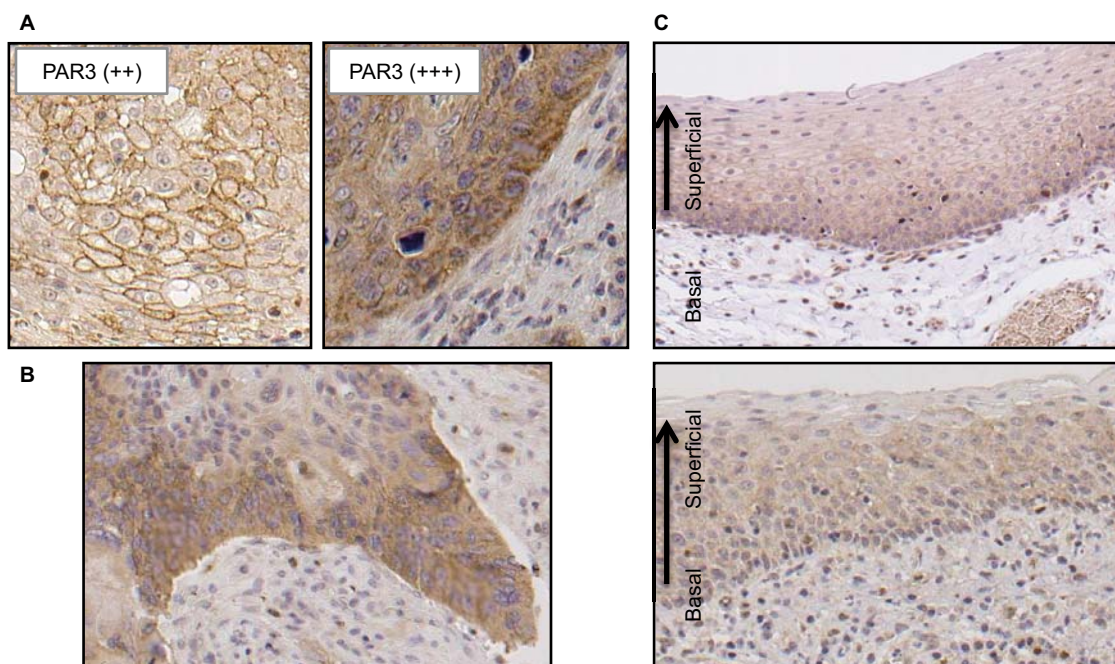


Figura 30. Immunohistoquímiques de PAR3 en HNSCC. **A.** Exemples del rang de tinció establert per l'avaluació de les immunohistoquímiques. **B.** Representació de la tinció heterogènia de PAR3 en un tumor HNSCC. **C.** Representació de la tinció heterogènia de PAR3 en lesions preneoplàsiques.

Finalment, es van dividir els tumors en dos grups. El primer grup contenia els tumors amb immunotinció de PAR3 negativa i baixa; mentre que el segon grup constava dels tumors que presentaven expressió moderada i alta. L'objectiu d'aquestes agrupacions era buscar correlacions entre els nivells d'immunotinció de PAR3 i paràmetres d'evolució de la malaltia, ja sigui càncer de pulmó o càncer de cap i coll. En càncer de pulmó, els tumors de pacients amb

alta expressió de PAR3 eren de major mida. No es va observar cap correlació entre els nivells de PAR3 i l'estadi tumoral o la presència de metàstasis als ganglis o a altres òrgans. Pel que fa als tumors de cap i coll no es va observar correlació de cap mena (taula 12).

LSCC Patients	Negative/Low	Moderate/High
<i>Distant metastasis</i>		
No	22	13
Yes	8	5
<i>Lymph node involvement</i>		
No	44	30
Yes	28	20
<i>Tumor size</i>		
T1-T2	86	40
T3 & T4	13	21**
<i>Clinical Stage</i>		
I	56	29
II-III	38	28

HNSCCs Patients	Negative/Low	Moderate/High
<i>Tumor location</i>		
Bottom of the tongue	59 (22%)	45 (17%)
Tonsil	68 (26%)	65 (25%)
Hypopharynx	6 (2%)	7 (3%)
Larynx	5 (2%)	7 (3%)
<i>Distant metastasis</i>		
No	111	98
Yes	27	26
<i>Lymph node involvement</i>		
No	28	36
Yes	110	88
<i>Tumor size</i>		
T1-T2	37	43
T3 & T4	101	81
<i>Clinical Stage</i>		
I-II-III	38	37
IV-V	100	87

Taula 12. Distribució de les categories de tinció de PAR3 per cadascun dels paràmetres clínics anomenats. Només estan inclosos els tumors dels que disposàvem de dades. Quadre de l'esquerra, dades de LSCC. A la dreta, dades de HNSCC. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

3. LES FUNCIONS DE PAR3 S'ALTEREN EN TUMORS

3.1. DETERMINACIÓ DE LA VARIANT TRANSCRIPCIONAL MÉS ABUNDANT EN PULMÓ

Per tal de comprendre el paper de *PARD3* en el procés tumoral, es van estudiar els efectes funcionals derivats de la restitució de *PARD3* en línies cel·lulars de càncer de pulmó. Abans de clonar la seqüència codificant sencera de *PARD3* vam voler conèixer quina era la isoforma que més s'expressava en el teixit pulmonar normal.

El gen *PARD3* presenta múltiples variants transcripcionals degudes a *splicing* alternatiu i a la presència de dos llocs diferents de poliadenilació. No existeixen gaires treballs que caracteritzin les diferents variants transcripcionals de *PARD3* i en quins teixits s'expressen. L'any 2001, Fang i Xu van clonar el cDNA de *PARD3* i van estudiar els perfils d'expressió en carcinoma hepatocel·lular humà i en alguns teixits normals. Van descriure 5 variants transcripcionals amb diferents esdeveniments de *splicing* alternatiu. Els exons 5, 12, 21, 22 i 23 estan absents en algunes d'aquestes variants transcripcionals, i l'exó 21 conté un codó *stop* extra, que permet la producció de transcrits més petits (Fang and Xu, 2001). Dos anys més tard, Gao i col·laboradors van descriure sis variants de *PARD3* i la seva abundància en teixits humans. Les variants descrites per aquests autors es basen en els *splicings* alternatius descrits per Fang i Xu, però ells van afegir el descobriment de dos seqüències alternatives noves. Aquests dos nous esdeveniments d'*splicing* consisteixen en la pèrdua o no de 9bp entre els exons 15 i 16 i en l'addició o no de l'exó 18 (Gao et al., 2002). Actualment, a les bases de dades

es mostren 11 variants transcripcionals pel gen *PAR3*. Aquestes variants es generen per la presència o absència de 5 regions diferents i les seves possibles combinacions: exó 5, exó 12, 9bp entre els exons 15 i 16, exó 17 i exó 22 (figura 31). A més, l'exó 21, amb lloc de poliadenilació, només apareix en 3 variants transcripcionals que generen una proteïna de 110 KDa. Les altres 8 variants transcripcionals codifiquen per una proteïna PAR3 que pesa entre 150 i 180 KDa.

La informació del perfil de les variants transcripcionals expressades en pulmó està restringit a aquests dos articles, segons els quals les variants més comuns en pulmó contenen l'exó 5 i no contenen l'exó 17. Quatre variants transcripcionals compleixen aquestes premisses, i a aquest fet cal afegir-li que la informació dels dos articles va obtenir-se amb poques mostres de pulmó, per aquest motiu es va creure necessari determinar quina era la variant transcripcional més expressada en pulmó.

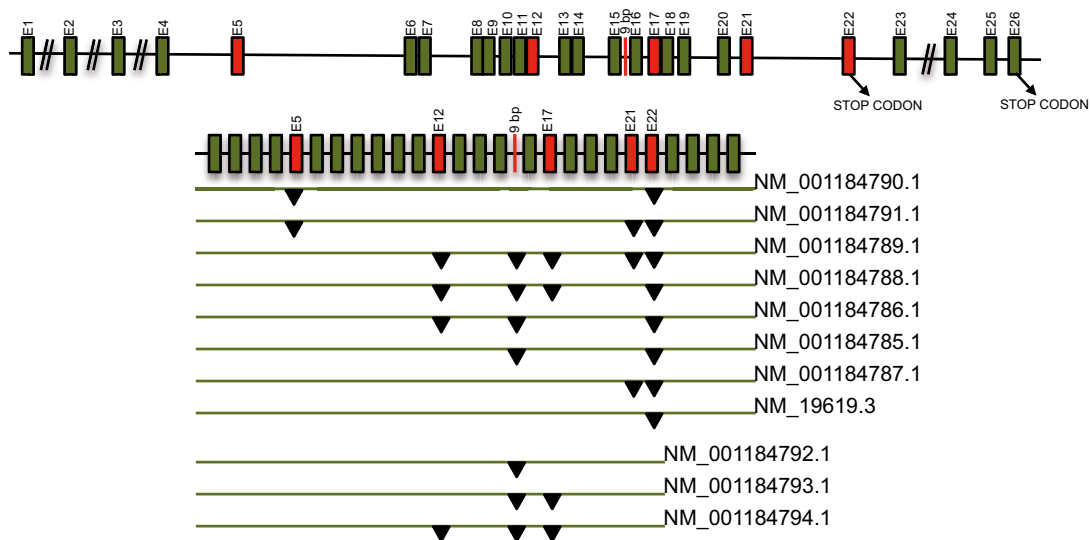


Figura 31. Representació esquemàtica del locus de *PAR3* i les seves variants transcripcionals. Els exons alternatius s'indiquen en vermell i la seva manca en un transcrit es mostra com un triangle negre.

En primer lloc i amb l'objectiu de discriminar les isoformes que donen lloc a proteïna PAR3 de major pes molecular de les que donen lloc a proteïnes de menor tamany, es van fer *western blots* de línies cel·lulars de càncer de pulmó. Es va concloure que les formes més curtes de PAR3 s'expressaven molt menys que les més grans. Seguidament es va amplificar la seqüència sencera del cDNA de *PAR3*, des de l'exó 1 fins l'exó 26, en 2 mesclades de cDNAs diferents (cada mescla consistia en quatre productes de cDNA provinents de RNA de teixit pulmonar sa). Els productes amplificats van ser clonats en un vector TOPO-TA i es va identificar quina era la variant clonada en més de 80 clons. La distinció de cada regió alternativa es va fer mitjançant la seva amplificació per PCR, en alguns casos calia seqüenciar els productes amplificats i en altres casos ja es podia diferenciar la presència o no de la regió a través de la determinació de la mida dels productes en una agarosa.

Els resultats van indicar que hi ha un número molt elevat de variants transcripcionals diferents expressades en pulmó i es va poder concloure que la variant més abundant és la que conté totes les regions variables excepte els 9bp entre els exons 15 i 16 (NM_001184785.1) (figura 32). Aquesta variant va clonar-se en vectors d'expressió induïble i transitòria i mitjançant mutagènesi dirigida es van obtenir les versions mutants de la proteïna.

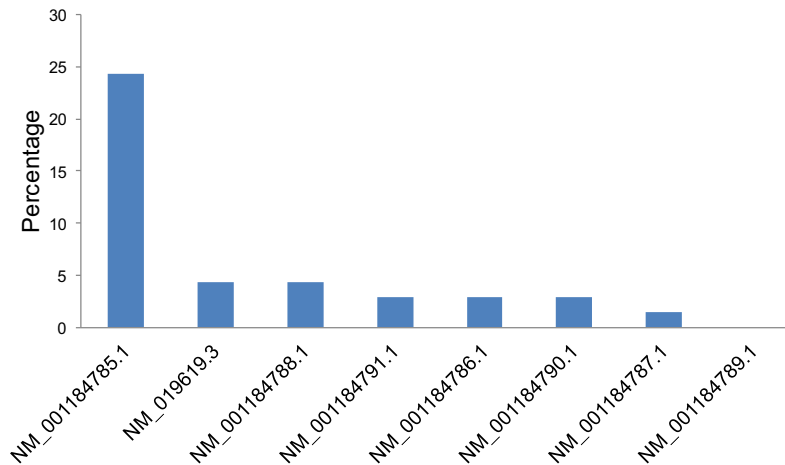


Figura 32. Abundància relativa dels transcrits alternatius de *PARD3* després de seqüenciar 80 clons d'un *pool* provinent de RNAs de teixit pulmonar sa.

3.2. ESTABLIMENT DELS SISTEMES D'EXPRESSIÓ ECTÒPICA DEL GEN *PARD3*

Per tal de definir la implicació del gen *PARD3* en el procés carcinogènic es va clonar la seva forma salvatge i algunes de les seves formes mutants mitjançant mutagènesi dirigida: c.121-?_2067+?del (p.D41_E689del), c.121-2A>G (p.D41_R74del), c.1034G>A (p.R345H), c.2581A>T (p.T861S), i c.3129A>G (p.I1043M). El clonatge es va fer en dos constructes diferents: en un vector que va ser utilitzat per expressió transitòria i que contenia una cua HA (pcDNA4) i en un altre vector que contenia un promotor regulat per un sistema Tet-ON (pRetroX-Tight-Pur), induïble per doxiciclina. En ambdós casos, aquests vectors van ser utilitzats en la línia derivada d'un càncer de pulmó escamós H157, i en una línia derivada d'un glioblastoma, T98G, ambdues completament deficientes per PAR3. A partir d'ara, s'anomenaran els clonatges transitoris wtPAR3, D41_R74del, D41_E689del R345H, T861S i I1043M. Mentre que els clonatges estables i induïbles s'acompanyaran de tr (de l'anglès, tet repressor): tr-wtPAR3, tr-D41_R74del, tr-R345H, tr-T861S i tr-I1043M.

A continuació es mostren els *western blots*, les immunofluorescències i els resultats de PCR quantitativa dels sistemes induïbles utilitzats (figures 33 i 34). El percentatge d'expressió de PAR3 dels diferents clons és d'entre el 40% i el 80% de totes les cèl·lules del cultiu.

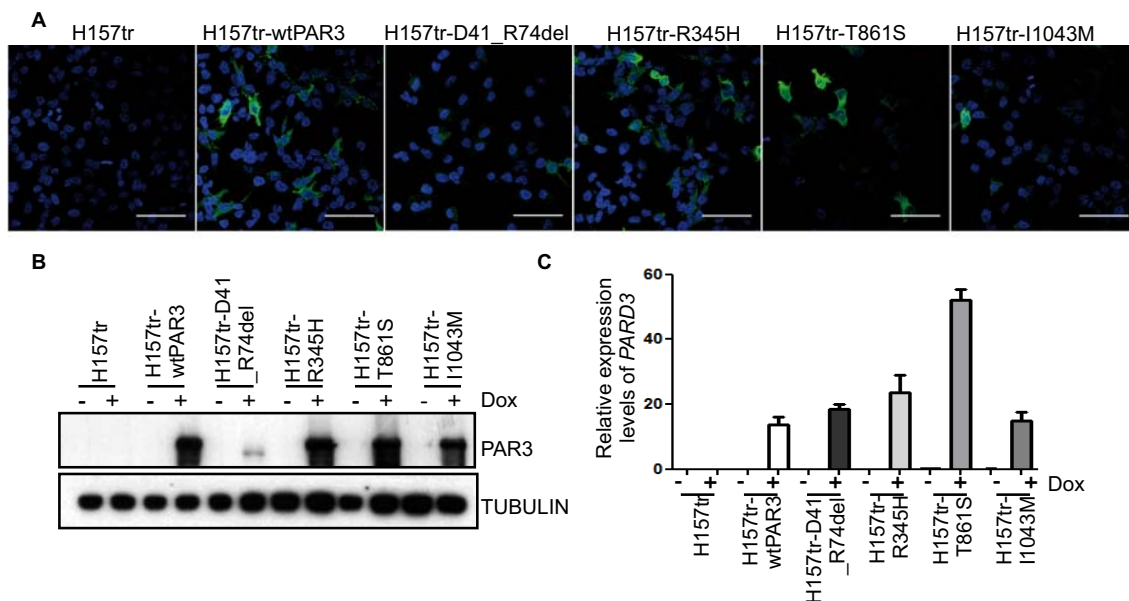


Figura 33. El sistema induïble en la línia H157. **A.** Immunofluorescències amb l'anticòs de PAR3 en les línies derivades de H157 després de la inducció del gen amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). Barra d'escala de 50 μ m. Els nuclis es tenyeixen amb DAPI. **B.** Western blots que mostren l'expressió dels diferents mutants de la proteïna PAR3 sota el control del repressor tet, amb (+Dox) i sense (-Dox) inducció dels seus nivells d'expressió amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). **C.** Nivells de mRNA de *PAR3* relativitzats al control *ACTB* pels diferents mutants indicats, amb (+Dox) i sense (-Dox) inducció dels seus nivells d'expressió amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). Les barres corresponen a desviacions estàndard de 3 rèpliques.

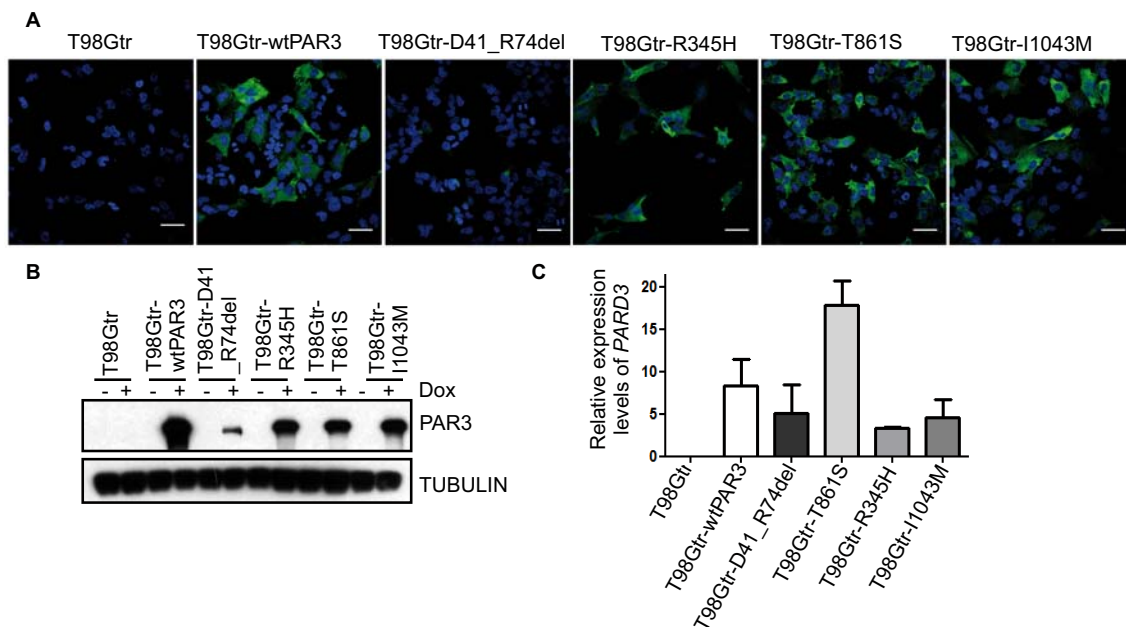


Figura 34. El sistema induïble en la línia T98G. **A.** Immunofluorescències amb l'anticòs de PAR3 en les línies derivades de H157 després de la inducció del gen amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). Barra d'escala de 50 μ m. Els nuclis es tenyeixen amb DAPI. **B.** Western blots que mostren l'expressió dels diferents mutants de la proteïna PAR3 sota el control del repressor tet, amb (+Dox) i sense (-Dox) inducció dels seus nivells d'expressió amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). **C.** Nivells de mRNA de *PAR3* relativitzats al control *ACTB* pels diferents mutants indicats, amb (+Dox) inducció dels seus nivells d'expressió amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). Les barres corresponen a desviacions estàndard de 3 rèpliques.

3.3. LA PROTEÏNA MUTANT D41_R74del ES DEGRADADA PEL PROTEASOMA

En els experiments d'expressió ectòpica de PAR3, especialment en el sistema induïble, es va observar que els nivells de la proteïna D41_R74del eren sempre més baixos que els de la resta de mutants i el de PAR3 salvatge. Els nivells de proteïna d'aquest mutant disminuïen de manera molt clara en els diferents temps d'expressió de 24, 48 i 72h. Aquesta observació va constatar-se en comparar la vida mitja de les proteïnes generades pels constructes tr-wtPAR3 i tr-D41_R74del, recollint extractes proteics a diferents temps postinducció amb doxiciclina. Com s'observa en la gràfica, el càlcul de la vida mitja després de 9h d'inducció, és de 20h per la proteïna tr-wtPAR3 i de 11h per la tr-D41_R74del (figura 35).

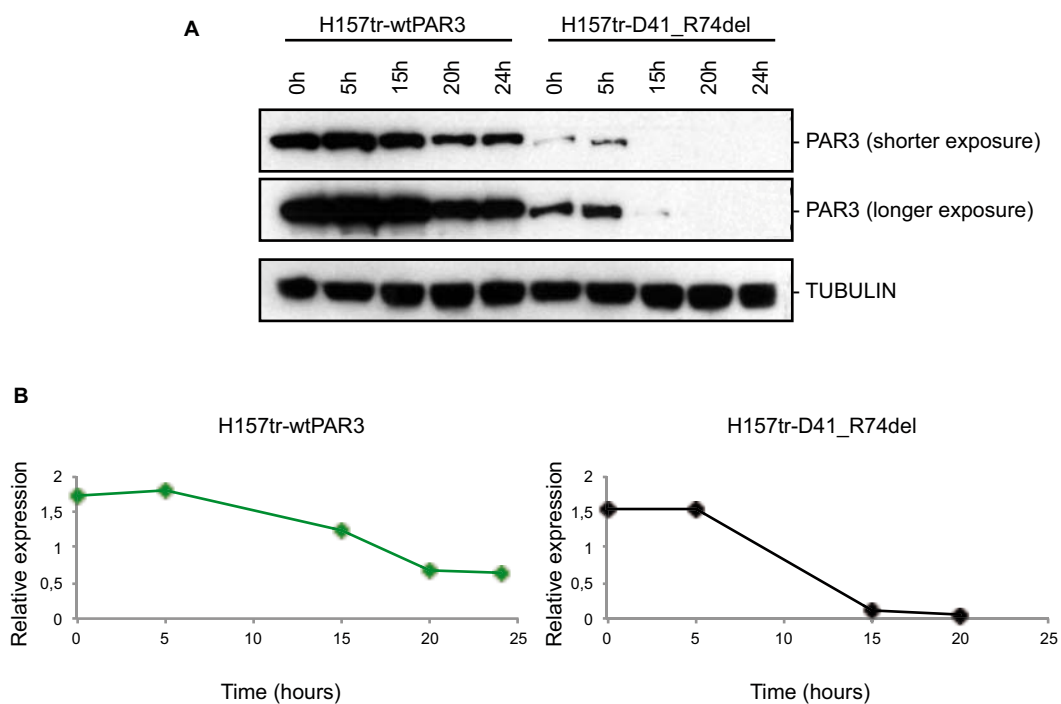


Figura 35. Vida mitja de la proteïna PAR3. **A.** *Western blots* per la proteïna wtPAR3 i la D41_R74del després de la inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l, 9h) als temps indicats. **B.** Gràfic pel càlcul de la vida mitja de la proteïna, que relaciona l'expressió relativa de PAR3 i el temps.

A diferència del que s'observa amb la proteïna, els nivells de transcrits dels diferents constructes eren heterogenis, però no disminuïen especialment en el mutant tr-D41_R74del. Per tant, la disminució dels nivells de proteïna no coincidia amb una disminució en els nivells d'RNA. Per aquest motiu es va creure que la proteïna mutant D41_R74del podia patir algun tipus de degradació post-traduccional. Per comprovar aquesta hipòtesi es va testar l'efecte de les molècules MG-132 i ALLN, dos inhibidors del proteasoma, en els nivells de la proteïna D41_R74del. MG-132 és un inhibidor específic del proteasoma que impedeix la degradació de proteïnes ubiquitinitzades, mentre que ALLN, a més de ser un inhibidor del proteasoma, inhibeix també les calpaïnes i les catepsines. Després de tractar les cèl·lules amb doxiciclina, per tal d'induir l'expressió de PAR3, es van tractar amb els inhibidors anteriors. Es va observar que els nivells de proteïna D41_R74del de les cèl·lules tractades amb inhibidors incrementaven

de forma clara comparant-los amb els nivells de la mateixa proteïna en cèl·lules sense tractar. En canvi, en les cèl·lules que expressaven la proteïna wtPAR3 pràcticament no hi havia canvis en els nivells de proteïna wtPAR3 (figura 36). A més, és interessant destacar que amb l'inhibidor ALLN la recuperació és menor, la qual cosa pot indicar que la via que s'està utilitzant en la degradació de D41_R74del és la del proteasoma. Tot i així caldria fer altres experiments per determinar-ho, doncs la dosi i l'efectivitat de les diferents drogues podria ser la causa d'aquestes diferències.

Aquests resultats es van confirmar també quan es van repetir els experiments amb el sistema d'expressió estable de la línia cel·lular T98G (figura 36B).

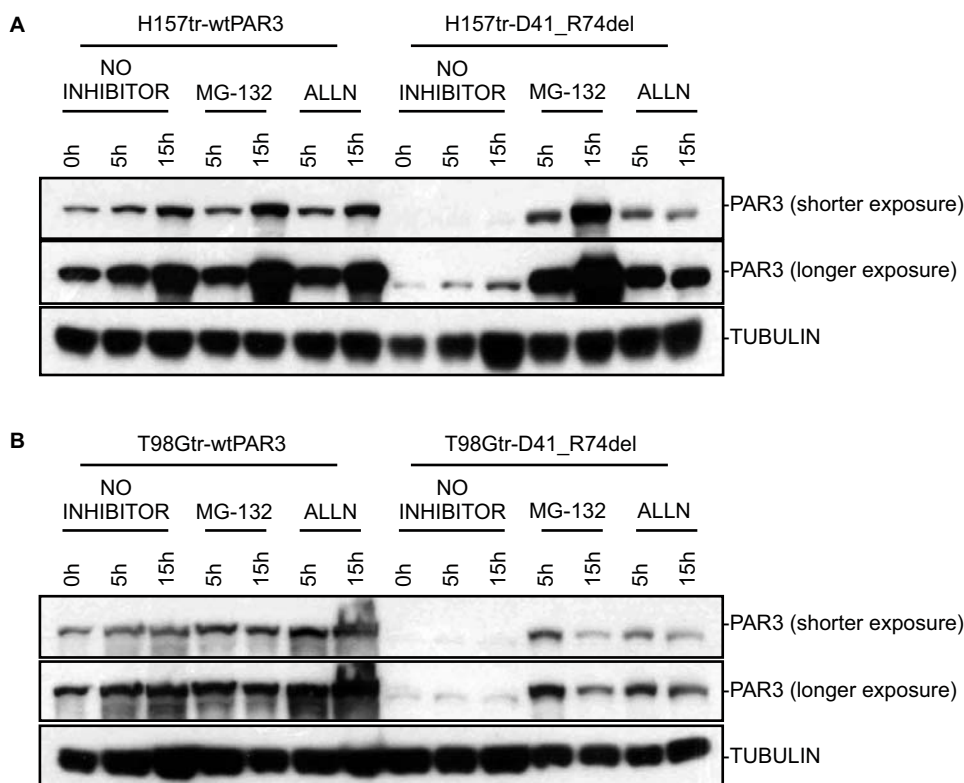


Figura 36. Degradació del mutant D41_R74del pel proteasoma. **A.** Línia H157. *Western blots* que mostren un increment dels nivells de la proteïna D41_R74del i no de la wtPAR3 després del tractament amb els inhibidors MG-132 i ALLN durant els temps indicats i després de la inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l, 9h). **B.** Línia T98G. *Western blots* que mostren un increment dels nivells de la proteïna D41_R74del i no de la wtPAR3 després del tractament amb els inhibidors MG-132 i ALLN durant els temps indicats i després de la inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l).

Es va voler determinar per quin mecanisme la proteïna mutant D41_R74del pateix més degradació que la proteïna wtPAR3. Per això van utilitzar-se programes lliures de predicció de seqüències PEST (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>), que són seqüències putatives de marcatge a degradació, i de predicció de llocs de trencament del proteasoma (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>). No es van observar diferències pel que fa a la generació de noves seqüències PEST ni a sorgiment de noves seqüències aminoacídiques que puguin ser dianes de degradació del proteasoma.

Tot i la degradació que pateix aquest mutant, els seus nivells baixos d'expressió de proteïna són comparables als nivells endògens d'altres línies cel·lulars (figura 37), per la qual cosa es va mantenir aquest mutant en els estudis posteriors, sempre testant el manteniment d'un nivell d'expressió mínim de proteïna.

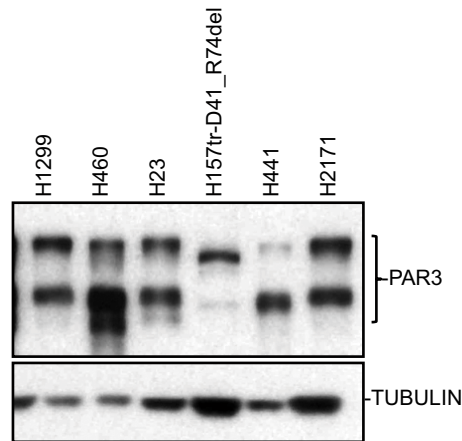


Figura 37. *Western blots* per la proteïna PAR3 endògena en les línies cel·lulars indicades i per l'expressió ectòpica de la proteïna mutant D41_R74del després de la inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h).

3.4. LES PROTEÏNES PAR3 MUTANTS MOSTREN MENYS CAPACITAT COLONIGÈNICA

Seguidament es va voler comprovar si la capacitat de formació de colònies (capacitat colonigènica) es veia afectada en els diferents mutants. En aquest assaig s'avalua si una cèl·lula, sembrada de manera individual, és capaç de dividir-se i formar una colònia.

Es va utilitzar la línia cel·lular H157 i els plàsmids d'expressió transitòria de la proteïna PAR3 salvatge i els diferents mutants. Després de 2 setmanes, les cèl·lules es van tenyir amb cristall violeta i es van fer els comptatges i els estudis estadístics pertinents.

Es va observar que les cèl·lules transfectades amb el vector D41_E689del eren les que tenien més capacitat de formació de colònies, seguides de les transfectades amb el vector D41_R74del. La resta de mutants, R345H, T861S i I1043M mostraven una capacitat molt similar a la del mutant D41_R74del. En tots els casos la proteïna salvatge era significativament la que mostrava menys capacitat colonigènica (figura 38).

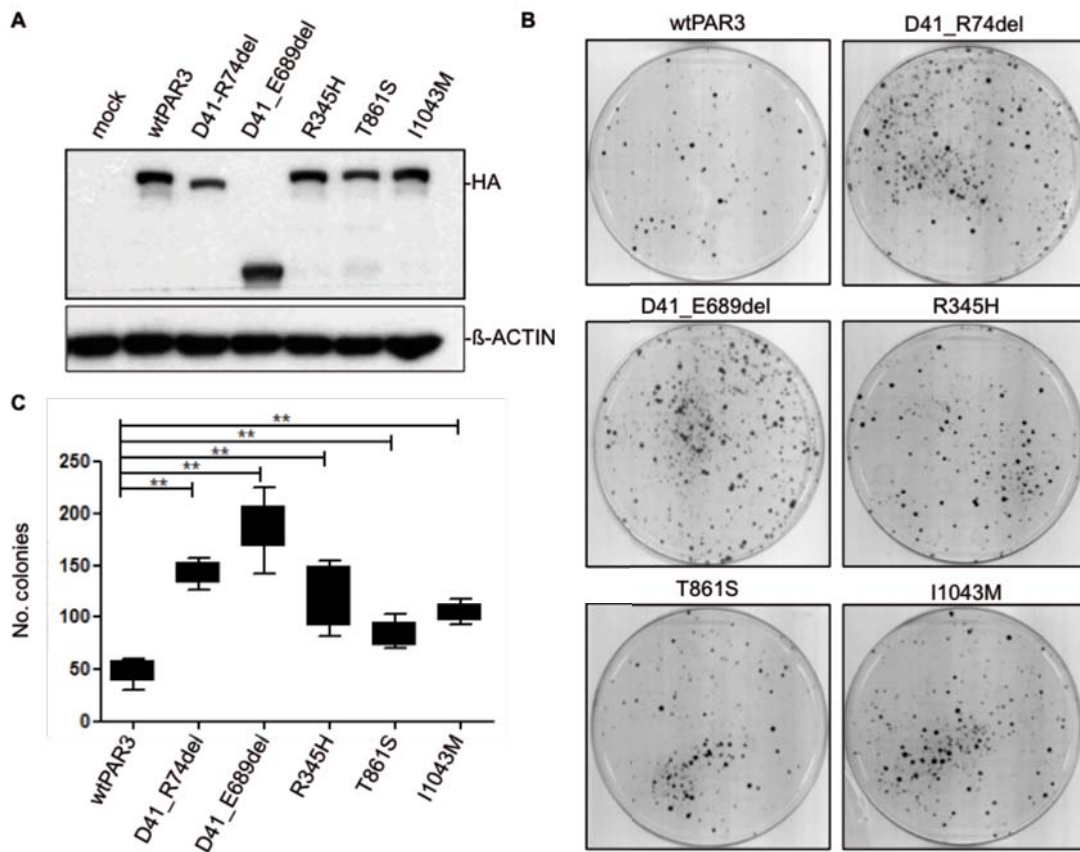


Figura 38. Assaig de formació de colònies. **A.** *Western blots* per les proteïnes PAR3 indicades. **B.** Al contrari que els mutants, la recuperació de wtPAR3 redueix la formació de colònies significativament. **C.** Quantificació de l'assaig. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

3.5. ALTERACIONS EN LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR

La localització de la proteïna PAR3 és crucial per la correcta realització de les seves funcions (Joberty et al., 2000; Mizuno et al., 2003). PAR3 permet la interacció entre proteïnes gràcies a la seva capacitat d'aglutinar-les en llocs pertinents de la cèl·lula, com en les regions apico-basals de la membrana plasmàtica. Per aquest motiu es va avaluar si els mutants conservaven l'habilitat de localitzar-se a la membrana cel·lular. Per determinar la localització subcel·lular de les diferents proteïnes PAR3 es va utilitzar la immunofluorescència i, posteriorment, es va fer un recompte del percentatge de cèl·lules que mostraven marcatge de PAR3 a la membrana cel·lular. Es van detectar canvis en la localització a la membrana en els mutants D41_E689del i D41_R74del, que tenen delecions al domini de dimerització (CR1) de la proteïna PAR3. En aquests mutants no hi ha un increment de senyal en la membrana, tal i com s'observava en la resta, i per tant, la seva funció en aquest lloc de la cèl·lula queda compromesa (figura 39).

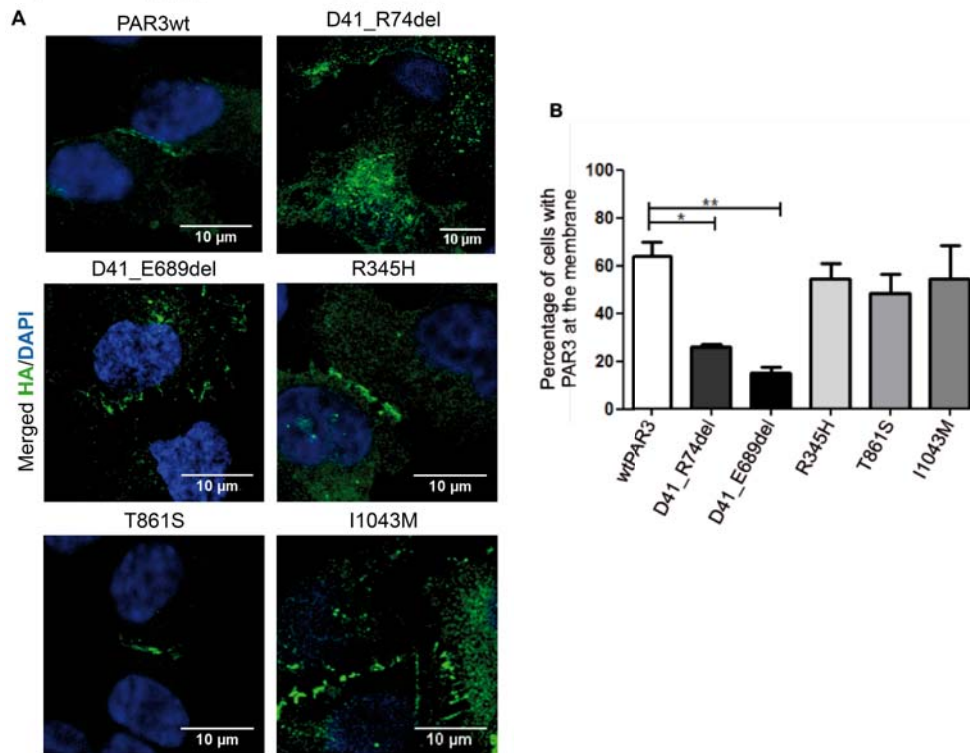


Figura 39. Localització subcel·lular de la proteïna PAR3 en la línia cel·lular H157. **A.** Immunofluorescències per determinar la localització de les proteïnes wtPAR3 i les mutants expressades transitòriament. **B.** Quantificació de l'assaig. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

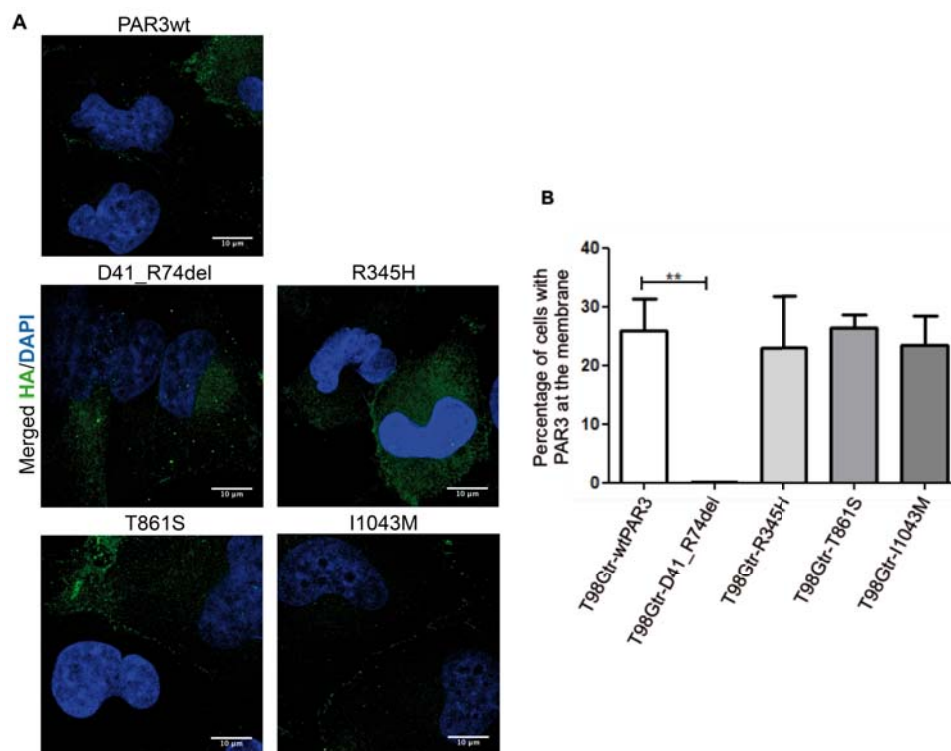


Figura 40. Localització subcel·lular de la proteïna PAR3 en la línia cel·lular T98G. **A.** Immunofluorescències per determinar la localització de les proteïnes wtPAR3 i les mutants en la línia cel·lular T98G. **B.** Quantificació de l'assaig. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

Aquestes alteracions en la localització subcel·lular de la proteïna PAR3 es van confirmar en la línia de glioblastoma T98G. Els resultats pel que fa a la distribució són semblants però el percentatge de cèl·lules que mostraven PAR3 a la membrana és menor (figura 40).

3.6. ALTERACIONS EN LA CAPACITAT D'UNIR-SE A LA QUINASA DEL COMPLEX PAR: aPKC

PAR3 forma part del complex PAR, juntament amb aPKC i PAR6 (Ellenbroek et al., 2012). S'ha descrit que la interacció PAR3-aPKC modula l'acció d'aPKC i que la localització d'aPKC als llocs d'unions intercel·lulars es perd sense PAR3 (Ishiuchi and Takeichi, 2011). La interacció d'aquestes dues proteïnes és imprescindible perquè es formi el complex PAR durant el desenvolupament de la membrana apical (Horikoshi et al., 2009). A més, aPKC fosforila PAR3 i això fa que PAR3 sigui exclosa del domini apical i es defineixin les fronteres apico-laterals (Morais-de-Sá et al., 2010). Totes aquestes interaccions possibiliten les funcions d'aPKC.

En aquest sentit, i tot i que només una de les mutacions de canvi d'aminoàcid afecta el domini d'unió a aPKC, es va creure oportú comprovar si alguna de les proteïnes mutants perdia la capacitat d'interaccionar amb aPKC. Això va fer-se mitjançant immunoprecipitació de HA, que és la cua incorporada en tots els constructes, perquè no hi hagués efecte de la pèrdua d'afinitat de l'anticòs en cap dels mutants.

Es va observar que la proteïna mutant D41_E689del pràcticament no podia unir-se a aPKC (figura 41). En la resta de mutants no es van detectar diferències respecte la proteïna salvatge pel que fa a la unió a aPKC. Així, el canvi d'aminoàcid trobat al domini d'unió a aPKC no afecta aquesta interacció. El més probable és que el plegament de la proteïna mutant D41_E689del sigui aberrant i això afecti la interacció amb aPKC i la seva funció per complet, tot i que el domini d'unió a aPKC no manqui en aquesta forma alterada. Tot i així, no es poden detectar canvis subtils en l'eficàcia de la interacció de aPKC amb les diverses formes mutants de PAR3, doncs es necessitarien tècniques més precises per avaluar-ho. En conseqüència, es pot afirmar amb tota seguretat que el mutant D41_E689del és incapaç d'unir-se a la proteïna quinasa del complex PAR, aPKC.

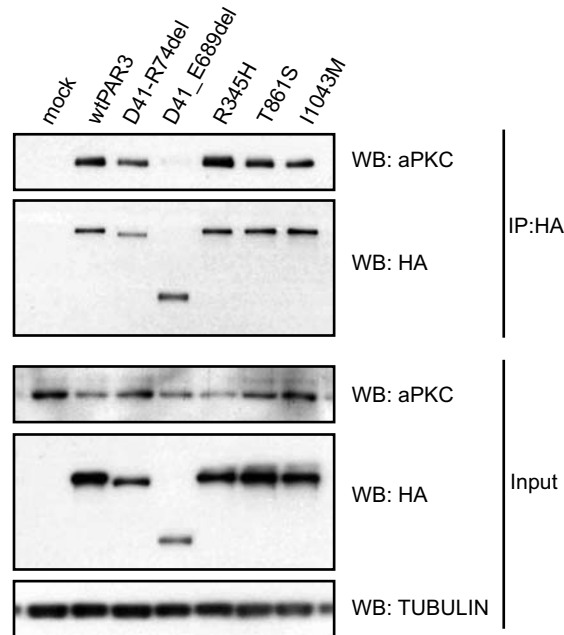


Figura 41. Coimmunoprecipitació d'aPKC. Coimmunoprecipitació d'aPKC amb l'anticòs HA en extractes de H157 expressant diferents constructes de PAR3. 1:20 part del lisat inicial (Input) s'hibridava amb els anticossos HA i aPKC.

3.7. ALTERACIONS EN LA FORMACIÓ D'UNIONS ESTRETES

PAR3 participa en la formació de les unions estretes. S'ha descrit que PAR3 és necessària pel correcte reclutament d'aPKC i PAR6 a les regions de contacte cèl·lula-cèl·lula (Mizuno et al., 2003). També s'ha observat que en cèl·lules deficientes en PAR3 hi ha un retràs en el procés de repolarització (Chen and Macara, 2005). Per això es va avaluar l'efecte en la formació d'unions estretes en la línia H157 a través del marcatge de *Zonula Occludens 1* (ZO1), proteïna que forma part del complex de les unions estretes i que s'utilitza com a marcador de les mateixes. Es va observar que la localització de ZO1 és més discontinua i menys intensa quan manca PAR3 (en el constructe buit o *mock*) i en el cas de la proteïna D41_R74del (figura 42). La resta de mutants, els de canvi d'aminoàcid, no mostren aquestes alteracions.

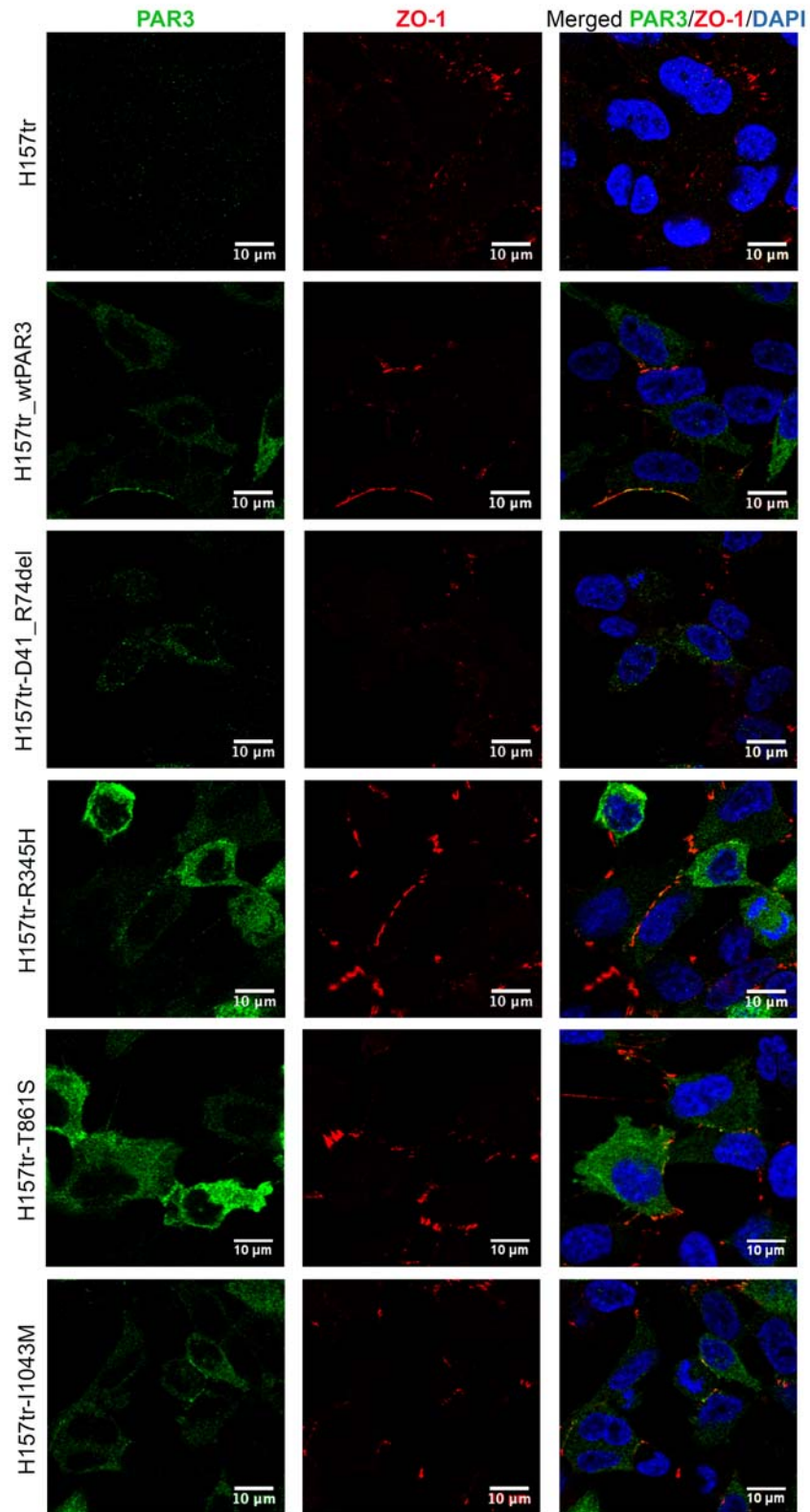


Figura 42. Immunofluorescències de les proteïnes PAR3 i ZO1 en les línies cel·lulars derivades de H157 que s'indiquen, després de la inducció amb doxiciclina (1ng/μl, 24h).

Per tal d'examinar amb més profunditat els efectes en les unions intercel·lulars associats a les proteïnes PAR3 amb mutacions del tipus canvi d'aminoàcid, es va fer servir la tècnica del *calcium switch*. Aquesta tècnica s'utilitza per avaluar la capacitat de formar correctament unions estretes després d'haver-les destruït per l'efecte de depleció de calci (Matter and Balda, 2003). Es va avaluar la localització de PAR3 i la col·localització amb ZO1 en els diferents temps després de la recuperació del calci i no es van observar canvis reproduïbles i significatius pel que fa a aquests paràmetres entre els mutants i la proteïna salvatge (figura 43).

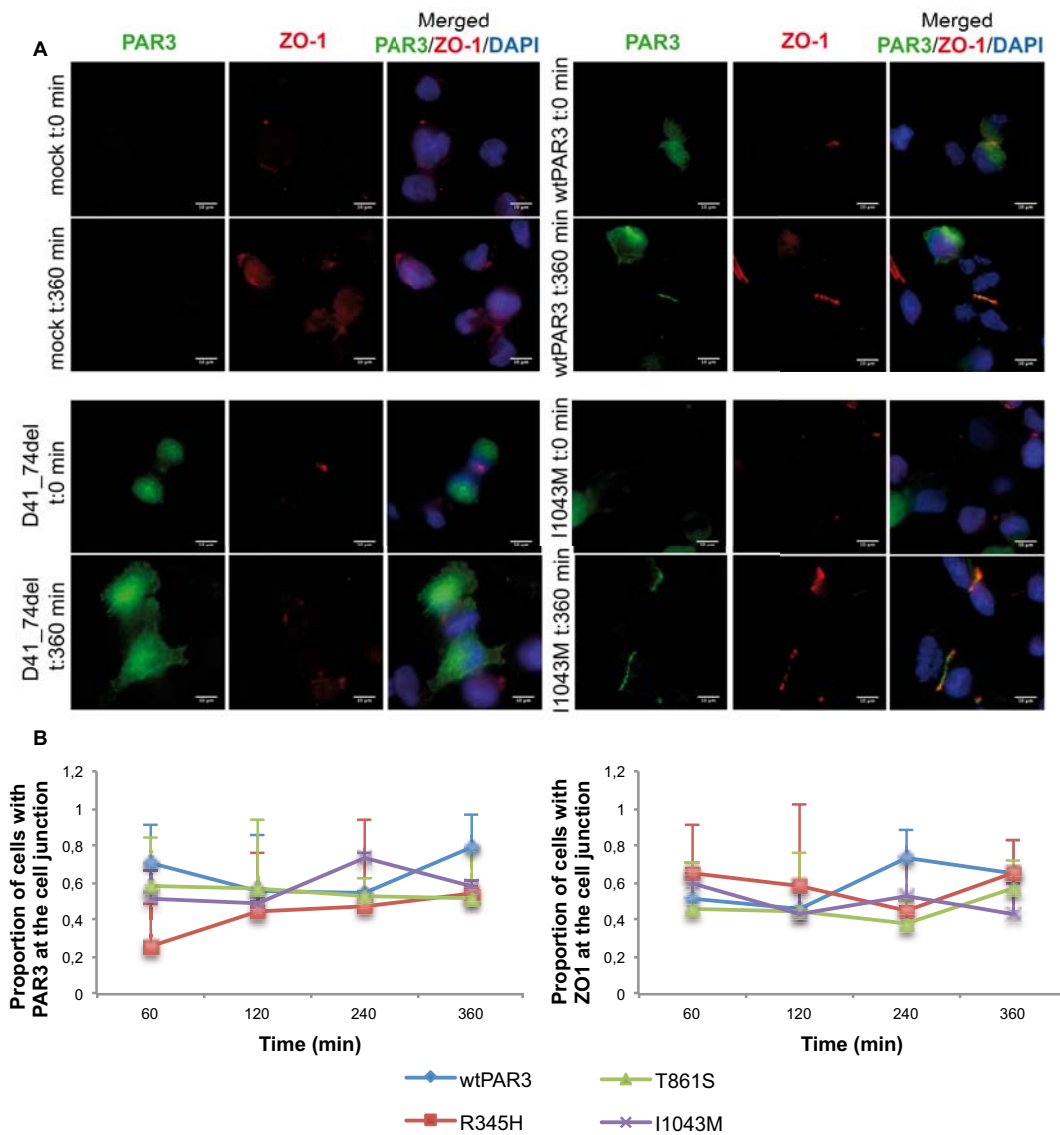


Figura 43. Assaig del *calcium switch*. **A.** Immunofluorescències de les proteïnes PAR3 i ZO1 en les línies cel·lulars derivades de H157 que s'indiquen, en els temps indicats després de la depleció de calci. **B.** Gràfics que mostren l'evolució de la localització de PAR3 i de la formació d'unions (mitjançant marcatge de ZO1) en els temps indicats post depleció de calci. Els mutants indicats i la proteïna salvatge van induir-se amb doxiciclina prèviament (1ng/ μ l, 24h).

3.8. ALTERACIONS EN LA FORMACIÓ DE PROTRUSIONS

L'activació de les proteïnes RAC1 i CDC42 determina la formació de protrusions com lamel·lopodis i fil·lopodis (Georgiou and Baum, 2010). Com s'ha comentat anteriorment, el complex PAR està connectat a diverses vies que permeten el control del citoesquelet, aquest és el cas de la interacció que té PAR3 amb la RacGEF TIAM1 per regular les protrusions d'actina (Nishimura et al., 2005). També s'ha descrit que PAR3 determina el lloc on apareixen les protrusions, la seva mida i el seu nombre (Georgiou and Baum, 2010), i que controla l'estabilitat dels microtúbuls i la formació de fil·lopodis i lamel·lopodis (Pegtel et al., 2007).

Tenint en compte tot això, es van voler testar els efectes de restituir PAR3 salvatge i els mutants en la formació de protrusions. Es va observar que les cèl·lules H157 que expressaven la proteïna salvatge, sembrades a una confluència baixa, formaven moltes més protrusions que les cèl·lules H157 control. Es va comprovar que les protrusions estaven formades per actina (utilitzant el marcador de F-actina, fal·loidina) (figura 44A). L'habilitat de formar aquestes protrusions es va comprovar també en la resta de mutants, havent-se trobat diferències significatives entre les línies H157tr-wtPAR3 i els mutants H157tr-D41_R74del i H157tr_R345H. La resta de mutants de canvi d'aminoàcid no presentaven diferències significatives quan es comparaven amb la proteïna salvatge (figura 44B-C).

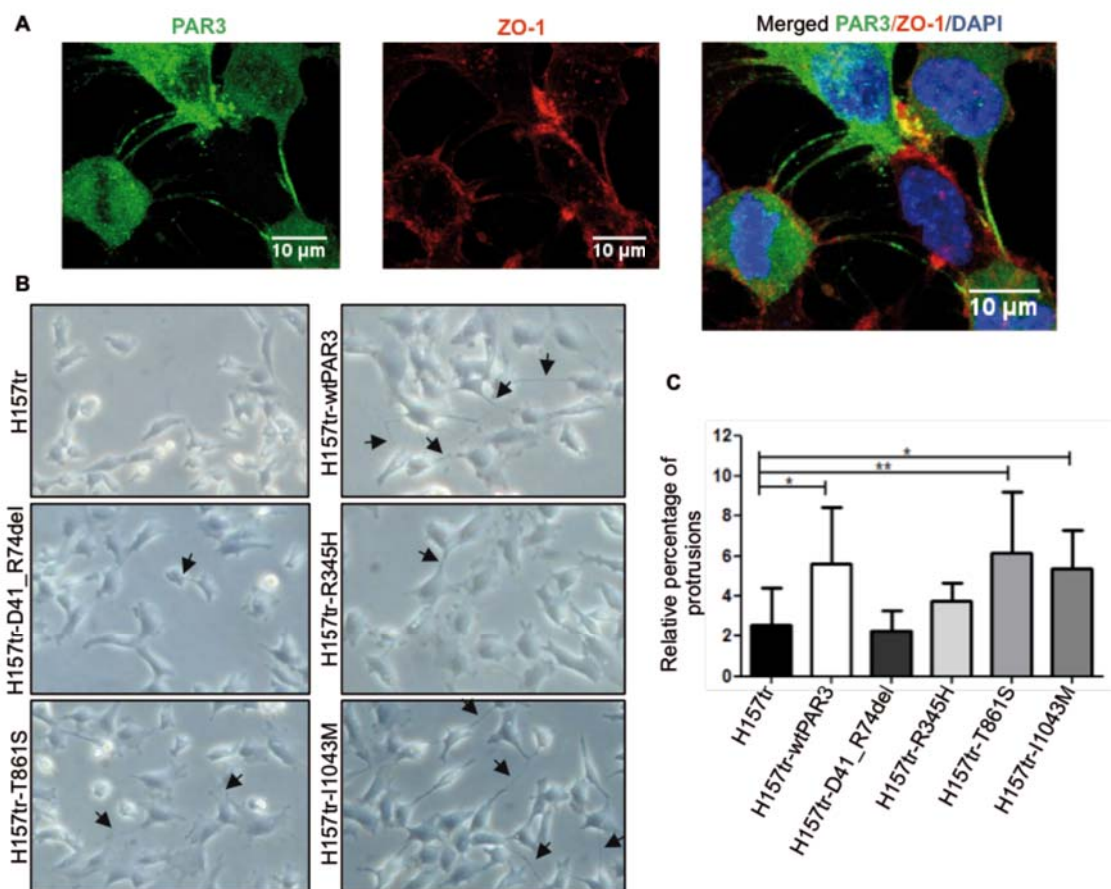


Figura 44. Formació de protrusions. **A.** Immunofluorescències per PAR3 i fal·loidina en les cèl·lules H157tr-wtPAR3. **B.** Imatges de contrast de fases de les cèl·lules indicades 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). Les fletxes indiquen algunes de les protrusions. **C.** Quantificació del percentatge de protrusions en cada cas. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

La capacitat de formació de protrusions de la proteïna PAR3 salvatge i dels diversos mutants també ha estat testada en la línia T98G. En aquest cas es van observar canvis significatius entre els les cèl·lules amb el vector buit i les cèl·lules a les que s'havia introduït PAR3wt. Pel que fa la resta de mutants, les diferències només són significatives en fer la comparativa de tots els constructes respecte el vector buit, així doncs es comportarien com la proteïna salvatge (figura 45).

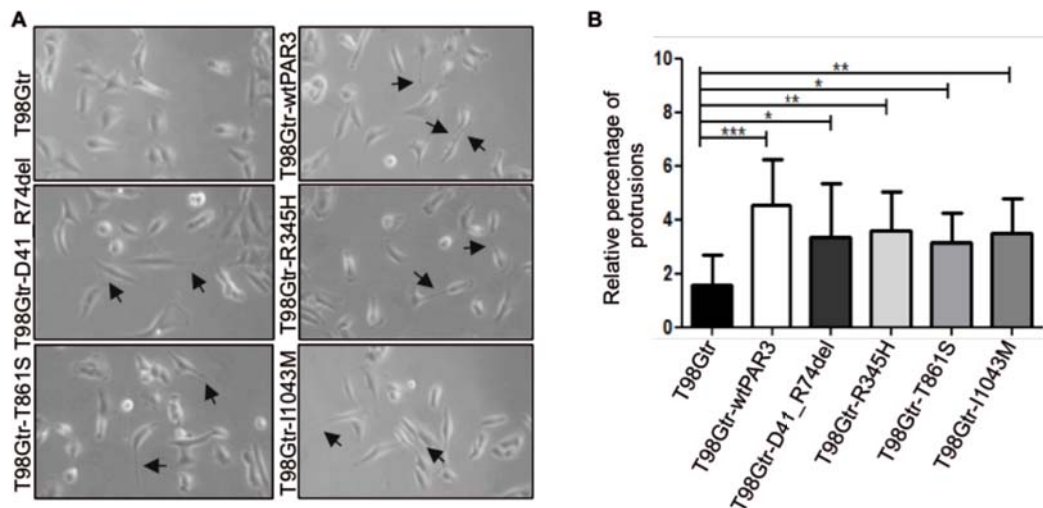


Figura 45. Formació de protrusions. **A.** Imatges de contrast de fases de les cèl·lules indicades 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/μl, 24h). Les fletxes indiquen algunes de les protrusions. **B.** Quantificació del percentatge de protrusions en cada cas. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * p<0,05, ** p<0,01.

3.9. EFECTES EN L'ACTIVACIÓ DELS COMPONENTS DE LA VIA DE PAR3

Per tal de comprendre amb més detall l'efecte de les mutacions en *PAR3* es van determinar els efectes de restituir la proteïna PAR3 salvatge i la dels diversos mutants en un seguit de proteïnes que funcionen corrent avall del complex PAR.

ATYPICAL PROTEIN KINASE C (aPKC)

aPKC és una proteïna del complex PAR amb activitat serina-treonina quinasa; és activada per RAC1 i CDC42 i les seves dianes són PAR3 i LGL, entre altres (Gopalakrishnan et al., 2007). S'ha descrit que PAR3 recluta aPKC a la zona dels complexos d'unions apicals i que sense PAR3 hi ha una mala localització d'aPKC, tot i que els nivells d'aPKC totals no es veuen afectats. En els complexos d'unions apicals, aPKC fosforila i controla la distribució de ROCK als llocs d'unions (Ishiuchi and Takeichi, 2011); també fosforila PAR3 i això fa que la interacció entre aquestes dues proteïnes es trenqui i que PAR3 es mantingui als llocs d'unió (Morais-de-Sá et al., 2010).

Per tot això es va pensar que en faltar la proteïna PAR3, els nivells d'aPKC activada (p-aPKC) o els nivells totals d'aPKC podrien veure's alterats. No va ser així, i en cap cas es van observar canvis en els nivells de p-aPKC o de aPKC totals. Per altra banda, també es va quantificar,

mitjançant *plot profiles* (es fan en immunofluorescències i són perfils d'intensitat de la senyal de aPKC al llarg de tota la cèl·lula), la localització a membrana de la proteïna p-aPKC en les cèl·lules H157tr-wtPAR3 i H157tr. Es va observar una tendència a localització preferentment a la membrana en el cas de H157tr-wtPAR3 respecte H157tr (figura 46).

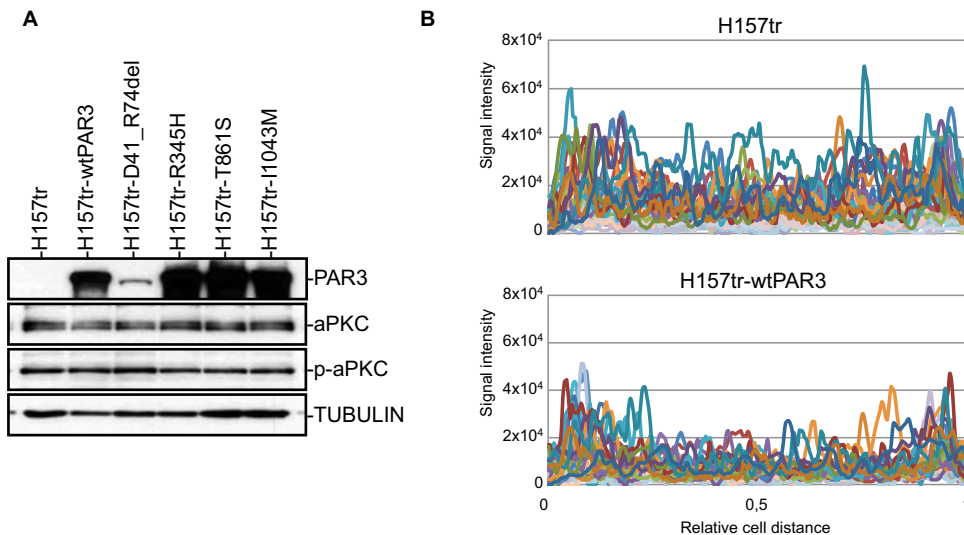


Figura 46. Activació d'aPKC. **A.** Western blots de aPKC i p-aPKC amb les cèl·lules indicades 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/ μ l, 24h). **B.** Plot profiles de les línies cel·lulars indicades per la proteïna p-aPKC.

RAC1

Per ser conseqüents amb les observacions anteriors pel que fa a número de protrusions, calia avaluar els nivells d'activació de les RHO GTPases. Les proteïnes RAC1, CDC42 i RHOA són mediadores dels canvis en el citoesquelet que permeten la mobilitat i organització polaritzada de les cèl·lules a través del control dels microtúbuls i filaments d'actina (Mack et al., 2011). Es va escollir RAC1 perquè està relacionada directament amb el complex PAR. La interacció del complex PAR3 i TIAM1 activa RAC1, mentre que si aquest complex no es forma RAC1 es manté inactiu (Wang et al., 2012). Per altra banda, cal tenir en compte que també s'ha descrit l'efecte contrari, és a dir que quan manca PAR3 hi ha una activació constitutiva de RAC1 (Chen and Macara, 2005; Georgiou and Baum, 2010). Aquesta última hipòtesi defensa una regulació negativa de RAC1 per PAR3, doncs es basa en una regulació de la localització de TIAM1 per PAR3: quan no hi ha PAR3 la localització de TIAM1 no està restringida i TIAM1 sempre té accés a RAC1, donant lloc a una hiperactivació d'aquesta última (Zhang and Macara, 2006).

Per tal de determinar els efectes de la forma salvatge de PAR3 i dels diferents mutants en l'activació de RAC1 es van fer experiments d'immunoprecipitació de la forma RAC1-GTP. Els resultats obtinguts van mostrar que la presència de la proteïna wtPAR3 incrementava la fracció de RAC1-GTP, indicant que PAR3 incrementa els nivells d'activat de RAC1. Pel que fa als resultats en els mutants, les proteïnes R345H i T861S es comportaven de forma molt similar a la proteïna PAR3 salvatge, mentre que els mutants D41_R74del i I1034M no incrementaven els nivells d'activació de RAC1. Així doncs, es pot concloure que els únics mutants que afecten l'activitat de RAC1 són D41_R74del i I1034M (figura 47).

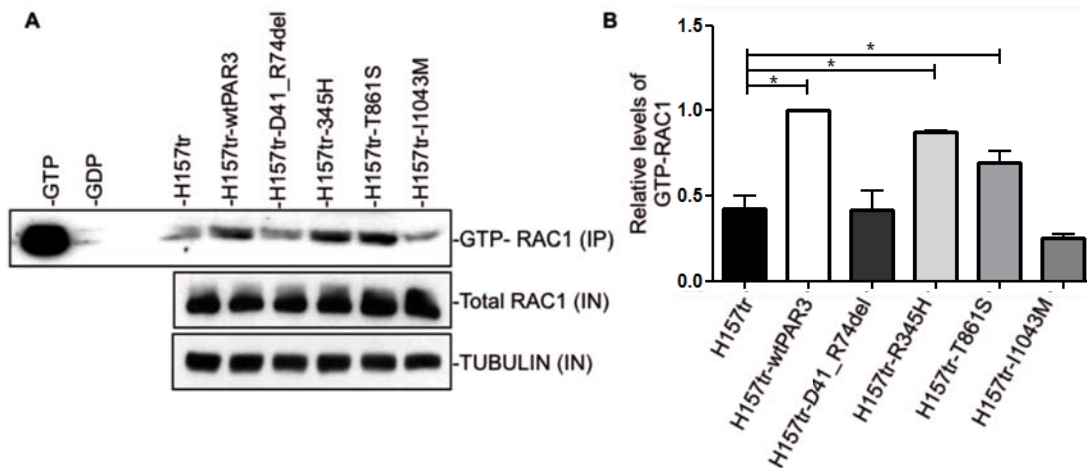


Figura 47. Activació de RAC1. **A.** Després de la inducció de l'expressió de PAR3 (1ng/ μ l, 24h) els lisats de les diferents línies cel·lulars es van incubar amb GST-PBD per immunoprecipitar la forma de RAC1 unida a GTP. *Western blots* que mostren els resultats d'aquestes immunoprecipitacions. Els lisats totals també van ser hibridats amb l'anticòs de RAC1. **B.** Quantificació de l'assaig, ràtios relatius de RAC1-GTP i RAC1 normalitzats amb el valor resultat de la proteïna wtPAR3. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4. LA SIGNATURA D'EXPRESSIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS IMPLICATS EN L'ADHESIÓ CEL·LULAR I DIANES DE STAT3

4.1. LA SIGNATURA D'EXPRESSIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS IMPLICATS EN L'ADHESIÓ CEL·LULAR

Per ampliar el coneixement de com la manca de PAR3 afecta la carcinogènesi de tumors de pulmó, es van realitzar *microarrays* d'expressió utilitzant la plataforma Agilent 8x60K. D'aquesta manera es van poder comparar els perfils d'expressió de la línia H157tr-wtPAR3 i del mutant per deleció H157tr-D41_R74del amb el de la línia H157 control (H157tr). De la comparativa entre H157tr-wtPAR3 i H157tr en va sortir una llista de 150 gens diferencialment expressats (p valor $< 0,05$ i *fold change* $> 1,5$) (taules de l'annex A11-A12 i figura 48). Per tal d'assignar funcionalitats als diferents gens que constituïen la signatura de PAR3 es van utilitzar els programes bioinformàtics habituals de *Gene Ontology* (GO). El GO de la signatura de PAR3 va evidenciar un enriquiment en transcrits relacionats amb la membrana cel·lular i amb la participació en processos com la mobilitat, l'adhesió i l'apoptosi (figura 48).

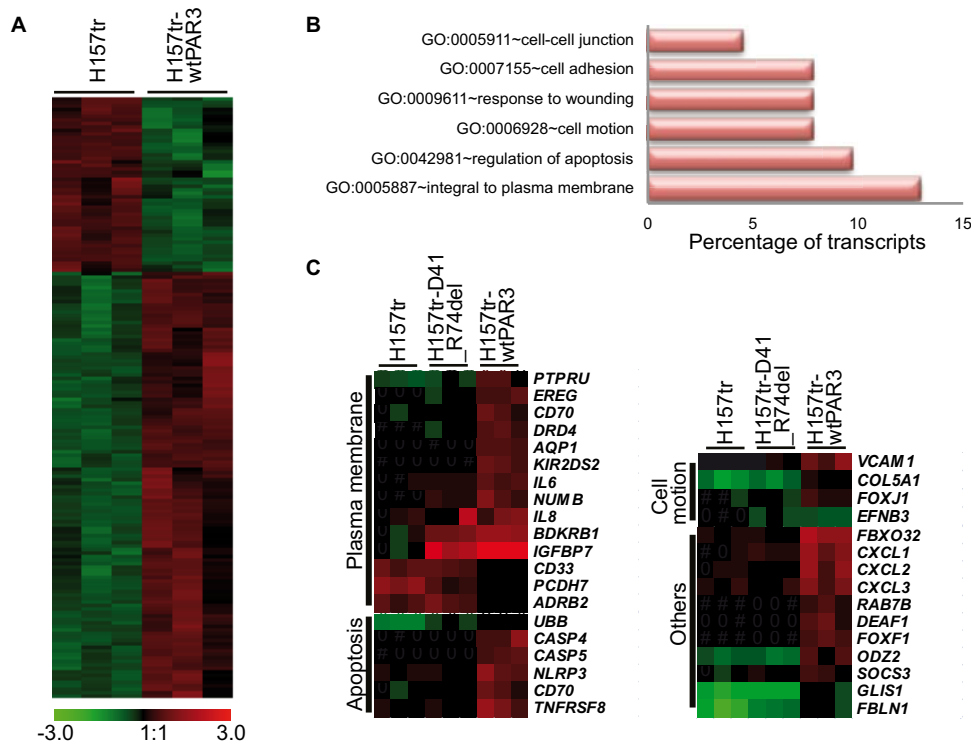


Figura 48. La signatura d'expressió de PAR3. **A.** *Heatmap* d'aproximadament 150 transcrits que constitueixen la signatura de PAR3. **B.** Categories de l'enriquiment en el *Gene Ontology* (GO) fet amb els gens que es regulen a l'alça amb la reintroducció de PAR3 ($p < 0,05$ per totes les categories). **C.** Nivells d'expressió de gens seleccionats per cada categoria representats en *heatmaps*.

Va escollir-se algun gen de cada grup per validar-lo mitjançant RT-PCR quantitativa i per determinar quin és l'efecte dels mutants de *PAR3* respecte aquests transcrits. Entre els gens escollits cal destacar *BDKRB1*, *VCAM1*, *PCDH7*, *GLIS1*, *COL5A1* i *ADRB2*. *BDKRB1* (Bradykinin receptor B1) és un receptor acoblat a proteïnes G que s'activa durant la inflamació (Esseghir et al., 2006) i que s'ha trobat expressat a nivells baixos en cèl·lules de càncer de pulmó comparades amb cèl·lules de pulmó normals (Wong et al., 2011). *VCAM1* (*Vascular cell adhesion molecule-1*) és una molècula d'adhesió que funciona en l'extravasació i que s'ha descrit sobreexpressada en tumors per escapar del sistema immunològic (Wu, 2007); també afavoreix interaccions amb l'estroma que medien la metastasi (Chen and Massagué, 2012) o potencien el procés inflamatori en els tumors (Läubli and Borsig, 2010). *PCDH7* (*Protocadherin-7*) és un membre de les protocadherines i funciona com una molècula de reconeixement cèl·lula-cèl·lula, s'ha descrit sobreexpressada en tumors i fomentant creixement, invasió i metastasi (Li et al., 2013). *GLIS1* (*Gli-like transcription factor*) és un factor de transcripció de la família dels de zinc 1 implicat en la generació de cèl·lules mare pluripotents (Maekawa et al., 2011) que es sobreexpressa en condicions d'hipòxia (Khalesi et al., 2013). *COL5A1* (*Collagen, type V, alpha 1*) codifica per una de les quatre cadenes α del col·lagen de tipus V, està implicat en invasió i regulat per STAT3 (Dauer et al., 2005). *ADRB2* (*Adrenergic receptor beta 2*), un receptor que s'ha descrit sobreexpressat en càncers hepatocel·lulars (Chen et al., 2012) i implicat en invasió i metastasi en càncers gàstrics, també que la seva activació desensibilitza a certes teràpies (Shi et al., 2013).

La RT-PCR quantitativa va validar les observacions dels microarrays d'expressió per tots els gens seleccionats. D'altra banda l'anàlisi en els mutants va donar lloc a observacions molt diferents, segons el transcrit i el mutant. Així doncs, pel que fa a l'activació o repressió transcripcional dels diferents transcrits, el mutant H157tr-D41_R74del sempre es comportava com el control H157tr, mentre que els mutants H157tr-R345H i H157tr-T861S tenien comportaments similars al H157tr-wtPAR3. D'altra banda, el mutant H157tr-I1034M tenia un comportament intermig, a cavall entre el control H157tr i el H157tr-wtPAR3 (figura 49).

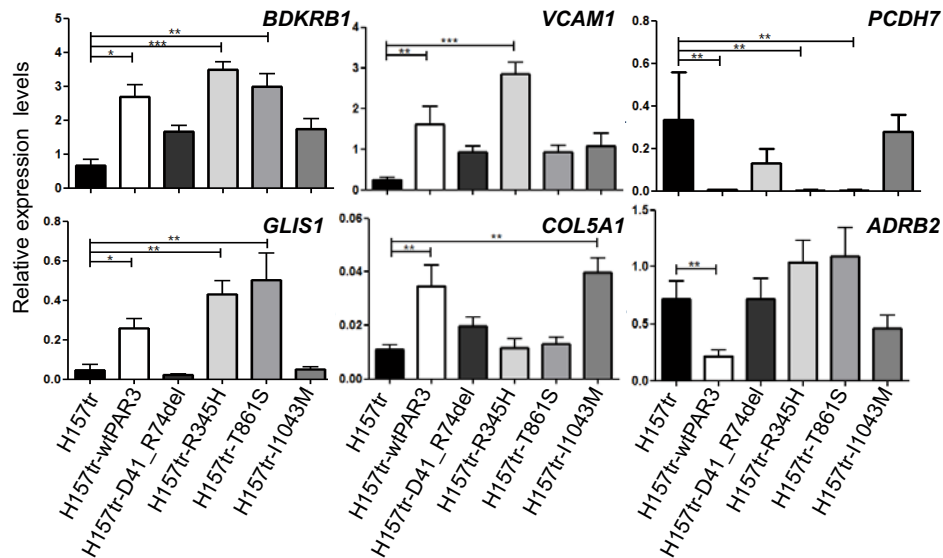


Figura 49. Nivells d'expressió de gens seleccionats avaluats mitjançant PCR quantitativa a temps real per les línies derivades de H157 que s'indiquen. Expressió relativitzada als nivells d'*ACTB*. Les barres d'error mostren la SD de tres replicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Finalment, i ja que es disposava del perfil d'expressió del mutant H157tr-D41_R74del, es va fer un anàlisi de comparació entre perfils d'expressió. Aquest anàlisi, anomenat GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), va permetre comparar el grau de similitud del perfil d'expressió del mutant H157tr-D41_R74del amb el de H157tr-wtPAR3. El resultat va mostrar clarament que existia una correlació inversa entre els gens d'ambdós perfils d'expressió. En concret, els gens que estaven activats transcripcionalment en les cèl·lules H157tr-wtPAR3 estaven regulats negativament en les cèl·lules H157tr-D41_R74del. Això indica que les cèl·lules H157tr-D41_R74del es comporten com les cèl·lules control i, per tant, que la proteïna D41-R74del és completament inactiva (figura 50).

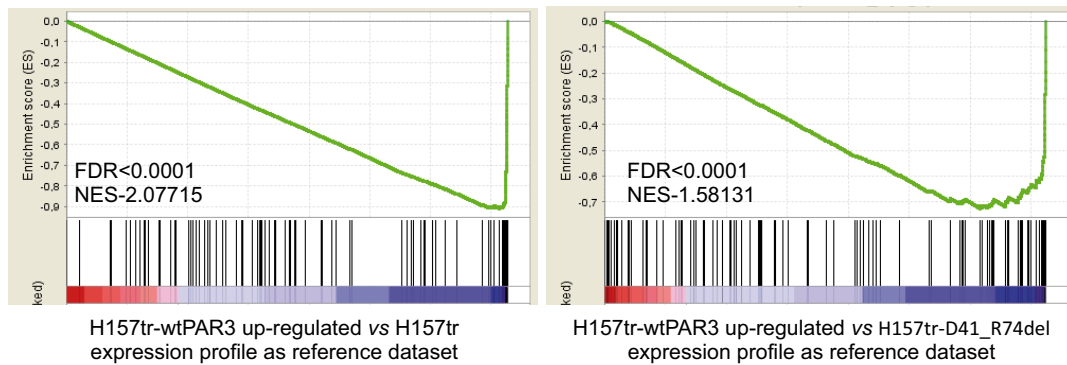


Figura 50. Gràfics obtinguts fent GSEAs per comparar els *datasets* que s'indiquen. Es mostren també les probabilitats dels False Discovery Rate (FDR) i els valors del *Normalized Enrichment Score* (NES).

4.2. LA SIGNATURA D'EXPRESSIONIÓ DE PAR3 ESTÀ ENRIQUIDA EN TRANSCRITS QUE SÓN DIANES TRANSCRIPCIONALS DE STAT3

La signatura de PAR3 contenia gens que eren dianes transcripcionals del factor de transcripció STAT3. Per això es va decidir comparar els gens activats en el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules H157tr-wtPAR3 amb els perfils d'expressió de dos *datasets* extrets de la base de dades GeoDataset (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>). Aquesta base de dades té una aplicació que ens permet agrupar les mostres d'un *dataset* i enfrontar els diferents grups entre ells, obtenint les diferències en els perfils d'expressió, es tracta de l'aplicació GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). El *dataset* GSE42979 prové d'un *microarray* d'expressió fet amb la línia de càncer de pulmó A549 i té tres grups: un grup transfectat amb un vector que expressa PIAS3 (un inhibidor de l'activació de STAT3), un grup on la línia s'ha tractat amb un RNA d'interferència per STAT3 i un tercer grup considerat com a control (Dabir et al., 2013). S'ha utilitzat la comparativa entre els dos últims grups per trobar els *upregulats* per STAT3 mitjançant el GEO2R. Per altra banda, el *dataset* GSE48124 prové de *microarrays* d'expressió fets en diferents línies de càncer urotelial interferides per P63 i STAT3. Utilitzant GEO2R s'ha fet la comparativa entre els grups de la línia cel·lular de càncer urotelial Scaber tractats amb un RNA d'interferència per STAT3 o amb un RNA d'interferència sense diana (*scramble*).

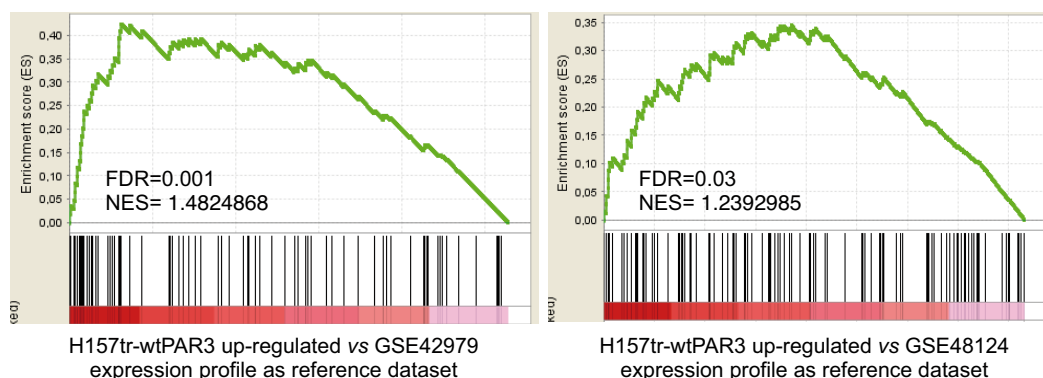


Figura 51. Gràfics obtinguts fent GSEAs per comparar els *datasets* que s'indiquen. Es mostren també les probabilitats dels False Discovery Rate (FDR) i els valors del *Normalized Enrichment Score* (NES).

Amb els resultats obtinguts de les comparatives dels *datsets* anteriors i la nostra signatura de PAR3 es van fer GSEAs (*Gene Set Enrichment Analysis*) i es va observar una associació inversa entre els perfils d'expressió de les línies que perdien STAT3 i la signatura de PAR3 (figura 51).

4.3. PAR3 CONTROLA L'ACTIVACIÓ DE STAT3 EN UNA SITUACIÓ DE CONFLUÈNCIA CEL·LULAR

Està ben establert que la fosforilació de STAT3 al residu tirosina 705 (pY-STAT3) indueix la seva activació, dimerització, translocació nuclear i unió al DNA per activar o reprimir la transcripció del seus gens diana (Quintás-Cardama and Verstovsek, 2013). Considerant els resultats dels GSEAs anteriors, es va voler veure si PAR3 tenia algun efecte en els nivells d'activació de STAT3.

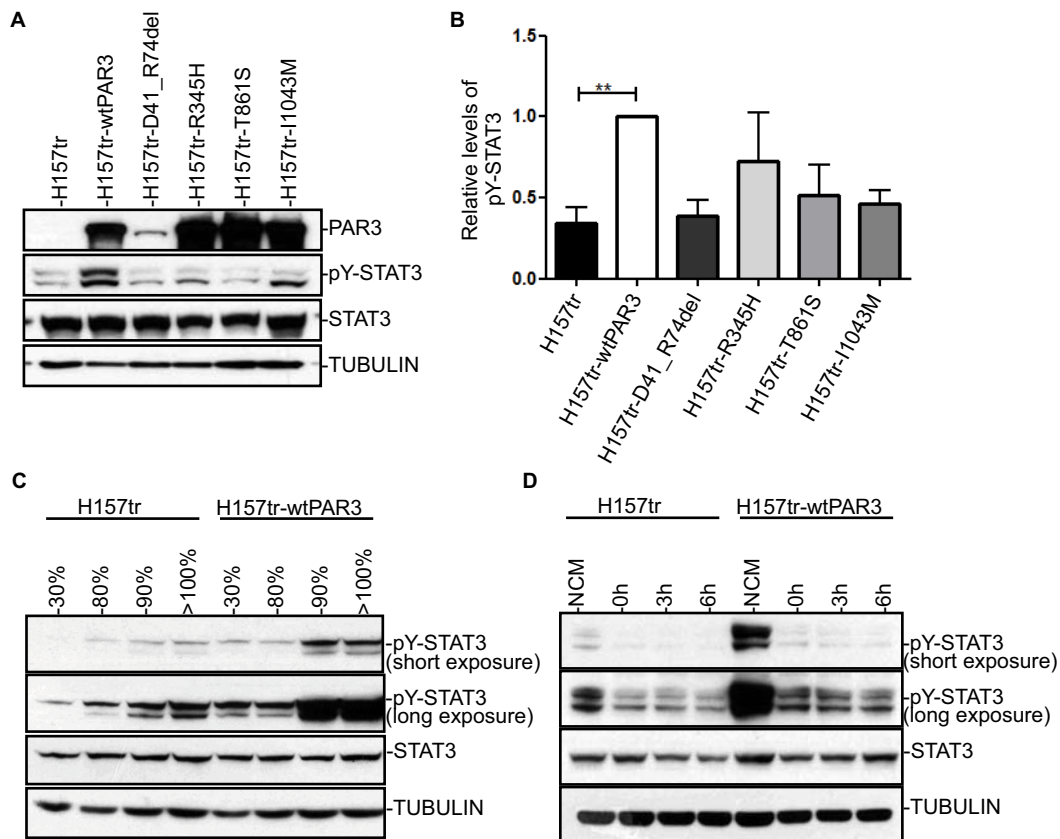


Figura 52. PAR3 controla l'activació de STAT3 en el model de recuperació de la línia cel·lular H157. **A.** *Western blots* de STAT3 i pY-STAT3 amb les cèl·lules indicades 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/μl, 24h). **B.** Quantificació de l'assaig, ràtios relatius de pY-STAT3 i STAT3 normalitzats amb el valor resultat de la proteïna wtPAR3. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * p<0.05, ** p<0,01. **C.** *Western blots* de STAT3 i pY-STAT3 en les cèl·lules H157tr i H157tr-wtPAR3 crescudes a diferents graus de confluència i post inducció amb doxiciclina (1ng/μl, 24h). **D.** *Western blots* que mostren la regulació a la baixa de p-STAT3 amb la dissolució de les unions intercel·lulars mitjançant *calcium switch*. NCM, medi amb una concentració de calci normal (de l'anglès, Normal Calcium Medium); s'indiquen els temps després de la reintroducció de calci en el *calcium switch*, els experiments es van realitzar 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/μl, 24h).

Es va observar que els nivells de pY-STAT3 eren més alts en les cèl·lules H157tr-wtPAR3, en comparació amb les cèl·lules control i els diversos mutants (figura 52A-B). A més, aquest increment era particularment evident quan les cèl·lules es cultivaven a alta densitat (figura 52C). Aquesta relació d'activació de STAT3 en situacions d'alta densitat de cèl·lules està completament d'acord amb les observacions d'altres autors que demostren que l'activitat de STAT3 augmenta dramàticament amb la confluència cel·lular (Steinman et al., 2003; Vultur et al., 2004). Tenint en compte que l'alta confluència és un estat en el que hi ha moltes unions intercel·lulars i que PAR3 està implicat en la seva formació vam realitzar un assaig de *calcium switch* per tal d'observar com canviaven els nivells de pY-STAT. D'acord amb les nostres hipòtesis, els nivells de pY-STAT disminueixen dramàticament després de la dissolució de les unions per depleció de calci (figura 52D); això es dona tant en les cèl·lules H157tr com en les H157tr -wtPAR3, però els nivells són sempre molt menors en H157tr, de fet, els nivells de pY-STAT3 en l'estat de NCM de les cèl·lules H157tr són molt similars als nivells de les cèl·lules H157tr -wtPAR3 sense cap mena d'unió.

Els resultats que mostren disminució de pY-STAT3 quan manca PAR3 es van reproduir en dos línies cel·lulars de càncer de pulmó, H1299 i H2170, infectades de manera estable amb dos shRNA diferents que tenen com a diana *PARD3*. És a dir, en aquestes dues línies cel·lulars, la disminució dels nivells de *PARD3* amb shRNAs, disminuïa l'activació de STAT3 en una situació de confluència. En aquests casos l'alta densitat i el creixement en un medi esgotat eren absolutament necessaris per veure l'efecte (Fig. 53).

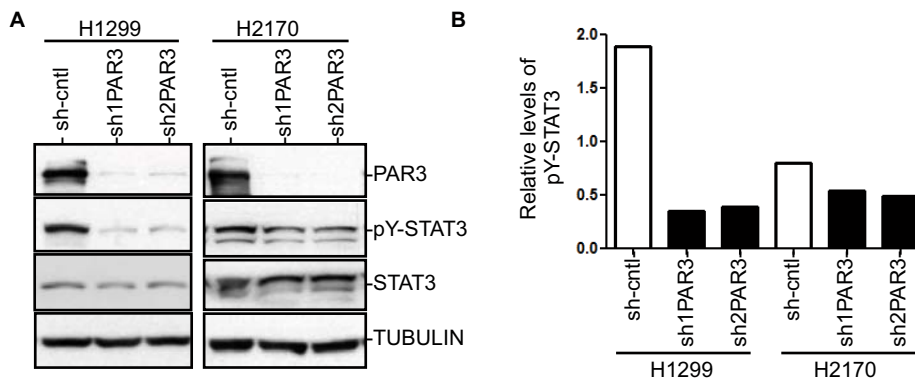


Figura 53. PAR3 controla l'activació de STAT en dos model de interferència de PAR3. **A.** Western blots que mostren la regulació a la baixa de PAR3 en les cèl·lules de càncer de pulmó H1299 i H2170 després d'infectar-les amb dos shRNAs per PAR3 (sh1 i sh2). Un shRNA *scramble* es va utilitzar com a control. S'observa la reducció dels nivells de p-STAT3 en les condicions amb regulació a la baixa de PAR3. **B.** Representació gràfica de les quantificacions de les intensitats de bandes del western blot.

En conjunt, aquestes observacions suggereixen que, en produir-se un contacte cèl·lula-cèl·lula, la formació de TJ desencadena l'activació de STAT3, en un procés que requereix l'activitat de PAR3. Curiosament, aquest model d'activació de STAT3 en confluència i dependent de PAR3 no es va reproduir en les cèl·lules T98G, que si bé són deficientes naturals per PAR3 també són d'un tipus tissular molt diferent d'origen. Les cèl·lules dels tumors escamosos de pulmó deriven de l'epiteli respiratori, un tipus de teixit que es basa fortament en les unions per al manteniment de la integritat epitelial i la seva defensa en front a agents estranys (Vareille et

al., 2011). En aquest cas, la pèrdua de TJ pot permetre que cèl·lules que estan proliferant altament es desuneixin entre sí i donin lloc a creixements anòmals. Pel que fa a les cèl·lules T98G, deriven de cèl·lules de la glia del teixit nerviós, on la regulació de les unions i els contactes cèl·lula-cèl·lula són molt més laxes que en els teixits epitelials.

Entre els gens que apareixien activats en els GSEAs de manera comuna en PAR3 i STAT3, se'n van escollir uns quants per testar-ne l'expressió. Concretament es van escollir *IGFBP7*, *IL6* o *COL5A1*, dianes transcripcionals de STAT3 ben conegudes (Couto et al., 2012; Dauer et al., 2005). Els seus nivells d'expressió mostren la relació que hi ha entre PAR3 i l'activació de STAT3 (figura 54).

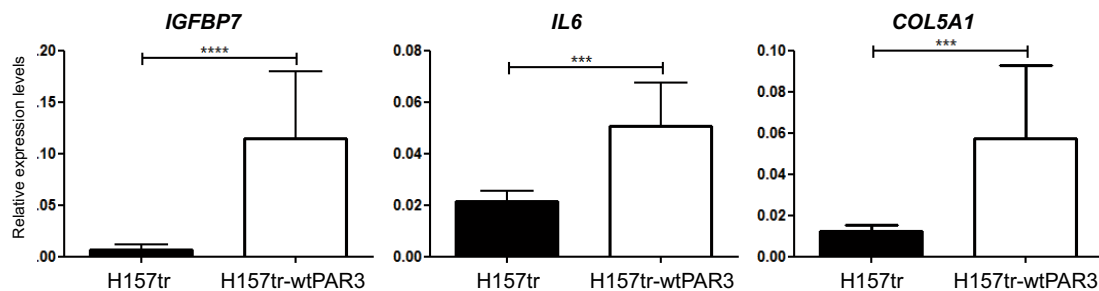


Figura 54. Gens diana de STAT3. Nivells d'expressió dels gens indicats avaluats mitjançant PCR quantitativa a temps real per les línies H157tr i H157tr-wtPAR3. Expressió relativitzada als nivells d'*ACTB*. Les barres d'error mostren la SD de tres triplicats. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Entre aquests gens destaca *IL6*, per ser també un activador de la via de JAK-STAT i formar així un *loop* de retroalimentació positiva, que encara s'intensifica més per la regulació a l'alça que STAT3 exerceix sobre el receptor de IL6, IL6R (Dauer et al., 2005). A més també s'ha descrit que RAC1 pot estimular la via de STAT3 a través de la generació de IL6 (Faruqi et al., 2001). En aquest sentit es van testar els nivells de IL6 a través de RT-PCR quantitativa a temps real en dos grups consistents en tumors primaris de pulmó i teixits sans pulmonars. Els resultats van constatar que, en contra del que s'ha descrit per *IL6* (Chang et al., 2013), els seus nivells són significativament majors en el grup de teixits pulmonars sans, donant suport a la troballa d'alts nivells de *IL6* trobats en H157tr-wtPAR3 respecte H157tr (figura 55).

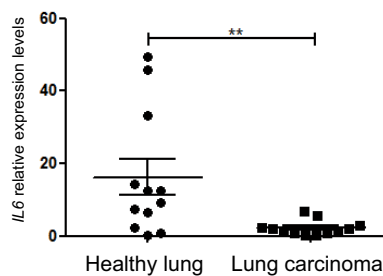


Figura 55. Expressió de *IL6*. Nivells d'expressió de *IL6* en mostres primàries de teixit sa pulmonar i de tumors de pulmó. Expressió relativitzada als nivells d'*ACTB*. Les barres d'error mostren la SD de les mostres. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

Els resultats respecte a IL6 permeten explicar també els elevats nivells d'activació de STAT3 dependents de PAR3. Per aquesta raó es va decidir tractar les cèl·lules amb un anticòs contra el receptor de IL6, tocilizumab, i veure si els nivells de pY-STAT3 canviaven. El tractament de les cèl·lules H157tr-wtPAR3 i H157tr amb aquest inhibidor no va mostrar canvis en els nivells de pY-STAT3 (figura 56). Aquesta observació ens fa pensar que la contribució de IL6 en l'activació de STAT3 en aquesta línia cel·lular no és tant important i que hi ha altres vies per incrementar pY-STAT3, reforçant la hipòtesi de la mala formació d'unions.



Figura 56. Western blots que mostren l'absència d'inhibició de pY-STAT3 després de tractar les cèl·lules indicades amb les concentracions indicades de tocilizumab durant 6h. Els experiments es van realitzar 24h post sembra i post inducció amb doxiciclina (1ng/µl, 24h).

A continuació es mostren, en forma de resum, les alteracions funcionals associades a cadascuna de les proteïnes PAR3 mutants (figura 57).

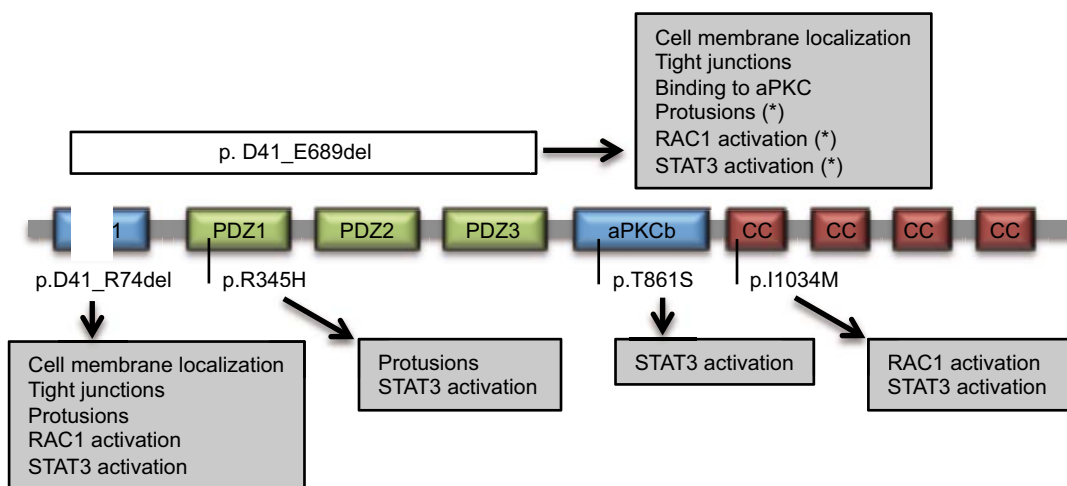


Figura 57. Representació esquemàtica de la proteïna PAR3 amb la localització de les diferents mutacions trobades i amb la funció que mostren alterada. * les alteracions en aquestes activitats s'infereixen de les trobades en el mutant p.D41_E689del.

5. LA RECUPERACIÓ DE PAR3 REDUEIX LA INVASIVITAT I METÀSTASI *IN VIVO*

5.1. LA RECUPERACIÓ DE PAR3 NO ALTERA LA PROLIFERACIÓ EN UN MODEL SUBCUTANI *IN VIVO*

Els experiments realitzats *in vitro* mostren que PAR3 està implicat en la formació de colònies, però en cap cas s'han observat alteracions pel que fa a la proliferació. Aquest fet, que ha estat demostrat per altres autors (Rothenberg et al., 2010), deixa a la llum que potser els avantatges proliferatius que confereix PAR3 es manifesten si les cèl·lules creixien en un teixit de manera tridimensional, d'acord amb la seva funció en la formació d'estructures tissulars. Per tal de testar-ho es va dur a terme un model de creixement subcutani en ratolins atímics *nude* on es comparava el creixement de les cèl·lules H157tr i H157tr-wtPAR3. Cada grup consistia en un total de 9 animals que van ser induïts amb doxiciclina a través de la beguda. Es va comprovar que l'expressió del gen fos correcta a nivell de proteïna (figura 58).

En cap cas es van detectar diferències entre H157tr i H157tr-wtPAR3 pel que fa a la velocitat de creixement o al pes dels tumors, tampoc es van observar canvis en altres paràmetres histopatològics com la presència de necrosi o de canvis en la morfologia cel·lular. Els resultats es mostren en la figura 58.

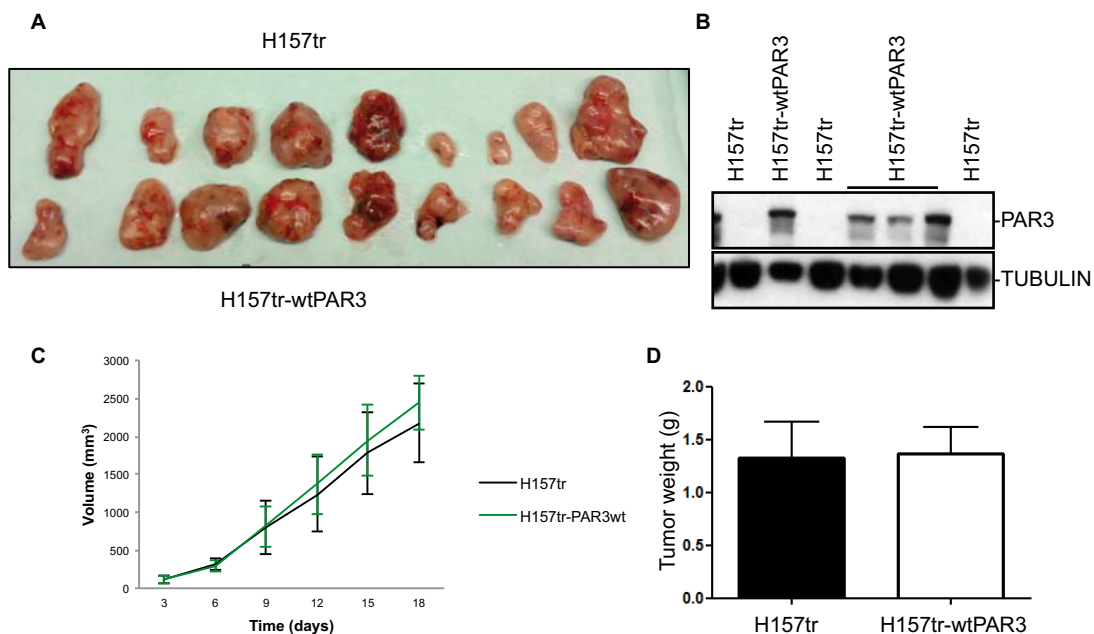


Figura 58. Creixement de la línia H157tr i H157tr-wtPAR3 en el model subcutani *in vivo*. **A.** Imatge dels tumors extrets dels animals. **B.** *Western blots* que confirmen la inducció eficient de PAR3 en els tumors. **C.** Representació gràfica de l'evolució dels volums dels tumors implantats en els dos grups que s'indiquen. **D.** Pesos del tumors a punt final. Les barres d'error mostren la SD.

5.2. LA RECUPERACIÓ DE PAR3 MOSTRA UN INCREMENT DE METÀSTASIS EN UN MODEL ORTOTÒPIC DE PULMÓ *IN VIVO*

Havent descartat que els efectes de PAR3 estaven relacionats amb la capacitat proliferativa, i per investigar *in situ* quines eren les capacitats tumorigèniques que conferia la manca del gen *PARD3*, es van implantar ortotòpicament les cèl·lules H157tr-wtPAR3 i H157tr en ratolins atímics *nude*. Cada grup consistia en un total de 11 animals que van ser induïts amb doxiciclina. La capacitat de formació de tumors en el parènquima pulmonar entre els dos grups va ser molt similar, i la mortalitat dels animals també (figura 59). Es va comprovar que l'expressió del gen fos correcta tant a nivell de transcrit com de proteïna (figura 60).

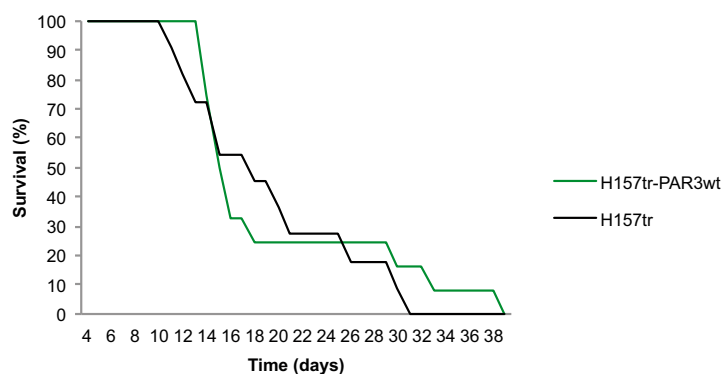


Figura 59. Creixement de la línia H157tr i H157tr-wtPAR3 en el model ortotòpic. Corbes Kaplan-Meier de la supervivència dels animals en els dos grups indicats.

Que els animals dels dos grups mostressin la mateixa supervivència va ser un resultat inesperat. Tot i així, en avaluar les lesions pulmonars histològicament en els tumors ortotòpics es va veure que el seu nombre era major en els ratolins que tenien implantada la línia H157tr. D'aquesta manera es confirmava una reducció en la capacitat d'invasió tumoral com a conseqüència de l'expressió de PAR3. També es van determinar els nivells de pY-STAT3 a través de *western blots*. Es va confirmar l'increment d'activació d'aquesta proteïna en els tumors en els que s'havia restituit la presència de PAR3 en comparació amb els tumors que no expressaven PAR3 (figura 60). Tenint en compte que el fetge és un òrgan preferent per la formació de metàstasis en els tumors primaris de pulmó, es van avaluar els fetges dels animals. Altre cop, també es va observar la presència de metàstasis en els animals dels dos grups, però aquestes eren menys freqüents en els ratolins que expressaven la forma salvatge de PAR3 (figura 60). La formació de metàstasis al fetge en aquests animals (model ortotòpic) indica que aquest és un molt bon model per avaluar el desenvolupament d'un tumor de càncer de pulmó i també que la línia H157 té bona capacitat invasiva.

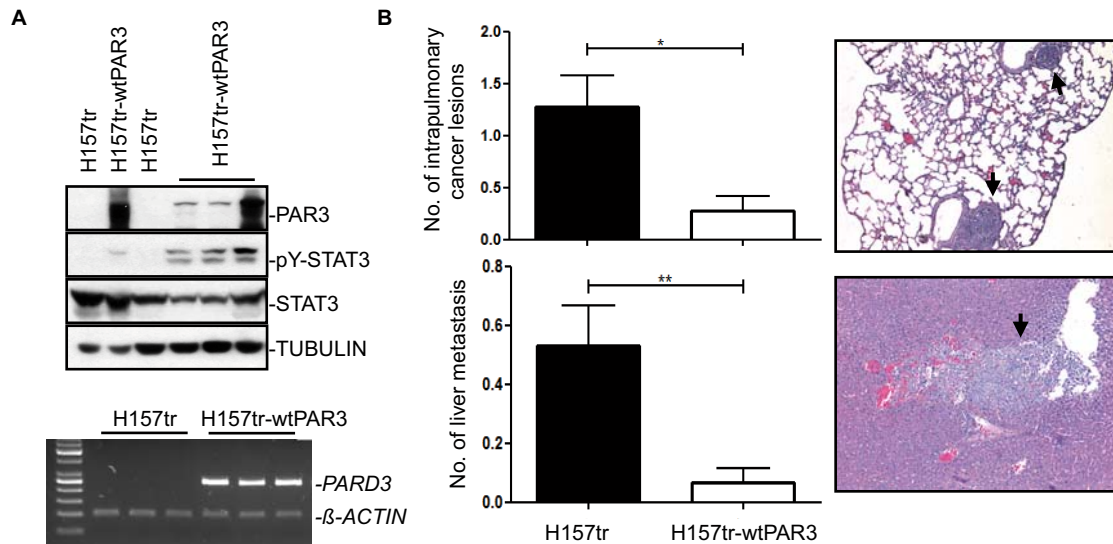


Figura 60. Invasivitat de la línia H157tr i H157tr-wtPAR3 en el model ortotòpic. **A.** *Western blots* representatius i RT-PCR que confirmen la inducció eficient de l'expressió de PAR3 en els tumors. També es mostren els nivells de p-STAT3. **B.** Mitja de les lesions intrapulmonars i les metastasis al fetge en cada grup d'animals. Les barres d'error mostren la SD de les mostres. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$. A la dreta, imatges de preparacions d'hematoxil·lina-eosina representatives de les metastasis (fletxes) en pulmó i fetge.

Com a conseqüència d'aquestes observacions, en les que havíem detectat diferències pel que fa a la capacitat invasiva i metastàtica de les cèl·lules amb i sense PAR3, es va voler testar altre cop aquesta hipòtesi en un model més adequat per a tal finalitat. Es tracta del model metastàtic de melsa en el que les cèl·lules malignes a testar s'implanten a la melsa dels animals i posteriorment s'extirpa aquest òrgan. Es van implantar les cèl·lules H157tr-wtPAR3 i H157tr en ratolins atímics *nude* en dos grups de 7 i 6 animals respectivament. Posteriorment, es van mesurar el nombre i mida de les metastasis que es van generar en els pulmons i fetges dels animals. Primer es va confirmar la inducció eficaç d'expressió ectòpica de PAR3 en algunes de les metastasis que es generaven a partir de les cèl·lules H157tr-wtPAR3 en el fetge, tant a nivell de transcrit com de proteïna (figura 61). El nombre de lesions metastàtiques que es van trobar en els pulmons va ser significativament menor en els ratolins que havien estat injectats amb H157tr-wtPAR3 respecte els ratolins injectats amb cèl·lules H157tr (figura 61). A més, es va observar que les lesions canceroses que van sorgir al fetge dels ratolins implantats amb les cèl·lules H157tr-wtPAR3 eren més petites i de forma arrodonida, cosa que suggereix una capacitat invasiva reduïda, en comparació amb les lesions hepàtiques que es troben en el grup de ratolins H157tr (figura 61).

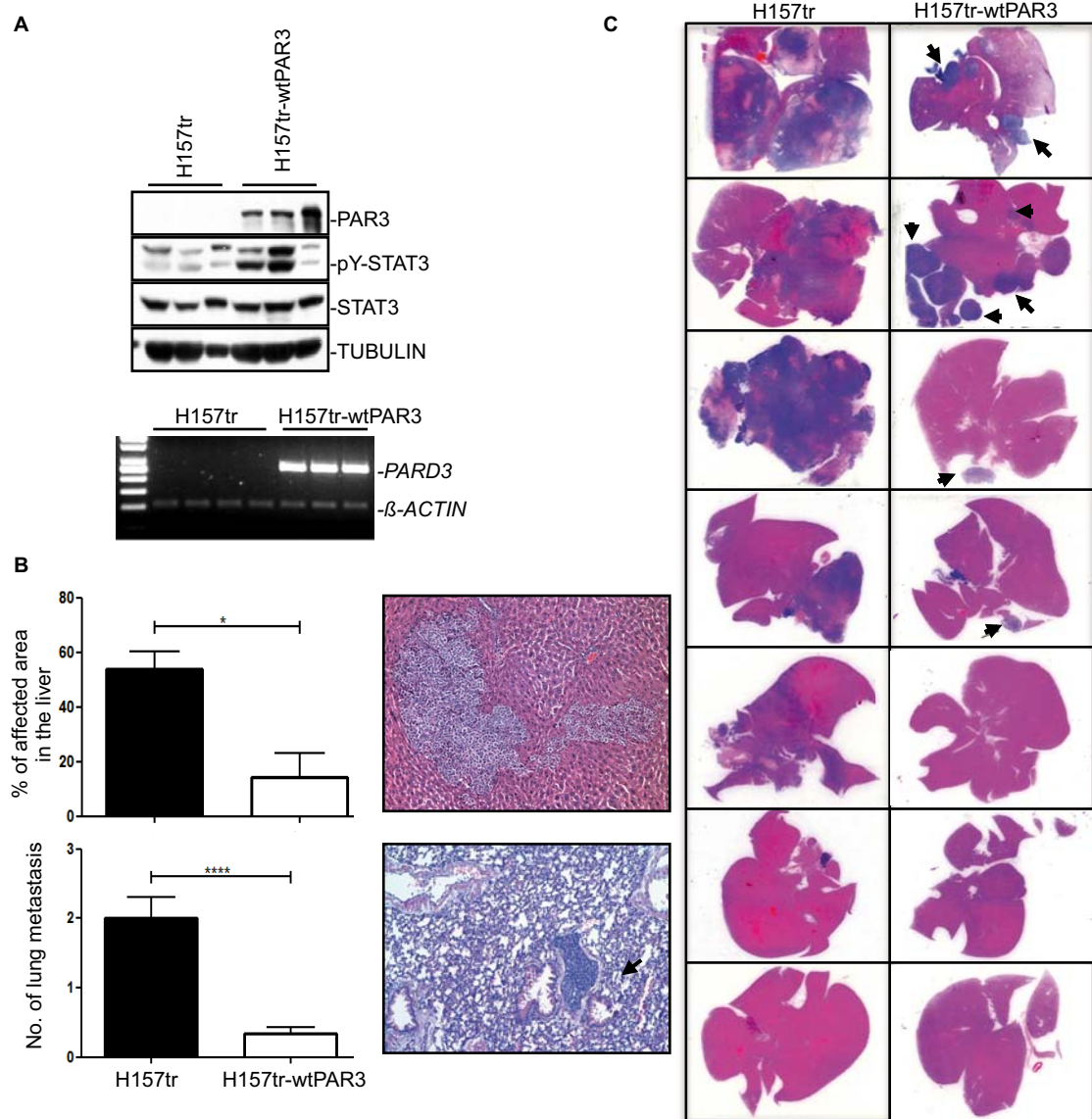


Figura 61. Creixement de la línia H157tr i H157tr-wtPAR3 en el model de melsa. **A.** *Western blots* representatius i RT-PCR que confirmen la inducció eficient de l'expressió de PAR3 en els tumors. També es mostren els nivells de pY-STAT3. **B.** Mitja de les àrees de fetge afectades per metastàsis i mitja de les lesions intrapulmonars en cada grup d'animals. Les barres d'error mostren la SD de les mostres. Significança estadística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$. A la dreta, imatges de preparacions d'hematoxil·lina-eosina representatives de les metastàsis (fletxes) en fetge i pulmó. **C.** Tincions d'hematoxil·lina-eosina en les metastàsis de fetge. Les regions liles i roses corresponen a tumor i teixit sa, respectivament. Les fletxes indiquen les lesions rodones i ben definides observades en els fetges dels animals implantats amb H157tr-wtPAR3.

6. PIK3R1

6.1. EL GEN PIK3R1 ESTÀ MUTAT EN CÀNCER DE PULMÓ

El gen *PIK3R1* es troba al braç llarg del cromosoma cinc i codifica per tres proteïnes que són les subunitats reguladores del grup de les PI3K de classe IA: p85 α , p55 α i p50 α . Les tres proteïnes, que pesen 85, 55 i 50 KDa respectivament, són tres variants transcripcionals del gen i difereixen entre sí per l'inici de transcripció, que el constitueixen tres exons diferents: NM_181523, NM_181524, NM_181504. A més la variant transcripcional més gran té 5 exons extra, que són els que a nivell genòmic van del 2 al 6, ambdós inclosos. Els dos exons 1 de les variants més petites es troben entre els exons 6 i 7 de la variant transcripcional major (figura 62).

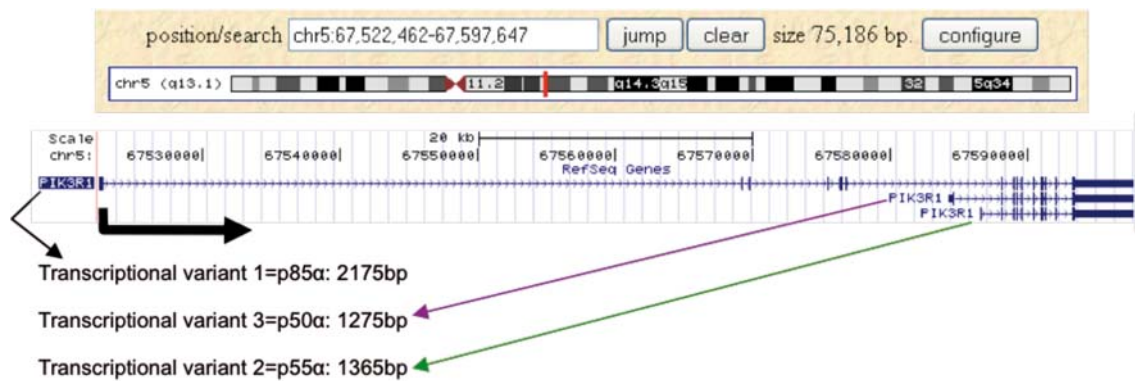


Figura 62. El gen *PIK3R1*, al braç gran del cromosoma 5, codifica per 3 variants transcripcionals. Les isoformes de la proteïna a les que donen lloc aquestes variants s'indiquen a la figura.

En la base de dades de Sanger, apareix una HD en aquest gen en la línia cel·lular H2171, que prové d'un tumor de cèl·lula petita de pulmó. En aquest treball s'ha confirmat aquesta deleció i s'ha delimitat mitjançant PCR, havent-se trobat que engloba tots els exons menys el primer. Posteriorment es va confirmar la pèrdua total d'expressió proteica en aquesta proteïna. Cal dir que per aquest gen es va avaluar també la deleció en una altra línia amb la possibilitat d'utilitzar-la com un segon model, es tracta de la línia de càncer de còlon SW1417, i aquesta presenta tot el gen delecionat (figura 63).

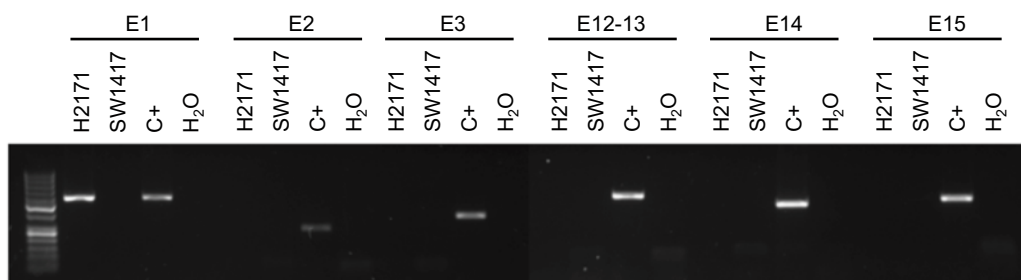


Figura 63. Agarosa on es mostren les deleccions en el gen *PIK3R1* en les línies cel·lulars H2171 i SW1417.

En la bibliografia aquest gen apareix descrit com a supressor tumoral (Cheung et al., 2011; Taniguchi et al., 2007) i com a oncogen (Jaiswal et al., 2009; Philp et al., 2001) i sols en pocs casos s'ha estudiat en càncer de pulmó. Per això es van seqüenciar un total de 86 línies cel·lulars de càncer pulmonar amb i sense LOH, un total de 30 presentaven LOH, i amb nivells alts i baixos d'expressió. La seqüenciació va realitzar-se a nivell genòmic i per tots els exons: es van incloure els 15 exons de la variant transcripcional 1 i els dos exons 1 alternatius de les variants 2 i 3. Es van trobar diferents polimorfismes i canvis intrònics de significat biològic desconegut allunyats dels llocs canònics de *splicing* (taula de l'annex A13). També es van trobar mutacions heterozigotes a nivell exònic, per exemple el canvi c.37G>C (p.D13H) en la línia cel·lular HCC-366, derivada d'un tumor escamós, i el canvi c.211G>T (p.G71*) en la línia cel·lular H1573 derivada d'un adenocarcinoma de pulmó (figura 64).

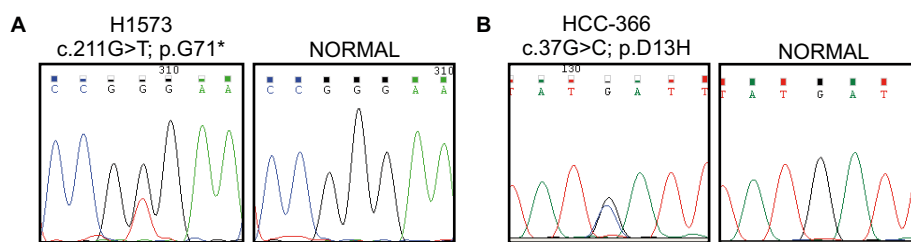


Figura 64. Cromatogrames que mostren les mutacions trobades en el gen *PIK3R1*.

Va resultar sorprenent trobar un canvi del tipus sense sentit en heterozigosi en un gen que es postula com a supressor tumoral. A més, va resultar especialment intrigant el fet que aquesta línia cel·lular no expressés proteïna p85 α , perquè només un dels dos al·lels es va trobar mutat. Es va pensar en la possibilitat que hi hagués una HD intragènica. Una deleció heterozigota d'un o diversos exons consecutius no hagués estat detectable per PCR. Per tal de trobar aquesta possible deleció es van fer PCRs per diversos fragments a nivell de cDNA. El resultat d'aquestes amplificacions i seqüenciacions no van permetre trobar cap altre canvi (figura 65).

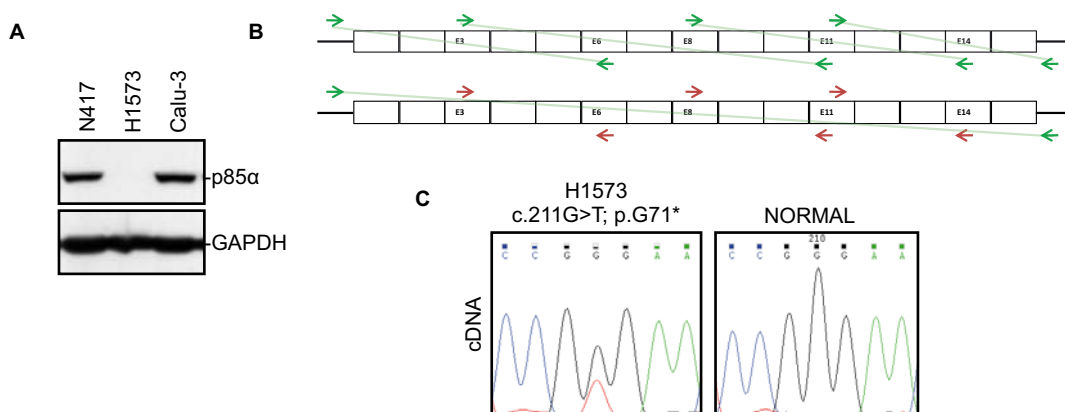


Figura 65. La línia H1573 no expressa proteïna p85 α . **A.** *Western blot* que mostra la manca d'expressió en aquesta línia cel·lular. **B.** Esquema de les amplificacions i seqüenciacions que es van realitzar en el cDNA de la línia H1573; les fletxes en verd indiquen *primers* utilitzats per amplificar i seqüenciar, les fletxes en vermell indiquen *primers* utilitzats per seqüenciar. **C.** Cromatogrames que mostren la mutació que dona lloc a un codó stop, es troba en heterozigosi a nivell de RNA.

Donada la raresa de la no expressió de proteïna p85 α en la línia H1573 sense la presència de dos mutacions inactivadores, es va considerar la presència d'alteracions epigenètiques però es va descartar perquè la mostra presentava bons nivells d'expressió del transcrit del gen *PIK3R1*, comparables a altres línies cel·lulars (figura 66).

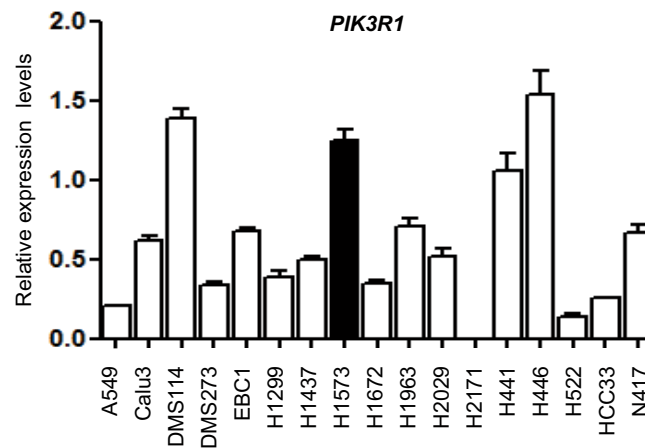


Figura 66. Nivells d'expressió del gen *PIK3R1* avaluats mitjançant PCR quantitativa a temps real per les línies que s'indiquen. Expressió relativitzada als nivells d'*ACTB*.

Les línies cel·lulars utilitzades per l'estudi mutacional van incloure tots els tipus histopatològics de càncer de pulmó (taula 13). Es pot concloure que la freqüència mutacional del gen *PIK3R1* en càncer de pulmó és del 3,5%.

TUMOR TYPE	CELL LINES	MUTATED CELL LINES
Lung AC	33	1 (3%)
Lung LCC	8	0
Lung SCC	10	1 (10%)
SCLC	31	1 (3.2%)
OTHER	4	0
TOTAL	86	3 (3.5%)

Taula 13. Línies cel·lulars seqüenciades pel gen *PIK3R1*. S'indica el número de cèl·lules de cada tipus histopatològic i el total. Última columna, línies amb mutacions en el nostre estudi. AC, adenocarcinoma; LCC, carcinoma de cèl·lula gran; SCC, escamós; SCLC, carcinoma de pulmó microcític.

6.2. LA MANCA DE PIK3R1 NO MANTÉ LA VIA DE LES PI3K CONSTITUTIVAMENT ACTIVA

La via de la fosfatidil-inositol-3 quinasa és una de les més rellevants en càncer. Regula processos com proliferació, creixement cel·lular, apoptosi i reorganització del citoesquelet (Bunney and Katan, 2010; García et al., 2006; Zhao and Vogt, 2008). Com ja ha estat detallat anteriorment, en aquesta via trobem oncogens, com la subunitat catalítica p110 α de l'heterodímer de PI3K (Samuels et al., 2005), i supressors tumorals, com *PTEN*, el qual té activitat fosfatasa oposada a PI3K. Després de la fosforilació dels fosfatidilinositols per l'heterodímer p110 α (*PIK3CA*) i p85 α (*PIK3R1*), AKT i PDK-1 són aglutinats a la membrana

citoplasmàtica permetent la fosforilació d'AKT, que generarà una cascada de fosforilacions que conduiran a l'activació de mTOR i posteriorment, i entre altres, de la proteïna ribosomal S6, proteïna implicada en la promoció de la síntesi proteica.

Donada la rellevància d'aquesta via, es va avaluar l'impacte de la pèrdua de *PIK3R1* en la via de AKT-mTOR utilitzant les dues línies cel·lulars amb delecions homozigotes, SW1417 i H2171, i la línia cel·lular que té un canvi sense sentit en heterozigosi, H1573. S'han testat els nivells de p85 α , pAKT-T308, pAKT-S473 i pS6-235/236 en línies cel·lulars de càncer amb diferents alteracions conegudes a la via de PI3K, abans i després d'estimular amb IGF1 i inhibint amb LY294002. El factor de creixement similar a la insulina 1 (IGF1; de l'anglès, *Insulin Growth Factor 1*) estimula la proliferació i la supervivència de les cèl·lules. IGF1 s'uneix al seu receptor (IGF1-R), i provoca una activació de la via de les PI3K i també de RAS i les MAPK. LY294002 és un inhibidor reversible de les subunitats catalítiques de PI3K i és àmpliament utilitzat per inhibir aquesta via. Les línies utilitzades i les seves característiques genètiques es mostren seguidament (taula 14).

CELL LINE	TUMOR TYPE	GENETIC ALTERATIONS
Calu3	Lung AC	<i>ERBB2</i> amplification
H2171	SCLC	<i>PIK3R1</i> deletion
H1573	Lung AC	<i>PIK3R1</i> deletion
SW1417	Colon	<i>PIK3R1</i> deletion
N417	SCLC	<i>PTEN</i> deletion
T47D	Breast	<i>PIK3CA</i> p.H1047R (kinase domain)

Taula 14. Línies cel·lulars utilitzades en els experiments d'avaluació de la via de les PI3K. Es mostren el seu tipus histològic i els gens que tenen alterats i pertanyen a la via de PI3K. AC, adenocarcinoma; SCLC, carcinoma de pulmó microcític.

L'anàlisi de l'estat d'activació dels components corrent avall de la via ha mostrat, com era d'esperar, que la línia amb alteracions en *ERBB2* (Calu3) té activació constitutiva de la via. Això s'ha comprovat en base a la presència i al manteniment d'alts nivells de fosforilació, i per tant d'activació, d'AKT i d'S6, independentment de l'addició o no de sèrum o de factors de creixement al medi de cultiu. Per altra banda, les línies amb alteracions en *PTEN* i *PIK3CA* mostren activació constitutiva de la via per sota de mTOR, però no a nivell de AKT. Sorprenentment, en les cèl·lules que no tenen *PIK3R1* no s'observava aquesta activació constitutiva, és a dir, es pot inhibir l'activitat de AKT i de S6 quan es retira el sèrum o els factors de creixement concrets com IGF1 del medi de cultiu (figures 67 i 68).

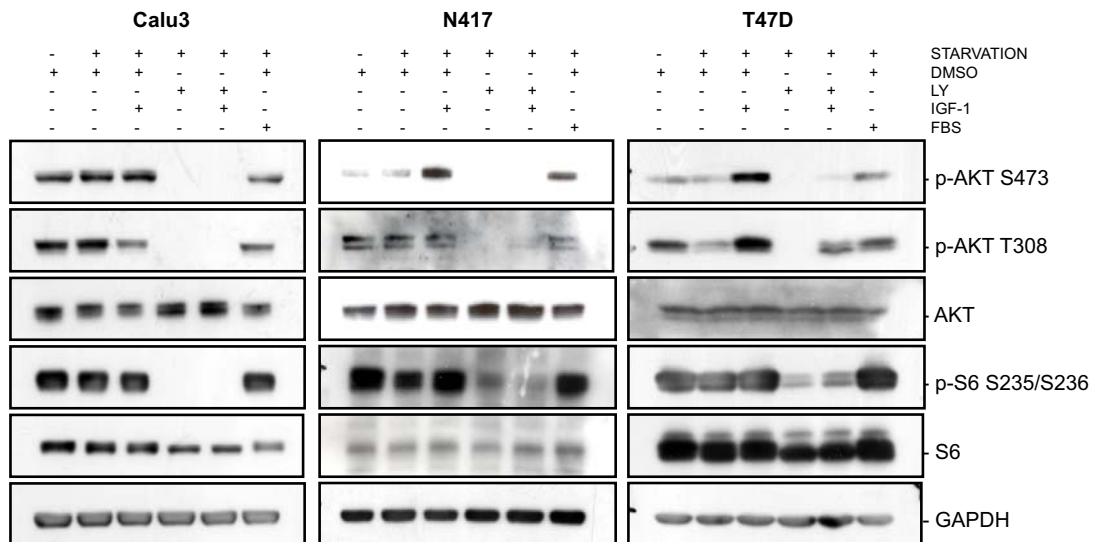


Figura 67. Assajos de funció de la via de PI3K en línies cel·lulars que tenen alteracions en proteïnes d'aquesta via. S'avalua l'activació de dos de les proteïnes que estan corrent avall de PI3K. En cada cas s'indica la línia cel·lular i el tractament que ha rebut. LY, LY294002; IGF-1, factor de creixement similar a la insulina; FBS, sèrum boví fetal.

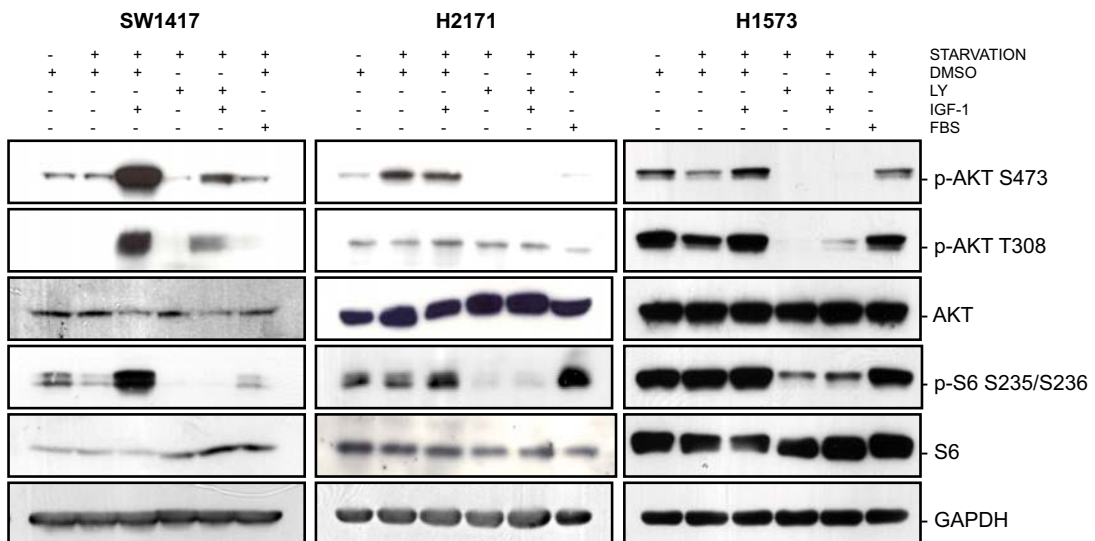


Figura 68. Assajos de funció de la via de PI3K en línies cel·lulars que tenen deleccions i mutacions en *PIK3R1*. S'avalua l'activació de dos de les proteïnes que estan corrent avall de PI3K. En cada cas s'indica la línia cel·lular i el tractament que ha rebut. LY, LY294002; IGF-1, factor de creixement similar a la insulina; FBS, sèrum boví fetal.

També va avaluar-se l'estat basal de la via en aquestes línies cel·lulars, i el que es pot veure de manera clara és que AKT està molt menys activa en aquelles línies cel·lulars que no expressen p85 α . En aquestes línies també s'observa una lleugera disminució de p110 α , tenint en compte les tres subunitats, tal i com s'ha descrit prèviament (Cheung et al., 2011). No hi ha cap canvi a nivell d'expressió en PTEN, i p-ERK tampoc canvia de manera uniforme en les tres línies cel·lulars amb alteracions a *PIK3R1* examinades (figura 69).

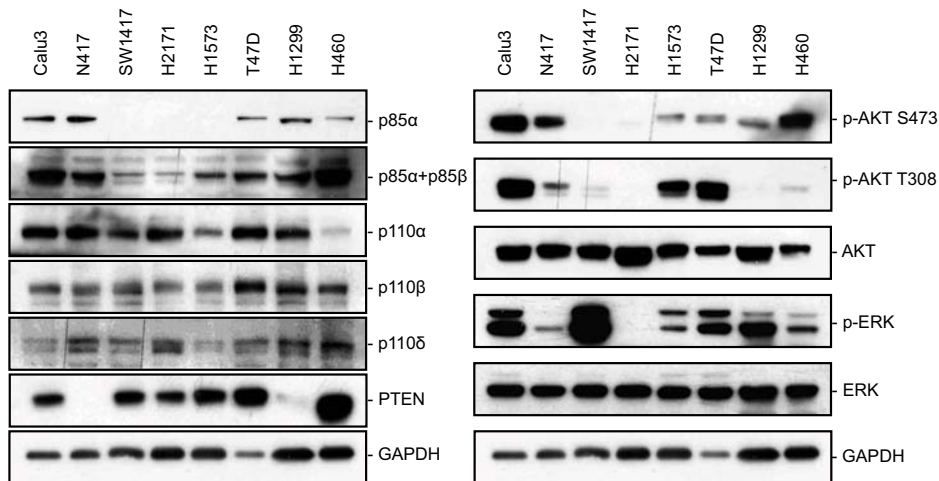


Figura 69. *Western blots* de les línies cel·lulars de pulmó que s'indiquen hibridades amb anticossos de proteïnes de la via de PI3K.

6.3. ESTABLIMENT DE SISTEMES MODEL PEL TREBALL AMB *PIK3R1*

Per entendre com coopera *PIK3R1* en el procés d'iniciació i evolució tumoral es va clonar la forma salvatge del gen en un vector d'expressió transitori i que conté la cua HA (pMSCVpuro). En aquest cas, les línies cel·lulars H2171 i SW1417 es van infectar i seleccionar per obtenir clons estables. També es van utilitzar shRNAs per eliminar l'expressió en diverses línies cel·lulars de càncer de pulmó, totes expressen *PIK3R1* de manera salvatge però algunes d'elles tenen mutacions activadores a la subunitat catalítica del complex PI3K, *PIK3CA* (H460, H1975 i Lu134). Els resultats d'aquests models es mostren a la figura 70.

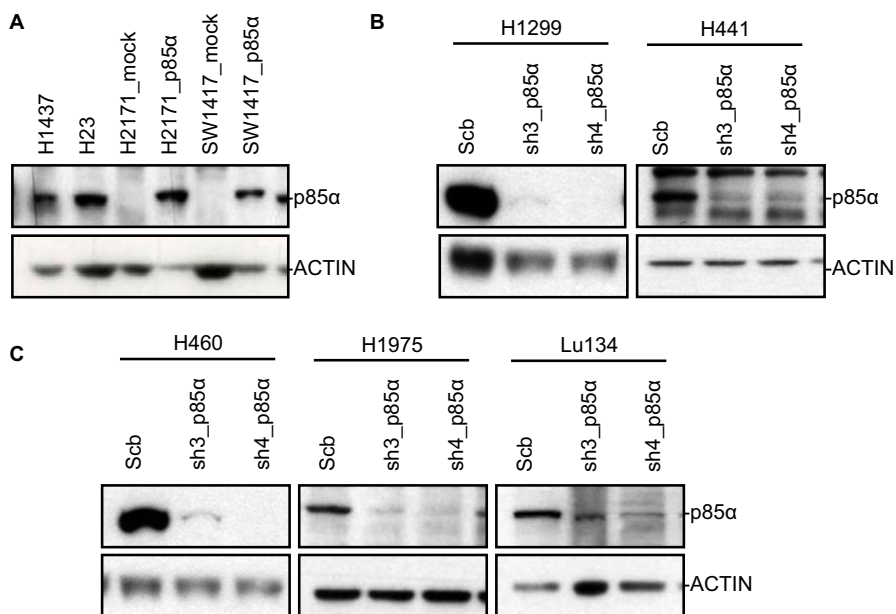


Figura 70. Els models de treball per la proteïna p85α. **A.** *Western blot* que mostra la recuperació de l'expressió de p85α en les línies amb delecions en el seu gen, H2171 i SW1417. **B.** *Western blot* que mostra la regulació a la baixa de l'expressió de p85α en les línies cel·lulars indicades (salvatges per *PIK3CA*) mitjançant shRNAs. **C.** *Western blot* que mostra la regulació a la baixa de l'expressió de p85α en les línies cel·lulars indicades (mutants per *PIK3CA*) mitjançant shRNAs.

6.4. PERFILS D'EXPRESSIONI DE *PIK3R1*

Per entendre millor la funcionalitat d'aquest gen es va realitzar un *microarray* d'expressió utilitzant la plataforma Agilent 8x60K. D'aquesta manera es van comparar els perfils d'expressió de la línia cel·lular H2171 parental i la mateixa línia després de recuperar el gen *PIK3R1* salvatge. De la comparativa entre H2171_mock i H2171_p85α en va sortir una llista de 80 gens diferencialment expressats (p valor <0,05 i *fold change* >1,5) (figura 71).

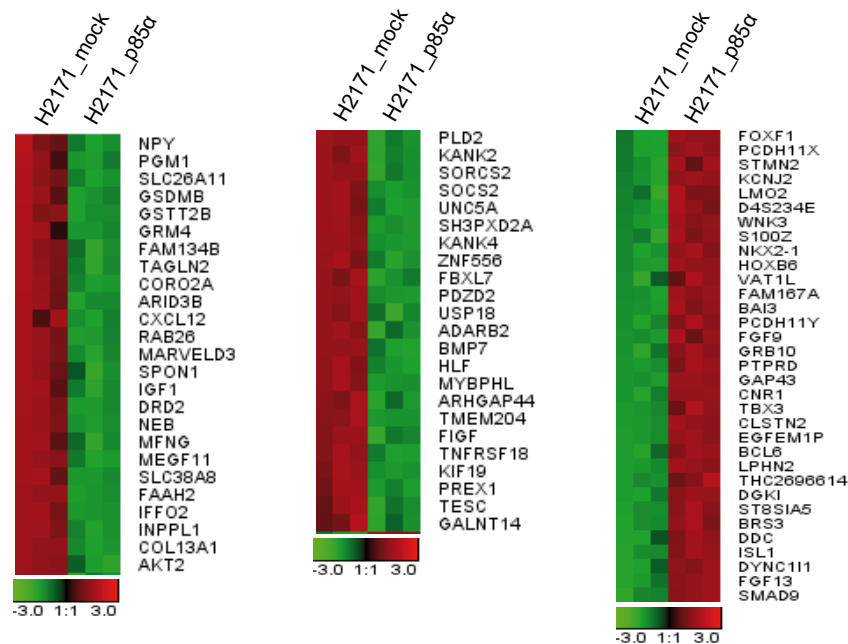


Figura 71. La signatura d'expressió de *PIK3R1*. Heatmap d'aproximadament 80 transcrits que constitueixen la signatura de *PIK3R1*.

Per tal d'assignar funcionalitats als diferents gens que constituïen la signatura de *PIK3R1* es van utilitzar els programes bioinformàtics habituals de *Gene Ontology* (GO). El GO de la signatura de *PIK3R1* va evidenciar un enriquiment en transcrits relacionats amb la mobilitat cel·lular, la regulació de processos de biosíntesi, regulació de l'expressió gènica, adhesió cel·lular i transmissió de senyals entre cèl·lules (taula 15). També es van observar canvis d'expressió en gens que solen estar alterats en càncer, entre els que destaquen els relacionats amb les vies de la PI3K, mTOR i MAPK.

GENE ONTOLOGY CATEGORY	%	GENES
GO:0006928~cell motion	11,0	<i>NPY, UNC5A, DRD2, NKX2-1, IGF1, ISL1, BMP7, CXCL12, GAP43</i>
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	11,0	<i>TESC, SMAD9, TBX3, FOXF1, NKX2-1, IGF1, ISL1, BMP7, AKT2</i>
GO:0010628~positive regulation of gene expression	9,8	<i>TESC, SMAD9, TBX3, FOXF1, NKX2-1, IGF1, ISL1, BMP7</i>
GO:0007155~cell adhesion	9,8	<i>CLSTN2, COL13A1, PCDH11Y, INPPL1, PCDH11X, PDZD2, CXCL12, SPON1</i>
GO:0007267~cell-cell signaling	9,8	<i>GRM4, GRB10, NPY, TBX3, FGF9, DRD2, NKX2-1, FGF13</i>

Taula 15. Categories de l'enriquiment en el *Gene Ontology* (GO) fet amb els gens que és regulen amb la reintroducció de *PIK3R1* ($p < 0,05$ per totes les categories). S'indica el percentatge que representa cada categoria i els gens que s'inclouen en cada grup.

Per obtenir informació d'interaccions funcionals més concretes es van agrupar tots els gens continguts en categories del GO seleccionades per significança i bona representació i es va utilitzar la base de dades de String. Es va obtenir un diagrama d'interaccions de dotze proteïnes, la majoria de les quals tenen relació directa amb la via de PI3K. A més, entre aquestes proteïnes destaquen FOXF1 i NKX2-1 per estar relacionades amb el desenvolupament dels pulmons (figura 72).

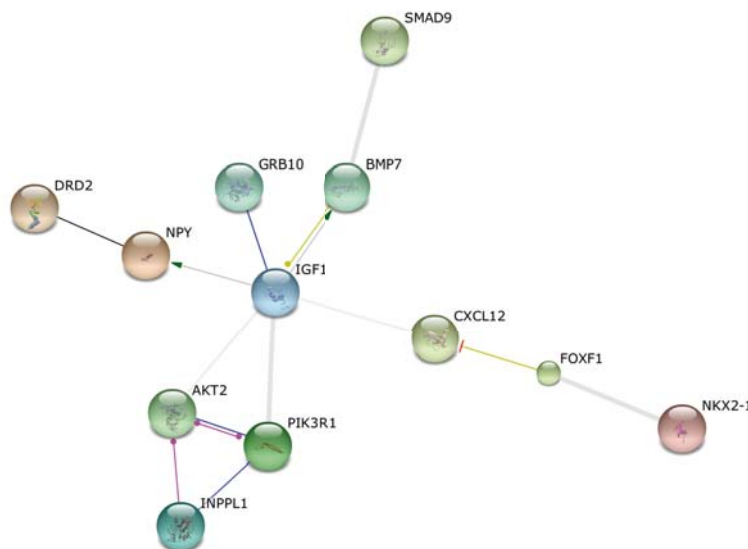


Figura 72. Diagrama d'interaccions obtingut de la base de dades String. Els gens utilitzats han estat els de la taula 13. En blau, interacció; en rosa, modificacions posttraduccional; en groc, expressió; en negre, reacció.

El treball amb *PIK3R1* continuarà al laboratori després de la realització de la present tesi doctoral. Doncs, hi ha moltes qüestions que queden sense resposta, com de quina manera p85 α regula l'expressió gènica de proteïnes de la via de PI3K, quina és la repercussió de la manca de p85 α pel que fa a les funcions que aquesta proteïna realitza sense formar un complex o com s'activa la via de PI3K sense la subunitat reguladora p85 α .

Discussió

Aquest treball té com a objectiu principal la cerca de nous gens alterats en càncer de pulmó. El seu punt de partida és la utilització d'informació de bases de dades públiques combinada amb la manera tradicional de buscar gens supressors tumorals, és a dir buscant gens doblement inactivats i amb alt percentatge de pèrdua d'heterozigositat. La dissecció de les dades d'*arrays* de SNPs per tal de trobar gens deletats homozigòticament en càncer de pulmó ens va generar una llista d'aproximadament cent gens amb possibilitats de ser supressors tumorals; la llista incloïa també gens ja descrits com a inactivats en càncer, és el cas de *NF1*, *RB*, *PTEN* o *CDKN2A* (el-Azouzi et al., 1989; Friend et al.; Nobori et al., 1994; Steck et al., 1997), la qual cosa valida els nostres criteris de selecció. El fet que a partir d'aquestes llistes haguem obtingut l'evidència que hi ha dos gens inactivats en càncer de pulmó indica la potència dels estudis massius que es realitzen actualment, i també la necessitat de discernir i aprofundir en tota la informació que es genera per part de la comunitat científica.

Es van escollir cinc gens per seguir amb el treball, tenint en compte les dades de LOH, l'existència de línies cel·lulars amb deletions homozigotes en tipus tumorals diferents a pulmó i la funció. El percentatge de LOH havia de ser alt, però no tant alt com per poder ser un polimorfisme de número de còpies, així que vam basar-nos en dades d'altres supressors tumorals ben coneguts, entre un 30 i un 60% va ser considerat un bon percentatge de LOH. L'existència de més línies cel·lulars doblement inactivades per deleció (en càncer de pulmó o en altres tipus de càncer) ja de per sí era interessant perquè validava una alta freqüència d'inactivació total del gen i també tenia una clara finalitat pràctica, que era tenir un model de línia cel·lular més per utilitzar en estudis fenotípics. En aquest cas, però, no ens vam fixar en el percentatge de deletions homozigotes respecte el total perquè podia ser una dada enganyosa, ja que només indica les inactivacions per deleció, que si bé són molt comuns no sempre són les més freqüents en gens supressors tumorals (Ali et al., 1999), i de fet representen un percentatge molt baix en el total d'alteracions que es troben en tumors (Vogelstein et al., 2013). Finalment, el paràmetre funcional també va ser tingut en compte, doncs calia que hi hagués un mínim d'informació prèvia en la literatura respecte les funcions d'aquests gens per poder-los contextualitzar en el desenvolupament tumoral. També cal dir que alguns dels cinc gens van escollir-se per estar relacionats amb gens ja estudiats en el nostre laboratori; és el cas de *SMARCA2*, membre del complex SWI-SNF que en la seva funció d'ATPasa s'alterna amb *SMARCA4*. Treballs anteriors del grup ja havien descrit mutacions i canvis fenotípics en els tumors per aquest últim gen (Medina et al., 2008).

En els cinc gens escollits es va procedir confirmant i delimitant les deletions homozigotes descrites per la base de dades. En dos dels casos no es van poder confirmar aquestes deletions homozigotes. Pensem que això pot ser degut a que la majoria de SNPs estan situats fora de les regions exòniques del gen. Les nostres comprovacions al DNA genòmic van incloure tots els exons però en cap cas les zones intròniques i podia donar-se el cas, perquè els introns d'aquests gens són força grans, que uns quants SNPs seguits coincidissin en un intró i això es qualifiqués com a deleció homozigota en aquest gen segons la base de dades de Sanger. En aquest últim supòsit desconeixem quin seria l'efecte fenotípic de la deleció, si és que en tingués, i donat que aquest era el primer pas en la nostra cerca, vam evitar qualsevol tipus de dada confusa, que no ens portés a evidenciar una inactivació total del gen en qüestió. És per això que vam descartar els gens en els que les deletions homozigotes no es confirmessin en les zones codificants.

Els resultats de la cerca mutacional pel gen *SMAD2* van ser negatius, no es va trobar cap alteració a part de la deleció inicial de partida. Tenint en compte les mostres que s'han analitzat en aquest treball, assumim que la freqüència d'inactivació d'aquest gen en càncer de pulmó està al voltant del 4%. Malgrat això, caldria incrementar el número de mostres per tenir una idea més acurada de la freqüència real.

1. *PARD3*

En l'estudi de *PARD3*, hem descobert alteracions inactivadores específiques de tumor en un 8% dels càncer de pulmó del tipus escamós. Aquesta troballa va en la mateixa línia que les descripcions prèvies d'inactivació d'aquest gen en tumors escamosos, és el cas de tumors escamosos de cap i coll o tumors escamosos d'esòfag (Rothenberg et al., 2010; Zen et al., 2009). Aquest fet confirma la tendència de la proteïna PAR3 a perdre la funció en tumors que provenen de teixits que per mantenir la seva homeòstasi estan altament polaritzats (Vareille et al., 2011). Tenint en compte el subtipus escamós de càncer de pulmó, la freqüència d'afectació trobada en aquest treball és força elevada, a l'altura d'altres gens supressors tumorals establerts com *PTEN* (Blanco et al., 2009). Per aquest motiu és sorprenent que no s'hagin detectat abans alteracions en aquest gen de manera més freqüent, però aquest fet queda completament explicat per l'alta freqüència de deleccions que pateix, que representa gairebé un 50% del total d'alteracions. Les deleccions en tumors primaris eren molt difícils de detectar abans de les tècniques de seqüenciació massiva actuals i especialment en tumors que acostumen a patir contaminació per cèl·lules normals, com és el cas del càncer de pulmó. En aquest sentit, treballs previs del laboratori han descrit un increment del 50% en les mutacions detectades en línies cel·lulars *versus* tumors primaris (Rodríguez-Nieto et al., 2011). Així, s'ha de tenir en compte que per fer una cerca completa d'alteracions en el gen *PARD3* cal utilitzar tècniques que permetin detectar canvis en el número de còpies. En aquest punt, cal afegir que el nostre anàlisi de número de còpies per MLPA no incloïa tots els exons del gen i que per tant, és molt possible que el número de deleccions homozigòtiques trobades estigui estimat a la baixa, en tot cas, és una limitació del número de sondes utilitzades.

S'han descrit alteracions en tots els membres del complex PAR i per diversos tipus tumorals. Per exemple, deleccions homozigotes dels gens *PARD6G* i *PARD3B* s'han trobat en línies cel·lulars de càncer (Rothenberg et al., 2010). Contràriament, *PARD6G* també s'ha descrit com a oncogen, sobreexpressat en càncer de mama i promotor de la iniciació i progressió tumoral dependent de CDC42 i aPKC (Nolan et al., 2008). Per la seva banda, la proteïna aPKC es considerada un oncogen en la majoria de tipus tumorals (Fields and Regala, 2007). Gairebé tots els gens de polaritat s'han trobat implicats en el procés tumoral (veure taula 2), aquestes observacions indiquen que les anomalies en el control de la polaritat cel·lular i tissular són esdeveniments força comuns en càncer. Relacionat amb la polaritat, no podem deixar d'esmentar el gen *STK11*, afectat en un 30% dels càncers de pulmó de cèl·lula no petita i molt relacionat amb el consum de tabac (Sanchez-Cespedes et al., 2002). Aquest gen és l'homòleg de *par4* en *Drosophila* i, a part de les seves funcions en el control del metabolisme energètic, està implicat en la regulació de la polaritat cel·lular a través de l'activació de la fosforilació de la cadena lleugera de les miosines o del control de les divisions asimètriques (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012; Vaahtomeri and Mäkelä, 2011). LKB1 també s'ha relacionat amb el

complex PAR, doncs s’ha descrit que intervé en la correcta localització de CDC42 (Zhang et al., 2008). A més, s’ha descrit una relació directa de LKB1 amb la correcta formació d’unions estretes a través d’AMPK (Zhang et al., 2006; Zheng and Cantley, 2007). Tot i aquesta relació d’LKB1 amb la polaritat, les funcions d’aquesta proteïna i de PAR3 són probablement diferents, ja que actualment es pensa que dues proteïnes involucrades en la mateixa via biològica no estan alterades simultàniament en un mateix tumor, i la nostra línia model presenta una deleció intragènica a *STK11* (Blanco et al., 2009).

Així, la conclusió de l’estudi d’alteracions genètiques en càncer de pulmó per *PARD3*, ens ha portat a incloure un nou gen mutat en el subtipus de càncer de pulmó escamós (figura 73). La qual cosa és especialment rellevant ja que els perfils mutacionals d’aquest subtipus de tumor són poc coneguts.

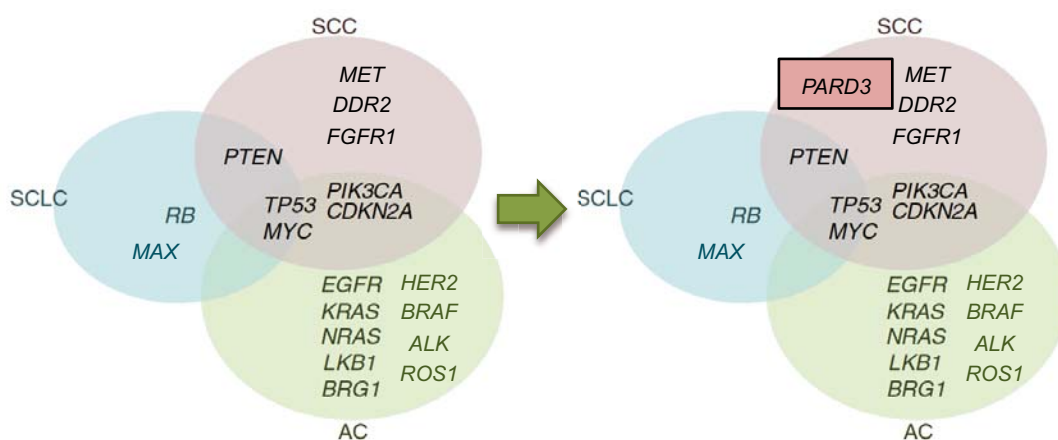


Figura 73. Gens alterats en càncer de pulmó. *PARD3* com a nou gen supressor tumoral implicat en el desenvolupament de LSCC.

La metilació, un mecanisme molt comú d’inactivació de gens supressors tumorals (Esteller, 2008; Herman and Baylin, 2003), també s’ha avaluat en el gen *PARD3* mitjançant la tècnica de MS-MLPA, per totes les mostres, i seqüenciació de bisulfit, en una representació de línies cel·lulars. La conclusió d’aquesta cerca és que la metilació de *PARD3* a les illes CpG del seu promotor no representa un mecanisme d’inactivació de la seva expressió. Això s’ha confirmat després de comparar l’expressió a nivell de proteïna i el grau de metilació del promotor, dades que no van en la mateixa direcció. Aquesta contradicció no és una observació aïllada en el camp de l’epigenètica, on en algunes ocasions l’estat de metilació del promotor no concorda amb l’expressió (Hovestadt et al., 2014; Nehls et al., 2008). Això pot ser degut a què aquest gen no es controla epigenèticament o a que el control per metilació de l’expressió del gen es troba en altres zones, doncs recentment s’han descrit altres seqüències amb alt contingut en CpGs en l’estructura dels gens (Irizarry et al., 2009). Per tot això, el nostre resultat no ens sorprèn i ens permet afirmar que la zona d’illes CpG del promotor no regula l’expressió de *PARD3*, però desconexim si podria haver-hi regulació de l’expressió per metilació en illes d’altres regions del gen, com en el cos o en les *shores* (costes) dels promotors (Portela and Esteller, 2010).

L'anàlisi d'immunotinció en tumors primaris de pulmó i de cap i coll escamosos va revelar un grau diferent d'expressió de la proteïna en els diferents tipus histopatològics de pulmó, destacant una major freqüència de nivells alts de PAR3 en els adenocarcinomes. La tinció intensa i aberrant de PAR3 en tumors que no tenen cap mutació al seu gen ens fa pensar que hi ha alteracions en altres components de la via que fan que incrementi l'expressió de PAR3. Mecanismes d'afectació entre components d'una mateixa via també s'han descrit per altres proteïnes implicades en càncer, és el cas de RB i p16: p16 regula l'activitat de la ciclina D i de la quinasa CDK4, que fosforila RB; quan no hi ha p16 l'activitat d'aquest complex està elevada i RB es manté fosforilat; d'aquesta manera, una manca de p16 és equivalent a una manca de RB pel que fa al control del cicle cel·lular (Nevins, 2001). Un altre exemple és el de la regulació de l'estabilitat de PTEN per p85 α detectada en càncer d'endometri; de manera que quan p85 α manca, la funció supressora de PTEN es veu compromesa (Cheung et al., 2011). No vam trobar cap diferència significativa pel que fa a disminució de l'expressió de PAR3 en casos de tumors escamosos de pulmó respecte a la resta, però això era esperable ja que un gran percentatge dels casos testats per immunohistoquímica ja havien estat avaluats per mutacions i delecions, i a més, sabem que la funció de la proteïna pot alterar-se sense que hi hagi una disminució de l'expressió. Per altra banda, no es va observar proteïna en totes les mostres que tenien mutacions de proteïna truncada o grans delecions; això està d'acord amb l'acció del mecanisme de NMD i amb la degradació que pateixen les proteïnes que tenen delecions.

En les dades de pacients, no es va observar cap correlació entre els nivells de PAR3 i cap dels paràmetres clínics que es van avaluar, tals com la presència de metàstasis o l'estadi clínic. Però el nostre treball i treballs anteriors confirmen que la pèrdua de PAR3 promou la metàstasi i la migració en matrius (Iden et al., 2012; McCaffrey et al., 2012; Rothenberg et al., 2010; Xue et al., 2013), per tant atribuïm aquesta absència de correlació a la dificultat d'interpretació de les dades en pacients, que són molt més heterogènies que els estudis fets amb sistemes específics per modular l'expressió d'un gen en concret. També cal dir que la baixa expressió detectada per immunohistoquímica no necessàriament implica alteració del gen *PARD3*, per tant en el nostre grup de pacients amb baixa expressió pot haver-hi casos amb *PARD3* salvatge que esbiaixarien el resultat. Finalment, si que hi ha correlació entre la mida dels tumors i els nivells d'expressió de PAR3, però la correlació és contrària a l'esperada, tumors amb nivells més alts d'expressió són significativament més grans. Aquest resultat és difícil d'explicar, doncs un increment en la massa tumoral és un factor de mal pronòstic, tot i que no és indicatiu d'un tumor més maligne o amb més capacitat invasiva. En aquest sentit, el fet de no trobar correlació entre nivells d'expressió de PAR3 i estadi de la malaltia treu pes a la correlació entre absència de PAR3 i menor mida dels tumors. Les possibles justificacions per aquesta dada podrien ser les mateixes que en el cas anterior.

El treball per determinar la isoforma de *PARD3* que predomina en el pulmó ens va dur a concloure que aquest gen expressa moltes variants transcripcionals, algunes no descrites en les bases de dades, i amb freqüències molt similars entre elles. Tot i així destacava la freqüència de la variant transcripcional NM_001184785 i aquesta és la que es va escollir pel clonatge. La variant seleccionada perd 9 parells de bases entre els exons 15 i 16, que corresponen als aminoàcids 741-743 del domini d'unió a aPKC; desconeixem quina és la finalitat biològica d'aquesta variant, si presenta més o menys afinitat per la proteïna aPKC, però en tot cas manté la capacitat d'unir-s'hi. Cal dir que la majoria d'exons alternatius es

troben en zones de la proteïna que són connectors entre dominis, és el cas de l'exó 5, que es troba entre els dominis CR1 i PDZ1 o l'exó 12, entre els dominis PDZ1 i PDZ2. S'ha descrit que els *splicings* alternatius poden tenir un paper rellevant en càncer, per exemple l'enzim piruvat quinasa expressa una isoforma diferent en càncer (inclou l'exó 10 en lloc del 9) que li permet incrementar la glicòlisi aeròbica i el creixement tumoral (Hartmann and Valcárcel, 2009). Tots aquests elements fan que l'alta heterogeneïtat en variants transcripcionals de *PAR3* sigui molt interessant, a més la determinació de la funció específica de cadascuna d'elles és completament desconeguda, per la qual cosa seria un bon tema de treball per recerques posteriors.

El nostre estudi mostra que, en comparació amb la proteïna salvatge PAR3, cap dels mutants que es troben en tumors escamosos de pulmó és capaç de suprimir el creixement cel·lular en un assaig colonigènic. Aquesta capacitat no concorda amb els resultats d'assajos de proliferació com MTT (resultats no mostrats), en el que no s'observen diferències, però el tipus d'assaig és diferent. En el cas de la MTT s'avalua capacitat de proliferació a partir de l'activitat mitocondrial mentre que en el cas d'un assaig de colònies, la capacitat testada és la de formar un nou focus a partir d'una sola cèl·lula que ha d'unir-se al substrat i proliferar. En la bibliografia hi ha pocs casos on s'avaluïn el efectes de PAR3 en la proliferació exclusivament, concretament dues publicacions. Rothenberg i col·laboradors observen una major proliferació en cèl·lules sense PAR3 en carcinoma escamós d'esòfag (Rothenberg et al., 2010). Pel contrari, Kunnev i el seu equip descriuen una major proliferació en cèl·lules amb PAR3 i un major creixement en agar tou en les cèl·lules sense PAR3 en càncer de pròstata (Kunnev et al., 2009). Les nostres observacions doncs, estan a cavall entre els dos resultats previs, no hi ha canvis en proliferació però si en habilitat per formar colònies.

A diferència de PAR3 salvatge i de les formes mutants de canvi d'aminoàcid, observem que els mutants p.D41_R74del i p.D41_E689del tenen una menor capacitat per localitzar a la membrana cel·lular, col·localitzant molt pitjor amb ZO1 i deteriorant d'aquesta manera la formació d'unions estretes. En el cas de la proteïna que té la deleció més petita, els 33 aminoàcids que falten es troben dins del domini anomenat regió de control 1 (CR1), i en la deleció gran aquesta regió també està eliminada. Els nostres resultats demostren la implicació d'aquest domini en el posicionament correcte de PAR3 a la membrana cel·lular. Això és consistent amb observacions anteriors en Bazooka, l'homòleg PAR3 en *Drosophila* (Benton and Johnston, 2003; Mizuno et al., 2003). Mizuno i col·laboradors conclouen que el domini CR1 no és suficient però si indispensable per la localització de par3 a la membrana apical; a més, impliquen el primer domini PDZ amb la unió a JAM, proteïna de les unions adherents que també afavoreix la localització de PAR3 a la membrana apical. Paral·lelament, el grup de Benton descriu que la dimerització de PAR3 es dona pel domini CR1 i que és clau per la localització apical de la proteïna. En conclusió, tots dos treballs donen suport a la localització aberrant dels mutants p.D41_R74del i p.D41_E689del per mancar-los-hi el domini CR1, i en el cas de p.D41_E689del, també per tenir deletat el primer domini PDZ. Per altra part, la ubicació aberrant de la proteïna mutant p.D41_R74del al citosol podria explicar la seva degradació pel proteasoma, com mostren els nostres resultats actuals. Aquesta degradació s'ha descrit com a mecanisme cel·lular per evitar que les proteïnes s'acumulin erròniament al citosol, puguin formar agregats i pertorbin l'homeòstasi cel·lular (Hessa et al., 2011).

El fet de trobar que una de les mutacions afecta la degradació de la proteïna és molt interessant, doncs és un fet que indica que es promou la pèrdua d'expressió de la proteïna i, per tant, la seva funcionalitat. En la literatura hi ha altres casos de mutacions que afecten l'estabilitat de les proteïnes, és el cas de SMAD2 i SMAD4, que presenten mutacions que no afecten les seves capacitats d'oligomeritzar, fosforilar-se o entrar a nucli, sinó que els confereixen increment de poliubiquitinació i degradació pel proteasoma (Izzi and Attisano, 2004). Un altre cas, per exemple, mostra com canvis d'aminoàcid en la proteïna Ncb5or, una reductasa, canvien la conformació de la proteïna i n'afecten l'estabilitat (Kálmán et al., 2013). Per tant, la nostra troballa no és un cas aïllat, la mutació p.D41_R74del de *PAR3* incrementa la degradació per part del proteasoma i reforça el concepte de *PAR3* com a gen supressor tumoral.

En avaluar la capacitat de formació de protuberàncies d'actina filamentosa, lamel·lopodis i fil·lopodis, es va observar que les cèl·lules H157tr tenien aquesta capacitat reduïda respecte les cèl·lules H157tr-wtPAR3. Aquests filaments es formen en resposta a senyals quimioatracients i estan implicats en l'adhesió al substrat i la motilitat dirigida. Marios Georgiou i els seus col·laboradors van descriure l'existència de cooperació entre RHO GTPases i proteïnes de polaritat, en concret van postular que l'activació de les proteïnes RAC1 i CDC42 determina la formació de protrusions i que PAR3 actua a través de TIAM1 per limitar-ne la localització (Georgiou and Baum, 2010). Les hipòtesis d'aquest article ens permeten explicar els nostres resultats, per exemple, pel fet que quan hi ha més RAC1 actiu no hi ha restriccions en l'aparició de fil·lopodis, això es compleix en el cas de *mock versus wt*. El que refereix a l'activació de RAC1 està suportat també per l'equip de Kaibuchi, que descriu una reducció en la formació de lamel·lopodis quan manca PAR3, que es dependent d'aquesta RHO GTPasa (Nishimura et al., 2005). Els resultats de Pegtel també corroboren les nostres observacions, doncs demostren que la pèrdua de PAR3 disminueix l'enriquiment en lamel·lopodis (Pegtel et al., 2007).

Les alteracions dins de la regió N-terminal (p.D41_R74 i p.R345H) van mostrar una capacitat significativament reduïda de formar protuberàncies. Aquestes dues mutacions afecten els dominis CR1 i PDZ1, respectivament. PDZ1 és el domini que permet la unió de PAR3 a PAR6, i això és una dada molt interessant, doncs Georgiou postula que CDC42-PAR6-aPKC i PAR3 tenen efectes antagonics pel que fa a la formació de protrusions (Georgiou and Baum, 2010). Si hi ha defectes en la unió de PAR3 i PAR6 per mutacions en el domini PDZ1, PAR6 estarà més lliure per unir-se a CDC42 i aPKC i es formaran menys protrusions. Encara que els autors descriuen un efecte de CDC42-PAR6-aPKC promotor de la formació de fil·lopodis i un efecte de PAR3 limitant; just al contrari del que nosaltres observem. L'explicació per la mutació en CR1 seria la contrària, doncs si hi ha defectes en la dimerització, hi haurà més PAR3 lliure i podrà unir-se a PAR6, però com que sabem que els nivells de PAR3 estan disminuïts en aquest mutant per la degradació, hem de contemplar que la hipòtesi més real seria que hi ha menys PAR3 per unir-se a PAR6 i per tant, el complex CDC42-PAR6-aPKC pot actuar sense restriccions.

El domini PDZ1 també és el domini de PAR3 que es requereix per formar un complex amb el receptor de domini discoidina 1 (DDR1). La formació d'aquest complex, que també inclou PAR6, antagonitza la contractilitat de l'actomiosina als contactes cèl·lula-cèl·lula inhibint l'activitat de ROCK (Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Nakayama et al., 2008). Aquesta inhibició

també s'ha relacionat amb un increment en el número i la mida de fil·lopodis (Barcia et al., 2012; Fass et al., 2004). És a dir, la manca de formació d'aquest complex podria no inhibir la contractilitat d'actomiosina i en conseqüència disminuirien les protrusions. Així doncs, el reduït número de protrusions d'actina observat en els mutants N-terminal podria ser degut a una unió defectuosa amb DDR1. En aquest punt és interessant recordar que s'han trobat mutacions oncogèniques en el gens *DDR1* i *DDR2* en càncer de pulmó del tipus escamós (Hammerman et al., 2011). També es notòria la relació d'inhibició establerta entre DDR1 i STAT3, on l'activació del receptor inhibeix l'activació de STAT3 (Wang et al., 2006).

Per altra banda, ni el mutant p.T861S ni el p.I1043M van mostrar evidència de mala localització ni de defectes en la formació de protuberàncies d'actina. La substitució T861S és al domini d'unió a aPKC, i pròxim a residus que són fosforilats per les aPKCs (S827 i S829) o la RHO quinasa (T833) (Ishiyoshi and Takeichi, 2011; Nakayama et al., 2008). Desconeixem si hi ha efectes pel que fa a la fosforilació de PAR3 en aquests mutants, però la fosforilació en aquests residus en la proteïna PAR3 redueix l'afinitat de PAR3 per aPKC i PAR6 i això suprimeix l'activitat del complex PAR (Ishiyoshi and Takeichi, 2011; Lin et al., 2000; McCaffrey et al., 2012; Nakayama et al., 2008). De tota manera, si hi haguessin efectes en l'afinitat per aPKC, no van ser detectats amb els experiments realitzats. En contraposició, la substitució p.I1043M es troba en el primer domini *coiled coil*, pròxim al domini d'unió a aPKC. En aquesta regió s'ha descrit una de les dues interaccions de PAR3 amb la proteïna FAK (*Focal Adhesion Kinase*), i està molt pròxim a la zona d'unió a p110 α , proteïna del complex PI3K (Itoh et al., 2010). PAR3 també fosforila FAK i això estimula la migració i el recanvi en les unions adherents. Malauradament, no observem cap efecte a nivell de formació de protuberàncies en aquest mutant.

La senyalització a través de RAC1 permet la reorganització del citoesquelet d'actina, regula l'aparició de protrusions i les adhesions amb la matriu extracel·lular i això afecta la motilitat. S'ha descrit que el complex PAR i TIAM1 s'uneixen a les integrines a través de TALIN, i regulen l'activitat de RAC1 i el recanvi d'adhesions per permetre la mobilitat dirigida (Wang et al., 2012). Les nostres observacions mostren que la proteïna RAC1 està més activa (unida a GTP) quan hi ha la proteïna PAR3. L'activació de RAC1 per sota de PAR3 pot donar-se per diversos supòsits, el més directe és el dependent de la proteïna GEF TIAM1 (Chen and Macara, 2005), però també n'hi ha altres com que PAR3 afavoreix la localització a la membrana de RAC1 i això n'estimula l'activació. En la bibliografia s'ha reportat la situació en què PAR3 incrementa l'activació de RAC1 (Nishimura et al., 2005; Wang et al., 2012), però també la contrària (Chen and Macara, 2005; Georgiou and Baum, 2010; Zhang and Macara, 2006). En qualsevol cas, la inhibició de RAC1 en un context oncogènic genera pèrdua de polaritat cel·lular per errors en la disposició de la laminina (O'Brien et al., 2001). També s'ha descrit que l'activació oncogènica de RAS regula a la baixa RAC1 i que això genera alteracions en el balanç RAC1-RHOA i promou la transició epitel·li-mesènquima i la pèrdua d'unions cel·lulars (Yamada and Nelson, 2007; Zondag et al., 2000). Malgrat això, RAC1 s'ha descrit en altres treballs com a oncogen. S'ha trobat sobreexpressat en diversos tumors (Mack et al., 2011), com per exemple en carcinoma escamós oral (Liu et al., 2004), i s'ha vist que aquesta sobreexpressió accelera el creixement tumoral (Espina et al., 2008). A més, en els últims anys s'ha correlacionat també aquesta hiperactivació de RAC1 amb major capacitat metastàtica i angiogènica i inclús s'estan proposant teràpies dirigides a inhibir l'activitat d'aquesta proteïna per millorar l'evolució dels

malalts de càncer (Bid et al., 2013). Tots els treballs anteriors, però, no han considerat mai quin és l'estat d'activació de RAC1 en cèl·lules tumorals que perden PAR3 de forma natural. És a dir, en cèl·lules que presenten pèrdua de PAR3 de manera somàtica i en les que aquesta pèrdua ofereix un avantatge en el desenvolupament oncogènic. Els nostres resultats indiquen que aquesta pèrdua endògena de PAR3 genera una inhibició de l'activació de RAC1, que podria promoure una hiperactivació d'altres proteïnes implicades en migració descontrolada, angiogènesi i metàstasi. Podria ser que aquestes proteïnes, amb funció alterada en conseqüència de RAC1, tinguessin més potència que la hiperactivació de RAC1 per si sola i això fes que el balanç final fos protumorigènic. Aquestes proteïnes podrien ser, per exemple, RHOA, laminina (citades anteriorment) o ROCK. En el cas de RAC1 i RHOA ja hi ha diverses publicacions que en descriuen activitats antagòniques (Chauhan et al., 2011; D'Avino et al., 2004; Nimnual et al., 2003). Cal dir que el mutant p.I1043M no mostra activació de RAC1 de la mateixa manera que PAR3 salvatge. Aquest mutant afecta una zona d'interacció de PAR3 amb la proteïna FAK i aquesta proteïna es fosforilada per PAR3 (Itoh et al., 2010). S'ha descrit que l'activació de FAK resulta en una activació de la proteïna RAC1 en un context oncogènic (Chang et al., 2007; Kallergi et al., 2007), en aquest sentit es podria atribuir la mala activació de RAC1 en aquest mutant a una mala activació de FAK.

A banda de RAC1, també ens ha interessat saber si els mutants de PAR3 afectaven l'activitat o unió a la proteïna quinasa del complex PAR, aPKC. El mutant p.D41_E689del no pot unir-se a aPKC. Estrictament, en aquest mutant no s'afecta el domini d'unió a aquesta quinasa, però la zona de trencament està molt pròxima, només a 23 aminoàcids de l'inici del domini. Així que és molt probable que la unió es vegi afectada i també que la gran deleció generi una proteïna amb grans diferències conformacionals respecte a la proteïna salvatge. Una manca d'unió a aPKC impedirà la correcta localització d'aquesta proteïna (Horikoshi et al., 2009). PAR3 també és deslocalitzarà perquè no podrà ser fosforilat per aPKC i no es donarà la subseqüent disrupció del complex aPKC-PAR3, que exclourà PAR3 de la zona apical i permetrà la delimitació de la zona apico-lateral i la correcta formació d'unions estretes (Gopalakrishnan et al., 2007; Morais-de-Sá et al., 2010). Al mateix temps, la manca d'unió entre aPKC i PAR3 mantindrà lliure la quinasa i amb capacitat per unir-se i fosforilar altres proteïnes diana, com per exemple LGL. Les unions aPKC-LGL i aPKC-PAR3 són mútuament excloents (Yamanaka et al., 2003). Tot i que en el nostre estudi només el mutant p.D41_E689del no pot unir-se a aPKC, no podem descartar la possibilitat que els mutants T861S i I1043M afectin l'afinitat d'interacció amb aquesta proteïna, doncs els canvis d'aminoàcid es troben al domini d'unió a aPKC i en llocs molt pròxims a aquest domini, com s'ha comentat anteriorment. La tècnica de la immunoprecipitació no és prou sensible i no ens permet detectar canvis petits d'afinitat. Tot i així, tampoc hem observat canvis en la fosforilació de LGL pel que fa als diferents mutants (resultats no mostrats).

Pel que fa a l'activitat de la quinasa aPKC, el nostre treball no mostra canvis en la fosforilació d'aquesta proteïna en cap cas. Tot i així, s'ha descrit que la proteïna aPKC fosforilada incrementa quan no hi ha PAR3 en un model amb coexistència d'hiperactivació de NOTCH (McCaffrey et al., 2012) i que l'activitat d'aPKC és dependent de PAR3 (Lin et al., 2000). Per altra banda, tampoc vam detectar canvis en els nivells de proteïna aPKC total en les nostres línies model. Aquestes observacions van en contra del que suggereixen Iden i col·laboradors (Iden et al., 2012), que descriuen que tumors amb mutacions a RAS i *knock outs* per *PAR3*

induïts en ratolins mostren nivells de proteïna aPKC incrementats. Sembla molt estrany que la manca de PAR3 en el nostre model no tingui cap efecte a nivell d'activació d'aPKC. Però aquest fenomen també s'ha observat per altres autors. Ishiuchi i col·laboradors han descrit que quan manca PAR3 no hi ha canvis en els nivells de p-aPKC ni en els nivells d'aPKC totals però sí en la localització d'aquesta proteïna, que ja no es concentra a les zones de la membrana cel·lular (Ishiuchi and Takeichi, 2011). Totalment d'acord amb aquestes troballes, en aquesta tesi s'ha observat una tendència diferencial en la localització d'aPKC entre les cèl·lules trH157 i les trH157-wtPAR3, que comprometria la correcta realització de les funcions d'aquesta proteïna quinasa.

Sense deixar de banda la funció primordial de PAR3 en la formació d'unions estretes, va observar-se una deficiència en la localització de la proteïna ZO1 a la membrana cel·lular en les cèl·lules sense PAR3. Aquest fet s'ha descrit abastament en la bibliografia, des de la primera evidència que PAR3 col·localitza a les unions estretes (Izumi et al., 1998). També s'ha descrit que la dimerització de PAR3 és necessària pel reclutament d'aPKC i PAR6 a les zones de les unions estretes i si això no es dona hi ha retràs en la formació d'aquestes unions després del *calcium switch* (Mizuno et al., 2003). La pèrdua de PAR3 produeix errors en la formació de les unions estretes, retarda el pic en la resistència transepitelial (TER) i disminueix la longitud del marcatge ZO1 després de la formació de les unions. Això es degut a una organització aberrant de l'actina. Un cop les unions estan formades, PAR3 recluta TIAM1 i això n'inhibeix la seva activitat, mantenint RAC1 inactiu a la zona i permetent l'estabilització de les unions estretes (Chen and Macara, 2005). Totes aquestes observacions coincideixen amb els nostres resultats de localització de ZO1. Tot i així, cap dels mutants de canvi d'aminoàcid mostra defectes pel que fa a aquesta funció, això està d'acord amb la manca d'alteracions per la unió d'aPKC.

La restitució de l'expressió de PAR3 en la línia deficient H157 va mostrar canvis en l'expressió de gens relacionats amb l'adhesió cel·lular i la polaritat, com *IGFBP7*, *PCDH7*, *CDH13*, *NRCAM* o *VCAM1*. En la majoria de casos aquests gens mostraven una regulació a l'alça i això està ben d'acord amb les funcions de PAR3. En la signatura d'expressió de PAR3 hem pogut reconèixer un enriquiment en transcrits que estan regulats pel factor de transcripció STAT3. Aquesta dada correlaciona amb un increment en l'activació de STAT3 en les cèl·lules H157tr-wtPAR3, especialment quan les cèl·lules es cultiven a alta densitat. Aquestes observacions contradiuen les de McCaffrey i col·laboradors, que observen un increment d'activació de STAT3 quan manca PAR3. Proposen que la manca de PAR3 deslocalitza aPKC i manté aquesta quinasa hiperactiva, aPKC és la que promou l'activació de STAT a través de JAK (McCaffrey et al., 2012). En aquest article, però, el model utilitzat és força diferent, els autors treballen amb un model de càncer de mama on s'ha interferit l'expressió de PAR3 i s'ha induït sobreexpressió del receptor de NOTCH. Els nostres resultats poden emmarcar-se en les publicacions de Sotillos i col·laboradors, que han descrit en *Drosophila* que PAR3 és necessari per acostar STAT3 a la membrana i allà permetre la seva activació per les proteïnes JAK (Sotillos et al., 2013). També tenen relació amb les interaccions establertes entre les RHO GTPases i l'activació de STAT3 (Raptis et al., 2011), i més concretament amb RAC1 (Simon, 2000). Simon i col·laboradors van descriure l'any 2000 que RAC1 s'uneix a STAT3 i pot activar-lo de dues maneres: portant-lo i mantenint-lo pròxim als receptors de citoquines, que són les seves quinases; i, en resposta a factors de creixement, contribuint en la formació d'espècies reactives d'oxigen que promouen l'activació de les quinases SRC i JAK, que alhora activaran STAT3. Recentment també s'ha

descriu que RAC1 pot estimular la translocació nuclear de STAT3 (Kawashima et al., 2009). En aquest sentit, l'activació de RAC1 coincideix amb l'increment de p-STAT3 en recuperar l'expressió de PAR3, però aquest efecte deixa de ser clar en els mutants de canvi d'aminoàcid.

Una altra troballa molt interessant és la regulació a l'alça de IL6 en les cèl·lules H157tr_wtPAR3. Doncs es coneix que STAT3 regula la transcripció de *IL6* i *IL6R* (Dauer et al., 2005) i que les proteïnes STAT s'activen en resposta a l'activació de receptors de citocines, com IL6 (Berishaj et al., 2007; Niemand et al., 2003). D'aquesta manera en el model de treball de la línia H157tr_wtPAR3 hi hauria un sistema de retroalimentació positiva mediat per PAR3: un increment de producció de IL6 produeix l'activació de STAT3, que alhora estimularà la síntesi de IL6R i IL6. Aquest bucle també aniria acompanyat d'una hiperactivació de RAC1, pel que també s'ha descrit que activa STAT3 mitjançant un mecanisme indirecte de producció autocrina de IL6 (NF-κB) (Faruqi et al., 2001). En la comprovació d'aquesta retroalimentació utilitzant un inhibidor del receptor de IL6 no es va veure cap efecte; la qual cosa pot indicar que IL6 no és la via primordial per mantenir STAT3 activat en el model de la línia H157tr_wtPAR3 o que hi ha alguna altra alteració en aquesta línia que fa que sigui completament insensible a l'ús d'aquests inhibidors.

Per altra banda, està ben establert que STAT3 és un oncogen i que pateix mutacions activadores en leucèmies (Koskela et al., 2012). Que un gen supressor tumoral estimuli l'activació d'un oncogen és, *a priori*, desconcertant. En el nostre model, STAT3 està més actiu quan hi ha PAR3 però mostra una expressió ben regulada per la confluència cel·lular, mentre que en els casos on STAT3 actua com a oncogen, la majoria de mutacions que pateix aquest gen donen lloc a una activació constitutiva de STAT3 (Koskela et al., 2012). La regulació de l'activació de STAT3 per la confluència (Steinman et al., 2003; Vultur et al., 2004) i per PAR3 alhora pot establir un nexa més entre confluència cel·lular i polaritat. De fet, Vultur i col·laboradors van determinar que l'activació de STAT3 per la confluència és completament dependent de les unions cel·lulars (Vultur et al., 2004), en aquest punt encaixa la nostra troballa a través del *calcium switch*, on es mostra clarament que STAT3 deixa d'estar actiu quan les unions es desfan. Totes aquestes observacions estan en complet acord amb la funció de PAR3. A més a més, el treball de Steinman posa de manifest que l'activació de STAT3 en confluència s'associa a condicions antiproliferatives, doncs els gens regulats per STAT3 que són antiproliferatius estan més actius, com p27 (Steinman et al., 2003). Es podria dir que a mesura que les cèl·lules van establint contacte entre elles i formant unions, procés que implica PAR3, hi ha també activació puntual de RAC1 i STAT3, que finalment produiria una aturada en la proliferació cel·lular (figura 74).

Finalment, donant suport als nostres resultats, s'ha descrit que l'activació de STAT3 és un regulador negatiu del creixement tumoral en càncer de tiroide (Couto et al., 2012). També s'ha observat que els efectes de la reducció de STAT3 són diferents segons el tipus cel·lular, doncs en adenocarcinoma de Barrett (un tipus de carcinoma d'esòfag) inhibeix la migració, però en canvi, en carcinoma escamós d'esòfag l'estimula (Timme et al., 2013). Així doncs, comencen a haver-hi indicis en la bibliografia que l'activació de STAT3 no és sempre oncogènica.

La formació de contactes entre cèl·lules és crítica per un bon manteniment de la polaritat cel·lular i això és molt important en teixits epitelials, concretament, l'epiteli respiratori basa el

manteniment de la seva integritat en la presència d'unions estretes. En teixits no epitelials aquests mecanismes no són tan crítics per l'homeòstasi tissular. D'acord amb aquesta línia, les cèl·lules de glioblastoma T98G es comporten igual pel que fa a localització de PAR3 i formació de protusions, però no reproduïxen el comportament de les cèl·lules H157 pel que fa a altres paràmetres estudiats en aquest treball. Per exemple, no mostren canvis en la regulació dels transcrits de la signatura de PAR3 i tampoc presenten més activació de STAT3 quan són cultivades a alta densitat i amb la presència de proteïna PAR3 salvatge.

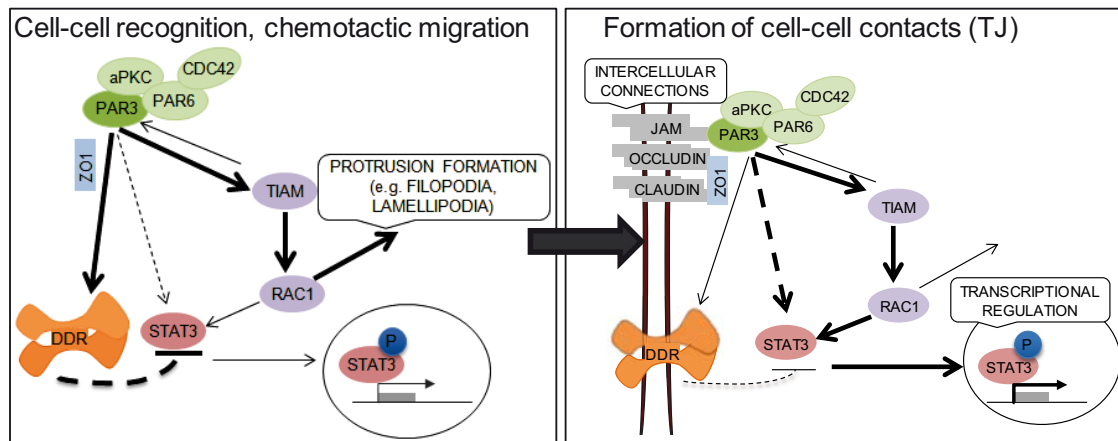


Figura 74. Representació esquemàtica de dos processos cel·lulars que requereixen PAR3. A l'esquerra, PAR3 promou la formació de protusions que permeten la migració dirigida. Molecularment, RAC1 està actiu però STAT3 no. A la dreta, la proximitat entre cèl·lules fa que es formin unions estretes, procés dependent de PAR3. I alhora, hi ha activació de RAC1 i STAT3.

Els resultats dels models *in vivo* mostren que la manca de PAR3 promou la invasió i la metàstasi, mentre que la presència de la proteïna PAR3 salvatge redueix aquests processos. En aquest punt és important destacar que els resultats provenen de la utilització de dos models diferents *in vivo*. El model ortotòpic de càncer de pulmó mimetitzava el que succeeix en un creixement tumoral en aquest òrgan; en aquest cas s'han observat metàstasis al fetge, òrgan que sol rebre metàstasis de càncer de pulmó humà. Per altra banda, s'ha utilitzat també un model ben establert per avaluar capacitat metastàtica, el model de melsa. En aquest últim model s'ha detectat una major capacitat d'envair el fetge per part de les cèl·lules sense PAR3 respecte les que expressen la proteïna PAR3 salvatge; i també s'han observat metàstasis al pulmó de manera diferencial, indicant el tropisme d'aquestes cèl·lules pel seu òrgan d'origen i una major capacitat metastàtica de les cèl·lules sense PAR3. Aquests resultats estan reforçats pels d'altres estudis que han aparegut recentment a la bibliografia (McCaffrey et al., 2012; Xue et al., 2013). A més, aquesta troballa està d'acord amb el paper de la desregulació de les unions i de la polaritat durant la carcinogènesi (Martin and Jiang, 2009; McCaffrey and Macara, 2011). Per contra, i com ja s'ha comentat anteriorment, els resultats de les correlacions dels nivells d'immunotinció de PAR3 amb paràmetres clínics en pacients han estat negatius. Però aquest fet no contradueix el paper de PAR3 en la promoció de la metàstasi, doncs els resultats en pacients, tot i ser més valuosos, tenen més dificultats en la interpretació, ja que caldria tenir en compte els gens mutats en cada pacient i si realment els tumors amb nivells de tinció moderada presenten alteracions reals en *PARD3*.

2. *PIK3R1*

El gen *PIK3R1* està alterat en càncer de pulmó amb una freqüència del 3,5%. En el present treball no s'observa cap preferència per un tipus histopatològic concret de càncer de pulmó. En els estudis que apareixen en la bibliografia, aquest gen s'altera més freqüentment en tumors de colon (Jaiswal et al., 2009), d'endometri (Cheung et al., 2011), urotelials (Ross et al., 2013) i glioblastomes (Parsons et al., 2008). I, pel que fa als treballs de búsqueda de mutacions en càncer de pulmó, Jaiswal i col·laboradors van trobar una freqüència molt baixa d'alteracions en tumors primaris d'aquest teixit (Jaiswal et al., 2009), coincidint amb els nostres resultats.

La presència d'una línia cel·lular amb un canvi en heterozigosi en el gen *PIK3R1* i sense expressió de proteïna evidencia l'existència d'altres mecanismes de regulació de l'expressió d'aquest gen. Degut a que hi ha RNA i que en ell s'observen igualment els dos al·lels possiblement podria tractar-se d'un mecanisme del tipus microRNAs, però aquesta possibilitat no s'ha treballat amb profunditat i el mecanisme no s'ha discernit.

El fet de no trobar una desregulació de la via de les PI3K en les línies cel·lulars mutants per *PIK3R1* va ser sorprenent. Aquest fet s'observa per exemple per mutacions en la subunitat catalítica del complex (Samuels et al., 2004) o en amplificacions de receptors que activen PI3K, com ERBB2 (Carretero et al., 2007). A més, altres autors han descrit que mutacions en el gen *PIK3R1* fan que hi hagi una activació major de AKT (Cheung et al., 2011; Jaiswal et al., 2009; Quayle et al., 2012; Ross et al., 2013), ja sigui per incapacitat d'inhibir el complex PI3K o per alteració de l'estabilitat de la proteïna PTEN. Fer una comparativa dels nostres resultats amb els de la majoria d'articles citats anteriorment és difícil, doncs en aquests articles es treballa amb mutacions puntuals que afecten l'habilitat d'interaccionar amb PTEN o p110 α . El model aquí utilitzat és de deleció total del gen. Així doncs, manca la capacitat reguladora de p85 α sobre p110 α o sobre l'estabilització de PTEN, però també manca la proteïna que ancora el complex PI3K a la proximitat dels seus substrats i activadors. Al nostre coneixement, aquest supòsit, en un context oncogènic, no s'ha tractat en la bibliografia.

La manca de p85 α en les línies cel·lulars de càncer de pulmó no ha donat lloc a una activació constitutiva de la via de PI3K ni a una pèrdua de l'habilitat per respondre a estímuls externs. Tot i així, línies cel·lulars sense aquesta proteïna mostren nivells d'activació d'AKT més baixos que la resta. Aquest fet pot explicar-se per manca d'unió de la subunitat catalítica als seus llocs d'acció i per mecanismes de compensació insuficients, doncs altres subunitats reguladores poden suplir la manca de p85 α . Pel que fa a la proteïna p85 β no s'observa un increment en línies amb manca de p85 α . Altres autors també han descrit que hi ha equilibri molecular entre la subunitat catalítica i la reguladora del complex, i que per tant, quan una de les dos disminueix, l'altra també hauria de fer-ho (Brachmann et al., 2005). D'acord amb aquestes evidències, els resultats aquí presentats mostren una lleugera disminució en el còmput total de les proteïnes p110s, que podria explicar la menor activació d'AKT en les línies *PIK3R1* mutants.

Per altra banda, no s'observa cap canvi en els nivells de proteïna PTEN, la qual cosa contradiu les observacions de Chagpar i col·laboradors i de Cheung i col·laboradors (Chagpar et al., 2010; Cheung et al., 2011), per les que p85 α s'uneix i activa PTEN o els dímers de p85 α s'uneixen i

estabilitzen PTEN, respectivament. Aquestes observacions són sorprenents donat que hi ha una manca total de proteïna p85 α en les línies utilitzades. L'activació d'ERK tampoc es veu alterada de manera uniforme en totes les línies cel·lulars que tenen dèficit de proteïna p85 α .

Cal dir que totes aquestes observacions s'han fet entre línies cel·lulars diferents que tenen diferents alteracions genètiques de base i que el número de línies cel·lulars alterades en càncer de pulmó és molt limitant. Els estudis d'aquestes funcions en els models establerts de reintroducció o inhibició de l'expressió aportaran més evidències al respecte.

Finalment, resulta molt interessant descriure canvis d'expressió en gens relacionats molt estretament amb la via de PI3K. Per exemple, els gens *AKT2*, *IGF1* o *GRB10*, i en altres com *BMP7* o *SMAD9*. La recuperació de l'expressió de p85 α en la línia tumoral H2171 disminueix l'expressió d'*AKT2*. Això està d'acord amb una funció supressora tumoral de *PI3KR1*, doncs la proteïna *AKT2* està sobreexpressada en diversos tumors i s'ha vist que té un paper molt important en el creixement tumoral, la metàstasi i l'angiogènesi (Cheng et al., 1996; Noske et al., 2007). L'expressió d'*IGF1* també disminueix amb la reintroducció de p85 α , i un cop més, aquest gen s'ha relacionat amb el procés oncogènic. S'ha descrit que un increment en aquest factor de creixement promou el desenvolupament tumoral, de fet la seva inhibició es una possible teràpia antitumoral (Arnaldez and Helman, 2012) i també que certes variacions en aquest gen incrementen el risc a patir càncer de pulmó (Huang et al., 2014). L'estudi amb més profunditat de la relació entre aquestes proteïnes i p85 α no s'ha pogut abordar en el transcurs d'aquesta tesi doctoral però segueix sent d'interès per la resta de treballs en el laboratori.

El gen *PIK3R1* és molt interessant perquè en la bibliografia en tots els casos es descriu el complex PI3K com a oncogènic, però a la proteïna p85 α se li atribueixen funcions oncogèniques i supressores tumorals alhora: en articles recents s'ha evidenciat que mutacions puntuals en el gen *PIK3R1* incrementen l'activació de la via de les PI3K (Jaiswal et al., 2009; Quayle et al., 2012) i que mimetitzen els efectes de mutacions en p110 α (Ross et al., 2013), per altra banda, s'ha relacionat una expressió a la baixa del gen *PIK3R1* amb major risc de metàstasi (Cizkova et al., 2013), i també s'ha descrit que hepatòcits sense *PIK3R1* desenvolupen amb més freqüència hepatocarcinomes (Taniguchi et al., 2010). Els articles que es basen en una pèrdua total de la proteïna són de gran ajuda en aquest sentit i indiquen que es tracta d'un supressor tumoral. Però, des d'un punt de vista genètic les mutacions puntuals que pateix aquest gen i els efectes fenotípics que generen no permeten discernir si és un gen supressor tumoral o un oncogen. En tot cas, el seu paper en la carcinogènesi està ben demostrat en molts tipus tumorals en la bibliografia.

Conclusions

El treball aquí presentat ens ha permès concloure que:

- *PARD3* està genèticament alterat en càncer de pulmó. Les alteracions en aquest gen són més comuns en el subtipus histopatològic escamós, en el que la freqüència trobada és del 8%. Aquesta dada és molt rellevant, doncs la freqüència d'aquest subtipus histopatològic de càncer de pulmó és molt elevada. Per contra, la genètica del càncer de pulmó escamós és molt menys coneguda que la del subtipus dels adenocarcinomes.
- Les alteracions que presenta el gen *PARD3* són inactivadores, somàtiques i homozigotes, la qual cosa confirma la naturalesa supressora tumoral d'aquest gen.
- La restitució de la forma salvatge del gen *PARD3*, però no de les formes mutants, en una línia cel·lular naturalment deficient per aquest gen redueix significativament el creixement cel·lular en un assaig colonigènic. Fet que està d'acord amb la seva funció supressora tumoral.
- Les dues proteïnes mutants que eliminen el domini N-terminal CR1 de la proteïna PAR3, però no les mutacions de canvi d'aminoàcid en altres dominis, perden la capacitat de localitzar a la membrana, i per tant, de formar unions estretes. De fet, aquestes proteïnes mutants mostren una localització subcel·lular predominantment citosòlica. Així, el domini CR1 és necessari per la correcta localització de la proteïna PAR3 a la membrana cel·lular.
- La restitució de la forma salvatge del gen *PARD3* en una línia cel·lular naturalment deficient per aquest restableix la capacitat d'activar proteïnes que estan corrent avall de PAR3, com RAC1. Aquest fet coincideix amb una major capacitat de formar protusions per part de la cèl·lula quan es reintrodueix la proteïna PAR3 salvatge.
- El comportament dels mutants de canvi d'aminoàcid per les funcions testades és diferent segons el domini afectat. I1043M mostra incapacitat d'activació de RAC1, mentre que R345H té menor capacitat de formar protusions.
- La restitució de la forma salvatge del gen *PARD3* en una línia cel·lular naturalment deficient per aquest fa que gens relacionats amb l'adhesió i la polaritat cel·lular es regulin a l'alça. Aquest fet reforça el paper d'aquestes propietats en el desenvolupament dels tumors de pulmó escamosos.
- Entre el gens regulats per PAR3 hi ha dianes del factor de transcripció STAT3. L'expressió de la proteïna PAR3 salvatge està relacionada amb un increment de l'activació de STAT3 de manera dependent de la confluència cel·lular i de les unions intercel·lulars. Aquestes observacions indiquen que PAR3 és necessari per la correcta activació de STAT3 en un context d'alta concentració d'unions cel·lulars.

- Dos models *in vivo* han demostrat que la reintroducció del gen *PAR3* disminueix la capacitat de generar metàstasis a òrgans llunyans, reforçant la implicació de PAR3 en el procés metastàtic.
- Els estudis d'expressió de la proteïna PAR3 en pacients de càncer de cap i coll i de càncer de pulmó no han permès establir correlacions amb l'estadi de la malaltia o la capacitat de formar metàstasis dels tumors primaris. Això pot indicar que altres factors genètics i moleculars estan contribuint a determinar la progressió clínica del malalt amb càncer de cap i coll i amb càncer de pulmó.
- El gen *PIK3R1* està alterat per inactivació en càncer de pulmó amb una freqüència del 3,5%. Tot i així, el baix número de casos no ens ha permès correlacionar aquesta alteració amb cap tipus histopatològic concret de càncer de pulmó.
- L'absència de la proteïna p85 α no correlaciona amb un increment en els nivells de fosforilació d'AKT en un estat basal. De fet, la manca de p85 α no evita que les cèl·lules mantinguin la capacitat de resposta a estímuls en la via de PI3K, pel que no s'afavoreix l'activació constitutiva d'aquesta via. Per tot això conclouem que la via d'AKT no és la diana de l'alteració que dona pèrdua total del gen *PIK3R1* en càncer de pulmó.

Annex

<i>Primers</i>	<i>Seqüència</i>
<i>PARD3_E1F</i>	TCCTCGGTCCCGGCC
<i>PARD3_E1R</i>	CCAGGAAGCGCCATATTGATC
<i>PARD3_E2F</i>	ATGGGCAGGAAGTTATCACG
<i>PARD3_E2R</i>	CCTAGTGTTAAGTCCAGGTATCAAG
<i>PARD3_E3F</i>	TTTGAATGTGAAATGTACGACTTAG
<i>PARD3_E3R</i>	TTCCATTTACAGGGTCATGG
<i>PARD3_E4F</i>	TTTAGGATTTCCCTACGTTCTCC
<i>PARD3_E4R</i>	CAATGGTTTACCCAAGACACG
<i>PARD3_E5F</i>	TCGGCACATGGTTATAATTCC
<i>PARD3_E5R</i>	CCAGAAATATCCTGCATTTATGTTAG
<i>PARD3_E6F</i>	CAAGATCATAATGCCTATTAGACTTCC
<i>PARD3_E6R</i>	TCCTCATGCCATATGCTTTC
<i>PARD3_E7F</i>	TGTGTGTCTGTGTTGTTGCAG
<i>PARD3_E7R</i>	TCAACACCACTCTCTATCTGAGC
<i>PARD3_E8F</i>	TCATTTTAACATGCTCCTTTGTAAG
<i>PARD3_E8R</i>	GGCAGAAAATATTCCTCTCCAG
<i>PARD3_E9F</i>	AACAGCCTGTCAGTTCCTATTGC
<i>PARD3_E9R</i>	AGGGTGCTTTGGGTTAGTAGG
<i>PARD3_E10F</i>	GAAATGTGGACCATTGTGAAAG
<i>PARD3_E10R</i>	CGCATACTCCGCTAAAATG
<i>PARD3_E11F</i>	GGCTAGTCCTAGAGTGTGTGTGTG
<i>PARD3_E11R</i>	CTCAATAAACATTTGCCATCAGG
<i>PARD3_E12F</i>	ACAGAGCATTATGTCAGCCATC
<i>PARD3_E12R</i>	GACCACTTTGGCATTTAATAAAACC
<i>PARD3_E13F</i>	TTTCATGGATCTTGCTGTGG
<i>PARD3_E13R</i>	CGTGACACATCACTGATACACC
<i>PARD3_E14F</i>	CGTTCAATTGGGCATAATCC
<i>PARD3_E14R</i>	AAGGTCTGGAACCTAATACCC
<i>PARD3_E15F</i>	TCGGGCAAGTTGTTATAATTCTC
<i>PARD3_E15R</i>	TTTGGTTGCTTCGTCATGTTAC
<i>PARD3_E16F</i>	AGACTCGAGGTCTCTGTTTGAC
<i>PARD3_E16R</i>	TTAAATTTACAGAGTTCCGGGTATAATC
<i>PARD3_E17F</i>	CACTTGCAGGTATGTATGAACCTC
<i>PARD3_E17R</i>	GACATCTGCTTGGGACCATC
<i>PARD3_E18F</i>	ATGACTGGCATATTGCATGG
<i>PARD3_E18R</i>	GGCATATGATTGGCAGCTC
<i>PARD3_E19F</i>	TGAGCAAATAATTGTTATGTACCTG
<i>PARD3_E19R</i>	GAGTAAAGGGCAAATAATATCGTC
<i>PARD3_E20F</i>	GCATTGCAGTCCATGTTGC
<i>PARD3_E20R</i>	TTCAGCCTCCCAAGTAGCTG
<i>PARD3_E21F</i>	ACTGCAGAAGACACCTGATCC
<i>PARD3_E21R</i>	CCATCAATATTTGGGTTGATACAG
<i>PARD3_E22F</i>	CCACTGATCTTCTATAGCTGCAAG
<i>PARD3_E22R</i>	AAGGCAATTCTGGTTTGAGG
<i>PARD3_E23F</i>	CAGCAAGTTGCCATGTTTTG
<i>PARD3_E23R</i>	TCGTTTCATAGAGCATTGAGGTC
<i>PARD3_E24F</i>	CATGCCAAAGCCAAAATCAC
<i>PARD3_E24R</i>	CGGGACATTTATTGGTTCCTC
<i>PARD3_E25F</i>	GCATATTCCATCCCATCCTG
<i>PARD3_E25R</i>	GAAACAGACACTTGAGACATAGTGG

TAULA A1. *Primers* utilitzats per l'amplificació i seqüenciació del gen *PARD3*.

<i>Primer</i>	<i>Seqüència</i>
<i>SFMBT1_E1F_tv3+2</i>	ACACCAGCCCGCGGAGTCCTT
<i>SFMBT1_E1R_tv3+2</i>	CCCGGCGGTTTCCCGTTG
<i>SFMBT1_E1F_tv1</i>	AAAGTGCCGGGGCGGCGCAGT
<i>SFMBT1_E1R_tv1</i>	CCCAAGCGTCCACCACTCCTTGAGCA
<i>SFMBT1_E2F_tv1+2</i>	GCAAAAACAAAAGGTTAACTAAAAA
<i>SFMBT1_E2R_tv1+2</i>	CATCCCAACTTTTATCACACAGAT
<i>SFMBT1_E2tv3_E3tv1+2_F</i>	TCTCTCAACCAGTCGAGTGCCCTGT
<i>SFMBT1_E2tv3_E3tv1+2_R</i>	TCTGAGAGGTACAGAAGATGGCAATGAA
<i>SFMBT1_E4F</i>	CAAAAACAAAACAAAACAAAACCCCACT
<i>SFMBT1_E4R</i>	AGGGTGGCAGGAGGAAAGAAAAAGC
<i>SFMBT1_E5F</i>	TTGGAATTTCTCAGGCTTTCTTGA
<i>SFMBT1_E5R</i>	GCTGGGTAAACCTATATGCTCGAGAGAC
<i>SFMBT1_E6F</i>	TGTGAAATACCTTTAAACCATCTCCACTGA
<i>SFMBT1_E6R</i>	TCAGAGTGGTAAATAAGCAACCGATTT
<i>SFMBT1_E7F</i>	GTGCTACTGGCTTTTGAATGGGTAA
<i>SFMBT1_E7R</i>	GCTCTATTATGAGAACTAACAAAGGTTTTCA
<i>SFMBT1_E8F</i>	AGTGACTTGTTTTGTTTTATGTGAATGCTT
<i>SFMBT1_E8R</i>	GGGCTGCTTTACACTTTCACCTCCT
<i>SFMBT1_E9F</i>	CCAGAGCTGGACATTTCTGTTAATCAC
<i>SFMBT1_E9R</i>	AAAATGGGTTGGATCAATAGAGCTT
<i>SFMBT1_E10F</i>	AGTGCTTCGGTGAGCCAAATTCAT
<i>SFMBT1_E10R</i>	GGAGAGGGACAAAAGATTTTCAGCAA
<i>SFMBT1_E11F</i>	GTGAGTGGACCCTTGGTGAG
<i>SFMBT1_E11R</i>	GAGCAATAACATGGAAAGCAAG
<i>SFMBT1_E12F</i>	AGGCAGACATTTTCCTTTTCTTCA
<i>SFMBT1_E12R</i>	TCCATTAAGTTTAAACAGGCAACATTACAG
<i>SFMBT1_E13F</i>	TGACTTCTGTGTCAAGAGACTTGTGTCTGC
<i>SFMBT1_E13R</i>	TGCAGGAACAGAGAACCAGAATGTCA
<i>SFMBT1_E14F</i>	TCACACAGAACCAGGTTTTAAATATGC
<i>SFMBT1_E14R</i>	TGCTTCCATCTGAGAAAATGAGGAA
<i>SFMBT1_E15F</i>	GAACATGCCACATTTGCTTTCTTCT
<i>SFMBT1_E15R</i>	CACAATTAAGAGACCCCTCTATGAAGACAC
<i>SFMBT1_E16F</i>	CTTCGTTTTTCTTCCCTGGCAGTT
<i>SFMBT1_E16R</i>	ATCTATGGCATGTGGCTCCCTGTAG
<i>SFMBT1_E17F</i>	CATATGACTAGAATTTAACCTCCTAAATAATCTT
<i>SFMBT1_E17R</i>	CTTGAACCTCCTGACCTTGTGATCC
<i>SFMBT1_E18F</i>	TGCAGAACTTCTTGTGTTTTTCAGG
<i>SFMBT1_E18R</i>	ACAGAAGAAGTTCGTGTGCCTCTGC
<i>SFMBT1_E19F</i>	TCAGTACTAGTCAAACCGTCACTTCA
<i>SFMBT1_E19R</i>	TTGGGCCACAAAACCATCTTCTATT
<i>SFMBT1_E20F</i>	TTTTGTGGCCCAAGAACTGGTTTGT
<i>SFMBT1_E20R</i>	CAAGAGACCCTGGAAATTCTACATAAGTCTG
<i>SFMBT1_E21F</i>	TCTTTGCCATCTTTGCTGGGAGAAA
<i>SFMBT1_E21R</i>	TTGGATCAAAACATTTTTCTAAAACCTGTAAA
<i>SFMBT1_E22F</i>	GGAAAGGAAAGCATAGGGATTCCAG
<i>SFMBT1_E22R</i>	CCTTCCCGAAAGTGCAAAGAG

TAULA A2. *Primers* utilitzats per l'amplificació i seqüenciació del gen *SFMBT1*.

Primer	Seqüència
SMAD2_E1F_tv2+3	CCTCGCCTCACGCTAGAC
SMAD2_E1R_tv2+3	GAAGGAGGGGGTGAGGAC
SMAD2_E1F_tv3	GCCTCACCCCTCCTTC
SMAD2_E1R_tv3	CATGTGACACGGCCCATC
SMAD2_E2F	TTCGAATTTCTATCTTGCTTTGC
SMAD2_E2R	CAGGCAACTTGAAAGGAACAC
SMAD2_E3F	TTCTGGGTGAAGGAAGTATTCTG
SMAD2_E3R	GAAGATTCAACTAGAATTGCATTG
SMAD2_E4F	ATTGTACTAATTTAGCCATTGAC
SMAD2_E4R	GCCAAATCATATGCTATTCCAAG
SMAD2_E5F	TCGAGTAGGTGGACCCTAGC
SMAD2_E5R	AAATAATCACCCAACGAATCC
SMAD2_E6F	TTGTTATTTGGAGTGATTTCATTGG
SMAD2_E6R	TTGGTATGCGTCTCAACTTCTC
SMAD2_E7F	GCACTTACATATTCTGAATTCTTGG
SMAD2_E7R	TTCATTAGGATCCCTTTCTCG
SMAD2_E8F	AGTGCAGGCTGGCATAGAG
SMAD2_E8R	TGTGTCGGCACTTAAACCAC
SMAD2_E9_10F	TCCAAGAAAATGCTTCCAAG
SMAD2_E9_10R	AACTCCAGAATATGCAAGAATGC
SMAD2_E11F	TTTGCGGAATAATCGTGTCC
SMAD2_E11R	TTCTCTTTAATGGGAGAGTATTTC

TAULA A3. Primers utilitzats per l'amplificació i seqüenciació del gen *SMAD2*.

Primer	Seqüència
PIK3R1_E1_85F	TCCTTTGCTCTGCTGGAC
PIK3R1_E1_85R	AACGACTCAACCCAACTTAAGAC
PIK3R1_E2F	GCAGTGGGCATATCACTTTG
PIK3R1_E2R	CAGTTTGAGTGTCCAGCAGAG
PIK3R1_E3F	TGGAACTGGAATGTCTCTGG
PIK3R1_E3R	TTCCCTTTAAATTTAGAACAATGC
PIK3R1_E4F	TTGTTCAAGAAATAGCCCAACT
PIK3R1_E4R	CTGGGTCTTCTCTGGATGC
PIK3R1_E5F	TGTGTGCTTCTCCAACAAC
PIK3R1_E5R	TGAATGTGTGTGATAGCATCTG
PIK3R1_E6F	GCAGATGCTATCACACACATTC
PIK3R1_E6R	TTACTTCAAAGGAGGTTTATAGCC
PIK3R1_E1_50F	TGCCAAGTTAATCATGAAGC
PIK3R1_E1_50R	CACGCACACACAGTACTCC
PIK3R1_E1_55F	ATGAAGCAGGAGTGGTCTGG
PIK3R1_E1_55R	TTACCACACACAGCCTGAGC
PIK3R1_E7F	TTTGAGCCATGCTCTGAAAG
PIK3R1_E7R	GCTTCATGCTTATGTTGGATG
PIK3R1_E8	TGCTGTGAACCTAAAAGTCTC
PIK3R1_E8	AAAGGTATTAACATTTTGAATAAGG
PIK3R1_E9F	GGGTTTTGGGCTGATATTAAGC
PIK3R1_E9R	CAAAATAGCTGACATGGAAACATC
PIK3R1_E10F	GATGTTTCCATGTCAGTATTTTG
PIK3R1_E10R	GATTCACAAATAAATGCTCTCACC
PIK3R1_E11F	TGAATTTGAGTCCCACTCTGC
PIK3R1_E11R	TCCACGTGATCATTCAAAGC
PIK3R1_E12_13F	AACTGCTGGGAAACCATAGTG
PIK3R1_E12_13R	TCCTACAAGATGTTCCAAACTCAG
PIK3R1_E14F	GTCTGACTGGCTTGGTAGGG
PIK3R1_E14R	CAGCTGCTTTGGTTTCTCTTC
PIK3R1_E15F	TTACCTACCCAAGGCACTCG
PIK3R1_E15R	GAAAGCTCTAGTCCCATCAA

TAULA A4. Primers utilitzats per l'amplificació i seqüenciació del gen *PIK3R1*.

Primers	Seqüència
SMARCA2_E1F	CGGCTGTCATCAATGAAGTC
SMARCA2_E1R	GAAGGGAGGGGAAAGAGGAG
SMARCA2_E2F	ACATCTGGACTAGACAGGGC
SMARCA2_E2R	CAGTAGAAAGGGGGATGGGG
SMARCA2_E3F	AGTAGATGATAGTGCCACAC
SMARCA2_E3R	GACTGAAAGACTATGCTGGG
SMARCA2_E4F	GTTGTCAGGGGCAGCCTGTG
SMARCA2_E4R	AAAGGCTACGTCAGCCCCGG
SMARCA2_E5F	CACTTAATGGTCCCCAGCAC
SMARCA2_E5R	CGGGTGAAAATCACAGTTTG
SMARCA2_E6F	CGGACTTAAACCTAATGTCA
SMARCA2_E6R	TTGAATAGACTAAAGGCAAC
SMARCA2_E7F	GCGAGAAGGCCAGAGTTCAG
SMARCA2_E7R	ACAGCTCTGCCAAAGTGAGG
SMARCA2_E8F	AGACACCAGGGCACCTATCC
SMARCA2_E8R	TCATTGCAGACGGACGTGGG
SMARCA2_E9F	GGAGGCAGAGTGGAGAGTG
SMARCA2_E9R	CCTGCCATACACCCTGGAC
SMARCA2_E10F	CATACCGGAGAGTTACCAGG
SMARCA2_E10R	GCCAGGTATGGCACAGACTC
SMARCA2_E11_12F	AGTACAGGACTGGGGGAAGG
SMARCA2_E11_12R	CCGGGCTTACATTCAGGAAG
SMARCA2_E13F	GTTGAATTGGGGTATTACC
SMARCA2_E13R	CGTGAAGTTAGTTGCCTTCC
SMARCA2_E14F	TGCATGGCAAGTCGTGGTTG
SMARCA2_E14R	GCCCTTAGTCAACATGTGC
SMARCA2_E15F	TCACACCCTCACTGGGTTG
SMARCA2_E15R	GGACAAGCTACTAATCGGGC
SMARCA2_E16F	CAAGGTGAGGCCTGAACATG
SMARCA2_E16R	GGAACAGTCAGCACAGTAGC
SMARCA2_E17F	CTTCAGTCACATGTCTGGGC
SMARCA2_E17R	CACATTCCAGTGAATGGTC
SMARCA2_E18F	TGCTTACTACACGTCCGTCC
SMARCA2_E18R	ATGTTCTCAGCTTAGGGCC
SMARCA2_E19F	CAGAGGTAGATATGACAGGC
SMARCA2_E19R	TTCCCTGCTCTCTAGCCC
SMARCA2_E20_21F	GAACAGGCGCCTTCTCCTTC
SMARCA2_E20_21R	ATGTCACTCAACTTCCGCC
SMARCA2_E22F	GCATGCAATATACTGAATTTCTGG
SMARCA2_E22R	CAAGAGGAAACACTGTAGAGAGG
SMARCA2_E23F	GGGCGAGGAGAAAGAATAAG
SMARCA2_E23R	TGGCTTCCGAGCCTAATGCC
SMARCA2_E24F	AGTGTTAGGAGGAGTCTGGG
SMARCA2_E24R	TAGTTGCTCTCCAGAGGGAG
SMARCA2_E25F	ATGCCTATGCCAGGCATCTC
SMARCA2_E25R	GGCTTTCTGTGGTTGGGATC
SMARCA2_E26F	TTGCCCCAGCTGTCCACTGG
SMARCA2_E26R	AAGTTCTGCCAGGCACGCAG
SMARCA2_E27F	GAGGTTGAAAGGGACCCTGC
SMARCA2_E27R	TCTAGGCCCTGGTTTCTCC
SMARCA2_E28F	TGAGTGTTTTGGCCTTCAG
SMARCA2_E28R	TAACTTCTGCTCCTCAG
SMARCA2_E29F	AGGCAGGTTGGTGAGGAGAC
SMARCA2_E29R	TCTGTGCTCTATCCGCTC
SMARCA2_E30_31F	GTGTGACAGAAGTGGGGACC
SMARCA2_E30_31R	GCACAGCTGTGGTACAAAGG
SMARCA2_E32F	GGAAGAGTTCCTGCCATGG
SMARCA2_E32R	AGACAGCTATGCAGGTGAGG
SMARCA2_E33F	ACCGGGAATGTTCTGGGCAC
SMARCA2_E33R	GCATGGAAATGCAAGAGGCC
SMARCA2_E34F	CCACGGAAAGAGATTTGGCG
SMARCA2_E34R	AGTGTTCACTAGCAAGAGCC

TAULA A5. Primers utilitzats per l'amplificació i seqüenciació del gen SMARCA2.

<i>Primer</i>	<i>Seqüència</i>
D10S1666_F_PARD3_FAM	[FAM]TGGAAACATGCCCTGTGATA
D10S1666_R_PARD3	GCTGGTCTCAAACCTCCC
D10S1791_F_PARD3_HEX	[6HEX]TCCAGCCTAGCAACAGAGTG
D10S1791_R_PARD3	ATGCAACATAACTTGGGCAAC
D10S1780_F_PARD3_FAM	[FAM]AATATTTGCTTTCTGTCTACAGTCC
D10S1780_F_PARD3	TCACTTTCTGGAGGGCTAGG
GTs_E11_F_PARD3	GGCAGAATTGTGCATGAAATG
GTs_E11_R_PARD3_FAM	[FAM]CGAAAGACCAGAAGGCTCAC

TAULA A6. Primers utilitzats per amplificar els microsatèl·lits de *PARD3*.

<i>Primer</i>	<i>Seqüència</i>
BS_PARD3_A1F	GTTTATAATTAAGATAAAATGAGTTTTAGTTA
BS_PARD3_A1R	CCTTTCTTTATCACTTTTAATCCC
BS_PARD3_A2F	TTTGGGTTAGGGTTGGTG
BS_PARD3_A2R	CCTACTAAATAAACTAAAACTTTTCATATAAC

TAULA A7. Primers utilitzats per la seqüenciació de bisulfit de *PARD3*.

REGION (MB)	GENE/S	% LOH	% HD/LOH
CHR 22			
17,28-17,30	<i>PRODH</i>	38,1	1,6
17,273-17,279	<i>DGCR6</i>	38,1	1,6
17,4-17,48	<i>DGCR2</i>	39,4	1,5
28,32-28,42	NF2	43,8	1,4
35,0-35,1	<i>MYH9</i>	47,5	1,3
37,74-37,75	<i>APOBEC3C</i>	46,9	1,3
CHR 21			
NO GENES IN THE 3 HD FOUND			
CHR 20			
13,92-15,98	<i>MACROD2</i>	37,5	10
CHR 19			
44,541-44,543	<i>FFAR3 (GPR41)</i>	25,0	20
47,94-48,05	<i>PSG8</i>	31,9	3,9
48,04-48,07	<i>PSG1</i>	30,0	4,2
48,09-48,11	<i>PSG6</i>	30,0	4,2
48,2-48,22	<i>PSG11</i>	30,6	12,2
48,3-48,4	<i>PSG4</i>	30,6	12,2
48,44-48,46	<i>PSG9</i>	31,9	9,8
CHR 18			
46,81-46,86	SMAD4	28,1	4,4
14,73-14,84	<i>ANKRD30B</i>	26,9	2,3
43,61-43,71	SMAD2	28,8	2,17
CHR 17			
5,91-5,96	<i>WSCD1</i>	78,1	0,8
7,512-7,531	TP53	80,0	0
21,74-21,75	<i>FAM27L</i>	63,1	3
26,49-26,57	NF1	25,6	4,9
CHR 16			
HD IN A FRAGILE SITE AND HD WITH NO KNOWN GENES			
CHR 15			
50,6-50,8	<i>ARP19</i>	36,9	1,7
74,42-74,98	SCAPER	36,3	1,7
90,19-90,50	<i>SLCO3A1</i>	34,4	1,8
CHR 14			
38,93-38,97	<i>FBXO33</i>	21,3	2,9
59,78-59,82	<i>PPM1A</i>	23,8	2,6
CHR 13			
18,89-19,00	<i>TPTE2</i>	58,1	2,2
19,10-19,14	<i>MPHOSPH8</i>	58,1	2,2
36,31-36,39	<i>SMAD9</i>	67,5	0,9
38,81-39,07	<i>LHFP</i>	67,5	1,9
47,75-47,95	RB	68,8	1,8
65,7-66,7	<i>PCDH9</i>	61,3	1
98,65-98,83	<i>UBAC2</i>	53,8	1,2
CHR 12			
20,3-26,7	<i>CACNA1C</i>	34,4	1,8
34,7-35,7	<i>PRMT8</i>	34,4	1,8
36,2-37,3	<i>EFCAB4B</i>	31,9	2
58,36-58,66	<i>SLC16A7</i>	23,8	2,6
81,6-82,0	<i>TMTC2</i>	25,6	2,4
88,50-88,57	<i>ATP2B1</i>	23,8	2,6
70,95-70,34	<i>TRHDE</i>	25,6	2,4
116,39-116,77	<i>KSR2</i>	24,4	2,6
CHR 11			
13,255-13,365	<i>ARNTL</i>	31,9	2
18,911-18,913	<i>MARGPRX1</i>	29,4	4,3

TAULA A8. Gens delecionats homozigòticament en línies de càncer de pulmó.

REGION (MB)	GENE/S		% HD/LOH
CHR 10			
12,978-12,083	CCDC3	41,3	1,5
34,440-35,143	PARD3	41,3	1,5
46,41-46,42	GPRIN2	35,6	1,8
52,504-53,725	PRKG1	41,9	1,5
76,256-76,464	MYST4	43,8	1,4
76,827-76,831	ZNF503	41,9	9
89,30-89,7	PTEN	41,9	9
127,69-128,06	ADAM12	43,8	1,4
CHR 9			
2,005-2,183	SMARCA2	53,8	1,2
21,95-21,98	CDKN2A	42,5	41,2
32,14-35,15	RFX3	53,8	1,2
83,04-90,08	PTPRD	56,9	4,4
66,30-66,49	RORB	41,3	1,5
CHR 8			
2,78-3,25	CSMD1	46,3	1,4
13,99-15,14	SGCZ	48,8	1,3
28,80-28,96	HMBX1	43,1	1,5
39,28-39,39	ADAM5P (PSEUDOGENE)	36,3	62,1
CHR 7			
141,34-141,45	MGAM	15,0	16,7
145,44-147,74	CNTNAP2	19,4	16,1
CHR 6			
20,64-21,34	CDKAL1	27,5	2,2
144,8-144,9	UTRN	33,1	1,9
163,06-163,65	PACRG	36,3	1,7
CHR 5			
66,29-66,49	MAST4	50,0	1,3
67,55-67,63	PIK3R1	48,1	1,3
80,56-80,59	CKMT2	48,1	1,3
156,69-159,92	FBXL7	11,9	10,5
122,20-122,37	SNX24	52,5	3,1
122,38-122,40	PPIC	52,5	3,1
138,11-138,29	CTNNA1	50,6	4,9
156,69-167,62	FBXL7	11,9	10,5
167,23-167,62	ODZ2	50,0	1,3
180,34-180,36	BTNL3	45,6	8,2
CHR 4			
91,267,707-92,742,392	FAM190A	43,1	7,3
91,978-91,979	TMSL3	40,0	1,6
104,7-104,8	TACR3	39,4	1,6
122,469,247-122,520,630	QRFP+GPR103	43,8	1,4
CHR 3			
11,289-11571	ATG7	65,0	1
37,878-38,000	CTDSPL	65,0	6,7
52,913-53,055	SFMBT1	71,3	7
54,13-55,08	CACNA2D3	70,6	0,9
59,71-60,4	FHIT	76,3	4,9
89,23-89,61	EPHA3	51,9	7,2
153,014-153,028	AADAC	21,9	2,9
178,21-178,39	TBL1XR1	22,5	2,8
189,4-190,9	LPP	23,8	2,6
CHR 2			
140,70-142,60	LRP1B	28,1	24,4
165,249-165,406	COBLL1	16,3	7,7
211,948-213,111	ERBB4	19,4	9,7
CHR 1			
48,77-50,26	AGBL4	25,0	2,5
61,98-62,40	INADL	21,9	2,9
74,43-74,78	TNNI3K+FPGT	25,6	2,4
172,39-173,19	RABGAP1L	15,0	20,8
179,64-180,03	CACNA1E	13,8	4,6
205,6-208,91	HHAT	17,5	3,6

TAULA A8. Gens delecionats homozigòticament en línies de càncer de pulmó.

PROBE TARGET INFORMATION	TUMOR												
	100	114	139	141	168	181	200	269	273	370	472	1529	1681
01-103244240 [Reference]	1,21	1,30	0,91	0,93	1,18	0,94	0,66	0,88	0,97	1,20	0,93	1,02	0,69
02-108906234 [Reference]	0,89	0,93	1,02	1,21	1,03	1,70	1,12	0,98	1,16	1,09	1,16	1,05	1,21
05-132037610 [Reference]	0,92	0,77	0,62	1,03	1,09	0,80	0,71	1,05	0,81	0,68	0,91	0,67	1,03
06-051632233 [Reference]	1,07	1,18	0,95	0,96	1,04	1,31	0,62	0,92	1,19	1,64	0,97	0,81	0,94
09-077963844 [Reference]	0,93	0,85	1,00	0,84	1,13	0,98	1,02	0,95	0,73	0,94	1,00	1,09	1,03
10-015054513 [MEIG1-3]	1,05	1,14	0,57	0,74	0,77	1,09	0,66	0,59	0,68	0,71	1,34	1,17	0,85
10-021226273 [NEBL-5]	1,02	0,84	0,62	0,90	0,62	1,23	0,60	0,61	0,88	2,01	1,44	0,88	0,90
10-034440325 [PARD3-26]	1,02	0,93	0,61	0,77	0,73	1,32	0,66	0,64	0,86	2,15	1,43	1,08	0,68
10-034460426 [PARD3-24]	1,01	1,01	0,58	0,79	0,66	1,15	0,68	0,59	0,72	1,55	1,39	1,16	0,91
10-034598733 [PARD3-23]	1,07	1,11	0,61	0,76	0,75	1,03	0,71	0,72	0,76	1,41	1,51	0,69	0,7
10-034641232 [PARD3-21]	1,05	0,89	0,60	0,88	0,67	1,45	0,61	0,66	0,73	1,76	1,38	0,62	0,69
10-034660145 [PARD3-19]	1,05	0,85	0,60	0,81	0,57	1,63	0,56	0,56	0,95	3,19	1,43	0,65	0,61
10-034670584 [PARD3-16]	1,07	0,89	0,60	0,89	0,66	1,42	0,61	0,57	0,89	2,09	1,30	0,60	0,66
10-034689024 [PARD3-13]	1,03	0,55	0,58	0,77	0,59	1,03	0,65	0,61	0,79	1,96	1,32	0,78	0,77
10-034706957 [PARD3-10]	1,06	0,51	0,63	0,80	0,72	1,09	0,66	0,63	0,77	1,52	1,21	0,67	0,75
10-034730785 [PARD3-6]	1,04	0,49	0,62	0,76	0,74	1,34	0,60	0,57	0,72	2,17	1,33	0,74	0,67
10-034799110 [PARD3-4]	1,03	0,38	0,62	0,79	0,77	0,64	0,67	0,78	0,78	1,59	1,41	0,66	0,64
10-034845867 [PARD3-3]	0,97	0,36	0,59	0,86	0,71	1,05	0,72	0,70	0,64	1,04	1,43	0,99	0,72
10-035025286 [PARD3-2]	1,01	0,65	0,61	0,76	0,81	0,98	0,73	0,82	0,73	1,07	1,39	1,16	1,08
10-035144654 [PARD3-1]	1,07	1,16	0,59	0,75	0,75	1,26	0,72	1,04	1,05	0,92	1,48	1,06	0,98
10-035145114 [PARD3-up]	1,10	1,02	0,58	0,88	0,70	1,49	0,69	0,75	0,85	0,98	1,62	1,37	1,21
10-035517225 [CREM-9]	1,00	1,07	0,61	0,73	0,77	0,88	0,75	3,93	0,87	0,74	1,53	0,98	0,9
10-038300693 [ZNF25-2]	1,02	1,26	0,58	0,84	0,83	0,98	0,65	3,45	0,90	0,83	1,20	1,00	0,66
10-042935130 [RET-14]	1,05	1,08	0,59	0,99	0,72	1,05	0,55	1,13	0,73	0,92	1,11	0,73	1,07
10-053746489 [DKK1-4]	1,04	0,98	0,63	0,88	0,66	1,04	0,64	0,90	0,77	1,75	1,05	0,59	1,11
10-055368625 [PCDH15-27]	1,09	0,92	0,57	0,83	0,50	0,85	0,58	0,80	1,03	2,25	0,92	0,55	0,9
15-025908309 [Reference]	1,00	1,00	1,02	1,25	0,67	1,42	1,14	1,08	1,15	1,00	1,08	1,05	1,05
15-042677706 [Reference]	1,02	1,08	1,37	1,05	0,75	1,02	1,00	1,10	1,25	0,86	0,81	0,97	0,8
18-045817181 [Reference]	1,04	1,19	1,01	0,97	0,70	0,74	1,12	1,15	0,59	1,01	1,24	1,15	1,06
AVERAGE	1,04	0,77	0,60	0,81	0,70	1,21	0,66	0,69	0,8	1,67	1,40	0,87	0,79
INTERPRETATION	Normal	Loss	Loss	Normal	Loss	Gain	Loss	Loss	Loss	Gain	Gain	Normal	Loss

TAULA A9. Resultats de MLPA en l'avaluació de número de còpies. Es mostren les ràtios de cada sonda pels tumors indicats. En blanc, número de còpies normal; en verd, guany; en vermell, pèrdua.

TUMOR	COPY NUMBER		METHYLATION	
100	1,04	Normal	0,03	Abs
104	1,02	Normal	-0,05	Abs
108	0,88	Normal	-0,07	Abs
110	1,46	Gain	0,01	Abs
114	0,75	Loss (deletion E2_E13)	-0,04	Abs
116	1,05	Normal	-0,05	Abs
120	1,92	Gain	0,04	Abs
139	0,60	Loss	0,14	Abs
141	0,80	Loss	0,02	Abs
143	0,89	Normal	0,11	Abs
149	1,01	Normal	0,10	Abs
156	0,96	Normal	0,04	Abs
159	0,76	Loss	0,01	Abs
160	1,05	Normal	0,01	Abs
162	1,08	Normal	-0,05	Abs
164	0,95	Normal	-0,01	Abs
167	0,98	Normal	0,09	Abs
168	0,70	Loss	-0,05	Abs
170	0,84	Normal	0,03	Abs
172	0,98	Normal	0,04	Abs
181	1,18	Normal (deletion E4)	0,00	Abs
184	0,87	Normal	0,06	Abs
186	1,05	Normal	0,06	Abs
189	0,92	Normal	0,01	Abs
190	1,21	Gain	-0,06	Abs
192	0,93	Normal	-0,10	Abs
193	1,17	Normal	-0,04	Abs
194	0,97	Normal	0,00	Abs
196	1,10	Normal	-0,07	Abs
197	1,03	Normal	-0,05	Abs
199	1,17	Normal	-0,06	Abs
200	0,66	Loss	-0,07	Abs
202	0,96	Normal	-0,05	Abs
203	1,03	Normal	0,01	Abs
205	0,92	Normal	0,00	Abs
207	1,30	Gain	-0,08	Abs
210	1,20	Gain	-0,01	Abs
212	0,97	Normal	-0,05	Abs
213	1,21	Normal	-0,05	Abs
217	1,20	Gain	-0,09	Abs
218	1,63	Gain	0,04	Abs
224	0,98	Normal	0,00	Abs
229	1,18	Normal	-0,04	Abs
237	1,16	Normal	-0,10	Abs
238	1,07	Normal	0,15	Abs
239	1,02	Normal	-0,08	Abs
240	1,08	Normal	0,01	Abs
251	0,98	Normal	-0,08	Abs
252	1,31	Gain	-0,07	Abs
254	1,08	Normal	-0,01	Abs
256	0,86	Normal	0,05	Abs
264	1,04	Normal	0,13	Abs
267	0,95	Normal	-0,05	Abs
269	0,68	Loss	0,15	Abs
273	0,80	Loss	-0,07	Abs
276	1,08	Normal	-0,03	Abs
360	1,07	Normal	-0,09	Abs
362	0,95	Normal	-0,10	Abs
368	1,20	Normal	-0,08	Abs
370	1,72	Gain	-0,05	Abs

TAULA A10. Dades de MS-MLPA. Resum de les alteracions de número de còpies i de metilació. S'indiquen els valors promig de totes les sondes i la conclusió final en cada cas. Abs:absent.

Tumor	Copy number		Methylation	
374	1,01	Normal	-0,06	Abs
388	1,08	Normal	0,11	Abs
471	1,05	Normal	0,09	Abs
474	1,18	Normal	-0,04	Abs
478	0,90	Normal	-0,04	Abs
482	1,12	Normal	-0,05	Abs
490	1,12	Normal	-0,03	Abs
495	1,03	Normal	0,12	Abs
847	1,12	Normal	0,26	Mild
857	0,77	Loss	0,11	Abs
901	0,99	Normal	0,01	Abs
915	0,96	Normal	-0,01	Abs
943	1,06	Normal	-0,01	Abs
958	1,26	Gain	0,00	Abs
961	1,03	Normal	0,08	Abs
975	1,14	Normal	0,03	Abs
978	1,19	Normal	-0,01	Abs
1101	1,03	Normal	0,00	Abs
1375	1,01	Normal	-0,01	Abs
1529	0,79	Loss (deletion E4-E23)	0,06	Abs
1631	1,10	Normal	-0,02	Abs
1642	0,97	Normal	0,03	Abs
1681	0,79	Loss (deletion E3-E23)	0,05	Abs
1928	1,07	Normal	0,00	Abs
1953	0,91	Normal	0,04	Abs
2022	0,96	Normal	0,03	Abs
0_6AXp1A	0,46	Loss	0,01	Abs
T1	1,37	Gain	0,05	Abs
T10	1,05	Normal	0,00	Abs
T11	1,15	Normal	0,05	Abs
T12	1,24	Gain	0,01	Abs
T13	1,15	Normal	0,02	Abs
T14	0,91	Normal	-0,02	Abs
T15	1,03	Normal	0,00	Abs
T16	0,96	Normal	0,02	Abs
T17	0,95	Normal	0,02	Abs
T18	0,98	Normal	0,04	Abs
T19	0,85	Normal	0,00	Abs
T2	1,02	Normal	0,01	Abs
T20	1,09	Normal	-0,02	Abs
T21	0,84	Normal	0,01	Abs
T22	1,02	Normal	0,02	Abs
T23	0,88	Normal	0,04	Abs
T25	1,30	Gain	0,01	Abs
T3	0,88	Normal	0,09	Abs
T5	0,97	Normal	0,06	Abs
T9	1,11	Normal	0,02	Abs

TAULA A10. Dades de MS-MLPA. Resum de les alteracions de número de còpies i de metilació. S'indiquen els valors promig de totes les sondes i la conclusió final en cada cas. Abs:absent.

GeneName	Fold change-Mock/wild	Fold change-Mutant/wild	Systematic Name
IGFBP7	-8,25	-1,88	NM_001553
C15orf48	-5,60	-3,26	NM_032413
ABCA3	-3,79	-1,83	NM_001089
FBLN1	-3,53	-2,00	NM_006486
GLIS1	-3,41	-3,62	NM_147193
PLA2G4C	-3,12	-2,30	NM_003706
ODZ2	-2,93	-3,33	NM_001122679
SLC22A18	-2,88	-1,95	NM_183233
FBXO32	-2,84	-3,00	NM_058229
RAMP1	-2,82	-6,16	NM_005855
EVL	-2,80	-4,11	NM_016337
CAMK1D	-2,75	-1,56	NM_153498
COL5A1	-2,75	-2,28	NM_000093
OSBPL5	-2,74	-2,31	NM_020896
NLRP5	-2,68	-2,88	NM_153447
C3	-2,63	-2,99	NM_000064
NTNG2	-2,62	-2,61	NM_032536
CXCL1	-2,56	-1,90	NM_001511
PAQR6	-2,54	-1,82	NM_024897
LOC283050	-2,46	-2,42	NR_024431
ODF3B	-2,42	-1,80	NM_001014440
C7orf52	-2,37	-1,95	NM_198571
PTPRU	-2,31	-1,96	NM_005704
AIG1	-2,30	-2,25	NM_016108
C9orf9	-2,30	-1,93	NM_018956
GNG4	-2,27	-2,24	NM_001098722
TNFRSF8	-2,23	-2,17	NM_001243
GFPT2	-2,19	-2,58	NM_005110
FOXB2	-2,18	-2,33	NM_001013735
TLE2	-2,16	-1,97	NM_003260
RIPK4	-2,12	-2,30	NM_020639
VCAM1	-2,09	-2,07	NM_001078
ARL4C	-2,08	-1,72	NM_005737
ENPP1	-2,07	-2,44	NM_006208
LHX1	-2,06	-1,77	NM_005568
KCNAB2	-2,04	-1,54	NM_003636
OSCP1	-2,04	-1,61	NM_145047
PDE2A	-2,03	-1,74	NM_002599
CASP4	-2,02	-1,91	NM_033306
ASS1	-2,01	-1,97	NM_000050
VEGF	-2,01	-1,95	NM_003378
LOC100129534	-2,01	-1,86	NR_024489
FNDC4	-1,99	-1,91	NM_022823
KIR2DS2	-1,98	-1,96	NM_012312
CXCL2	-1,97	-2,00	NM_002089
DRD4	-1,97	-1,93	NM_000797
NLRP3	-1,96	-1,99	NM_001079821
IQSEC2	-1,95	-2,03	NM_015075
PPAPDC3	-1,93	-2,00	NM_032728
GRK5	-1,93	-1,91	NM_005308
LOC100508196	-1,91	-1,86	XR_111691
CHD5	-1,90	-1,96	NM_015557
LOC100652793	-1,89	-1,67	XR_132879
FOXF1	-1,88	-1,80	NM_001451
ZC3H12A	-1,86	-1,61	NM_025079
TWIST2	-1,85	-2,00	BC103755
GATM	-1,85	-2,50	NM_001482
CD70	-1,84	-1,62	NM_001252
NAV1	-1,84	-1,51	NM_020443
EFR3B	-1,83	-1,91	NM_014971

TAULA A11. Gens de la signatura de *PARD3* regulats a l'alça.

GeneName	Fold change-Mock/wild	Fold change-Mutant/wild	Systematic Name
XLOC_011068	-1,82	-1,72	TCONS_00022788
HSPA12A	-1,81	-3,00	NM_025015
IL6	-1,81	-1,46	NM_000600
FUCA1	-1,80	-2,32	NM_000147
TLE6	-1,80	-1,71	NM_001143986
GRP	-1,79	-1,91	NM_002091
WIP1	-1,78	-1,92	NM_017983
CASP5	-1,77	-1,80	NM_004347
LOC100506930	-1,77	-1,51	NR_038279
RORA	-1,76	-1,78	NM_134260
XLOC_I2_002761	-1,75	-1,82	TCONS_I2_00005178
XLOC_I2_005517	-1,75	-1,82	THC2630320
CD82	-1,75	-1,52	NM_002231
MOCOS	-1,74	-1,97	NM_017947
AQP1	-1,74	-1,74	NM_198098
PIGZ	-1,74	-1,72	NM_025163
TMEM171	-1,72	-1,67	NM_173490
MIOX	-1,72	-1,65	NM_017584
DEAF1	-1,72	-1,51	NM_021008
CLIC2	-1,72	-2,23	NM_001289
LOC255512	-1,72	-1,90	NR_029409
IL8	-1,71	-2,33	NM_000584
NCR3	-1,70	-1,87	NM_147130
ICAM2	-1,70	-3,59	NM_000873
GPR68	-1,70	-1,51	NM_003485
HTATIP2	-1,70	-1,88	NM_006410
COL13A1	-1,70	-1,59	NM_080801
ARHGEF10L	-1,69	-2,24	NM_018125
GALC	-1,69	-2,31	NM_000153
ATG16L2	-1,68	-1,60	NM_033388
KIF26B	-1,68	-1,56	NM_018012
SUPT3H	-1,67	-1,69	NM_181356
XLOC_010244	-1,67	-1,66	TCONS_00020981
PLA2G4A	-1,66	-2,11	NM_024420
NOG	-1,66	-1,70	NM_005450
SLC22A7	-1,66	-1,61	NM_153320
CD8A	-1,65	-1,51	NM_001768
HBG1	-1,65	-1,94	NM_000559
XLOC_I2_013513	-1,65	-1,81	ENST00000415536
IFI140	-1,65	-1,53	NM_014714
XLOC_011064	-1,65	-2,14	ENST00000555771
SYCE3	-1,64	-1,83	NM_001123225
TMEM221	-1,64	-1,64	BC039402
TMEM180	-1,64	-1,55	NM_024789
LAMB2P1	-1,63	-2,53	NR_004405
LOC149351	-1,63	-1,76	XR_132798
SNORD121A	-1,63	-1,52	NR_003685
EREG	-1,62	-1,86	NM_001432
LOC643733	-1,61	-1,88	NR_034079
XLOC_008561	-1,60	-1,73	TCONS_00018283
PRAMEF5	-1,60	-1,50	NM_001013407
ACSS1	-1,59	-1,62	NM_032501
RBKS	-1,59	-1,56	NM_022128
BFSP1	-1,59	-1,81	NM_001195
FOXJ1	-1,57	-1,62	NM_001454
RBM47	-1,57	-2,34	NM_019027
IDH2	-1,57	-1,90	NM_002168
C8orf31	-1,56	-1,58	NM_173687
TNFRSF11B	-1,54	-1,50	NM_002546
TMEM190	-1,54	-1,59	NM_139172

TAULA A11. Gens de la signatura de *PAR3* regulats a l'alça.

GeneName	Fold change-Mock/wild	Fold change-Mutant/wild	Systematic Name
<i>HES5</i>	-1,53	-1,57	NM_001010926
<i>C10orf58</i>	-1,53	-3,29	NM_032333
<i>TMCO4</i>	-1,53	-1,76	NM_181719
<i>MYLK-AS1</i>	-1,52	-1,55	NR_038266
<i>RSPH3</i>	-1,52	-1,65	NM_031924
<i>SERGEF</i>	-1,51	-1,55	NM_012139
<i>SOCS3</i>	-1,47	-1,29	NM_003955

TAULA A11. Gens de la signatura de *PARD3* regulats a l'alça.

GeneName	Fold change-Mock/wild	Fold change-Mutant/wild	Systematic Name
<i>CACNG7</i>	3,61	2,62	NM_031896
<i>TPD52L1</i>	2,81	1,93	NM_001003395
<i>PCDH7</i>	2,71	1,55	NM_002589
<i>VSTM1</i>	2,70	2,54	NM_198481
<i>HECW2</i>	2,70	2,39	NM_020760
<i>CD33</i>	2,09	1,87	NM_001772
<i>ICOSLG</i>	1,91	1,66	ENST00000407780
<i>CFH</i>	1,88	1,72	NM_000186
<i>GPER</i>	1,86	2,89	NM_001039966
<i>ADRB2</i>	1,85	1,91	NM_000024
<i>ITGA4</i>	1,83	1,70	NM_000885
<i>INF2</i>	1,83	1,90	NM_032714
<i>IGFBP3</i>	1,83	1,56	NM_001013398
<i>FIGN</i>	1,82	1,61	ENST00000333129
<i>ANXA3</i>	1,73	1,55	NM_005139
<i>SH3D21</i>	1,72	1,65	ENST00000480549
<i>CFHR3</i>	1,70	1,70	NM_021023
<i>LOC375196</i>	1,60	1,54	NR_028386
<i>ARHGAP23</i>	1,58	1,66	NM_001199417
<i>ABCB6</i>	1,54	1,64	NM_005689
<i>ESR2</i>	1,53	1,53	NM_001437
<i>COBLL1</i>	1,51	1,54	NM_014900

TAULA A12. Gens de la signatura de *PARD3* regulats a la baixa.

DNA NUCLEOTIDE CHANGE	EXON/ INTRON	PROTEIN PREDICTED EFFECT	TYPE	% OF CELL LINES
c.219C>T	E1.85	p.Y73Y	SNP (T=0.25)	39,3
c.37G>C	E1.85	p.D13H	MISSENSE	1,1
c.195A>G	E1.85	p.E65E	SNP	1,1
c. 219C>T	E1.85	p.Y73Y	SNP (T=0.25)	1,1
c.334+14A>C	I1.85	NONE	SNP (C=0.25)	37,2
c.427+32T>C	I2	NONE	SNP (C=0.042)	1,1
c.427+81A>C	I2	NONE	SNP (C=0.167)	25,6
c.428-21G>A	I3	NONE	SNP (A=0.292)	46,5
c.621T>C	E4	p.I207I	SNP	3,5
c.634+81A>G	I4	NONE	SNP	25,6
c.917-93C>T	I6	NONE	SNP	50
c.917-87A>G	I6	NONE	SNP	12,8
c.978G>A	E7	p.M326I	SNP	19,8
c.1019+16C>A	I7	NONE	UV	2,3
c.1118+11G>A	I8	NONE	UV	1,1
c.1425+38-39insAGT	I10	NONE	UV	2,3
c.1425+38-39insACT	I10	NONE	UV	1,1
c.1728G>A	E12	p.T576T	UV	1,1
c.1985+112G>A	I14	NONE	SNP	5,8
c.2109T>C	E15	p.L703L	SNP	2,3
c.2178C>T	E15_UTR	NONE (UTR 3')	SNP	1,1
c.2266G>C	E15_UTR	NONE (UTR 3')	UV	1,1

TAULA A13. Canvis de nucleòtid trobats al gen *PIK3R1*: SNPs, variants de significat biològic desconegut (UV) i mutacions. Se'n detalla la freqüència trobada en les mostres analitzades.

Bibliografia

- Ali, I.U., Schriml, L.M., and Dean, M. (1999). Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1922–1932.
- 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.
- Aranda, V., Haire, T., Nolan, M.E., Calarco, J.P., Rosenberg, A.Z., Fawcett, J.P., Pawson, T., and Muthuswamy, S.K. (2006). Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1235–1245.
- Arnaldez, F.I., and Helman, L.J. (2012). Targeting the insulin growth factor receptor 1. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *26*, 527–42, vii–viii.
- Arteaga, C.L., and Engelman, J.A. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* *25*, 282–303.
- 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.
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, a, Flanagan, a, Teague, J., Futreal, P. a, Stratton, M.R., et al. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* *91*, 355–358.
- Barcia, C., Ros, C.M., Annese, V., Carrillo-de Sauvage, M.A., Ros-Bernal, F., Gómez, A., Yuste, J.E., Campuzano, C.M., de Pablos, V., Fernandez-Villalba, E., et al. (2012). ROCK/Cdc42-mediated microglial motility and gliapse formation lead to phagocytosis of degenerating dopaminergic neurons in vivo. *Sci. Rep.* *2*, 809.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Gregory, V., Sonkin, D., et al. (2012). NIH Public Access of anticancer drug sensitivity. *483*, 603–607.
- Belinsky, S.A. (2004). Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 707–717.
- Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 11891–11896.
- Benton, R., and Johnston, D.S. (2003). A Conserved Oligomerization Domain in *Drosophila* Bazooka / PAR-3 Is Important for Apical Localization and Epithelial Polarity. *13*, 1330–1334.
- Bergethon, K., Shaw, A.T., Ignatius Ou, S.-H., Katayama, R., Lovly, C.M., McDonald, N.T., Massion, P.P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., et al. (2012). ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J. Clin. Oncol.* *30*, 863–870.
- Berishaj, M., Gao, S.P., Ahmed, S., Leslie, K., Al-Ahmadie, H., Gerald, W.L., Bornmann, W., and Bromberg, J.F. (2007). Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *9*, R32.
- Bernardes de Jesus, B., and Blasco, M.A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* *29*, 513–520.
- Bid, H.K., Roberts, R.D., Manchanda, P.K., and Houghton, P.J. (2013). RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 1925–1934.
- Bignell, G.R., Greenman, C.D., Davies, H., Butler, A.P., Edkins, S., Andrews, J.M., Buck, G., Chen, L., Beare, D., Latimer, C., et al. (2010). Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* *463*, 893–898.

Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev.* *18*, 1909–1925.

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.

Bota, S., Auliac, J.B., Paris, C., Métayer, J., Sesboué, R., Nouvet, G., and Thiberville, L. (2001). Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 1688–1693.

Brachmann, S.M., Ueki, K., Engelman, J.A., Kahn, R.C., and Cantley, L.C. (2005). Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1596–1607.

Braga, V.M., and Yap, A.S. (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 466–474.

Breuer, R.H., Pasic, A., Smit, E.F., van Vliet, E., Vonk Noordegraaf, A., Risse, E.J., Postmus, P.E., and Sutedja, T.G. (2005). The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium. *Clin. Cancer Res.* *11*, 537–543.

Brzezińska, E., Dutkowska, A., and Antczak, A. (2013). The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol. Biol. Rep.* *40*, 309–325.

Bunney, T.D., and Katan, M. (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 342–352.

Campbell, P.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., O’Meara, S., Li, H., Santarius, T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Hardy, C., et al. (2008). Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat. Genet.* *40*, 722–729.

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.

Carretero, J., Medina, P.P., Blanco, R., Smit, L., Tang, M., Roncador, G., Maestre, L., Conde, E., Lopez-Rios, F., Clevers, H.C., et al. (2007). Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. *Oncogene* *26*, 1616–1625.

Castillo, S.D., and Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* *16*, 903–919.

Castillo, S.D., Matheu, A., Mariani, N., Carretero, J., Lopez-Rios, F., Lovell-Badge, R., and Sanchez-Cespedes, M. (2012). Novel transcriptional targets of the SRY-HMG box transcription factor SOX4 link its expression to the development of small cell lung cancer. *Cancer Res.* *72*, 176–186.

Cavatorta, A.L., Fumero, G., Chouhy, D., Aguirre, R., Nocito, A.L., Giri, A.A., Banks, L., and Gardiol, D. (2004). Differential expression of the human homologue of *Drosophila* discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy. *Int. J. Cancer* *111*, 373–380.

Chagpar, R.B., Links, P.H., Pastor, M.C., Furber, L.A., Hawrysh, A.D., Chamberlain, M.D., and Anderson, D.H. (2010). Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5471–5476.

Chai, H., and Brown, R.E. (2009). Field Effect in Cancer-An Update. *Ann. Clin. Lab. Sci.* *39*, 331–337.

Chang, F., Lemmon, C.A., Park, D., and Romer, L.H. (2007). FAK Potentiates Rac1 Activation and Localization to Matrix Adhesion Sites : A Role for NL PIX . *18*, 253–264.

- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S.P., Daly, L., Wels, J., Theilen, T., Granitto, S., Zhang, X., et al. (2013). The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia* *15*, 848–862.
- Chauhan, B.K., Lou, M., Zheng, Y., and Lang, R. a (2011). Balanced Rac1 and RhoA activities regulate cell shape and drive invagination morphogenesis in epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18289–18294.
- Chen, Q., and Massagué, J. (2012). Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clin. Cancer Res.* *18*, 5520–5525.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* *7*, 262–269.
- Chen, D., Xing, W., Hong, J., Wang, M., Huang, Y., Zhu, C., Yuan, Y., and Zeng, W. (2012). The beta2-adrenergic receptor is a potential prognostic biomarker for human hepatocellular carcinoma after curative resection. *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 3556–3565.
- Chen, R.-J., Chang, L.W., Lin, P., and Wang, Y.-J. (2011). Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. *J. Oncol.* *2011*, 654931.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3636–3641.
- Cheung, L.W.T., Hennessy, B.T., Li, J., Yu, S., Myers, A.P., Djordjevic, B., Lu, Y., Stemke-Hale, K., Dyer, M.D., Zhang, F., et al. (2011). High Frequency of PIK3R1 and PIK3R2 Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability. *Cancer Discov.* *1*, 170–185.
- Choi, Y.L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., et al. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors.
- Cizkova, M., Vacher, S., Meseure, D., Trassard, M., Susini, A., Mlcuchova, D., Callens, C., Rouleau, E., Spyrtos, F., Lidereau, R., et al. (2013). PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer* *13*, 545.
- Coffa, J., Van De Wiel, M.A., Diosdado, B., Carvalho, B., Schouten, J., and Meijer, G.A. (2008). MLPAlyzer: Data analysis tool for reliable automated normalization of MLPA fragment data. *Cell. Oncol.* *30*, 323–335.
- Cohen, E.E.W., Lingen, M.W., Zhu, B., Zhu, H., Straza, M.W., Pierce, C., Martin, L.E., and Rosner, M.R. (2006). Protein kinase C zeta mediates epidermal growth factor-induced growth of head and neck tumor cells by regulating mitogen-activated protein kinase. *Cancer Res.* *66*, 6296–6303.
- Cooper, W. a, Lam, D.C.L., O’Toole, S. a, and Minna, J.D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *J. Thorac. Dis.* *5*, S479–S490.
- Couto, J.P., Daly, L., Almeida, A., Knauf, J. a, Fagin, J. a, Sobrinho-Simões, M., Lima, J., Máximo, V., Soares, P., Lyden, D., et al. (2012). STAT3 negatively regulates thyroid tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2361–70.
- D’Avino, P.P., Savoian, M.S., and Glover, D.M. (2004). Mutations in sticky lead to defective organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J. Cell Biol.* *166*, 61–71.
- Dabir, S., Kluge, A., and McColl, K. (2013). PIAS3 activates the intrinsic apoptotic pathway in non-small cell lung cancer cells independent of p53 status. *J. Cancer.*
- Dang, C. V (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* *149*, 22–35.
- Dauer, D.J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R., and Haura, E.B. (2005). Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* *24*, 3397–3408.

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.

Delva, E., Tucker, D.K., and Kowalczyk, A.P. (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a002543.

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.

Dolberg, D.S., and Bissell, M.J. (1984). Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* *309*, 552–556.

Dow, L.E., Elsum, I. a, King, C.L., Kinross, K.M., Richardson, H.E., and Humbert, P.O. (2008). Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling. *Oncogene* *27*, 5988–6001.

Drake, C.G., Jaffee, E., and Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol.* *90*, 51–81.

Eder, A.M., Sui, X., Rosen, D.G., Nolden, L.K., Cheng, K.W., Lahad, J.P., Kango-Singh, M., Lu, K.H., Warneke, C.L., Atkinson, E.N., et al. (2005). Atypical PKC δ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 12519–12524.

Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* *30*, 207–210.

el-Azouzi, M., Chung, R.Y., Farmer, G.E., Martuza, R.L., Black, P.M., Rouleau, G.A., Hettlich, C., Hedley-Whyte, E.T., Zervas, N.T., and Panagopoulos, K. (1989). Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7186–7190.

Elf, S.E., and Chen, J. (2014). Targeting glucose metabolism in patients with cancer. *Cancer* *120*, 774–780.

Ellenbroek, S.I.J., Iden, S., and Collard, J.G. (2012). Cell polarity proteins and cancer. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 208–215.

Engelman, J. a, Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 606–619.

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.

Espina, C., Céspedes, M.V., García-Cabezas, M.A., Gómez del Pulgar, M.T., Boluda, A., Oroz, L.G., Benitah, S.A., Cejas, P., Nistal, M., Mangués, R., et al. (2008). A critical role for Rac1 in tumor progression of human colorectal adenocarcinoma cells. *Am. J. Pathol.* *172*, 156–166.

Essegir, S., Reis-filho, J.S., Kennedy, A., James, M., Hare, M.J.O., Jeffery, R., Poulosom, R., and Isacke, C.M. (2006). Identification of transmembrane proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets in breast cancer by a screen for signal sequence encoding transcripts. 420–430.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1148–1159.

Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* *59*, 793–797.

Fang, C.M., and Xu, Y.H. (2001). Down-regulated expression of atypical PKC-binding domain deleted asip isoforms in human hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* *11*, 223–229.

- Faruqi, T.R., Gomez, D., Bustelo, X.R., Bar-Sagi, D., and Reich, N.C. (2001). Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9014–9019.
- Fass, J., Gehler, S., Sarmiere, P., Letourneau, P., and Bamburg, J.R. (2004). Regulating filopodial dynamics through actin-depolymerizing factor/cofilin. *Anat. Sci. Int.* *79*, 173–183.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* *49*, 1374–1403.
- Fields, A.P., and Regala, R.P. (2007). Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol. Res.* *55*, 487–497.
- Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, a, Flanagan, a, Teague, J., Wooster, R., Futreal, P. a, et al. (2006). Cosmic 2005. *Br. J. Cancer* *94*, 318–322.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* *323*, 643–646.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R., and Stratton, M.R. (2001). Cancer and genomics. *Nature* *409*, 850–852.
- Gao, L., Macara, I.G., and Joberty, G. (2002). Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene* *294*, 99–107.
- García, Z., Silio, V., Marqués, M., Cortés, I., Kumar, A., Hernandez, C., Checa, A.I., Serrano, A., and Carrera, A.C. (2006). A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *EMBO J.* *25*, 4740–4751.
- Gardioli, D., Zacchi, A., Petrera, F., Stanta, G., and Banks, L. (2006). Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int. J. Cancer* *119*, 1285–1290.
- Gazdar, A.F., and Brambilla, E. (2012). Preneoplasia of lung cancer. *Transl. Pathol. Early Cancer* 385–396.
- Georgiou, M., and Baum, B. (2010). Polarity proteins and Rho GTPases cooperate to spatially organise epithelial actin-based protrusions. *J. Cell Sci.* *123*, 1089–1098.
- Go, H., Jeon, Y.K., Park, H.J., Sung, S.-W., Seo, J.-W., and Chung, D.H. (2010). High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* *5*, 305–313.
- Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a002576.
- Gopalakrishnan, S., Hallett, M.A., Atkinson, S.J., and Marrs, J.A. (2007). aPKC-PAR complex dysfunction and tight junction disassembly in renal epithelial cells during ATP depletion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *292*, C1094–C1102.
- Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N.D., Kanchi, K.L., Maher, C.A., Fulton, R., Fulton, L., Wallis, J., et al. (2012). Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* *150*, 1121–1134.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* *446*, 153–158.
- Grifoni, D., Garoia, F., Schimanski, C.C., Schmitz, G., Laurenti, E., Galle, P.R., Pession, A., Cavicchi, S., and Strand, D. (2004). The human protein Hugel-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo. *Oncogene* *23*, 8688–8694.

- Hammerman, P.S., Sos, M.L., Ramos, A.H., Xu, C., Dutt, A., Zhou, W., Brace, L.E., Woods, B. a, Lin, W., Zhang, J., et al. (2011). Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* *1*, 78–89.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Kaye, F.J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* *241*, 353–357.
- Hartmann, B., and Valcárcel, J. (2009). Decrypting the genome’s alternative messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 377–386.
- Hartwell, L.H. (1997). Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science* (80-.). *278*, 1064–1068.
- Hecht, S.S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int. J. Cancer* *131*, 2724–2732.
- Hecht, S.S., and Hoffmann, D. (1988). Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* *9*, 875–884.
- Heist, R.S., Sequist, L. V, and Engelman, J.A. (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J. Thorac. Oncol.* *7*, 924–933.
- Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2042–2054.
- Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H.D., Gutierrez, E., and Hegde, R.S. (2011). Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* *475*, 394–397.
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinska, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., de Jong, S., Jonkers, J., Maelandsmo, G.M., et al. (2014). Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov.* *4*, 998–1013.
- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S.I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B., and Sahai, E. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* *13*, 49–58.
- Hirsch, F.R., Prindiville, S.A., Miller, Y.E., Franklin, W.A., Dempsey, E.C., Murphy, J.R., Bunn, P.A., and Kennedy, T.C. (2001). Fluorescence versus white-light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1385–1391.
- Horikoshi, Y., Suzuki, A., Yamanaka, T., Sasaki, K., Mizuno, K., Sawada, H., Yonemura, S., and Ohno, S. (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J. Cell Sci.* *122*, 1595–1606.
- Hovestadt, V., Jones, D.T.W., Picelli, S., Wang, W., Kool, M., Northcott, P.A., Sultan, M., Stachurski, K., Ryzhova, M., Warnatz, H.-J., et al. (2014). Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. *Nature* *510*, 537–541.
- Huang, L., and Muthuswamy, S.K. (2010). Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 41–50.
- Huang, X.P., Zhou, W.H., and Zhang, Y.F. (2014). Genetic variations in the IGF-IGFR-IGFBP axis confer susceptibility to lung and esophageal cancer. *Genet. Mol. Res.* *13*, 2107–2119.
- Hubaux, R., Becker-Santos, D.D., Enfield, K.S.S., Lam, S., Lam, W.L., and Martinez, V.D. (2012). Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis. *Environ. Health* *11*, 89.

- Hurd, T.W., Gao, L., Roh, M.H., Macara, I.G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat. Cell Biol.* 5, 137–142.
- Iden, S., van Riel, W.E., Schäfer, R., Song, J.-Y., Hirose, T., Ohno, S., and Collard, J.G. (2012). Tumor type-dependent function of the par3 polarity protein in skin tumorigenesis. *Cancer Cell* 22, 389–403.
- Imielinski, M., Berger, A.H., Hammerman, P.S., Hernandez, B., Pugh, T.J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., et al. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 150, 1107–1120.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945.
- Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., et al. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 41, 178–186.
- Ishuchi, T., and Takeichi, M. (2011). Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 13, 860–866.
- Ishizumi, T., McWilliams, A., MacAulay, C., Gazdar, A., and Lam, S. (2010). Natural history of bronchial preinvasive lesions. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 5–14.
- Itoh, N., Nakayama, M., Nishimura, T., Fujisue, S., Nishioka, T., Watanabe, T., and Kaibuchi, K. (2010). Identification of focal adhesion kinase (FAK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) as Par3 partners by proteomic analysis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67, 297–308.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K.J., and Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell Biol.* 143, 95–106.
- Izzi, L., and Attisano, L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* 23, 2071–2078.
- Jaiswal, B.S., Janakiraman, V., Kljavin, N.M., Chaudhuri, S., Stern, H.M., Wang, W., Kan, Z., Dbouk, H. a, Peters, B. a, Waring, P., et al. (2009). Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell* 16, 463–474.
- Januschke, J., and Gonzalez, C. (2008). *Drosophila* asymmetric division, polarity and cancer. *Oncogene* 27, 6994–7002.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.
- Jin, G., Kim, M.J., Jeon, H.S., Choi, J.E., Kim, D.S., Lee, E.B., Cha, S.I., Yoon, G.S., Kim, C.H., Jung, T.H., et al. (2010). PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 69, 279–283.
- Johnson, D.H., Fehrenbacher, L., Novotny, W.F., Herbst, R.S., Nemunaitis, J.J., Jablons, D.M., Langer, C.J., DeVore, R.F., Gaudreault, J., Damico, L.A., et al. (2004). Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 2184–2191.
- Kallergi, G., Agelaki, S., Markomanolaki, H., and Stournaras, C. (2007). Cellular Physiology and Biochemistry Activation of FAK / PI3K / Rac1 Signaling Controls Actin Reorganization and Inhibits Cell Motility in Human Cancer Cells.

- Kálmán, F.S., Lizák, B., Nagy, S.K., Mészáros, T., Zámbo, V., Mandl, J., Csala, M., and Kereszturi, E. (2013). Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. *Biochimie* 95, 1403–1410.
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., et al. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869–873.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517–531.
- Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Fukada, T., Takahashi, N., Nosaka, T., et al. (2009). A Rac GTPase-activating protein, MgcRacGAP, is a nuclear localizing signal-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 29, 1796–1813.
- Kerr, K.M. (2001). Pulmonary preinvasive neoplasia. *J. Clin. Pathol.* 54, 257–271.
- Khalesi, E., Nakamura, H., Leong Lee, K., Chandra Putra, A., Fukazawa, T., Kawahara, Y., Makino, Y., Poellinger, L., Yuge, L., and Tanimoto, K. (2013). The Krüppel-like zinc finger transcription factor, GLI-similar 1, is regulated by hypoxia-inducible factors via non-canonical mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1–14.
- Kloth, M., and Buettner, R. (2014). Changing histopathological diagnostics by genome-based tumor classification. *Genes (Basel)*. 5, 444–459.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.
- Kohno, T., Otsuka, A., Girard, L., Sato, M., Iwakawa, R., Ogiwara, H., Sanchez-Cespedes, M., Minna, J.D., and Yokota, J. (2010). A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 342–352.
- Kojima, Y., Akimoto, K., Nagashima, Y., Ishiguro, H., Shirai, S., Chishima, T., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Sasaki, T., Kubota, Y., et al. (2008). The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum. Pathol.* 39, 824–831.
- Koskela, H.L.M., Eldfors, S., Ellonen, P., van Adrichem, A.J., Kuusanmäki, H., Andersson, E.I., Lagström, S., Clemente, M.J., Olson, T., Jalkanen, S.E., et al. (2012). Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 366, 1905–1913.
- Kunnev, D., Ivanov, I., and Ionov, Y. (2009). Par-3 partitioning defective 3 homolog (*C. elegans*) and androgen-induced prostate proliferative shutoff associated protein genes are mutationally inactivated in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 9, 318.
- Kuphal, S., Wallner, S., Schimanski, C.C., Bataille, F., Hofer, P., Strand, S., Strand, D., and Bosserhoff, A.K. (2006). Expression of Hugel-1 is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 25, 103–110.
- Lal, A., Panos, R., Marjanovic, M., Walker, M., Fuentes, E., Kubicek, G.J., Henner, W.D., Buturovic, L.J., and Halks-Miller, M. (2013). A gene expression profile test to resolve head & neck squamous versus lung squamous cancers. *Diagn. Pathol.* 8, 44.
- Lam, S., MacAulay, C., leRiche, J.C., and Palcic, B. (2000). Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 89, 2468–2473.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.
- Langzam, L., Koren, R., Gal, R., Kugel, V., Paz, A., Farkas, A., and Sampson, S.R. (2001). Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am. J. Clin. Pathol.* *116*, 377–385.
- Larsen, J.E., and Minna, J.D. (2011). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin. Chest Med.* *32*, 703–740.
- Läubli, H., and Borsig, L. (2010). Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenviron.* *3*, 97–105.
- Lee, M., and Vasioukhin, V. (2008). Cell polarity and cancer--cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J. Cell Sci.* *121*, 1141–1150.
- Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.-H., Shong, M., Kim, J.-M., Kim, J., et al. (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* *447*, 1017–1020.
- 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.
- Leong, P.P., Rezai, B., Koch, W.M., Reed, A., Eisele, D., Lee, D., Sidransky, D., Jen, J., and Westra, W.H. (1998). Accelerated Discovery Distinguishing Second Primary Tumors From Lung Metastases in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *90*.
- Li, A.-M., Tian, A.-X., Zhang, R.-X., Ge, J., Sun, X., and Cao, X.-C. (2013). Protocadherin-7 induces bone metastasis of breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *436*, 486–490.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* *275*, 1943–1947.
- Li, Y., Sheu, C.-C., Ye, Y., de Andrade, M., Wang, L., Chang, S.-C., Aubry, M.C., Aakre, J.A., Allen, M.S., Chen, F., et al. (2010). Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. *Lancet Oncol.* *11*, 321–330.
- Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* *61*, 253–270.
- Lin, D., Edwards, a S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *2*, 540–547.
- Lisovsky, M., Dresser, K., Baker, S., Fisher, A., Woda, B., Banner, B., and Lauwers, G.Y. (2009). Cell polarity protein Lgl2 is lost or aberrantly localized in gastric dysplasia and adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* *22*, 977–984.
- Liu, S.-Y., Yen, C.-Y., Yang, S.-C., Chiang, W.-F., and Chang, K.-W. (2004). Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofac. Surg.* *62*, 702–707.
- Low, B.C., Pan, C.Q., Shivashankar, G., Bershadsky, A., Sudol, M., and Sheetz, M. (2014). YAP/ TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Lett.*
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* *432*, 307–315.
- Macaulay, I.C., and Voet, T. (2014). Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet.* *10*, e1004126.

- MacConaill, L.E., Van Hummelen, P., Meyerson, M., and Hahn, W.C. (2011). Clinical implementation of comprehensive strategies to characterize cancer genomes: opportunities and challenges. *Cancer Discov.* *1*, 297–311.
- Mack, N.A., Whalley, H.J., Castillo-Lluva, S., and Malliri, A. (2011). The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* *10*, 1571–1581.
- Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* *474*, 225–229.
- Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., and Buttitta, F. (2011). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3574–3579.
- Martin, T. a, and Jiang, W.G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 872–891.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 23–38.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., and Mostov, K. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* *128*, 383–397.
- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). SIGNALLING TO AND FROM TIGHT JUNCTIONS. *4*.
- McCaffrey, L.M., and Macara, I.G. (2011). Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* *21*, 727–735.
- McCaffrey, L.M., Montalbano, J., Mihai, C., and Macara, I.G. (2012). Loss of the Par3 polarity protein promotes breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Cell* *22*, 601–614.
- McClatchey, A.I., and Yap, A.S. (2012). Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 685–694.
- 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., 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.
- Memisoglu, A., and Samson, L. (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.* *451*, 39–51.
- Mizuno, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kitamura, K., Kutsuzawa, K., Futaki, M., Amano, Y., and Ohno, S. (2003). Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem.* *278*, 31240–31250.
- Mogi, A., and Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*.
- Morais-de-Sá, E., Mirouse, V., and St Johnston, D. (2010). aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell* *141*, 509–523.
- Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D.N., and Ku, C.-S. (2011). Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum. Genomics* *5*, 577–622.
- Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., and Taketani, Y. (2004). Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br. J. Cancer* *90*, 194–199.

- Nakayama, M., Goto, T.M., Sugimoto, M., Nishimura, T., Shinagawa, T., Ohno, S., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2008). Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev. Cell* *14*, 205–215.
- Nehls, K., Vinokurova, S., Schmidt, D., Kommos, F., Reuschenbach, M., Kisseljov, F., Einkenkel, J., von Knebel Doeberitz, M., and Wentzensen, N. (2008). p16 methylation does not affect protein expression in cervical carcinogenesis. *Eur. J. Cancer* *44*, 2496–2505.
- Nevins, J.R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 699–703.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 274–284.
- Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., and Muller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* *170*, 3263–3272.
- Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2525–2532.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* *5*, 236–241.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M., and Kaibuchi, K. (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat. Cell Biol.* *7*, 270–277.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* *368*, 753–756.
- Nolan, M.E., Aranda, V., Lee, S., Lakshmi, B., Basu, S., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2008). The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 8201–8209.
- Noske, A., Kaszubiak, A., Weichert, W., Sers, C., Niesporek, S., Koch, I., Schaefer, B., Sehoul, J., Dietel, M., Lage, H., et al. (2007). Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer Lett.* *246*, 190–200.
- Nygren, A.O.H., Ameziane, N., Duarte, H.M.B., Vijzelaar, R.N.C.P., Waisfisz, Q., Hess, C.J., Schouten, J.P., and Errami, A. (2005). Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): Simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1–9.
- O'Brien, L.E., Jou, T.S., Pollack, A.L., Zhang, Q., Hansen, S.H., Yurchenco, P., and Mostov, K.E. (2001). Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat. Cell Biol.* *3*, 831–838.
- Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., and Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* *51*, 146–153.
- Ouyang, Z., Zhan, W., and Dan, L. (2010). hScrib, a human homolog of *Drosophila* neoplastic tumor suppressor, is involved in the progress of endometrial cancer. *Oncol. Res.* *18*, 593–599.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* *307*, 1603–1609.
- Paez, J.G., Jänne, 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.
- Paget, S. (1889). THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet* *133*, 571–573.

Palmisano, W.A., Divine, K.K., Saccomanno, G., Gilliland, F.D., Baylin, S.B., Herman, J.G., and Belinsky, S.A. (2000). Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* *60*, 5954–5958.

Palmisano, W.A., Crume, K.P., Grimes, M.J., Winters, S.A., Toyota, M., Esteller, M., Joste, N., Baylin, S.B., and Belinsky, S.A. (2003). Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res.* *63*, 4620–4625.

Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13306–13311.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.

Parsons, L.M., Grzeschik, N.A., Allott, M.L., and Richardson, H.E. (2010). Lgl/aPKC and Crb regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway. *Fly (Austin)*. *4*, 288–293.

Pearson, H.B., Perez-Mancera, P.A., Dow, L.E., Ryan, A., Tennstedt, P., Bogani, D., Elsum, I., Greenfield, A., Tuveson, D.A., Simon, R., et al. (2011). SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J. Clin. Invest.* *121*, 4257–4267.

Pecornio (2008). *Molecular Biology of Cancer* (New York).

Pegtel, D.M., Ellenbroek, S.I.J., Mertens, A.E.E., van der Kammen, R.A., de Rooij, J., and Collard, J.G. (2007). The Par-Tiam1 Complex Controls Persistent Migration by Stabilizing Microtubule-Dependent Front-Rear Polarity. *Curr. Biol.* *17*, 1623–1634.

Petros, W.P., Younis, I.R., Ford, J.N., and Weed, S.A. (2012). Effects of tobacco smoking and nicotine on cancer treatment. *Pharmacotherapy* *32*, 920–931.

Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., and Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* *21*, 7435–7451.

Philp, A.J., Campbell, I.G., Leet, C., Vincan, E., Rockman, S.P., Whitehead, R.H., Thomas, R.J., and Phillips, W.A. (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* *61*, 7426–7429.

Plant, P.J., Fawcett, J.P., Lin, D.C.C., Holdorf, A.D., Binns, K., Kulkarni, S., and Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat. Cell Biol.* *5*, 301–308.

Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1057–1068.

Pros, E., Lantuejoul, S., Sanchez-Verde, L., Castillo, S.D., Bonastre, E., Suarez-Gauthier, A., Conde, E., Cigudosa, J.C., Lopez-Rios, F., Torres-Lanzas, J., et al. (2013). Determining the profiles and parameters for gene amplification testing of growth factor receptors in lung cancer. *Int. J. Cancer* *133*, 898–907.

Quayle, S.N., Lee, J.Y., Cheung, L.W.T., Ding, L., Wiedemeyer, R., Dewan, R.W., Huang-Hobbs, E., Zhuang, L., Wilson, R.K., Ligon, K.L., et al. (2012). Somatic mutations of PIK3R1 promote gliomagenesis. *PLoS One* *7*, e49466.

Quintás-Cardama, A., and Verstovsek, S. (2013). Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1933–1940.

Raptis, L., Arulanandam, R., Geletu, M., and Turkson, J. (2011). The R(h)oads to Stat3: Stat3 activation by the Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* *317*, 1787–1795.

Regala, R.P., Weems, C., Jamieson, L., Khor, A., Edell, E.S., Lohse, C.M., and Fields, A.P. (2005). Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* *65*, 8905–8911.

- Rehman, F.L., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2010). Synthetic lethal approaches to breast cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *7*, 718–724.
- Riely, G.J., Kris, M.G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D.A., Nafa, K., Riedel, E.R., Hsu, M., Pao, W., et al. (2008). Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5731–5734.
- Rodenhuis, S., and Slebos, R.J. (1992). Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res.* *52*, 2665s–2669s.
- Rodriguez-Nieto, S., and Sanchez-Cespedes, M. (2009). BRG1 and LKB1: Tales of two tumor suppressor genes on chromosome 19p and lung cancer. *Carcinogenesis* *30*, 547–554.
- Rodriguez-Nieto, S., Cañada, A., Pros, E., Pinto, A.I., Torres-Lanzas, J., Lopez-Rios, F., Sanchez-Verde, L., Pisano, D.G., and Sanchez-Cespedes, M. (2011). Massive parallel DNA pyrosequencing analysis of the tumor suppressor BRG1/SMARCA4 in lung primary tumors. *Hum. Mutat.* *32*, E1999–2017.
- Rodríguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* *17*, 330–339.
- Romero, O. a, Torres-Diz, M., Pros, E., Savola, S., Gomez, A., Moran, S., Saez, C., Iwakawa, R., Villanueva, A., Montuenga, L.M., et al. (2014). MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC-SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. *Cancer Discov.* *4*, 292–303.
- Romero, O.A., Setien, F., John, S., Gimenez-Xavier, P., Gómez-López, G., Pisano, D., Condom, E., Villanueva, A., Hager, G.L., and Sanchez-Cespedes, M. (2012). The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. *EMBO Mol. Med.* *4*, 603–616.
- Ross, J.S., and Cronin, M. (2011). Whole cancer genome sequencing by next-generation methods. *Am. J. Clin. Pathol.* *136*, 527–539.
- Ross, R.L., Burns, J.E., Taylor, C.F., Mellor, P., Anderson, D.H., and Knowles, M. a (2013). Identification of mutations in distinct regions of p85 alpha in urothelial cancer. *PLoS One* *8*, e84411.
- Rothenberg, S.M., Mohapatra, G., Rivera, M.N., Winokur, D., Greninger, P., Nitta, M., Sadow, P.M., Sooriyakumar, G., Brannigan, B.W., Ulman, M.J., et al. (2010). A genome-wide screen for microdeletions reveals disruption of polarity complex genes in diverse human cancers. *Cancer Res.* *70*, 2158–2164.
- Saeed, I., and Anderson, J. (2011). Cancer of the lung: staging, radiology, surgery. *Surg.* *29*, 221–226.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 133–142.
- 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.
- Samuels, Y., Diaz, L.A., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., DeLong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., et al. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* *7*, 561–573.
- Sánchez, M.J., Payer, T., De Angelis, R., Larrañaga, N., Capocaccia, R., and Martinez, C. (2010). Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann. Oncol.* *21 Suppl 3*, iii30–36.
- Sanchez-Cespedes, M. (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* *40*, 111–121.
- 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.

- Sasaki, T., Koivunen, J., Ogino, A., Yanagita, M., Nikiforow, S., Zheng, W., Lathan, C., Marcoux, J.P., Du, J., Okuda, K., et al. (2011). A Novel ALK Secondary Mutation and EGFR Signaling Cause Resistance to ALK Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* *71*, 6051–6060.
- Sathyanarayana, U.G., Toyooka, S., Padar, A., Takahashi, T., Brambilla, E., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. (2003). Epigenetic inactivation of laminin-5-encoding genes in lung cancers. *Clin. Cancer Res.* *9*, 2665–2672.
- Scagliotti, G., Hanna, N., Fossella, F., Sugarman, K., Blatter, J., Peterson, P., Simms, L., and Shepherd, F.A. (2009). The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *Oncologist* *14*, 253–263.
- Schimanski, C.C., Schmitz, G., Kashyap, A., Bosserhoff, A.K., Bataille, F., Schäfer, S.C., Lehr, H.A., Berger, M.R., Galle, P.R., Strand, S., et al. (2005). Reduced expression of HUGL-1, the human homologue of *Drosophila* tumour suppressor gene *Igl*, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene* *24*, 3100–3109.
- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *286*, C1213–C1228.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* *30*, e57.
- Schumann, M., Günzel, D., Buegel, N., Richter, J.F., Troeger, H., May, C., Fromm, A., Sorgenfrei, D., Daum, S., Bojarski, C., et al. (2012). Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease. *Gut* *61*, 220–228.
- Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* *116*, 235–246.
- Shi, M., Yang, Z., Hu, M., Liu, D., Hu, Y., Qian, L., Zhang, W., Chen, H., Guo, L., Yu, M., et al. (2013). Catecholamine-Induced β 2-adrenergic receptor activation mediates desensitization of gastric cancer cells to trastuzumab by upregulating MUC4 expression. *J. Immunol.* *190*, 5600–5608.
- Shields, P.G. (2002). Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* *21*, 6870–6876.
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Eby, M.T., Huang, C.X., Sathyanarayana, U.G., Cunningham, H.T., Reddy, J.L., Brambilla, E., Takahashi, T., Minna, J.D., et al. (2002). Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol. Ther.* *1*, 65–69.
- Simon, a. R. (2000). Regulation of STAT3 by Direct Binding to the Rac1 GTPase. *Science* (80-.). *290*, 144–147.
- 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.
- Sotillos, S., Krahn, M., Espinosa-Vázquez, J.M., and Hombría, J.C.-G. (2013). Src kinases mediate the interaction of the apical determinant Bazooka/PAR3 with STAT92E and increase signalling efficiency in *Drosophila* ectodermal cells. *Development* *140*, 1507–1516.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., et al. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.* *15*, 356–362.
- Steels, E., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Lemaitre, F., Mascaux, C., Meert, A.P., Vallot, F., Lafitte, J.J., and Sculier, J.P. (2001). Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *18*, 705–719.
- Steinman, R. a, Wentzel, A., Lu, Y., Stehle, C., and Grandis, J.R. (2003). Activation of Stat3 by cell confluence reveals negative regulation of Stat3 by cdk2. *Oncogene* *22*, 3608–3615.

- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* *431*, 525–526.
- Sullivan, J.P., Minna, J.D., and Shay, J.W. (2010). Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 61–72.
- Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 778–790.
- Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D.H., and Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* *17*, 89–97.
- Takeuchi, K., Choi, Y.L., Togashi, Y., Soda, M., Hatano, S., Inamura, K., Takada, S., Ueno, T., Yamashita, Y., Satoh, Y., et al. (2009). KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinin identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3143–3149.
- Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., Asaka, R., Hamanaka, W., Ninomiya, H., Uehara, H., et al. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat. Med.* *18*, 378–381.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* *70*, 5649–5669.
- Tanaka, T., and Ishigamori, R. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J. Oncol.* *2011*, 603740.
- Taniguchi, C.M., Aleman, J.O., Ueki, K., Luo, J., Asano, T., Kaneto, H., Stephanopoulos, G., Cantley, L.C., and Kahn, C.R. (2007). The p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase potentiates c-Jun N-terminal kinase-mediated insulin resistance. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2830–2840.
- Taniguchi, C.M., Winnay, J., Kondo, T., Bronson, R.T., Guimaraes, A.R., Alemán, J.O., Luo, J., Stephanopoulos, G., Weissleder, R., Cantley, L.C., et al. (2010). The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res.* *70*, 5305–5315.
- TCGA (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* *489*, 519–525.
- Thorgeirsson, T.E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K.P., Manolescu, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Ingason, A., et al. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* *452*, 638–642.
- Timme, S., Ihde, S., Fichter, C.D., Waehle, V., Bogatyreva, L., Atanasov, K., Kohler, I., Schöpflin, a, Geddert, H., Faller, G., et al. (2013). STAT3 expression, activity and functional consequences of STAT3 inhibition in esophageal squamous cell carcinomas and Barrett's adenocarcinomas. *Oncogene* *1*–11.
- Travis, W.D. (2011). Classification of lung cancer. *Semin. Roentgenol.* *46*, 178–186.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., et al. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* *6*, 244–285.
- Travis, W.D., Brambilla, E., and Riely, G.J. (2013). New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.* *31*, 992–1001.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, H.C. (2004). Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. *IARC Pres* *10*, 1–344.
- Tsai, J.H., Hsieh, Y.S., Kuo, S.J., Chen, S.T., Yu, S.Y., Huang, C.Y., Chang, A.C., Wang, Y.W., Tsai, M.T., and Liu, J.Y. (2000). Alteration in the expression of protein kinase C isoforms in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *161*, 171–175.

- Tsujiuchi, T., Sasaki, Y., Tsutsumi, M., and Konishi, Y. (2000). Mutations of the Smad2 and Smad4 genes in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol. Carcinog.* *29*, 87–91.
- Uchida, K., Nagatake, M., Osada, H., Yatabe, Y., Kondo, M., Mitsudomi, T., Masuda, A., and Takahashi, T. (1996). Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* *56*, 5583–5585.
- Uhlirova, M., Jasper, H., and Bohmann, D. (2005). Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13123–13128.
- Vahtomeri, K., and Mäkelä, T.P. (2011). Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS Lett.* *585*, 944–951.
- Vachani, A., Nebozhyn, M., Singhal, S., Alila, L., Wakeam, E., Muschel, R., Powell, C. a, Gaffney, P., Singh, B., Brose, M.S., et al. (2007). A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2905–2915.
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M.R., and Regamey, N. (2011). The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* *24*, 210–229.
- Venmans, B.J., van Boxem, T.J., Smit, E.F., Postmus, P.E., and Sutedja, T.G. (2000). Outcome of bronchial carcinoma in situ. *Chest* *117*, 1572–1576.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304–1351.
- Vogel, W.F., Abdulhussein, R., and Ford, C.E. (2006). Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell. Signal.* *18*, 1108–1116.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.
- Vultur, A., Cao, J., Arulanandam, R., Turkson, J., Jove, R., Greer, P., Craig, A., Elliott, B., and Raptis, L. (2004). Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells. *Oncogene* *23*, 2600–2616.
- Wang, C., Su, H., Hsu, Y., Shen, M., and Tang, M. (2006). A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2839–2852.
- Wang, S., Watanabe, T., Matsuzawa, K., Katsumi, A., Kakeno, M., Matsui, T., Ye, F., Sato, K., Murase, K., Sugiyama, I., et al. (2012). Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *J. Cell Biol.* *199*, 331–345.
- Weis, S.M., and Cheresch, D. a (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* *17*, 1359–1370.
- Weng, Y., Fang, C., Turesky, R.J., Behr, M., Kaminsky, L.S., and Ding, X. (2007). Determination of the role of target tissue metabolism in lung carcinogenesis using conditional cytochrome P450 reductase-null mice. *Cancer Res.* *67*, 7825–7832.
- Williams, S.E., and Fuchs, E. (2013). Oriented divisions, fate decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 749–758.
- Wistuba, I.I., and Gazdar, A.F. (2006). Lung cancer preneoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* *1*, 331–348.
- Wistuba II, Berry, J., Behrens, C., Maitra, A., Shivapurkar, N., Milchgrub, S., Mackay, B., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. (2000). Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* *6*, 2604–2610.

- Wong, J., Sia, Y.Y., Misso, N.L., Aggarwal, S., Ng, A., and Bhoola, K.D. (2011). Effects of the demethylating agent, 5-azacytidine, on expression of the kallikrein-kinin genes in carcinoma cells of the lung and pleura. *Patholog. Res. Int.* **2011**, 167046.
- Wu, T.-C. (2007). The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Res.* **67**, 6003–6006.
- Xue, B., Krishnamurthy, K., Allred, D.C., and Muthuswamy, S.K. (2013). Loss of Par3 promotes breast cancer metastasis by compromising cell-cell cohesion. *Nat. Cell Biol.* **15**, 189–200.
- Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **178**, 517–527.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl Forms a Protein Complex with PAR-6 and aPKC Independently of PAR-3 to Regulate Epithelial Cell Polarity. *Curr. Biol.* **13**, 734–743.
- Zaridze, D.G., Safaev, R.D., Belitsky, G.A., Brunnemann, K.D., and Hoffmann, D. (1991). Carcinogenic substances in Soviet tobacco products. *IARC Sci. Publ.* 485–488.
- Zen, K., Yasui, K., Gen, Y., Dohi, O., Wakabayashi, N., Mitsufuji, S., Itoh, Y., Zen, Y., Nakanuma, Y., Taniwaki, M., et al. (2009). Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PAR3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* **28**, 2910–2918.
- Zhang, H., and Macara, I.G. (2006). The polarity protein PAR-3 and TIAM1 cooperate in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 227–237.
- Zhang, L., Li, J., Young, L.H., and Caplan, M.J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17272–17277.
- Zhang, S., Schafer-Hales, K., Khuri, F.R., Zhou, W., Vertino, P.M., and Marcus, A.I. (2008). The tumor suppressor LKB1 regulates lung cancer cell polarity by mediating cdc42 recruitment and activity. *Cancer Res.* **68**, 740–748.
- Zhao, L., and Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* **27**, 5486–5496.
- Zhao, X., Weir, B.A., LaFramboise, T., Lin, M., Beroukhim, R., Garraway, L., Beheshti, J., Lee, J.C., Naoki, K., Richards, W.G., et al. (2005). Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res.* **65**, 5561–5570.
- Zheng, B., and Cantley, L.C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 819–822.
- Van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* **728**, 23–34.
- Zöchbauer-Müller, S., Fong, K.M., Virmani, A.K., Geradts, J., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* **61**, 249–255.
- Zondag, G.C., Evers, E.E., ten Klooster, J.P., Janssen, L., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (2000). Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **149**, 775–782.

If I had only one hour to save the world,
I would spend fifty-five minutes defining the problem
and only five minutes finding the solution.

A. Einstein