



Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

**Papel de DUSP1 en progresión tumoral y en  
respuesta a CDDP en cáncer no microcítico  
de pulmón.**

TESIS DOCTORAL

VERÓNICA MONCHO AMOR

Madrid, 2011



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



# **Papel de DUSP1 en progresión tumoral y en respuesta a CDDP en cáncer no microcítico de pulmón.**

Memoria que presenta

**Verónica Moncho Amor**

Licenciada en Bioquímica y Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de la tesis:

**Dra. Rosario Perona Abellón**

Profesor de Investigación

**Dra. M<sup>a</sup> Inmaculada Ibáñez de Cáceres**

Investigador Contratado

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”  
CSIC-UAM





MINISTERIO DE CIENCIA E  
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"ALBERTO SOLS" IIBM

Por la presente, **Rosario Perona Abellón**, Doctora en Farmacia y Profesor de Investigación del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Madrid, y **M<sup>a</sup> Inmaculada Ibáñez de Cáceres**, Doctora en Biología e Investigador "Miguel Servet" contratado por la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital de la Paz (FIB-HULP) y del Instituto de Investigación Sanitaria IdiPAZ, certifican que:

**Dña. Verónica Moncho Amor**, Licenciada en Bioquímica y Biología por la Universidad Francisco de Vitoria y la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada:

**"Papel de DUSP1 en progresión tumoral y en respuesta a CDDP en cáncer no microcítico de pulmón"** en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a veinticinco de mayo de dos mil once.

Dra. Rosario Perona Abellón  
Director de la Tesis  
Profesor de Investigación  
CSIC

Dra. M<sup>a</sup> Inmaculada Ibáñez de Cáceres  
Director de la Tesis  
Investigador Contratado  
FIB-HULP-IdiPAZ

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Tutor/a

Dra. Isabel Varela Nieto  
Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica

# **AGRADECIMIENTOS**



## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todos por todo!!



# **RESUMEN**



## **RESUMEN**

DUSP1 es una fosfatasa que regula la actividad de las MAPK, JNK y p38, que además tiene un papel significativo en la biología tumoral y en la resistencia al cisplatino (CDDP). En este trabajo se estudia la función de DUSP1 en cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Para ello se realizó un análisis diferencial de la expresión génica global entre células de CNMP parentales (H460v) y células con expresión de DUSP1 inhibida (H460cri). En este estudio se observó que la inhibición en la expresión de DUSP1 induce cambios en las rutas biológicas involucradas en angiogénesis, actividad MAP quinasa, señalización célula-célula, la actividad de los factores de crecimiento y receptores tirosina-quinasa. Estas diferencias observadas en expresión génica se complementaron con ensayos funcionales para estudiar la implicación de DUSP1 en angiogénesis y metástasis. Se observó que en células H460, la inhibición de la expresión DUSP1 disminuye la capacidad migratoria e invasiva, el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos y la metástasis inducida por estas células. También se observó que la inhibición de DUSP1 reduce el potencial angiogénico *in vivo*, dato que correlaciona con una disminución de la producción de VEGFC. A raíz de estos resultados, se realizó una aproximación translacional con muestras de biopsias de tumores de pacientes con CNMP, observándose una estrecha correlación entre la expresión de VEGFC y DUSP1 en las zonas de mayor vascularización.

La expresión de DUSP1 parece estar relacionada con la resistencia encontrada frecuentemente en pacientes de CNMP al CDDP, quimioterápico de uso habitual en este tumor. Por tanto, se quiso profundizar en el conocimiento del papel de DUSP1 en respuesta al CDDP en células de CNMP. Para ello, se trataron las células H460v y H460cri con CDDP a diferentes tiempos y se estudiaron los cambios en la expresión génica mediante el uso de *microarrays* de expresión. Los resultados obtenidos indican que las células H460cri son más sensibles al CDDP, con un aumento en el porcentaje en células apoptóticas tras su tratamiento con este agente. En ambas líneas celulares la apoptosis está mediada por la actividad de p38, aunque en células H460v la activación de la apoptosis es vía p38-ATF2, mientras que en células H460cri parece ser independiente de ATF2.

Como conclusión los resultados indican que DUSP1 juega un papel importante en la progresión tumoral en CNMP, probablemente debido a su participación en los procesos de angiogénesis y metástasis; además DUSP1 parece estar implicada en la aparición de resistencia al agente CDDP a través de una sutil regulación de los procesos apoptóticos mediados por la ruta p38.



## **ABSTRACT**

DUSP1 is a phosphatase that regulates the activity of the MAPK, JNK and p38, with an increasingly recognized implication in tumor biology and resistance to cisplatin (CDDP). To understand more about the role of DUSP1 in non-small cell lung cancer (NSCLC), gene expression analysis was performed comparing parental versus DUSP1-deficient H460 NSCLC cancer cells. Results showed that inhibition in DUSP1 expression induces changes in specific biological pathways including angiogenesis, MAP-kinase phosphatase activity, cell-cell signalling, growth factor and tyrosine-kinase receptor activity. Then, complementary functional assays were performed focussed on the implication of DUSP1 in angiogenesis and metastasis. In H460 cells, inhibition of DUSP1 expression resulted in a diminished capacity to migrate, invade, generate tumors in nude mice and to metastasize. Furthermore, H460cri cells have a reduced angiogenic potential *in vivo*, which correlates with a decrease in VEGFC expression. Finally, we studied the relevance of these findings in human NSCLC specimens. A significant correlation was found between VEGFC and DUSP1 expression that localize next to vascular structures.

CDDP-based chemotherapy is the first option treatment in NSCLC and the expression of DUSP1 seems to be related to CDDP resistance in those patients. To gain insight into the cellular signaling pathways involving DUSP1 actions and the response to CDDP in NSCLC; H460v and H460cri cells were treated during different times with CDDP and the gene expression analysis was studied using microarrays. Results indicated the H460cri cells were more sensitive to CDDP and that the percentage of apoptotic cells increased after treatment. In both cell lines the apoptosis is mediated by p38 activity, although in H460v cells the activation of apoptosis occurs by p38-ATF2 pathway, while in H460cri cells seems to be independent of ATF2.

Overall, this work provides evidence on the role of DUSP1 in tumor progression in NSCLC, which is probably related to its participation in angiogenesis and metastasis; moreover DUSP1 seems to be involved in CDDP resistance through subtle changes in apoptotic processes regulation mediated by p38 signalling pathway.



# ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. CÁNCER DE PULMÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1 Tipos de cáncer de pulmón .....	7
1.2 Estadaje del CNMP: Sistema TNM.....	8
1.3 Tratamiento de CNMP según los estadios .....	9
<b>2. PROGRESIÓN TUMORAL .....</b>	<b>12</b>
2.1 Angiogénesis .....	13
2.2 Metástasis.....	15
<b>3. RUTAS CELULARES ALTERADAS EN EL CNMP .....</b>	<b>17</b>
<b>4. SEÑALIZACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD QUINASA     ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs) .....</b>	<b>19</b>
4.1 Señalización de proteínas quinasas reguladas por estrés SAPKs .....	21
4.1.1 JNK.....	21
4.1.2 p38.....	22
4.1.3 Factor de transcripción ATF2 .....	23
4.2 La familia de proteínas fosfatasas duales DUSP reguladoras de la actividad .....	24
MAPKs.....	24
4.2.1 DUSP1.....	25
4.2.2 DUSP6.....	25
<b>5. TÉCNICAS DE ESTUDIO EN CÁNCER: MICROARRAYS.....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Cultivos celulares.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Reactivos y tratamientos .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Vectores y construcciones .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Transfecciones y ensayos de actividad luciferasa .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Generación de líneas celulares mediante el uso de lentivirus.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Análisis de expresión de proteínas mediante western blot .....</b>	<b>36</b>
<b>8. Estudio de perfiles de expresión génica mediante microarrays.....</b>	<b>37</b>
<b>9. Análisis de expresión génica por RT-PCR .....</b>	<b>38</b>
<b>10. Curvas de crecimiento celular.....</b>	<b>40</b>
<b>11. Preparación de medios condicionados de cultivos celulares .....</b>	<b>41</b>
<b>12. Ensayo de migración e invasión celular .....</b>	<b>41</b>
<b>13. Ensayos de angiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>14. Inmunofluorescencia.....</b>	<b>43</b>
14.1 En implantes subcutáneos de matrigel.....	43
14.2 En muestras humanas de CNMP .....	43
<b>15. Ensayos de tumorigénesis <i>in vivo</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>16. Inmunohistoquímica.....</b>	<b>44</b>
<b>17. Ensayo de metástasis .....</b>	<b>46</b>
<b>18. Necropsias y análisis histopatológico .....</b>	<b>46</b>
<b>19. Análisis estadístico .....</b>	<b>47</b>

## **RESULTADOS ..... 49**

<b>1. PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE DUSP1 .....</b>	<b>51</b>
1.1 Perfil de expresión génica diferencial derivado de la inhibición de la expresión de DUSP1 .....	51
1.2 Validación de los cambios identificados en expresión génica .....	52
1.3 Implicación de la proteína DUSP1 en los cambios de expresión de los genes validados.....	53
<b>2. CAMBIOS FUNCIONALES DERIVADOS DE LA INHIBICIÓN EN LA EXPRESIÓN DE DUSP1 EN CÉLULAS DE CNMP .....</b>	<b>55</b>
2.1 Estudio de la relación entre las fosfatasa DUSP1 y DUSP6.....	55
2.2 Estudio del efecto de la inhibición en la expresión de DUSP1 sobre la migración e invasión celular .....	56
2.3 Estudio del efecto de la inhibición en la expresión de DUSP1 en la angiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	60
2.4 Estudio del efecto de la inhibición en la expresión de DUSP1 sobre la capacidad tumorigénica y metastásica .....	62
<b>3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE VEGFC, DUSP1 Y CD31 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CNMP.....</b>	<b>67</b>
<b>4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON CDDP SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA A CAMBIOS EN DUSP1 .....</b>	<b>69</b>
4.1 Perfil de expresión génica diferencial derivado de combinar la inhibición de la expresión de DUSP1 y el tratamiento con CDDP .....	69
4.2 Validación de los cambios identificados en expresión génica regulados de forma dependiente de los niveles de DUSP1.....	71
<b>5. CAMBIOS FUNCIONALES DERIVADOS DE LA DISMINUCIÓN EN LOS NÍVELES DE DUSP1 EN CÉLULAS TRATADAS CON CDDP .....</b>	<b>73</b>
5.1 Cambios en el porcentaje de células apoptóticas.....	73
5.2 Estudio de los factores de transcripción SRF, c-Jun y ATF2 en células tratadas con CDDP.....	75
5.3 Estudio de la vía de señalización de p38 en células tratadas con CDDP.....	77
5.4 Estudio de la vía de señalización de JNK en células tratadas con CDDP.....	78
5.5 Estudio del ciclo celular en células tratadas con CDDP cuando se inhibe la expresión de ATF2 .....	78
5.6 Estudio de los cambios en las vías de señalización de p38 y JNK en células tratadas con CDDP cuando la expresión de ATF2 está inhibida .....	79

## **DISCUSIÓN..... 81**

<b>1. Papel de DUSP1 en la progresión tumoral en células de CNMP.....</b>	<b>83</b>
1.1 Perfiles de expresión génica tras inhibir la expresión de DUSP1 .....	83
1.2 Implicación de DUSP1 en los cambios de expresión de los genes validados..	85
1.3 Implicaciones de la expresión de DUSP1 en la progresión tumoral, angiogénesis y metástasis en el CNMP .....	86
<b>2. Papel de DUSP1 en respuesta a CDDP en células de CNMP .....</b>	<b>88</b>
2.1 Significado biológico de las agrupaciones génicas observadas según la respuesta al tratamiento con CDDP y la expresión de DUSP1 .....	89
2.2 Regulación diferencial de p38 y ATF2 en relación con la expresión de DUSP1 .....	92

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>.116</b>
<b>1. Publicaciones que forman parte de la Tesis.....</b>	<b>118</b>
<b>2. Otras publicaciones durante el desarrollo de la Tesis .....</b>	<b>118</b>

# **ABREVIATURAS**

---

**ABREVIATURAS**

<b>AKT</b>	Homólogo al oncogen viral de timoma murino
<b>ANGPTL4</b>	Angiopoietina-4
<b>API</b>	La proteína activadora 1
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli
<b>ARNi</b>	ARN de inhibición
<b>ATF2</b>	El factor de transcripción activador 2
<b>BRAF</b>	Homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf
<b>BRCA1</b>	Cáncer de mama 1
<b>c/EBP</b>	Proteína beta de unión al potenciador CCAAT
<b>Cdc25</b>	Proteína de ciclo de división celular 25
<b>CDK</b>	Quinasas dependientes de ciclinas
<b>CDKN2A</b>	Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina
<b>c-myc</b>	Oncogén de la mielocitomatosis celular
<b>CTNNB1</b>	Catenina beta 1
<b>CXCR4</b>	El receptor 4 de las quimioquinas tipo CXC
<b>CXCL12</b>	El ligando 12 de la CXC de la familia de las quimioquinas
<b>DLK1</b>	Homólogo parecido a delta 1 (Drosophila)
<b>DUSP/MKP</b>	Proteínas fosfatasa duales específicas
<b>ELK1</b>	Ets LiKe gene1
<b>GEO</b>	<i>Gene Expression Omnibus</i>
<b>GSK3B</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
<b>HDAC</b>	Histona deacetilasas
<b>HGF</b>	El factor de crecimiento de los hepatocitos
<b>KRas</b>	Kirsten-Ras
<b>MEF2</b>	Factor potenciador de miocitos 2
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios murinos
<b>MKK4 y 7</b>	MAP quinasa quinasa 4 y 7
<b>MLL 2-3</b>	Histona metiltransferasa 2-3
<b>MMP-s</b>	Metaloproteinasas
<b>MMS</b>	Metilsulfonato de metano
<b>MSK1</b>	Quinasa regulado por mitógenos y estrés 1
<b>MNK 1 y 2</b>	Quinasas 1 y 2 relacionadas con la señal de MAPK
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>NF-KB</b>	Factor nuclear kappa-B
<b>PI3KR1</b>	El receptor 1 de las fosfoinositol 3-quinasa
<b>PTEN</b>	Homólogo fosfatasa y tensina
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa o a tiempo real
<b>RAS</b>	Oncogén homólogo al virus del sarcoma de rata
<b>RHO</b>	Gen de la familia de homología a ras
<b>RPMI</b>	Instituto Memorial <i>Roswell Park</i>
<b>T.A.</b>	Temperatura ambiente.
<b>TNM</b>	Tumor-Nódulo-Metástasis
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TNC</b>	Tenascina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>VHL1</b>	Von Hippel-Lindau 1

---

# **INTRODUCCIÓN**



---

## 1. CÁNCER DE PULMÓN

**E**l **cáncer de pulmón** es un conjunto de enfermedades resultantes del crecimiento maligno de células del tracto respiratorio, en particular del epitelio de recubrimiento de las estructuras bronquiales y alveolares. Es uno de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial y la primera causa de muerte por cáncer en la población masculina en los países industrializados. Además su incidencia se ha incrementado también entre la población femenina como consecuencia del aumento del hábito tabáquico, superando a la mortalidad por cáncer de mama en algunos países desarrollados (Boyle and Levin, 2008). En España se diagnostican cada año 20.000 nuevos casos, que representan el 12% de todos los tipos de tumores y el 20% de las muertes asociadas a esta patología.

### 1.1. Tipos de cáncer de pulmón.

Según la clasificación histológica vigente, el cáncer de pulmón puede dividirse en cuatro subtipos principales que representan el 95% de los casos y son los siguientes(Christopher G.Azzoli, 2010):

**Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CMP):** Representa el 10-15% de todos los casos. Está compuesto por células con un escaso citoplasma, nucleolos prominentes y con gran velocidad de proliferación. Su incidencia se está reduciendo sin que por el momento se conozcan las causas.

**Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CNMP):** Este tipo de cáncer representa el 80-85% de todos los diagnósticos de cáncer de pulmón. Los tipos principales de CNMP reciben su nombre dependiendo del tipo celular al que se diferencian histológicamente:

**a) carcinoma epidermoide, escamoso o escamocelular (20-30%):** Compuesto por células epiteliales con diferenciación escamosa e identificable por la producción de islas de queratina. Fue el tumor más frecuente hasta hace 10 años, momento en el que se observó un descenso en su incidencia.

**b) adenocarcinomas (30-40%):** Conformado por células con diferenciación glandular o con producción de mucina similares a las células caliciformes que integran la mucosa de cualquier epitelio. Hoy día es el tumor más frecuente en los países occidentales y aunque el aumento en su incidencia se ha asociado a los distintos modelos de tabaquismo no existe evidencia biológica que justifique los hallazgos epidemiológicos.

**c) carcinoma de células grandes (10%):** Células grandes, anaplásicas y poligonales, con núcleos vesiculares. La ausencia de diferenciación evidente impide su clasificación como epidermoide o adenocarcinoma pero la mejoría en las técnicas diagnósticas histológicas está reduciendo su incidencia. En cualquier caso, los cambios epidemiológicos en este subtipo histológico van asociados a la tecnología empleada en cada centro hospitalario.

**d)** Existen otras variantes menos frecuentes que configuran el 5-8 % del resto de los tumores primitivos del pulmón con histologías mixtas epiteliales, mesenquimales o linfoides cuya descripción carecen de interés para este trabajo de investigación.

### **1.2. Estadiaje del CNMP: Sistema TNM.**

La localización y el tamaño del tumor inicial de pulmón, y la presencia o ausencia de extensión hacia los ganglios linfáticos o hacia lugares más distantes del cuerpo, determinan el estadio del cáncer de pulmón y con ello, las posibilidades de supervivencia. El sistema utilizado internacionalmente para la clasificación de carcinomas no microcíticos de pulmón es el **TNM**, donde **T** indica el grado de infiltración y extensión local en la vecindad tisular del Tumor primario (describe la extensión del tumor primario), el **N** se refiere a la afectación ganglionar de acuerdo con su localización (es decir, la ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos), tamaño y número y, finalmente, el **M** indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia. El sistema TNM fue propuesto inicialmente por Denoix en 1946 y es actualizado periódicamente. La nueva clasificación es la primera basada en datos internacionales de pacientes tratados de diferente manera y los cambios se han basado en diferencias en la supervivencia. Se da más importancia al tamaño tumoral; le concede un pronóstico real a los tumores que tienen nódulos adicionales; y adapta la

clasificación de la extensión a la pleura a su pronóstico y a la práctica clínica habitual, que ya contemplaba estos casos como diseminados (Rami Porta, 2009).

Utilizando el sistema TNM los tumores se clasifican en: **Estadio 0** se define como "carcinoma *in situ*", el tumor se encuentra localizado en la capa mucosa de la estructura bronquial y no presenta crecimiento a través de la membrana basal que separa la mucosa de la submucosa y no tienen metástasis ganglionares ni a distancia (TisN0M0). En el **estadio I** el tumor se encuentra únicamente en el pulmón y está rodeado por tejido normal y no existe afectación ganglionar ni a distancia. El **estadio II** el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales peribronquiales o hiliares del mismo lado en el que se ha originado el tumor primario. En el **estadio III** el tumor mide más de 7cm. en ausencia de cualquier otro tipo de afectación, o se ha extendido a la pared torácica o al diafragma cerca del pulmón; o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos mediastínicos, subcarinales o más allá de estos. En este estadio es importante diferenciar el estadio IIIA, potencialmente operable, del estadio IIIB sin posibilidades reales de cirugía, pues la aproximación terapéutica es totalmente distinta. Por último, en el **estadio IV** el tumor se ha diseminado a otros órganos (Christopher G.Azzoli, 2010).

### 1.3. Tratamiento de CNMP según los estadios.

El tratamiento del cáncer no microcítico de pulmón exige la combinación racional de todas las modalidades existentes de terapias: cirugía, radioterapia y quimioterapia. En función del estadio en el que se ha diagnosticado al paciente, las técnicas terapéuticas y su orden de administración son variables (ver tabla 1).

El cáncer de pulmón no microcítico en estadios I y II se trata con cirugía y disección de los ganglios mediastínicos. A pesar de que con la cirugía se pueden llegar a curar un elevado porcentaje de los casos, se recomienda administrar quimioterapia adyuvante basada en un doblete de platino a aquellos pacientes en estadio II y IIIA. Por el momento, los pacientes diagnosticados e intervenidos en estadio I no se benefician de tratamiento adyuvante pues en varios ensayos clínicos se ha cuestionado su valor para aumentar la supervivencia global. En pacientes con estadios IIIa se recomienda administrar quimioterapia inicialmente para en un segundo momento proceder a la resección quirúrgica si fuera viable. En caso contrario se administra radioterapia

concurrente a dosis radicales. Algunos pacientes en estadios IIIB sin derrame pleural que contraindique la radioterapia se pueden beneficiar también de un esquema concurrente de quimio-radioterapia pero la mayoría de ellos terminan recibiendo exclusivamente quimioterapia. En cualquier caso, es importante separar los dos grupos pronóstico establecidos por los estadios IIIB y IV ya que su supervivencia será ligeramente distinta y puede sesgar resultados experimentales (ver tabla 1).

**Tabla 1. Tratamientos de CNMP según estadios.**

Estadios	Tratamiento usual	Áreas de investigación
<b>IA, IB</b>	Cirugía	Quimioterapia adyuvante
<b>IIA, IIB</b>	Cirugía + Quimioterapia adyuvante	Quimioterapia neoadyuvante
<b>IIIA</b>	Quimioterapia de inducción + cirugía  Quimioterapia-radioterapia secuencial	Necesidad de cirugía  Quimio-radioterapia concurrente sin cirugía  Radioterapia hiperfraccionada  Nuevos fármacos  Tratamientos adyuvantes
<b>IIIB</b>	Quimio-radioterapia secuencial	Quimio-radioterapia concurrente  Radioterapia hiperfraccionada  Nuevos fármacos  Nuevas combinaciones de fármacos
<b>IV</b>	Quimioterapia	Nuevos fármacos  Nuevas combinaciones de fármacos

Actualmente, la quimioterapia utilizada se basa en la combinación de un agente derivado del platino como el cisplatino o carboplatino y otros fármacos como: docetaxel, gemcitabina, paclitaxel, pemetrexed o vinorelbina. Desde hace varios años, distintos estudios han sugerido dobles de quimioterapia sin la inclusión de ningún platino sin que por ello se observasen diferencias significativas en las supervivencias de los pacientes. Más recientemente, los inhibidores de la actividad tirosina quinasa localizada en el dominio intracelular de la isoforma 1 de EGFR en pacientes con mutaciones en el mismo receptor han permitido observar supervivencias inimaginables hace 10 años. Además, la descripción de una proteína de fusión por la translocación entre los genes ALK y EML4 ha permitido la introducción de un nuevo inhibidor de esta proteína con tasas de respuestas superiores al 80%. Finalmente, la incorporación de bevacizumab (anticuerpo que se une a VEGF, bloqueando su función correcta) a los dobles más usados de platino también ha obtenido supervivencias superiores a los 12 meses en pacientes con histología de adenocarcinoma. Aun así, el paradigma de Shiller sugiere que ningún esquema citotóxico es mejor que otro, este paradigma sigue siendo totalmente vigente pues más del 60% de los pacientes no son subsidiarios de tratamiento con inhibidores o con terapias biológicas.

El **cisplatino** es un fármaco derivado del platino, descrito originalmente como la sal de Peyroine y cuya actividad biológica implicada en la división celular fue descubierta de forma accidental en 1965 por Barnett Rosenberg, al identificar un complejo soluble procedente de la electrolisis de electrodos de platino que inhibía la fisión binaria en *Escherichia coli* (Rosenberg et al., 1965). Posteriormente, fue probado como quimioterápico y en 1971 fue tratado el primer paciente con cáncer. Hoy en día, se utiliza en el tratamiento de muchos tumores como los procedentes de ovario, cérvix, linfomas en recurrencia, cabeza y cuello, testículo, esófago, vejiga y pulmón. El cisplatino se une a la posición N7 de las bases purínicas (principalmente guanina) del ADN, formando aductos intracatenarios (la mayoría de ellos) o intercatenarios que bloquean la replicación y transcripción en las células tratadas. Estos aductos causan distorsiones en la curvatura del ADN que son reconocidos por una variedad de proteínas involucradas en las rutas de reparación del ADN, que controlan la muerte y la proliferación celular, diferenciación y la respuesta a estrés. Sin embargo, el cisplatino actúa por igual en todas las células proliferantes, ya sean tumorales o no, y por tanto tiene un elevado grado de toxicidad (Kelland, 2007).

Los avances en el estudio de las bases moleculares del CNMP han permitido llegar a un mejor conocimiento del comportamiento biológico de esta enfermedad. Esto ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra la actividad de algunos de los genes implicados en el mantenimiento del estado neoplásico. Los fármacos dirigidos contra una diana molecular tienen en general una acción citostática, en contraposición con la quimioterapia tradicional de acción citotóxica, y son entre otros: inhibidores de EGFR, RAS, PI3K/AKT, RAF/MEK/ERK, proteína-quinasa C, RAC/RHO, proteosoma, proteínas de ciclo celular y de la angiogénesis.

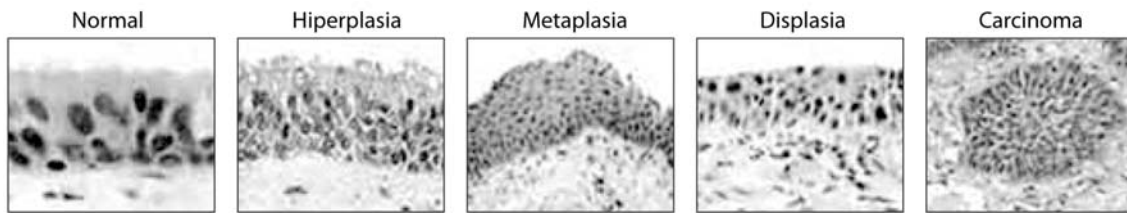
A pesar de los pequeños avances en la detección temprana y el tratamiento adyuvante, el CNMP es diagnosticado en más del 70% de los casos en estadios avanzados en los que los tratamientos no son curativos, por lo que tiene un pobre pronóstico (Herbst et al., 2008). Además, en la mayoría de los casos se produce resistencia al tratamiento con cisplatino en estos pacientes, que se debe principalmente a dos mecanismos: a) baja concentración de cDDP dentro de la célula por problemas en la entrada o salida del cisplatino que deriva en una disminución en la unión al ADN y b) a pesar de la formación de aductos ADN-platino, se incrementa el mecanismo de reparación del ADN o disminuye la inducción de apoptosis. Por tanto, estos dos factores (diagnóstico tardío y resistencia al tratamiento) son responsables de una media de supervivencia global inferior al año, a pesar del máximo esfuerzo terapéutico (Herbst et al., 2008).

## **2. PROGRESION TUMORAL**

El cáncer de pulmón como otros tumores, surge por un proceso acumulativo de cambios genéticos y epigenéticos en oncogenes como *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*, *PI3K* y genes supresores de tumores como *RBI*, *p53*, *STK11*, *p16*, *APC*, *ATM*, *DKK1*, *PTEN*, *RASSF1A*.

Estos cambios en un principio acontecen en células del epitelio bronquial, en los pneumocitos que recubren el espacio alveolar o en las células caliciformes de los conductos bronquiales permitiendo una progresión hacia hiperplasia, metaplasia, displasia y finalmente la aparición de un carcinoma *in situ* (Figura 1). Otras mutaciones posteriores permiten que el carcinoma *in situ* progrese mediante la invasión hacia el

tejido submucoso, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la migración de células hacia órganos distantes.



**Figura 1. Progresión tumoral.** Aspecto histológico de las etapas que sigue un epitelio pulmonar, desde unas condiciones normales a un carcinoma *in situ*, pasando por las fases de hiperplásica, metaplásica y displásica.

### 2.1. Angiogénesis.

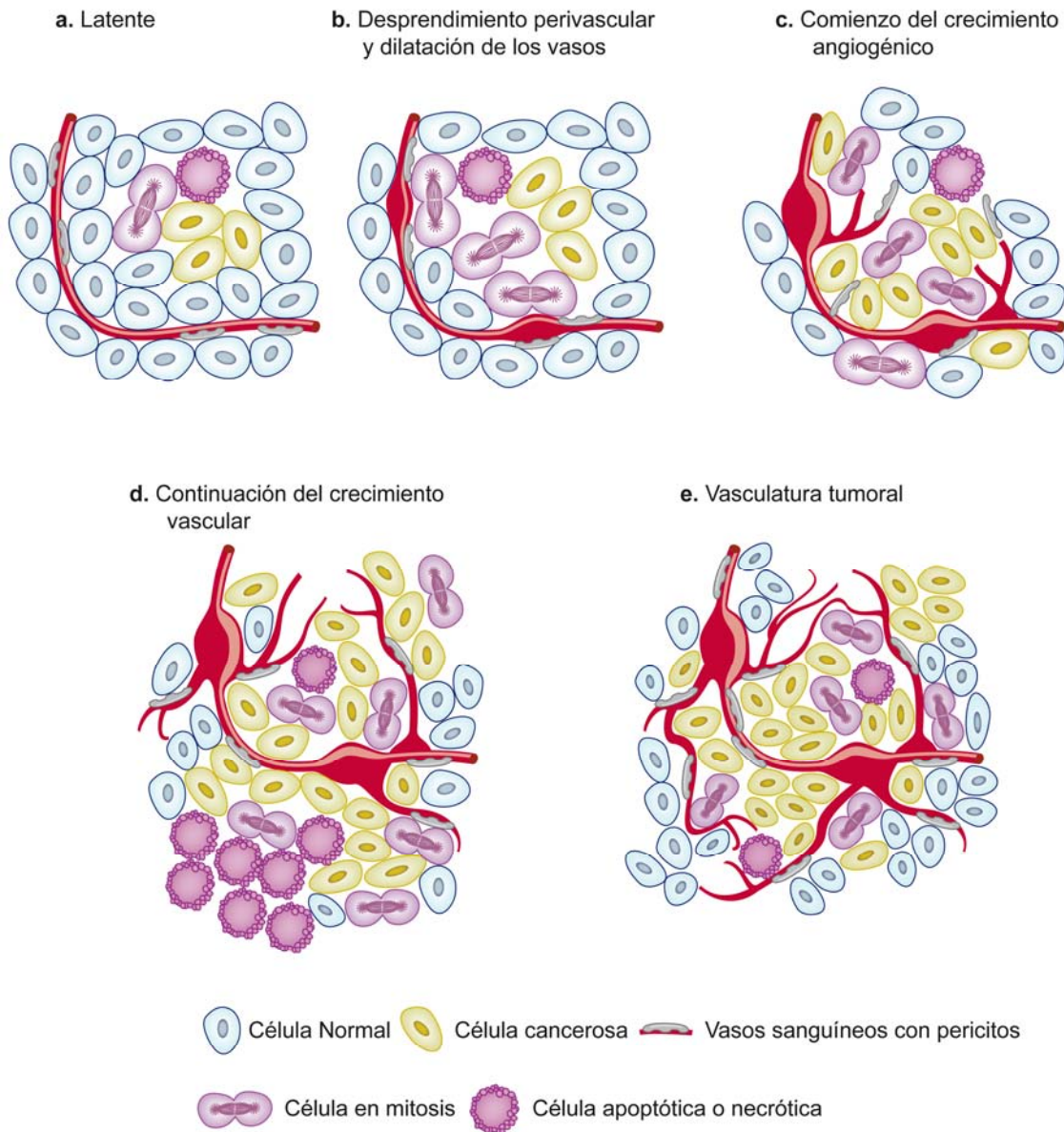
La **angiogénesis** es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes y es necesario durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas (Carmeliet, 2005). Sin embargo, según J. Folkman (1971) también es un proceso fundamental en la progresión tumoral, ya que los tumores requieren de la angiogénesis para mantener la proliferación ilimitada del tumor primario y permitir la colonización de órganos distantes.

La activación del proceso angiogénico (Figura 2) se lleva a cabo conjuntamente por células tumorales, células endoteliales, macrófagos infiltrados en el tumor, fibroblastos y la matriz extracelular. Además, en la regulación de este proceso hay un equilibrio entre la cantidad de factores proangiogénicos y aquellos que inhiben la angiogénesis (Herbst et al., 2005; Kerbel, 2008). Cuando la proporción de los factores proangiogénicos (FGF, miembros de la familia VEGF, PDGF) exceden la de los factores inhibitorios (trombospondina, endostatina, angiostatina, tumstatina, etc) se activa el proceso de angiogénesis y se produce una cascada de eventos que culminan en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Los tumores sólidos con un volumen de 1-2 mm<sup>3</sup> (Folkman, 1992), por lo general, aparecen y progresan en un ambiente de hipoxia (Bergers and Benjamin, 2003). La subunidad alfa del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF) media el aumento de la angiogénesis en los tumores, mediante la activación de la expresión en la célula tumoral de un conjunto de genes, entre los que se encuentran los integrantes de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular: VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd (factores pro-angiogénicos). Los factores del crecimiento secretados por las



células tumorales se unen a los receptores de las células endoteliales (VEGFR1, VEGFR2 y NRP), activándose funciones como la permeabilidad vascular, la proliferación, la migración y la movilización de las células endoteliales hacia las células tumorales secretoras de factores pro-angiogénicos. Como consecuencia de todo este proceso se forman nuevos capilares sanguíneos en el tumor (fase vascular) (Herbst et al., 2005; Jimenez and Volpert, 2001).

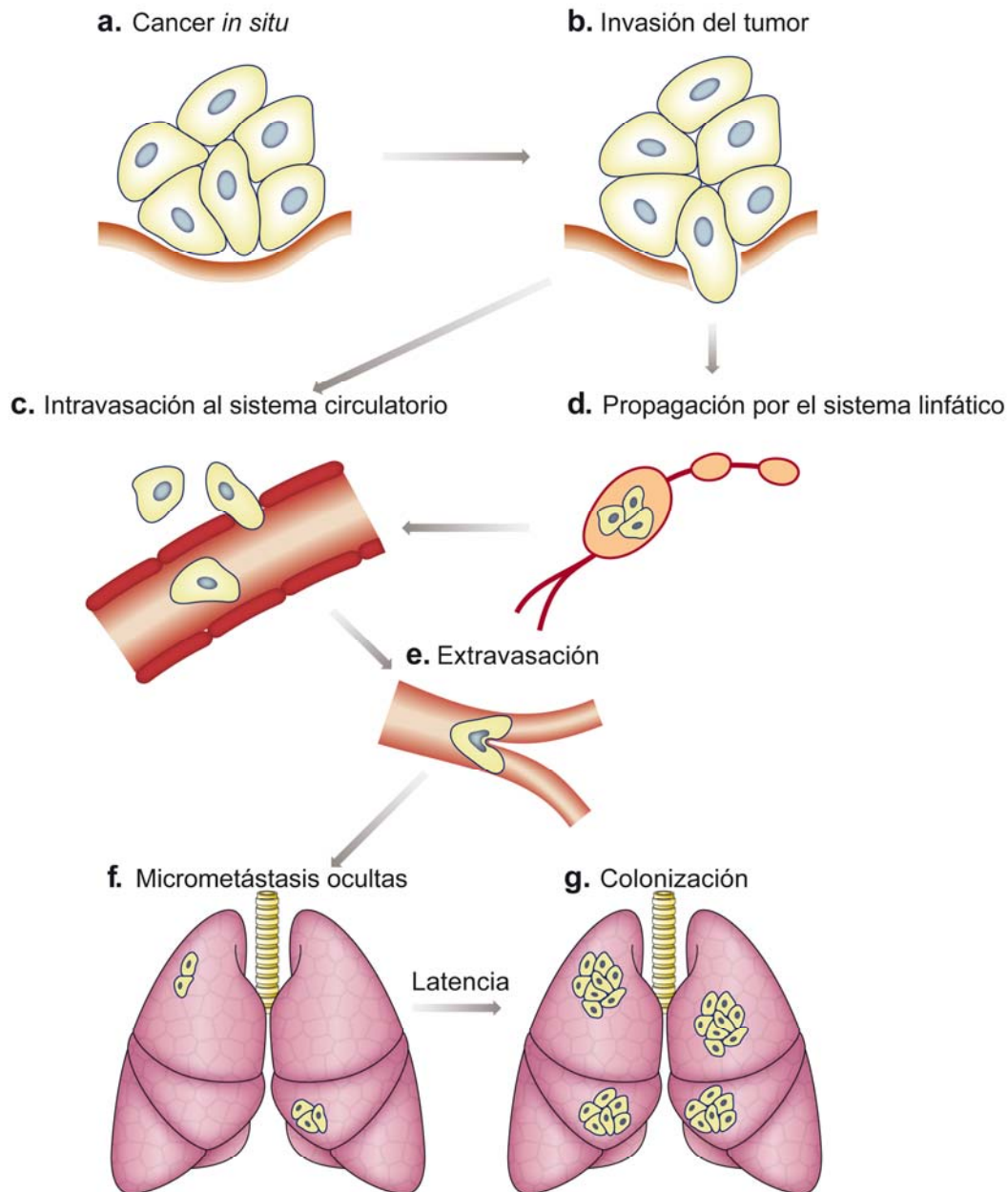


**Figura 2. Modelo clásico de inducción de angiogénesis.** La activación del fenómeno es un paso discreto en el desarrollo del tumor que puede ocurrir en diferentes fases de la progresión tumoral, dependiendo de la naturaleza del tumor y su microambiente. a) La mayoría de tumores empiezan creciendo como nódulos avasculares (latentes) alcanzando un estado estacionario entre células en proliferación y apoptóticas. El inicio de la angiogénesis garantiza el crecimiento exponencial del tumor. b) El encendido ocurre cuando las células perivasculares se desprenden de los vasos sanguíneos y se produce una dilatación de éstos, c) seguido de un crecimiento angiogénico es decir, d) la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos y el reclutamiento de células perivasculares. e) La formación de nuevos vasos sanguíneos continuará conforme el tumor crezca, y los vasos sanguíneos proveerán de nutrientes y oxígeno a aquellas áreas del tumor hipóxicas o necróticas. (Adaptado de (Bergers and Benjamin, 2003)

## 2.2. Metástasis.

La **metástasis** es un proceso secuencial en el que las células del tumor primario se propagan a un órgano distinto de aquel en el que se iniciaron (Fidler et al., 2010). Los tumores primarios están formados por poblaciones celulares heterogéneas que pueden encontrarse en estadios muy tempranos de la progresión (Chiang and Massague, 2008; Minn et al., 2007; Nguyen and Massague, 2007). Estas células presentan una inestabilidad genética que es intrínseca a las células tumorales, facilitando el avance del proceso hacia la metástasis. Alteraciones genéticas adicionales les permiten superar uniones físicas (uniones celulares, estructura del tejido, torrente circulatorio), químicas (falta de oxígeno, de nutrientes, aumento de especies reactivas de oxígeno) y biológicas (evasión de la respuesta inflamatoria, inhibición de citoquinas), permitiendo su diseminación y colonización a un órgano distante. La adquisición de un fenotipo metastásico se inicia cuando las células tumorales invaden la región contigua dando lugar al proceso denominado **invasión**. En este proceso se producen cambios en las células metastásicas como la pérdida de su polaridad (Rho-GTPasa), la pérdida de la adhesión celular (se reprime la expresión del gen *Cadherina-E*), el reordenamiento del citoesqueleto y el aumento de los marcadores mesenquimales (vimentina, fibronectina). Estos cambios están asociados a un proceso denominado transición epitelio-mesenquima (Moreno-Bueno et al., 2008). Además, las células tumorales aumentan su capacidad migratoria (*HGF*) y son capaces de proteolizar mediante metaloproteasas (*MMP*) la membrana basal y la matriz extracelular del tejido circundante para escapar por el torrente circulatorio, lo que se denomina **intravasación**. Posteriormente las células tumorales han de ser capaces de sobrevivir en el torrente circulatorio o linfático evadiendo al sistema inmune (expresión de genes *CXCR4*, *CXCL12* para unirse a receptores que expresan los tejidos) e invadir el parénquima de un órgano diferente y distante al primero por mecanismos similares a los de la intravasación, proceso que se denomina **extravasación** (*MMP-1* y *ANGPTL4*). Se produce entonces una infiltración de las células tumorales a dicho órgano y su **colonización** (Figura 3) (Chiang and Massague, 2008). En algunos tumores existe un espacio temporal denominado **latencia** entre los procesos de extravasación y colonización (Sahai, 2007). En el adenocarcinoma de pulmón, la metástasis frecuentemente se producen en órganos como cerebro, hígado,

hueso y pulmón, existiendo una latencia de meses para su aparición clínicamente evidente (Chiang and Massague, 2008).



**Figura 3. Inicio del tumor y metástasis.** a) Cáncer *in situ*, tumor primario originado en un órgano diferente al de metástasis. b) Invasión del tumor, las células tumorales invaden la región contigua. c y d) Intravasación al sistema circulatorio y propagación por el sistema linfático, las células tumorales tendrán la capacidad de escapar por el torrente circulatorio y linfático. e) Extravasación, las células tumorales escapan del torrente sanguíneo y circulatorio e invaden un órgano diferente y distante al primero. f) las células tumorales están latentes en el órgano receptor. g) Se produce un crecimiento de las células tumorales colonizando dicho órgano. (Adaptado de (Steeg, 2003)

### 3. RUTAS CELULARES ALTERADAS EN EL CNMP

El CNMP es un tumor heterogéneo en el que se han identificado cambios genéticos que incluyen mutaciones en genes reguladores de rutas de gran importancia biológica, involucradas en la de señalización intracelular, ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis (Herbst et al., 2008). En la bibliografía se han descrito unos 100 genes conocidos que se asocian al desarrollo del cáncer de pulmón (Blanco et al., 2009). Algunos de los más frecuentes se describen a continuación (Figura 4):

a) Receptores con actividad tirosina quinasa: **El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR)** regula importantes procesos como la proliferación, apoptosis, angiogénesis e invasión. En el desarrollo y la progresión del cáncer de pulmón no microcítico se sobreexpresa frecuentemente *EGFR*; también se han identificado mutaciones puntuales (ej. L858R) y deleciones en el exón 19 que ocurren en el adenocarcinoma de pulmón y están localizadas dentro del dominio catalítico, que producen una activación constitutiva de EGFR (Kobayashi et al., 2005). Estas mutaciones están relacionadas con un incremento de sensibilidad a inhibidores de la actividad tirosina-quinasa del EGFR (erlotinib y gefitinib). En contraste, mutaciones en el residuo T790M se asocian con resistencia adquirida a estos fármacos. Las mutaciones de *EGFR* están asociadas a un pronóstico favorable en CNMP incluso en respuesta a quimioterapia. También se han descrito mutaciones en otros receptores tales como VEGFR2, PDGFR, FGFR, y otros.

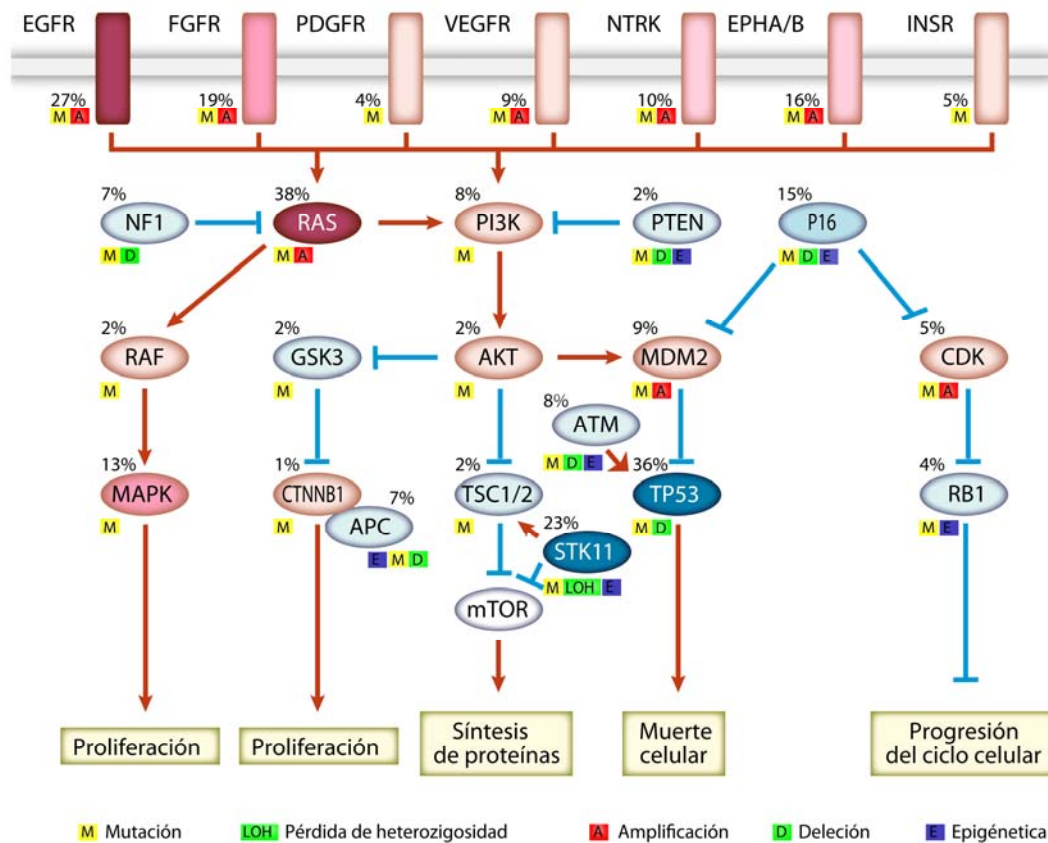
b) La vía de señalización intracelular **Ras-Raf-Mek** media la señalización de EGFR y otras vías que conducen al crecimiento celular y progresión tumoral. Cerca de un tercio de los adenocarcinomas de pulmón se asocian a mutaciones oncogénicas en *K-RAS* y se asocian a resistencia a inhibidores de EGFR y quimioterapia (Pao and Girard, 2011). La mayoría de mutaciones en *KRAS* en el adenocarcinoma de pulmón son transversiones de G/T relacionadas con pacientes fumadores y se encuentran en el exon 12 (90% pacientes) o el exon 13. Otra mutación encontrada en *KRAS* es la transición de G/A detectada en pacientes no fumadores con adenocarcinoma de pulmón. Las mutaciones en *KRAS* aparecen en estadios tempranos de adenocarcinomas de pacientes fumadores y se relaciona con un pobre pronóstico. Las mutaciones en *BRAF* también son detectadas en CNMP como eventos tempranos de la tumorigénesis de pulmón.

c) También se han encontrado mutaciones en las proteínas involucradas en **la vía PI3K-Akt-mTOR** (modulada por EGFR) que está activada en la fase temprana de la carcinogénesis de pulmón. *Akt* está también sobreexpresada en displasia bronquial y su inhibición puede inducir apoptosis de células premalignas y malignas en cáncer de pulmón. Por otra parte, la sobreexpresión de *PIK3RI* implica una pobre respuesta a quimioterapia en cáncer de pulmón (Herbst et al., 2008) .

d) En la **vía de señalización Wnt** también se han encontrado mutaciones en genes como *APC*, *CTNNB1*, *SMAD2*, *SMAD4*, *GSK3B* y *DKK1*. Concretamente, *DKK1* es un potente antagonista de la vía de señalización de Wnt que se expresa a niveles altos en carcinoma de pulmón, carcinoma de esófago y en hepatocarcinomas (Ding et al., 2008).

e) En CNMP podemos encontrar la **ruta ALK** activada. Cuando se produce una inversión dentro del cromosoma 2, como resultado se obtiene una fusión génica (*EML4* y *ALK*) encontrándose en un pequeño porcentaje de pacientes de CNMP. Esta fusión hace que la quinasa ALK se encuentre en un estado constitutivamente activo y que el crecimiento celular dependa de las rutas activadas por esta quinasa (Ding et al., 2008).

f) También se han identificado otras vías involucradas en la progresión tumoral del cáncer de pulmón, como son entre otras las reguladas por los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (Cortes-Sempere et al., 2009) y c-myc (Iwakawa et al., 2011), el gen supresor de tumores *p53* (Pfeifer and Besaratinia, 2009), las deacetilasas de histonas (HDAC) (Watanabe et al., 2008), el gen *c-Met* (Ding et al., 2008), genes involucrados en angiogénesis como *VEGF* (Jackson et al., 2010) y finalmente proteínas reguladoras del ciclo celular como CDKN2A, CDKs.



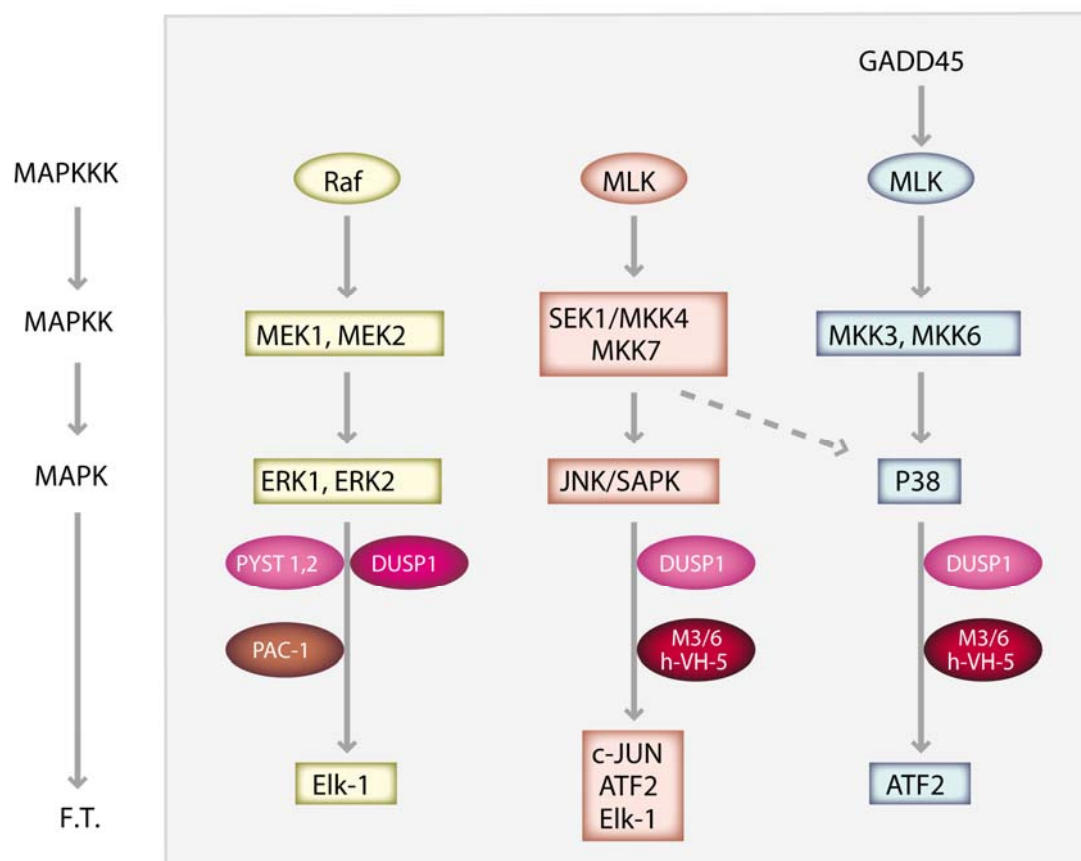
**Figura 4. Rutas de señalización alteradas en cáncer de pulmón.** Las alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer de pulmón ocurren frecuentemente en genes de la vía de señalización MAPK, p53, Wnt, ciclo celular y mTOR. Las oncoproteínas están representadas con los colores de rosa a rojo y las proteínas supresoras de tumores se representan del azul claro al más oscuro. La oscuridad en el color representa una correlación positiva con el porcentaje de tumores que presentan la alteración en concreto. (Adaptado de (Ding et al., 2008)).

#### 4. SEÑALIZACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD QUINASA ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs)

La familia de proteínas MAPK está altamente conservada en todas las células eucariotas y controlan una gran variedad de procesos intracelulares en respuesta a los cambios que ocurren en el medio extracelular. Entre estos procesos encontramos crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. (Chang and Karin, 2001; Davis, 2000; Johnson and Lapadat, 2002; Pearson et al., 2001; Wada and Penninger, 2004). En mamíferos se han caracterizado seis grupos diferentes de MAPKs que son: ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, la quinasa del dominio N-terminal de c-Jun (JNK1/2/3) y p38 ( $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ). Estos dos últimos grupos también se denominan proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK).

Las MAPKs se activan por fosforilación en los residuos de treonina y tirosina de una secuencia conservada T-X-Y en el dominio de activación de la quinasa. La señal de activación se produce en cascada, es decir, una MAPK se activa por otra proteína de la familia MAPK quinasa (MAPKK), la cual a su vez se fosforila y se activa por una proteína perteneciente al grupo de MAPKK quinasa (MAPKKK) (Figura 5). Esta cascada de señalización intracelular permite la amplificación de la señal iniciada por los estímulos extracelulares. La señalización de las MAPKs dependen de la magnitud y la duración de la activación de las quinasas (Marshall, 1995). Los factores que influyen en la regulación de la señalización de la familia MAPKs son diversos y complejos, como pueden ser la densidad y grado de internalización de los receptores de la superficie celular, la asociación de otras proteínas a las MAPKs tales como las proteínas acopladoras, y el balance entre la activación de la quinasa y su inactivación por las proteínas fosfatasas.

ERK1 y ERK2 se activan por mitógenos y esta vía de señalización se encuentra desregulada en aproximadamente un tercio de todos los cánceres humanos, ya sea por mutación o amplificación en los receptores para factores de crecimiento o por mutaciones en la proteína Ras, pero no se han detectado mutaciones o amplificación en ERK1 o ERK2 en tumores humanos. Esto ha permitido el desarrollo de inhibidores para MEK1 y ERK1 (Dhillon et al., 2007) con el fin de inhibir la vía de señalización y actualmente estos inhibidores están en diferentes etapas de desarrollo clínico y preclínico.



**Figura 5.** Esquema de la vía de señalización de las MAPK (ERK, JNK, p38). El grupo de MAPKK quinasa (MAPKKK) activa a una proteína de la familia MAPK quinasa (MAPKK), la cual a su vez fosforila y activa a una MAPK y esta activa factores de transcripción (F.T.) induciendo una respuesta celular. Este último paso viene regulado por las proteínas fosfatasas duales (DUSPs)

#### 4.1. Señalización de las proteínas quinasas reguladas por estrés: SAPKs.

Las otras quinasas de la familia MAPK, JNK y p38 que participan en la señalización de estrés también juegan un papel relevante en cáncer, ya que las células tumorales están expuestas a varias condiciones de estrés como hipoxia, inflamación o estrés metabólico. Por otra parte la participación de las mismas depende del sistema celular ya que la activación persistente de p38 y JNK induce apoptosis en muchos sistemas celulares pero en otros aumenta la supervivencia (Wagner and Nebreda, 2009).

##### 4.1.1. JNK.

Las JNKs son proteínas codificadas por tres genes; *MAPK8* (el cual codifica JNK1), *MAPK9* (codifica JNK2), y *MAPK10* (codifica JNK3) y mediante el procesamiento alternativo de *JNK1* y *JNK2* se originan 10 isoformas. Estos dos genes



tienen una expresión ubicua, mientras que JNK3 se expresa principalmente en el cerebro (Wagner and Nebreda, 2009).

Durante el desarrollo, JNK1 y JNK2 controlan la migración de las células epiteliales en la formación del párpado (Davis, 2000). En ratones adultos, JNK1 y JNK2 modulan la formación de osteoclastos, regulan la diferenciación de linfocitos T, controlan la señalización de la insulina, participan en funciones pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos y por último juegan un papel importante en el desarrollo de la progresión tumoral (Karin and Gallagher, 2005). En respuesta a estrés la función que desempeña JNK en la célula es pro-apoptótica y en fibroblastos transformados por RAS, JNK actuaría como supresor de tumores activando la apoptosis (Kennedy and Davis, 2003).

La familia de proteínas JNK se activa por exposición de las células a citoquinas y estrés ambiental (UV, agentes alquilantes, daño en el ADN, TNF- $\alpha$ ). JNK es activada por MKK4 y MKK7, mediante fosforilación en la Thr 183 y la Tyr 185. MKK4 y MKK7 son a su vez fosforiladas y activadas por varias MKKK, como son; MEKK1-4, MLL2-3, YTpl-2, DLK, TAO1 y 2, TAK1 y ASK1 y 2. Cuando JNK está fosforilada, se transloca del citoplasma al núcleo para fosforilar y activar sus diferentes sustratos; c-jun, ATF-2, Elk-1. Los complejos jun/ATF2 y Jun/fos son miembros del factor de transcripción AP1 y controlan una variedad de genes diana relacionados con ciclo celular, supervivencia, apoptosis, metaloproteinasas y receptores de hormonas nucleares.

#### **4.1.2. p38.**

Hay cuatro genes que codifican para las p38 MAPKs: *MAPK14* (codifica p38 $\alpha$ ), *MAPK11* (codifica p38 $\beta$ ), *MAPK12* (codifica p38 $\gamma$ ) y *MAPK13* (codifica p38 $\delta$ ). p38 $\alpha$  fue la primera en ser identificada como una serina/treonina quinasa la cual se activa por fosforilación después del tratamiento con IL-1, lipopolisacaridos endotóxicos y choque de calor. p38 $\alpha$  se expresa de manera ubicua en la mayoría de células, mientras que los niveles de expresión de p38 $\beta$  son más bajos y se expresa sobre todo en el cerebro. p38 $\gamma$  se expresa en el músculo esquelético y p38 $\delta$  en testículos, páncreas, riñón e intestino delgado (Cuenda and Rousseau, 2007; Wagner and Nebreda, 2009). Los ratones nulos para p38 $\beta$  o p38 $\gamma$  o p38 $\delta$  son viables y no tienen ningún fenotipo visible, demostrando la existencia de una redundancia funcional debido al solapamiento de los sustratos

específicos en las diferentes p38 MAPK, en contraste los ratones nulos para p38 $\alpha$  no son viables.

p38 $\alpha$  participa en la miogénesis y otros procesos de diferenciación, angiogénesis, inflamación y artritis reumatoide, hipertrofia cardiaca y desórdenes neurodegenerativos. En cáncer, p38 $\alpha$  está involucrada en algunas de las alteraciones que sufren las células transformadas, como son potencial ilimitado de replicación, protección contra la apoptosis, invasión del tejido y metástasis (Cuenda and Rousseau, 2007).

Su activación se produce cuando se fosforilan los residuos Thr180 y Tyr182 y esta activación es llevada a cabo por las MKK3/6 quinasas. **MKK6** puede fosforilar los cuatro miembros de la familia de p38 MAPK, mientras que **MKK3** activa p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , pero no p38 $\beta$ . p38 $\alpha$  también puede ser fosforilada por MKK4, un activador de la vía de JNK. Dependiendo del tipo de estímulo de estrés MKK3 y MKK6 contribuyen de forma diferente a la activación de los miembros de la familia de p38 MAPK (Cuadrado and Nebreda, 2010). Estas MKKs son activadas por varias MAPKKKs; TAK1, ASK1/2, DLK, MEKK4, TAO1/2/3, MLK2/3 y MTK1. A su vez, MTK1 (MAPKKK) o MEKK4 (MAPKK) se activan por GADD45. La familia de GADD45 está formada por GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$  y GADD45 $\gamma$ , que son proteínas de bajo peso molecular (18kDa) y están conservadas a lo largo de la evolución. *GADD45* es un gen inducido de forma temprana por estrés físico y químico o estrés oxidativo, hipoxia, rayos X, radiación UV y citoquinas (Takekawa and Saito, 1998), (Shaulian and Karin, 1999).

Las proteínas que son reguladas por p38 mediante fosforilación son los factores de transcripción; p53, ATF2, ELK1, MEF2 y C/EBP $\beta$  y las proteínas quinasas MK2, MSK1, MNK1 y MNK2.

#### **4.1.3. Factor de transcripción ATF2.**

ATF2 es un miembro de la familia de los factores de transcripción hélice-lazo-hélice bZIP que contribuye a múltiples funciones celulares. ATF2 es una proteína que se expresa de manera ubicua y está implicada en el control transcripcional, remodelación de la cromatina y la respuesta al daño en el ADN. Como JUN y FOS, ATF2 es también crucial para una homodimerización o heterodimerización del complejo AP1. En respuesta a estrés o citoquinas, ATF2 es fosforilada en la Thr69 y/o Thr71 por JNK o p38 $\alpha$ . La fosforilación de estos residuos permite la activación de

ATF2 y su unión a otros miembros del complejo AP1 como JUN, CREB, Fos y Fra. Los homodímeros de ATF2 regulan la expresión de varios genes como Gadd45 $\alpha$  y  $\beta$ , ciclina A y D involucrados en la progresión del ciclo celular.

Se ha descrito que ATF2 juega un papel como supresor tumoral u oncogen dependiendo del contexto celular o tisular. La sobreexpresión y activación (fosforilación) de ATF2 alteran la localización subcelular y aumentan la interacción con otras proteínas del complejo AP1, en particular con el factor de transcripción oncogénico JUN. La sobreexpresión de ATF2 se ha detectado en cáncer de mama, melanoma, próstata y modelos animales de carcinogénesis de piel (Vlahopoulos et al., 2008), además el incremento de ATF2 en el núcleo de las células de carcinoma mamario está asociado con un peor diagnóstico clínico. También se han detectado mutaciones que inactivan ATF2 en distintos tipos tumorales como cáncer de pulmón, mama o neuroblastoma (Bhoumik and Ronai, 2008; Lopez-Bergami et al., 2010).

#### **4.2. La familia de proteínas fosfatasaes duales DUSP reguladoras de la actividad MAPK.**

Esta familia de fosfatasaes tiene la capacidad de inactivar a las MAPK defosforilando ambos residuos de Thr y Tyr, imprescindibles para su activación. Por tanto se les ha denominado “fosfatasaes de las proteína-quinasaes activadaes por mitógenos (MKPs) o fosfatasaes duales específicaes (DUSPs)”.

En mamíferos se han descrito diez proteínaes de la familia fosfatasaes duales: DUSP1 (MKP-1), DUSP4 (MKP-2), DUSP6 (MKP-3), DUSP9 (MKP-4), DUSP10 (MKP-5), DUSP16 (MKP-7), DUSP7 (MKP-X), DUSP2 (PAC1), DUSP5 (hVH3) y DUSP8 (M3/6). Se caracterizan por tener un dominio catalítico conservado en el extremo C-terminal, con actividad fosfatasa. En el extremo N-terminal contienen un dominio no catalítico que contiene dos regiones cortas (CH2) con homología a la fosfatasa Cdc25, proteína que controla la entrada en mitosis (Bermudez et al., 2010; Pulido and Hooft van Huijsduijnen, 2008). Las 10 MKPs se dividen en tres clasees. El primer grupo; DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 y DUSP5 son proteínaes que codifican por genees nucleares induciblees, los cuales se sobreexpresan en respuesta a mitógenos o estrés. El segundo grupo; DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP-4 son fosfatasaes citoplasmáticaes que inactivan ERK-1 y ERK-2. El tercer grupo DUSP8, DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7 son fosfatasaes que se localizan en

el núcleo y citoplasma tienen sustrato selectivo que son las proteínas quinasas reguladas por estrés, SAPKs (JNK y p38) (Keyse, 2008) (Bermudez et al., 2010).

#### **4.2.1. DUSP1.**

DUSP1/MKP-1/CL100 fue el primer miembro de la familia DUSPs en ser identificado como MAPK fosfatasa. Es un gen temprano que se expresa rápidamente en respuesta a estrés oxidativo, calor y factores de crecimiento. Su localización subcelular es estrictamente nuclear y se expresa a niveles bajos en todos los tejidos. DUSP1 es capaz de inactivar las principales MAPKs (JNK, p38, ERK). Concretamente, DUSP1 inactiva a JNK y p38 en respuesta a estímulos genotóxicos como la luz UV, agentes alquilantes, MMS, etc (Boutros et al., 2008; Chattopadhyay et al., 2006; Keyse, 2008; Sanchez-Perez et al., 2000; Sanchez-Perez et al., 1998; Wu, 2007)

Aunque los ratones nulos para este gen no presentan anomalías en el desarrollo, hay estudios que indican que la expresión de DUSP1 está alterada en muchos tipos de cáncer como pulmón (Chattopadhyay et al., 2006), mama (Rojo et al., 2009), próstata (Magi-Galluzzi et al., 1997), páncreas (Liao et al., 2003), hígado (Tsujita et al., 2005) y adenocarcinoma gástrico (Bang et al., 1998). En el laboratorio de R. Perona se ha demostrado que DUSP1 juega un papel importante en la progresión tumoral en cáncer de pulmón, ya que en biopsias de pacientes con CNMP se encontraron altos niveles de expresión de DUSP1 en fases tempranas de la enfermedad (Chattopadhyay et al., 2006). Además se ha descrito que, en ratones atímicos inoculados con células CNMP, en las cuales se ha inhibido la expresión de DUSP1, los tumores son más sensibles al CDDP (Chattopadhyay et al., 2006). Finalmente, las células MEFs derivadas de ratones nulos para DUSP1 son también más sensibles al CDDP induciendo la apoptosis vía JNK, mientras que las células MEFs normales son más resistentes (Zhao et al., 2006).

#### **4.2.2. DUSP6.**

El gen que codifica para la proteína DUSP6/MKP-3/PYST1 se expresa constitutivamente o es inducido por factores de crecimiento como FGF (Ekerot et al., 2008). Su localización celular es citosólica y su sustrato específico es ERK1/2. El promotor de DUSP6 presenta posibles secuencias reguladoras para los factores de transcripción forkhead y los factores de transcripción de la familia Ets, que son

conocidos como dianas de ERK. Además, la vía de ERK aparece como el principal regulador de la expresión de DUSP6, en un bucle negativo inducido por la señal de FGF (Bermudez et al., 2010; Keyse, 2008).

DUSP6 es otro de los miembros de la familia de las fosfatasas DUSP que ha sido implicado en el desarrollo de cáncer. Su expresión se encuentra aumentada en cáncer de páncreas, mieloma, melanoma, glioma, queratinocitos y mama, e inhibida en cáncer de pulmón (Bermudez et al., 2010).

## **5. TÉCNICAS DE ESTUDIO EN CÁNCER: MICROARRAYS.**

Los sistemas de análisis genómico masivo (microarrays) permiten analizar el nivel de expresión de miles de genes de manera simultánea en un solo experimento. Los microarrays de expresión se han empleado en el estudio de la taxonomía molecular del cáncer y como herramienta de pronóstico y predicción de la respuesta a posibles tratamientos (Cigudosa, 2004; Herbst et al., 2008).

Como ejemplo, se ha identificado el perfil de expresión génica que asocia subtipos de CNMP con poca recurrencia o con la supervivencia de pacientes. En este sentido, al menos tres estudios han ayudado a separar los adenocarcinomas de pulmón en tres subgrupos que expresan de forma diferencial un conjunto de genes. Esos subgrupos tienen diferentes patrones de supervivencia, siendo los de peor pronóstico aquellos adenocarcinomas que expresan de forma preferente genes de diferenciación neumocítica y tienen una alta expresión de genes implicados en procesos de remodelación tisular y actividad proliferativa (Virtanen et al., 2002). También se ha identificado mediante microarrays un grupo de genes (*MMPI*, *ANGPTLA*, *CXCL1*, *CXCR4* y *TNC*) que median la metástasis a pulmón desde el cáncer de mama, y que se ha correlacionado clínicamente con el desarrollo de metástasis en pulmón cuando estos genes se expresan en el tumor primario (Minn et al., 2005).

Por otro lado, la combinación de éstas técnicas de análisis masivos y metodologías más recientes, como son la inhibición de la expresión génica mediante el uso de ARNi de un gen junto con técnicas tradicionales de cultivos celulares, ha facilitado la interrelación entre perfil génico y funcionalidad de determinados procesos biológicos. Mediante la técnica de ARNi en células en cultivo se ha podido dilucidar el potencial del gen cuya expresión se ha inhibido para el estudio del perfil genético en los sistemas de mamíferos (Cigudosa, 2004; Herbst et al., 2008).

# **OBJETIVOS**

---

Siguiendo la línea de investigación orientada a definir el papel de DUSP1 en cáncer, el objetivo principal de esta tesis es profundizar en el estudio del papel que juega la fosfatasa DUSP1 implicada en diferentes vías de señalización celular en la progresión tumoral en CNMP. Para este estudio se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1. Investigar la función de DUSP1 en células de CNMP.
2. Valorar la función de DUSP1 en respuesta al agente quimioterápico CDDP en células de CNMP.

El abordaje experimental combina la tecnología de ARNi (en concreto la inhibición de DUSP1) y el estudio de los perfiles de expresión génica por *microarrays* de expresión. Esta estrategia aporta un perfil de expresión diferencial de los genes dependiendo de la expresión de DUSP1.



---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **1. Cultivos celulares.**

Para el desarrollo de este trabajo hemos utilizado las siguientes líneas celulares humanas: H460 y H23 carcinoma y adenocarcinoma de CNMP; MCF7, adenocarcinoma de cáncer de mama; HEK293T<sub>17</sub>, células epiteliales inmortalizadas embrionarias de riñón; HT1080, células de tejido conectivo de fibrosarcoma y HeLa, adenocarcinoma de cáncer de cérvix. Todas ellas se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las líneas celulares H460v (vector vacío) y H460cri que expresan un vector de ARNi que inhibe la expresión de DUSP1 han sido generadas previamente en el laboratorio (Chattopadhyay et al., 2006). Todas ellas se mantuvieron en cultivo en las condiciones recomendadas por la ATCC. También se utilizaron cultivos primarios de células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC), cedidas por la Dra. Benilde Jiménez, los cuales se cultivaron en medio MCDB131(Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 2mM de L-glutamina (Invitrogen), 10µg/mL factor de crecimiento epidermal (Peprotech), 10µg/mL de hidrocortisona (Sigma) y 16,32 mg/mL extracto de pituitaria bovina (Invitrogen). Todas las células se mantuvieron en condiciones estándar de humedad (95%), presión de CO<sub>2</sub> (5%) y temperatura (37°C).

### **2. Reactivos y tratamientos.**

El cisplatino se obtuvo de FarmaFerrer y se utilizó a la dosis 10µg/mL. Los inhibidores de p38 (SB203580) y de JNK II (SP600125) de Calbiochem se usaron a las dosis indicadas en cada figura. Los antibióticos G418 (Sigma-Aldrich) y puromicina (Invitrogene) se utilizaron a las dosis de 2,5 mg/ml y 2-2,5 µg/ml respectivamente. Las células se sembraron en medio completo a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células en placas de 20cm<sup>2</sup> y a las 16 horas se cambió el medio a 0.5% FBS durante 24 horas y se sometieron a los tratamientos indicados en cada una de las figuras correspondientes.

### **3. Vectores y construcciones.**

El vector pSuperRetro codifica para un ARNi de DUSP1 (pSuperDUSP1) (Chattopadhyay et al., 2006) y el vector pLXSNDUSP1 (Sanchez-Perez et al., 2000) codifica para el gen DUSP1. El vector de expresión pCELP38α (p38), fue cedido por A.R. Nebreda y el vector de expresión 219 (pCDNA3JNK) por Silvio Gutkind. El vector de expresión eucariota pCTAP se obtuvo de Stratagene. Este vector contiene las

proteínas de unión estreptavidina y calmodulina en el extremo 5' del correspondiente gen. La construcción pCTAPDUSP1 se realizó por clonación de la secuencia de DUSP1 entre los sitios EcoRI y BamHI. Además, el plásmido pGL3DUSP6 que contiene el promotor de DUSP6 con el reportero de luciferasa fue cedido por el Doctor Jonathan D. Licht (Morrison et al., 2008).

pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-DUSP1 es un vector lentiviral de segunda generación (pGIPz) que expresa la secuencia de inhibición shRNA<sup>mir</sup> V2LHS\_160994 (Open Biosystems) dirigida contra el ARN mensajero de DUSP1 humano. Como control se utilizó una secuencia shARN<sup>mir</sup>-NS (non-silencing) que no presenta homología con ningún gen conocido de mamíferos, y procede del vector pGIPz-shARN<sup>mir</sup>-NS (Open Biosystems).

#### **4. Transfecciones y ensayos de actividad luciferasa.**

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células H460v, H460cri o HEK293T en placas de 20cm<sup>2</sup> quedando a un 60-70% de confluencia. Transcurridas 24 horas las células se transfectaron usando el reactivo lipídico Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En todos los casos se utilizó 1 µg de ADN total por ensayo con una relación ADN: lípido de 1:3. Las células se recogieron a las 48 horas después de la transfección.

Para las transfecciones estables se añadió el antibiótico G418 para el que tienen resistencia los plásmidos pLXSNDUSP1 y CTAPDUSP1, seleccionando las células que expresan DUSP1 de manera estable.

También se utilizaron en transfecciones transitorias, los oligoribonucleótidos de ARNi para ATF2 (HSS102266, Stealth Select ARNi) y el control negativo ARNi (stealth RNAi Negative Control) que se obtuvieron de Invitrogene.

Por otra parte, se co-transfectaron las células con los plásmidos pGL3DUSP6 (250 ng o 500 ng) y gen reportero renilla (5 ng). A las 48 horas de la transfección, las células se lisaron con el tampón comercial Reporter Dual Lysis buffer (Promega). Los lisados celulares se centrifugaron y con 10 µg de proteína del sobrenadante se cuantificó la actividad luciferasa usando un luminómetro Glomax 96-microplate Reader (Promega). Como control de transfección, las células se cotransfectaron con una construcción del promotor de CMV seguido del gen renilla. La actividad luciferasa se expresó por microgramo de proteína y se normalizó con la luminiscencia de la renilla en el mismo extracto.

### **5. Generación de líneas celulares mediante el uso de lentivirus.**

Para obtener células expresando de forma estable el ARNi de DUSP1 se generaron partículas lentivirales anfotrópicas no replicativas, empleando los vectores lentivirales de segunda generación descritos en el apartado “Vectores y construcciones”. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células de HEK293T en placas de  $10 \text{ cm}^2$  y al día siguiente se co-transfectaron con los siguientes plásmidos;  $8 \mu\text{g}$  del Vector pGIPz-shARN<sup>mir</sup>-NS (control) ó pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-DUSP1,  $8 \mu\text{g}$  del plásmido empaquetador pCD-NL-BH y  $8 \mu\text{g}$  del plásmido de la envuelta (envuelta glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular (VSVg) pMD2.G) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Tras 6 horas se refrescó el cultivo en medio nuevo. Después de 24 horas se refrescó de nuevo el cultivo y a las 48 y 72 horas se recogieron los sobrenadantes que contenían partículas lentivirales, se pasaron por un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  y se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior.

Para la determinación de la multiplicidad de infección (MOI) los sobrenadantes que contenían partículas lentivirales (48 ó 72 horas) se infectaron en células HeLa. Para la titulación a las 72 horas de la infección se determinó el porcentaje de células GFP positivas (GFP<sup>+</sup>) por citometría de flujo (FACS).

Para inhibir la expresión de DUSP1 en las líneas celulares se añadieron los sobrenadantes que contenían las partículas lentivirales correspondientes al medio de cultivo a una MOI de 2,5, en presencia de  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  polibreno (Sigma) durante 16h. Para seleccionar las células infectadas se añadió puromicina ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) al cultivo durante 10 días. Posteriormente se extrajo el ARN de las células y se comprobó mediante qRT-PCR los niveles de expresión de DUSP1.

### **6. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.**

Las células se cultivaron en placas de  $20 \text{ cm}^2$ . Transcurridos los tiempos de inhibición o estimulación a evaluar, las células, tanto control como tratadas, se lavaron en solución fosfato salina (PBS), se recogieron mediante tripsinización (tripsina/EDTA, Gibco) y se centrifugaron (10min, 1000rpm). Posteriormente se resuspendieron en 1 mL de PBS y se fijaron en etanol al 70% en frío toda la noche. Una vez fijadas, las células se lavaron 2 veces con PBS, se permeabilizaron y tiñeron en 1 mL de citrato sódico 2,5 mM (Merck) y 1mg de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 minutos

a temperatura ambiente. La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se determinó mediante la adquisición y análisis de las muestras en un citómetro de flujo (FACScan, Becton-Dickinson). Se adquirieron 10000 eventos por muestra y esta población se analizó usando el programa de análisis Cell Quest Pro (Becton-Dickinson).

### **7. Análisis de expresión de proteínas mediante “Western blotting”.**

En cada caso, las células tratadas se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con el tampón que contiene: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 25 mM HEPES; 20 mM β-GlicerolFosfato; 0,1% TritonX-100 y los inhibidores: 100 µg/ml PMSF; 2µg/ml Leupeptina; 1 µg/ml PeptatinaA; 2 µg/ml Aprotinina; 0,1mM Ortovanadato; 0,5 mM DTT. Los lisados se centrifugaron a 14.000 rpm, a 4°C y durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se midió la cantidad de proteína por el método Bradford. Se cargaron 20 µg de proteína en geles SDS-poliacrilamida (Biorad) y posteriormente se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo. Tras comprobar la transferencia de las proteínas a la membrana con Rojo Ponceau S (Sigma), las membranas se bloquearon con 5% leche desnatada ó 5% BSA (Sigma) disueltos en TBS (20mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) y 0,1% Tween-20 (Sigma). Las membranas se incubaron durante toda la noche con los correspondientes anticuerpos primarios (ver anticuerpos y condiciones en la Tabla 2). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-ratón/conejo (Biorad), conjugados directamente con peroxidasa. Mediante una reacción de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Santa Cruz Biotechnology) se detectaron las bandas por autorradiografía (Konica).

**Tabla 2. Anticuerpos, especie, casa comercial y condiciones de incubación.**

Antígeno	Especie	Casa comercial	Dilución WB
p-JNK (V7391)	Conejo	Promega	1:5000
JNK (C-17)	Conejo	Santa Cruz Bio	1:1000
p-ATF2 (Thr71)	Ratón	Cell Signaling	1:1000
ATF2 (sc-187)	Conejo	Santa Cruz Bio	1:1000
p-P38 (9211S)	Conejo	Cell Signaling	1:2000
p38 (C20)	Conejo	Santa Cruz Bio	1:1000
p-c-jun (sc-822)	Ratón	Santa Cruz Bio	1:1000
cjun (h16)	Conejo	Santa Cruz Bio	1:1000
GADD45 (sc-797)	Conejo	Santa Cruz Bio	1:1000
p-MKK3/6 (Ser189/207)	Conejo	Cell Signaling	1:1000
$\beta$ -tubulina	Ratón	Sigma	1:1000

### 8. Estudio de perfiles de expresión génica mediante el uso de *microarrays*.

Se extrajo el ARN de las líneas celulares H460v y H460cri sin tratamiento o tratadas con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cisplatino durante 1, 3 y 6 horas. La extracción se realizó al 80% de confluencia celular en todos los casos y por duplicado.

El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y se purificó con el *kit Mini RNeasy* (Qiagen). La calidad del ARN se confirmó por la relación entre el ARN ribosómico 28S y 18S mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa y posterior teñido con Syber-Safe (Invitrogen).

La plataforma de arrays de expresión utilizada fue GeneChip Human Genome-U133 plus 2.0, de la casa Affymetrix. Esta plataforma contiene 54.000 grupos de sondas (probe set) para analizar los niveles de expresión de más de 47.000 transcritos y variantes, incluyendo más de 38.500 genes humanos bien caracterizados. Las hibridaciones y el procesamiento inicial de los datos obtenidos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Farmacogenómica, CIMA, Universidad de Navarra.

Se sintetizó ARNc biotinilado a partir de 2  $\mu\text{g}$  de ARN total utilizando el *3'Amplification One-cycle Target labeling kit* (Affymetrix) y a continuación se fragmentó a 95° durante 35 min en fragmentos de 35-200 bases y se hibridaron 10  $\mu\text{g}$  de ARNc biotinilado y fragmentado sobre *microarrays HG-U133 plus 2.0* (Affymetrix) a 45°C durante 16h en un horno de hibridación a 60 rpm. Después los *microarrays* se lavaron y tiñeron en una *Affymetrix Fluidics Station 450* siguiendo los protocolos



estándar de Affymetrix, y se leyeron en un *Affymetrix Gene Chip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix).

Para la obtención de los valores de expresión génica normalizados se utilizó el algoritmo RMA (Robust Multi-array Average) (Irizarry et al., 2003). Los niveles de intensidad de las sondas del *probe set* se corrigieron con la señal del fondo teniendo en cuenta la secuencia de cada sonda y se normalizaron para poder posteriormente comparar y analizar varios microarrays a la vez y finalmente se unificaron, dando lugar a una única medida de expresión por *probe set*.

Dependiendo del estudio a realizar, se utilizaron diferentes comparaciones. En el primer análisis para estudiar los cambios funcionales derivados de la inhibición en la expresión de DUSP1 en células de CNMP, se seleccionaron aquellos genes cuya expresión aumentaba o disminuía ocho veces o más con respecto al control correspondiente y en el segundo análisis para el estudio de la influencia del tratamiento con CDDP sobre la expresión génica asociada a cambios en DUSP1, se seleccionaron genes cuya expresión aumentaba o disminuía al menos tres veces con respecto a su control. Los datos de expresión génica se depositaron en NCBI's Gene Expression Omnibus, GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y son accesibles a través del GEO, con números de acceso GSE19592 y GSE26704.

Para la clasificación funcional de los genes obtenidos, se utilizó el programa Gene Ontology Tree Machine (GOTM). Ésta es una plataforma basada en la información ontológica obtenida a partir de diferentes bases de datos que agrupa los genes a estudiar dependiendo de su función biológica, ubicación celular y procesos biológicos en los que participa. El programa además realiza un análisis estadístico identificando los grupos más significativos. Tras este segundo filtro, se procedió a un estudio bibliográfico completo de los genes seleccionados a través de las bases de datos de GeneCard y PubMed (<http://bioinfo.weizman.ac.il/cards/index.html>) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

## **9. Análisis de expresión génica por qRT-PCR.**

La expresión de los genes seleccionados en el apartado anterior, se validó mediante la técnica de PCR a tiempo real. La extracción del ARN total de las células se realizó usando el reactivo Trizol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención del ADNc, se partió de 1 µg del ARN total que se retro-transcribió a 37°C durante 2h usando el kit *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems). Cada ADNc se analizó por triplicado usando el ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Applied Biosystems). La PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla de reacción Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Los cebadores y sondas Taqman usadas para la detección de los genes diana proceden de Applied Biosystems, con los códigos para cada ensayo indicados en la Tabla 3:

**Tabla 3. Ensayos utilizados para la valoración cuantitativa de la expresión génica.**

Gen	Ensayo ID	Gen	Ensayo ID
<i>ATF2</i>	Hs 00153179_m1	<i>GADD45</i>	Hs 00169255_m1
<i>ATF3</i>	Hs 00231069_m1	<i>MAP2K6</i>	Hs 00177150_m1
<i>ATF5</i>	Hs 00247172_m1	<i>MLK1</i>	Hs 00252979_m1
<i>BMP2</i>	Hs 00154192_m1	<i>MLK2</i>	Hs 00539161_s1
<i>DUSP1</i>	Hs 00610256_g1	<i>NRP1</i>	Hs 00826128_m1
<i>DUSP6</i>	Hs 00737962_m1	<i>SH2D2A</i>	Hs 00610216_ml
<i>IL1A</i>	Hs 00174092_m1	<i>SRF</i>	Hs 00182371_m1
<i>IL8</i>	Hs 00174103_m1	<i>VEGFC</i>	Hs 00153458_m1

Los parámetros utilizados para la amplificación génica fueron los siguientes: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 sec a 95°C y 1 min a 60°C. Los genes  $\beta$ -actina (ensayo ID: Hs99999903\_m1) y ARN ribosomal 18S (ensayo ID: Hs99999901\_s1) se amplificaron como controles internos.

La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Giulietti et al., 2001). Este método consiste en normalizar la expresión de cada uno de los genes analizados respecto a la expresión de un gen endógeno de referencia ( $\beta$ -actina), y posteriormente en calcular la expresión normalizada de cada gen en la muestra problema respecto a la expresión normalizada del mismo gen en la muestra de referencia, presentándose los datos como el “cambio en veces de expresión” (RQ). Las barras de error se calcularon en base al cálculo máximo (RQmax) y el cálculo mínimo (RQmin) de los niveles de expresión y representan la D.E de la media del nivel de expresión (RQ).

También se valoró el cambio en expresión a partir del ARN total en las líneas celulares por RT-PCR semicuantitativa. El ADN complementario de cadena simple

(ADNc) se sintetizó a partir de 5 µg de ARN total. Inicialmente se incubó el ARN durante 5 minutos a 65° y posteriormente se añadió una mezcla de reacción que contenía 100 unidades de la enzima Transcriptasa Reversa Superscript (Clontech), el tampón de la enzima, mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP 1mM cada uno) y 0,1 µg/ml de oligo poli(dT) (cebador). El volumen de reacción final se llevó a 50 µl con H<sub>2</sub>O y se incubó durante 2 horas a 37 °C, seguido de 5 minutos a 95°C. Los genes *ATF2*, *DUSP1* y *GAPDH* se amplificaron a partir de 0,2 µg del ADNc; en cada reacción de PCR se amplificó simultáneamente el gen problema y el gen de referencia *GAPDH* como control de carga. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 50 µl que contenía: 0.5 unidades de Taq polimerasa (Dynazime), el tampón de la enzima, la mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP 1mM cada uno) y 0,1 µg/ml de los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada gen, cuyas secuencias están listadas en la tabla 4:

**Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes *ATF2*, *DUSP1* y *GAPDH*.**

Nombre	Oligos
<i>ATF2 sentido</i>	5'CTGGAAGCAGAGTAAATAAAG3'
<i>ATF2 antisentido</i>	5'TTAAACAAACCCACTTCTTCA3'
<i>DUSP1 sentido</i>	5'CATGGAAGTGGGCACCCTGGACG3'
<i>DUSP1 antisentido</i>	5'GCGCTCGTCCAGGAACACCACGGC3'
<i>GAPDH sentido</i>	5'GAGAGACCCTCACTGCTG3'
<i>GAPDH antisentido</i>	5'GATGGTACATGACAAGGTGC3'

Las condiciones de amplificación fueron: a) 1 ciclo de 95°C durante 5 min, b) 27-36 ciclos de: 95°C durante 1 min, 54°-60°C durante 1 min y 72C durante 1 minuto c) 8 min a 72°C. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Syber safe.

#### **10. Curvas de crecimiento celular.**

Se sembraron  $4 \times 10^4$  células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se dejaron crecer con medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% FBS. Cada día se fijó una columna de la placa de 24 pocillos (1,9cm<sup>2</sup>) (4 pocillos) con 1% glutaraldehido y se lavó posteriormente con PBS. La placa se mantuvo en el incubador a 37 °C de

temperatura, en 95% de humedad y 5% de presión de CO<sub>2</sub>, hasta fijar todos los pocillos a lo largo de los 6 días de ensayo. Después las células se tiñeron con una disolución al 0,1% del colorante cristal violeta en agua destilada. El número de células se estimó midiendo la absorbancia a 595nm después de desteñir el exceso de colorante con ácido acético (10%). Se realizaron dos experimentos independientes por cuadruplicado. Las gráficas muestran el porcentaje de crecimiento con respecto a las células fijadas el día 0, representándose la media con sus correspondientes desviaciones.

### **11. Preparación de medios condicionados a partir de cultivos celulares.**

Para la realización de los ensayos de angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* se prepararon medios condicionados de células H460v y H460cri. Para ello se sembraron varias placas de 10cm<sup>2</sup> con cada línea celular y cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 10 ml de medio sin suero. A las 24h se recogieron los medios condicionados (MC), se centrifugaron a 1.500 rpm para eliminar los restos celulares, se añadió 1mM PMSF (inhibidor de proteasas de tipo serina) y se concentraron por centrifugación (2.500 rpm) a 4°C con centricones Amicon Ultra (Millipore), con un tamaño de exclusión molecular de 10kDa. Se lavó el concentrado tres veces con PBS. En este proceso, cada fracción de 10ml de MC inicial se concentró unas sesenta veces hasta un volumen final aproximado de 150µl. Posteriormente se midió la cantidad de proteína mediante el reactivo Bradford (Bio-Rad), se alicuotó y almacenó a -80°C.

### **12. Ensayo de migración e invasión celular.**

Para el ensayo de migración se sembraron 1,5x10<sup>6</sup> células en placas de 56 cm<sup>2</sup>, dejándolas posteriormente 48 horas a 0,5% FBS hasta que llegaron a confluencia. A continuación, se realizó una “herida” o incisión a modo de línea recta de manera transversal en la placa con una punta de pipeta. Seguidamente, se lavó la placa dos veces con PBS para descartar los restos celulares generados y se añadieron 10 ml de medio RPMI al 10% FBS. Las placas se mantuvieron en una cámara a 37 °C de temperatura, con 95% de humedad y 5% de presión de CO<sub>2</sub>. Se tomaron fotos en el momento de hacer la herida y 24 horas después con un microscopio Nikon Eclipse TS100. La distancia relativa entre ambos extremos de la herida se calculó utilizando el

software DS-L1. Se analizaron 10 campos y en cada campo se realizaron tres medidas. En cada línea celular se repitió tres veces el ensayo con muestras independientes.

Para el ensayo de invasión celular se utilizaron cámaras de invasión BD Biocoat Matrigel™ con factores de crecimiento reducido (BD Biosciences), en el cual se sembraron  $2,5 \times 10^6$  células incubadas en ausencia de suero durante las 16 horas en la parte superior del filtro, mientras que en la parte inferior se puso medio con FBS al 10-20% como quimioatrayente. Tras la incubación entre 18-24h, las células que no habían migrado/invadido se retiraron con un bastoncillo de algodón y los filtros se fijaron y tiñeron con Diff Quik (Dade Behring). Se contó el número de células que había migrado/invadido en un microscopio con luz visible a 40x aumentos, en 10-20 áreas diferentes.

### **13. Ensayos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.**

Para evaluar la capacidad migratoria de las células HMVEC se utilizaron también cámaras de Boyden modificadas pero con filtros de policarbonato (6,5mm de diámetro y  $8\mu\text{m}$  de tamaño de poro) (Costar) se cubrieron durante 16h con 0.5% de gelatina (Gibco) en PBS. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células endoteliales en la parte superior del filtro en medio sin suero, mientras que en la parte inferior se añadieron 700 $\mu\text{L}$  de medio basal suplementado con 10% FBS (control positivo), medio con 0% FBS (control negativo) ó 30  $\mu\text{g/mL}$  del medio condicionado correspondiente. El procesamiento de los filtros se realizó como se explica en el apartado anterior.

Para estudiar la angiogénesis *in vivo*, se utilizaron ratones Athymic nude-Fox 1 nu/nu que se inyectaron subcutáneamente cerca del abdomen en un volumen de 300 $\mu\text{L}$  de Matrigel (BD biosciences) mezclado con 30 $\mu\text{g}$  de proteínas de medio condicionado de las líneas celulares o PBS, en caso del control negativo (C-). Cada grupo experimental comprendía dos ratones inyectados en ambos flancos. Los ratones fueron sacrificados a los 10 días, se extrajeron las muestras y se procesaron mediante el protocolo de congelación siguiente: los tumores se trataron con concentraciones crecientes de sacarosa 15-30% en PBS, una vez los tumores caen al fondo de la solución de sacarosa, se embeben en una dilución 1:1 de 30% sacarosa en PBS: OCT (Qiagen) (30 minutos a T.A), por último se embebe en OCT puro (15 min) y se congelan los tumores con nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de 10 $\mu\text{m}$  de matrigel congelado y se guardaron en portaobjetos para su posterior tinción por inmunofluorescencia a  $-80^\circ\text{C}$ .

Los ratones utilizados en los experimentos, se mantuvieron en un ambiente estéril con viruta, agua y comida esterilizada por rayos  $\gamma$  *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo según la normativa europea del uso de animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre).

#### **14. Inmunofluorescencia.**

##### **14.1. En implantes subcutáneos de matrigel.**

Los portaobjetos obtenidos al cortar las secciones del matrigel se fijaron siguiendo los siguientes pasos: acetona, acetona-cloroformo (1:1) y acetona. Todos estos pasos se realizaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las secciones se bloquearon en PBS con suero bovino (BSA) al 3%, incubándose posteriormente con el anticuerpo policlonal de conejo anti-Von Willebrand (Dako) diluido (1:1000) en BSA (3% en PBS) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras los correspondientes lavados con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG, conjugado con Alexa 546) (Molecular Probes) diluido (1:350) en BSA (3% en PBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se tiñeron 5 minutos con  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) para la detección de los núcleos y se lavaron y montaron con Reactivo Prolong (Molecular Probes). Las preparaciones se analizaron en un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 35 TV. En cada sección se analizó la densidad microvascular en 20 campos elegidos al azar. La medida de la densidad microvascular se determinó como eventos por área y para la cuantificación se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health (NIH), USA). También se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal espectral TCS SP5 DMI600 (*software* de confocal LAS AF 1.8.1, Leica). Cada canal fue grabado independientemente y las imágenes se generaron por superposición.

##### **14.2. En muestras humanas de CNMP.**

La expresión de DUSP1, VEGFC y CD31 se valoró por inmunofluorescencia en 25 muestras de tumores primarios procedentes de pacientes de CNMP. Las muestras humanas se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se realizó una doble inmunotinción para analizar: CD31 y DUSP1 o; VEGFC y DUSP1. Se utilizaron secciones de  $3\mu\text{m}$  de tejido tumoral. Después de la desparafinación, se realizó el desenmascaramiento antigénico con la incubación de una solución EDTA (pH 9.0)

(Dako). Las secciones se bloquearon en 5% de suero bovino (BSA) en TBS durante 10 minutos para quitar las uniones no específicas y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios DUSP1 (Santa Cruz Biotech, dilución 1:100), VEGFC (DAKO, dilución 1:100) y CD31 (DAKO, dilución 1:100). A continuación se usaron los siguientes anticuerpos secundarios: para DUSP1 cabra anti-raton IgG conjugado con Alexa Fluor 655, (Molecular Probes) diluido (1:700), para VEGFC y CD31 cabra anti-conejo IgG conjugado con Alexa Fluor 488, (Molecular Probes) diluido (1:700). Finalmente las secciones se tiñeron con 1µg/mL 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vysis) para la detección de los núcleos. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron en una plataforma de Dako Autostainer. Las imágenes y el análisis de la tinción se evaluó utilizando un microscopio de luz (Leica DM2000, Leica Application Suite v2.8.1). La composición de cada imagen se realizó en el software ImageJ (NIH).

### **15. Ensayos de tumorigénesis *in vivo*.**

Se utilizaron 6 ratones Athymic nude-Fox 1 nu/nu para cada línea celular. Las células tumorales se resuspendieron en solución salina ( $1 \times 10^6$  células/0,1 ml) e inocularon de forma subcutánea en los dos flancos traseros de los ratones. El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición visible (volumen inicial  $0,2 \text{ mm}^3$ ) calculándose según la ecuación  $V = (l \cdot w^2 \cdot 0.52)$ , donde l es el diámetro mayor del tumor y w el diámetro menor. Cuando el volumen del tumor en el flanco del ratón alcanzó  $0,5 \text{ mm}^3$  se sacrificaron y extrajeron los tumores. Una parte fue procesada para realizar los ensayos de inmunofluorescencia según se ha descrito en el apartado anterior.

En este caso se utilizó el anticuerpo primario anti-CD31 (1:100) y el anticuerpo secundario (anti-rata IgG conjugado con Alexa 546) (Molecular Probes) diluido (1:850). En cada caso, la parte del tumor restante se fijó en formalina y se embebió en parafina para la realización de ensayos de inmunohistoquímica.

### **16. Inmunohistoquímica.**

Se realizó una doble inmunotinción de CD31 y de VEGFC en secciones en parafina de 3 µm de tejido tumoral obtenidas de los tumores embebidos en parafina descritos en el apartado anterior. Las muestras se desparafinaron y la actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en metanol

durante 5 min a temperatura ambiente. El desenmascaramiento antigénico se realizó mediante incubación con una solución EDTA (pH 9) (Dako) utilizando DakoLink facility.

Los portas se lavaron en una solución salina tamponadora con tampón Tris que contenía Tween 20 a pH 7,6 y después se incubaron con los anticuerpos policlonales primarios anti-VEGFC y anti-CD31 (DAKO) diluidos 1:100 en BSA (1% en TBS) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa (Flex+, Dako). Como sustrato cromogénico se añadió diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se contrastaron utilizando hematoxilina-eosina, se deshidrataron progresivamente por inmersión en soluciones de alcohol de diferente grado y se secaron en xileno.

Todas las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en una plataforma de Dako Autostainer. Como controles negativos se utilizaron secciones seriadas de las mismas muestras incubadas con suero no inmunizado y como control positivo se tiñeron secciones de tumor colorectal humano.

La expresión de CD31 y VEGFC se valoró utilizando un microscopio Leica (DM2000) y mediante un análisis doble ciego por dos patólogos. Para cuantificar la expresión de VEGFC se utilizó la puntuación histológica (H-score) descrita previamente (Rojo et al., 2007). La densidad microvascular se calculó utilizando la tinción de CD31 con el software ImageJ (NIH) que reconoce estructuras vasculares (Costa and Vendeira, 2008; Zhang et al., 2006). Las áreas de inflamación, necrosis, tumor esclerótico y tejido benigno adyacente se excluyeron para el cálculo de la densidad microvascular.

Los tumores obtenidos a partir de los ensayos de metástasis descritos en el siguiente apartado, se caracterizaron teniendo en cuenta el índice mitótico, el grado de necrosis y la presencia de estructuras glandulares (Hamilton et al., 2000). En algunas secciones de estos bloques que contenían tumor se tiñeron con los siguientes anticuerpos: anti-AE1/AE3 (mezcla de dos anti-citoqueratinas) (Progne), anti-vimentina (Enzo Life Sciences), anti-Ki67 (Chemicon) y anti-Antígeno carcinoembrionario (Novocastra). Posteriormente las secciones se examinaron microscópicamente (microscopio Leica DM LS2 unido a cámara digital Leica EC3) para caracterizar el



tumor y detectar su presencia en aquellos órganos en los que no se observó macroscópicamente.

Además, solo en los pulmones del ensayo de metástasis, también se utilizó el anticuerpo primario anti-CD31 para visualizar estructuras vasculares. La expresión de CD31 se valoró utilizando un microscopio Leica (DM2000) y la puntuación histológica (H-score) descrita.

### **17. Ensayo de metástasis.**

Se utilizaron 22 ratones Athymic nude-Fox 1 nu/nu, de seis semanas de vida distribuidos en dos grupos de 11 animales. Antes de la inoculación de las células tumorales, se indujo la vasodilatación de la vena de la cola para facilitar su inyección. A cada grupo se le inoculó por vía intravenosa lateral de la cola una cepa diferente de células tumorales. La cantidad inoculada fue de  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ L de solución salina. Posteriormente se registró a diario cualquier anomalía externa y el peso de cada animal.

### **18. Necropsias y análisis histopatológico.**

Tras la muerte de cada animal se llevó a cabo la necropsia completa. Los órganos cervicales, torácicos, abdominales y pélvicos se extrajeron en un solo bloque y la presencia de tumor se analizó macroscópicamente en cada órgano. Cada foco de tumor se midió y quedó registrada la presencia de cualquier otra anomalía macroscópica.

Los pulmones se perfundieron y el bloque completo de órganos se fijó en formaldehído (4% en solución de tampón fosfato) durante 24 horas. El cerebro también se extrajo y se fijó en la misma solución. Tras la fijación, los órganos se diseccionaron del bloque y se tomaron las fotografías apropiadas de cada tumor y de las anomalías presentes con una cámara digital Nikon Coolpix 5700. El tumor y cada órgano en su totalidad se procesaron y embebieron en parafina. Se obtuvieron secciones de 4  $\mu$ m de grosor de cada bloque de parafina y, o bien se tiñeron con hematoxilina-eosina o se utilizaron para el análisis inmunohistoquímico descrito en el apartado anterior.

## **19. Análisis estadístico.**

### ***T-student***

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo por el soporte informático *SPSS* (versión 17.0) y *Microsoft Excel*. Con estos programas se calculó: el valor medio, la desviación estándar (D.E) y la significación estadística, que se obtuvo utilizando el test *t-Student* para distribuciones normales no pareados de dos colas. Todas las p-value iguales o inferiores a 0,05 fueron consideradas como estadísticamente significativas.

### **H-score**

La H-score se determinó por la estimación del porcentaje de células positivas teñidas en el citoplasma con una intensidad baja, media o alta. La puntuación final se estimó utilizando la siguiente fórmula: H-score= (expresión baja %)\*1+ (expresión media%)\*2+ (expresión alta%)\*3.

### **Kaplan y Meier**

La estimación del tiempo de supervivencia se realizó de acuerdo al Método de Kaplan y Meier (Kaplan and Meier, 1958), que se usa también para variables no paramétricas. En las curvas de supervivencia acumulada se consideraron casos nulos aquellos animales que no habían muerto a causa del tumor a los 7 meses. La distribución de la supervivencia entre los grupos se comparó con el Test de Log-Rank (Mantel, 1963), que se utiliza igualmente para variables no paramétricas. En todos los casos, consideramos como diferencias estadísticamente significativas los valores de  $p < 0,05$ .

---

# **RESULTADOS**

---

## **1. PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE DUSP1**

### **1.1. Perfil de expresión génica diferencial derivado de la inhibición de la expresión de DUSP1.**

La línea celular deficiente en DUSP1 (H460cri) se generó previamente en el laboratorio (Chattopadhyay et al., 2006). Las propiedades de esta línea celular se corroboraron en el inicio de este trabajo a través del tratamiento de las células H460cri y H460v con CDDP, analizándose la fosforilación de JNK. Puesto que en respuesta a cisplatino se activa JNK, al inhibir la expresión de DUSP1 (H460cri) se observó que la activación por fosforilación de JNK se adelanta en el tiempo respecto a la línea celular H460v (datos no mostrados). A lo largo de este trabajo también se verificó la inhibición de la expresión de DUSP1 en células H460cri mediante qRT-PCR.

Mediante la hibridación de *microarrays* de ADN se analizaron los cambios globales en expresión génica en la línea celular H460cri respecto de las células H460v. Se encontraron 136 genes con cambios en la expresión (inducida o reprimida) de al menos ocho veces en la línea H460cri respecto de la H460v. Estos 136 genes se analizaron con el programa Gene Ontology Tree Machine (GOTM) y se obtuvieron 45 grupos funcionales con un valor estadístico  $p < 0,01$ . Entre estos grupos, se identificaron varios involucrados en progresión tumoral, como son; actividad fosfatasa de MAPK quinasa, angiogénesis, señalización celular, factores de crecimiento y receptores de transmembrana (Tabla 5).

**Tabla 5. Genes seleccionados tras comparar los perfiles de expresión de células H460cri vs H460v.**

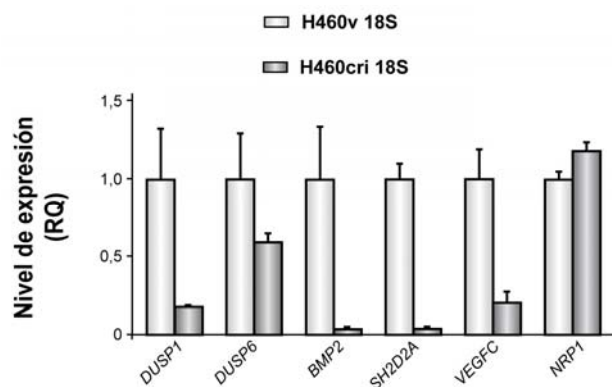
Identificación de genes diferencialmente expresados

Función GO y Símbolo génico	Nº de acceso	Sonda ID	Cambio de expresión*	
Actividad MAPK quinasas fosfatasa	DUSP1	NM_004417	201044_x_at	-3.31
	DUSP6	NM_001946	208891_at	-3.04
Angiogénesis	NRP1	NM_003873	212298_at	3.28
	SH2D2A	NM_003975	207351_s_at	-11.11
	VEGFC	NM_005429	209946_at	-3.06
Señalización celular	BMP2	NM_001200	205289_at	-5.53
	GJB2	NM_004004	223278_at	-3.77
	WISP2	NM_003881	205792_at	3.15
Actividad del factor de crecimiento	DKK1	NM_012242	204602_at	-3.36
	EGFR	NM_005228	232541_at	-3.29
	GDF15	NM_004864	221577_x_at	4.27
Actividad del receptor transmembrana	ACVR1C	NM_145259	1552519_at	-3.41
	MERTK	NM_006343	206028_s_at	-3.92
	PTPRK	NM_002844	203038_at	3.27
	THBD	NM_000361	203887_s_at	-6.14
Actividad activadora del plasminógeno	PIK3R1	NM_181504	212239_at	-4.26
	PLAT	NM_000930	201860_s_at	-4.94
Constituyentes de la matriz extracelular	SERPINB2	NM_002575	204614_at	5.02
	COL3A1	NM_000090	215076_s_at	7.23
	LUM	NM_002345	201744_s_at	-34.00

\*Cambios de expresión comparando H460cri vs H460v (representado como fold change 2<sup>n</sup>)

## 1.2. Validación de los cambios identificados en expresión génica.

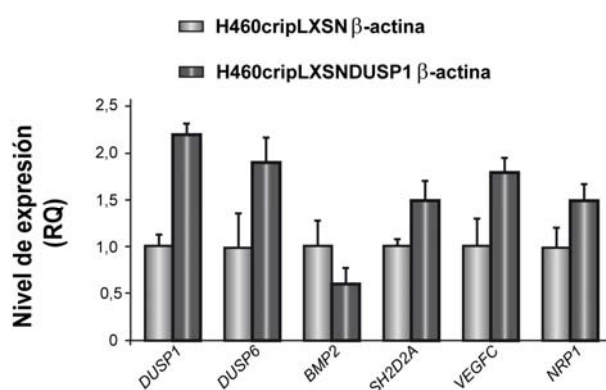
De entre los 136 genes obtenidos, se seleccionaron seis por su implicación en funciones biológicas relacionadas con progresión tumoral, metástasis y/o angiogénesis (Tabla 5), que se validaron mediante qRT-PCR, verificando en todos los casos los resultados obtenidos con los *microarrays* de expresión (Figura 6). Por un lado, se observa que DUSP1 y DUSP6 tienen una expresión reprimida en las células H460cri con respecto a células H460v. Este dato valida no solo el resultado del *microarray*, sino la técnica de la inhibición de la expresión del gen de interés (DUSP1) utilizada en el estudio. También se validó la expresión de los siguientes genes implicados en angiogénesis: Neuropilina 1 (NRP1), proteína 2 A con dominio SH2 (SH2D2A) y el factor de crecimiento del endotelio vascular tipo C (VEGFC). El gen NRP1 muestra sobreexpresión en las células H460cri, mientras que en las mismas células los genes VEGFC y SH2D2A están reprimidos. Finalmente, se validó también la expresión de la proteína morfogenética ósea tipo 2 (BMP2) por estar involucrada en las categorías “señalización celular” y “actividad de factores de crecimiento”. Al igual que en el *microarray*, los datos obtenidos por qRT-PCR muestran una menor expresión de BMP2 en las células H460cri.



**Figura 6. Validación de los cambios en expresión de los genes *DUSP1*, *DUSP6*, *BMP2*, *SH2D2A*, *VEGFC* y *NRP1*.** Análisis por qRT-PCR de los genes seleccionados en células H460v y H460cri en condición basal. Se muestran los niveles relativos de ARNm normalizados a los de la línea celular H460v. El gen utilizado como control interno fue el que codifica *18S* y se representa la media  $\pm$  D.E. de 3 experimentos independientes.

### 1.3. Implicación de la proteína DUSP1 en los cambios de expresión de los genes validados.

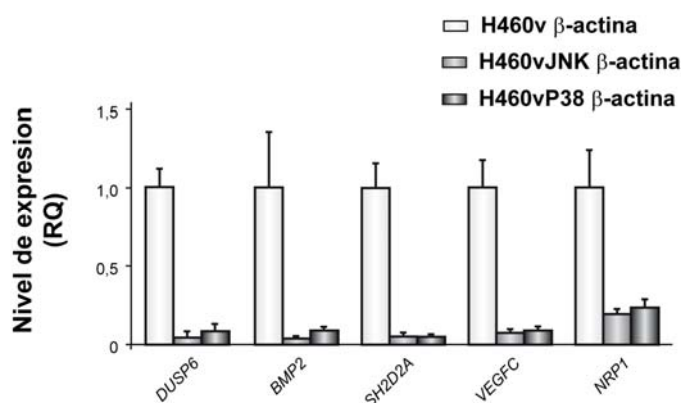
Para confirmar que los cambios observados se deben a la disminución en la expresión de DUSP1, se sobreexpresó esta fosfatasa de forma transitoria en la línea celular H460cri (H460cripLXSNDUSP1) y se estudió el efecto sobre la expresión de los seis genes seleccionados del *microarray*. Los datos de la Figura 7 muestran la recuperación parcial del nivel de expresión de los genes *DUSP1*, *DUSP6*, *SH2D2A*, y *VEGFC* en la línea celular H460v. Sin embargo, la expresión de *BMP2* no aumenta y la de *NRP1* no disminuye.



**Figura 7. Regulación de la expresión de los genes *DUSP1*, *DUSP6*, *BMP2*, *SH2D2A*, *VEGFC* y *NRP1* cuando se sobreexpresa *DUSP1* en la línea celular H460cri.** Análisis por qRT-PCR de los niveles de ARNm de los genes seleccionados en la línea celular H460cri que expresa transitoriamente pLXSN (vector vacío) o pLXSNDUSP1 (expresa DUSP1). La gráfica representa los valores relativos de ARNm de los genes seleccionados respecto a la línea celular H460cripLXSN, normalizados frente a los valores de  $\beta$ -actina. Las barras muestran la media de los valores  $\pm$  D.E. de 3 experimentos independientes.

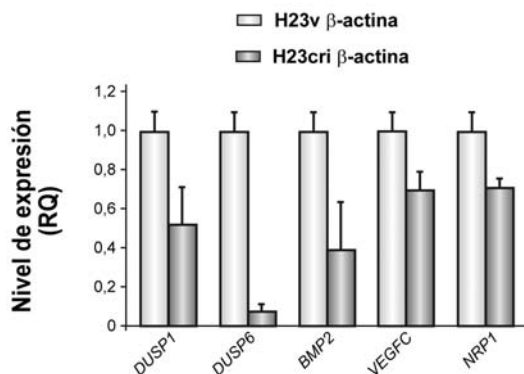


Puesto que las quinasas JNK y p38 son sustratos de la fosfatasa DUSP1, era razonable pensar que los cambios observados se debiesen a cambios en la actividad de estas quinasas. Por tanto, estudiamos los cambios de expresión observados tras la sobreexpresión de forma transitoria de JNK1 y p38 $\alpha$  en las células parentales H460v. Mediante la técnica de qRT-PCR se analizó el nivel de expresión de los genes *DUSP6*, *VEGFC*, *SH2D2A*, *NRP1* y *BMP2*, observándose una disminución de todos ellos en las células H460v (Figura 8). Estos resultados indican que todos los genes excepto *NRP1* siguen un patrón similar al observado en las células H460cri.



**Figura 8. Regulación de la expresión de los genes *DUSP6*, *BMP2*, *SH2D2A*, *VEGFC* y *NRP1* cuando se sobreexpresan las quinasas JNK o p38 $\alpha$  en células H460v.** Análisis por qRT-PCR de los genes seleccionados en la línea celular H460v transfectadas de forma transitoria con los vectores vacíos pLXSN (H460v) o pCEL (H460v) o pLXSN expresando JNK (H460vJNK) o pCEL expresando p38 $\alpha$  (H460vp38). La gráfica corresponde a los niveles relativos de ARNm respecto a los niveles de expresión de la línea celular H460v con los vectores vacíos, normalizados frente a los valores de  $\beta$ -actina. Las barras muestran la media de los valores  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes.

Además, para verificar que los resultados obtenidos se reproducen en otras líneas celulares de CNMP, se inhibió la expresión de *DUSP1* mediante infección con lentivirus expresando un ARNi de DUSP1 en la línea celular H23 de CNMP (H23cri). El gen *DUSP1* disminuye su expresión en las células H23cri en un 50% con respecto a las células H23v. También disminuyen los genes seleccionados *DUSP6*, *VEGFC* y *BMP2* (Figura 9). A diferencia de las células H460cri, en H23cri el gen *NRP1* está reprimido, como en las células que sobreexpresan JNK1 o p38 $\alpha$ .



**Figura 9.** Expresión de los genes *DUSP1*, *DUSP6*, *BMP2*, *VEGFC* y *NRPI* en la línea celular H23. Análisis por qRT-PCR de los genes seleccionados en células H23v y H23cri. Se muestran los niveles relativos de ARNm respecto a los de la línea celular H23v, normalizados frente a los valores de  $\beta$ -actina. Las barras muestran la media de los valores  $\pm$  D.E. de 3 experimentos independientes.

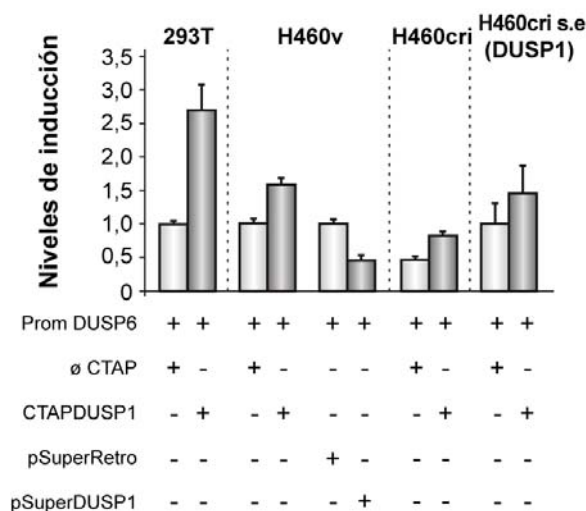
## 2. CAMBIOS FUNCIONALES DERIVADOS DE LA INHIBICIÓN EN LA EXPRESIÓN DE DUSP1 EN CÉLULAS DE CNMP.

### 2.1. Estudio de la relación entre las fosfatasas DUSP1 y DUSP6.

Puesto que en los datos del *microarray* se observó que la inhibición de la expresión de *DUSP1* resulta a su vez en la inhibición de la expresión de *DUSP6*, se investigó si *DUSP1* afecta a la actividad del promotor de *DUSP6*. Para ello se co-transfectaron de forma transitoria, las células HEK293T y H460v con el vector de expresión constitutivo pCTAP expresando *DUSP1* (CTAPDUSP1) y el vector reportero con el gen luciferasa precedido del promotor de *DUSP6* (Prom DUSP6). A las 48 horas se observó una inducción de la actividad luciferasa de 3 veces en las células HEK293T y 1 vez y media en las células H460v comparando con las células co-transfectadas con pCTAP (Figura 10).

Se utilizó el mismo abordaje en células H460cri. La figura 10 muestra que, al igual que se observa en células H460v, la sobreexpresión del vector CTAPDUSP1 también aumenta la actividad luciferasa en células H460cri. Además, estos resultados se completaron con el estudio de la actividad del promotor de *DUSP6* en células H460cri que sobreexpresan la fosfatasa *DUSP1* de forma estable (H460cri s.e. *DUSP1*) y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con células H460v. Por tanto, en todos los casos en los que se sobreexpresó *DUSP1* de forma transitoria, se incrementó la actividad del promotor *DUSP6*.

El efecto inverso se obtuvo cuando se co-transfectó de forma transitoria en células H460v el vector psuperretro expresando el ARNi de DUSP1 (psuperDUSP1) y el vector reportero (Prom DUSP6). En este caso, se observó un descenso en los niveles de luciferasa con respecto a la co-transfección control (pSuperRetro) (Figura 10). Además, los niveles observados fueron similares a los obtenidos en células H460cri control (pCTAP y prom DUSP6), que tienen inhibida la expresión de DUSP1 de forma estable.



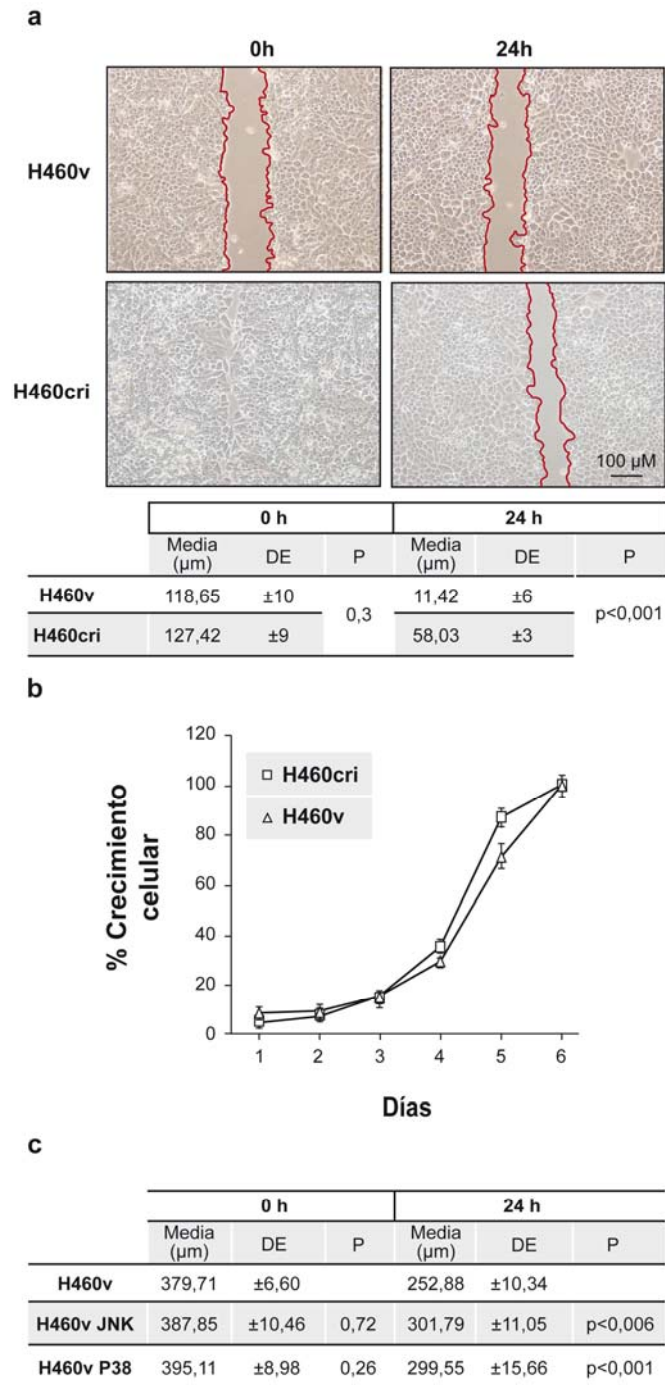
**Figura 10. Regulación de la actividad del promotor de DUSP6 por la fosfatasa DUSP1 en diferentes líneas celulares.** Las líneas celulares HEK293T, H460v, H460cri y H460cri s.e DUSP1 se cotransfectaron con el plásmido del promotor DUSP6 unido al reportero del gen luciferasa (250 o 500 ng) y con un plásmido de expresión vacío (∅ CTAP) (500ng) o un plásmido de expresión del gen DUSP1 (CTAPDUSP1) (500ng). La línea celular H460v se transfectó con el vector vacío de ARNi (pSuperRetro) (500ng) o con el vector ARNi para DUSP1 (DUSP1pSuper) (500ng). Tras 48 horas después de la transfección se lisaron las células y se cuantificó la actividad luciferasa de 10µg de proteína total. Todos los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado, corregidos por la actividad renilla (se cotransfectaron 5 ng) y normalizados por la concentración de proteína. En las gráficas se muestra la actividad relativa de luciferasa, considerándose 1 los niveles de actividad luciferasa detectados con la transfección del vector que contiene sólo el gen reportero luciferasa y el vector vacío CTAP o pSuperRetro.

## 2.2. Estudio del efecto de la inhibición en la expresión de DUSP1 sobre la migración e invasión celular

Puesto que la inhibición de la expresión de DUSP1 produjo alteraciones en el perfil de expresión de genes involucrados en la formación de la matriz extracelular e invasión celular; estudiamos la capacidad migratoria de las líneas celulares H460v y H460cri, mediante el ensayo de cicatrización de herida en placa. En la figura 11a se observa que a las 24 horas, las células H460v cierran casi por completo la herida, mientras que las células H460cri no son capaces de ocupar el espacio vacío. La diferencia observada entre ambas líneas celulares fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

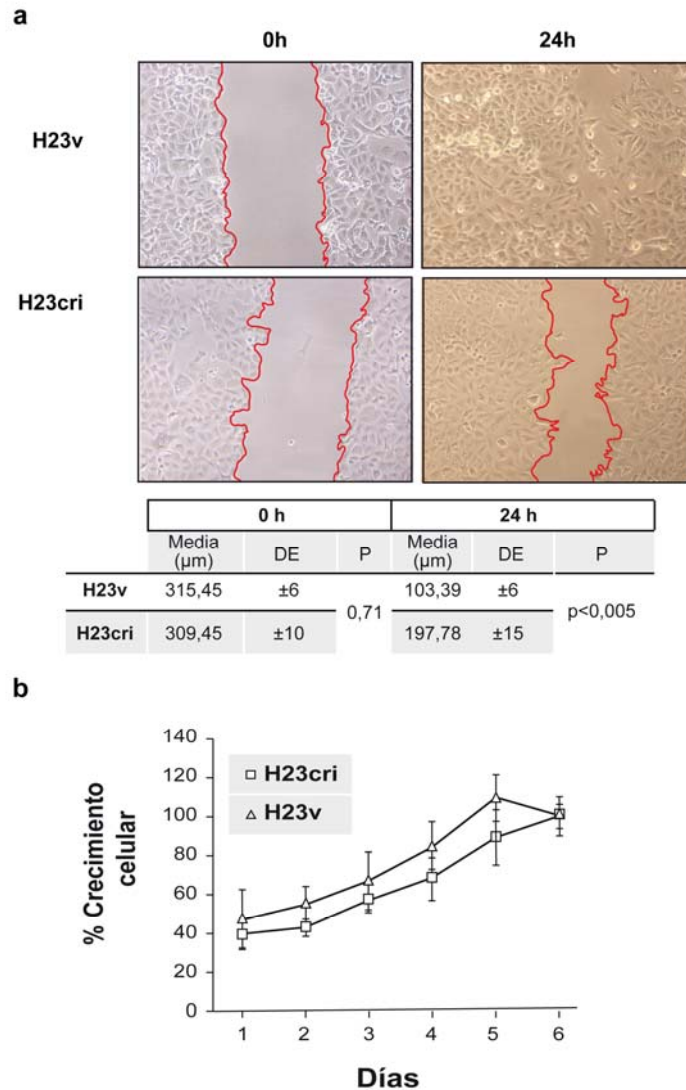
Para verificar si la diferencia observada se debía a cambios en la capacidad migratoria o proliferativa entre células H460v y H460cri, se estudió la velocidad de crecimiento de ambas líneas celulares. La figura 11b muestra la cinética de crecimiento de células H460v y H460cri en medio completo observándose su similaridad y descartando por tanto el que las diferencias observadas se debieran a cambios en la cinética de crecimiento en ambas líneas celulares.

Al igual que en el apartado anterior, también se realizó el ensayo de la herida en células H460v que expresaban de forma transitoria las quinasas JNK y p38 $\alpha$ , para investigar si los cambios en expresión génica afectaban a su motilidad celular de forma similar a lo observado en las células H460cri. Se observó que las células transfectadas con el vector vacío migraban más, quedando un 66% de área por cerrar (Figura 11c). Mientras, las células transfectadas con JNK o p38 $\alpha$  migraban más despacio, quedando un 77%-75% del área por cerrar ( $p < 0,006$ ;  $p < 0,001$ ).



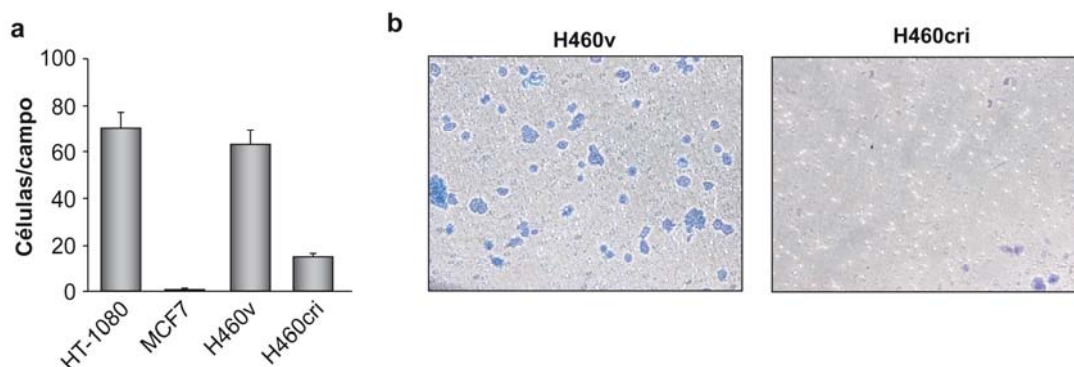
**Figura 11. DUSP1 promueve la migración en células de CNMP H460.** a) El efecto de DUSP1 en la migración celular se estudió en las células H460v y H460cri mediante la técnica de la herida en placa y se tomaron fotomicrografías a 0 y 24 horas. La tabla representa la distancia que queda entre ambos extremos de la herida en cada línea celular (10 medidas de campo al azar/en cada línea celular) para tres experimentos independientes, a las 0h (p=0,3) y a las 24h p<0,001 (T-student). b) Curvas de crecimiento. Se sembraron las líneas celulares H460v y H460cri (40.000células/pocillo) en condiciones normales (10% FBS) posteriormente se detuvo el crecimiento a los días indicados. El crecimiento celular fue una estimación relativa sobre la densidad celular de cada grupo experimental en el mismo periodo de tiempo (24 horas) a lo largo de 6 días. Cada punto representa la media de los valores obtenidos de dos experimentos por cuadruplicado y las barras de error D.E. c) Se estudió el efecto de la sobreexpresión transitoria de las quinasas JNK y P38α en la migración celular en células H460v mediante la técnica de la herida en placa como en a). La tabla representa se representa al igual que a) con la desviación estándar para tres experimentos independientes, p<0,006 y p<0,001 (T-student). Los p-valor en los apartados a y c están referidos a la distancia migrada a las 24h respecto las 0h, (0h-24h).

También se realizaron los mismos ensayos de migración en las líneas celulares de CNMP, H23v y H23cri. Se observó que las células H23v cerraban la herida, mientras que las H23cri no eran capaces de hacerlo en el mismo tiempo ( $p < 0,005$ ) (Figura 12a). En paralelo se realizó una curva de viabilidad, donde se observó que las dos líneas celulares H23v y H23cri proliferaban con una cinética similar (Figura 12b).



**Figura 12. DUSP1 promueve la migración en células de CNMP H23.** a) El efecto de DUSP1 en la migración celular se estudió en las células H23v y H23cri mediante la técnica de la herida en placa y se tomaron fotomicrografías a 0 y 24 horas. La tabla representa la distancia que queda entre ambos extremos de la herida en cada línea celular (10 medidas de campo al azar/en cada línea celular) para tres experimentos independientes,  $p < 0,005$  (T-student), el p-valor está referido a la distancia migrada a las 24h respecto las 0h, (0h-24h). b) Curvas de crecimiento. Se sembraron las líneas celulares H23v y H23cri ( $4 \times 10^4$  células/pocillo) en condiciones normales (10% FBS) posteriormente se detuvo el crecimiento a los días indicados. El crecimiento celular fue una estimación relativa sobre la densidad celular de cada grupo experimental en el mismo periodo de tiempo (24 horas) a lo largo de 6 días. Cada punto representa la media de los valores obtenidos de dos experimentos por cuadruplicado y las barras de error D.E.

A continuación se estudiaron las posibles diferencias en la capacidad invasiva entre las células H460v y H460cri, mediante el ensayo de invasión en Matrigel *in vitro* utilizando las líneas celulares HT1080 y MCF7 como control positivo y negativo respectivamente. Se observó que la línea celular H460v tenía mayor capacidad invasiva a través del matrigel comparada con la línea celular H460cri ( $67 \pm 4$  vs.  $15 \pm 1$ ) (Figura 13a y b) indicando que DUSP1 esta involucrado en el mantenimiento de la capacidad invasiva de las células H460.

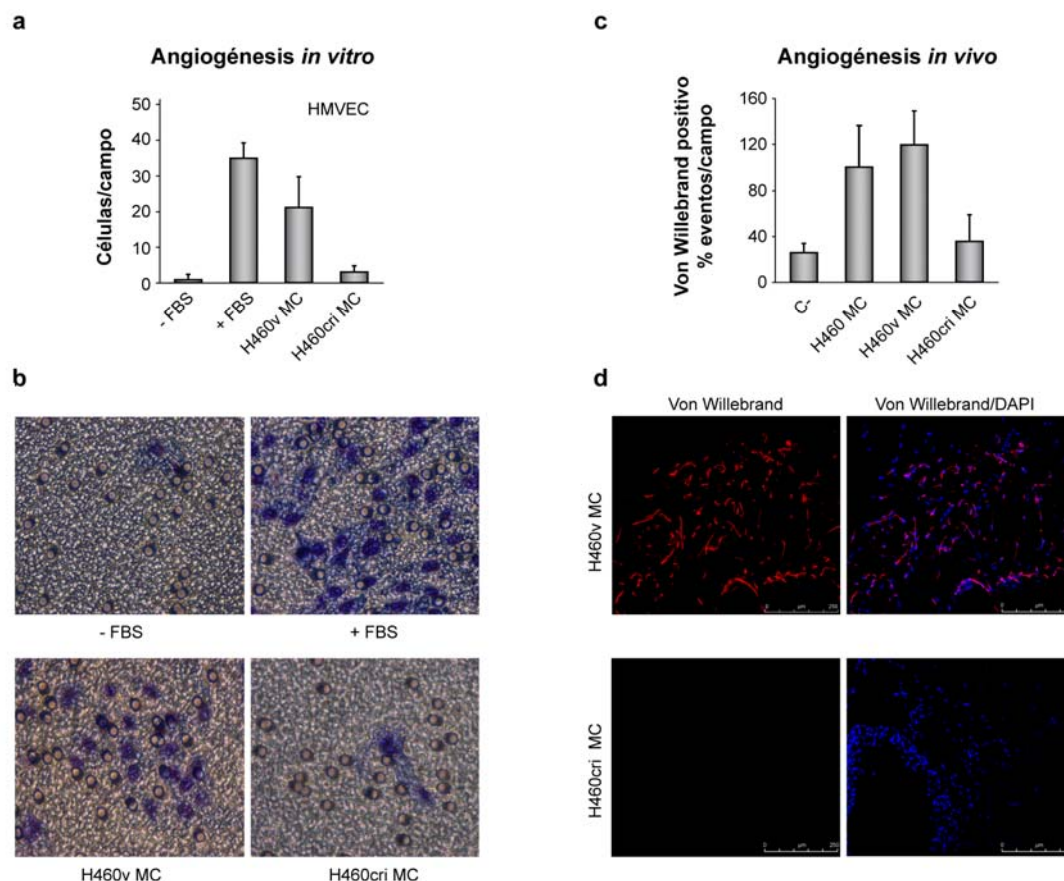


**Figura 13. DUSP1 promueve la invasión celular en células H460.** La capacidad de invasión de las líneas celulares H460v y H460cri se valoró mediante el uso de las cámaras de invasión de Biocoat Matrigel y las líneas celulares HT1080 y MCF7 se usaron como control positivo y negativo respectivamente. Los datos representan el número de células que atraviesan el Matrigel tras 24 horas para cada línea celular. Se contaron diez campos fotografiados (20x aumento) por membrana y los valores medios  $\pm$  desviación estándar (D.E.) se muestran en las figuras. Se realizaron al menos tres experimentos independientes en cada caso. b) Fotomicrografías representativas tomadas de células H460v y H460cri.

### 2.3. Estudio del efecto de la inhibición en la expresión de DUSP1 en la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.

Al igual que en el apartado anterior, uno de los grupos de genes estadísticamente significativos identificado a partir de los datos obtenidos de los *microarrays* de expresión, fue el que se encuadra en la categoría ontológica de angiogénesis. Por tanto decidimos valorar los cambios en esta función biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primer caso se utilizó una cámara Boyden (transwell) donde las células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) se depositaron en la cámara superior y el medio condicionado (MC) de células H460v o H460cri en la cámara inferior. A las 16 horas (Figura 14 a y b) se observó que las células endoteliales migraban mas abundantemente (4 veces) hacia el medio condicionado de las células H460v que hacia el de las células H460cri sugiriendo que el medio de las células H460cri contiene menos factores proangiogénicos que el MC de las células parentales. Para los experimentos realizados *in vivo* se implantaron subcutáneamente en los flancos de ratones matrigel embebido en

el medio condicionado de células H460, H460v o H460cri. En la figura 14 c y d se observa que, transcurridos 15 días, al teñir los cortes de los implantes subcutáneos de matrigel con anticuerpo anti-Von Willebrand que marca vasos, se detectan menos intensidad de vasos sanguíneos, en los implantes subcutáneos de matrigel embebidos con el medio condicionado de células H460cri ( $1,5 \cdot 10^5 \pm 0,3 \cdot 10^5$ ) que con los implantes subcutáneos de matrigel embebidos con el medio condicionado de células H460 ( $3,2 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^5$ ) o H460v ( $3,8 \cdot 10^5 \pm 1,25 \cdot 10^5$ ).



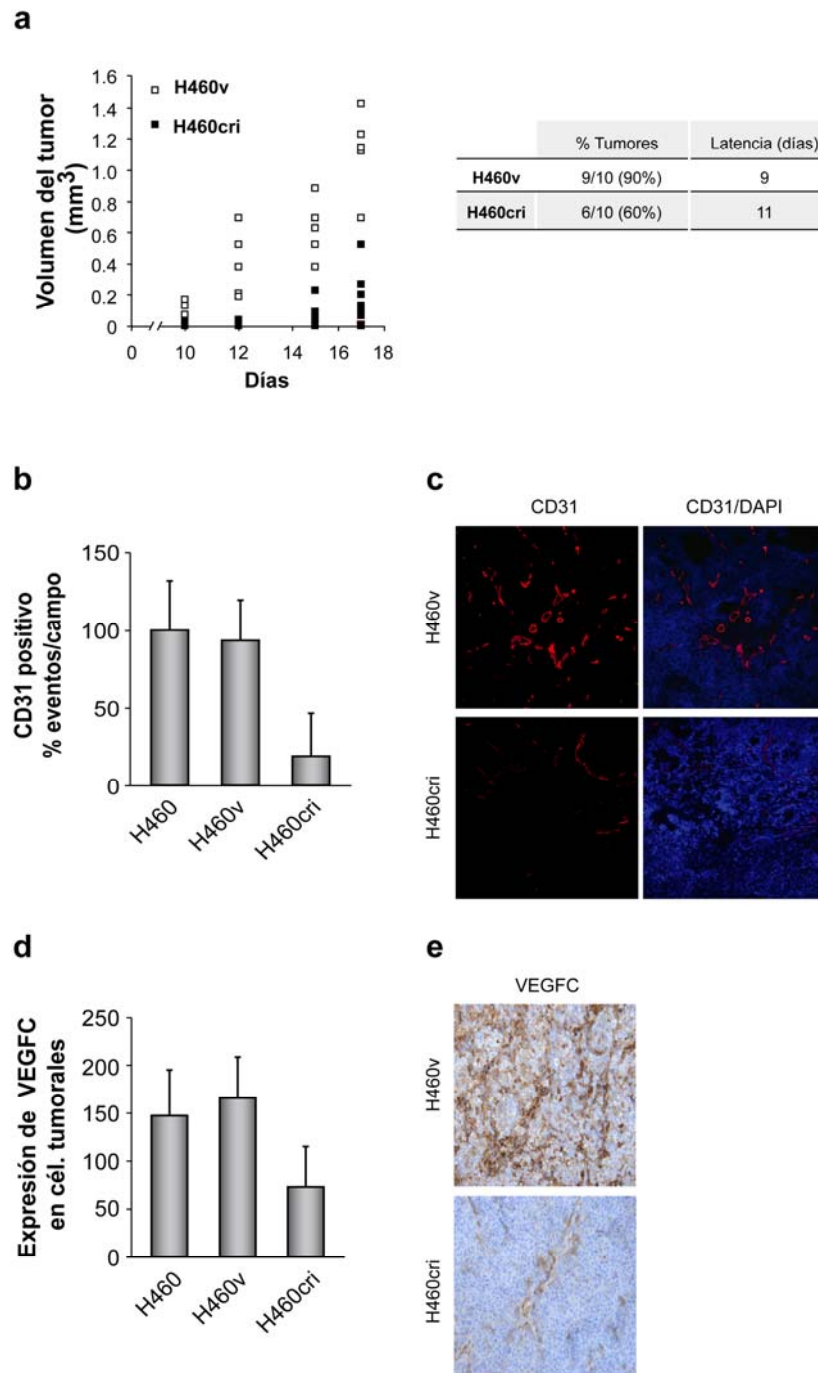
**Figura 14. La inhibición en la expresión de DUSP1 reduce la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.** a) Se sembraron  $1,6 \times 10^5$  células HMVEC en el pocillo con filtro cubierto de gelatina al 0,5% (ensayo de transwell), las células migraron hacia medio sin suero (control -) o medio con 10% FBS (control +) o hacia los medios condicionados de las líneas celulares H460v o H460cri ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) durante 16h. En la gráfica, las barras representan la media del número de células que migran por campo y la D.E (10 medidas al azar/filtro). b) Fotomicrografías representativas tomadas de células HMVEC que migran en cada condición a estudiar tras 16 horas. c) Para los ensayos de angiogénesis *in vivo* se utilizaron implantes subcutáneos de matrigel embebidos con PBS (control -) o medio con 10% FBS (control +) o  $30 \mu\text{g/ml}$  de los medios condicionados de las líneas celulares H460, H460v o H460cri y se inocularon en los flancos de los ratones (4 flancos/ línea celular). A los 15 días se extrajeron los implantes subcutáneos de matrigel, las secciones de matrigel se tiñeron con el anticuerpo anti-Von Willebrand y DAPI y se cuantificó el número de vasos sanguíneos (intensidad/área). En la gráfica se representa las barras como la media de eventos positivos para tinción con el anticuerpo anti-Von Willebrand, siendo el 100% H460 y calculando el porcentaje del resto de líneas celulares respecto a H460 ( $n=10$ ; t test,  $p<0,005$ ). d) Fotomicrografías representativas de los implantes subcutáneos de matrigel embebidos con el MC de H460v o el MC de H460cri y teñidos con el anticuerpo anti-Von Willebrand y DAPI (200X aumento).



#### **2.4. Estudio del efecto de la inhibición de la expresión de DUSP1 sobre la capacidad tumorigénica y metastásica.**

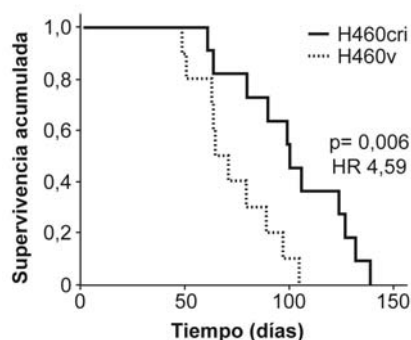
El siguiente objetivo fue analizar la capacidad tumorigénica en ambas líneas celulares H460v y H460cri. Se inyectaron en los flancos de los ratones atímicos ambas líneas celulares y se realizó un seguimiento del volumen tumoral. Se observó que el volumen de los tumores generados por las células H460cri estaba reducido en un 50% respecto de los tumores generados por las células H460v (Figura 15a). Asimismo, el número de tumores inducido por las células H460cri fue un 30% menor. Los datos por tanto indican que la inhibición en la expresión de DUSP1 afecta la capacidad de formar tumores de las células H460.

Para estudiar la capacidad angiogénica de los tumores inducidos por las diferentes líneas celulares se inyectaron en los flancos de los ratones, las células H460, H460v y H460cri. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $0,5\text{mm}^3$ , se analizó la densidad microvascular de los tumores por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-CD31 que detecta vasos sanguíneos. Como se puede observar en la figura 15 (b y c) los tumores derivados de células H460cri tienen un menor número de vasos sanguíneos que los tumores derivados de células H460 y H460v, en concordancia con los datos obtenidos en los implantes subcutáneos de matrigel embebidos con el medio condicionado (Figura 14 c y d). En estos mismos tumores se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de VEGFC cuyo gen, según los datos de los *microarrays*, está regulado cuando cambia la expresión de DUSP1 y está relacionado con el proceso de angiogénesis. Los tumores generados por las células H460cri presentaron menor nivel de expresión de VEGFC que los tumores de células H460 y H460v (Figura 15 d y e). Esto sugiere que el crecimiento de los tumores inducidos por células H460cri puede estar inhibido en parte porque hay una inhibición del proceso angiogénico mediado por una menor expresión de VEGFC y por tanto menor crecimiento de vasos sanguíneos.



**Figura 15. DUSP1 regula el crecimiento y la angiogénesis tumoral.** Se inocularon subcutáneamente en el flanco de ratones inmunodeprimidos  $1 \times 10^6$  células de cada línea celular H460, H460v o H460cri. a) El volumen del tumor fue medido cuando se hizo visible en días alternos y se representa una curva de crecimiento donde cada punto representa un único tumor. La tabla indica el porcentaje de tumores en cada grupo y el tiempo de aparición (latencia). b y c) Se extrajeron los tumores originados por las células H460, H460v o H460cri. La mitad del tumor se criofijó y se analizaron por inmunofluorescencia las secciones teñidas con anti-CD31 y DAPI. Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopia confocal de la localización de las células endoteliales (CD31, rojo) y núcleos celulares (DAPI, azul) (200X aumento). d y e) La expresión de VEGFC se analizó mediante inmunohistoquímica en la otra parte extraída del tumor. Se muestran imágenes representativas. b y d) Las gráficas representan en los tumores de cada línea celular la cuantificación de los eventos positivos en porcentaje para CD31 y la expresión de VEGFC.

Ya que tanto la capacidad migratoria como angiogénica estaba reducida en las células H460cri, se evaluó si había diferencias en la capacidad de inducir metástasis. Para ello se inyectaron en la vena de la cola del ratón las líneas celulares H460v y H460cri. Se valoró tanto la presencia de tumores en diferentes órganos como la supervivencia media de los ratones inyectados con ambas líneas celulares. Se observó que los ratones inyectados con las células H460cri sobrevivían durante más tiempo que los ratones inyectados con células H460v (Figura 16), resultados que están de acuerdo con los obtenidos en los ensayos de migración, invasión y angiogénesis.



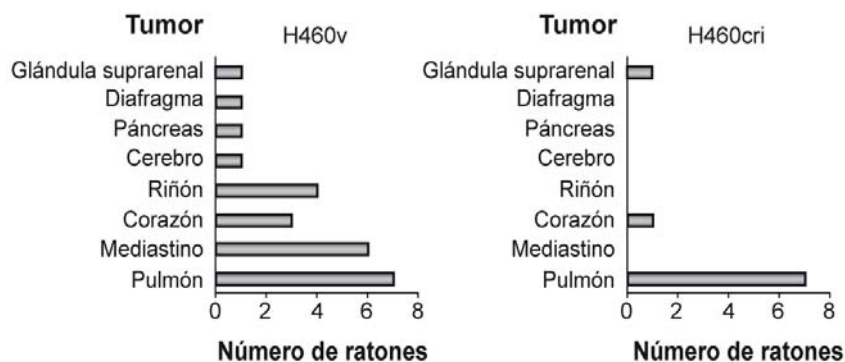
**Figura 16.** Curva de supervivencia acumulada de los ratones inoculados con las líneas celulares H460v y H460cri. Las células H460v y H460cri se inyectaron en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos Fox1 nu/nu ( $1 \times 10^6$  células en  $100 \mu\text{l}$  suero salino). Se estimó la curva de supervivencia acumulada usando el método Kaplan y Meier.

Cuando se realizaron los estudios de anatomía patológica en ambos grupos de animales se observó que a nivel macroscópico, en ambas líneas celulares se inducía una infiltración en órganos viscerales por nódulos irregulares blanquecinos (Figura 17).



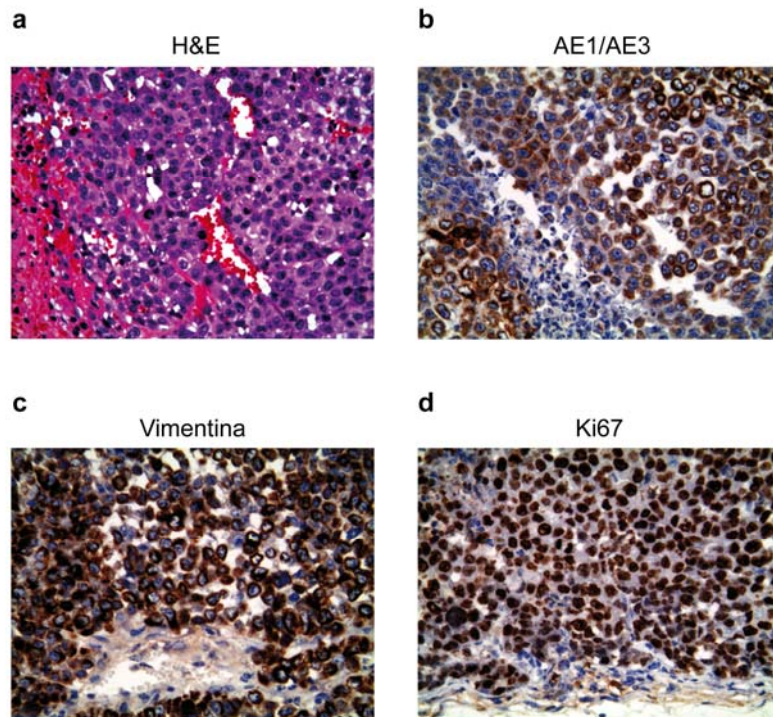
**Figura 17.** Análisis macroscópico de ratones inoculados en la vena de la cola con las líneas celulares H460v o H460cri. Imagen macroscópica de los órganos torácicos y abdominales en bloque. En este caso, el tumor se localizaba en el pulmón (masa blanquecina que obstruye parte del pulmón) señalado con asterisco.

A nivel microscópico, tiñendo las muestras con hematoxilina y eosina, se encontró que los ratones inyectados con células H460v presentaban tumores en pulmón, mediastino, riñón, corazón y menos frecuentemente en cerebro, páncreas, diafragma y glándula suprarrenal. Por otra parte, los ratones inyectados con células H460cri mostraban tumores preferentemente en el pulmón y solo en un caso en el corazón y en la glándula suprarrenal (Figura 18).



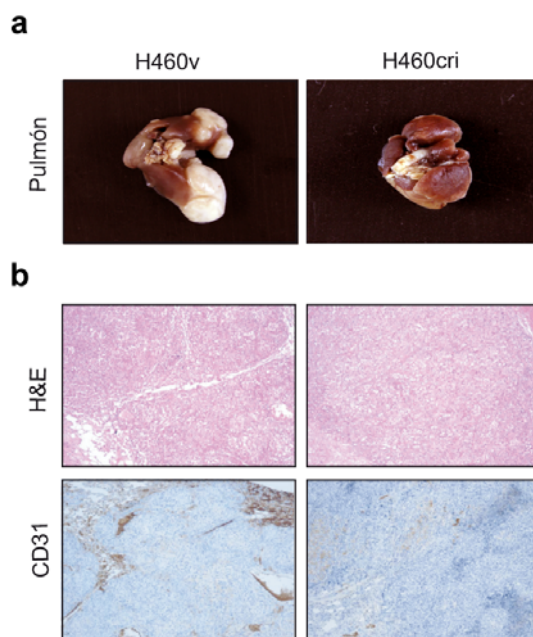
**Figura 18. La expresión de DUSP1 regula la metástasis en células de CNMP.** Las células H460v y H460cri se inyectaron en la vena de la cola del ratón inmunodeprimidos Nu/Nu. Todos los órganos de los ratones de ambos grupos se tiñeron con hematoxilina y eosina y se representó en un diagrama los órganos en los que se encontró tumor y el número de ratones que tenían tumores en dicho órgano.

Se encontró también a nivel microscópico, que la morfología de los tumores primarios y las metástasis generadas por ambas líneas celulares eran similares en todos los ratones tanto los inducidos por las células H460v como H460cri (Figura 19a). Los nódulos estaban constituidos por una proliferación atípica de células epiteliales, que se ordenaban en capas sólidas con un lumen glandular pequeño y disperso, con áreas de necrosis. El inmunofenotipo de las células tumorales fue epitelial (positivo para las citoqueratinas AE1/AE3) (Figura 19b) y con diferenciación mesenquimal (positivo para la vimentina) en ambas líneas celulares (Figura 19c). Cuando se estudió el índice mitótico mediante el marcador Ki67 se observó que era alrededor de un 90% (Figura 19d). Las muestras fueron negativas para citoqueratina 7, citoqueratina 20, el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1), el antígeno carcinoembrionario, el antígeno epitelial de membrana, cromogranina A y sinaptofisina, descartando otros orígenes de diferenciación tisular. Finalmente, en ambos casos solo el 1% del núcleo de las células tumorales se tiñó con el anticuerpo anti-p53. Todos estos resultados microscópicos e inmunohistoquímicos corresponden a un fenotipo de adenocarcinoma de pulmón pobremente diferenciado.



**Figura 19:** Caracterización microscópica de los tumores generados en los ratones inoculados en la vena de la cola con la línea celular H460v o H460cri. Se analizaron mediante inmunohistoquímica diferentes marcadores en las preparaciones de parafina de los órganos para conocer el inmunofenotipo (adenocarcinoma pobremente diferenciado) del tumor generado por ambas líneas celulares. a) Hematoxilina y eosina b, c y d) secciones seleccionadas de los bloques de órganos que contienen tumor y se tiñeron con AE1/AE3, Vimentina y Ki67.

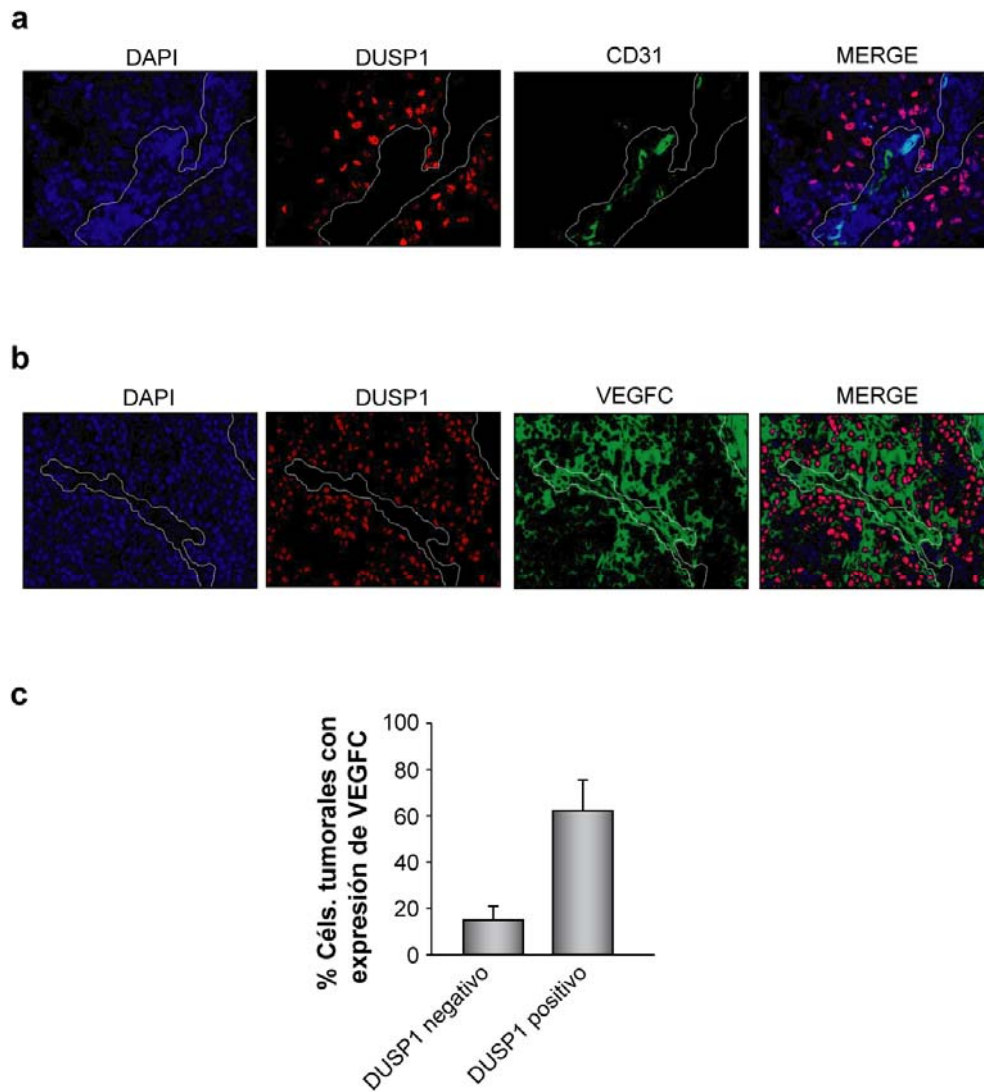
En todos los pulmones se observó formación de tumor, por lo que se consideró este órgano como el primer sitio de anidación de las células inyectadas. Además los pulmones de los ratones inyectados con células H460v tenían mayor masa nodular que los pulmones de los ratones inyectados con células H460cri (Figura 20a). Por tanto, se estudió la formación de vasos sanguíneos en los tumores desarrollados en los pulmones mediante la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD31. Se observó que (Figura 20b) en los tumores derivados de células H460cri el número de vasos sanguíneos era menor que en los tumores inducidos por células H460v y por tanto esto podría estar relacionado con la disminución del potencial metastásico observado en células H460cri.



**Figura 20. Análisis de los tumores en pulmón generados por células H460v y H460cri.** a) Imagen representativa a nivel macroscópico de los tumores generados en el pulmón por ambas líneas celulares. b) Se muestran secciones de pulmones teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y se analiza por inmunohistoquímica la expresión de CD31 para valorar vasos sanguíneos.

### 3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE VEGFC, DUSP1 Y CD31 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CNMP

Los resultados obtenidos hasta este punto sugerían que la expresión de VEGFC en células H460 era dependiente de la actividad DUSP1 y que su expresión correlacionaba con una mayor tumorigenicidad, angiogénesis y metástasis utilizando modelos *in vivo*. Para valorar la relevancia translacional de los resultados observados con líneas celulares, se analizó por inmunofluorescencia la expresión y distribución de DUSP1 en biopsias de pacientes con CNMP, en las cuales se encontró que la mayoría de las células tumorales que expresaban altos niveles de DUSP1 se localizaban en las proximidades de las estructuras vasculares teñidas con el marcador CD31 (Figura 21a). Además se observó que DUSP1 y VEGFC colocalizan en muestras de tejido tumoral de CNMP, con una correlación estadísticamente significativa de  $p=0,002$  (Figura 21b). Se detectó la expresión de VEGFC solo en un 17% de células neoplásicas de muestras que expresaban bajos niveles de DUSP1, mientras que un 62% de las muestras positivas para DUSP1 lo fueron también para VEGFC (Figura 21c). Estos resultados apoyan una correlación directa entre la expresión de DUSP1 y la angiogénesis en pacientes con CNMP.



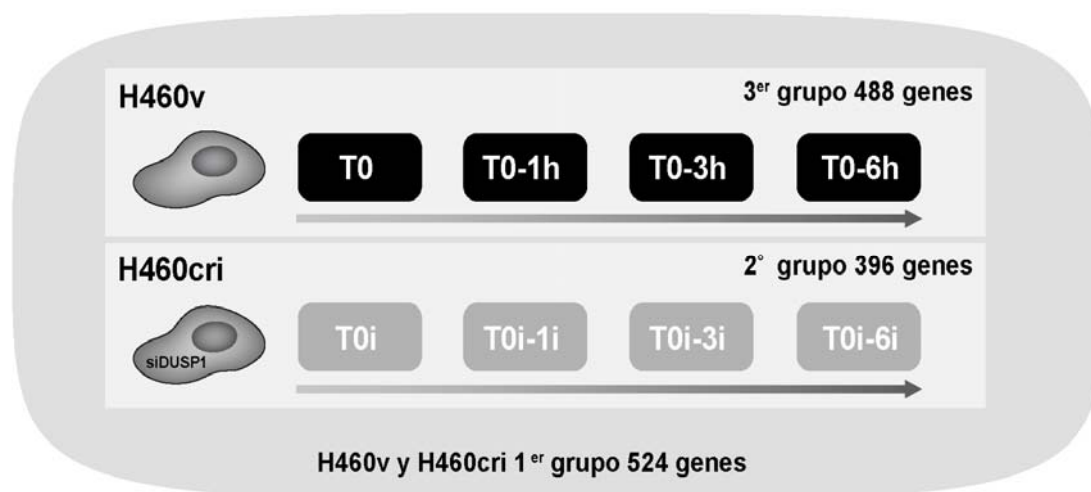
**Figura 21. Colocalización por inmunofluorescencia de DUSP1 y VEGFC en pacientes con CNMP.** Se analizaron una serie de secciones de tejido mediante inmunofluorescencia. a) Las secciones se tiñeron con DAPI e hibridaron con anticuerpos anti-DUSP1 y anti-CD31. DAPI nuclear (azul); células positivas para DUSP1 (rojo); células endoteliales CD31 (verde) b) Las secciones se tiñeron con DAPI e hibridaron con anticuerpos anti-DUSP1 y anti-VEGFC. DAPI (azul); células positivas para DUSP1 (rojo); células positivas para VEGFC (verde). c) Gráfica que representa en tejido de tumores humanos, el porcentaje de células que expresan VEGFC y a su vez también DUSP1. Las columnas representan la media de los valores obtenidos y las barras la D.E ( $p < 0,002$ ).

#### 4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON CDDP SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA ASOCIADA A CAMBIOS EN DUSP1

##### 4.1 Perfil de expresión génica diferencial derivado de combinar la inhibición de la expresión de DUSP1 y el tratamiento con CDDP.

Para conocer las diferentes vías de señalización dependientes de los niveles de expresión de DUSP1 en las células de CNMP tratadas con CDDP, se analizó la expresión génica diferencial entre las células H460cri y H460v después de su exposición al CDDP a tiempos de 0, 1, 3 y 6 horas. Aunque también se obtuvieron datos a 9 horas de tratamiento, se descartó este tiempo ya que se observó una fuerte activación de la maquinaria de apoptosis, tanto en H460cri como en H460v, que enmascaraba el objeto de estudio.

Se identificaron 1010 genes con expresión modificada al menos tres veces a lo largo del tratamiento con CDDP en las células H460v y 918 genes en las células H460cri. En función de la comparación realizada, se obtuvieron los siguientes grupos: a) Un primer grupo de 524 genes, dependientes del tratamiento de CDDP a lo largo del tiempo y que son genes comunes que cambian en ambas líneas celulares. b) Un segundo grupo de 396 genes, dependientes del tratamiento de CDDP que cambian solo en células H460cri, pero no modifican su expresión en las células H460v en los mismos tiempos de tratamiento c) Un tercer grupo de 488 genes, dependientes del tratamiento de CDDP que cambian solo en células H460v, sin modificaciones en su expresión en las células H460cri en los mismos tiempos de tratamiento (Figura 22).



**Figura 22. Estrategia de análisis utilizada para identificar los genes involucrados en cada comparación.** Diagrama con los tres análisis estadísticos realizados: 1<sup>er</sup> grupo) genes comunes que aumentan o disminuyen en respuesta al tratamiento con CDDP en ambas líneas celulares, independientemente de la expresión de DUSP1. 2<sup>o</sup> grupo) genes que aumentan o disminuyen en respuesta al tratamiento con CDDP cuando la expresión de DUSP1 esta inhibida. 3<sup>er</sup> grupo) genes que aumentan o disminuyen en respuesta al tratamiento con CDDP cuando se expresa DUSP1.



A continuación, los grupos descritos se estudiaron mediante GOTM para agrupar y jerarquizar los genes identificados (Tabla 6). En el primer grupo (a, 524 genes) se identificaron 30 categorías ( $p < 0,05$ ) de las cuales destacan la regulación de la apoptosis y regulación de la actividad MAP quinasa. En el segundo grupo (b, 396 genes), se identificaron 25 categorías ( $p < 0,05$ ) de las cuales destacan actividad oxidoreductasa, regulación del crecimiento celular y biosíntesis de membrana. En el tercer grupo (c, 488 genes), se identificaron 17 categorías GO ( $p < 0,05$ ) involucradas en actividad MAPK fosfatasa y ciclo celular. En la tabla 6 se muestran ejemplos de genes agrupados en cada una de las categorías mencionadas.

**Tabla 6. Selección génica según actividad biológica y estrategia de análisis**

H460v/H460cri	H460cri	H460v
a)	b)	c)
<b>Regulación actividad MAPK</b>	<b>Actividad oxidoreductasa</b>	<b>Actividad fosfatasa MAPK</b>
<i>DUSP2</i> ↑	<i>SCD</i> ↓	<i>DUSP1</i> ↑
<i>JUN</i> ↑	<i>FADS1</i> ↓	<i>DUSP6</i> ↑
<b>Regulación de la apoptosis</b>	<i>SQLE</i> ↑	<i>DUSP5</i> ↑
<i>EGFR</i> ↓	<b>Regulación del crecimiento celular</b>	<b>Regulación negativa de procesos biológicos</b>
<i>IGF1R</i> ↓	<i>IGFBP3</i> ↑	<i>IL1A</i> ↑
<i>PHLDA1</i> ↑	<i>IGFBP7</i> ↑	<i>IL8</i> ↑
<i>TGFB2</i> ↓	<b>Biosíntesis de membrana</b>	<b>Ciclo celular</b>
<i>TNFAIP3</i> ↑	<i>MVD</i> ↑	<i>MAP2K6</i> ↓
	<i>MVK</i> ↑	<i>GADD45</i> ↑
	<i>HMGCR</i> ↑	<i>ATF5</i> ↑
	<i>EBP</i> ↑	

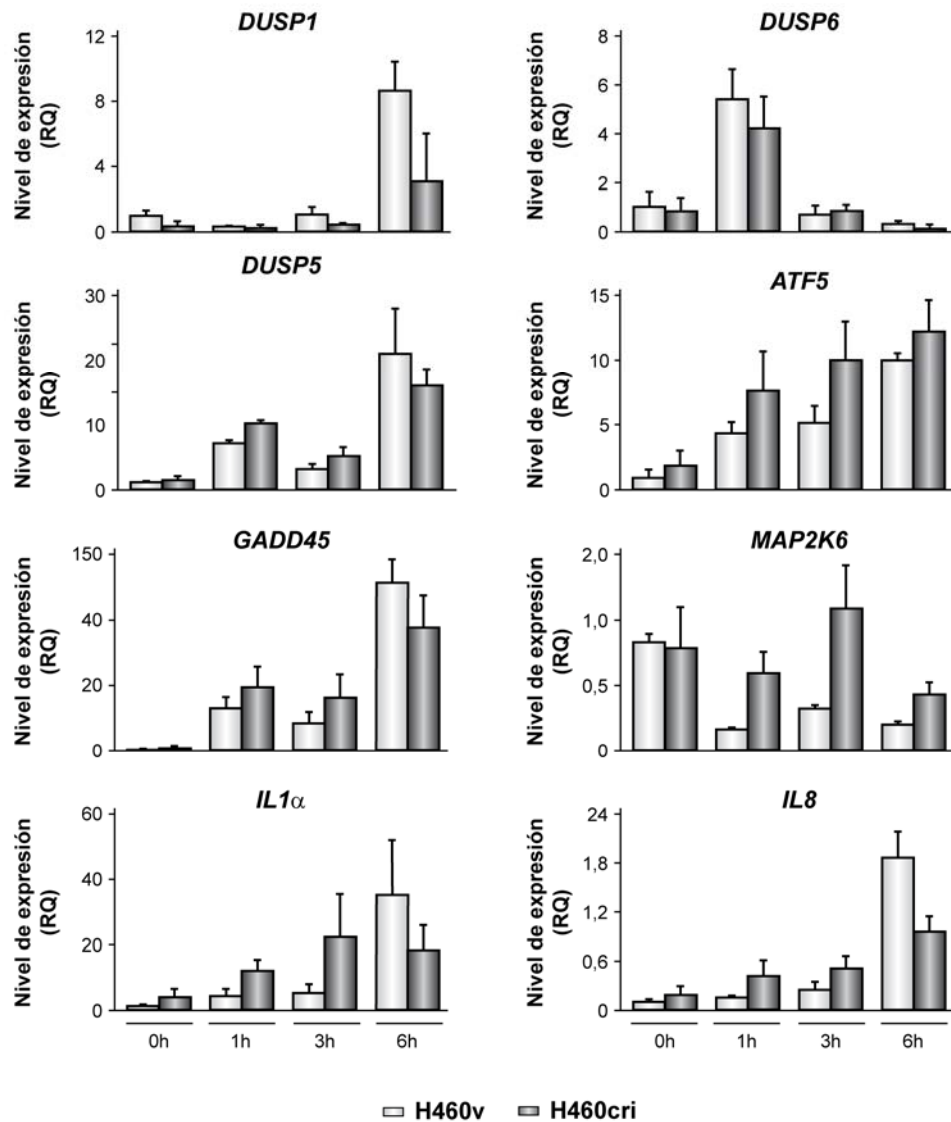
La tabla representa los genes seleccionados estadísticamente significativos de cada grupo. La flecha que se adjunta al lado de cada gen representa la sobreexpresión (flecha hacia arriba) o represión (flecha hacia abajo) a lo largo del tiempo.

De los tres grupos descritos, seleccionamos el tercer grupo de comparación (c, 488 genes), ya que este grupo de genes varía su expresión después del tratamiento con CDDP solo cuando *DUSP1* se expresa. Por tanto, probablemente sean genes cuya expresión depende de *DUSP1*.

#### 4.2. Validación de los cambios identificados en expresión génica regulados de forma dependiente de los niveles de DUSP1.

Seleccionamos para validar por qRT-PCR, los 8 genes correspondientes al tercer grupo de comparación mostrado en el apartado anterior, (genes del grupo c, tabla 6). Como se puede observar en la figura 23, en las células H460v los niveles de ARN mensajero (ARNm) de DUSP1 Y DUSP5 aumentan 6 horas después del tratamiento con CDDP, mientras que DUSP6 aumenta su expresión a la hora y después desciende rápidamente su expresión entre las 3 y 6 horas después del tratamiento con CDDP. Respecto a los genes involucrados en ciclo celular, se observó que la expresión de GADD45 aumentaba a las 6 horas en las células H460v y en menor medida, en células H460cri. Cuando se estudió la expresión de MAP2K6, se observó que en células H460v disminuía en todos los tiempos de tratamiento con CDDP, mientras que en células H460cri no se hallaron cambios en la expresión en los mismos periodos de tiempo. También se analizó la expresión del factor de transcripción ATF5, el cual estaba aumentado en la línea celular H460v, alcanzando la máxima expresión a las seis horas (Figura 23). También se analizaron los genes IL1 $\alpha$  e IL8, que son dos citoquinas pro-inflamatorias. Para ambos genes, los niveles de ARN mensajero en la línea H460v alcanzaban su máximo a las 6 horas después del tratamiento con CDDP. Estos resultados indican que la expresión de los genes analizados dependía en parte del mantenimiento de los niveles de DUSP1.

Todos los cambios observados en qRT-PCR en células H460cri, al igual que en los datos obtenidos a partir de los *microarrays* de expresión, no fueron en ningún caso cambios significativos. Por ello este grupo de genes se seleccionó al mostrar cambios en la expresión significativo sólo en la línea celular H460v (Figura 23).



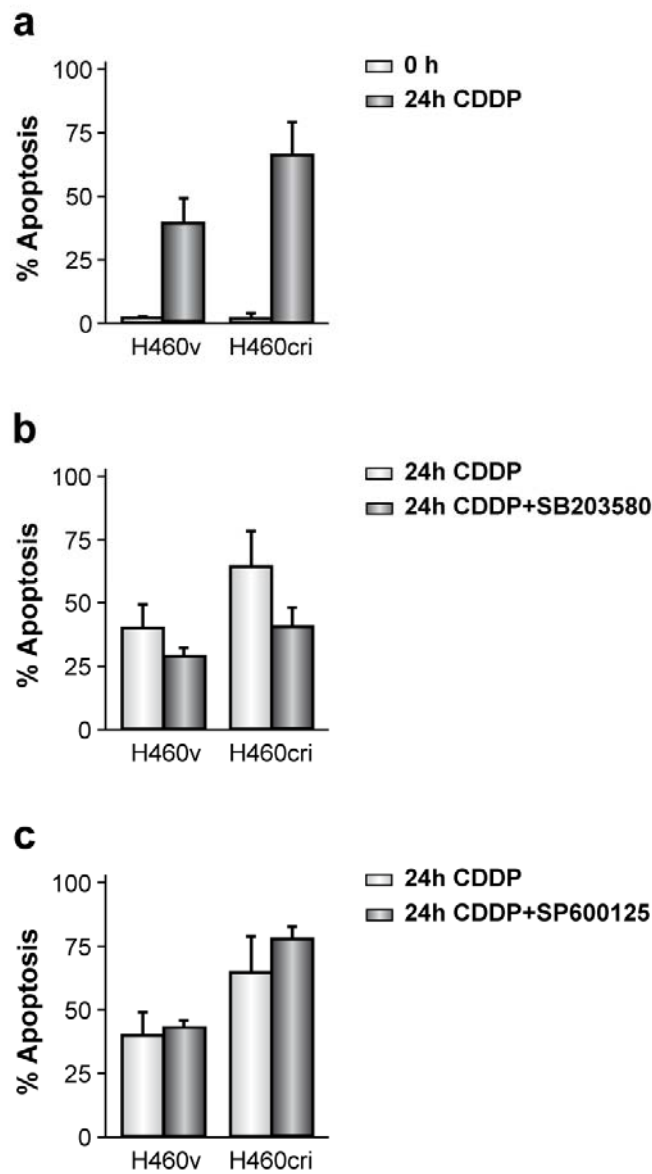
**Figura 23.** Validación de los cambios en expresión de los genes *DUSP1*, *DUSP6*, *DUSP5*, *ATF5*, *GADD45*, *MAP2K6*, *IL1 $\alpha$*  e *IL8*. Análisis por qRT-PCR de los genes seleccionados en células H460v y H460cri a 0, 1, 3 y 6 horas de tratamiento con CDDP. Se muestran los niveles relativos de ARNm normalizados frente a los de la línea celular H460v a 0h. El gen utilizado como control interno fue el que codifica  *$\beta$ -actina*, representándose la media  $\pm$  D.E.

## 5. CAMBIOS FUNCIONALES DERIVADOS DE LA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE DUSP1 EN CÉLULAS TRATADAS CON CDDP.

### 5.1. Cambios en el porcentaje de células apoptóticas.

Para investigar el papel de DUSP1 en la regulación de apoptosis mediada por CDDP en células de CNMP se utilizó la técnica de citometría de flujo que cuantifica las distintas fases del ciclo celular. Se observó que, a las 24 horas de tratamiento, había mayor apoptosis en las células H460cri que en las células H460v ( $p < 0,05$ ) (Figura 24a), lo que implica mayor sensibilidad de las células H460cri al CDDP, lo cual estaba de acuerdo con resultados anteriores del grupo (Chattopadhyay et al., 2006).

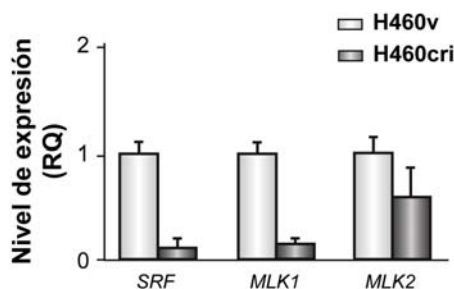
Para estudiar la implicación de JNK y p38 en este incremento observado en la apoptosis, se trataron las células H460v y H460cri con inhibidores químicos de p38 (SB203580) y JNK (SP600125). Previamente habíamos descrito que en células H460cri tratadas con CDDP, la activación de JNK y p38 se producía antes en el tiempo que en células H460v. En este caso se observó que en células H460v el tratamiento combinado con el inhibidor de p38 (SB203580) y CDDP disminuía en número de células en apoptosis con respecto al tratamiento de CDDP (Figura 24b). Este efecto fue aún mayor en las células H460cri ( $p < 0,05$ ). En células tratadas con el inhibidor de JNK (SP600125) y CDDP se observó que la inhibición de JNK no inducía cambios significativos en el contenido de células en apoptosis en células H460v o H460cri respecto de ambas líneas celulares cuando se tratan solo con CDDP (Figura 24c). Estos resultados sugerían que en el mecanismo de inducción de apoptosis en células H460v y H460cri participa la quinasa p38.



**Figura 24. Análisis de la apoptosis mediante citometría de flujo en células H460v y H460cri.** a) Las células H460v y H460cri fueron tratadas con CDDP (10  $\mu\text{g/ml}$ ) cuantificándose el contenido apoptótico por citometría de flujo mediante tinción con ioduro de propidio a 0h y 24h. b) Células pre-tratadas 30 minutos con SB203580 (20 $\mu\text{M}$ ) y después estimuladas con CDDP (10  $\mu\text{g/ml}$ ), a las 24 h se analizaron como en el apartado a. c) Células pre-tratadas 20 minutos con SP600125 (10 $\mu\text{M}$ ) y después estimuladas con CDDP (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a las 24 h se analizaron como en el apartado a). Todas las gráficas representan el porcentaje de células en apoptosis, las columnas representan la media de los valores obtenidos y las barras la DE.

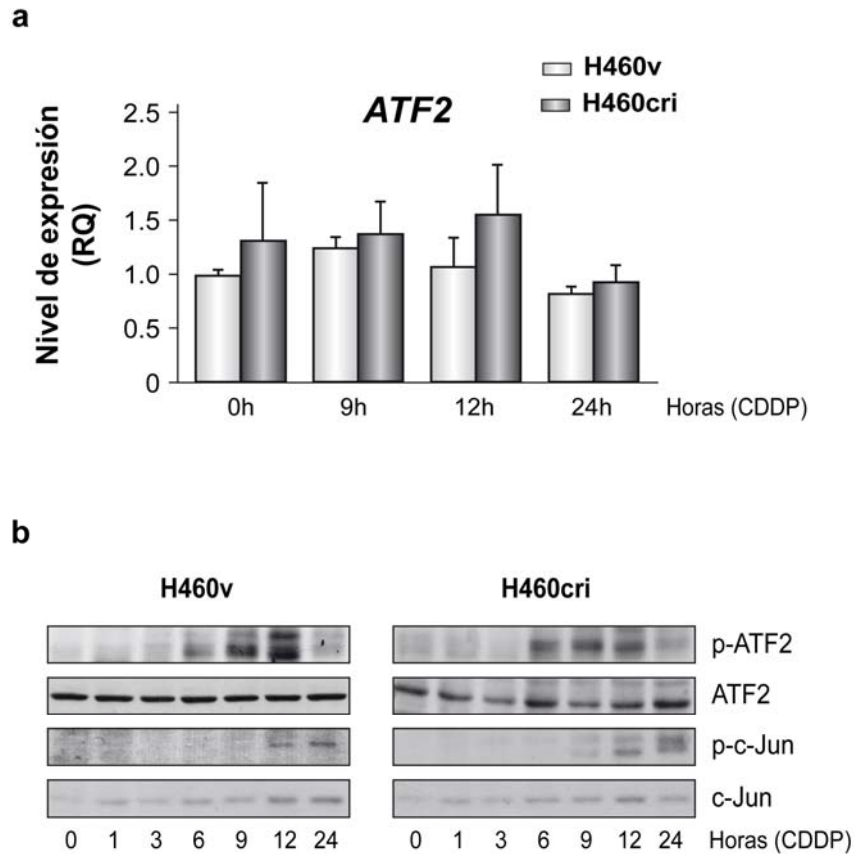
## 5.2. Estudio de los factores de transcripción SRF, c-Jun y ATF2 en células tratadas con CDDP.

Se estudiaron mediante qRT-PCR los niveles de expresión de algunos factores de transcripción, involucrados en rutas de supervivencia y relacionados con las vías de MAPKs, en respuesta a condiciones de estrés o daño al ADN. Concretamente, el factor de transcripción que responde al suero (SRF) y sus coactivadores MLK1 y MLK2. Se observó que en ausencia de tratamiento con CDDP, la línea celular H460cri tenía menor nivel de expresión de estos factores de transcripción implicados en supervivencia con respecto a células H460v (figura 25). Por tanto, esta reducción en la expresión de genes implicados en supervivencia celular podría también contribuir a la menor supervivencia de las células H460cri en respuesta al tratamiento con CDDP.



**Figura 25.** Estudio de los niveles de expresión de los factores de transcripción de supervivencia SRF, MLK1 Y MLK2 en las células H460v y H460cri. Valoración de la expresión por qRT-PCR de los genes seleccionados en células H460v y H460cri. Se muestran los niveles relativos de ARNm normalizados frente a los de la línea celular H460v. El gen utilizado como control interno fue  $\beta$ -actina. Los resultados se representan con la media de los valores obtenidos  $\pm$  D.E.

También se estudió la implicación de los principales sustratos de p38 y JNK como son ATF2 y c-Jun, involucrados en las rutas de apoptosis en respuesta a daño citotóxico. Inicialmente, se analizó la expresión mediante qRT-PCR del factor de transcripción ATF2 (sustrato implicado en la vía de p38), pero no se observaron cambios en su expresión ni en células H460v ni en H460cri (Figura 26a). El siguiente paso fue valorar la activación, a través de fosforilación, de los factores de transcripción ATF2 y c-Jun en respuesta al CDDP. En la Figura 26b se muestra que la activación de c-Jun en células H460cri se produce antes que en células H460v (desde las 9 horas vs 12 horas), mientras que se observó una mayor activación por la fosforilación de ATF2 a las 6 horas en células H460cri tratadas con CDDP.

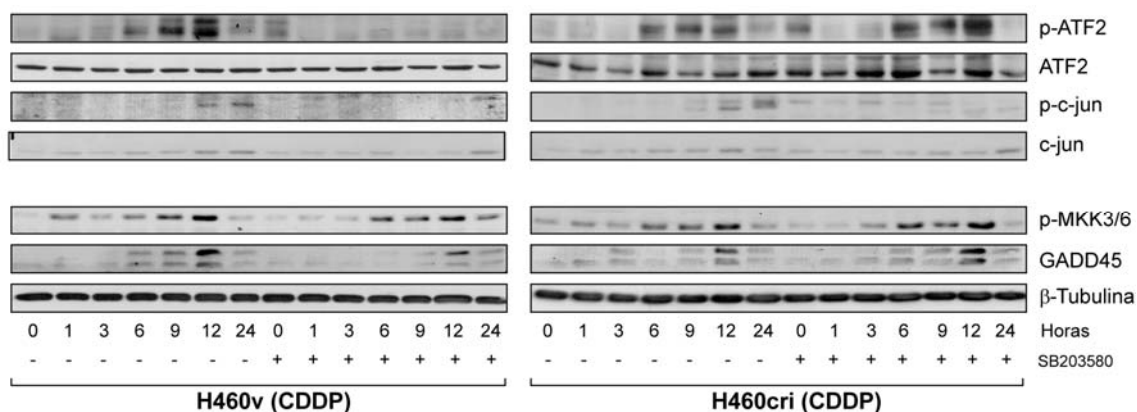


**Figura 26. Estudio de los factores de transcripción ATF2 y c-Jun en células H460v y H460cri después del tratamiento con CDDP.** a) Valoración de la expresión por qRT-PCR de *ATF2* en células H460v y H460cri. Se muestran los niveles relativos de ARNm normalizados frente a los valores de la línea celular H460v. El gen utilizado como control interno fue el que codifica  $\beta$ -actina. Los resultados se representan con la media de los valores obtenidos  $\pm$  D.E. b) Las células H460v y H460cri se sembraron y tras incubación en medio bajo en suero (0,5% FBS) durante 16h, fueron tratadas con CDDP (10  $\mu$ g/ml) 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los extractos protéicos celulares obtenidos en cada punto se analizaron mediante *Western Blot*. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína total por cada pocillo y posteriormente la membrana se hibridó con los anticuerpos específicos para las formas activas de las proteínas: p-ATF2 y p-c-Jun y como controles de carga ATF2, y c-Jun.

### 5.3. Estudio de la vía de señalización de p38 en células tratadas con CDDP.

Con el fin de profundizar en el papel de p38 sobre la sensibilidad al cisplatino, valoramos la activación de c-Jun y ATF2 en presencia del compuesto inhibidor de P38, SB203580. La inhibición de p38 disminuyó dramáticamente la fosforilación de ATF2 en las células H460v, mientras que no se observó ningún cambio en las células H460cri (Figura 27). Además, en la misma figura se puede observar que no había diferencias en los niveles de proteína de ATF2 en ambas líneas celulares. Por otra parte, la inhibición de p38 inhibía la fosforilación de c-Jun y de la proteína en ambos casos.

Igualmente, se analizó la fosforilación de MKK6 y los niveles de proteína de GADD45, ambas involucradas en la vía de señalización de p38 y con expresión génica alterada en células H460v (Figura 27) (Figura 5 de la Introducción). La inhibición de p38 en las células H460v, indujo un retraso en la activación de MKK3/6 (6h vs 1h), mientras, en células H460cri la activación de MKK3/6 se observó con un retraso mucho menor en presencia del inhibidor de p38. En lo que respecta a GADD45, en las células H460v tratadas con el inhibidor de p38 se observó un retraso en la inducción de GADD45 (12h vs 6h), mientras que en las células H460cri no se observaron diferencias en la inducción de GADD45 en ningún caso.



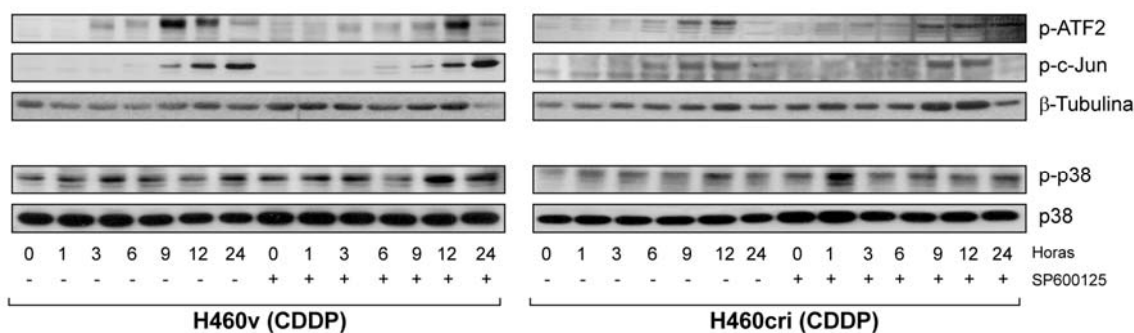
**Figura 27.** Estudio de la cinética de activación de las proteínas involucradas en la vía de señalización de p38 en células CNMP después del tratamiento con CDDP. Las células H460v y H460cri se sembraron y crecieron en medio bajo en suero (0,5% FBS) durante 16h, posteriormente fueron pre-tratadas con SB203580 (20 $\mu$ M) 30 minutos y después estimuladas con CDDP (10  $\mu$ g/ml) durante 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los extractos proteicos celulares obtenidos en cada tiempo se analizaron mediante *Western Blot*, cargando 20  $\mu$ g de proteína total en cada pocillo. La membrana se hibridó con los anticuerpos específicos nombrados en la figura. Para el control de carga del total de proteína se utilizó el anticuerpo  $\beta$ -tubulina.



#### 5.4. Estudio de la vía de señalización de JNK en células tratadas con CDDP.

Para investigar el papel de JNK en la ruta de señalización activada por CDDP, se utilizó el compuesto SP600125, inhibidor de JNK1, 2, 3 selectivamente frente a otras quinasas. En células H460v, la presencia del inhibidor de JNK y CDDP retrasó y atenuó la activación de c-Jun y ATF2 (Figura 28). En células H460cri tratadas con el inhibidor de JNK y CDDP se observó el mismo retraso en el factor de transcripción c-Jun, pero no se encontraron diferencias en la fosforilación de ATF2.

Finalmente, para comprobar que el compuesto SP600125 era un inhibidor específico de JNK se estudió la activación de p38 en ambas líneas celulares y no se observó modificación alguna.

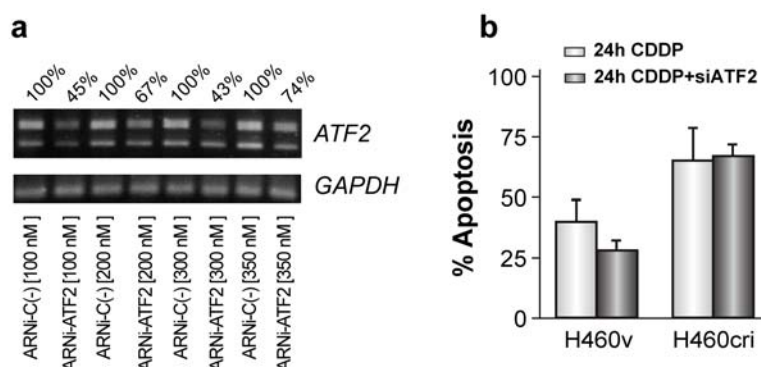


**Figura 28.** Estudio de la cinética de activación de las proteínas involucradas en la vía de señalización de JNK en células CNMP después del tratamiento con CDDP. Las células H460v y H460cri se sembraron y se crecieron en medio bajo en suero (0,5% FBS) durante 16h, posteriormente fueron pre-tratadas 20 minutos con SP600125 (10 $\mu$ M) y después estimuladas con CDDP (10  $\mu$ g/ml) durante 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los extractos proteicos celulares obtenidos en cada tiempo se analizaron mediante *Western Blot*, con 20  $\mu$ g de proteína total en cada pocillo y la membrana se hibridó con los anticuerpos específicos nombrados en la figura. Para el control de carga del total de proteína se utilizó el anticuerpo  $\beta$ -tubulina.

#### 5.5. Estudio del ciclo celular en células tratadas con CDDP cuando se inhibe la expresión de ATF2.

Puesto que la inhibición de p38 en las células H460v resultó en un llamativo descenso en los niveles de la proteína ATF2 fosforilada, pasamos a inhibir la expresión de *ATF2* para valorar el papel que jugaba este factor de transcripción en la respuesta pro-apoptótica mediada por DUSP1 tras el tratamiento con CDDP. Mediante PCR semi-cuantitativa se seleccionó la concentración más efectiva del ARNi de *ATF2*, capaz de inhibir la expresión del ARNm a las 48 horas después de la transfección (Figura 29a). La concentración elegida fue 300 nM, donde la expresión del gen descendió un 60%. Esta concentración de ARNi y tiempo de estudio fueron las condiciones seleccionadas para experimentos posteriores.

Tras la transfección del ARNi de *ATF2* y el posterior tratamiento con CDDP, se observó que se indujo menos eficientemente la apoptosis en células H460v, mientras que no se observaron cambios en células H460cri (Figura 29b). Además la transfección del ARNi control no tuvo ningún efecto en ambas líneas celulares (dato no mostrado). Tomando en cuenta que el ARNi de *ATF2* solo inhibió en un 60% la expresión de ATF2 (Figura 29a), la inhibición observada en la apoptosis en células H460v es significativa, y aún lo es más el hecho que la inhibición de la expresión de *ATF2* no afecte al porcentaje de apoptosis en células H460cri.

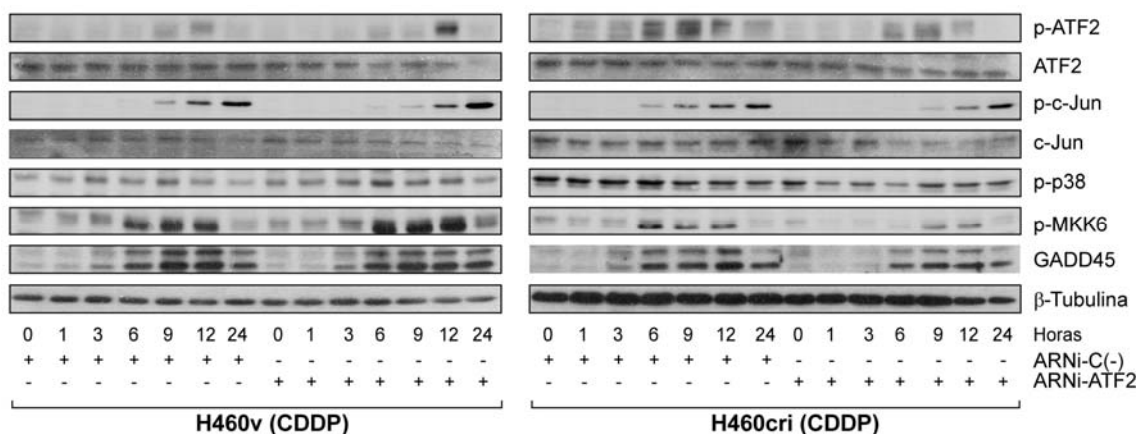


**Figura 29.** Estudio de la apoptosis en células de CNMP con menores niveles de *ATF2* (ATF2i) y tratadas con cDDP. a) Análisis de los niveles de ARNm de *ATF2* mediante PCR semi-cuantitativa en células H460v transfectadas con el ARNi de *ATF2* o ARNiC- (scrambled oligos) a las 48h después de la transfección. Como control interno se utilizó el gen *GAPDH*. b) Análisis de la incidencia de apoptosis por citometría de flujo en células H460v y H460cri con menores niveles de *ATF2* (300nM ARNi), estimuladas con CDDP a las 24 horas, tras 16h desde su transfección.

### 5.6. Estudio de los cambios en las vías de señalización de P38 y JNK en células tratadas con CDDP cuando la expresión de ATF2 está inhibida.

En primer lugar, se comprobó la eficacia de la inhibición de la expresión de *ATF2*, ya que hay un descenso de los niveles proteicos de *ATF2* a tiempos largos de tratamiento con CDDP, así como un retraso en su activación (Figura 30). Cuando se analizó la activación de c-Jun, se observó que la inhibición en la expresión de *ATF2* no modificaba el patrón de activación en células H460v. Sin embargo, en células H460cri que expresan niveles bajos de *ATF2* se observó un retraso en su activación con respecto a células H460cri control (9 h vs 6 h). Por otra parte, en células H460v que expresan niveles bajos de *ATF2* no se observaron alteraciones en *GADD45* ni de *MKK6* comparado con sus células control. Mientras, en células H460cri que expresan niveles bajos de *ATF2* se observó que la proteína *GADD45* retrasaba su incremento al compararla con las células H460cri (6h vs 3h) y también se retrasaba la fosforilación de la proteína *MKK6* (9h vs 6h). Por último, se estudió la fosforilación de p38,

observándose que en células H460v que expresan niveles reducidos de ATF2, no había cambios en la fosforilación comparándolo con células control, mientras que en las células H460cri, se observó una disminución en la fosforilación de p38 respecto a las células H460cri control. Estos resultados nos indicaron que ATF2 como factor de transcripción juega un papel relevante en el retraso que existe en expresión de las proteínas GADD45, la activación de MKK6 y p38 en células H460cri, y esto no influye en la regulación de la apoptosis en esta línea celular.



**Figura 30.** Efecto de la inhibición en la expresión de *ATF2* (*ATF2i*) en células de CNMP tratadas con *CDDP*. Las células H460v y H460cri se transfectaron con *ARNiATF2* (300nM) y *ARNiC-*, se mantuvieron a 0,5%FBS y 24 horas después de la transfección se estimularon con *CDDP* (10  $\mu$ g/ml). Los extractos proteicos celulares obtenidos en cada tiempo se analizaron mediante *Western Blot* utilizando 20  $\mu$ g de proteína total por cada pocillo. La membrana se hibridó con los anticuerpos específicos nombrados en la figura. Para el control de carga del total de proteína se utilizó el anticuerpo  $\beta$ -tubulina.

# **DISCUSIÓN**

---

La familia MAPKs está implicada en importantes funciones celulares como son la proliferación celular, la supervivencia y la migración celular. Estas funciones pueden encontrarse alteradas en determinados tumores, bien por cambios a nivel molecular que ocurren en las MAPKs o en las proteínas reguladoras de su actividad. La familia DUSP es una familia de fosfatasas reguladoras de la intensidad y duración de la actividad de las MAPKs, y tienen un papel relevante en la inducción y progresión de tumores (Bermudez et al., 2010). En concreto, DUSP1 se sobreexpresa en algunos tipos de tumores como mama, próstata y CNMP (Chattopadhyay et al., 2006; Denkert et al., 2002; Loda et al., 1996). En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente un incremento en la expresión de DUSP1 nuclear en el 80% de las biopsias tumorales de pacientes con CNMP (Chattopadhyay et al., 2006). Por otra parte también habíamos descrito que al disminuir la expresión de DUSP1 en células de CNMP estas son más sensibles al quimioterápico CDDP. Estos datos tan relevantes nos han dirigido al desarrollo del presente trabajo, centrado en el papel de DUSP1 en la progresión del cáncer de pulmón, el cual es la mayor causa de mortalidad de cáncer en todo el mundo, así como su papel en la respuesta celular a CDDP, quimioterápico de referencia en este tipo de cáncer.

## **1. Papel de DUSP1 en la progresión tumoral en células de CNMP.**

### **1.1. Perfiles de expresión génica tras inhibir la expresión de DUSP1.**

Los perfiles de expresión génica diferencial obtenidos tras inhibir la expresión de DUSP1 en células de CNMP, sugieren la participación de esta proteína en los procesos de angiogénesis y progresión tumoral lo cual se valoró en este trabajo a través de ensayos funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*.

En primer lugar, se validaron los datos obtenidos de los ensayos realizados con microarrays de expresión mediante qRT-PCR, seleccionándose varios genes involucrados en progresión tumoral y la validación del descenso en expresión del gen *DUSP1* verificó la efectividad de la inhibición obtenida con el retrovirus DUSP1-ARNi en la línea celular H460cri. También se estudió *DUSP6*, ya que otros autores habían descrito su sobreexpresión en el CNMP (Zhang et al., 2010). Por otra parte se seleccionaron *VEGFC*, *NRP1* y *SH2D2A*, ya que son relacionados con la señalización de VEGF y angiogénesis (Olsson et al., 2006; Wu et al., 2000). Finalmente también se

seleccionó **BMP2** relacionado con progresión e invasión tumoral (Langenfeld et al., 2005).

La **neuropilina NRP1** es un receptor sin dominio intracelular quinasa, que forma complejos con los receptores VEGFR1 y VEGFR2 y cuyos niveles de expresión hemos encontrado aumentados en las células con expresión inhibida de *DUSP1*. Uno de los ligandos específicos que se une a VEGFR2 es **VEGFC**, que se sobreexpresa en células de cáncer de mama aumentando la linfangiogénesis intratumoral y la metástasis hacia los nódulos linfáticos y pulmones (Skobe et al., 2001). Precisamente la expresión del gen **VEGFC** está inhibida significativamente en la línea celular H460cri. Y podría implicar que estas células tuviesen una menor capacidad angiogénica que las parentales. El dominio intracelular quinasa (KDR) del receptor VEGFR2 participa en el inicio de la cascada intracelular tras la activación del receptor. Este dominio KDR fosforila proteínas como **SH2D2A**, que participa en la cascada de señalización intracelular que tiene como producto final la transcripción de genes relacionados con proliferación celular, angiogénesis, migración y supervivencia como FGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC y VEGFD incrementando así el proceso angiogénico (Bergers and Benjamin, 2003). Por otra parte, en células H460cri se encontró una expresión menor de **BMP2** que en células H460v. BMP2 es un factor de crecimiento y se ha descrito que se encuentra sobreexpresado en CNMP, aumentando la migración celular y la invasión en el tumor (Langenfeld et al., 2005). También se ha descrito que la inhibición de BMP2 reduce el crecimiento tumoral (Langenfeld et al., 2005). Por tanto en células H460cri esperaríamos encontrar un menor crecimiento tumoral y menor capacidad invasiva que en células H460v.

Aunque no se procedió a su validación por qRT-PCR, cabe destacar también otros genes con menor nivel de expresión en células H460cri, identificados a partir del estudio realizado con los *microarrays* de expresión: **PIK3R1** regula la vía de señalización AKT/PKB. Se ha descrito que PIK3R1 regula supervivencia celular y esta implicada en una menor respuesta a quimioterapia en cáncer de pulmón (Cortes-Sempere et al., 2009; Downward, 2008; Marinov et al., 2009; Sos et al., 2009). Por otro lado también se encontró **DKKI** (homólogo 1 dickkopf) que es un potente antagonista de la vía de señalización de Wnt, y esta expresado en niveles altos en carcinoma de pulmón, de esófago (Yamabuki et al., 2007) y hepatocarcinomas (Yu et al., 2009). **PLAT** (el activador plasminógeno tisular) es otro de los genes inhibidos en H460cri.

Este gen se encuentra menos expresado en tumores no angiogénicos que en tumores angiogénicos de CNMP (Offersen et al., 2007). Finalmente, la expresión de *EGFR* (el receptor del factor de crecimiento epidérmico) también se encontró disminuida en los *microarrays* de expresión. Este receptor es de gran interés, no sólo por su potencial oncogénico, sino también como diana terapéutica (Hynes and MacDonald, 2009). De hecho, el tratamiento con inhibidores de la actividad quinasa del receptor en pacientes con CNMP que presentan el gen mutado, induce un descenso en el crecimiento tumoral. En su conjunto los resultados que hemos obtenido indican que en células H460cri hay una inhibición en la expresión de genes relevantes para la proliferación celular como *PIK3R1*, *DKK* y *EGFR* y para el proceso de angiogénesis como *PLAT*, por tanto el mantenimiento elevado de los niveles de expresión de estos genes en células de CNMP representaría una ventaja para la proliferación celular.

### **1.2. Implicación de DUSP1 en los cambios de expresión de los genes validados.**

Con la finalidad de confirmar el posible papel de DUSP1 en la regulación de los genes validados por qRT-PCR, se sobreexpresó DUSP1 en las células H460cri, analizándose el cambio en la expresión de dichos genes. *DUSP6*, *SH2D2A* y *VEGFC* recuperaron su expresión a valores similares a la línea celular H460v. Esto indica que la expresión de estos tres genes debe estar bajo el control directo de DUSP1 probablemente a través de las quinasas JNK y p38. Al mismo tiempo, no se encontró el cambio de expresión esperado en *NRP1* y *BMP2*, lo que sugiere que; o estos genes no están directamente regulados por DUSP1, o bien los niveles de sobreexpresión obtenidos para DUSP1 no fueron lo suficientemente eficaces como para modificar la expresión de estos genes. Inicialmente, la expresión de todos estos genes (excepto *NRP1*), parece estar regulada en parte por las quinasas JNK y p38 $\alpha$ , según los resultados obtenidos tras su sobreexpresión transitoria en las células H460v. Además, la inhibición de la expresión de *DUSP1* en otra línea celular de CNMP como es H23, mostró resultados similares en cuanto a la inhibición de los genes descritos anteriormente, sugiriendo que el papel de DUSP1 en el mantenimiento del nivel de expresión de estos genes es un proceso general en CNMP.

Otro proceso en el que nos centramos en nuestro estudio fue en la posible interacción funcional de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6. Se encontró que en todas las situaciones estudiadas en las que sobreexpresamos DUSP1, tanto en células 293T,



H460v, H460cri y H460cri s.e. DUSP1, se incrementa la activación del promotor de DUSP6. Además, la inhibición de la expresión de DUSP1 en células H460v también inhibe la actividad del promotor de DUSP6. Por tanto, el conjunto de estos datos sugieren que DUSP1 estaría participando en la regulación de la expresión de DUSP6. La sobreexpresión de DUSP6 esta relacionada con cáncer y se ha descrito su sobreexpresión en algunos tumores específicos como el CNMP que sobreexpresan EGFR y Ras/Raf (Sato et al., 2006), en las células H460cri esta expresión es inhibida respecto de las células parentales. Además, el promotor de DUSP6 contiene 4 sitios de unión para el factor de transcripción EGR-1 (Morrison et al., 2008) que es una diana transcripcional de la señalización de EGFR (Nutt et al., 2007), gen cuya expresión, como se ha mencionado anteriormente, está inhibida en las células H460cri. Por tanto, en las células H460cri la inhibición de la expresión de EGFR, podría jugar un papel en la regulación de la expresión de DUSP6.

### **1.3. Implicación de la expresión de DUSP1 en la progresión tumoral, angiogénesis y metástasis en el CNMP.**

Los datos obtenidos en el análisis de la capacidad migratoria de las células H460 y H23 indican que tanto las células H460cri como las H23cri tienen disminuida la capacidad celular migratoria debido a la disminución en los niveles de DUSP1 respecto de sus controles. Además, la sobreexpresión transitoria de las proteínas JNK y p38 $\alpha$  en células H460v indujo un fenotipo similar al encontrado en las células H460cri. Esto indica que puesto que la actividad fosfatasa de DUSP1 defosforila y por tanto inactiva a las proteínas JNK y p38 $\alpha$ , altos niveles de DUSP1 equivaldrían a una inhibición de estas quinasas. Por tanto, inhibir la expresión de DUSP1 con ARNi ó sobreexpresar estas quinasas deriva en un mismo resultado, indicando que el papel de DUSP1 en migración está relacionado con su capacidad de regulación sobre las quinasas JNK y p38.

Los cambios observados en los niveles de expresión de genes relacionados con angiogénesis sugirieron que había diferencias en la capacidad angiogénica de las células H460v y H460cri. Se ha descrito que la angiogénesis es un proceso esencial para el crecimiento de órganos y su reparación, sin embargo, el desequilibrio en este proceso contribuye a numerosos desordenes patológicos y al cáncer entre otros. También es conocido que un aumento de la angiogénesis no inicia la malignidad pero si promueve

la progresión tumoral y metástasis (Carmeliet, 2005). Por estos motivos estudiamos si los cambios observados en los niveles de expresión de genes relacionados con el proceso de angiogénesis resultaban en diferencias en la capacidad angiogénica entre las líneas celulares H460v y H460cri, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Nuestros resultados indican que las células H460 con menores niveles de DUSP1, secretan menos factores pro-angiogénicos al medio y por consiguiente su medio condicionado promueven en menor medida la formación de vasos sanguíneos nuevos. Cuando se analizó por inmunohistoquímica la expresión de VEGFC en los tumores generados por las células H460cri su expresión era menor, lo que justificaría el menor reclutamiento de vasos sanguíneos observado (He et al., 2005). Este resultado concuerda con los obtenidos tras los análisis realizados con los datos obtenidos por los arrays de expresión, ya que la expresión del gen *VEGFC* esta disminuida en células H460cri al igual que la expresión de la proteína en el tumor inducido por esta línea celular. Además, cuando se realizan los ensayos de tumorigenicidad se observa la aparición de tumores con menor frecuencia en los flancos inoculados con células H460cri, el tiempo que tarda en aparecer el tumor es mayor y los tumores son de menor tamaño que los generados por las células H460v. La disminución en la capacidad angiogénica observada en las células H460cri puede por tanto inducir una disminución del número de vasos sanguíneos que rodean el tumor, reducir el aporte de oxígeno y nutrientes, afectando así negativamente al crecimiento tumoral.

En cuanto al efecto de la disminución de los niveles de DUSP1 en la capacidad metastásica y progresión tumoral, nuestros datos sugieren que la disminución en los niveles de DUSP1 en las células H460 reduce severamente la angiogénesis y como resultado reduce también el potencial metastático. Es decir que la disminución del número de vasos sanguíneos que rodean el tumor derivado de células H460cri resulta en una reducción el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, y como consecuencia en la capacidad de diseminación tumoral. Cuando inyectamos ambas líneas celulares H460v y H460cri, en la vena de la cola del ratón, el primer sitio de anidación de las células parece ser el pulmón y su potencial metastático podría depender de la eficiencia con la que el tumor primario fuese capaz de inducir neoangiogénesis, para permitir que las células intravasen y escapen por el torrente circulatorio y extravasen a otros órganos distantes al primer sitio de anidación. Ambas líneas celulares H460v y H460cri eran capaces de llegar al pulmón del ratón tras su inoculación, ya que el número de animales

con tumores en pulmón era similar, pero solo en el caso de los ratones inoculados con las células H460v se encontró migración a otros órganos distantes. Cuando se estudio el nivel de vascularización de los tumores se observó que los tumores de pulmón que derivaban de las células H460cri estaban menos vascularizados que los derivados de las células H460v, lo que incidía en una menor capacidad metastásica. En resumen nuestros resultados indican que en el CNMP, la expresión de DUSP1 contribuye al crecimiento, a la invasividad del tumor, y a la angiogénesis.

DUSP1 se conoce como uno de los 11 genes que determinan el perfil de expresión a metástasis a hueso en células de cáncer de mama (Kang et al., 2003) y su expresión en aquellas células con tropismo a hueso hacen que la metástasis sea más agresiva. Cuando se inhibe la expresión de DUSP1 en células de cáncer de mama, se observa que en aquellos ratones inyectados con estas células disminuía la metástasis a hueso. Por tanto estos datos apoyan un papel relevante de DUSP1 en metástasis (Kang et al., 2003). Nuestros datos muestran además una correlación directa entre la expresión de DUSP1 y una mayor angiogénesis en tumores de pacientes con CNMP, ya que hemos observado que en muestras histológicas de estos pacientes, DUSP1 se localiza cerca de los vasos sanguíneos, observándose además una fuerte correlación entre la expresión de DUSP1 y de VEGFC.

Globalmente, estos resultados sugieren que DUSP1 participa en los procesos de migración, invasión, angiogénesis y metástasis en CNMP, puesto que la inhibición de la expresión de DUSP1 atenúa estos procesos. Además, los resultados obtenidos en muestras de pacientes sugieren que la expresión de DUSP1 podría considerarse como un buen marcador tumoral de mal pronóstico e incluso como biomarcador para la posterior combinación de quimioterápicos y fármacos de angiogénesis en CNMP. Finalmente, la inhibición de la actividad de DUSP1 podría ser una buena estrategia para inhibir la angiogénesis, invasión tumoral y metástasis señalándola como una posible nueva diana terapéutica de la que pudieran beneficiarse pacientes con CNMP.

## **2. Papel de DUSP1 en respuesta a CDDP en células de CNMP.**

El CDDP es uno de los fármacos que se utiliza habitualmente para el tratamiento con quimioterapia combinada, en pacientes con CNMP avanzado.

Estudios previos, algunos realizados en el laboratorio, utilizando dominantes negativos o ARNi revelaron que la expresión de DUSP1 aumenta la resistencia a cisplatino, doxorubicina y paclitaxel en cáncer de mama, osteosarcoma y CNMP, debido a la inhibición de la actividad de JNK (Chattopadhyay et al., 2006; Rojo et al., 2009; Sanchez-Perez et al., 2000; Small et al., 2007). En estos estudios se encontró que en tejido normal de pulmón, DUSP1 se localizaba en el citoplasma de la célula, mientras que en tejido tumoral de pacientes con CNMP, DUSP1 se localiza mayoritariamente en el núcleo celular (Chattopadhyay et al., 2006), donde regula la magnitud y duración de la activación de JNK, P38 y ERK y su señalización (Owens and Keyse, 2007) y la inhibición en la expresión de DUSP1 aumentaba la sensibilidad a cisplatino. Apoyando estos resultados, se ha descrito que hay una correlación entre la sobreexpresión de DUSP1 en carcinoma de mama infiltrante considerándose su expresión como factor independiente de mal pronóstico que predice recidivas en pacientes (Rojo et al., 2009).

### **2.1. Significado biológico de las agrupaciones génicas observadas según la respuesta al tratamiento con CDDP y la expresión de DUSP1.**

Apoyándonos por tanto en el posible efecto de DUSP1 mediando la acción quimioterápica del CDDP, se estudió el efecto global de la expresión de DUSP1 en las funciones celulares de líneas de CNMP durante la respuesta al tratamiento con este agente. Para ello en el abordaje experimental se trataron las células H460v y H460cri con cisplatino a diferentes tiempos y se estudiaron los cambios en la función génica mediante microarrays de expresión. Los resultados obtenidos se combinaron según tres análisis diferenciales para conocer la respuesta celular a los diferentes tratamientos con CDDP y la función de DUSP1 en estos tratamientos. Como resultado se obtuvieron tres agrupaciones génicas.

El primer grupo corresponde a 596 genes que cambian a lo largo del tiempo en ambas líneas celulares en respuesta a CDDP. En este grupo se identificaron genes relacionados con las MAPK (*Jun*, *DUSP2*) y con la regulación de la apoptosis (*EGFR*, *IGFIR1*, *PHLDA1*, *TNFAIP3*). En lo que se refiere a MAPK, los datos bibliográficos indican que *c-Jun* (sobreexpresado en este caso), está regulado por la activación de JNK en respuesta a cisplatino (Brozovic and Osmak, 2007; Sanchez-Perez et al., 2000). También se ha descrito que *DUSP2/PAC-1* (sobreexpresado) regula negativamente

ERK1/2. En modelos de tumores murinos se ha descrito un incremento de la expresión de DUSP2 después de radiación (Mitra and Krishna, 2007), y posiblemente en el modelo descrito en esta tesis, el tratamiento con CDDP podría inhibir las actividades de las MAPKs a través de la regulación de esta fosfatasa. La expresión de *EGFR* la encontramos inhibida a lo largo del tiempo en respuesta al tratamiento con CDDP y de acuerdo con esto, se ha descrito que la expresión de *EGFR* se inhibe en respuesta a este agente en cáncer de esófago (Schneider et al., 2005). También se encontró inhibición de la expresión de *IGFIR1* (el receptor-1 del factor de crecimiento de la insulina) a lo largo del tratamiento. Se ha descrito que *IGFIR1* media en la supervivencia celular a diferentes tipos de estrés (O'Connor, 2003); según nuestros resultados, la disminución de su expresión está relacionada con la inducción de muerte celular por el cisplatino. La sobreexpresión que observamos en *PHLDA1* (el miembro A de la familia del dominio como homología a la pleckstrina), concuerda con lo descrito para una variedad de estímulos externos donde juega un papel como mediador de la apoptosis (Nagai et al., 2007). Finalmente *TNFAIP3* (la proteína 3 inducida por el factor de necrosis del tumor), se encontró sobreexpresada y se ha descrito que esta proteína inhibe la activación de NF-kappa B, que es un factor de transcripción involucrado en la carcinogénesis de pulmón y resistencia a quimioterapia. Por tanto la sobreexpresión de *TNFAIP3* redundaría en una mayor inducción de muerte celular bloqueando la actividad del factor de transcripción NF-κB (Bednarski et al., 2009; Cortes-Sempere et al., 2009; Chen et al., 2008; Meylan et al., 2009).

La segunda agrupación génica corresponde a 396 genes que se modulan a lo largo del tiempo en respuesta a CDDP en células H460cri, mientras que los cambios que acontecen en la línea H460v no son significativos, lo que indica que son genes que responden a CDDP en ausencia de DUSP1. *SCD* (desaturasa delta 9), *FADS1* (homólogo dinucleotido sintetasa de la flavina adenina) y *SQLE* (escualeno epoxidasa) juegan un papel importante en el mantenimiento del estado de redox de la célula en respuesta a estrés. En este grupo también aparecen genes sobreexpresados que pertenecen a la vía del mevalonato, como *MVD* (difosfo mevalonato decarboxilasa) (Wu et al., 2010), *MVK* (mevalonato quinasa) y *HMCGR* (CoA 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa) (Clendening et al., 2010). Todos estos enzimas podrían jugar un papel importante en la biosíntesis de la membrana celular, en un intento de restaurar el equilibrio celular en respuesta a la apoptosis inducida por CDDP. También *IGFBP3* e

*IGFBP7* (proteínas de unión al factor de crecimiento de la insulina de los tipos 3 y 7) se encontraron sobreexpresadas en este grupo y ambos se unen al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) I o II. Se ha descrito que la unión de *IGFBP3* a *IGFI* inhibe las señales de supervivencia mediadas por este último y la pérdida de expresión de *IGFBP3* reduce la sensibilidad a CDDP en células de CNMP (Ibanez de Caceres et al., 2010). Además se ha descrito que *IGFBP7* se requiere para inducir senescencia o apoptosis en líneas celulares de cáncer humano que tienen activados los oncogenes *BRAF* y *RAS* (Wajapeyee et al., 2009), así mismo, actúa como un oncosupresor génico en carcinogénesis de tiroides (Vizioli et al., 2010). Por otra parte, el tratamiento con *IGFBP7* como agente antitumoral reduce el crecimiento en células de cáncer de colon y la metástasis en células de melanoma en ratones (Wajapeyee et al., 2009). Por tanto este grupo génico parece regularse de manera independiente a *DUSP1* y promueven mecanismos inhibitorios de la supervivencia celular

El tercer grupo comprende 488 genes cuya expresión está alterada significativamente por el tratamiento de CDDP solo cuando *DUSP1* se expresa en las células (H460v). Entre estos se incluyen algunas MAPK fosfatasa duales, tales como *DUSP1*, *DUSP6* y *DUSP5*, cuyos niveles de expresión se incrementan. La sobreexpresión de *DUSP1* era esperable, puesto que esta fosfatasa se expresa en respuesta a diferentes tipos de estrés como radiación UV y cisplatino (Sanchez-Perez et al., 1998; Staples et al., 2010) y la inducción de su expresión es dependiente de la señalización de  $p38\alpha$  (Staples et al., 2010). Por otra parte tanto la expresión de *DUSP5* como de *DUSP6* se induce en otros sistemas celulares por estrés (Liovic et al., 2008), pudiendo en nuestro caso responder de la misma forma ante el agente quimioterápico CDDP. De hecho, en el primer apartado de esta tesis se describe que los cambios en las actividades de JNK y/o  $p38$  son debidos a la regulación por *DUSP1*, alterando estas quinasas a su vez los niveles de expresión de *DUSP6*. Otro grupo de genes sobreexpresado son las interleuquinas *IL1 $\alpha$*  e *IL8*, ambas citoquinas proinflamatorias, cuya expresión está inducida probablemente debido a los efectos secundarios inflamatorios del cisplatino (Kuhad et al., 2007). Además se encontraron genes involucrados en la regulación del ciclo celular y la actividad MAPK tales como *GADD45* (gen de parada del crecimiento e inducible por daño al ADN 45) y *MAP2K6* (*MKK6*). *GADD45* es miembro de un grupo de genes cuyos niveles de expresión se incrementan por estrés y por el tratamiento con agentes del daño al ADN. Su expresión

está mediada por p38 y la vía MTK1/MKK4 quinasa. A su vez, la vía GADD45-MKK4-MKK6 modula la actividad de p38 y JNK, que están involucradas en la inducción de apoptosis en respuesta a CDDP y otros tipos de estrés (Chattopadhyay et al., 2006; Staples et al., 2010)

## **2.2. Regulación diferencial de p38 y ATF2 en relación con la expresión de DUSP1.**

Las rutas de señalización de p38 y JNK, son claves en la regulación de la apoptosis celular en respuesta a estrés, estas rutas están además moduladas por GADD45 y MKK6 (Mita et al., 2002); cuya expresión hemos encontrado alterada en respuesta a CDDP en células que expresan DUSP1. Por este motivo, se ha valorado el estado de estas rutas y la regulación de la apoptosis en las líneas celulares H460v y H460cri.

Nuestro grupo fue el primero en describir una mayor sensibilidad al CDDP en células de CNMP en las cuales la expresión de DUSP1 se había inhibido (Chattopadhyay et al., 2006) y en el presente trabajo, se muestra que esta sensibilidad al agente quimioterápico está relacionada con un aumento en la apoptosis. Por otro lado, ensayos previos similares a los aquí descritos y realizados con la línea celular no tumoral HEK293T cuando se expresa un gen dominante negativo para DUSP1 (Sanchez-Perez et al., 2000; Sanchez-Perez et al., 1998), describen a JNK como principal activador de apoptosis. En este sentido, nuestros resultados demuestran que el inhibidor de p38 (SB203580) protege de la apoptosis inducida por CDDP, con mayor eficacia en células de CNMP H460cri mientras que el inhibidor de JNK (SP600125) no influye significativamente en la inducción de apoptosis en estas células. Estos datos indican un cambio en la función entre p38 $\alpha$  y JNK en células de CNMP con respecto a células no tumorales. Recientemente se ha descrito que p38 $\alpha$  juega un papel importante en la tumorigénesis de cáncer de pulmón en el modelo de ratones nulos para p38 $\alpha$  (Ventura et al., 2007) y que además regula negativamente la proliferación en células de cáncer de pulmón e hígado inhibiendo la vía de JNK (Cuadrado and Nebreda, 2010; Wagner and Nebreda, 2009). Por tanto es factible pensar que en CNMP sea p38 y no JNK la que juega un papel relevante tanto en la carcinogénesis como en la regulación de apoptosis en respuesta a quimioterapia.

La regulación de la apoptosis también se regula en respuesta a determinados estímulos con un balance entre los factores de transcripción que activan la supervivencia

y la apoptosis; entre estos factores de transcripción se han estudiado ampliamente los relacionados con la ruta de las MAPK (Cuenda and Rousseau, 2007) activados en respuesta a estrés o daño al ADN. Se ha observado una disminución en la expresión de los factores de transcripción involucrados en supervivencia (*SRF*, *MLK1* y *MLK2*) en las células carentes de DUSP1. Por otra parte, también se han estudiado los factores de transcripción relacionados con apoptosis: ATF2 y c-Jun, sustratos de p38 y JNK, en respuesta a CDDP. Ambos factores de transcripción se activaban a tiempo mas corto en células H460cri en respuesta a CDDP, efecto posiblemente relacionado con la mayor apoptosis observada en estas células.

El papel que juega p38 en la regulación de apoptosis parece ser relevante en ambas líneas celulares. Cuando se inhibió la actividad de p38, se encontró que en células H460cri, p38 no mediaba la fosforilación de ATF2 en respuesta a CDDP, pero sí de c-Jun. Estos resultados indicaban que en células H460cri, la fosforilación de ATF2 no era dependiente de p38, por lo que otra quinasa como JNK podría estar involucrada en su fosforilación. Sin embargo, cuando se utilizó el inhibidor de JNK en células H460cri, no se observaron cambios en la fosforilación de ATF2 y que por tanto podía ser la actividad de otra quinasa la inductora de supervivencia al inhibir las células con p38. La actividad de esta quinasa debería estar también modulada por DUSP1. El factor de transcripción ATF2 está implicado en el control transcripcional, remodelación de la cromatina y la respuesta al daño en el ADN y en nuestro caso, en células H460v parece estar regulado mediante la fosforilación por p38. Además, cuando se expresa DUSP1 (células H460v), p38 podría ser la responsable de la apoptosis inducida a través de la activación de ATF2, ya que se observó que la apoptosis disminuía cuando se inhibía la expresión de ATF2 en estas células, mientras que en células H460cri, este efecto sobre la muerte celular no se observa. Así pues, ATF2 no estaría involucrado en la inducción de apoptosis cuando la expresión de DUSP1 esta inhibida en las células. Por tanto estos datos apoyarían la actividad dual descrita para el factor de transcripción de ATF2, oncogénica o supresora de tumores (Bhoumik and Ronai, 2008; Lopez-Bergami et al., 2010).

En células H460v tratadas con CDDP, la actividad de p38 parece modular la expresión de GADD45 y la fosforilación de MKK3/6 y ATF2. Estos resultados concuerdan con lo que se ha descrito sobre el papel regulatorio de GADD45 en la fosforilación de MKK3/6 (Mita et al., 2002). Por otra parte, cuando en células H460cri

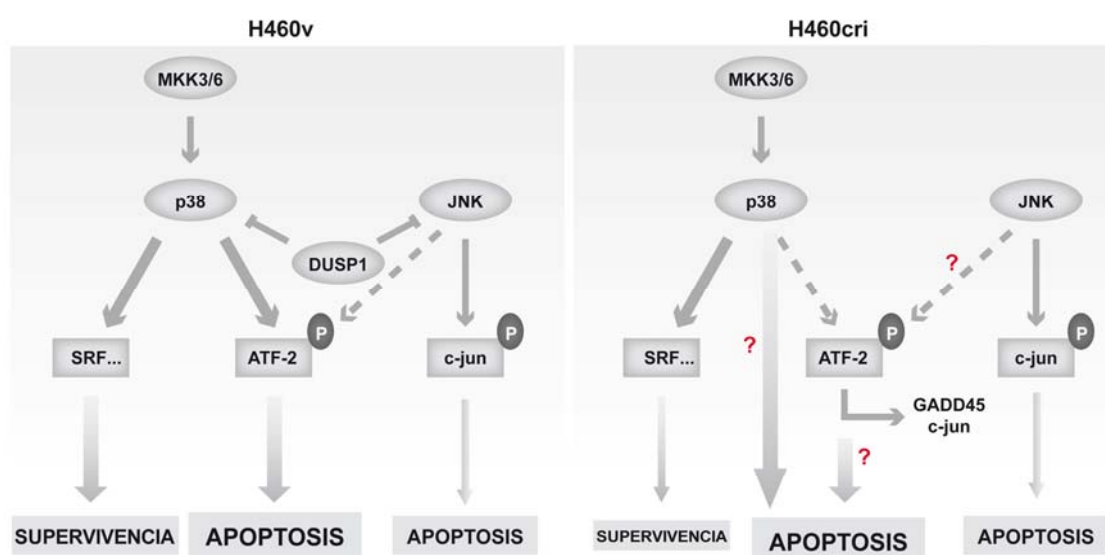


se inhibe la actividad de p38, no se modifica ni la expresión de GADD45, ni MKK3/6 o la fosforilación de ATF2, probablemente esto sea debido a la independencia observada en nuestros experimentos de p38 en la acción de ATF2 y sugiriendo que estas interacciones requieren de la actividad de DUSP1.

De acuerdo con los datos previos que describen el papel de ATF2 regulando la transcripción de GADD45 (Maekawa et al., 2008), nosotros hemos observado que la inhibición de la expresión de ATF2 en respuesta a cisplatino induce un descenso en los niveles proteicos de GADD45, pero también en la fosforilación de MKK3/6 en células H460cri y no en células H460v donde encontrábamos diferencias en la apoptosis.

Todos estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual se obtiene mayor sensibilidad al CDDP cuando se inhibe la expresión de DUSP1 en células H460, se debe a la participación de la vía p38 que media muerte celular, independientemente de ATF2 (Figura 31).

Desde el punto de vista translacional, se ha descrito recientemente a DUSP1 como diana para la terapia contra el cáncer de mama y como biomarcador para metástasis a hueso en este tumor (Minn et al., 2005; Rojo et al., 2009). Los resultados demuestran que la expresión de DUSP1 promueve la angiogénesis y metástasis en CNMP y que los pacientes con esta patología que presenten niveles bajos de DUSP1 serían los que más se beneficiarían de una terapia con CDDP, siendo la actividad de p38, de manera independiente a la activación del factor de transcripción ATF2, el responsable en parte del aumento en la eficacia del tratamiento.



**Figura 31. Papel de p38 y ATF2 en la respuesta a CDDP en células H460v y H460cri.** En células H460v la apoptosis inducida por CDDP está mediada por p38 y ATF2 y en células H460cri se observa que solo depende de p38.

# **CONCLUSIONES**

---

1. Los perfiles de expresión génica diferencial en células de CNMP sugieren la participación de DUSP1 en la regulación de diferentes procesos biológicos relacionados con la progresión tumoral, regulación de actividad MAP quinasa y proliferación celular a través de la señalización por factores de crecimiento y receptores tirosina-quinasa.
2. Los cambios en expresión génica dependientes de la expresión de DUSP1, se regulan como consecuencia de la actividad de los sustratos de DUSP1, las quinasas JNK y p38.
3. Los ensayos funcionales demuestran que una de las funciones de DUSP1 en células de CNMP sería el mantenimiento de la capacidad migratoria e invasiva y el crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos
4. La expresión de DUSP1 en células de CNMP contribuye a mantener la capacidad angiogénica probablemente a través de la regulación en la expresión y producción de VEGFC. Esta función pro-angiogénica podría facilitar el aumento en metastasis que se observa en las células que expresan DUSP1.
5. La correlación existente en biopsias de tumores humanos de CNMP entre la expresión de VEGFC y DUSP1 en las zonas de mayor vascularización apoya fuertemente la función de DUSP1 en la angiogénesis y progresión tumoral en este tumor.
6. En respuesta a CDDP se regula, de forma dependiente de DUSP1, la expresión de genes de MAPK fosfatasas duales, interleuquinas, proteínas de regulación del ciclo celular y reguladores de la actividad MAPK.
7. La inhibición en la expresión de DUSP1 aumenta la sensibilidad al CDDP a través de un incremento en la apoptosis tras el tratamiento con este agente. Esta diferencia se debe en parte a que en ausencia de DUSP1 hay una disminución en la expresión de los factores de transcripción relacionados con supervivencia (SRF, MLK1 y MLK2) y por la activación más temprana de proteínas relacionadas con apoptosis (ATF2 y cJUN).

8. En células de CNMP que expresan DUSP1 la apoptosis en respuesta a CDDP está mediada por la actividad de la vía p38-ATF2. En ausencia de esta fosfatasa la inducción de apoptosis depende solo de la actividad p38.
9. Como conclusión final, DUSP1 parece jugar un papel importante en la progresión tumoral en CNMP, probablemente debido a su participación en los procesos de angiogénesis y metástasis. Además DUSP1 parece estar implicada en la respuesta al agente CDDP, a través de la regulación de los procesos apoptóticos mediados por la vía de señalización de p38.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

<http://bioinfo.weizman.ac.il/cards/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

**Bang, Y.J., Kwon, J.H., Kang, S.H., Kim, J.W., and Yang, Y.C.** (1998). Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 43-47.

**Bednarski, B.K., Baldwin, A.S., Jr., and Kim, H.J.** (2009). Addressing reported proapoptotic functions of NF-kappaB: targeted inhibition of canonical NF-kappaB enhances the apoptotic effects of doxorubicin. *PLoS One* 4, e6992.

**Bergers, G., and Benjamin, L.E.** (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 3, 401-410.

**Bermudez, O., Pages, G., and Gimond, C.** (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C189-202.

**Bhoumik, A., and Ronai, Z.** (2008). ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7, 2341-2345.

**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.

**Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P.** (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 60, 261-310.

**Boyle, P., and Levin, B.** (2008). World Cancer Report 2008. World cancer report 2008.

**Brozovic, A., and Osmak, M.** (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* 251, 1-16.

**Carmeliet, P.** (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

**Cigudosa, J.C.** (2004). [The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology]. *An Sist Sanit Navar* 27, 11-20.

**Clendening, J.W., Pandyra, A., Boutros, P.C., El Ghamrasni, S., Khosravi, F., Trentin, G.A., Martirosyan, A., Hakem, A., Hakem, R., Jurisica, I., et al.** (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15051-15056.

**Cortes-Sempere, M., Chattopadhyay, S., Rovira, A., Rodriguez-Fanjul, V., Belda-Iniesta, C., Tapia, M., Cejas, P., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Sanchez-Perez, I., et al.** (2009). MKP1 repression is required for the chemosensitizing



effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 286, 206-216.

**Costa, C., and Vendeira, P.** (2008). Does erectile tissue angioarchitecture modify with aging? An immunohistological and morphometric approach. *J Sex Med* 5, 833-840.

**Cuadrado, A., and Nebreda, A.R.** (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.

**Cuenda, A., and Rousseau, S.** (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1358-1375.

**Chang, L., and Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

**Chattopadhyay, S., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Belda-Iniesta, C., Moratilla, C., Cejas, P., Fresno-Vara, J.A., de Castro-Carpeno, J., Casado, E., Nistal, M., et al.** (2006). MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25, 3335-3345.

**Chen, W., Wang, X., Bai, L., Liang, X., Zhuang, J., and Lin, Y.** (2008). Blockage of NF-kappaB by IKKbeta- or RelA-siRNA rather than the NF-kappaB super-suppressor IkappaBalpha mutant potentiates adriamycin-induced cytotoxicity in lung cancer cells. *J Cell Biochem* 105, 554-561.

**Chiang, A.C., and Massague, J.** (2008). Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359, 2814-2823.

**Christopher G.Azzoli, M.**, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (2010). *Non-small cell lung cancer* (Sudbury, Jones and Bartlett Publishers).

**Davis, R.J.** (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

**Denkert, C., Schmitt, W.D., Berger, S., Reles, A., Pest, S., Siegert, A., Lichtenegger, W., Dietel, M., and Hauptmann, S.** (2002). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 102, 507-513.

**Dhillon, A., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W.** (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.

**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.

**Downward, J.** (2008). Targeting RAS and PI3K in lung cancer. *Nat Med* 14, 1315-1316.

**Ekerot, M., Stavridis, M.P., Delavaine, L., Mitchell, M.P., Staples, C., Owens, D.M., Keenan, I.D., Dickinson, R.J., Storey, K.G., and Keyse, S.M.** (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J* 412, 287-298.

**Fidler, I.J., Balasubramanian, K., Lin, Q., Kim, S.W., and Kim, S.J.** (2010). The brain microenvironment and cancer metastasis. *Mol Cells* 30, 93-98.

**Folkman, J.** (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 3, 65-71.

**Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C.** (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.

**Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A., Cancer, I.A.f.R.o., and Organization, W.H.** (2000). Pathology and genetics of tumours of the digestive system (IARC press Lyon:).

**He, Y., Rajantie, I., Pajusola, K., Jeltsch, M., Holopainen, T., Yla-Herttuala, S., Harding, T., Jooss, K., Takahashi, T., and Alitalo, K.** (2005). Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 65, 4739-4746.

**Herbst, R.S., Heymach, J.V., and Lippman, S.M.** (2008). Lung cancer. *N Engl J Med* 359, 1367-1380.

**Herbst, R.S., Onn, A., and Sandler, A.** (2005). Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 23, 3243-3256.

**Hynes, N.E., and MacDonald, G.** (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21, 177-184.

**Ibanez de Caceres, I., Cortes-Sempere, M., Moratilla, C., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Manguan-Garcia, C., Cejas, P., Lopez-Rios, F., Paz-Ares, L., de CastroCarpeno, J., et al.** (2010). IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 29, 1681-1690.

**Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.

**Iwakawa, R., Kohno, T., Kato, M., Shiraishi, K., Tsuta, K., Noguchi, M., Ogawa, S., and Yokota, J.** (2011). MYC Amplification as a Prognostic Marker of Early-Stage Lung Adenocarcinoma Identified by Whole Genome Copy Number Analysis. *Clin Cancer Res* 17, 1481-1489.

**Jackson, A.L., Zhou, B., and Kim, W.Y.** (2010). HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets* 14, 1047-1057.

**Jimenez, B., and Volpert, O.V.** (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J Mol Med* 78, 663-672.

**Johnson, G.L., and Lapadat, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

**Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massague, J.** (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537-549.

**Kaplan, E.L., and Meier, P.** (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association* 53, 457-481.

**Karin, M., and Gallagher, E.** (2005). From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* 57, 283-295.

**Kelland, L.** (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.

**Kennedy, N.J., and Davis, R.J.** (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle* 2, 199-201.

**Kerbel, R.S.** (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358, 2039-2049.

**Keyse, S.M.** (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 253-261.

**Kobayashi, S., Boggon, T.J., Dayaram, T., Janne, P.A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B.E., Eck, M.J., Tenen, D.G., and Halmos, B.** (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352, 786-792.

**Kuhad, A., Pilkhwal, S., Sharma, S., Tirkey, N., and Chopra, K.** (2007). Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem* 55, 10150-10155.

**Langenfeld, E.M., Bojnowski, J., Perone, J., and Langenfeld, J.** (2005). Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 80, 1028-1032.

**Liao, Q., Guo, J., Kleff, J., Zimmermann, A., Buchler, M.W., Korc, M., and Friess, H.** (2003). Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 124, 1830-1845.

**Liovic, M., Lee, B., Tomic-Canic, M., D'Alessandro, M., Bolshakov, V.N., and Lane, E.B.** (2008). Dual-specificity phosphatases in the hypo-osmotic stress response of keratin-defective epithelial cell lines. *Exp Cell Res* 314, 2066-2075.

**Loda, M., Capodieci, P., Mishra, R., Yao, H., Corless, C., Grigioni, W., Wang, Y., Magi-Galluzzi, C., and Stork, P.J.** (1996). Expression of mitogen-activated protein

kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* 149, 1553-1564.

**Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z.** (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 65-76.

**Maekawa, T., Sano, Y., Shinagawa, T., Rahman, Z., Sakuma, T., Nomura, S., Licht, J.D., and Ishii, S.** (2008). ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* 27, 1045-1054.

**Magi-Galluzzi, C., Mishra, R., Fiorentino, M., Montironi, R., Yao, H., Capodiceci, P., Wishnow, K., Kaplan, I., Stork, P.J., and Loda, M.** (1997). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Lab Invest* 76, 37-51.

**Mantel, N.** (1963). Chi-square tests with one degree of freedom; extensions of the Mantel-Haenszel procedure. *Journal of the American statistical association* 58, 690-700.

**Marinov, M., Ziogas, A., Pardo, O.E., Tan, L.T., Dhillon, T., Mauri, F.A., Lane, H.A., Lemoine, N.R., Zangemeister-Wittke, U., Seckl, M.J., et al.** (2009). AKT/mTOR pathway activation and BCL-2 family proteins modulate the sensitivity of human small cell lung cancer cells to RAD001. *Clin Cancer Res* 15, 1277-1287.

**Marshall, C.J.** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.

**Meylan, E., Dooley, A.L., Feldser, D.M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C., and Jacks, T.** (2009). Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462, 104-107.

**Minn, A.J., Gupta, G.P., Padua, D., Bos, P., Nguyen, D.X., Nuyten, D., Kreike, B., Zhang, Y., Wang, Y., Ishwaran, H., et al.** (2007). Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6740-6745.

**Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L., and Massague, J.** (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.

**Mita, H., Tsutsui, J., Takekawa, M., Witten, E.A., and Saito, H.** (2002). Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol Cell Biol* 22, 4544-4555.

**Mitra, A.K., and Krishna, M.** (2007). Fractionated and acute irradiation induced signaling in a murine tumor. *J Cell Biochem* 101, 745-752.

**Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A.** (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27, 6958-6969.

- Morrison, D.J., Kim, M.K., Berkofsky-Fessler, W., and Licht, J.D.** (2008). WT1 induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 represents a novel mechanism of growth suppression. *Mol Cancer Res* 6, 1225-1231.
- Nagai, M.A., Fregnani, J.H., Netto, M.M., Brentani, M.M., and Soares, F.A.** (2007). Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 106, 49-56.
- Nguyen, D.X., and Massague, J.** (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8, 341-352.
- Nutt, J.E., Foster, P.A., Mellon, J.K., and Lunec, J.** (2007). hEGR1 is induced by EGF, inhibited by gefitinib in bladder cell lines and related to EGF receptor levels in bladder tumours. *Br J Cancer* 96, 762-768.
- O'Connor, R.** (2003). Regulation of IGF-I receptor signaling in tumor cells. *Horm Metab Res* 35, 771-777.
- Offersen, B.V., Riisbro, R., Knoop, A., Brunner, N., and Overgaard, J.** (2007). Lack of association between level of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and estimates of tumor angiogenesis in early breast cancer. *Acta Oncol* 46, 782-791.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L.** (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.
- Owens, D.M., and Keyse, S.M.** (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26, 3203-3213.
- Pao, W., and Girard, N.** (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12, 175-180.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pfeifer, G.P., and Besaratinia, A.** (2009). Mutational spectra of human cancer. *Hum Genet* 125, 493-506.
- Pulido, R., and Hooft van Huijsduijnen, R.** (2008). Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. *FEBS J* 275, 848-866.
- Rami Porta, R.** (2009). [New TNM classification for lung cancer]. *Arch Bronconeumol* 45, 159-161.
- Rojo, F., Gonzalez-Navarrete, I., Bragado, R., Dalmases, A., Menendez, S., Cortes-Sempere, M., Suarez, C., Oliva, C., Servitja, S., Rodriguez-Fanjul, V., et al.** (2009). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* 15, 3530-3539.

**Rojo, F., Najera, L., Lirola, J., Jimenez, J., Guzman, M., Sabadell, M.D., Baselga, J., and Ramon y Cajal, S.** (2007). 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* *13*, 81-89.

**Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T.** (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* *205*, 698-699.

**Sahai, E.** (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* *7*, 737-749.

**Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., and Perona, R.** (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* *19*, 5142-5152.

**Sanchez-Perez, I., Murguia, J.R., and Perona, R.** (1998). Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* *16*, 533-540.

**Sato, H., Yazawa, T., Suzuki, T., Shimoyamada, H., Okudela, K., Ikeda, M., Hamada, K., Yamada-Okabe, H., Yao, M., Kubota, Y., et al.** (2006). Growth regulation via insulin-like growth factor binding protein-4 and -2 in association with mutant K-ras in lung epithelia. *Am J Pathol* *169*, 1550-1566.

**Schneider, S., Uchida, K., Brabender, J., Baldus, S.E., Yochim, J., Danenberg, K.D., Salonga, D., Chen, P., Tsao-Wei, D., Groshen, S., et al.** (2005). Downregulation of TS, DPD, ERCC1, GST-Pi, EGFR, and HER2 gene expression after neoadjuvant three-modality treatment in patients with esophageal cancer. *J Am Coll Surg* *200*, 336-344.

**Shaulian, E., and Karin, M.** (1999). Stress-induced JNK activation is independent of Gadd45 induction. *J Biol Chem* *274*, 29595-29598.

**Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K., and Detmar, M.** (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* *7*, 192-198.

**Small, G.W., Shi, Y.Y., Higgins, L.S., and Orlowski, R.Z.** (2007). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* *67*, 4459-4466.

**Sos, M.L., Koker, M., Weir, B.A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J.M., Weiss, J., Fischer, F., Frommolt, P., et al.** (2009). PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* *69*, 3256-3261.

**Staples, C.J., Owens, D.M., Maier, J.V., Cato, A.C., and Keyse, S.M.** (2010). Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *J Biol Chem* *285*, 25928-25940.

**Steeg, P.S.** (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 3, 55-63.

**Takekawa, M., and Saito, H.** (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530.

**Tsujita, E., Taketomi, A., Gion, T., Kuroda, Y., Endo, K., Watanabe, A., Nakashima, H., Aishima, S., Kohnoe, S., and Maehara, Y.** (2005). Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 69, 342-347.

**Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., and Nebreda, A.R.** (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 39, 750-758.

**Virtanen, C., Ishikawa, Y., Honjoh, D., Kimura, M., Shimane, M., Miyoshi, T., Nomura, H., and Jones, M.H.** (2002). Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12357-12362.

**Vizioli, M.G., Sensi, M., Miranda, C., Cleris, L., Formelli, F., Anania, M.C., Pierotti, M.A., and Greco, A.** (2010). IGFBP7: an oncosuppressor gene in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 29, 3835-3844.

**Vlahopoulos, S.A., Logotheti, S., Mikas, D., Giarika, A., Gorgoulis, V., and Zoumpourlis, V.** (2008). The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays* 30, 314-327.  
**Wada, T., and Penninger, J.M.** (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-2849.

**Wagner, E.F., and Nebreda, A.R.** (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.

**Wajapeyee, N., Kapoor, V., Mahalingam, M., and Green, M.R.** (2009). Efficacy of IGFBP7 for treatment of metastatic melanoma and other cancers in mouse models and human cell lines. *Mol Cancer Ther* 8, 3009-3014.

**Watanabe, H., Soejima, K., Yasuda, H., Kawada, I., Nakachi, I., Yoda, S., Naoki, K., and Ishizaka, A.** (2008). Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int* 8, 15.

**Wu, G.S.** (2007). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 579-585.

**Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Ozes, O.N., Warren, R.S., and Donner, D.B.** (2000). VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 275, 6059-6062.

**Wu, Z.Z., Lu, H.P., and Chao, C.C.** (2010). Identification and functional analysis of genes which confer resistance to cisplatin in tumor cells. *Biochem Pharmacol* 80, 262-276.

**Yamabuki, T., Takano, A., Hayama, S., Ishikawa, N., Kato, T., Miyamoto, M., Ito, T., Ito, H., Miyagi, Y., Nakayama, H., et al.** (2007). Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 67, 2517-2525.

**Yu, B., Yang, X., Xu, Y., Yao, G., Shu, H., Lin, B., Hood, L., Wang, H., Yang, S., Gu, J., et al.** (2009). Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 50, 948-957.

**Zhang, S.C., Hironaka, S., Ohtsu, A., Yoshida, S., Hasebe, T., Fukayama, M., and Ochiai, A.** (2006). Computer-assisted analysis of biopsy specimen microvessels predicts the outcome of esophageal cancers treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 12, 1735-1742.

**Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A.C., Leidner, R.S., Laframboise, T., Levine, A.D., and Halmos, B.** (2010). Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 31, 577-586.

**Zhao, Q., Wang, X., Nelin, L.D., Yao, Y., Matta, R., Manson, M.E., Baliga, R.S., Meng, X., Smith, C.V., Bauer, J.A., et al.** (2006). MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 203, 131-140.



---

# **ANEXO 1:**

## **Eventos de difusión científica**



## **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS**

### **Frontiers in tumour progresión.**

Madrid, España. 24-27 Octubre 2010.

Presentación poster: "The role of DUSP1 in angiogenesis and lung cancer metastasis".

**Moncho-Amor, V.**, Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Martinez-Poveda, B., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, S., Rovira, A., Albanell, J., Jimenez, B., Rojo, F., Belda-Iniesta, C., Garcia-Foncillas, J., Perona, R.

### **21st Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR-21).**

Oslo, Norway. 26-29 Junio 2010.

Presentación poster. "The role of DUSP1 in angiogenesis and lung cancer metastasis".

**Moncho-Amor, V.**, Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Martinez-Poveda, B., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, S., Rovira, A., Albanell, J., Jimenez, B., Rojo, F., Perona, R.

European Journal of Cancer, Vol. 8, No. 5, June 2010.

### **XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA)**

Madrid, España. 6-8 Mayo 2009.

Comunicación oral: "The role of DUSP1 in angiogenesis and lung cancer metastasis".

**Moncho-Amor, V.**, Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Martinez-Poveda, B., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, S., Rovira, A., Albanell, J., Jimenez, B., Rojo, F., Belda-Iniesta, C., Garcia-Foncillas, J., Perona, R.

### **Stress Signalling and Cancer.**

Madrid 13-15 Octubre 2008.

Comunicación oral: Identification of DUSP1/MKP1 mediated pathways in lung cancer progression.

**Moncho-Amor, V.**, Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, Jimenez, B., Garcia-Foncillas, J., Perona, R.

### **XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).**

Bilbao 10-13 Septiembre 2008.

Presentación poster: Estudio Funcional de Proteína-Fosfatasas de especificidad dual en *Dictyostellium Discoideum*.

**Moncho-Amor, V.**, Galardi-Castilla, M., Perona, R., Sastre, L.

### **20th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR).**

Lyon, Francia. 5-8 Julio 2008.

Presentación poster. "Identification of *DUSP1/MKP1* mediated pathways in lung cancer progression".

**Moncho-Amor, V.**, Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Jimenez, B., Rojo, F., Garcia-Foncillas, J., Perona, R.

European Journal of Cancer, Vol. 6, No. 9, July 2008.

### **VI Congreso Nacional FESEO.**

España. 2005

Presentación poster: "Evaluación de mecanismos de resistencia a quimiorradioterapia en cáncer de recto para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas".

E. Casado, P. Cejas, J. De Castro, C. Belda-Iniesta, J.Feliú, B.Castelo, J.A. Fresno, **V.Moncho**, R. Perona y M. González Barón. Feseo,

### **X Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer (ASEICA)**

Pamplona, España. 13-16 Octubre 2005.

Presentación póster: "Rutas de señalización intracelular involucradas en la respuesta a oxaliplatino en Cáncer Colorrectal"

**V. Moncho Amor**, E. Casado, J. De Castro, C. Belda Iniesta, M. Gonzalez Barón y R. Perona.

### **V CONGRESO NACIONAL de la Federación Española de Sociedades Oncológicas (FESEO)**

Valencia, España. 17-19 Noviembre 2004.

### **PARTICIPACIÓN EN SEMINARIOS, CURSOS Y EVENTOS DE DIFUSIÓN CIENTÍFICA**

#### **Curso "Análisis de datos de expresión génica con R"**

Biomol-Informatics SL. Madrid, 22-25 Junio 2009.

#### **Curso de Capacitación de Operadores de Instalaciones radiactivas.**

Campo de aplicación: **Laboratorio con fuentes no encapsuladas.**

Servicio de Protección Radiológica. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols". Madrid, 13-24 febrero 2006

Homologado por el Consejo de Seguridad Nuclear.

#### **Curso Básico de Radiactividad.**

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols". Madrid, febrero 2003.



# **ANEXO 2: Publicaciones**

---



## 1. Publicaciones que forman parte de la Tesis

**Moncho-Amor, V., Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Martinez-Poveda, B., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, S., Rovira, A., Albanell, J., Jimenez, B., Rojo, F., Belda-Iniesta, C., Garcia-Foncillas, J., Perona, R. (2010).** DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 30, 668-678.

## 2. Publicaciones que no forman parte de la Tesis

**Moncho-Amor, V., Galardi-Castilla, M., Perona, R., and Sastre, L. (2011).** The dual-specificity protein phosphatase MkpB, homologous to mammalian MKP phosphatases, is required for *D. discoideum* post-aggregative development and cisplatin response. *Differentiation* 81, 199-207.

**Perona, R., Moncho-Amor, V., Machado-Pinilla, R., Belda-Iniesta, C., and Sánchez Pérez, I. (2008).** Role of CHK2 in cancer development. *Clinical and Translational Oncology* 10, 538-542.

## ORIGINAL ARTICLE

**DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer**

V Moncho-Amor<sup>1,8</sup>, I Ibañez de Cáceres<sup>2,8</sup>, E Bandres<sup>3</sup>, B Martínez-Poveda<sup>4</sup>, JL Orgaz<sup>4</sup>, I Sánchez-Pérez<sup>1</sup>, S Zazo<sup>5</sup>, A Rovira<sup>6</sup>, J Albanell<sup>6</sup>, B Jiménez<sup>4</sup>, F Rojo<sup>5,6</sup>, C Belda-Iniesta<sup>7</sup>, J García-Foncillas<sup>3</sup> and R Perona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas C.S.I.C./I.U.A.M, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), IdiPAZ, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Research Unit, Oncology Research Laboratory, FIB-La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Laboratory of Pharmacogenomics, Division of Oncology, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Navarra, Spain; <sup>4</sup>Department Molecular and Cellular Biology of Cancer, Instituto de Investigaciones Biomédicas C.S.I.C./I.U.A.M, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Department of Pathology, Capió-Fundación Jimenez Díaz, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Department of Medical Oncology, Hospital del Mar-IMAS, and Cancer Research Program, IMIM-Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain and <sup>7</sup>Department of Medical Oncology, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain

**DUSP1/MKP1 is a dual-specific phosphatase that regulates MAPKs activity, with an increasingly recognized role in tumor biology. To understand more about the involvement of DUSP1 in lung cancer, we performed gene expression analyses of parental and DUSP1-interfered H460 non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. Down-regulation of DUSP1 induced changes in the expression levels of genes involved in specific biological pathways, including angiogenesis, MAP kinase phosphatase activity, cell-cell signaling, growth factor and tyrosine-kinase receptor activity. Changes in the expression of some of these genes were due to modulation of c-Jun-N-terminal kinase and/or p38 activity by DUSP1. Complementary functional assays were performed to focus on the implication of DUSP1 in angiogenesis and metastasis. In H460 cells, interference of DUSP1 resulted in a diminished capacity to invade through Matrigel, to grow tumors in nude mice and also to induce metastasis through tail-vein injection. Furthermore, the angiogenic potential of H460 cells was also impaired, correlating with a decrease in VEGFC production and indicating that DUSP1 could be required to induce angiogenesis. Finally, we studied whether a similar relationship occurred in patients. In human NSCLC specimens, DUSP1 was mainly expressed in those tumor cells close to CD31 vascular structures and a statistically significant correlation was found between VEGFC and DUSP1 expression. Overall, these results provide evidence for a role of DUSP1 in angiogenesis, invasion and metastasis in NSCLC.**

*Oncogene* (2011) 30, 668–678; doi:10.1038/onc.2010.449; published online 4 October 2010

**Keywords:** non-small-cell lung cancer; DUSP1/MKP1; VEGFC; angiogenesis; metastasis; DUSP6/MKP3

**Introduction**

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) constitute a family of proteins transducing extracellular signals to effectors that control different cellular processes such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis (Davis, 2000; Chang and Karin, 2001; Pearson *et al.*, 2001; Johnson and Lapadat, 2002; Wada and Penninger, 2004). The mechanisms of MAPK activation include phosphorylation on tyrosine and threonine residues of a conserved motif T-X-Y within the activation loop of the kinase. This process is mediated by a dual-specific MAPK kinase (MKK or MEK) that is regulated by a MAPK kinase-kinase. Three families of MAPK have been characterized in mammalian cells, which are differentially regulated in response to specific stimuli and present different substrate specificity. The three families are: ERK1 and ERK2, the c-Jun-N-terminal kinases (JNKs) 1, 2 and 3 and the p38 family of kinases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ). The intensity and long-lasting effect of MAPK signaling is regulated by a family of dual-specific MAP kinase phosphatases. This family of proteins constitutes a separate group within the cystein-dependent dual specificity protein phosphatases. On the basis of sequence similarity, gene structure, substrate specificity and subcellular location; this family can be subdivided into three different groups. The first group contains DUSP1/MKP1, DUSP2/Pac1, DUSP4/MKP2 and DUSP5/hVH3. The second group consists of DUSP6/MKP3, DUSP7/MKPX and DUSP9/MKP4. The final group comprises DUSP8/hVH5, DUSP10/MKP5 and DUSP16/MKP7 (Keyse, 2008).

The biochemical properties and the catalytical activities of most of these enzymes are well known, but their physiological function in normal cells and their role in pathologies such as cancer still remain unclear. DUSP1

Correspondence: Dr R Perona, Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC/UAM, C/Arturo Duperier, 4, Madrid 28029, Spain  
E-mail: RPerona@iib.uam.es

<sup>8</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 15 February 2010; revised 19 August 2010; accepted 25 August 2010; published online 4 October 2010

is a nuclear mitogen and stress-inducible MAP kinase phosphatase highly expressed in different types of human tumors, including non-small-cell lung cancer (NSCLC), breast, ovarian, bladder, osteosarcoma and in prostate cancer in early stages of disease (Loda *et al.*, 1996; Denkert *et al.*, 2002; Chattopadhyay *et al.*, 2006). We have previously demonstrated that DUSP1 has an essential function in NSCLC biology (Chattopadhyay *et al.*, 2006), both in tumor growth and in response to cisplatin treatment. NSCLC cells expressing a small-interfering RNA (siRNA) specific for DUSP1 were more sensitive to cisplatin and grew more slowly when injected into nude mice. Chemical compounds that inhibit DUSP1 expression also induce higher sensitivity to cisplatin (Chattopadhyay *et al.*, 2006). These results suggested that DUSP1 is an important target for tumor regression and understanding its function might lead to improvements in cell-death promoting chemotherapy.

One of the most important problems in the clinical outcome of NSCLC, which accounts for 80% of lung cancer, is the high percentage of patients that recur. Although new therapies have appeared in the treatment of locally advanced disease, the outcome of these treatments in the patients is very poor. The capacity of tumor cells to induce angiogenesis and lymphangiogenesis may increase the probability of haematogenous or lymphatic metastasis (He *et al.*, 2002). In lung cancer models, high levels of VEGFC directly promotes both tumor lymphangiogenesis and tumor dissemination to the regional lymph nodes (He *et al.*, 2005) that can be blocked by inhibiting VEGFR3 signaling (He *et al.*, 2002). In addition, in NSCLC patients, increased expression of VEGFC, VEGFD and VEGFR3 are associated with a lower survival rate (Renyi-Vamos *et al.*, 2005). Furthermore, NSCLC metastasis correlates with angiogenesis and lymphangiogenesis. In the absence of vascular angiogenesis, NSCLC cells invade host lymphatics during tumor development (Renyi-Vamos *et al.*, 2005).

To gain insight into the cellular pathways involving DUSP1 actions in tumor progression we have used a double strategy that combines microarray and siRNA technology. This strategy provided a differential expression profile of genes functionally related to DUSP1. Here, we report that downregulation of DUSP1 expression in the NSCLC cell line H460 induces changes in the expression levels of other DUSPs and in other genes involved in tumor progression and angiogenesis maybe as a result of modulation of JNK/p38 activity. Cells expressing DUSP1-siRNA presented a reduction in their migratory, invasive and angiogenic potential, which translated into a reduced capacity of forming tumors in nude mice and metastatic dissemination. Moreover, in patients with NSCLC tumors expressing high levels of DUSP1, increase in VEGFC levels was also detected. These results suggest that blockage of DUSP1 expression in NSCLC would be a good strategy to inhibit both tumor vascularization and metastasis, and therefore would be a suitable strategy to block tumor progression.

## Results

### *Identification of genes differentially expressed in parental control versus DUSP1-deficient H460 lung cancer cells*

We have previously reported that expressing DUSP1-siRNA in H460 cells (H460cri) (Chattopadhyay *et al.*, 2006) resulted in earlier phosphorylation of JNK and p38 in response to CDDP and differences in tumor growth. Thus, changes in gene expression controlled by both kinases could underlie this observation. Therefore, we analyzed the changes in expression of 47 000 genes in H460cri cells compared with the H460v cell line (H460pSuperRetro vector). We found 136 genes with altered expression by at least threefold comparing both cell lines. Posterior gene ontology (GO) analysis identified, 45 GO categories with significantly enriched ( $P < 0.01$ ) gene numbers in the selected 136 genes compared with a reference gene set. These GO categories included cancer-relevant biological pathways, such as angiogenesis, MAP kinase phosphatase activity, cell-cell signaling, growth factor activity and tyrosine-kinase receptor activity, among other pathways (Table 1).

**Table 1** Subset of genes selected from the array assay

<i>GO function and gene symbol</i>	<i>Accession no.</i>	<i>Probe ID</i>	<i>Fold change<sup>a</sup></i>
<i>MAP kinases phosphatases activity</i>			
DUSP1	NM_004417	201044_x_at	-3.31
DUSP6	NM_001946	208891_at	-3.04
<i>Angiogenesis</i>			
NRP1	NM_003873	212298_at	3.28
SH2D2A	NM_003975	207351_s_at	-11.11
VEGFC	NM_005429	209946_at	-3.06
<i>Cell signaling</i>			
BMP2	NM_001200	205289_at	-5.53
GJB2	NM_004004	223278_at	-3.77
WISP2	NM_003881	205792_at	3.15
<i>Growth factor activity</i>			
DKK1	NM_012242	204602_at	-3.36
EGFR	NM_005228	232541_at	-3.29
GDF15	NM_004864	221577_x_at	4.27
<i>Transmembrane receptor activity</i>			
ACVR1C	NM_145259	1552519_at	-3.41
MERTK	NM_006343	206028_s_at	-3.92
PTPRK	NM_002844	203038_at	3.27
THBD	NM_000361	203887_s_at	-6.14
<i>Cytokine activity</i>			
PIK3R1	NM_181504	212239_at	-4.26
<i>Plasminogen activator activity</i>			
PLAT	NM_000930	201860_s_at	-4.94
SERPINB2	NM_002575	204614_at	5.02
<i>Extracellular matrix structural constituent</i>			
COL3A1	NM_000090	215076_s_at	7.23
LUM	NM_002345	201744_s_at	-34.00

Abbreviation: GO, gene ontology.

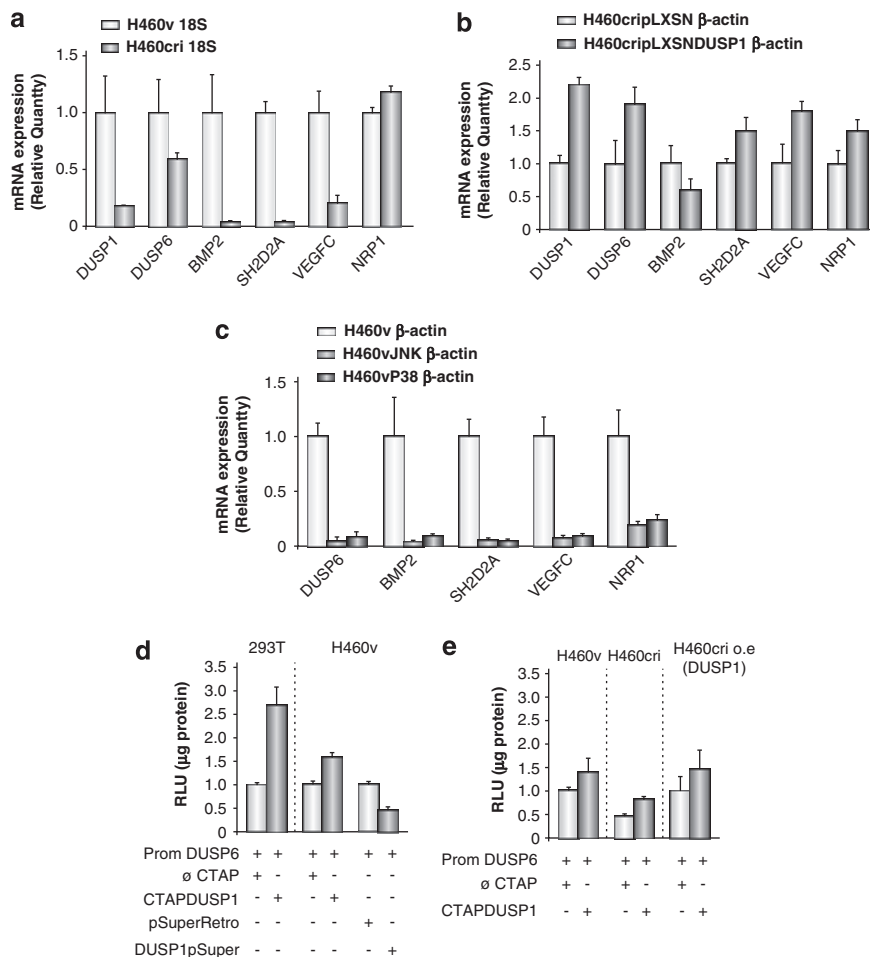
<sup>a</sup>Fold change is shown in terms of H460cri versus H460v

### Validation of genes differentially expressed in parental control versus *DUSP1*-deficient H460 cells

A group of six genes were selected for further validation using real-time PCR (Figure 1a), because of their implication in biological functions related to tumor progression, metastasis and angiogenesis (Table 1) very relevant in lung cancer biology. First, *DUSP1* and *DUSP6* genes were downregulated by more than threefold in H460cri cells, confirming the decrease in *DUSP1* expression (Table 1). Our results showed that expression of *NRP1* was upregulated in H460cri cells, whereas *VEGFC* and *SH2D2A* were downregulated. Finally, *BMP2*, a protein involved in growth factor activity and cell-cell signaling, was also validated,

showing a downregulation in H460cri compared with H460v in agreement with the results obtained in the microarray analysis. We have used 18S rRNA as an internal control but similar results were obtained with  $\beta$ -actin (Figure 1a; Supplementary Figure 1).

To confirm that changes in gene expression in H460cri cells were indeed due to a decrease in *DUSP1* expression, we reexpressed *DUSP1* in H460cri cells (H460cripLXSNDUSP1) by using the retroviral vector pLXSNDUSP1 and estimated the expression levels of the above selected genes (Figure 1b). The results showed a significant recovery of *DUSP6*, *SH2D2A* and *VEGFC* levels, suggesting that their expression is modified in response to *DUSP1*. However, *NRP1* and *BMP2*



**Figure 1** Expression profile of genes differentially regulated by high levels of *DUSP1*. (a, b) qRT-PCR validation of indicated genes. Data were normalized to 18S rRNA or  $\beta$ -actin levels and are shown as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (a) Data corresponding to H460v and H460cri cells at basal conditions. Relative mRNA levels were normalized to H460v cell line expression. (b) Graphic corresponds to H460cri cells stably transfected with pLXSN (H460cripLXSN) or pLXSN-DUSP1 (H460cripLXSNDUSP1). Relative mRNA levels were normalized to H460cripLXSN cell line mRNA expression. (c) H460v cell were transfected either with 1  $\mu$ g of empty pCELS or pCDNAIII empty vectors (H460v), pCELSp38 $\alpha$  or with pCDNAIII-JNK1 and after 24 h qRT-PCR was performed for the indicated genes. Relative mRNA levels were normalized to H460v cell line transfected with the corresponding empty vector. Data were normalized to  $\beta$ -actin levels and are shown as mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. (d) 293T and H460v cell lines were cotransfected with the *DUSP6* promoter-luciferase reporter gene plasmid and with an empty expression plasmid ( $\emptyset$  CTAP) or a *DUSP1* expression plasmid (CTAPDUSP1), in addition H460 cell line was transfected with an empty siRNA vector (pSuperRetro) or siRNA vector interfering *DUSP1* (DUSP1pSuper). (e) H460v, H460cri and H460cri overexpressing *DUSP1* stable cell lines (b) were cotransfected with the *DUSP6* promoter-luciferase reporter gene plasmid plus an empty expression plasmid ( $\emptyset$  CTAP) or a *DUSP1* expression plasmid (CTAPDUSP1). All data are representative of three independent experiments performed by triplicate and normalized to protein concentrations. RLU, relative luminescence units.

expression were not significantly reduced after DUSP1 overexpression, and consequently we interpreted that it might be implicated in cancer progression, although not directly regulated by DUSP1. As DUSP1 targets JNK and p38, we overexpressed both kinases in H460v cells to check if changes in expression of the above indicated genes may be reproduced by expression of these kinases. We transiently expressed, JNK1 and p38 $\alpha$  in H460v cells and levels of DUSP6, BMP2, SH2D2A2, VEGFC and NRP1 expression were measured by q-PCR. The results showed (Figure 1c) that expression levels of the genes were inhibited, and with small differences the results were equivalent for both kinases. These changes were similar to those observed in H460cri cells, indicating that one or both kinases could be responsible for the observed changes.

As the sequence of DUSP6 promoter has recently been reported (Ekerot *et al.*, 2008; Morrison *et al.*, 2008), we investigated if DUSP1 was able to modulate DUSP6 expression by stimulating the promoter activity. Co-transfection of a DUSP6 promoter reporter vector (Prom DUSP6) and CTAPDUSP1, a strong and transient DUSP1 expression vector in 293T and H460 cells, induced the activation of DUSP6 by threefold and 1.5-fold, respectively (Figure 1d). Furthermore, we co-transfected a DUSP1siRNA (Chattopadhyay *et al.*, 2006) (DUSP1pSuper) construct able to target the CTAPDUSP1 expressed gene in H460v, and observed that it induced a decrease in the DUSP6 promoter activity at same levels as in H460cri cells, indicating that DUSP1 was indeed involved in the DUSP6 expression regulation (Figure 1d; Supplementary Figure 2). Further, we transiently overexpressed DUSP1 in H460v and H460cri cells with the CTAPDUSP1 expression vector and found a higher basal activation of DUSP6 promoter in H460v-transfected cells when compared with the basal activation observed in H460cri-transfected cells (Figure 1e). In addition, H460cri cells stably reexpressing DUSP1 (Figure 1b, H460cripLXSN-DUSP1) (Figure 1e, H460cri o.e. DUSP1) showed a higher activation of DUSP6 promoter when compared with H460cri cells (Figure 1e) indicating that although the DUSP1 coding sequence of this expression vector is sensitive to siRNA, it can still overcome the effects of DUSP1siRNA when overexpressed. Therefore, in all situations, transfection of the DUSP1 expression vector was able to increase activation of DUSP6 promoter.

#### *Inhibition of DUSP1 expression limits cell motility and invasion of NSCLC cells*

As our GO analysis selected genes involved in extracellular matrix formation and cell invasion, we proceeded to evaluate cell-migratory capacity of H460v and H460cri cells by the wound-healing assay. In 24 h, parental H460v cells healed the wounded area (9% distance left), whereas H460cri cells were unable to do so in the same time period (46% distance left) and these results were statistically significant ( $P < 0.001$ ) (Figure 2a). The growth capacity of both cells lines, measured by a standard growth assay in complete

medium, was similar (Figure 2b); hence, the differences were due to motility and not to growth. As we observed above that expression of JNK or p38 $\alpha$  could induce changes in gene expression in H460v cells similar to those in H460cri cells (Figure 1c), we investigated if these were also related to changes in cell motility. H460v cells were transfected with JNK1 or p38 $\alpha$ , and the results showed (Figure 2c) that H460v cells transfected with empty vector healed the wounded area with 66% distance left, whereas cells transfected with either JNK or p38 $\alpha$ , were slower in the same period of time (77 and 75% distance left, respectively), and these results were statistically significant.

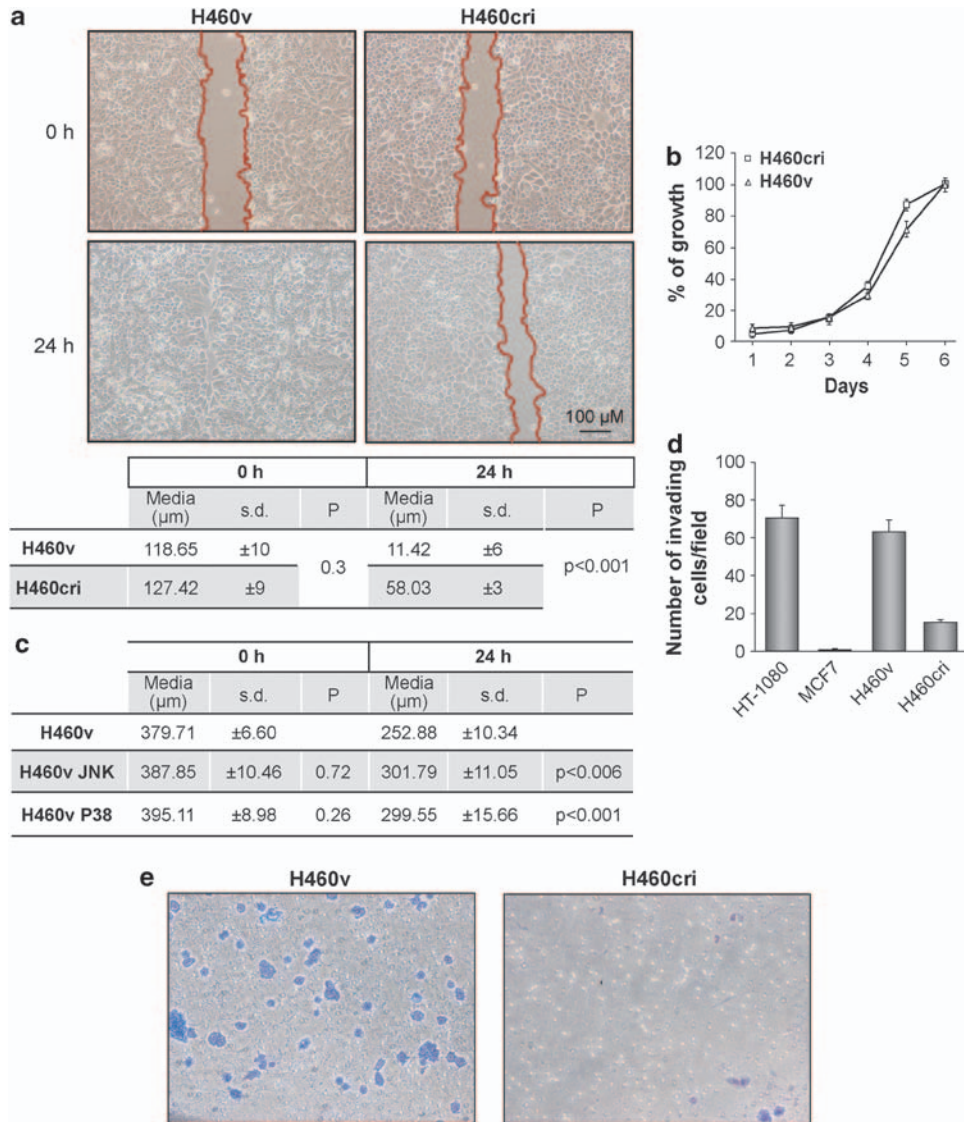
To investigate possible differences in invasiveness, an *in vitro* Matrigel invasion assay was performed using H460v and H460cri cells. H460v displayed larger invasive capacity than H460cri cells ( $67 \pm 4$  versus  $15 \pm 1$  number of invading cells) (Figures 2d and e). These results suggest that DUSP1 is involved in maintaining migratory and invasive capacity of H460 cells.

#### *DUSP1 modulates angiogenesis in H460 cells*

During tumor progression, tumor cells acquire the ability to activate the expansion of surrounding blood vessels by not fully a characterized mechanisms (Carmeliet, 2005). As H460cri cells showed an important decrease in VEGFC and SH2D2A mRNA expression, we compared the angiogenic potential of conditioned media (CM) obtained from H460v and H460cri cells on migration of human microvascular endothelial cells. CM prepared from H460v cells was fourfold more potent than H460cri CM in the induction of human microvascular endothelial cells migration (Figure 3a). These results indicated that DUSP1 interference generated signals that significantly impaired the secretion of proangiogenic factors, leading to a reduced migration of human microvascular endothelial cells. We then evaluated the angiogenic potential of H460v and H460cri cells CM using an *in vivo* angiogenesis assay. CM from either cell line was included in Matrigel plugs and implanted subcutaneously into the flanks of nude mice. Vascularization of the plugs was evaluated by immunohistochemistry using a specific antibody for endothelial cells: anti-Von Willebrand factor (Figure 3b, lower panel). Fewer vessels were detected in the plugs containing H460cri-CM ( $1.5 \times 10^5 \pm 0.3 \times 10^5$ ) (Figure 3b, upper panel), when compared with plugs including CM from either parental H460 ( $3.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ ) or H460v cells ( $3.8 \times 10^5 \pm 1.25 \times 10^5$ ). These results demonstrate that DUSP1 silencing significantly impairs the capacity of H460 cells to promote new vessel formation, and therefore interference of DUSP1 expression acts as angiogenic inhibitor.

#### *DUSP1 controls tumorigenicity and metastasis in H460 cells*

As expression of some genes involved in growth factor activity and cell signaling (Table 1) was lower in H460cri cells, we studied the efficiency of these cells to induce

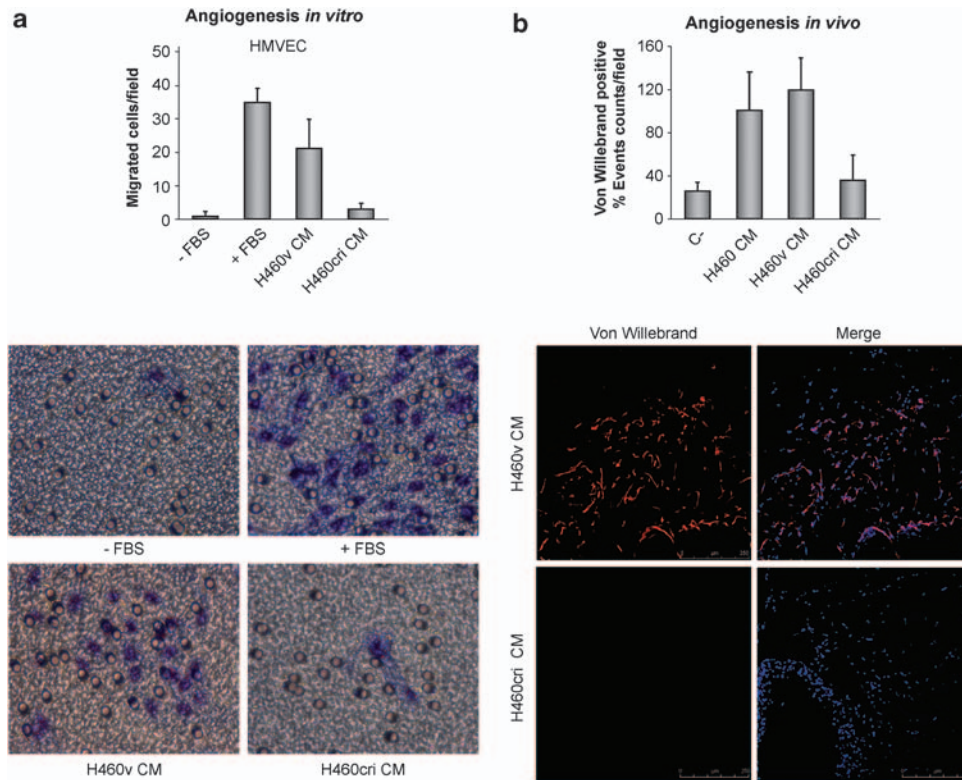


**Figure 2** Expression of DUSP1 promotes cell migration and invasion. **(a)** The effect of expression of DUSP1 on cell migration was examined in H460v and H460cri cells by wound-healing assays. Photomicrographs were taken at 0 and 24 h. The table represents the distance between both edges of the wound in each cell line (10 random measures/each cell line) for three independent experiments,  $P < 0.001$  was considered a significant change in cell migration (Student's *t*-test). **(b)** Growth curves of H460v and H460cri. Cell growth was estimated relative to the density recorded over the same experimental group at same period of time (24 h) after 7 days. Data represent the means of two experiments performed in quadruplicate and error bars denote s.d. **(c)** The effect of expression of JNK1 and p38 $\alpha$  on cell migration was examined in H460v cells by wound-healing assays. H460v cells were transfected like in Figure 1 and 24 h later assayed for wound-healing assays. The table represents the distance between both edges of the wound in each transfected cell line (10 random measures/each cell line) for three independent experiments,  $P < 0.001$  was considered a significant change in cell migration (Student's *t*-test). **(d)** HT-1080, MCF7, H460v and H460cri cells were used to test the cell invasiveness using Biocoat Matrigel invasion chambers. HT-1080 and MCF7 were used as positive and negative control, respectively. Data represents number of cells invading the lower chamber after 24 h for each cell line. A total of 10 random fields for each membrane were pictured ( $\times 20$  magnification) and quantified for three independent experiments. **(e)** Representative micrographs of H460v and H460cri invading cells, taken at the bottom surface of the filter.

tumors in nude mice. The tumorigenic capacity and tumors volume were reduced in 30 and 50%, respectively using H460cri compared with H460v cells (Figure 4a).

As we described above that H460cri cells have a reduced angiogenic potential compared with H460v cells, we aimed to investigate its impact on tumor growth. We studied the microvascular density in H460-, H460v- and H460cri-induced tumors (Figures 4b and d;

Supplementary Figure 3) and found that H460cri tumors presented a significant reduction in anti-CD31 positive vessels in agreement with previous results, suggesting that tumor growth may be impaired in H460cri cell-derived tumors due, at least in part, to impaired angiogenesis. We finally estimated if, in agreement with the data obtained in the array studies, tumors derived from H460, H460v and H460cri cells presented significant differences in VEGFC and found



**Figure 3** Inhibition of DUSP1 expression impairs angiogenesis *in vitro* and *in vivo* (a) Effects of modulation of DUSP1 expression on human microvascular endothelial cells migration. Conditioned medium from H460v or H460cri cells was used in a transwell migration assay of human microvascular endothelial cells. In the upper panel, bars show average number of migrated cells per field and s.d. values representative of three independent experiments. (b) Effect of modulation of DUSP1 expression on angiogenesis *in vivo* in Matrigel plug assay. CM of H460, H460v or H460cri cells were checked in the Matrigel plug assay. After immunostaining of the sections with anti-Von Willebrand antibody, the number of blood vessels was quantified as positive events per field (upper panel section;  $n = 10$ ;  $t$ -test,  $P < 0.005$ ) in three independent experiments. Negative control (C-) corresponded to Matrigel containing PBS. Lower panel corresponds to representative micrographs of H460v CM and H460cri CM containing plugs ( $\times 200$  magnification) immunostained with anti-Von Willebrand antibody and DAPI.

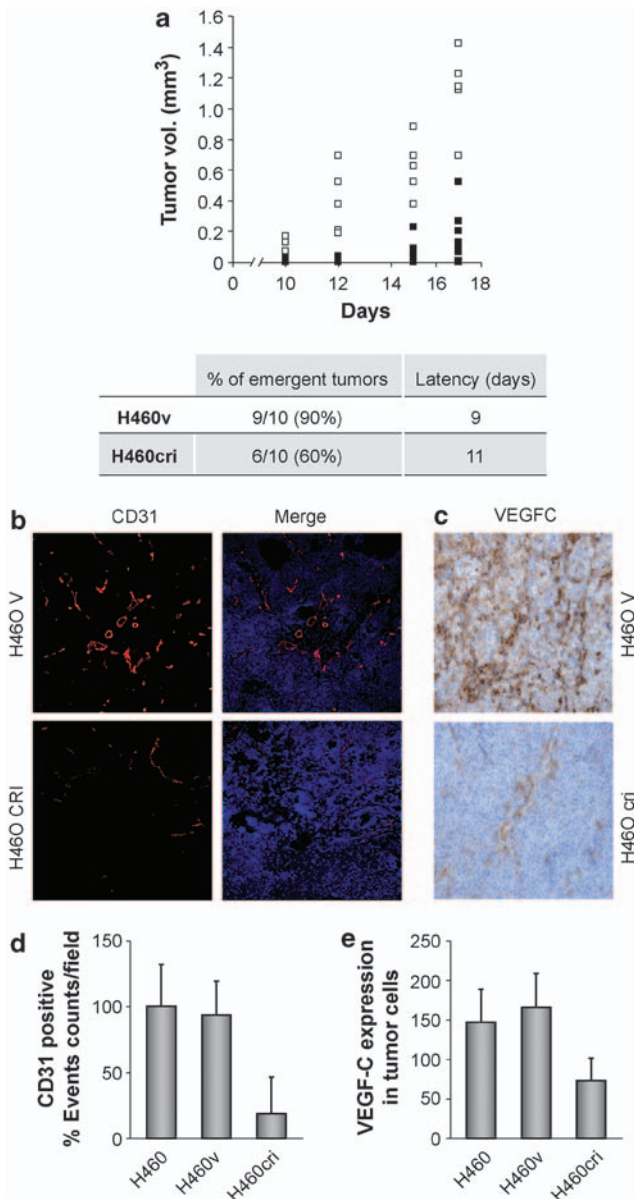
that expression levels of VEGFC in H460cri tumors were significantly lower than that observed in H460v tumors (Figures 4c and e) and this may contribute to observed variations in the vascularization degree of tumors generated from these cell lines.

As both tumor cell migration and angiogenic potential were reduced in H460cri cells, we investigated the capacity of these cells to metastasize using the tail-vein injection model. The anatomical examination showed that animals injected with H460v cells presented macroscopic tumors in lung, mediastinum, kidney and heart, and less frequently in brain, pancreas, diaphragm and suprarenal gland (Figure 5a, left panel). In contrast, animals injected with H460cri cells showed tumors only in lung, and just in one case, in heart and suprarenal gland (Figure 5a, right panel). In addition, the median survival time after injection was shorter for those animals injected with H460v than those injected with H460cri cells ( $P = 0.006$ ; hazard ratio 4.59) (Figure 4b), correlating with the cells invasion capacity. The morphology of the primary tumors and the metastases generated both by H460v and H460cri cells were similar in all animals, showing an infiltration of visceral organs by whitish irregular nodules (Supplementary Figure 4a)

constituted by a proliferation of atypical epithelial cells, arranged in solid sheets with scattered small glandular lumens and extensive necrosis (Supplementary Figure 4b). The immunophenotype of tumor cells showed both epithelial (expression of AE1/AE3 cytokeratins) (Supplementary Figure 4c) and mesenchymal differentiation (expression of vimentin) (Supplementary Figure 4d) and the mitotic index was over 90% using the Ki67 marker (Supplementary Figure 4e). The CD31 immunohistochemical analysis in the metastasized lungs of both cell lines revealed an important decrease in angiogenesis in metastasized lung by H460cri cells (Figure 5b), further supporting the fact that lack of DUSP1 severely impairs angiogenesis and results in diminished metastatic potential.

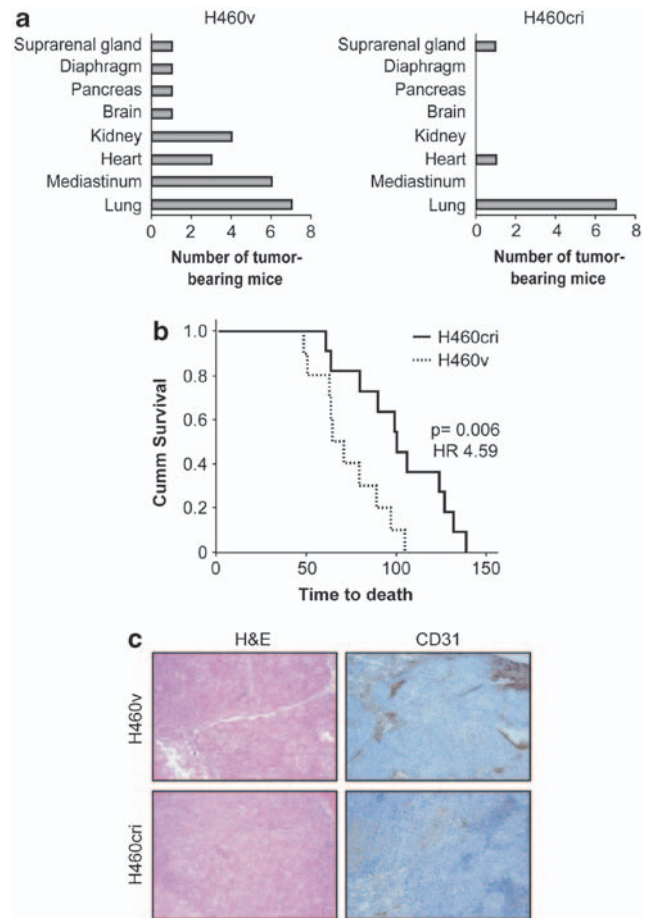
*Expression of VEGFC is increased in human NSCLC tumors with high level of DUSP1 expression*

Our previous results strongly suggested that expression of VEGFC in NSCLC H460 cells was dependent on DUSP1 activity. Further, expression of DUSP1 also correlated with angiogenesis and metastasis using *in vivo* animal models. To investigate the relevance in NSCLC



**Figure 4** Expression of DUSP1 promotes tumor growth and angiogenesis *in vivo*. H460v or H460cri cells were injected subcutaneously into Nu/Nu mice (a) Tumor volume was measured during the assay (each point represented a single tumor); table indicates the percentage of emergent tumors in each group and the latency. (b) Immunodetection of CD31 and DAPI staining in sections of H460v and H460cri xenograft tumor models. A representative section ( $\times 200$  magnification) is shown. Fluorescent red, CD31-positive endothelial cells; fluorescent blue DAPI-stained nuclei. (c) Immunohistochemical analysis of VEGFC expression in H460v and H460cri xenografts. (d, e) Graphs represent the quantification of CD31-positive events and VEGFC expression in tumors of each cell line.

patients, we first investigated the distribution of DUSP1 in tumors followed by the colocalization of the phosphatase and endothelial cells. The majority of tumor cells expressing high levels of DUSP1 were detected in the proximity of CD31-positive vascular structures (Figure 6a). We then assessed the expression



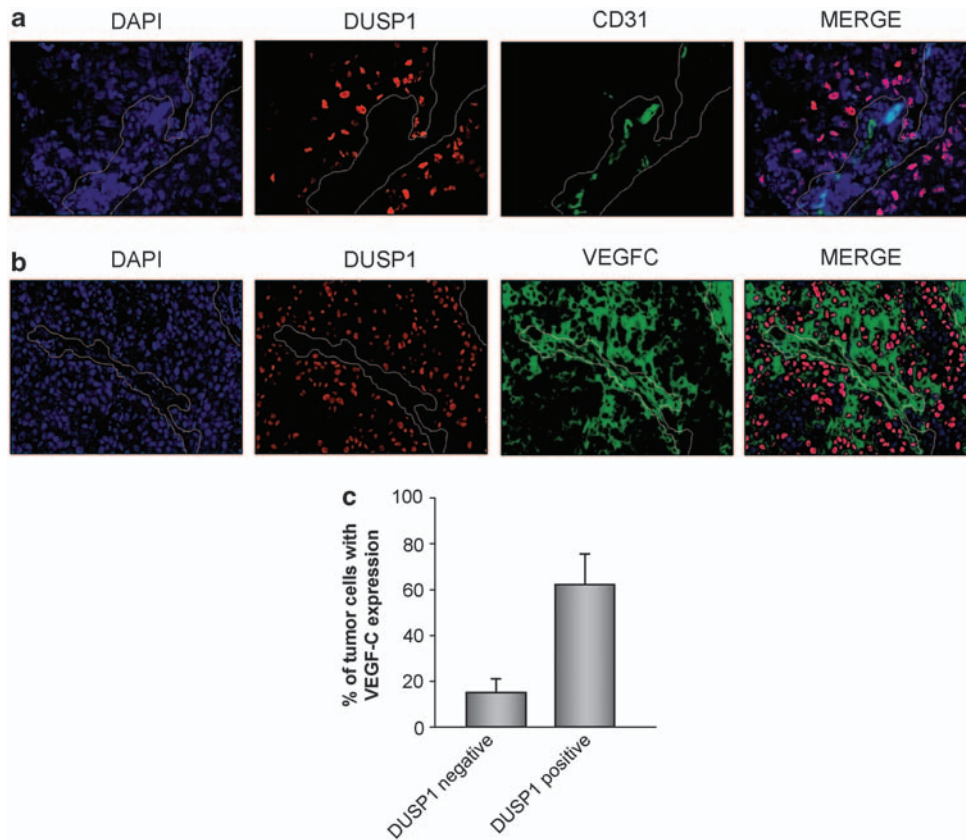
**Figure 5** Expression of DUSP1 regulates metastasis in H460 cells. (a) Graphs represent the different organs affected in tumour-bearing mice after the injection of H460v (left panel) or H460cri (right panel) cells into the tail vein. (b) Estimation of survival time between H460v and H460cri cells by the method of Kaplan and Meier. (c) Hematoxylin and eosin stained sections (left panel) and immunohistochemical analysis of CD31 expression (right panel) from those lungs with metastasis.

of DUSP1 and VEGFC in a series of NSCLC tumor samples. Colocalization by immunofluorescence and analysis of expression of both DUSP1 and VEGFC in NSCLC specimens indicated a significant correlation between both proteins (Figure 6b). VEGFC was detected in only 17% of the neoplastic cells with undetected or low expression of DUSP1, whereas VEGFC was present up to 62% of cells expressing DUSP1 ( $P=0.002$ ) (Figure 6c). Collectively, these results support a direct correlation between DUSP1 expression and angiogenesis in human NSCLC.

## Discussion

The physiological roles of many of the DUSPs are largely unknown *in vivo*. Many have shown differential expression in multiple types of human cancer. Over-expression of the ubiquitous DUSP1 has been found in





**Figure 6** Colocalization by immunofluorescence of DUSP1 and VEGFC expression in NSCLC specimens. (a) Immunofluorescence of serial tissue sections stained with DAPI/DUSP1 and CD31 are shown. Fluorescent blue, DAPI nuclear; fluorescent red, DUSP1-positive cells; fluorescent green, CD31-positive endothelial cells; merge (b) Immunofluorescence of serial tissue sections stained with DAPI/DUSP1 and VEGFC are shown. Fluorescent blue, DAPI nuclear cells; fluorescent red, DUSP1-positive cells; fluorescent green, VEGFC-positive cells; merge. (c) Percentage of tumor cells with VEGFC expression regarding positive or negative DUSP1 expression in human tumors. Columns, mean; bars, s.d. ( $P < 0.002$ ).

several malignancies, including breast, prostate and NSCLC (Loda *et al.*, 1996; Denkert *et al.*, 2002; Chattopadhyay *et al.*, 2006). Lung cancer is a major cause of cancer mortality and accounts for about 20% of all cancer deaths worldwide. The complete map of mutations in lung cancer has been recently published (Ding *et al.*, 2008) and some of them may trigger DUSP1 expression, as we have found an increase in DUSP1 expression in nearly 80% of NSCLC patient samples (Chattopadhyay *et al.*, 2006).

Here, we described differences in gene expression profile in NSCLC cells, which have been depleted of DUSP1, including groups of genes related to cell growth, migration or angiogenesis. These genes were downregulated in the vast majority of cases, in cells lacking DUSP1. Although in this manuscript we have focused in the study of genes involved in angiogenesis and migration, the regulation of other genes nicely correlates with the phenotype of the NSCLC cell line H460cri when compared with H460v cells. Among these genes are: phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1- $\alpha$  (*PIK3RI*) (−4.26 fold), which is a regulator of AKT/PKB signaling pathway, is involved in cell survival and has been implicated in poor responses to chemotherapy in lung cancer (Downward, 2008; Marinov *et al.*, 2009;

Sos *et al.*, 2009); dickkopf homolog-1 (*DKK1*) (−3.36 fold), a potent antagonist of Wnt signaling, is expressed at high levels in lung and esophageal carcinomas (Yamabuki *et al.*, 2007) and hepatocarcinomas (Yu *et al.*, 2009); tissue-type plasminogen activator (*PLAT*) (−4.949 fold) has been previously found significantly downregulated in nonangiogenic NSCLC tumors as compared with angiogenic tumors (Offersen *et al.*, 2007), and therefore its downregulation in H460cri cells agrees with its reduced angiogenic potential; epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (−3.29 fold) has been intensely studied, not only to understand the mechanisms underlying its oncogenic potential, but also to exploit as a therapeutic target (Hynes and MacDonald, 2009) as inhibition of its activity decreases lung cancer cell growth in tumors, which show mutated versions of this receptor. Finally, *BMP2* has been found overexpressed in human NSCLC, with little or no expression in normal lung tissue or benign lung tumors, (Langenfeld *et al.*, 2003) suggesting that *BMP2* may enhance tumor progression. We found that *BMP2* expression is downregulated after interfering DUSP1, supporting those results. In addition, inhibition of *BMP2* results in a significant reduction of tumor growth (Langenfeld *et al.*, 2003). Our group described similar results

regarding DUSP1 actions (Chattopadhyay *et al.*, 2006) and tumor growth, suggesting a possible interaction between DUSP1 and BMP2.

JNK and p38 are major targets for DUSP1 (Keyse, 2000, 2008; Sanchez-Perez *et al.*, 2000) and therefore inhibition of the activity of such kinases may mediate the observed changes in gene expression and cell behavior found in H460v cells as demonstrated when we expressed either JNK or p38 $\alpha$  in H460v cells. As yet, p38 has been involved in repressing expression of EGFR in a p38 $\alpha$  knockout model (Ventura *et al.*, 2007), in agreement with our results that demonstrated that inhibition of DUSP1 expression leads to a reduced EGFR mRNA levels.

Among the genes selected in our study, expression of DUSP6 increases when reexpressing DUSP1 in H460cri cells. Although it has been reported that ERK activity modulates DUSP6 expression in response to fibroblast growth factor (Ekerot *et al.*, 2008), in H460 cells expression of DUSP1 increases both DUSP6 promoter activation and expression, thus maybe other kinases, such as p38 $\alpha$  and/or JNK, should control DUSP6 expression by repressing its promoter. DUSP6 can be upregulated in specific cancers exhibiting aberrant RTK and ras/raf signaling such as NSCLC (Sato *et al.*, 2006). In this context, DUSP6 promoter comprises two regions relevant for controlling its expression, which contains 4-Egr1 binding sites (Morrison *et al.*, 2008). EGR-1 is a transcriptional target of the EGFR signaling pathway (Nutt *et al.*, 2007) and EGFR expression is down-regulated by threefold in H460cri cells, which again indicated a high correlation between expression levels of DUSP6, activation of DUSP6 promoter and levels of DUSP1.

Our results indicate that upregulation of DUSP1 expression and consequently changes in JNK and p38 activities are involved in tumorigenesis and the control of invasion and metastasis in NSCLC cells. There is a relevant difference in tumor size between the tumors induced by H460v cells and those induced by H460cri cells, which might be related to the decreased levels of EGFR, PIK3R1 and MERTK (Ling and Kung, 1995). Activation of MERTK in NIH3T3 fibroblasts led to cellular transformation (Ling and Kung, 1995) and activation of the RAS/PI3K pathway (Linger *et al.*, 2008).

The inhibition of VEGFC and SH2D2A expression by the inhibition of DUSP1 expression points up a possible role of this phosphatase-controlling tumor angiogenesis. In fact, *in vivo* and *in vitro* assays confirmed that the angiogenic potential of H460cri cells was significantly reduced compared with H460v cells. Moreover, we were able to demonstrate that tumors induced by H460cri cells showed reduced tumor size and lower levels of VEGFC, correlating with a decrease in tumor vascularization. Altogether the data indicate that DUSP1 profoundly affects the tumor capacity to properly vascularize.

In agreement with our results, DUSP1 has been reported as one of the 11 genes that cluster as a bone metastasis gene expression signature in breast cancer

cells (Kang *et al.*, 2003). Using shRNA-mediated gene silencing in this cell system to knock down DUSP1 expression, a significant decrease in bone colonization was observed. The importance of DUSP1 in bone metastasis was clinically analyzed and found higher levels of DUSP1 in primary tumors of patients with bone metastasis (Lu *et al.*, 2010). Also in breast cancer, DUSP1 has been reported to be overexpressed in 50% of infiltrating breast carcinomas and to be an adverse prognostic factor for relapse by univariate and multivariate analyses in patients (Rojo *et al.*, 2009). We have observed a marked decrease in the metastatic potential of H460cri cells, correlating with a decrease in angiogenesis in the lung primary tumors, indicating that the diminished angiogenic potential of H460cri cells impairs tumor metastasis in this cell model. In summary, our results indicate that the overexpression of DUSP1 in NSCLC cells contributes to tumor growth, tumor invasion and angiogenesis. This control in the invasive phenotype seems to be mediated by expression changes of different genes probably due to changes in the activities of JNK and/or p38. Finally, in NSCLC specimens, we have found colocalization of DUSP1 expression and endothelial cells and also a strong correlation of DUSP1 expression and increased VEGFC expression, reinforcing the relevance of our findings for human cancer. Therefore, expression of DUSP1 in NSCLC should trigger angiogenesis as a result of increased expression of VEGFC. As a final point, our results suggest that inhibition of DUSP1 activity should be a good strategy to inhibit both tumor invasion and angiogenesis and also should represent a good candidate marker for combined treatment with chemotherapeutic drugs and angiogenic inhibitors in NSCLC.

## Materials and methods

### *Cell lines, vector constructions and luciferase assay*

The human NSCLC H460, human epithelial 293T/17, human fibrosarcoma connective tissue HT-1080 and human breast cancer adenocarcinoma MCF7 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured as recommended. Primary human microvascular endothelial cells were cultured as described in Supplementary Material and Methods. The DUSP6 promoter luciferase, CTAPDUSP1, DUSP1pSuper vectors and control *Renilla* reporter were transfected into 293T, H460v and H460cri cells. The relative luciferase activity was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madrid, Spain). For more procedure details and vector constructions see Supplementary Material and Methods.

### *Microarray hybridization and gene selection*

Transcriptional profiling of H460v and H460cri was performed using Affymetrix HG-U133 plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the Gene Chip Expression Analysis Technical Manual. Raw data were normalized with robust multichip average (RMA) and fold change between H460v and H460cri cells calculated. Data have been deposited in the NCBI's Gene Expression Omnibus, GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO series accession GSE19592.

We selected a subset of genes for validation with at least threefold up- or downregulation in H460cri versus H460v cell lines, followed by the use of a Gene Ontology database as deeply described in Supplementary Material and Methods. As additional criteria, we chose those genes implicated in tumor progression, metastasis and angiogenesis within enriched GO categories that could be involved in biological pathways mediated by the DUSP1 and with a strong bibliographic support.

#### Validation of mRNA changes by qRT-PCR

For qRT-PCR validation, 1 µg of total RNA was retro-transcribed by High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and carried out by triplicate using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primers, probes, PCR settings and normalization of expression values are listed in Supplementary Material and Methods.

#### Growth kinetic, wound-healing and *in vitro* invasion assays

H460v and H460cri cells were grown in 24-well plates for the growth kinetic assay determination or in petri dish followed by a scratch to create the wound for the wound-healing assay. The relative distance traveled by the leading edge for 24 h was assessed using DS-L1 software (Nikon, New York, NY, USA). For the *in vitro* invasion assay, HT1080, MCF7, H460v and H460cri cell lines were seeded in serum-free medium in the upper chamber of the Biocoat Matrigel invasion chamber inserts (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were allowed to invade through the Matrigel for 24 h using medium containing fetal bovine serum in the lower chamber as a chemoattractant. Following migration, cells were fixed and stained with Diff-Quick method (Medion Diagnostics, Miami, FL, USA) as recommended. Procedures are acutely described in Supplementary Material and Methods.

#### Tumorogenicity in xenograft mouse model

H460v and H460cri cells were injected in both flanks from six nude mice. Tumor measurements were recorded as visible tumor appeared in 17 days after injection; and volume was calculated as  $l \times w^2 \times 0.52$ , where  $l$  is the length and  $w$  the width of the tumors. In a parallel experiment, mice were killed when tumor volume reached 50 mm<sup>3</sup>. Then, tumors were removed; one part was processed to measure microvascular density by CD31 immunostaining as described above in the measurement of microvessels and the remaining tumor was formalin fixed and paraffin embedded to double check the CD31 immunostaining and to perform VEGFC expression analyses (*H*-score), which are deeply described in Supplementary Material and Methods.

#### Metastasis and survival assays

Nude mice of 6 weeks were injected in the tail with H460v or H460cri cell suspension to compare their dissemination pattern and survival time. Animals were kept until death. Next, a complete necropsy examination of each animal was performed as already described (Espina *et al.*, 2008). Every visceral organ was formalin fixed and paraffin embedded *in toto*. Sections from each paraffin block were stained with hematoxylin and eosin to detect the presence of tumor metastatic foci in all the visceral organs. Representative sections were immunostained

as described in Supplementary Material and methods. Statistical significance in survival time between H460v and H460cri cells in a total of 21 nude mice was also estimated according to the method of Kaplan–Meier; survival distributions were determined using the log-rank test.  $P < 0.05$  was considered to have statistical significance.

#### Colocalization by immunofluorescence assay

Immunofluorescence analysis of DUSP1, VEGFC and CD31 expression was performed on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections from human NSCLC specimens, and is exhaustively described in Supplementary Material and Methods. Two sets of sections were incubated with anti-DUSP1 and anti-CD31 antibodies or with anti-DUSP1 and anti-VEGFC antibodies. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) to visualize cell nuclei. Fluorescence in tumor cells was scored as percentage of the expression of VEGFC and DUSP1.

#### Abbreviations

BMP2, bone morphogenetic protein 2; CDDP, Cisplatin; MERTK, c-mer proto-oncogene tyrosine kinase; PTPRK, protein tyrosine phosphatase receptor type K; VEGFC and D, vascular endothelial growth factor C and D; VEGFR3, vascular endothelial growth factor receptor3.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

Ibanez de Caceres was partially supported by the Fondo de Investigacion Sanitaria (ISCIII) through the 'Miguel Servet' program (CP 08/000689); VM-A is a recipient of FIS fellowship. IS-P is in receipt of career development awards from the Ramón y Cajal program funded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We acknowledge Leandro Sastre for helping with cTAP constructs and helpful discussions. We thank Silvia Menéndez (Hospital del Mar-IMAS) and Nuria Pérez-González (Fundación Jiménez Díaz) for the technical support. We also thank Javier Perez and Fernando Núñez (IIB) for the artwork and animal facility, respectively. This work was supported by PI05/2019, PI05/1305, PI06/1513, PI081485, PI09/1296, PS09/01285 and PS09/00472 (Spanish Health Ministry grant 'Fondo de Investigación Sanitaria'), SAF2007-62292 (Ministerio de Educación y Ciencia grant), SAL-0311-2006 (Comunidad Autónoma de Madrid) and RTICC 06/0020/19 grant. We especially thank Fundació Privada Cellex (Barcelona) and Fundació Mèdica Mutua Madrileña for a generous grant to the Medical Oncology Service, Hospital del Mar-IMAS and to Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), respectively.

#### References

Carmeliet P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**: 932–936.

Chang L, Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37–40.

- Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Beldaniesta C, Moratilla C, Cejas P *et al.* (2006). MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **25**: 3335–3345.
- Davis RJ. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239–252.
- Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A *et al.* (2002). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* **102**: 507–513.
- Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K *et al.* (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**: 1069–1075.
- Downward J. (2008). Targeting RAS and PI3K in lung cancer. *Nat Med* **14**: 1315–1316.
- Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM *et al.* (2008). Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem J* **412**: 287–298.
- Espina C, Cespedes MV, Garcia-Cabezas MA, Gomez del Pulgar MT, Boluda A, Oroz LG *et al.* (2008). A critical role for Rac1 in tumor progression of human colorectal adenocarcinoma cells. *Am J Pathol* **172**: 156–166.
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T *et al.* (2002). Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* **94**: 819–825.
- He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S *et al.* (2005). Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* **65**: 4739–4746.
- Hynes NE, MacDonald G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 177–184.
- Johnson GL, Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911–1912.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C *et al.* (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**: 537–549.
- Keyse SM. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 186–192.
- Keyse SM. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**: 253–261.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. (2003). The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* **24**: 1445–1454.
- Ling L, Kung HJ. (1995). Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **15**: 6582–6592.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. (2008). TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* **100**: 35–83.
- Loda M, Capodiceci P, Mishra R, Yao H, Corless C, Grigioni W *et al.* (1996). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *Am J Pathol* **149**: 1553–1564.
- Lu X, Yan CH, Yuan M, Wei Y, Hu G, Kang Y. (2010). *In vivo* dynamics and distinct functions of hypoxia in primary tumor growth and organotropic metastasis of breast cancer. *Cancer Res* **70**: 3905–3914.
- Marinov M, Ziogas A, Pardo OE, Tan LT, Dhillon T, Mauri FA *et al.* (2009). AKT/mTOR pathway activation and BCL-2 family proteins modulate the sensitivity of human small cell lung cancer cells to RAD001. *Clin Cancer Res* **15**: 1277–1287.
- Morrison DJ, Kim MK, Berkofsky-Fessler W, Licht JD. (2008). WT1 induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 represents a novel mechanism of growth suppression. *Mol Cancer Res* **6**: 1225–1231.
- Nutt JE, Foster PA, Mellon JK, Lunec J. (2007). hEGFR1 is induced by EGF, inhibited by gefitinib in bladder cell lines and related to EGF receptor levels in bladder tumours. *Br J Cancer* **96**: 762–768.
- Offersen BV, Pfeiffer P, Andreasen P, Overgaard J. (2007). Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer* **56**: 43–50.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K *et al.* (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153–183.
- Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I *et al.* (2005). Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 7344–7353.
- Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R, Dalmases A, Menendez S, Cortes-Sempere M *et al.* (2009). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* **15**: 3530–3539.
- Sanchez-Perez I, Martinez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* **19**: 5142–5152.
- Sato M, Vaughan MB, Girard L, Peyton M, Lee W, Shames DS *et al.* (2006). Multiple oncogenic changes (K-RAS (V12), p53 knock-down, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* **66**: 2116–2128.
- Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T *et al.* (2009). PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* **69**: 3256–3261.
- Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M *et al.* (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* **39**: 750–758.
- Wada T, Penninger JM. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**: 2838–2849.
- Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M *et al.* (2007). Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* **67**: 2517–2525.
- Yu B, Yang X, Xu Y, Yao G, Shu H, Lin B *et al.* (2009). Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* **50**: 948–957.
- Zhang SC, Hironaka S, Ohtsu A, Yoshida S, Hasebe T, Fukayama M *et al.* (2006). Computer-assisted analysis of biopsy specimen microvessels predicts the outcome of esophageal cancers treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* **12**: 1735–1742.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)



# The dual-specificity protein phosphatase MkpB, homologous to mammalian MKP phosphatases, is required for *D. discoideum* post-aggregative development and cisplatin response<sup>☆</sup>

Verónica Moncho-Amor<sup>a</sup>, María Galardi-Castilla<sup>a</sup>, Rosario Perona<sup>a,b</sup>, Leandro Sastre<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC/UAM, C/ Arturo Duperie, 4, 28029 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 March 2010

Received in revised form

7 January 2011

Accepted 9 January 2011

### Keywords:

MKP phosphatase

DUSP

Dictyostelium

Development

Cisplatin

Protein phosphatase

## ABSTRACT

Dual-specificity protein phosphatases participate in signal transduction pathways inactivating mitogen-activated protein kinases (MAP kinases). These signaling pathways are of critical importance in the regulation of numerous biological processes, including cell proliferation, differentiation and development. The social amoeba *Dictyostelium discoideum* harbors 14 genes coding for proteins containing regions very similar to the dual-specificity protein phosphatase domain. One of these genes, *mkpB*, additionally codes for a region similar to the Rhodanase domain, characteristic of animal MAP kinase-phosphatases, in its N-terminal region. Cells that over-express this gene show increased protein phosphatase activity. *mkpB* is expressed in *D. discoideum* amoeba at growth but it is greatly induced at 12 h of multicellular development. Although it is expressed in all the cells of developmental structures, *mkpB* mRNA is enriched in cells with a distribution typical of anterior-like cells. Cells that express a catalytically inactive mutant of MkpB grow and aggregate like wild-type cells but show a greatly impaired post-aggregative development. In addition, the expression of cell-type specific genes is very delayed, indicating that this protein plays an important role in cell differentiation and development. Cells expressing the MkpB catalytically inactive mutant show increased sensitivity to cisplatin, while cells over-expressing wild type MkpB, or MkpA, proteins or mutated in the MAP kinase *erkB* gene are more resistant to this chemotherapeutic drug, as also shown in human tumor cells.

© 2010 International Society of Differentiation. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are important intracellular signal transducer proteins involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis (reviewed in Johnson and Lapadat, 2002; Pearson et al., 2001). These proteins are activated by phosphorylation on both the threonine and tyrosine residues of the consensus T-X-Y domain in response to extracellular signals (reviewed in Qi and Elion, 2005). MAP kinases activation is a reversible process and the period of time that the proteins remain activated is an important determinant of the biological response (Marshall, 1995). Inactivation is produced by dephosphorylation of either the threonine or the tyrosine residues. Therefore, this reaction can be catalyzed by threonine- or tyrosine-protein phosphatases but an important group of enzymes that mediate this reaction are the dual-

specificity phosphatases (DUSP) that dephosphorylate both residues (reviewed in Dickinson and Keyse, 2006; Patterson et al., 2009).

Dual-specificity protein phosphatases constitute themselves a large family of proteins in mammals, characterized by the presence of a highly conserved C-terminal catalytic domain. Although all the enzymes of the family can inactivate MAP kinases, the largest group of mammalian phosphatases involved in MAPK signaling regulation belongs to the subgroup of the MAPK phosphatases (MKP) (Keyse, 2008). This group of 11 human proteins share an N-terminal domain characterized by the presence of two regions of similarity to the cdc25 protein phosphatase catalytic domain (Keyse and Ginsburg, 1993). This domain, that is important for MAPK recognition and binding, is also present in the Rhodanase family of sulphotransferases and has been named Rhodanase domain.

One of the organisms where the MAPK regulatory pathway has been shown to be important is the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, that constitutes one of the simplest models for the study of cell motility, differentiation and multicellular development (for a recent review see Annesley and Fisher, 2009)

<sup>☆</sup>Join the International Society for Differentiation ([www.isdifferentiation.org](http://www.isdifferentiation.org)).

\* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC/UAM, C/ Arturo Duperie, 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: 34 91 5854401.

E-mail address: lsastre@iib.uam.es (L. Sastre).

This organism lives in forestall soils as individual ameba, feeding on bacteria. However, when food is exhausted ameba aggregate together and initiate a multicellular developmental process leading to the formation of a fruiting body. This structure is composed of a basal disk, a stalk and, on top of it, a sorus where most of the ameba differentiate into spores. This is an adaptive response since spores are resistant to adverse conditions for several weeks but germinate to give rise to new ameba in a favorable environment.

Analysis of the nucleotide sequence of the *D. discoideum* genome (Eichinger et al., 2005) has shown that this organism harbor two MAPK-encoding genes, *erkA* and *erkB*. *erkA* codes for a protein (Erk1) more similar to the ubiquitous ERK subfamily. Cells where this gene has been interrupted form small aggregates most of which get stalled at this developmental stage (Sobko et al., 2002).

The *erkB* gene codes for a protein (Erk2) that is more similar to the ERK7 subfamily of MAP kinases. Mutagenesis studies have shown that this gene is required for cAMP synthesis in response to extracellular cAMP. In *D. discoideum* aggregation is produced by chemotaxis towards extracellular cAMP. This molecule is initially secreted at discrete aggregation centers and diffuses towards neighboring cells. Later on, each cell of the aggregation field that detects an increase in cAMP concentration responds by migrating towards increasing cAMP concentrations. In addition, each cell secretes cAMP so that the signals gets amplified and moves through the field of cells as cAMP waves (van Haastert and Devreotes, 2004). Cells moving towards the aggregation centers also adhere to each other, forming cell streams. Therefore, *erkB* mutant cells, that are defective in cAMP secretion, show greatly impaired cell aggregation (Segall et al., 1995). Actually, Erk2 has been proposed to be a component of an oscillatory circuit that regulates cAMP synthesis during aggregation (Maeda et al., 2004).

A protein phosphatase with a DUSP phosphatase domain and the capacity to dephosphorylate Erk2 has been described (Rodriguez et al., 2008). This enzyme, named MPL1, is induced at 5 h of development, at the initiation of the aggregation process. The *mpl1* gene was ablated by homologous recombination and the mutant cells showed persistent Erk2 phosphorylation, aberrant patterns of cAMP production, defective aggregation and streaming (Rodriguez et al., 2008). A second gene coding for a DUSP-domain containing protein, *mkpA*, has been interrupted by insertional mutagenesis and the mutant cells were defective in cAMP wave formation and aggregation (Sawai et al., 2007). These data, and those described above for Erk2, highlight the importance of MAPK signaling during the aggregation of *D. discoideum* cells.

However, the picture is not complete because the analysis of the *D. discoideum* genome indicates the existence of 14 genes coding for proteins that contain DUSP phosphatase domains, including MkpA and MPL1. It will be of interest to determine the possible function of all these genes and their possible interactions. This article approaches the study of one of these genes, named *mkpB*. The encoded protein is unique among *D. discoideum* DUSP-domain containing proteins because in its N-terminal region contains a Rhodanase domain similar to that of the mammalian MKP subfamily of dual-specificity phosphatases. The phosphatase domain of MkpB is also more similar to those of the mammalian MKP1 and MKP4 proteins than most of the other *D. discoideum* proteins, suggesting that this protein could play a relevant role in Erk1 or/and Erk2 activity regulation. Unexpectedly, *mkpB* expression is induced by 12 h of multicellular development, after aggregation is completed. In addition, over-expression of a catalytically inactive mutant protein did not affect cell aggregation but impaired post-aggregative development. These data suggest that MkpB plays an important role during *D. discoideum* development regulation, acting at later

stages than MkpA and MPL1. Additionally, analyses of cisplatin sensitivity of cells that express MkpB, the catalytically inactive mutant of MkpB, MkpA and ErkB mutant cells indicated that these signaling pathways are involved in the response to this anti-carcinogenic drug.

## 2. Methods

### 2.1. Cell culture, transformation and development

*D. discoideum* AX4 cells were cultured axenically in HL-5 media. Transformation by electroporation was performed as described by Pang et al. (1999). Transformed cells were selected by treatment with neomycin (G418) or blasticidine. For development on plastic plates  $10^6$  cells were collected by centrifugation, resuspended in 1 ml of phosphate-based PDF buffer and loaded on 6-well culture dishes (Multiwell, 6 well, FALCON, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). For development on filters,  $2 \times 10^7$  cells were centrifuged, resuspended on PDF buffer and deposited on Nitrocellulose filters (Millipore) over PDF soaked absorbant pads (Millipore). Cells transformed with promoter reporter vectors were developed on Nitrocellulose filters and the  $\beta$ -galactosidase activity determined by X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) hydrolysis as previously described (Escalante and Sastre, 2006).

### 2.2. Generation of expression and reporter vectors

The coding region of the *mkpA* and *mkpB* (DDB0238328) genes was amplified by PCR using the oligonucleotides GGGGATCCACTCCACCATCAACTCCTAGAGG and GGAATTCACCAACACCACCTTACCACC for *mkpA* and GGGGATCCCAAGATATAGGATCTAGTAAG and GGAATTCGGATTGAGGTAATT CAATTGGTG for *mkpB*. The fragments generated were cloned in the pGEMT-Easy plasmid vector (Promega), sequenced in both strands and transferred to the pDV-CTAP-CGFP expression vector (Meima et al., 2007) using the BamHI and EcoRI restriction sites. A catalytically inactive form of MkpB was generated by in vitro mutagenesis according to Zheng et al. (2004). The oligonucleotides GAGTTTAAATACACGCTGCAATGGGTATTAGTAGATC and CCCATTGCAGCGTGTATTAATACTACCACCTTG were used for mutagenesis. *mkpB* promoter region, covering from the closest upstream gene (*alyD-2*)(nucleotide-1253 from the *mkpB* initiation codon) to nucleotide 45 of the *mkpB* coding region, was amplified by PCR using the primers GGTCTAGACCATAGCATGGGTTACTACAAC and GGACATCTTGGTAGTCTCTGTTGTATATTAAC. The amplified fragments were cloned in the pGEMT-Easy vector, sequenced in both strands and transferred to the pDDGal-17 vector (Harwood and Drury, 1990), using the XbaI and BglII restriction sites.

### 2.3. Northern blot analysis

RNA was obtained from  $2 \times 10^7$  cells collected from axenic cultures or from structures at different developmental stages on Nitrocellulose filters using the Trizol reagent (GIBCO-BRL). RNA electrophoresis, transfer to filter and hybridization were carried out as previously described (Sambrook et al., 1989). DNA probes were obtained by PCR from *D. discoideum* DNA using oligonucleotides designed from nucleotide sequences obtained at the Dicty Base (<http://www.dictybase.org>) and labeled using the Ready-to-Go DNA labeling Beads (-dCTP)(GE Healthcare).

#### 2.4. DNA nucleotide sequence analysis

*D. discoideum* genes coding for proteins containing a DUSP phosphatase homology domain were identified at the Dicty Base using the amino acid sequence of the human MKP1 phosphatase domain as query and the on line BLASTP program. Amino acid sequences were aligned using the Clustal W algorithm of the MacVector program (MacVector Inc., Cary, NC, USA). Phylogenetic trees were generated using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) and the MacVector and ClustalX (Thompson et al., 1997) programs. A random generator seed of 111 was used and 1000 bootstrap trials were generated. Trees were drawn using the MacVector and njplot programs.

#### 2.5. Cisplatin viability curves

Cell viability was studied using the tetrazolium compound MTS (Promega) method. Briefly cells were seeded at 40,000 cells/well in a 24-well plate, 20–30 min later 0–200 µg/ml of cisplatin (CDDP) were added to the cultures. After 72 h, MTS was added to the cultures and the amount of degradation product determined by measuring optical absorption to 490 nm after three hours of incubation.

#### 2.6. Folic acid induction and Western blot analysis

Folic acid induction of Erk2 phosphorylation was determined as previously described (Nguyen and Hadwiger, 2009). Cells were suspended in phosphate buffer (12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.1) at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml, shaken for 1 h and stimulated with 50 µM folic acid. Cells were collected by centrifugation at the indicated times and suspended in SDS-PAGE sample buffer. Twenty µl of each extract were analyzed in 10% polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred to Immobilon P membranes (Millipore) and incubated with anti-phospho ERK antibodies (Thr202/Tyr204; Cell Signaling Technology). After ECL (Amersham) developing, blots were washed and incubated with anti-actin antibodies (Sigma, MI, USA) to normalize protein load. The phospho-ERK signal obtained for each sample was quantified by densitometry using the ImageJ program and divided by the signal obtained for the anti-actin antibody.

#### 2.7. In vitro phosphatase activity assays

Phosphatase activity was determined using 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP) as a substrate.  $2 \times 10^7$  cells were harvested and lysed in 1 mL NP-40 lysis buffer as described by Rice et al. (1997). The assay was performed in the buffer previously described, containing 45 µM OMFP, using 20 µg of total AX4, MKPB OE or MKPA OE protein, or 0.35 µg of purified human MKP1 protein (positive control) in the absence or presence of orthovanadate. Fluorescence emission was measured every 10 min of incubation at 30 °C using a multiwell plate reader (excitation/emission: 485 nm/530 nm). Fluorescence values were processed using SoftMax Pro v5 software. The reaction was linear over 2 h of incubation ( $V_{\max}=0.071$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Analysis of *D. discoideum* dual-specificity protein phosphatase coding genes

The phosphatase domain of the human dual-specificity protein phosphatase MKP1 (DUSP1) was used for a search of the proteins

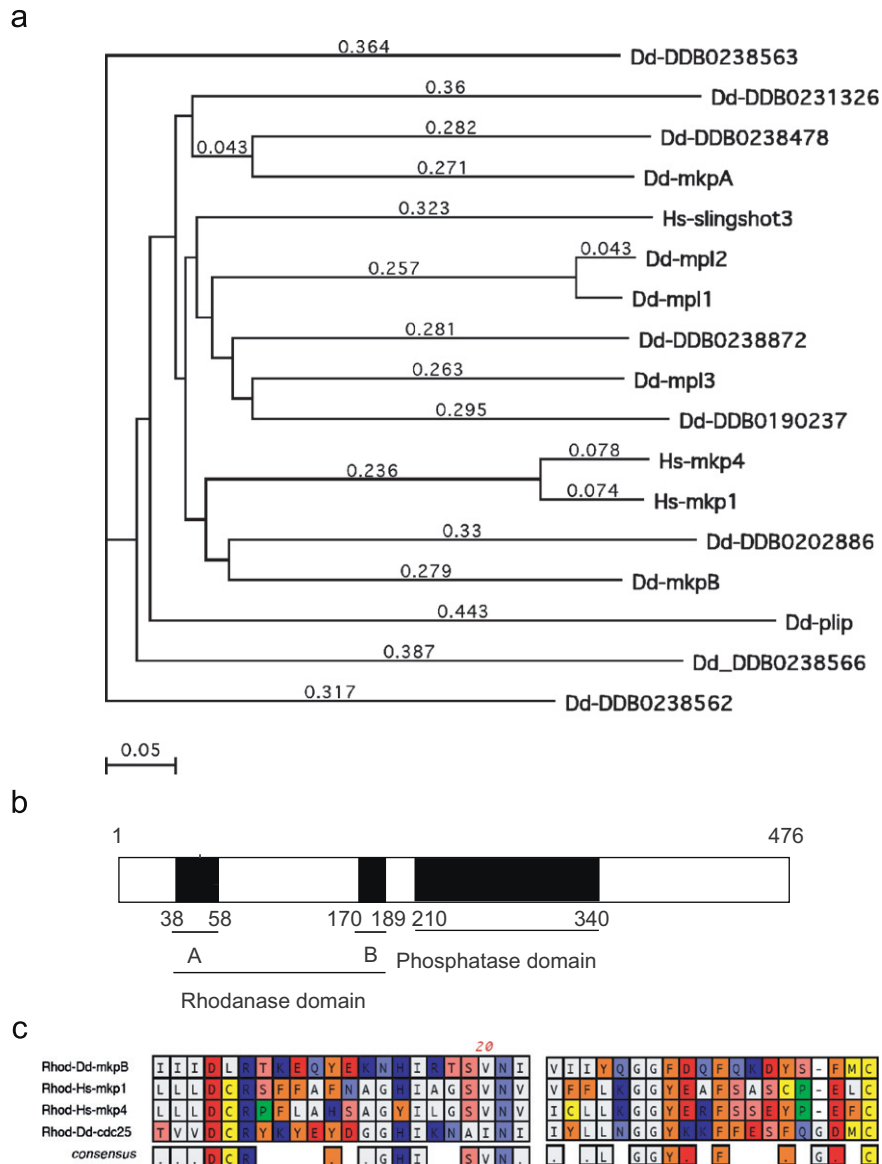
encoded in the *D. discoideum* genome. Fourteen proteins were found that presented significant similarity, with *E* values smaller than  $6e^{-07}$  (Fig. 1). Some of these proteins had been described previously, like MkpA (Sawai et al., 2007) or MPL1 (Rodriguez et al., 2008). *D. discoideum* proteins were between 30% and 40% identical to the human MKP1 phosphatase domain. The percentage increased to 50–60% if conservative changes were admitted. Thirteen of the fourteen proteins contained the highly conserved catalytic domain HCXXXXXR. Only the protein encoded by the gene DDB0231326 presented changes in this region (CSDKGVSR) and might encode an inactive protein phosphatase.

The amino acid sequences of the putative phosphatase domains of these proteins were compared to those of the human dual-specificity protein phosphatases MKP1, MKP4 and slingshot3 domains and the multiple alignments used to construct the phylogenetic tree shown in Fig. 1a. The two *D. discoideum* proteins more similar to human MKP1 and MKP4 were encoded by DDB0202886 and DDB0238327/28(*mcpB*) genes. The two last genes (DDB0238327/28) are located in a chromosome-2 region that is duplicated in the AX4 strain used to determine the nucleotide sequence and code for identical proteins. The analysis of the domains present in the protein encoded by these two genes indicated the presence of a N-terminal Rhodanase domain that is characteristic of the mammalian MKP subfamily of DUSP phosphatases (Keyse and Ginsburg, 1993). This domain was only present in this protein among the 14 *D. discoideum* DUSP proteins. A search of the *D. discoideum* genome encoded proteins showed that only the *cdc25* homologous protein contained this domain, in addition to the DDB0238327/28(*mcpB*) encoded protein. Fig. 1b shows the location of the two regions of the Rhodanase domain, as well as the phosphatase domain, on the DDB0238327/28(*mcpB*) encoded protein. The alignment of the two regions of the Rhodanase domain to those of human MKP1 and MKP4 and of the *D. discoideum* *cdc25* proteins is shown in Fig. 1c. The presence of this N-terminal domain, and the similarity of the phosphatase domain, indicate that the protein encoded by the DDB0238327/28 genes is the *D. discoideum* protein more similar to mammalian MKP protein phosphatases so that the gene will be named *mcpB* and the protein MkpB in this article.

#### 3.2. Determination of MkpB protein phosphatase activity

Functional characterization of MkpB was approached in AX4 cell populations over-expressing MkpB under control of the constitutive Actin 15 promoter. The same vector was used to over-express the previously characterized *mcpA* gene, used as a positive control. Cell populations derived from a large number of independent transformants were collected and used to determine phosphatase activity in vitro using the 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP) substrate and the results are shown in Fig. 2a. Two independent populations of cells over-expressing MkpB (MkpB OE1 and MkpB OE2) showed significantly more phosphatase activity than non-transformed AX4 cells. Cells over-expressing MkpA also showed more phosphatase activity.

The in vivo effects of MkpB over-expression on Erk2 phosphorylation was studied activating the cells with folic acid, that had been previously shown to induce Erk2 phosphorylation (Nguyen and Hadwiger, 2009). Concordantly, folic acid quickly induced Erk2 phosphorylation in AX4 cells reaching maximal levels by one minute to decrease thereafter (Fig. 2b). The cells that over-express MkpB showed lower Erk2 phosphorylation levels (Fig. 2b). These results indicate that MkpB over-expression result in a decrease in phosphorylated Erk2, in agreement with its expected function as a protein phosphatase.



**Fig. 1.** *D. discoideum* genes coding for dual-specificity protein phosphatase homologous proteins. A search of the *D. discoideum* genome using the protein phosphatase domain of human MKP1 dual-specificity protein phosphatase detected the existence of 14 genes coding proteins with significant similarity. Panel A shows a phylogenetic tree indicative of the functional domain similarities among the *D. discoideum* proteins and with human MKP1, MKP4 and slingshot 3 dual-specificity protein phosphatases. Evolutionary distances, calculated as the fraction of nucleotide changes, are indicated over each branch and the scale is shown in the lower left corner. Bootstrap values over 850 were obtained for the Hs-mkp1/mkp4, DdmkpA/DDB0238478 and Ddmp11/mp12 associations. Panels B and C show the results obtained in a more detailed study of the *D. discoideum* gene DDB0238328, named *mkpB* in this article. Panel B shows the domain structure of the encoded protein, including the two regions of the Rhodanase domain (A, B) and the phosphatase domain. Domain limits are indicated underneath the scheme. Panel C indicates the alignment of the amino acid sequences of the A (left panel) and B (right panel) Rhodanase subdomains of *D. discoideum* MpkB and cdc25 and human Mkp1 and Mkp4 proteins.

### 3.3. Developmental expression of the *mkpB* gene

Expression of the *mkpB* gene in cells at growth and during multicellular development was analyzed by Northern blot (Fig. 3a). Low levels of expression were detected in growing cells and during the first hours of development but expression was strongly induced by 12 h of development and maintained at later developmental stages.

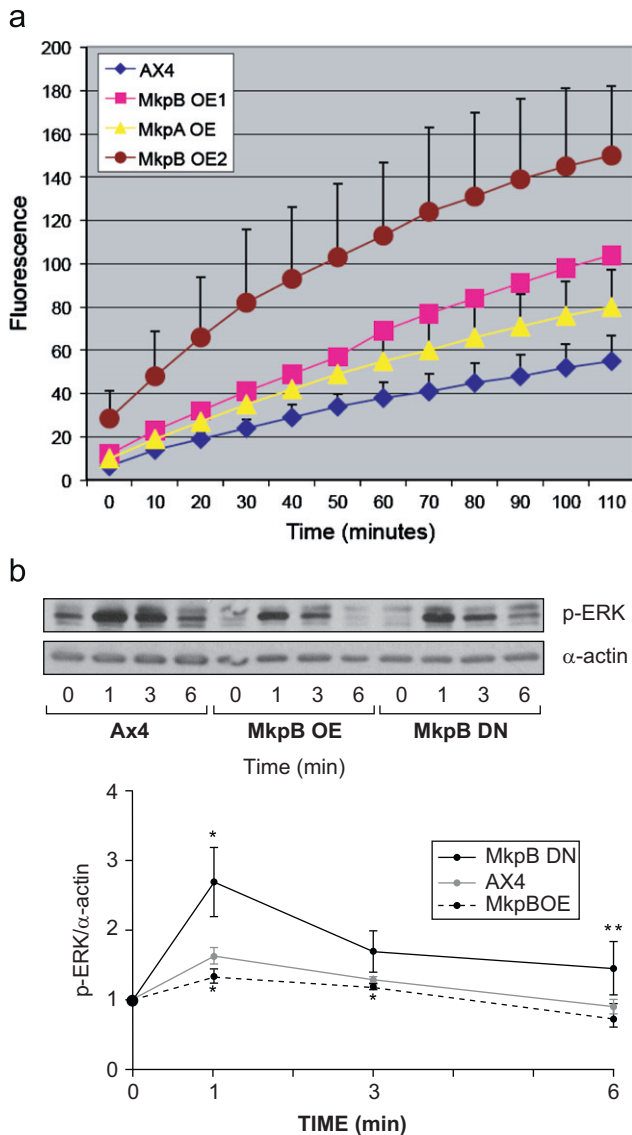
The possible cell-type specificity of *mkpB* expression was analyzed by cloning the complete intergenic region upstream of *mkpB* (1298 nt) in a *lacZ* reporter vector. *D. discoideum* AX4 cells were transfected with this reporter vector and *lacZ* expression analyzed at several developmental stages, as shown in Fig. 3b. *mkpB* promoter activity was detected in aggregates, being more intense in the upper, central part of the structures (Fig. 3b1). Later on during development promoter activity was detected in the

whole structures although it was more intense in cells with a distribution typical of anterior-like cells. These cells were scattered in tight mounds, although they were more abundant in the basal region (Fig. 3b2). In finger and slug structures the more intensely stained cells were detected at the tip and scattered in the posterior prespore region (Fig. 3b3 and b4). In culminant structures the more intensive staining was observed in the basal disk, stalk, upper and lower cup regions (Fig. 3b5), as also described for anterior-like cells.

### 3.4. Analysis of *mkpB* function during development

The generation of mutant strains by homologous recombination was attempted to study MkpB function. However, this approach was not possible in AX4 cells, where this gene is





**Fig. 2.** Determination of MkpB phosphatase activity. Panel A: the phosphatase activity of extracts from AX4 cells or AX4 cells expressing MkpB (MkpB OE1, MkpB OE2) or MkpA (MkpA OE) was determined using 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP) as a substrate. Panel B: AX4 cells, either non-transfected or expressing MkpB (MkpB OE) or a catalytically inactive form of the enzyme (MkpB DN) were stimulated with folic acid and collected 1, 3 or 6 min thereafter. The presence of phosphorylated ErkB was analyzed by Western blots using anti-phospho Erk antibodies, as shown in the upper panel. The amount of phospho-ErkB was quantified by densitometry and normalized to the amount of actin present in each sample, as determined by Western blot. The results of the quantification are shown in the lower part of the panel. All data are representative of three independent experiments performed by triplicate.

duplicated, and was unsuccessful in AX2 cells, that contain a single copy of the gene. This circumstance forced the use of alternative approaches. Dual-specificity protein phosphatases require the presence of a conserved Cysteine residue in their active center (Denu and Dixon, 1995; Zhou et al., 1994). In mammals, mutation of this residue originates catalytically inactive mutants that work as dominant-negative forms of the protein (Sanchez-Perez et al., 2000). Therefore, the codon corresponding to MkpB Cysteine 294 (TGC) was changed to the Valine codon GCT. The inactive form of the protein (MkpB-DN) was expressed in AX4 cells under the control of the constitutive Actin 15 promoter. The possible consequences of the expression of this catalytically

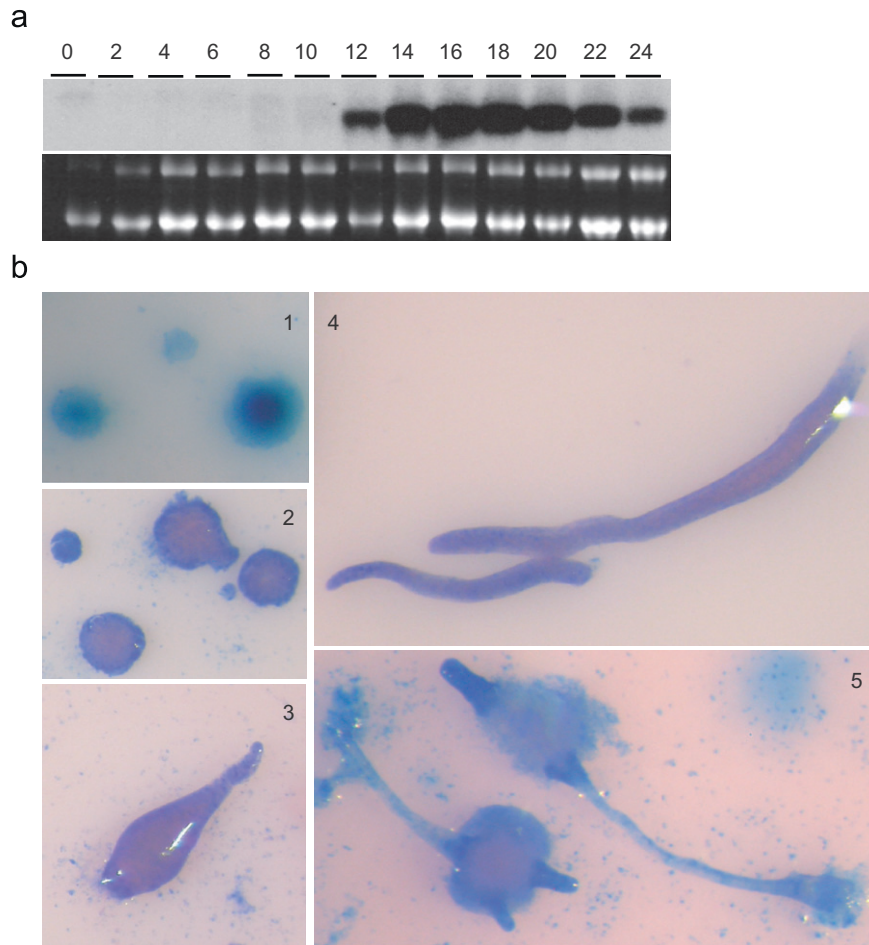
inactive form on Erk activity was analyzed in vivo in response to folic acid. The cells that expressed the catalytically inactive form showed a larger increase in Erk phosphorylation in response to folic acid than AX4 cells (Fig. 2b) in agreement with the proposed inactivating effect of the expression of this mutated MkpB form. Therefore, these cells have been named MkpB-DN (dominant negative) in the rest of the article.

Cells expressing MkpB-DN did not show any differences with the original cells in their growth, either in axenic media or feeding on bacteria (data not shown). Multicellular development was studied laying starved cells on plastic dishes (Fig. 4a) or over Nitrocellulose filters (Fig. 4b). Two different pools of cells expressing MkpB-DN, derived from independent transformations, were used in these studies (MkpB-DN1 and MkpB-DN2). These cells polarized during aggregation on plastic dishes and associated into streams (Fig. 4a) although they were less tightly packed than non-transformed cells (compare lower panels in Fig. 4a). In agreement with these data, MkpB-DN cells aggregated by 12 h of development on Nitrocellulose filters (Fig. 4b). However, post-aggregative development was greatly impaired in MkpB-DN expressing cells. Most of the aggregates did not continue development and those that progressed further formed very small slug (Fig. 4b, 20 h) and small culminant structures with thickened stalks, even after 48 h of development (Fig. 4b, 24 and 48 h). This phenotype was not due phosphatase activity-independent effects of MkpB overexpression because expression of non-mutated MkpB using the same vector did not produce any alteration in development (Fig. 4b).

Postaggregation development is a coordinated process that involves differentiation of prespore and prestalk cells, morphogenetic movements and, later on, the terminal differentiation of stalk cells and spores. To determine which of these processes was altered by MkpB-DN the expression of several developmental markers was studied. The expression of gene coding for the cAMP receptor 1 (*carA*) is induced at aggregation in AX4 cells to decrease at later developmental stages (Fig. 5a, AX4). The cells that express MkpB-DN showed *carA* induction at aggregation with a small delay of two to four hours in relation to AX4 cells (Fig. 5a, MkpB-DN1 and MkpB-DN2). *carA* mRNA levels also decreased from 16 h of development in MkpB-DN expressing cells although significant expression was maintained in MkpB-DN1 cells up to 24 h of development. The prestalk gene *ecmB* (coding for an extracellular matrix protein) and the prespore gene *cotD* (coding for a protein of the spore coat) are induced in AX4 cells after aggregation (10–12 h of development) while mRNA levels decrease at culmination (24 h), as shown in Fig. 5b and c. The cells that express MkpB-DN showed an important delay in the expression of both markers (Fig. 5b and c). These data indicate that MkpB-DN expression originated a marked delay in the differentiation of both prespore and prestalk cells that might explain the blockage observed in post-aggregative development.

### 3.5. MkpB involvement in *D. discoideum* response to cisplatin

Cisplatin (CDDP) is one of the antitumoral drugs more relevant in clinical treatments and the human MKP1 protein is involved in the mechanism of resistance to this compound. For example, MKP1 is expressed in non-small-cell lung cancer and decreasing its expression significantly increases the sensitivity of these cells to CDDP (Chattopadhyay et al., 2006; Cortes-Sempere et al., 2009). To know if *D. discoideum* MKPs could play a similar role both MkpA and MkpB proteins were overexpressed in AX4 cells. Cells over-expressing *D. discoideum* MkpA or MkpB showed increased resistance to CDDP, in comparison to AX4 cells (Fig. 6a). On the contrary, expression of MkpB-DN protein produced



**Fig. 3.** Expression of the *mkpB* gene. Panel A: temporal *mkpB* mRNA expression in growing cells (0) and at different times of multicellular development (2–24 h) was analyzed by Northern blot. The upper panel shows the hybridization signals and the lower panel the Ethidium Bromide staining of the RNA gel. Panel B: the promoter region of the *mkpB* gene was cloned in a *lacZ* reporter vector. Developmental structures obtained from cells transformed with this vector were stained to detect *lacZ* activity and counterstained with eosine. The structures shown correspond to the early aggregate (panel B1), tight aggregate (B2), finger (B3), slug (B4) and culminant (B5) stages of development.

increased sensitivity to CDDP, as shown in Fig. 6b. These data indicated that MAP kinase activity is involved in CDDP sensitivity. To further test this possibility, cells mutated in one of the two genes coding for *D. discoideum* MAP kinases, *erkB*, were analyzed and showed to be significantly more resistant to CDDP than wild type AX4 cells (Fig. 6b). These results indicated that the mechanisms of response to CDDP involving MAP kinases and MKP proteins are conserved between humans and *D. discoideum* and that this amoeba could be a good model system to study the implication of these proteins in CDDP resistance.

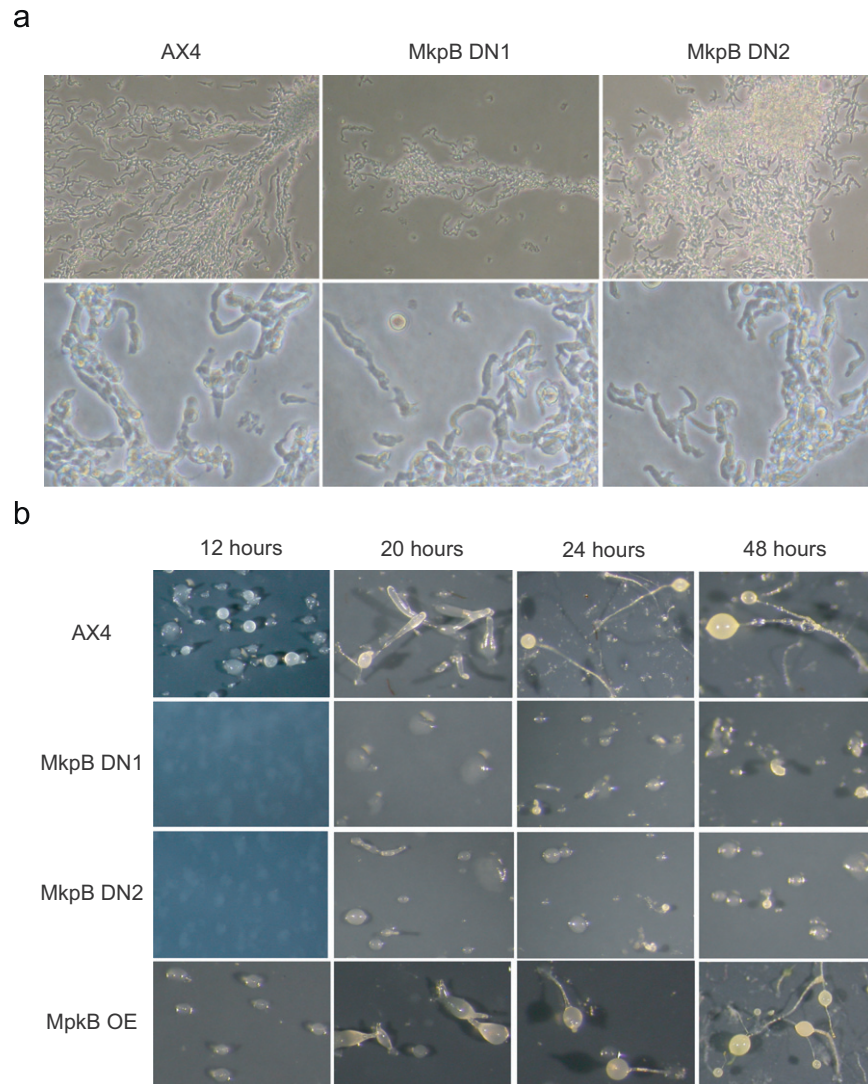
#### 4. Discussion

The gene *mkpB* codes for the *D. discoideum* protein more similar to animal MAP kinase phosphatases (MKPs), among the 14 genes that code for dual-specificity protein phosphatase domain containing proteins in this organism. This conclusion is based on the similarity of the MkpB protein phosphatase domain with those of mammalian MKP1 and MKP4 proteins that makes them group together in the phylogenetic tree shown in Fig. 1, in addition to the DDB020286-encoded protein. The second argument is the presence of a region with similarity to the Rhodanase domain, characteristic of animal MKPs (Keyse and Ginsburg, 1993), in the N-terminal region of MkpB. This domain was only

found in MkpB among the 14 *D. discoideum* dual-specificity protein phosphatases. In addition, only MkpB and Cdc25 presented a Rhodanase domain among *D. discoideum* proteins. Cells over-expressing MkpB showed increased phosphatase activity in *in vitro* assays. Besides, Erk2 phosphorylation in response to folic acid stimulation was reduced in MkpB-over-expressing cells, indicating that the *mkpB* gene codes for a functional MAP kinase phosphatase protein.

This gene is expressed in replicating amoeba and at all stages of the developmental process induced by starvation. However, its expression is strongly induced at 12 h of development, after the aggregation process is completed. Analysis of reporter vectors containing the promoter region indicated that *mkpB* is expressed at all the regions of the structure although the highest levels of expression are found in cells with the same distribution as anterior-like cells. This cell population show a scattered distribution in slug and finger structures and form part of the basal disk, stalk, lower and upper cup and tip regions in culminant structures.

The study of *mkpB* function was initially approached through the generation of mutant strains by homologous recombination. However, this approach was not possible in AX4 cells, because the gene is duplicated in this strain, and was unsuccessful in AX2 cells. The alternative strategy of expressing an inactive form of the protein (MkpB-DN) previously described for mammalian



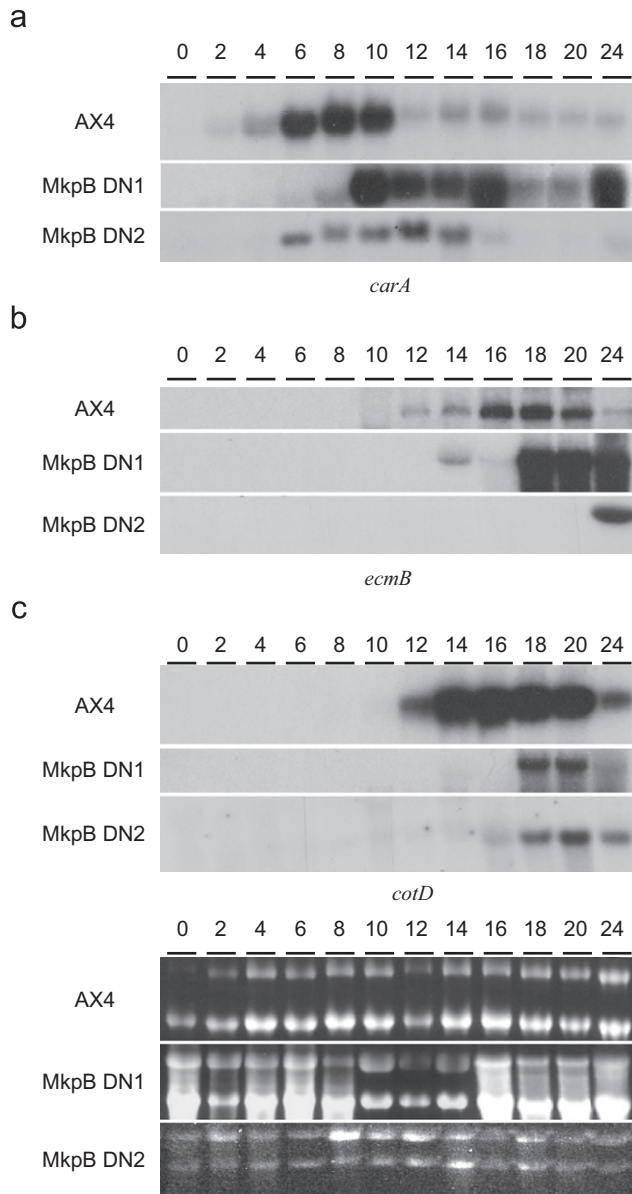
**Fig. 4.** Multicellular development of cells expressing a catalytically inactive form of MkpB. *D. discoideum* AX4 cells were transformed with a vector expressing MkpB (MkpB OE) or a catalytically inactive form of MkpB (MkpB-DN) under the control of the constitutive Actin 15 promoter. AX4 cells or two populations of transformed cells (MkpB DN1, MkpB DN2) were harvested and laid on plastic dishes (panel A) or Nitrocellulose filters (panel B) to observe multicellular development. AX4 cells transformed with MkpB (MkpB OE) were also laid on Nitrocellulose filters (panel B). The images of panel A were obtained at 12 h of development while those of panels B were taken at the times indicated in the upper part of the panels.

MKPs (Denu and Dixon, 1995) was, therefore, chosen. Cells expressing the MkpB inactive form of the protein grew similarly to AX4 cells both in axenic media and feeding on bacteria, which would indicate that MkpB is not required for cell proliferation. Multicellular development was, however, greatly impaired. Cells expressing MkpB-DN initiated aggregation at about the same time as AX4 cells, polarized and formed streams timely, although they were not as tightly packed in the streams as AX4 cells.

Most of the aggregates formed by MkpB-DN-expressing cells did not progress any further in the developmental process, even after 48 h from starvation. The few aggregates that proceeded further formed very defective structures. The morphological alterations were reflected in the pattern of expression of differentiation marker genes. Cells expressing MkpB-DN expressed the *carA* aggregation-specific gene with a temporal pattern similar to that of AX4 cells, except for a small delay of about two to four hours. However, one prestalk (*ecmB*) and one prespore (*cotD*) gene, whose expression is induced after aggregation, showed a marked delay with respect to AX4 cells. Besides, the expression of these genes remained at high levels at 24 h of development while their expression decreased in AX4 cells after culmination

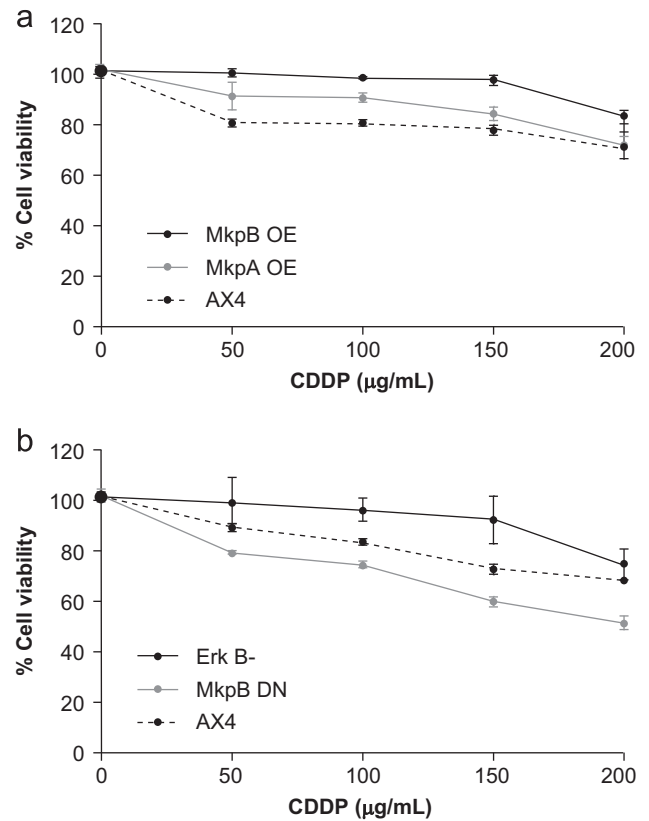
was completed. This result is in agreement with the morphological observation that MkpB-DN expressing cells remained at the mound stage of development. These data also indicate that the developmental delay observed was not limited to specific defects in prestalk or prespore cell differentiation but to a very general blockage of differentiation and morphogenesis. However, the phenotype could be initially due to impairment of prestalk or prespore cell differentiation since a block in one cell type often interferes with the development of another cell type.

Dual-specificity protein phosphatases regulate the activity of MAP kinases, inactivating them. The defects observed in MkpB-DN expressing cells are expected to be due to interference with the MAP kinase regulatory pathways that regulate development. The existence of 14 *D. discoideum* genes coding for MAP kinase phosphatase homologous proteins makes possible that the phenotype observed could be due to interference with other phosphatases, in addition to or instead MkpB. However, the temporal coincidence of *mkpB* expression and the defects observed is consistent with the phenotype being due to interference with MkpB-dependent regulatory pathways.



**Fig. 5.** Analysis of gene expression during development of cells expressing a MkpB catalytically inactive form. RNA was extracted from AX4 cells or two populations of AX4 cells expressing a MkpB catalytically inactive form (MkpB DN1, MkpB DN2) during growth (0) or after 2–24 h of development (2–24). The expression of the aggregation-specific gene *carA*, coding cAMP receptor 1 (panel A), the prestalk *ecmB* gene, coding for the extracellular matrix protein EcmB (panel B) or the prespore-specific *cotD* gene, coding for the spore coat protein CotD (panel C) was analyzed by Northern blot. The lower panel shows the Ethidium Bromide staining of the gels.

As mentioned in the Introduction section, only two genes coding for MAP kinases have been identified in *D. discoideum*, *erkA* and *erkB*, and both genes are required for regulation of development. *ErkA* is expressed at growth but its expression is also induced from 8 h of development under the control of a development-specific promoter (Gaskins et al., 1994). This promoter drives *erkA* expression in cells with a distribution similar to that of anterior-like cells and also very similar to the one observed for cells with maximal *mcpB* expression, as mentioned above. Cells where the *erkA* genes has been mutated form small aggregates that, in the most part, do not continue development (Nguyen et al., 2010; Sobko et al., 2002), as also observed for cells expressing MkpB-DN.



**Fig. 6.** Cisplatin sensitivity of *D. discoideum* cells expressing wild type or catalytically inactive Mkp proteins. Panel A: AX4 cells non-transfected (AX4), or transformed with vectors where the expression of MkpA (MkpA OE) or MkpB (MkpB OE) was regulated by the constitutive Actin 15 promoter. Cells were incubated in the presence of 0–200 µg/ml of cisplatin (CDDP) for 48 h. The number of viable cells was estimated by MTS hydrolysis after 48 h of treatment and represented as the percentage of untreated cells. Panel B: AX4 cells (AX4), a population of AX4 cells expressing a catalytically inactive form of MkpB (MkpB DN) or *erkB*-mutant cells (Erk B-) were incubated in the presence of 0–200 µg/ml of cisplatin (CDDP) for 48 h and the MTS assay performed. The percentage of viable cells was calculated as indicated in panel A. All data are representative of three independent experiments performed by triplicate.

Cells mutated in the *erkB* gene do not aggregate because Erk2 is required for establishment of the cAMP oscillatory waves that regulate this process (Maeda et al., 2004). In addition, Erk2 is also required for prespore cells differentiation at the mound stage of development, in a process that is independent of cAMP signaling (Gaskins et al., 1996).

Two dual-specificity protein phosphatases with the capacity to regulate Erk1 and Erk2 activity have been characterized in *D. discoideum*, Mpl1 and MkpA. *Mpl1* expression is induced by 5 h of development and mutant cells show defective streaming and aggregation (Rodriguez et al., 2008). Similarly, *mcpA* mutant cells show impaired aggregation (Sawai et al., 2007), suggesting that these two protein phosphatases regulate the aggregation process that is dependent on Erk2 activity. On the contrary, *mcpB* expression is induced after aggregation and expression of MkpB-DN does not significantly alter the aggregation process, indicating that this protein phosphatase rather regulates cell differentiation and morphogenesis. We would like to suggest that MkpB might be responsible for Erk1 inactivation, given that both proteins show similar expression patterns and Erk1 has been related to cell differentiation and tip formation, as mentioned above. Expression of the catalytically inactive mutant is expected to result in sustained Erk1 activation and the functional consequences could be the opposite of *erkA* mutation. However, long-lasting

stimulation of MAP kinases can also negatively affect the involved signaling pathways and the consequences on Erk1-overstimulation have not been described. In addition, MkpB could also regulate Erk2 activity during spore differentiation since MkpB-DN expressing cells show a strong delay in the expression of the *cotD* prespore gene. Obviously, further experiments will be necessary to confirm or reject these hypotheses.

The last part of the article approaches the study of a different function that has been described for mammalian MKP proteins. A strong correlation between MKP1 activity and cisplatin resistance has been shown in human cancer cells. Cells with decreased Mkp1 expression or over-expressing a dominant-negative form of the enzyme are more sensitive to cisplatin while cells that over-express this protein are more resistant to the drug (Chattopadhyay et al., 2006; Sanchez-Perez et al., 2000). The same effect was observed for two *D. discoideum* MAP kinase phosphatases, MkpA and MkpB. Cells over-expressing any of these phosphatases are more resistant to cisplatin. On the contrary, cells that express a MkpB catalytically inactive form are more sensitive. Furthermore, cells mutated in the MAP kinase-coding gene *erkB* are more resistant to cisplatin than wild type cells. In agreement with these data, *ErkB* regulates the activity of the cAMP phosphodiesterase *RegA* (Maeda et al., 2004), that has also been involved in cisplatin resistance in *D. discoideum* (Li et al., 2000; Niedner et al., 2001). These observations indicate that MAP kinase- and MKP-dependent cisplatin resistance mechanisms have been conserved through evolution and makes of *D. discoideum* a good model system for their study.

## Acknowledgements

This work was supported by Grants BFU2008-02249 (LS) from the Dirección General de Investigación, Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, and PI08-1485 from the Fondo de Investigación Sanitaria (RP), respectively. VM-A is recipient of a FIS pre-doctoral fellowship and MG-C of a JAE pre-doctoral fellowship.

## References

- Annesley, S.J., Fisher, P.R., 2009. *Dictyostelium discoideum*—a model for many reasons. *Mol. Cell Biochem.* 329, 73–91.
- Chattopadhyay, S., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Belda-Iniesta, C., Moratilla, C., Cejas, P., Fresno-Vara, J.A., de Castro-Carpeno, J., Casado, E., Nistal, M., Gonzalez-Baron, M., Perona, R., 2006. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25, 3335–3345.
- Cortes-Sempere, M., Chattopadhyay, S., Rovira, A., Rodriguez-Fanjul, V., Belda-Iniesta, C., Tapia, M., Cejas, P., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Sanchez-Perez, I., Nistal, M., Moratilla, C., Castro-Carpeno, J.D., Gonzalez-Baron, M., Albanell, J., Perona, R., 2009. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF- $\kappa$ B and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 286, 206–216.
- Denu, J.M., Dixon, J.E., 1995. A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5910–5914.
- Dickinson, R.J., Keyse, S.M., 2006. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J. Cell Sci.* 119, 4607–4615.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43–57.
- Escalante, R., Sastre, L., 2006. Investigating gene expression: in situ hybridization and reporter genes. In: Eichinger, L., Rivero, F. (Eds.), *Dictyostelium discoideum* Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 230–247.
- Gaskins, C., Maeda, M., Firtel, R.A., 1994. Identification and functional analysis of a developmentally regulated extracellular signal-regulated kinase gene in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6996–7012.
- Gaskins, C., Clark, A.M., Aubry, L., Segall, J.E., Firtel, R.A., 1996. The *Dictyostelium* MAP kinase ERK2 regulates multiple, independent developmental pathways. *Genes Dev.* 10, 118–128.
- Harwood, A.J., Drury, L., 1990. New vectors for expression of the *E. coli lacZ* gene in *Dictyostelium*. *Nucl. Acids Res.* 18, 4292.
- Johnson, G.L., Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912.
- Keyse, S.M., 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 253–261.
- Keyse, S.M., Ginsburg, M., 1993. Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and *cdc25*. *Trends Biochem. Sci.* 18, 377–378.
- Li, G., Alexander, H., Schneider, N., Alexander, S., 2000. Molecular basis for resistance to the anticancer drug cisplatin in *Dictyostelium*. *Microbiol. UK* 146, 2219–2227.
- Maeda, M., Lu, J., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A., Loomis, W., 2004. Periodic signaling controlled by an oscillatory circuit that includes protein kinases ERK2 and PKA. *Science* 304, 875–878.
- Marshall, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185.
- Meima, M.E., Weening, K.E., Schaap, P., 2007. Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*. *Protein Expression Purif.* 53, 283–288.
- Nguyen, H.N., Hadwiger, J.A., 2009. The Galph4 G protein subunit interacts with the MAP kinase ERK2 using a D-motif that regulates developmental morphogenesis in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* 335, 385–395.
- Nguyen, H.N., Raisley, B., Hadwiger, J.A., 2010. MAP kinases have different functions in *Dictyostelium* G protein-mediated signaling. *Cell Signal.* 22, 836–847.
- Niedner, H., Christen, R., Lin, X., Kondo, A., Howell, S.B., 2001. Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin. *Mol. Pharmacol.* 60, 1153–1160.
- Pang, K.M., Lynes, M.A., Knecht, D.A., 1999. Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid* 41, 187–197.
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., Daly, R.J., 2009. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.* 418, 475–489.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.
- Qi, M., Elion, E.A., 2005. MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118, 3569–3572.
- Rice, R.L., Rusnak, J.M., Yokokawa, F., Yokokawa, S., Messner, D.J., Boynton, A.L., Wipf, P., Lazo, J.S., 1997. A targeted library of small-molecule, tyrosine, and dual-specificity phosphatase inhibitors derived from a rational core design and random side chain variation. *Biochem.* 36, 15965–15974.
- Rodriguez, M., Kim, B., Lee, N.S., Veeranki, S., Kim, L., 2008. MPL1, a novel phosphatase with leucine-rich repeats, is essential for proper ERK2 phosphorylation and cell motility. *Eukaryot. Cell* 7, 958–966.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Perez, I., Martinez-Gomariz, M., Williams, D., Keyse, S.M., Perona, R., 2000. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 19, 5142–5152.
- Sawai, S., Guan, X.J., Kuspa, A., Cox, E.C., 2007. High-throughput analysis of spatio-temporal dynamics in *Dictyostelium*. *Genome Biol.* 8, R144.
- Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C., Firtel, R.A., 1995. A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 128, 405–413.
- Sobko, A., Ma, H., Firtel, R.A., 2002. Regulated SUMOylation and ubiquitination of DdMEK1 is required for proper chemotaxis. *Dev. Cell* 2, 745–756.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876–4882.
- van Haastert, P.J.M., Devreotes, P.N., 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 626–634.
- Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J.L., 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucl. Acids Res.* 32, e115.
- Zhou, G., Denu, J.M., Wu, L., Dixon, J.E., 1994. The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J. Biol. Chem.* 269, 28084–28090.

## Role of CHK2 in cancer development

Rosario Perona · Verónica Moncho-Amor · Rosario Machado-Pinilla · Cristóbal Belda-Iniesta · Isabel Sánchez Pérez

Received: 10 June 2008 / Accepted: 15 July 2008

**Abstract** DNA repair pathways enable tumour cells to survive DNA damage induced by external agents such as therapeutic treatments. Signalling cascades involved in these pathways comprise the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), ATM and Rad3 related (ATR) and checkpoint kinases I and 2 (Chk1/Chk2), among others. ATM and ATR phosphorylate, respectively, Chk2 and Chk1, leading to activation of checkpoints. Chk2 acts as a signal distributor, dispersing checkpoint signal to downstream targets such as p53, Cdc25A, Cdc25C, BRCA1 and E2F1. A role of Chk2 as a candidate tumour suppressor has been suggested based on both mouse genetics and somatic tumour studies. We will

discuss here the possible role of this kinase in human carcinogenesis and the possibility to use it as a target to increment DNA damage in cancer cells in response to DNA-damaging therapies.

**Keywords** CHK2 · ATM · ATR · DNA damage · Checkpoints · Chemotherapy

### Introduction

Mammalian cells are at permanent risk of damage to their DNA [1], inflicted by environmental factors including ultraviolet (UV) light, ionising radiation and oxidative stress. These lesions ( $1 \times 10^4$ /day) are mainly single- and double-strand breaks. If these lesions are not repaired, the cells acquire genomic instability. The maintenance of genomic stability is essential for normal functioning and survival of mammalian cells and is pivotal to avoid cancer. Cells have developed sophisticated mechanisms to maintain the genome's integrity, which relies on a coordinated network that activates check-point controls in the cell cycle, activated in response to DNA damage and break advance of the cell cycle, allowing the DNA to be repaired before advancing; otherwise a senescence or death cell programme is activated. Indeed many individuals with syndromes with a genetic predisposition to cancer harbour mutations on the DNA repair systems.

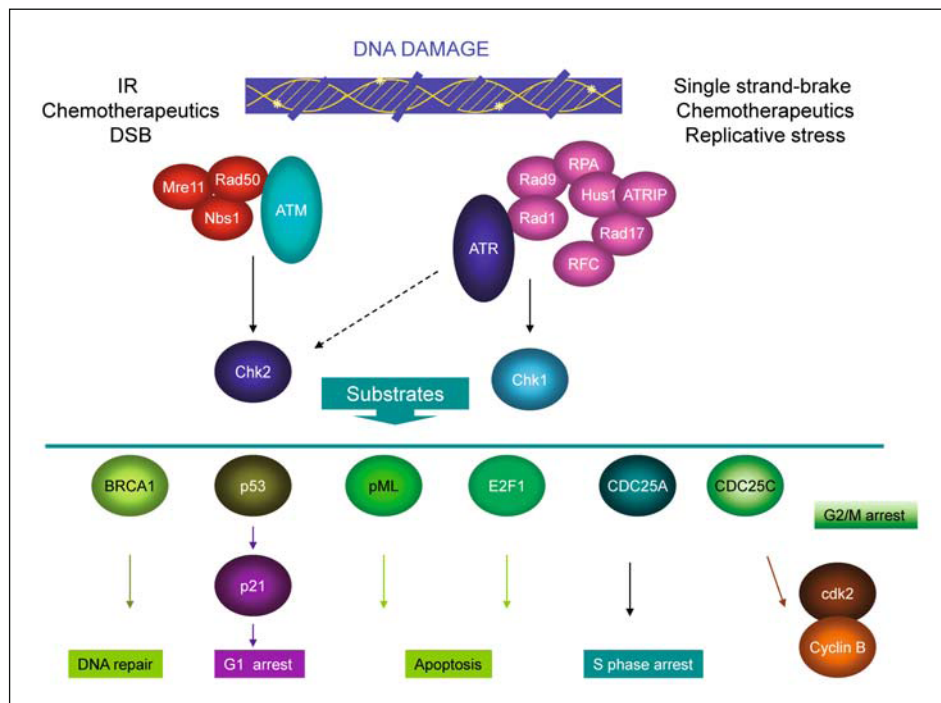
Cell cycle checkpoint maintenance is therefore a key issue for preventing cancer. Therefore, a lot of effort has been invested in the study of the proteins that accomplish these processes and how their activity is modified in cancer. Another important aspect to study is their role in the responses to DNA damage induced as a result of chemo-

\*Supported by an unrestricted educational grant from Pfizer.

R. Perona (✉) · V. Moncho-Amor · R. Machado-Pinilla ·  
I. Sánchez Pérez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas C.S.I.C./U.A.M.  
C/ Arturo Duperier, 4  
ES-28029 Madrid, Spain  
e-mail: RPerona@iib.uam.es

R. Perona · V. Moncho-Amor · R. Machado-Pinilla ·  
I. Sánchez Pérez  
Translational Oncology Unit C.S.I.C./U.A.M.  
CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)  
Valencia, Spain

C. Belda-Iniesta  
Translational Oncology Unit CSIC/UAM at Medical  
Oncology Division  
University Hospital La Paz  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, Spain



**Fig. 1** DNA-damage response signaling pathway. DNA damage is induced either by exogenously (ionizing radiation-IR, chemotherapeutics, double strand-break-DSB, single-strand brake) or endogenously (Replicative stress). Different proteins are recruited to the damaged DNA forming complexes. MRN complex (Mre11, Nbs1 and rad 50) is involved in activation of ATM in response to DSB. ATR is activated in response to single strand breaks by interacting with the ATRIP complex (Rad17, RFC, ATRIP, RPA, Hus1 and Rad9). Depending on the type of stress either Chk2 or Chk1 are activated by ATM and ATR respectively. Chk1 and Chk2 can phosphorylate a number of substrates that results in activation of DNA repair, apoptosis, G1 arrest, G2/M arrest and S-phase arrest

therapy and radiotherapy treatments. Among the proteins involved in these processes, the checkpoint kinase 2 (CHK2) has been the subject of many molecular and biochemical studies and it has been revealed as an interesting therapeutic target for the treatment of cancer.

### DNA damage checkpoints and CHK2

The mechanisms that are activated after damage of DNA are relatively lesion specific, as are the signalling pathways that are activated in response to the damage (Fig. 1). DNA lesions are recognised by sensor damage proteins such as Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN complex) and BASC complex [2, 3]. These proteins recruit and activate the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein, a member of the family of phosphoinositide-3-kinase-related kinases (PIKKs) [2, 3]. Two other PIKKs, DNA-dependent protein-kinase (DNA-PK) and ATR (ATM and Rad3 related), are also activated. These three proteins phosphorylate other targets that contribute to the DNA-damage response, minutes after damage formation. One of these proteins is histone H2AX, which, after being phosphorylated ( $\gamma$ H2AX), recruits other proteins with chromatin remodelling activity, a step essential

to the repair of DNA. Among the proteins that are recruited, we can find MDC1, 53BP1 and BRCA1, which are ATM substrates and mediators of the DNA-damage response.

Participation of ATM and ATR is necessary for the function of three DNA-damage checkpoints, G1/S, Intra S-phase and G2/M. These three checkpoints are necessary to maintain genomic stability since defects in ATM or ATR are associated with cancer-prone syndromes. Mutations in ATM are responsible for the disease ataxia telangiectasia (AT), an autosomal recessive disease that, besides predisposing patients to cancer, induces cerebral ataxia, mental retardation, defective immune functions and neurological problems [4]. ATR mutations predispose to Seckel syndrome, a rare autosomal recessive disease that shows growth and mental retardation and microcephalia [4]. Both AT and Seckel syndrome patients show hypersensitivity to ionising radiation, which also induces genomic instability in Seckel patients [4].

The cascade of activation of the DNA damage signal continues with phosphorylation and activation of Chk1 and Chk2 by the PIKKs ATR and ATM, respectively. Chk1 and Chk2 phosphorylate cdc25A at Ser 76 and Ser 124, which causes it to bind  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -TrCP), a component of the SCF-ubiquitin ligase complex

and Cdc25A degradation that results in arrest in G1/S [4, 5]. Additionally, ATR, ATM, DNA-PK, Chk2 and Chk1 phosphorylate and activate p53. p53 activates transcription of p21, which activates G1/S checkpoint by inhibiting two G1/S cyclin-dependent kinases (CDK), CDK2 and CDK2, thereby allowing DNA repair to occur. During the S phase of the cell cycle, phosphorylation of Cdc24A by Chk1 and Chk2 induces the intra-S-phase checkpoint, allowing repair of the DNA of the cell in this phase of the cell cycle. The delay in the cell cycle is due to the degradation of the S-phase cyclin E/CDK2 complex. Other proteins such as BRCA1, 53BP1 and MDC1 also contribute to activate this checkpoint. During the G2-phase of the cell cycle, DNA damage, a G2/M checkpoint is activated, preventing the damaged cell from entering mitosis. Chk2 or Chk1 phosphorylated CDC25C is a dual specific phosphatase which binds to 14-3-3 sequestering CDC25C away from its substrate CDC2. p53, once activated by the different kinases, also contributes to inhibit G2/M transition by activating transcription of p21 and 14-3-3. p21 activity effectively blocks phosphorylation of CDC2 and the sequestering of CDC25C in the cytoplasm promotes the activation of Wee1, a tyrosine kinase that negatively regulates CDC2, therefore blocking entry into mitosis.

Cxhk2 is also involved in DNA repair. Following Chk2 phosphorylation on S988, BRCA1 is released from the nuclear foci and functions in a homologous recombination pathway and inhibits non-homologous end joining (NHEJ), favouring the error-free mechanism of double strand repair [6–9]. Chk2 can also phosphorylate and stabilise the transcription factor FOXM1, which activates the expression of BRCA1 and base excision repair factor X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1), which operates in homologous recombination repair and the base excision repair pathway [10].

### Role of Chk2 in cancer

CHEK2, the human gene coding for Chk2, was discovered in 1998. Many reports in the literature suggest that CHEK2 is not a tumour suppressor gene but is involved in cancer susceptibility.

Germline mutations of CHEK2 have been found in families with Li-Fraumeni Syndrome (LFS) 11, a rare familial cancer disease [11, 12]. This disease is characterised at the molecular level by heterozygous germline mutation in the gene encoding p53, TP53 [13]. The risk of developing cancer among these individuals is 85% over the lifetime and 42% between birth and the age of 16. Loss of heterozygosity (LOH) on CHEK2 is associated with tumour initiation in some these families, which results in total loss of function of TP53. A subset of LFS families do not harbour TP53 mutations. In these families a study looking for mutations in CHEK2 detected three different mutations, 1157T, 1100delC and 1422delT, in one or more individuals

from each of these families. These findings led to the conclusion that CHEK 2 was another gene involved in LFS [11]. Other studies demonstrated later that one of these mutations (1422delT) was a polymorphism and the other two were founder mutations present in healthy individuals in healthy populations. Other studies have demonstrated with statistical significance that 1100delT and 1157T are moderate penetrant cancer susceptibility mutations increasing the risk of developing breast and prostate cancers [14, 15]. On the other hand, 1157T has also been reported to increase the risk of developing thyroid, bladder, kidney, ovarian and colorectal cancers, and leukaemias [16–18]. Another interesting observation was that carriers of the 1100delC, who have an increased risk of bilateral breast cancer, developed contralateral cancer in a high percentage after having received radiation therapy for the first breast cancer [19]. These findings support the hypothesis that CHEK2 is a cancer susceptibility gene that can synergise with other genes or factors to induce cancer.

Recently, the relationship between Mre11 complex and chk2 in the DNA damage response was approached genetically [20]. This group generated Nbs1<sup>ΔB/ΔB</sup> Chk2<sup>-/-</sup> and Mre11<sup>ATLD1/ATLD1</sup> mice. In these animals Chk2 deficiency did not modify the checkpoint defects or chromosomal instability of Mre11 complex mutants. However, the double mutant mice exhibited synergistic defects in DNA damage induced p53 regulation and apoptosis. The triple mutant mice were also predisposed to tumours. By contrast, DNA-PK-deficient mice in which G1-specific chromosome breaks are present did not exhibit synergy with Chk2<sup>-/-</sup> mutants. These data supported a global role of Chk2 as a tumour suppressor although Chk2 deficiency alone does not appreciably increase spontaneous tumour risk.

Finally, analysis of CHEK2 mutations has been performed in different types of tumours but these are rare and infrequent. Loss of the arm of chromosome 22q13 where CHEK2 is located has been reported in an important proportion of breast, colorectal, ovarian and brain tumours [21–24].

Decreased expression of chk2 has been found in almost 50% of studied cases of colon cancer. Quantitative studies revealed a decrease in pChk2, especially in early stages of colon carcinomas [25].

### Targeting checkpoints in cancer treatment

Results obtained from different studies in tumours do not clearly define the role of Chk2 in cancer, although it appears to act in some cases as a cancer susceptibility gene. As previously shown, Chk2 has a clear and important role in DNA damage responses. DNA-damaging therapies are still one of the most common cancer treatments, particularly in combination with drugs with different mechanisms of action. Even though induction of DNA damage is an effective approach for tumour control, side effects induced by



the doses used in the clinic involving toxicities to the haematological, gastrointestinal and other organs usually limit the used of chemotherapy in the clinical practice. Modulation of checkpoint regulating responses to these types of drugs can appear as a potential strategy to sensitise cells to the DNA-damaging agents.

One of the first modulators of checkpoint pathways was caffeine, an inhibitor of ATM and ATR, and after this the staurosporine derivative UCN-01. By using these agents, it was shown that both could abrogate DNA damage induced G<sub>2</sub> arrest and selectively sensitise p53 mutant cells to radiation, since radiation induces G<sub>2</sub> arrest [26–29]. Later, Chk1 was recognised as one of the targets of UCN-01, supporting the fact that targeting checkpoint proteins would be a useful strategy to enhance cytotoxicity of tumour cells to therapy [30, 31]. UCN-01 is also a potential inhibitor of other kinases including Chk2, cyclin-dependent kinases, therefore the potential mechanisms would not be compared with those obtained with more specific inhibitors. A number of clinical trials are still ongoing with UCN-01 in combination with different DNA-damaging therapies.

The basis of tumour sensitisation to DNA-damaging agents relies on the observation that most tumours are deficient in the DNA damage G1 checkpoint or other components of the general checkpoint signalling response. This is the case of tumours with high rates of p53 mutations, which results in the availability restricted to the S and G<sub>2</sub> phase checkpoints, to repair DNA damage and guarantee cell survival. Thus abrogation of these intact checkpoints should lead to tumour death in contrast with the normal tissue.

Different agents that inhibit CHK1 and less potent inhibitors of CHK2 such as AZD7762, PF447736 and XL844 are being evaluated in phase I studies acting in combination with gemcitabine [32, 33]. IC83, a Lilly/ICOS agent, has been recently approved to enter a phase I study in combination with pemetrexed [33]. AZD7762, PF447736 and XL844 are also inhibitors of Chk2, activating the G1 checkpoint and apoptotic pathways. Therefore it has been hypothesised that CHK2 inhibition should lead also to enhance the effect in p53-null cancer cells [34]. Supporting

this, other authors have described that an ATP-competitive inhibitor of CHK2 protected human CD4(+) and CD8 (+) T cells from apoptosis following ionising radiation [35]. Also in agreement with this, the CHK2-specific inhibitor VRX0466617 attenuated IR-induced apoptosis in short-term assays, while does not have an effect on the cytotoxicity of doxorubicin, taxol or cisplatin [36].

Other preclinical data has also evidenced that inhibiting CHK2 expression is found to show activity in two cellular models of mitotic catastrophe, indicating a potential role for chemosensitisation to doxorubicin.

Targeting of chk2 with SiRNA prevents survivin release from the mitochondria and enhanced apoptosis following induction of DNA damage by IR or doxorubicin and inhibits the growth of resistant *in vivo* tumours [37]. Therefore, activated chk2 circumvents its own tumour-suppressor functions by promoting tumour and cell survival. In agreement with this, expression of a dominant negative of chk2 potentiates cytotoxicity in HCT116 colon carcinoma cells to doxorubicin.

As described above, Chk2 clearly may represent a brake for oncogenesis in the absence of activation of DNA damage. In this situation, activation of Chk2 may force cells to enter senescence or apoptosis. Evidence comes from a recent study demonstrating stable transfection of p53-deficient DLD1 colon cancer and HeLa carcinoma cell lines [38]. Inducible expression of Chk2 in the absence of DNA damage was detected by phosphorylation on T68. In this situation increased levels of phosphorylated Chk2 induced a decrease in cell proliferation, G<sub>2</sub> arrest and apoptosis. Therefore manipulating the phosphorylation stage of Chk2 by inhibition of the phosphatase PPM1D/WIP (which targets T68) should have a therapeutic effect [39].

More work is necessary to clarify the precise role of Chk2 in tumorigenesis and how general and prevalent the role of CHEK2 is as a multiorgan tumour susceptibility gene. On the other hand, in cancer patients resistant to DNA-damaging therapies, a strategy inhibiting the function of Chk2 may be useful to sensitise tumours, once the partial overlap and redundancy of the Chk1 protein is clarified.

## References

- Jackson SP (2001) Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* 29:655–661. Review
- Su TT (2006) Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet* 40:187–208. Review
- Sánchez-Pérez I (2006) DNA repair inhibitors in cancer treatment. *Clin Transl Oncol* 8:642–646. Review
- O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair—insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7:45–54
- Karlsson-Rosenthal C, Millar JB (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* 16:285–292
- Lee JS, Collins KM, Brown AL et al (2000) hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404:201–204
- Zhang J, Willers H, Feng Z et al (2004) Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 24:708–718
- Wang HC, Chou WC, Shieh SY, Shen CY (2006) Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res* 66:1391–1400
- Zhuang J, Zhang J, Willers H et al (2006) Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res* 66:1401–1408
- Tan Y, Raychaudhuri P, Costa RH (2007) Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol Cell Biol* 27:1007–1016
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE et al (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286:2528–2531
- Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ et al (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358–5362
- Malkin D, Li FP, Strong LC et al (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233–1238
- Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J et al; CHEK2-Breast Cancer Consortium (2002) Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 31:55–59
- Seppälä EH, Ikonen T, Autio V et al (2003) Germline alterations in MSR1 gene and prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 9:5252–5256
- Cybulski C, Górski B, Huzarski T et al (2004) CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 75:1131–1135
- Szymanska-Pasternak J, Szymanska A, Medrek K et al (2006) CHEK2 variants predispose to be-

- nign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 102:429–431
18. Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P et al (2006) CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet* 43:e34
  19. Broeks A, de Witte L, Nooijen A et al (2004) Excess risk for contralateral breast cancer in CHEK2\*1100delC germline mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 83:91–93
  20. Stracker TH, Couto SS, Cordon-Cardo C et al (2008) Chk2 suppresses the oncogenic potential of DNA replication-associated DNA damage. *Mol Cell* 31:21–32
  21. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J et al (2003) The CHEK2\*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer Res* 63:8153–8157
  22. Ingvarsson S, Sigbjornsdottir BI, Huiping C et al (2002) Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers. *Breast Cancer Res* 4:R4
  23. Sallinen SL, Ikonen T, Haapasalo H, Schleutker J (2005) CHEK2 mutations in primary glioblastomas. *J Neurooncol* 74:93–95
  24. Williams LH, Choong D, Johnson SA, Campbell IG (2006) Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 12:6967–6972
  25. Stawinska M, Cygankiewicz A, Trzcinski R et al (2008) Alterations of Chk1 and Chk2 expression in colon cancer. *Int J Colorectal Dis* [Epub ahead of print]
  26. Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K et al (2000) Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem* 275:10342–10348
  27. Graves PR, Yu L, Schwarz JK et al (2000) The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 275:5600–5605
  28. Busby EC, Leistritz DF, Abraham RT et al (2000) The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *Cancer Res* 60:2108–2112
  29. Wang Q, Fan S, Eastman A et al (1996) UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* 88:956–965
  30. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM et al (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13:152–157
  31. Koniaras K, Cuddihy AR, Christopoulos H et al (2001) Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene* 20:7453–7463
  32. Janetka JW, Ashwell S, Zabludoff S, Lyne P (2007) Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic. *Curr Opin Drug Discov Dev* 10:473–486. Review
  33. O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC (2007) Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 26:7816–7824
  34. Kawabe T (2004) G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 3:513–519. Review
  35. Arienti KL, Brunmark A, Axe FU et al (2005) Checkpoint kinase inhibitors: SAR and radioprotective properties of a series of 2-arylbenzimidazoles. *J Med Chem* 48:1873–1885
  36. Carlessi L, Buscemi G, Larson G et al (2007) Biochemical and cellular characterization of VRX0466617, a novel and selective inhibitor for the checkpoint kinase Chk2. *Mol Cancer Ther* 6:935–944
  37. Ghosh JC, Dohi T, Raskett CM et al (2006) Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res* 66:11576–11579
  38. Chen CR, Wang W, Rogoff HA et al (2005) Dual induction of apoptosis and senescence in cancer cells by Chk2 activation: checkpoint activation as a strategy against cancer. *Cancer Res* 65:6017–6021
  39. Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD (2007) CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy—two sides of the same coin? *Nat Rev Cancer* 7:925–936