

**Universidad Autónoma de Madrid.
Departamento de Bioquímica**

**Implicación del supresor tumoral BRG1,
ATPasa de los complejos remodeladores de
cromatina SWI/SNF, en el desarrollo del
cáncer de pulmón**

OctavioA. Romero Ferraro.

Madrid 2011

- Departamento de Bioquímica.
- Facultad de Medicina.
- Universidad Autónoma de Madrid
- Titulo:

Implicación del supresor tumoral BRG1, ATPasa de los complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF, en el desarrollo del cáncer de pulmón.

-Autor: Octavio A. Romero Ferraro
Lic. En C.C Biológicas
Directora: Montserrat Sánchez-Céspedes.

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. (CNIO)
Programa de Epigenética y Biología del cáncer (PEBC)
National Cancer Institute -National Institutes of Health (NIH)





INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA
DE BELLVITGE

Dña. Montse Sánchez Céspedes, Doctora en Biología, Jefa del Grupo de Genes y Cáncer, del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer-PEBC del Institut Investigacions Biomediques Bellvitge (IDIBELL) de Hospitalet de Llobregat, Barcelona

CERTIFICA:

Que Don Octavio Romero Ferraro, Licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado *“Implicación del supresor tumoral BRG1, ATPasa de los complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF, en el desarrollo del cáncer de pulmón”*. Doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Barcelona a 14 de Diciembre del año dos mil once.

Dra.Montse Sánchez Céspedes

Directora
Montse Sanchez-Céspedes, PhD

Dr.Ignacio Palmero

Tutor.
Profesor honorario de UAM



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



Genes and Cancer Group Leader
Programa Epigenetica i Biologia del Cancer-PEBC
Hospital Duran i Reynals
Av. Gran Via del'Hospitalet, 199-203
08907-Hospitalet de Llobregat-Barcelona, Spain
email: mscspedes@iconcologia.net
Phone number: +34.93.260.71.32.
Fax number: +34.93.260.72.19

AGRADECIMIENTOS

-Principalmente a mis Padres y Hermanas

-A mi Directora de Tesis y Compañeros de Madrid, Washington y Barcelona

- A mi mujer Patricia.

-Al Ministerio de Educación y Ciencia, al CNIO, al IDIBELL y al NIH

Y a todos mis amigos que durante tantos años me han mostrado su apoyo en este duro trabajo.

- a BRG1....

RESUMEN

Algunos de los componentes de los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF, tales como *INI1*, se inactivan en cáncer mediante mutaciones y, por lo tanto, constituyen genes supresores tumorales. En esta tesis, se han estudiado las mutaciones en el gen *BRG1* (también denominado *SMARCA4*), que codifica para la ATPasa principal de dichos complejos, en 59 líneas celulares de cáncer de pulmón de los tipos histopatológicos más comunes. Se identificaron mutaciones en el 24% de las líneas celulares de cáncer de pulmón. Todas las mutaciones eran homocigotas y la gran mayoría predecían proteínas truncadas, lo cual se confirmó mediante ausencia de proteína por western-blot. Las mutaciones predominaban, de forma estadísticamente significativa, en el subtipo no microcítico (NSCLC) (13/37,35%) en comparación con el subtipo microcítico (SCLC) (1/19,5%) ($P=0.05$; Fisher's Exact test). Las mutaciones en *BRG1* coexistían con alteraciones en *KRAS*, *LKB1*, *NRAS*, *P16* y *P53*, pero no con amplificación del oncogen *MYC*, lo que sugiere una relación funcional entre *BRG1* y *MYC*. Estos datos confirman que *BRG1* es un importante gen supresor tumoral en el cáncer de pulmón y lo sitúan como el cuarto gen más frecuentemente alterado en NSCLC. No obstante, no está claro cómo la inactivación de *BRG1* contribuye a la tumorigénesis del pulmón. Es por ello que en este trabajo de tesis también se estudia este aspecto. Los resultados demuestran que la restauración de *BRG1* en las células de cáncer de pulmón restituye, de forma muy significativa, los patrones de expresión del pulmón normal. Desde un punto de vista del mecanismo molecular, se ha demostrado una relación funcional entre *BRG1* y *MYC*, por la cual *BRG1* se une al promotor de *MYC* y de sus dianas transcripcionales, de manera dependiente de los receptores del ácido retinoico y glucocorticoides. Los retinoides y corticoides están muy relacionados con los procesos que controlan la diferenciación celular y son importantes en el desarrollo embrionario del pulmón y en la prevención del cáncer. La relación funcional *BRG1*/*MYC* es antagónica, ya que cuando *BRG1* está inactiva falla el control de los niveles de *MYC* y se favorece la falta de respuesta de las células a las hormonas lipídicas circulantes. Por último, la re-expresión de *BRG1* inhibe significativamente la invasión y progresión de las células del cáncer de pulmón ortotópicamente implantados en ratones atímicos, apoyando aún más la capacidad supresora de tumores de esta proteína. En definitiva, mediante el uso de varios modelos de cáncer de pulmón que incluyen líneas celulares de cáncer, tumores primarios y tumores ortotópicos humanos en ratones, se demuestra que la función supresor tumoral de *BRG1* está relacionada con el control de los oncogenes de la familia *MYC* y la respuesta a distintos estímulos ambientales. La inactivación de *BRG1* permite a la célula cancerosa sostener programas de la expresión génica que prevengan la diferenciación.

SUMMARY

Components of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, such as INI1, are inactivated in human cancer and thus, act as tumor suppressors. Here we screened for mutations the entire coding sequence of *BRG1 (SMARCA4)*, which encodes the ATPase of the complex, in 59 lung cancer cell lines of the most common histopathological types. Mutations were detected in 24% of the cancer cell lines. All mutations were homozygous and most predicted truncated proteins, which was confirmed by western-blot. The alterations were significantly more frequent in the non-small-cell lung cancer (NSCLC) type (13/37, 35%) as compared to the small-cell lung cancer (SCLC) type (1/19, 5%) (P0.05; Fisher's Exact test). Overall, BRG1 was the fourth most frequently altered gene in NSCLC cell lines. BRG1 mutations coexisted with mutations/deletions at *KRAS*, *LKB1*, *NRAS*, *P16* and *TP53* but never occurred concomitantly with *MYC* amplification, suggesting a common role in lung cancer development. In conclusion, our data strongly support that *BRG1* is a bona fide tumor suppressor and a major factor in lung tumorigenesis. On other hand, it is not clear how *BRG1* inactivation contributes to tumorigenesis. This thesis reports that that expression of wild type BRG1 in lung cancer cells up-regulates lung-specific transcripts (i.e. ACP5, AQP1, TIE1), significantly restoring the gene expression signature of normal lung. Using cell lines from several cancer types it was found that those lacking BRG1 do not respond to retinoic acid (RA) or glucocorticoids (GC), while restoration of BRG1 restitutes sensitivity, as determined by changes in cell morphology and gene expression. Conversely, in SH-SY5Y cells, a paradigm of RA-dependent differentiation, abrogation of BRG1 prevented the response to RA. It is also demonstrated an antagonistic functional connection between BRG1 and MYC, whereby refractoriness to RA and GC by BRG1 inactivation involves deregulation of MYC activity. Mechanistically, these effects are mediated by BRG1 binding to MYC and MYC-target promoters to regulate their expression. Further, the BRG1-MYC antagonism was evident in primary tumors. Finally, BRG1 restoration significantly dampened invasion and progression, decreased MYC and restored responsiveness to RA in lung cancer cells orthotopically implanted in nude mice. In conclusion, this work uses several lung cancer models, i.e. cancer cell lines, primary tumors and an orthotopic cancer mice model, and demonstrates an antagonistic functional connection between BRG1 and MYC, whereby inactivation of BRG1 in cancer cells leads to deregulation of MYC activity and refractoriness to nuclear receptor-mediated transcriptional activation. This enables the cancer cell to sustain undifferentiated gene expression programs that affect the control of key cellular processes, including proliferation, invasiveness and response to inflammation.

INDICE

1-Introducción.....	14
1.1- El cáncer.....	16
1.2-El pulmón, su desarrollo composición y formación.....	17
1.3-El cáncer de pulmón.....	20
1.4-Alteraciones moleculares frecuentes en el cáncer de pulmón.....	23
1.5-Los receptores de membrana y componentes de vías transductoras de señales como oncogenes en el cáncer de pulmón.	24
1.6-Estudio de <i>MYC</i> como modelo oncogénico	25
1.7-Los genes supresores tumorales en el cáncer de pulmón.	28
1.8- El supresor tumoral <i>LKB1</i> y la región cromosómica 19p13.	29
1.9- BRG1 y los complejos remodeladores de cromatina.	30
1.10-BRG1 en el desarrollo del cáncer	33
2- Objetivos.....	36
3-Materiales y métodos.....	40
3.1 Líneas celulares y extracción de ácidos nucleicos.....	42
3.2 Estudio mutacional de <i>BRG1</i> : PCR y secuenciación directa.	42
3.3 Análisis en el número de copias de los genes de la familia <i>MYC</i> ; PCR cuantitativa a tiempo real.....	43
3.4 Tratamientos.....	43
3.5 Ensayo de luciferasa.....	44
3.6 Vectores de expresión de BRG1.....	44
3.7 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	46
3.8 Infección lentiviral.....	46
3.9 Anticuerpos, western blots, inmunofluorescencias e inmunohistoquímica.....	47
3.10 Análisis de expresión génica global con microarrays de de expresión.	48
3.11 RT-PCR cuantitativas a tiempo real.....	49
3.12 Ensayo de formación de colonias	49
3.13 Modelos murinos: xenográfico y ortotópico.....	50
3.14 Análisis estadístico y bioinformático.....	52

4-Resultados.....	54
4.1-El gen BRG1 está frecuentemente inactivado en cáncer de pulmón.	56
4.2-Descripción de isoformas en BRG1.....	59
4.3-Las alteraciones en BRG1 son mutuamente excluyentes con la amplificación en los genes de la familia MYC.	60
4.4-Estudio de la actividad reguladora de la transcripción y de la capacidad para suprimir el crecimiento celular de las formas mutadas de BRG1.....	62
4.5-La restitución de BRG1 en células tumorales de pulmón recupera los programas de expresión propios del tejido pulmonar sano.	64
4.6-BRG1 es reclutado en las E-boxes de las dianas transcripcionales de MYC.....	67
4.7-BRG1 es necesario para promover cambios morfológicos y fenotípicos en las células, provocados por señales externas y mediadas por receptores nucleares.....	70
4.8- La recuperación de BRG1 salvaje reduce el crecimiento celular.....	74
4.9-BRG1 es necesario para regular los niveles de MYC y de dianas transcripcionales de los receptores de corticoides y ácido retinoico.....	75
4.10-Reclutamiento dinámico de BRG1 y MYC en los promotores de las dianas transcripcionales de los receptores de corticoides y ácido retinoico.....	76
4.11-La supresión de la expresión de MYC, tras el tratamiento con RA o DEX, requiere de un desplazamiento en la ocupación de BRG1 dentro del locus de MYC.	78
4.12-La recuperación de BRG1 en líneas deficientes restituye la respuesta a RA mientras que interferencia en la expresión de BRG1 evita la diferenciación inducida por RA.....	80
4.13- La recuperación de BRG1 en modelos xenografts y ortotópicos de cáncer de pulmón reduce la formación de tumores, inhibe la capacidad invasiva y aumenta el tiempo medio de supervivencia.....	84
4.14 Actualización del análisis comparativo entre las alteraciones en MYC y en BRG1, en tumores y líneas celulares de cáncer de pulmón y en líneas celulares derivadas de neuroblastomas.	90
5-Discusión.....	93
6-Conclusiones.....	106
7- Anexo.....	111
8-Bibliografía.....	115
9-Artículos.....	131

PALABRAS CLAVE

- AD:** Adenocarcinoma
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- cDNA:** Acido desoxirribonucleico codificante.
- ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina.
- DEX:** Dexametasona
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Médium.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- DNA:** Acido desoxirribonucleico.
- EDTA:** Acido etilendiaminotetracético.
- GC:** Glucocorticoides
- H&E:** Hematosilina & Eosina
- HRP:** Peroxidasa de rábano.
- HRS:** Región de tinción homogénea.
- Kb:** Kilobases.
- LCC:** Carcinoma de células grandes.
- LOH:** Pérdida de heterocigosidad.
- Mb:** Megabases.
- NSCLC:** Cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- pb:** Pares de bases.
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PJS:** Peutz–Jeghers síndrome.
- PVDF:** Polivinil-dimetil-floruro.
- RA:** Acido retinoico
- RNA:** Acido ribonucleico.
- SCC:** Carcinoma de células escamosas.
- SCLC:** Cáncer de pulmón de células pequeñas.
- TMA:** Microarrays de tejidos.

INTRODUCCION

El cáncer

El término cáncer es un concepto que se aplica a un conjunto de diferentes enfermedades heterogéneas, que comparten como característica común entre ellas la proliferación incontrolada de células pertenecientes a cualquiera de los diferentes órganos y tejidos del individuo donde se desarrolla. Este crecimiento incontrolado de células provoca, en el tejido donde se origina, la formación de una masa conocida como tumor maligno. Los tumores malignos son, a su vez, un producto heterogéneo y dinámico resultado de la combinación de las múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que se acumulan en las células que los forman. En último término pues, las características y el comportamiento de los tumores, en cuanto a tamaño, velocidad, forma de crecimiento, capacidad invasiva local ó a distancia y resistencia a drogas y tratamientos, van a depender de las características moleculares y de la historia de alteraciones que acumulan las células malignizadas.

Las alteraciones genéticas y epigenéticas que se acumulan durante la historia de la formación de los tumores malignos, son muy amplias y variadas. En algunas ocasiones, estas alteraciones se encuentran de forma muy frecuente y de manera transversal en la mayoría de tumores, independientemente del tejido u órgano donde se originen, siendo alteraciones comunes en un alto porcentaje de los pacientes, como es el caso paradigmático de la inactivación por mutación bialélica de *TP53*. Otras alteraciones genéticas y epigenéticas son específicas y de frecuencia variable, en función del tejido de origen donde se forma el tumor, del fondo genético del paciente y del agente carcinógeno inductor del tumor. El dinamismo y variabilidad en las alteraciones y la alta complejidad adicional que confieren las múltiples combinaciones entre las mismas, convierten a los procesos tumorales en fenómenos extremadamente complejos que, junto con la práctica ausencia de una sintomatología temprana clara, dificultan su detección precoz y tratamiento apropiado, convirtiendo al cáncer en una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados.

La inmensa mayoría de los cánceres diagnosticados en humanos son derivados de células de origen epitelial, este grupo de tumores son conocidos como carcinomas, otros tumores de incidencia mucho menor son los sarcomas, que son derivados de células de tejido conjuntivo o células musculares. También existen otras variedades de tumores en humanos, que son los derivados de células del sistema nervioso y aquellos tumores sanguíneos, no sólidos, como son las leucemias y los linfomas derivados de células hematopoyéticas y de sus precursores. Desde el punto de vista clínico, las neoplasias que dan lugar a tumores son clasificadas como tumores

benignos ó malignos. En el caso de los tumores epiteliales, los benignos son conocidos como adenomas, y son tumores diferenciados, no invasivos y que suelen presentar estructura glandular, siendo sus equivalentes malignos, designados coherentemente con la clasificación anterior, como adenocarcinomas. En el caso de los sarcomas, derivados de tejido conjuntivo, un tumor benigno sería clasificado como mioma, si es procedente de tejido muscular, o condroma, si se forma en el cartílago, en este caso los variantes malignizadas, serían designadas como miosarcomas o condrosarcomas

El pulmón, su desarrollo composición y formación

En los pulmones se produce el intercambio gaseoso, mediante la difusión del oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y los alvéolos que forman los pulmones. Los pulmones están cubiertos por una doble membrana serosa lubricada, llamada pleura, y están separados el uno del otro por el mediastino. El pulmón derecho está dividido por dos cisuras la mayor y la menor, que divide al pulmón en 3 partes, el lóbulo superior, el medio y el inferior. En cada lóbulo se distinguen diferentes segmentos, bien diferenciados, correspondiéndole a cada uno un bronquio segmentario. Los bronquios segmentarios se subdividen en bronquios propiamente dichos y estos en bronquiolos. Los bronquiolos carecen de cartílago y se ramifican en bronquiolos terminales y bronquiolos respiratorios que desembocan en los alvéolos, que son en último término las unidades funcionales de intercambio gaseoso del pulmón.

El sistema respiratorio surge como un derivado del endodermo, como una evaginación de la pared ventral que se forma en la porción más cefálica del intestino anterior. Esta evaginación ocurre aproximadamente entre la tercera y cuarta semana, en el periodo somítico del embrión. La evaginación del endodermo forma un brote denominado brote pulmonar, de la cual derivarán los bronquios, bronquiolos y el resto de porciones de lo que son los pulmones. A pesar que el pulmón y el resto de partes del sistema respiratorio proviene principalmente del tejido endodérmico, muchas porciones celulares provienen del tejido mesenquimático. El mesodermo que rodea el árbol bronquial se diferencia en cartílago, músculo liso y vasos sanguíneos. En la fase pseudoglandular hay bifurcación y capilarización de los segmentos broncopulmonares y se alcanza el número de generaciones bronquiales que se tiene al nacimiento. La fase canalicular empieza a formarse el área pulmonar, donde se producirá el intercambio gaseoso. Las vías respiratorias terminales van adelgazando su pared al tiempo que se ramifican y se dividen mediante tabiques internos. Se forman los bronquiolos terminales. Las células superficiales epiteliales de las vías periféricas adoptan una forma cuboidal. Las

células de los sáculos que darán origen a los alveolos comienzan a diferenciarse en dos tipos: los futuros neumocitos tipo I y tipo II, que se originan a partir de neumoblastos.

Las células de tipo I son las encargadas del intercambio gaseoso, son planas y alargadas y cubren alrededor del 95% de la superficie alveolar. Las células tipo I son las más abundantes, forman la pared entre dos alvéolos y tienen un núcleo arrinconado en un extremo. Las células tipo II son cuboidales, menos abundantes, y se caracterizan principalmente por la presencia de un cuerpo laminar en su interior, además poseen vellosidades en su superficie. Son células productoras de proteínas surfactantes, cuya función es la estabilización de la superficie alveolar y la prevención del colapso durante la respiración. El moco es producido por células en las glándulas seromucosas bronquiales y por células caliciformes del epitelio bronquial. Simultáneamente, a partir del mesénquima, comienza a formarse la red de capilares que acabará uniéndose al sistema vascular pulmonar. Esta fase culmina con un pulmón primitivo capaz de respirar. Existen además en el epitelio respiratorio macrófagos alveolares. Durante la fase sacular se completa la formación del sistema canalicular bronquíolo-alveolar. Se forman varias generaciones de sacos alveolares, se diferencian los neumocitos de tipo I, que alcanzan estrecho contacto con los capilares de los tabiques conjuntivos.

En el epitelio de las vías respiratorias se diferencian primero las células neuroendocrinas de Feyrter, similares a las de Kultschisky luego en los bronquios, las células ciliadas y posteriormente, las caliciformes. Sólo después de la aparición de los neumocitos I y II, en los sacos alveolares y alvéolos se diferencian las células de clara en los bronquíolos terminales y respiratorios. La producción de secreción mucosa y serosa comienza en la vigésimo cuarta semana y se completa en la vigésimo sexta semana. Los vasos sanguíneos comienzan a desarrollarse a partir de la decimosexta semana y continúa en la vida posnatal. El desarrollo posnatal del pulmón se caracteriza por la formación de conductos alveolares y de alvéolos maduros. (Adaptación de los libros de anatomía de Frank H. Netter; Rouvière, H. y Delmas, A.; Warwick, Williams. Gray 1995 y 1996).

La maduración pulmonar se alcanzaría por dos mecanismos: multiplicación alveolar y aumento del volumen de los alvéolos en forma proporcional al aumento de volumen de la caja torácica. Con respecto a la multiplicación alveolar se ha visto una regulación hormonal, mediada por el ácido retinoico (RA) y los corticoides (GC) que pueden inducir la formación y regeneración de los alvéolos pulmonares (Massaro y Massaro, 1997). Esta capacidad regeneradora del RA, también se observó en modelos murinos mutantes, con fallos en el desarrollo alveolar (Massaro y Massaro, 2000). Los mecanismos moleculares de los efectos de la RA en la alveolarización conllevan cambios en la expresión de factores críticos para la angiogénesis como VEGF en células epiteliales, y factores críticos para el crecimiento,

proliferación celular y la diferenciación como PDGF y TGF en células mesenquimales de los alveolos. (Belloni PN, et al 2000, Morrisey EE, et al 2003). Además, la regulación del RA y las interacciones con los receptores del RA (RAR y RXR) contribuyen al desarrollo pulmonar adecuado. Por ejemplo, RAR- α promueve la diferenciación en células epiteliales durante la progresión de las fases pseudoglandular a canalicular del desarrollo de los pulmones. Además, el recetor nuclear RAR- α promueve también la formación alveolar después de la etapa perinatal. Mientras por otro lado, la expresión de RAR- β aumenta hacia el final de la etapa sacular e induce la formación de las células epiteliales de tipo I y tipo II (Massaro et al. 2003). En el caso de los corticoides (GC) se ha demostrado que el tratamiento con dexametasona induce la maduración de la microvasculatura pulmonar (Tschanz et al. 1995) y aunque se ha visto su administración exógena previene la formación normal de los alveolos en modelos animales (Massaro et al. 1985; Tschanz et al. 1995). La dexametasona es administrada en neonatos con deficiencias en la maduración pulmonar, ya que favorece la maduración de los alveolos aunque los mecanismos de actuación precisos no están todavía bien entendidos.

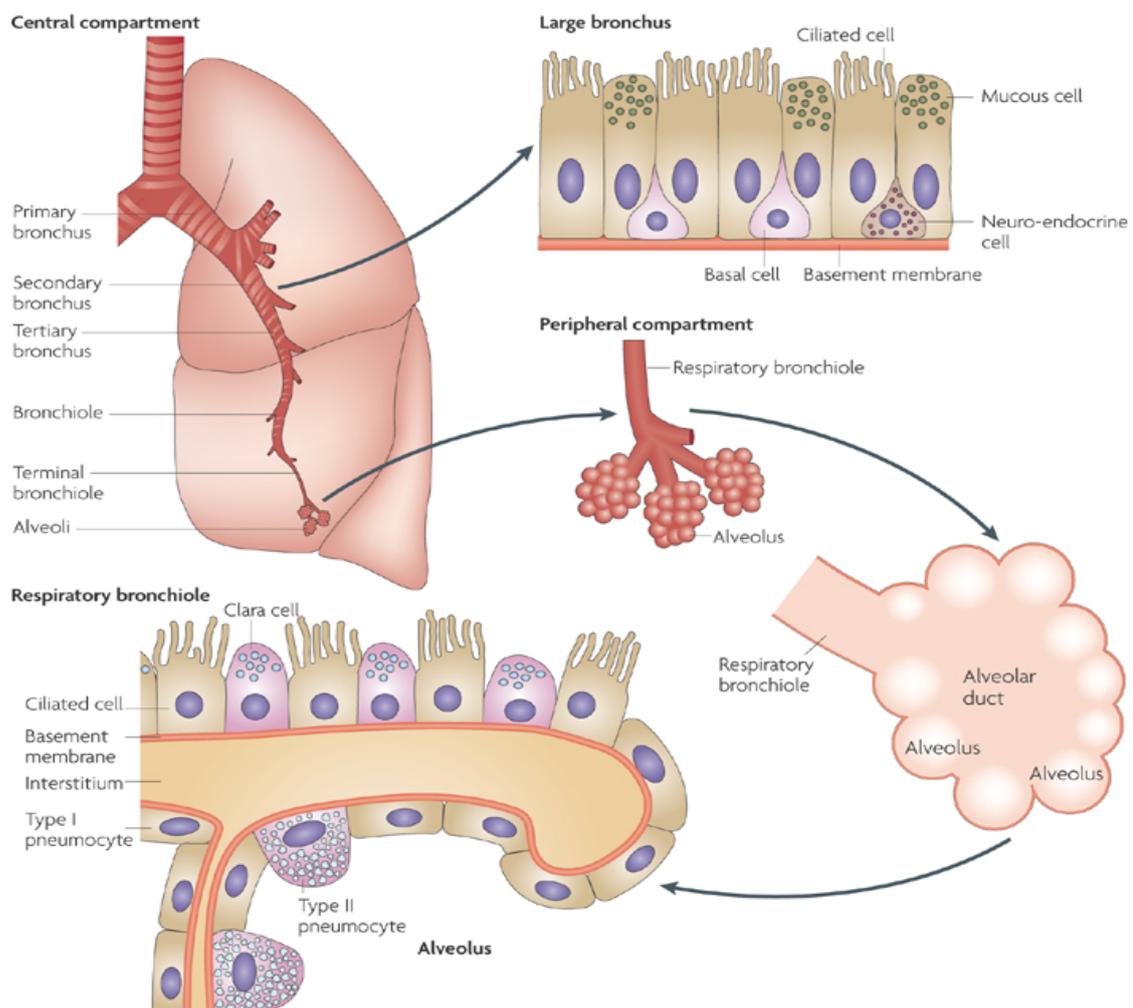


Figura 1.1: Esquema del pulmón y su composición celular. “*Lung cancer in never smokers a different disease*” de Adi F. Gazdar. Nature Reviews 2007

El cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón es un conjunto heterogéneo de enfermedades, resultantes del crecimiento incontrolado de los diferentes tipos celulares que conforman el órgano. Los tumores más frecuentes, dentro del cáncer de pulmón, son aquellos tumores derivados del epitelio bronquial. Los síntomas más comunes provocados por las neoplasias pulmonares en los pacientes son tos crónica o sanguinolenta (hemoptisis), fuerte dolor de pecho que cursa junto con asfixia, dificultad para respirar y fatiga. El cáncer de pulmón, como en muchos otros tipos de cáncer puede extenderse a distancia (metástasis) y colonizar órganos y tejidos (ganglios linfáticos, huesos, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado) destruyendo el tejido afectado, originando nuevos focos tumorales (Arias, Jaime 2000; Minna, JD 2004.)

Desde un punto de vista clínico e histológico las distintas enfermedades que engloba el cáncer de pulmón se clasifican en dos grandes grupos principales, en función de la morfología que presenten las células tumorales que los conforman. Son el cáncer de pulmón de células no pequeñas NSCLC (del inglés, *non-small cell lung cancer*) o no microcítico, y el cáncer de pulmón de células pequeñas SCLC (del inglés *small cell lung cancer*) o microcítico. Los tumores que se encuentran en ambos grupos de esta clasificación morfológica se agrupan, a su vez, en diferentes subtipos de cáncer de pulmón, en función del tejido y tipo celular del que derivan. Además, actualmente, se están haciendo esfuerzos en incluir en la clasificación el tipo y naturaleza de las alteraciones genéticas y epigenéticas que aparecen en ellos, con alta frecuencia y de forma casi exclusiva en cada grupo.

El NSCLC es el tipo de cáncer de pulmón más frecuente y conforma alrededor de un 80% del total de los casos diagnosticados. Este tipo de tumores son derivados de las células que forman los epitelios bronquiales y alveolares. El cáncer de pulmón de célula no pequeña, es un grupo heterogéneo donde destacan tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas, SCC (del inglés, *squamous cell carcinoma*) también conocido como carcinoma epidermoide, es el más frecuente de los subtipos diagnosticados y aparece frecuentemente en los tejidos y estructuras bronquiales. Los adenocarcinomas, AC, más propios de los tejidos alveolares más profundos (neumocitos) es el segundo en frecuencia dentro del grupo y, finalmente, los carcinomas de células grandes LCC (del inglés, *large cell carcinoma*), que son el subtipo más infrecuente pero que presentan como particularidad un alto grado de indiferenciación celular (Travis, WD. Et al 1995). Este último grupo también contiene tumores que se derivan de SCC o AD, pero el alto grado de indiferenciación que han sufrido no permite reconocerlos como tales.

En estos casos, el uso de marcadores genéticos o moleculares suele ayudar a identificarlos. Los tumores que pertenecen al tipo NSCLC crece y se disemina con más lentitud que los SCLC, característica que lo convierten en un grupo de tumores que, en principio, son extirpables por resección quirúrgica, sobre todo en sus primeros estadios, antes de que aparezca diseminación en ganglios locales, o se hayan producido metástasis a distancia. Por otra parte, el SCLC representa aproximadamente el 20% del total de los casos de cáncer de pulmón. Los tumores de este grupo son derivados de células neuroendocrinas muy especializadas que se encuentran en baja proporción en el tejido pulmonar normal. Desde el punto de vista clínico, estos tumores crecen con mucha más rapidez y su diagnóstico suele ser muy tardío, por lo que el tratamiento más común, generalmente paliativo, suele ser el empleo de agentes citotóxicos (quimioterapia y/o radioterapia). Por otro lado, este subtipo de tumores tan agresivos, muestran una alta sensibilidad al tratamiento con agentes químicos, pudiéndose reducir casi por completo el tumor en los primeros meses de tratamiento. Lamentablemente, en la casi totalidad de los casos, se produce una recidiva de la enfermedad que ya no vuelve a responder a los tratamientos previamente aplicados (Rosti, G. et al 2006; Collins, LG. et al 2007).

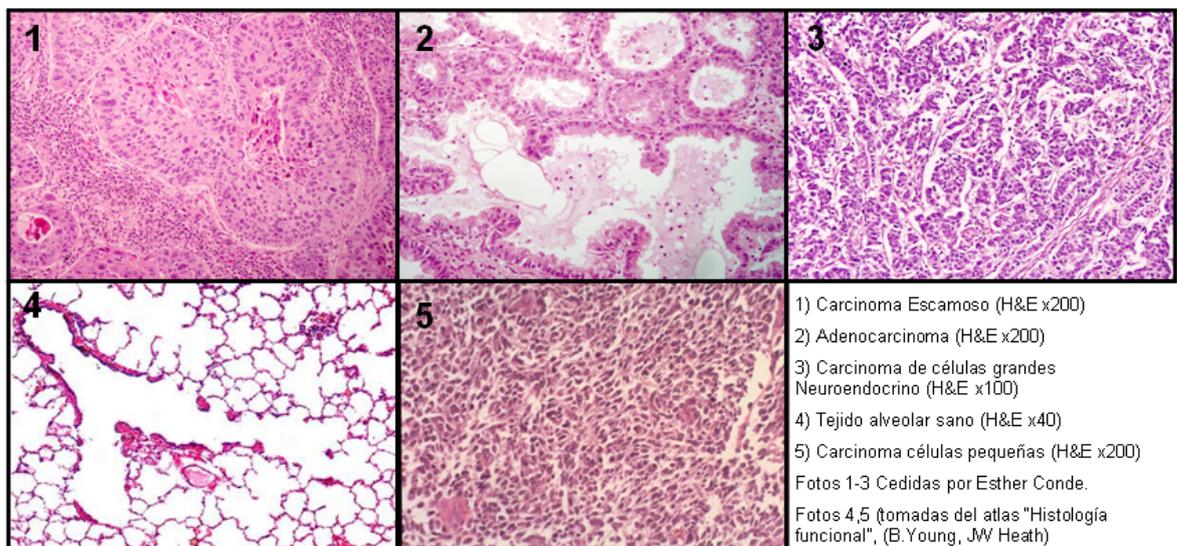
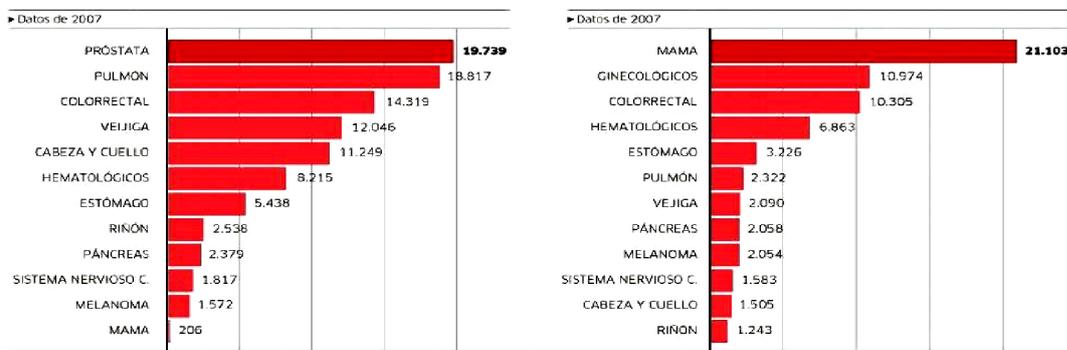


Figura 1.2: Tipos histológicos en el cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón es muy letal, ya que menos del 12,5% de los pacientes en España logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico (Eurocare-3, 2003). En el conjunto de los países desarrollados, el cáncer de pulmón representa el tipo de cáncer con mayor mortalidad y el segundo tipo de cáncer en cuanto a incidencia, tras el cáncer colorrectal en hombres y el cáncer de mama en mujeres. En España supone cerca de 20.000 casos cada año y 1.500.000 casos anuales en todo el mundo, siendo la incidencia mayoritaria en hombres, más del 80%. No obstante, esta tendencia está empezando a cambiar, debido a que desde un punto de vista histórico, se han ido sumando al hábito tabáquico, un número creciente de mujeres en las últimas cuatro o cinco décadas. El cáncer de pulmón es responsable de alrededor de 18.000 muertes al año en España y 1.200.000 en todo el mundo indicando, pues, que aproximadamente 8 de cada 10 pacientes diagnosticados van a fallecer de esta enfermedad. (Rubin, Philip; Jacqueline P. Williams 2003; Cancer Research UK 2005).

Aunque existan otras causas etiológicas de menor incidencia que ayudan a explicar la aparición del cáncer de pulmón, como son el caso del radón, la exposición a asbestos, el arsénico, etc, la relación entre consumo de tabaco y cáncer de pulmón es absolutamente directa. (Nakayama, Kaneko et al. 1985; Shopland, Eyre et al. 1991). El humo del tabaco contiene miles de compuestos diferentes, de los cuales al menos 60 se consideran carcinógenos según el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (Kumar, Stanley L. Robbins et al 2008). Se ha demostrado que cerca del 20% de los consumidores de tabaco acabarán desarrollando cáncer de pulmón y que el tabaco es el responsable directo de más del 90% de los cánceres de pulmón diagnosticados, además de aumentar muy significativamente y de forma directa el riesgo de otros tipos de cáncer como el de cabeza y cuello y de vejiga, entre otros (Wang, Sophia Ssamet, Jonathan M. 1997). Las campañas de la lucha anti-tabáquica y las nuevas legislaciones, que en los últimos años se han incorporado en muchos países, incluyendo más recientemente a España, se han traducido en una disminución de la incidencia y la mortalidad del cáncer de pulmón, sobre todo en aquellos países donde estas medidas llevan más tiempo implantadas (Bray, Sankila et al. 2002). Los carcinógenos presentes en el tabaco pueden producir varios tipos de daños sobre el DNA, gran parte de los cuales producidos mediante su asociación química estable con el DNA, y reciben el nombre de aductos. Los aductos pueden llegar a producir la ruptura de una cadena de la doble hélice del ADN (Wei, Gu et al. 1996).



Tasa de supervivencia

► Proporción de supervivientes en 2003 tras el diagnóstico entre 1995-1999

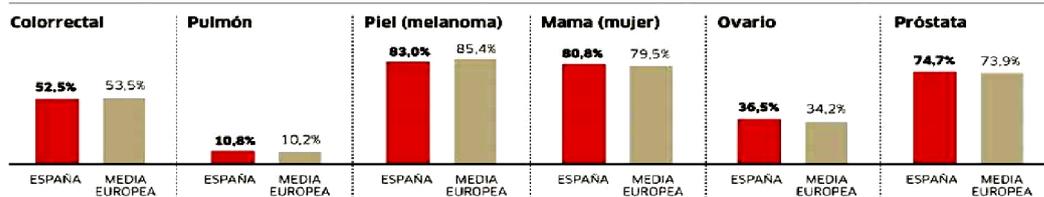


Figura 1.3: Mortalidad/Incidencia del cáncer en España y en la Unión Europea

Alteraciones moleculares frecuentes en el cáncer de pulmón.

Los genes alterados y dañados en el cáncer se agrupan en dos grandes categorías: los proto-oncogenes y los genes supresores tumorales. Los proto-oncogenes son genes que, en los tejidos sanos codifican para moléculas que participan en la regulación positiva del crecimiento celular. Muchas de estas moléculas promueven y dirigen distintos procesos que son absolutamente necesarios durante el desarrollo embrionario, crecimiento de los tejidos y procesos de regeneración y renovación de los mismos. Cuando estos genes sufren alteraciones funcionales o de expresión se convierten en oncogenes y, solo entonces, promueven el crecimiento celular de forma incontrolada. Por otro lado, los genes supresores tumorales controlan negativamente el crecimiento y la proliferación celular y promueven la diferenciación celular. Desde un punto de vista molecular, el cáncer de pulmón no difiere en gran medida de los procesos que serían aplicables a otros tumores formados en otros tejidos. Además, cabe destacar la existencia de una cierta correlación entre su clasificación histopatológica y los distintos tipos de alteraciones moleculares. Por ejemplo, es característico del SCLC, la sobre-expresión, por amplificación génica, de los proto-oncogenes de la familia *MYC* y la pérdida, por inactivación bialélica, del supresor tumoral *RB*. Por otro lado, en el caso del NSCLC es más frecuente la activación del proto-oncogen *K-RAS* y la inactivación del gen supresor tumoral *P16^{INK4A}* (Shiraishi, M., M. Noguchi, et al. 1989).

Los receptores de membrana y componentes de vías transductoras de señales como oncogenes en el cáncer de pulmón.

Hoy en día se conoce una amplia variedad de alteraciones genéticas y epigenéticas en el cáncer, pero aquí solo citaremos alguno de los casos más importantes y estudiados. De entre los proto-oncogenes, cabe destacar la familia *RAS*: *H-RAS*, *N-RAS*, *K-RAS*, por su relevancia en el cáncer de pulmón. Los genes *RAS* codifican para moléculas que actúan como segundos mensajeros de las señales que reciben las células a través de sus receptores de membrana. Estas proteínas forman parte del complejo de las proteínas G, que presentan actividad GTPasa. Cuando están activas desencadenan una serie de señales celulares que promueven las vías de proliferación. Los genes *ras* sufren mutaciones puntuales en los codones 12 o 13 o 61, y como consecuencia la proteína queda constitutivamente activada. En el cáncer de pulmón las mutaciones activadoras son principalmente en *K-RAS* afectando en un 85% al codón 12. Las mutaciones se observan preferentemente en adenocarcinomas (15-20%) (Shiraishi, Noguchi et al. 1989 ;Classon, M. and E. Harlow 2002)

Otros oncogenes importantes pertenecen a la familia *ERBB*, que codifican para una familia de receptores celulares transmembrana que comprende 4 miembros: *ERBB1*, *ERBB2*, *ERBB3* y *ERBB4*. Cuando el ligando se une al receptor, se produce un cambio de conformación en dichas proteínas que conlleva una activación de la actividad tirosina-quinasa de su fracción citosólica, que origina la cascada de transducción de señales, modificando así decenas de rutas en el interior de la célula. *ERBB1*, más conocido como *EGFR*, funciona como el receptor del factor de crecimiento epidérmico y *ERBB2*, conocido también como *HER2/Neu*, se han encontrado alterados por mutación o amplificación en un 25-30% tumores de mama y mutado en un porcentaje muy reducido de varios tipos de cáncer incluyendo colon, mama, ovario y pulmón (Shiraishi, Noguchi et al. 1989; Franklin, Veve et al. 2002). A diferencia de lo que ocurre en cáncer de mama (Slamon, Godolphin et al. 1989), en cáncer de pulmón la amplificación de *ERBB2* es poco frecuente. Aunque la amplificación no sea frecuente, si se ha descrito sobreexpresión en alrededor de un 30% de NSCLC (Bunn, Helfrich et al. 2001). Por otra parte también se han publicado trabajos donde encuentran mutaciones poco frecuentes, de *ERBB2*, en aproximadamente el 4% de tumores primarios de cáncer de pulmón pacientes europeos y en 1% de Japoneses (Sasaki, Shimizu et al. 2006). Por otra parte, la proteína EGFR regula la proliferación y diferenciación epitelial, entre sus ligandos están el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF α). Con respecto al gen *EGFR*, cabe destacar que las mutaciones activadoras en este oncogén se han asociado,

de forma muy estrecha, con el cáncer de pulmón. Hoy en día, está bien establecido que las estas mutaciones son casi exclusivas del adenocarcinomas de pulmón, más específicamente de individuos no fumadores y, por lo tanto se detectan en aproximadamente un diez por ciento de los adenocarcinomas de pulmón. No obstante, y por razones que todavía se desconocen, las mutaciones de EGFR son más frecuentes en adenocarcinomas pulmonares de individuos asiáticos (>30%) que en europeos. Además, cabe destacar el hecho de que las mutaciones en EGFR es un factor predictivo muy importante en la respuesta a gefinitib o erlotinib, dos inhibidores potentes de la actividad de EGFR. Otros oncogenes alterados en el cáncer de pulmón, menos relevantes desde el punto de vista de su frecuencia pero muy importantes desde el punto de vista terapéutico son el oncogén *MET*, que codifica para el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y que está genéticamente activado por amplificación génica en aproximadamente un 5% de los NSCLC y el oncogén *ALK* (del inglés, *anaplastic lymphoma kinase*) otro receptor de membrana activado mediante translocación cromosómica en aproximadamente un 1% de los NSCLC

Estudio de MYC como modelo oncogénico

Otra de las familias de proto-oncogenes más interesantes y más estudiada es el grupo de los genes *MYC*, que incluye a *C-MYC*, *N-MYC* y *L-MYC*. Estos genes codifican para factores de transcripción de tipo hélice-horquilla-hélice, cremallera de leucina (HLH-LZ). A diferencia de lo que sucede con los genes *RAS*, en el cáncer los genes *MYC* no presentan mutaciones puntuales en su secuencia. A través del estudio de *MYC* se describieron, por primera vez, tres nuevos mecanismos de activación génica: mutagénesis por inserción vírica, translocación cromosómica y amplificación génica. Con respecto al primero, se basa en observaciones de que el retrovirus de la mielocitomatosis aviar (MC29) provocaba la formación de una proteína quimérica *v-gag-myc* que mantenía, en las células infectadas, altos los niveles de *MYC*, desregulando su actividad transactivadora (Neel B. et al 1981). El segundo de los mecanismos, la translocación cromosómica, es característica de linfomas y leucemias, donde existen varias translocaciones entre los cromosomas 14, 2 o 22 con la región del cromosoma 8 que contiene a *MYC*. Estas translocaciones colocan al gen *MYC* inmediatamente adyacente a los genes que codifican las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Sheng-ong, G. L. et al. 1982; Crews, S. et al.1982) y provocan una altísima expresión de *MYC*. El tercer mecanismo, descubierto inicialmente en líneas celulares de cáncer colon y leucemias, es la amplificación génica, que también tiene como consecuencia unos niveles de expresión de *MYC* muy elevados. La amplificación génica de *MYC* se produce mediante regiones de tinción homogénea (HSR del inglés, *Homogeneous Staining Region*) o mediante los cromosomas “double-minutes” (Dalla-

Favera, R., F. Wong-Staal, et al. 1982) Ambas estrategias incrementan el número de copias de los genes *MYC* en más de 50. Posteriormente se descubrió que, de forma similar a *MYC*, los genes *N-MYC* y *L-MYC*, que en tejidos sanos sólo se expresan durante el desarrollo, se encontraban intensamente amplificados y sobreexpresados en neuroblastomas y cáncer de pulmón, bajo los mismos mecanismos descritos anteriormente (Schwab, M. et al 1983 Kohl, N.E et al 1983).

En el contexto del cáncer de pulmón se ha descrito que sólo uno de los genes *MYC* se encuentra amplificado en un mismo espécimen tumoral. Es decir, no existe co-amplificación de más de un miembro de la familia *MYC* simultáneamente, siendo *MYC* el que se encuentra amplificado con mayor frecuencia. En general se ha observado que el 18% de los SCLC y el 8% de los NSCLC presentan amplificación génica de *MYC*. No obstante, cabe destacar que amplificación de *N-MYC* y *L-MYC* también ocurre en el cáncer de pulmón y que ésta se da casi exclusivamente en el tipo histopatológico de SCLC (Varmus, H.E. et al 1984; Shiraishi, Noguchi et al. 1989; Richardson and Johnson 1993).

Las proteínas de la familia *MYC* actúan como factores de transcripción, uniéndose, de forma específica, a centenares de regiones promotoras de genes cuya transcripción es directamente regulada por los genes *MYC*. Los factores de transcripción *MYC* tienen una red de interacción tan amplia y compleja que, a día de hoy, se desconoce aún la totalidad de su genes diana (Revisado en Natalie Meyer et al 2008). Además, la proteína *MYC* interacciona con otras proteínas, a través de su dominio de dimerización situado en el extremo carboxilo terminal. De entre las proteínas con las que interactúan se encuentran otros factores de transcripción, incluyendo miembros de grandes complejos multiprotéicos. Entre estos últimos cabe destacar complejos remodeladores de la cromatina, que modifican la estructura de la cromatina y que actúan como co-reguladores de la transcripción, tal es el caso de la unión de *MYC* al complejo SWI/SNF a través de la proteína SNF5 (Cheng, S.W. et al.1999). También se ha descrito que *MYC* es capaz de reclutar complejos acetiladores de histonas, como es el caso del complejo hGCN, a través de su interacción con TRAP (McMahon, S.B. et al.2000). Una de las moléculas de interacción con *MYC* que ha sido más caracterizada es la proteína MAX, que forma un heterodímero con *MYC*. La formación del heterodímero *MYC-MAX* es necesaria para el apropiado funcionamiento de *MYC*, (Gallant, P. et al. 1996, Mao, D.Y. et al. 2003) que es así capaz de reconocer, con alta afinidad, una secuencia consenso CACGTG en los promotores de sus genes diana (Blackwood, E.M et al 1991). Estas secuencias consenso, denominadas *E-boxes*, son las secuencias que reconoce *MYC* para su unión física al DNA y para regular la transcripción de sus genes diana, implicados muchas veces en procesos como: metabolismo, crecimiento celular, proliferación, pérdida de la diferenciación y apoptosis. La actividad

transformante y oncogénica de MYC, ocurre a través de la regulación de la expresión de varios genes diana que participan en diversas rutas celulares. Una de ellas es control del ciclo celular, especialmente transición de G0/G1 a la fase S (Roussel, M.F. et al. 1991, Facchini, L.M. et al 1998, de Alboran, I.M et al. 2001) y donde se ha demostrado que MYC regula directamente la expresión de la ciclina dependiente de kinasa, CDK4, el gen de ciclo celular CDC25A y los factores de transcripción E2F1 y E2F2 (Revisado en Natalie Meyer et al. 2008). La actividad transformante de MYC también podría estar relacionada con su papel sobre la diferenciación celular, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión ectópica de MYC promueve un estado fuertemente indiferenciado, probablemente a través de la promoción promitótica crónica. También se ha demostrado que la función de MYC es necesaria para llevar a término una correcta diferenciación celular (Langdon, W.Y. et al. 1986, Coppola, J.A. et al 1986, Gandarillas, A et al. 1997 Prochownik, E et al 1986.). Aunque el mecanismo molecular mediante el cual MYC controla la diferenciación celular no está completamente elucidado, se sabe que en esta función de MYC participan proteínas como MXD y MAD, que a través de una compleja red de interacciones y formación de heterodímeros MYC-MAX, MAX-MAD y MYC-MAD, regularían diferentes dianas transcripcionales que participarían en diferentes programas transcripcionales. Así pues, la dimerización competitiva de MAX con MYC favorecería la activación de genes implicados en la división celular mientras que la dimerización MAX-MAD, por el contrario, permitiría la regulación de la expresión de genes implicados en la diferenciación terminal. (Gallant, P. et al. 2006 Rottmann, S. et al 2006, Nair, S.K. et al. 2006, Billin A.N. et al. 2006). Finalmente, cabe destacar el reciente papel de MYC como reprogramador celular en el que se ha demostrado que su sobreexpresión, conjuntamente con la de otros factores de transcripción como SOX2, OCT4 y KLF4, MYC es capaz de modificar por completo los programas de expresión de células adultas diferenciadas, hacia programas de células progenitoras pluripotenciales, capaces de derivar en cualquier tipo de tejido (Shinya Yamanaka 2007).

Los genes supresores tumorales en el cáncer de pulmón

De la misma manera que ocurre en el caso de los oncogenes se conocen diversos genes supresores tumorales, algunos de ellos muy bien caracterizados. Los genes supresores tumorales conocidos cumplen, todos ellos la hipótesis descrita por Knudson o de “los dos golpes” del inglés, *two hit hypothesis*, según la cual, en una célula tumoral se deben inactivar las dos copias del gen para eliminar por completo su función biológica como supresor tumoral (Knudson 1971). Hasta la fecha sólo se han descrito, relativamente pocos genes que sean supresores tumorales “*bona fide*” en cáncer de pulmón, a pesar de que existe una elevada frecuencia de pérdidas de heterocigosidad (LOH, del inglés, *loss of heterozygosity*) en varios cromosomas, en el genoma de las células tumorales (Sanchez-Cespedes 2003). De entre los genes supresores tumorales conocidos cabría destacar *TP53* que, en cáncer de pulmón se encuentra mutado en el 75-100% de SCLC y en un 60% de NSCLC (Hainaut, Hernandez et al. 1998). Habitualmente, la inactivación de *TP53* ocurre mediante pérdida completa de un alelo y mutación puntual del alelo restante, anulando completamente la función de la proteína. El gen *TP53* codifica para la proteína P53 que actúa como factor de transcripción y modifica los programas de expresión celular cuando en la célula aparecen daños en el DNA. Estos daños, que ocurren en todos los procesos malignos, ante la presencia de agentes carcinógenos externos o rayos UV, inducen la expresión de *TP53*, que normalmente no se expresa o lo hace a niveles muy bajos. En este contexto P53 regula la expresión de genes que frenan el ciclo celular, que están implicados en la reparación del DNA y que participan en los procesos de muerte celular programada ó apoptosis. De esta forma, la función biológica y supresora tumoral principal de P53, sería detener el ciclo celular cuando se detecta daño en el DNA, fomentar la reparación de dichos daños, o en función de las circunstancias, hacer entrar a la célula dañada entre en un proceso de muerte celular programada, para evitar así que acabe malignizando (Pomerantz, Schreiber-Agus et al. 1998 Shieh, S. Y., M. Ikeda, et al. 1997).

Otro gen supresor tumoral clave en el cáncer pulmonar es *RB*, que codifica una proteína nuclear, que controla la actividad de múltiples factores de transcripción esenciales para la transición de la fase G1 a la S. Cuando RB está hiperfosforilada por los complejos de ciclinas y ciclinas dependientes de kinasas, pierde su capacidad de unirse estos factores de transcripción, y éstos puede promover las síntesis de proteínas que activan el tránsito hacia la fase S del ciclo celular. La inactivación de *RB* en cáncer de pulmón suele suceder mediante pérdida de un alelo y mutación del restante. La proteína RB está alterada en alrededor del 90% en SCLC y entre el 15% de los NSCLC (Kern, Torney et al. 1993; Pfeiffer, Clausen et al. 1996).

Por otro lado, la proteína codificada por $P16^{INK4a}$ es un regulador de RB, que actúa inhibiendo a los complejos de ciclinas /CDK que lo hiperfosforilan. En cáncer de pulmón, $P16^{INK4a}$ pierde su expresión y funcionalidad mediante deleciones homocigotas, mutaciones puntuales e hipermetilación del promotor en un 30-70% de NSCLC (Classon and Harlow 2002), sin embargo, en SCLC su inactivación no es muy frecuente. La vía $P16^{INK4}$ -Ciclina D1-CDK4-RB es fundamental para el control de la transición entre las fases del ciclo celular G1 y S, por ello, dicha vía está alterada funcionalmente en muchos tipos de cánceres humanos.

Además, otro gen supresor importante en la carcinogénesis de pulmón es *PTEN*, que codifica para una fosfatasa lipídica capaz de desfosforilar el fosfatidil inositol trifosfato, actividad que habitualmente se traduce en una restricción en el crecimiento y señales de supervivencia. *PTEN* se ha encontrado alterado mediante mutaciones puntuales o deleciones homocigóticas en el 20% de tumores primarios de pulmón y líneas celulares (Li, Yen et al. 1997).

El supresor tumoral LKB1 y la región cromosómica 19p13

Por último, pero no por ello menos importante, es el caso del gen supresor *LKB1* (también denominado *STK11*), localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13). Las mutaciones en línea germinal de *LKB1* se asocian al síndrome de Peutz-Jeghers cuyos pacientes presentan varias características fenotípicas y clínicas, entre las que destaca una mayor predisposición a cáncer (Jeghers, Mc et al. 1949; Westerman, Entius et al. 1999; Giardiello, Brensinger et al. 2000). La función de *LKB1* está enmarcada en regular la ruta de señalización de AMPK-TSC-mTOR, que controla el estado energético celular, en ausencia de disponibilidad de glucosa. *LKB1* también está implicada en la polaridad celular y en el mantenimiento de la entidad de tejido de las células (Clevers H.). El descubrimiento de la inactivación genética de *LKB1* y, por lo tanto, su papel como gen supresor tumoral en el cáncer de pulmón, se desveló mediante el descubrimiento de que las pérdidas de heterocigosidad en el cromosoma 19p13 eran muy frecuentes en este tipo de cáncer. Tal y como se ha comentado anteriormente, este hecho indica la presencia de un gen supresor tumoral en la región. El análisis en detalle de la región, mediante marcadores de microsatélites, permitió identificar a *LKB1* como uno de los genes supresores tumorales diana. Posteriormente, un análisis más pormenorizado mostró que *LKB1* presentaba mutaciones bialélicas inactivantes entre 30-50% de adenocarcinomas de pulmón de origen esporádico (Sanchez-Cespedes, Parrella et al. 2002). Más allá de *LKB1*, los altos porcentajes de pérdida de heterocigosidad del brazo 19p13, superiores al 75%, hacen pensar que dicho brazo cromosómico podría albergar otros genes supresores tumorales.

En este contexto, el gen *BRG1*, también denominado *SMARCA4*, situado en la región cromosómica 19p13, es un candidato gen supresor tumoral por varias razones que se comentan más adelante, entre ellas que se han identificado mutaciones inactivadoras de *BRG1* en varias líneas celulares, incluyendo algunas de cáncer de pulmón (Wong, Shanahan et al. 2000). Dado que *LKB1*, por sí solo, no explica la frecuencia tan elevada de LOH en el cromosoma 19p, es muy probable que esta región incluya otros genes supresores tumorales adicionales. En este contexto, *BRG1* resulta un buen candidato a ser analizado en profundidad.

BRG1 y los complejos remodeladores de cromatina

BRG1 está situado en la región cromosómica 19p13 y codifica para una enzima de 198 kDa, conocida como BRG1. La proteína BRG1 es un componente fundamental de diferentes complejos remodeladores de cromatina conocidos como SWI/SNF. Estos complejos reciben su nombre del análisis de mutantes realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson et al 1981). El primer mutante, que recibió el nombre de SNF (del inglés, *Sucrose Non Fermenting*), era necesario para la expresión de *SUC2*, un gen que participa en el metabolismo de la sacarosa. El segundo mutante identificado, denominado SWI, era necesario para el “encendido” (SWI, del inglés *Switching*) de los genes de procesos de diferenciación en levaduras. Posteriormente, se fueron identificando nuevos miembros del complejo, así como complejos homólogos, en levadura y en otros organismos como *Drosophila melanogaster*, que tenían una actividad bioquímica similar. Entre ellos, está el complejo RSC, en levadura, que controla aproximadamente el 7% del genoma de este organismo (Cote et al 1996), y los complejos BAP y PBAP, en *Drosophila*, que son capaces de regular la expresión de entre el 1% y el 2% de su genoma (Sudarsanam et al.2000).

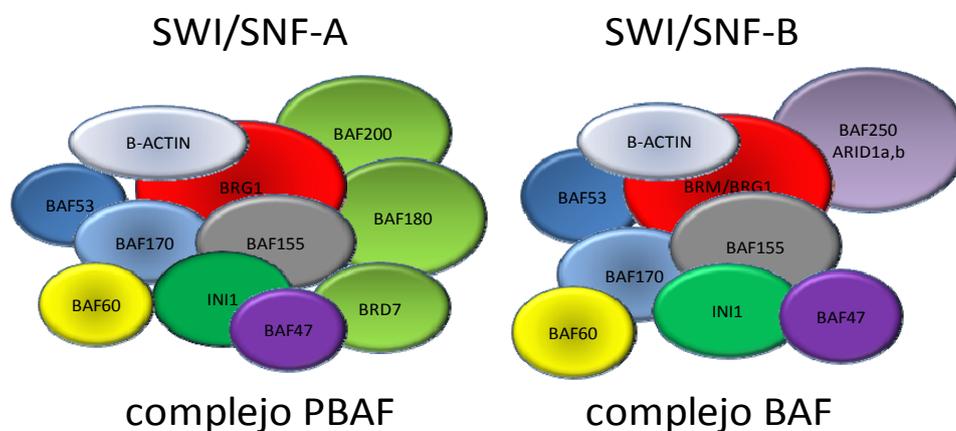


Figura 1.4: Representación de la composición de elementos de los diferentes complejos SWI/SNF en mamífero

En mamíferos se han identificado dos grandes complejos multiproteicos, con un peso aproximado de 2 MDa, el complejo BAF (del inglés, *BRG1 Associated Factors*), también llamado SWI/SNF-A y el PBAF (del inglés, *polybromo-BRG1 Associated Factors*), también llamado SWI/SNF-B. Ambos complejos comparten una serie de proteínas, como BAF170, BAF155, BAF60, BAF57, BAF53 y BAF45. La denominación de estas proteínas como BAF, proviene del inglés *BRG1 associated factors*, seguido de un número, que indica el peso molecular. Además, está SNF5 (también conocida como BAF47) que junto con β -actina, cerrarían el principal grupo de elementos comunes en ambos complejos (Reisman et al.2009; Wilson and Roberts 2011). Entre la composición proteica de los complejos BAF y PBAF existen algunas diferencias, aunque la principal radica en la ATPasa, que cataliza la actividad remodeladora del complejo. Así pues, mientras que en el caso de BAF ó SWI/SNF-A, la ATPasa puede ser indistintamente BRG1 ó BRM, en el caso de PBAF ó SWI/SNF-B la ATPasa principal es siempre BRG1. Las ATPasas BRG1 y BRM son dos proteínas que comparten entre ellas una homología del 74% de su secuencia (Khavari et al. 1993). Ambas proteínas tienen hasta seis dominios en común, dominio QLQ de interacción proteína-proteína, dominio rico en prolinas, dominio HSA (que contiene una helicasa asociada a un dominio SANT de unión a DNA), dominio ATPasa de unión e hidrólisis de ATP (que sirve como motor para la actividad remodeladora del complejo), dominio de unión a RB y, por último, el bromodominio, a través del cual ambas proteínas reconocen marcas de acetilación en las colas de las histonas (Winston et al. 1999). Entre los complejos BAF y PBAF, existen otras particularidades y diferencias. El complejo BAF en el que la ATPasa podría ser BRG1 ó BRM, se asocia con otros miembros conocidos como las proteínas

BAF250, codificadas por los genes *ARID1A* y *ARID1B*. Ambas proteínas son intercambiables entre sí y no se acomplejan a la vez, es decir cuando BAF250-A está en el complejo no está BAF250-B y viceversa. Por otro lado, en el complejo PBAF, donde la ATPasa principal es BRG1, contiene hasta tres miembros adicionales: BAF180, codificada por el gen *PBRM1*; BAF200, codificada por el gen *ARID2*, y la proteína BRD7 (Reisman et al.2009; Wilson and Roberts 2011). Además, añadiendo si cabe más complejidad, han sido descritos otros complejos remodeladores de cromatina, como el WINAC, donde BRG1 y, en menor medida, otros miembros de los complejos SWI/SNF, se acompleja con el factor de transcripción del síndrome de *Williams* (WSTF), junto con otras proteínas que participan en la replicación del DNA y la elongación durante la transcripción. También se ha descrito el complejo NUMAC que, además de BRG1, contiene una arginina-metiltransferasa, CARM1, que actúa como activadora modificando la metilación en residuos de histonas. Además en este complejo se asocia el receptor de estrógenos, ER, que cooperaría activando la transcripción de dianas específicas.

Interesantemente, BRG1 se ha asociado también a la represión transcripcional, ya que se ha identificado la presencia de BRG1, junto con otros miembros de los complejos SWI/SNF, en dos complejos represores de la transcripción que actuarían, junto con la proteína KAP1 ó MSIN3A, reclutando deacetilasas de histonas. Estos complejos represores son NcoR (del inglés *Nuclear Receptors Corepressors*) donde BRG1 se asociaría con la proteína HDAC3 deacetiladora de histonas y con KAP1 y el complejo mSin3A/HDAC donde se acomplejan las histona deacetilasas HDAC1 y HDAC2 junto con MSIN3A (Reisman et al.2009: Trotter et al. 2008).

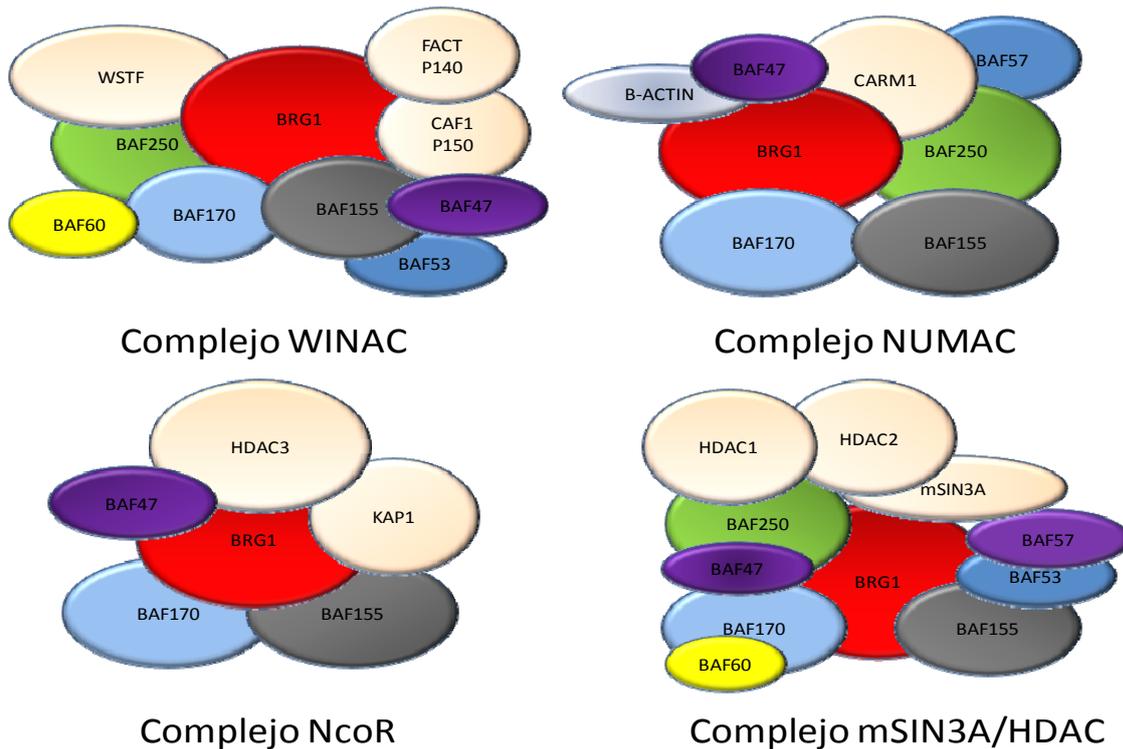


Figura 1.5: Representación de diferentes complejos remodeladores de cromatina que contienen a BRG1 como ATPasa principal.

En los tejidos adultos sanos, durante el desarrollo embrionario y en los múltiples procesos de diferenciación, la función de estos complejos remodeladores de cromatina es la de facilitar el acceso de múltiples factores de transcripción a las regiones reguladoras de sus genes diana. Este proceso es llevado a cabo por los complejos SWI/SNF, que desplazan mecánicamente los octámeros de histonas. Esta actividad motora del complejo tiene un requerimiento energético y produce un gasto de ATP, hidrólisis que es llevada a cabo por BRG1 en ambos complejos ó también BRM en el caso del complejo BAF. El mecanismo de desplazamiento de los nucleosomas es llevado a cabo de dos maneras: 1) mediante deslizamiento (del inglés, *Sliding*), donde los complejos se unen a una posición fija de un nucleosoma, seguidamente se produce una disrupción del DNA-histonas y, a continuación, se va propagando una horquilla de DNA, donde los factores de transcripción tienen entonces acceso libre para la unión a sus zonas

promotoras específicas (Saha A. et al. 2006 Lorch, Y. et al. 2010) y 2) la eyección directa de un nucleosoma, un mecanismo que aún no está completamente elucidado donde los complejos SWI/SNF, uniéndose a un nucleosoma concreto y asistidos por proteínas chaperonas de histonas, hacen saltar el nucleosoma adyacente y lo sustituirían reposicionando aquel unido previamente por el complejo (Dechassa, M.L. et al. 2010).

BRG1 en el desarrollo del cáncer

Al inicio de este trabajo de tesis existían ciertos indicios de que el complejo SWI/SNF podría estar implicado en el desarrollo tumoral. Por una parte, y desde el punto de vista genético, se habían descrito alteraciones genéticas del gen *SNF5*, conocido también como *INI1*, en algunos tipos de cáncer. Este gen se encuentra inactivado por mutaciones bialélicas en el 98% de los tumores rhabdoides, una forma muy agresiva de tumores del sistema nervioso, especialmente frecuentes en niños (Versteeg, I. et al 1998). Además, *INI1* está mutado en el 40% de familias con schwannomatosis, el 50% de los sarcomas epitelioides, el 30% de sarcomas poco diferenciados, el 8% de los condrosarcomas myxodes extra esqueléticos y el 4% de los hepatoblastomas (Trobaugh-Lotario et al 2009; Kohashi et al 2008). Además, pérdidas de expresión de BRG1 y de BRM ha sido descrita en líneas celulares y tumores primarios de distintos tipos de cáncer. En el caso de BRG1, un trabajo muestra la inactivación completa del gen *BRG1* en algunas líneas celulares de cáncer, que incluye líneas de cáncer de pulmón (Wong, Shanahan et al. 2000) y otro trabajo muestra mutaciones en tumores primarios de pulmón (Medina P.P. et al 2004), aunque la frecuencia de mutaciones en *BRG1* descrita en ambos trabajos es realmente baja. Por otra parte, los modelos de ratón también apoyan el papel de BRG1 en el desarrollo tumoral, aunque no así de BRM. Los ratones heterocigotos para *Brg1* (*Brg1*^{+/-}) tienen un riesgo mayor de desarrollar tumores de mama (Bultman S.J. et al. 2008) que los individuos control, mientras que los homocigotos de *Brg1* (*Brg1*^{-/-}) son letales embrionarios, más allá de la 4 división del cigoto. Por otro lado, los ratones homocigotos para *Brm* (*Brm*^{-/-}) son individuos viables cuya única característica es un peso un 15% más elevado que los individuos control (Reyes, J.C. et al. 1998) y una expresión independiente de andrógenos en la próstata (Shen, H. et al. 2008). Además, en el caso de BRM, la ausencia de expresión en el cáncer no ha podido ser asociada a mutaciones en el gen, aunque no se puede descartar una su inactivación de naturaleza epigenética. En conjunto, estas diferencias entre BRG1 y BRM sugieren que el estudio de BRG1, y no tanto de BRM, tiene interés desde el punto de vista del desarrollo tumoral. Todas estas diferencias entre BRM y BRG1 son particularmente interesantes, porque aunque desde un principio dada su alta homología y función se les

consideró como elementos con actividad redundante, estos trabajos muestran lo contrario. Ahora se sabe que, si bien ambas moléculas pueden ser cooperativas o intercambiables en un cierto contexto, el resultado de la pérdida de su actividad es radicalmente distinto (Kadman, S. et al. 2003).

Los complejos SWI/SNF regulan la transcripción a través de su capacidad para remodelar la cromatina. A través de esta actividad, estos complejos controlan una amplia variedad de procesos fisiológicos y celulares muy importantes. Desde el punto de vista funcional, existen numerosos estudios que implican a los complejos remodeladores de cromatina en el control de la diferenciación y la entidad celular específica de linaje, circunstancia que en los tumores se ve seriamente comprometida (Lickert et al 2004; Lessard et al 2007; Ho et al 2009). Así por ejemplo, en el plano de la regulación de la diferenciación, se ha demostrado que la actividad de BRG1 es necesaria para la diferenciación de los osteoblastos, mientras que BRM, por el contrario, inhibe tal proceso (Flowers, S. et al. 2009). Los complejos SWI/SNF también están implicados en la regulación de los procesos inflamatorios, la respuesta inmunológica y el desarrollo embrionario temprano (Hendricks et al, 2004; Kwon et al, 2007). Más recientemente, se ha demostrado que los complejos SWI/SNF que contienen BRG1, los PBAF, participan en los procesos de reprogramación de células somáticas (Singhal et al, 2010). El control ejercido por BRG1 en algunos de estos procesos está íntimamente relacionado con su interacción con receptores hormonales para la regulación de promotores en respuesta a hormonas lipídicas. Se han descrito algunos componentes específicos de los complejos SWI/SNF vinculados a varios receptores nucleares como los receptores de estrógenos, de progesterona, de glucocorticoides, de ácido retinoico y de vitamina D3 (Chiba et al, 1994; Fryer et al, 1998; Hsiao et al, 2003; John et al, 2008). Los complejos SWI/SNF, al interactuar con estos receptores nucleares y factores de transcripción, facilitan la regulación de la transcripción en promotores específicos (Peterson et al, 1994; Medina et al, 2005). Además, se ha descrito que BRG1 se une o regula la actividad de otras proteínas implicadas en el desarrollo del cáncer, como el BRCA1, β -CATENINA, LKB1, FANCA, MYC y RB (Medina & Sánchez-Céspedes, 2008).

Represión de la transcripción

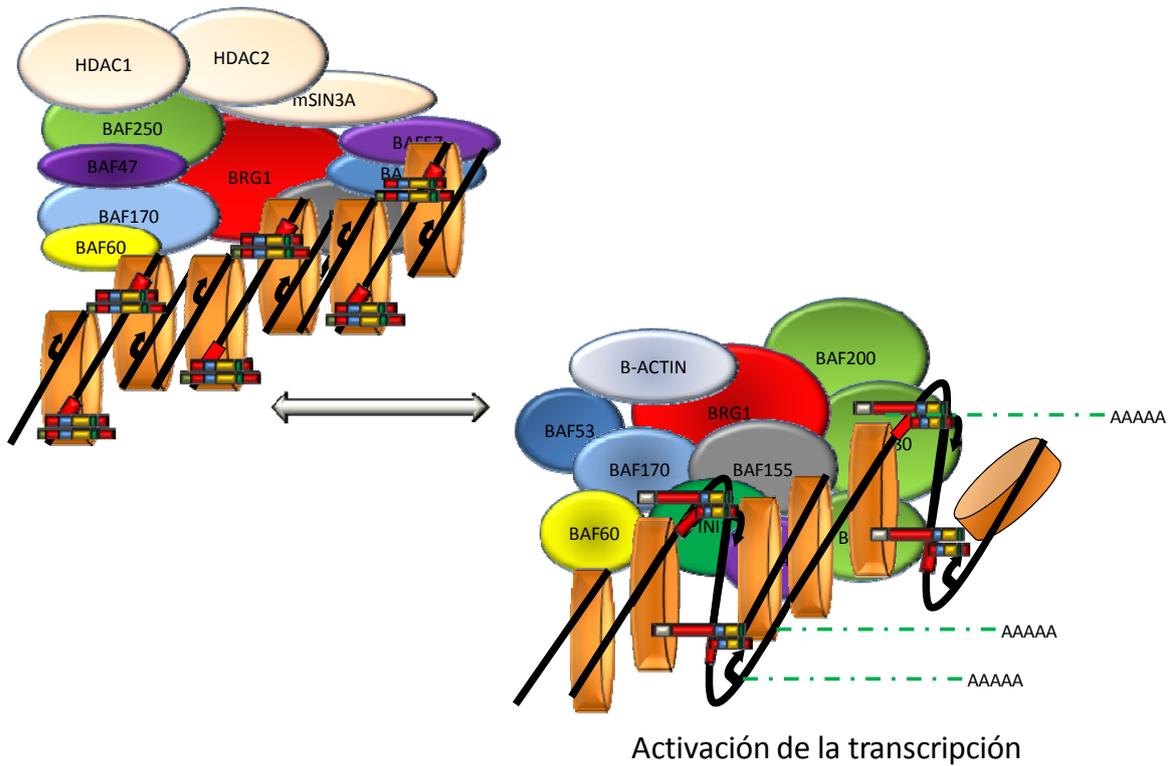


Figura 1.6: Figura representativa de la actividad de dos de los complejos que dependen de la actividad de BRG1 como: Co-represores generales de la transcripción (mSIN3A/HDAC), arriba. Donde inhiben el acceso al DNA a factores de transcripción, modificando residuos en histonas y cerrando la cromatina y co-activadores generales de la transcripción (SWI/SNF-A PBAF), abajo, que modifican la posición de los nucleosomas dando acceso a factores de transcripción al DNA desnudo.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos del presente trabajo de tesis son los siguientes:

1.- Análisis mutacional del gen *BRG1/SMARCA4*, componente de los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF en cáncer de pulmón:

- Estudio de los mecanismos genéticos, así como la frecuencia de inactivación del gen *BRG1* en líneas de cáncer de pulmón
- Estudio del contexto histopatológico y genético en el que se presentan las alteraciones en *BRG1*, incluyendo la coexistencia con alteraciones en otros importantes genes supresores u oncogenes potencialmente relacionados con *BRG1*

2. Análisis de la firma de expresión génica, dependiente de la actividad de BRG1:

- Generación de modelos que recuperan la expresión de BRG1 de forma estable en líneas celulares de cáncer deficientes para el mismo.
- Análisis de los cambios de expresión global mediante el uso de microarrays de expresión.
- Identificación de potenciales dianas transcripcionales cuyos promotores estén regulados directamente por BRG1, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

3.- Estudio de los potenciales cambios fenotípicos provocados por la recuperación de la función de BRG1:

- Cultivos de líneas de cáncer de pulmón con y sin expresión de BRG1 y posterior análisis de su comportamiento mediante el estudio de su velocidad de crecimiento, alteraciones en la capacidad de formación de colonias y análisis de los posibles cambios morfológicos
- Inhibir la expresión de BRG1 mediante el uso de RNAs interferentes en líneas celulares que expresen BRG1 salvaje y posterior análisis de su comportamiento mediante el estudio de su velocidad de crecimiento, alteraciones en la capacidad de formación de colonias y análisis de los posibles cambios morfológicos
- Recuperación de la expresión de BRG1 *in vivo*, mediante el uso de modelos animales con el fin de poder estudiar los potenciales efectos en un contexto más próximo a las condiciones fisiológicas del cáncer de pulmón.

MATERIALES Y METODOS

Líneas celulares y extracción de ácidos nucleicos

La líneas celulares se adquirieron a través la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) y se cultivaron bajo las condiciones recomendadas por el proveedor, manteniéndose en atmósfera húmeda a 37 °C con un 5% de CO₂. Todas las células fueron testadas y resultaron negativas para infección por micoplasma. El DNA fue extraído usando los protocolos estándar de proteinasa K/alcohol isoamilico. El RNA se extrajo de las líneas celulares usando el kit de RNeasy kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Durante el proceso se usó la nucleasa RNase-free DNase I (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) para eliminar posibles interferencias con el DNA. Para comprobar que el RNA extraído no había sufrido degradación durante el proceso de extracción, se realizó una electroforesis con 1µg del RNA obtenido.

Estudio mutacional de BRG1: PCR y secuenciación directa.

En el estudio genético se incluyeron un total de 59 líneas de cáncer de pulmón. El análisis y la búsqueda de mutaciones en la secuencia codificante de *BRG1* fue llevada a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) utilizando el cDNA de dichas líneas como molde para la amplificación de los productos específicos de BRG1. El RNA total de las células fue obtenido mediante la utilización del kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA) utilizándose Trizol como reactivo de extracción (LifeTechnologies, Inc., Grand Island, NY), seguidamente del kit de RNeasy y a continuación se digirió con DNasa libre de RNasa siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una pequeña alícuota del RNA fue separada y se usó para cuantificación y control de calidad. La retrotranscripción del RNA para la obtención del cDNA, fue llevada a cabo con 1ug de RNA siguiendo el protocolo del fabricante (Superscript II RT; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para la localización de las mutaciones se utilizó como secuencia de referencia RefSeq mRNA sequence NM_003072.2. Todos los cambios detectados en el cDNA fueron confirmados en el DNA genómico de dichas líneas, utilizando como secuencia de referencia *Homo sapiens* chromosome 19 reference assembly NC_000019.8. Para la numeración de las alteraciones a lo largo de la secuencia codificante de BRG1, la A del codón de inicio ATG fue considerada como +1. La secuenciación de los productos de PCR fue llevada a cabo mediante el uso de Big Dye Terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA) y secuenciadas con ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Perkin Elmer LifeSciences, Inc., Boston, MA). Todas las variantes encontradas fueron confirmadas por re-secuenciación independiente de productos de PCR, la secuencia de los cebadores usados para DNA genómico fueron previamente descritos por (Medina et al., 2004).

Las mutaciones y deleciones encontrada en *LKB1/KRAS* (exón1), *TP53* (exón 5-8), *NRAS* (exón 1) y *P16/INKA4A* (exones 1 y 2) fueron llevadas a cabo por PCR directa y secuenciación automática o extraídas de publicaciones previas (Sanchez-Cespedes et al. 2002). El estudio de la hipermetilación del promotor de *P16/INKA4A* se obtuvo mediante protocolos previamente descrito (Sánchez-Céspedes et al., 2002). La información sobre el estado de mutaciones de *RB* fue extraído de publicaciones previas (Yokota et al.1988) o de bases de datos públicas (www.sanger.ac.uk).

Análisis en el número de copias de los genes de la familia MYC; PCR cuantitativa a tiempo real.

Para la determinación del número de copias de *MYC* se utilizó SYBR green mediante PCR a tiempo real sobre DNA genómico (Applied Biosystems), utilizando primers específicos para los genes *C-MYC*, *N-MYC* y *L-MYC*. Las reacciones se hicieron por triplicado usando el secuenciador ABI Prism 7900 Sequence detector (Applied Biosystems). El criterio utilizado para considerar presencia de amplificación de *MYC* en cada línea celular tuvo en cuenta que el número de copias relativas de cada uno de los genes *MYC* fuera, al menos, 10 veces superior en relación con los otros genes *MYC*, utilizados como control, ya que está descrito que las alteraciones en los genes *MYC* nunca ocurre de forma coincidente en los tumores.

Tratamientos

Para el tratamiento con dexametasona (DEX) y ácido-trans-retinoico (RA), las células fueron sometidas a una privación del suero fetal bovino (FBS), siendo éste sustituido por suero especial libre de hormonas (*Charcoal-dextran stripped serum*), filtrado con carbono activo, durante 24 horas previas al tratamiento hormonal (Johnson et al. 2008). Para el tratamiento con DEX, tras la sustitución del suero las células fueron tratadas durante diferentes periodos de tiempo, que oscilaron entre 24-72 horas, en función de cada experimento, con una concentración de 1µM de DEX disuelta en agua. Igualmente, para el tratamiento con RA, tras la sustitución del suero, se trataron las células durante diferentes periodos de tiempo entre 12-72 horas, según experimento, con 0,25, 0,50 ó 1µM de RA disuelto en DMSO, como vehículo, o en un volumen equivalente de DMSO, como control. Después de cada tratamiento, las células fueron recogidas y se extrajo el ARN y las proteínas totales para su análisis.

Ensayo de luciferasa

Para los ensayos de transactivación de la luciferasa se utilizó una construcción que contenía el promotor de respuesta a glucocorticoides MMTV (del inglés, *Mouse Mammary Tumoral Virus*), precediendo al gen de la luciferasa, que se utilizó como gen reportero. El plásmido PRSV-GR, que contiene clonado el receptor de glucocorticoides y las construcciones pcDNA4/TO, conteniendo varias versiones mutantes de BRG1 (668-758Δ, W764R), el mutante K798R, en el que se ha demostrado la falta de actividad del dominio ATPasa (Pattenden et al., 2002) y la versión salvaje de BRG1. La línea NCI-H1299, mutante para *BRG1* (Wong et al. 2000) fue cultivada en medio libre de hormonas, con *Charcoal-dextran stripped serum*, como suero de sustitución y transfectadas conjuntamente con diferentes combinaciones de las construcciones anteriores, junto con el plásmido RENILLA como control de la eficiencia de transfección, en presencia o ausencia de 1μM de DEX. Tras 12, 24 y 48 horas de exposición a DEX y tras la recuperación de la expresión de BRG1, se utilizó el Kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* de PROMEGA para la extracción, lisado y cuantificación de la luminiscencia de las diferentes muestras. Las mediciones se llevaron a cabo, por triplicado técnico utilizando el luminómetro GLOMAX *Multy detection system*, de PROMEGA.

Vectores de expresión de BRG1

Para generar las diferentes construcciones, la secuencia salvaje completa de *BRG1* fue clonada entre los sitios de restricción EcoRV y XbaI del poli-linker del vector pcDNA4/TO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias de los diferentes mutantes se obtuvieron al sustituir, directamente mediante digestión y religación de la región salvaje equivalente en la secuencia clonada, por la versión mutada de la misma región, obtenida mediante PCR de las líneas de cáncer de pulmón portadoras de las mismas. Las secuencias de todos los vectores clonados fueron verificadas por secuenciación automática. Para transfecciones y reexpresión transitoria de BRG1 y de sus versiones mutantes (668-758Δ y W764R) se utilizó el reactivo de transfección *Transfast* (Promega, WI), siguiéndose las recomendaciones del fabricante.

Para la generación de las líneas estables e inducibles de BRG1, H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, se utilizó el modelo Tet-ON, mediante el sistema *T-rex* (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene el plásmido *Tet-repressor* que codifica para la proteína tetR, proteína que se une y bloquea la expresión del promotor fuerte del citomegalovirus (CMV) contenido en el plásmido pcDNA4/TO (Invitrogen, Carlsbad, CA) en el que se clonaron las diferentes versiones de BRG1. La proteína tetR es susceptible de ser modificada, en presencia de doxiciclina, cuando ésta es añadida al medio de cultivo, produciéndose un cambio conformacional en la

proteína tetR, dicho cambio provoca la liberación de la proteína tetR del operador Tet del vector pcDNA4/TO, permitiéndose así, la reexpresión de las proteínas clonadas en este vector. La línea H1299 fue co-transfectada con el plásmido *Tet-repressor* y los vectores pcDNA4/TO-BRG1Wt y pcDNA4/TO-BRG1Mut que contienen la secuencia salvaje (Wt) o mutante (668-758Δ) de BRG1. Las células transfectadas fueron cultivadas y seleccionadas mediante doble selección antibiótica contenida en ambos vectores (zeocina 0.2mg/ml e higromicina B 0.2mg/ml). Las colonias individuales fueron recogidas y analizadas para la expresión inducible de BRG1 por western-blot, tras inducir los cultivos con 2ng/ul de doxiciclina. Para evitar un posible sesgo, relacionado con la selección clonal, que podría afectar al análisis, tres clones de cada cultivo, H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, se combinaron para obtener las líneas celulares H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut. Para generar las líneas estables verdes, H1299tr-BRG1wt y rojas, H1299tr-BRG1mut, las células fueron transfectadas con los vectores pEGFP/C1 y Pires-Red2 (Clontech BD, Mountain View, CA), que codifican la secuencia de expresión de las proteínas fluorescentes GFP (verde) y mRFP (rojo), respectivamente.

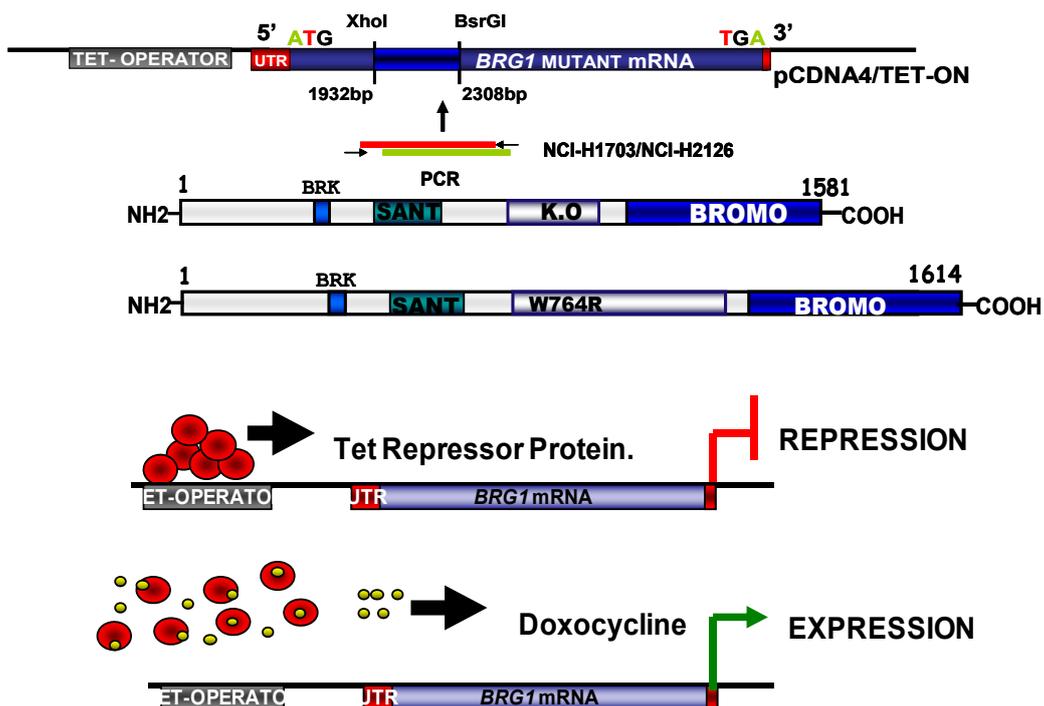


Figura 2.1: Esquema del diseño experimental llevado a cabo para el clonaje y reexpresión inducible de BRG1 y sus variantes mutadas, en el modelo de carcinogénesis pulmonar.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo tras el mantenimiento de las células en diferentes condiciones de cultivo (10% suero fetal bovino, medio condicionado con dexametasona, y medio condicionado con ácido retinoico). Las células fueron fijadas, añadiendo al medio de cultivo 1% de PFA (paraformaldehído) durante 10 min, el pellet celular fue lisado y sonificado a diferentes tiempos y en diferentes condiciones, eligiéndose como condición final aquella en la que se obtuvo una mayor cantidad de fragmentos de cromatina de tamaño homogéneo de alrededor de 500-pb, sin separar el DNA de las proteínas, y de alrededor de unas 250-pb, tras desentrecruzar el DNA y las proteínas. Para cada análisis se llevaron a cabo por lo menos dos experimentos biológicamente independientes, en los que se indujo la re-expresión de BRG1.

Para la precipitación de BRG1 y MYC se utilizaron los anticuerpos específicos anti-BRG1 H88 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anti-C-MYC N262 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Como control de la especificidad de la precipitación se utilizó en paralelo, en las mismas muestras testadas, una inmunoglobulina de conejo no inmunizado. Tras la precipitación de ambas proteínas, se separó el DNA de las proteínas y el DNA obtenido fue aislado y purificado por separación de fases utilizando fenol: cloroformo: isoamyl:alcohol. El análisis y cuantificación del enriquecimiento en la ocupación de ambas proteínas en los promotores y zonas de interés de las diferentes dianas transcripcionales se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando *primers* específicos y utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Todos los análisis de PCR cuantitativa se realizaron por triplicado y, posteriormente, los principales resultados se corroboraron mediante PCR semi-cuantitativa, amplificando los productos a diferentes ciclos, entre 25 y 35 ciclos, según la diana analizada y resolviendo los productos en un gel de agarosa al 2% en TBE.

Infección lentiviral

Los lentivirus utilizados fueron generados en la línea celular empaquetadora 293T. Para la formación de los viriones la línea fue cotransfectada con una mezcla de tres plásmidos diferentes. Dos de ellos codificaban para elementos propios de la estructura y envoltura de los lentivirus, psPAX y pMD2.6 (Sigma-MISSION™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El tercer plásmido consistió en cinco versiones diferentes del plásmido pLKOshBRG1, portadores de cinco shRNAs específicos contra BRG1 y, adicionalmente, un pLKO*scramble* que no provoca ninguna interferencia específica y que se utilizó como control. Los diferentes shRNAs contra BRG1 y el pLKO*scramble* fueron adquiridos a Sigma-MISSION™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después

de 48-72 horas tras la co-transfección, los diferentes sobrenadantes de la línea 293T portadores de los viriones fueron recogidos, filtrados mediante un filtro con un tamaño poro de 0.45µM y se utilizaron como medio de cultivo para las líneas celulares, SH-SY5Y Y H446 durante 24-48 horas adicionales. Después de la infección lentiviral, las poblaciones de las diferentes líneas celulares fueron seleccionadas con 0.4mg/ml de puomicina hasta establecer clones resistentes.

Para el análisis de interferencia de BRG1, se analizaron los niveles de expresión en los diferentes clones de las líneas H446 y SH-SY5Y, mediante PCR cuantitativa y western-blot. Aquellos clones de los diferentes shRNAs que presentaron menor expresión de BRG1 fueron crecidos y cultivados en conjunto, estableciendo así, diferentes líneas interferidas para BRG1 de forma estable. De las cinco líneas establecidas, se utilizaron como modelos experimentales al menos aquellas dos poblaciones derivadas de shRNA diferentes que suprimían más fuertemente la expresión de BRG1, junto con la población infectada con el pLKO*scramble*.

Anticuerpos, western blots, inmunofluorescencias e inmunohistoquímica.

Para las técnicas de western-blot, CHIP e inmunofluorescencia se utilizaron una batería de diferentes anticuerpos específicos, conejo anti-BRG1 H88 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), ratón anti-C-MYC 9E10 y conejo anti-C-MYC N262 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), ratón anti-tubulina (T6199 mouse, Sigma Aldrich), anti-phalloidina (Alexa Fluor 647, 1:200 dilución. Invitrogene), anti-hBRM (BRM N-19, Santa Cruz Biotechnology CA, EE.UU.), anti-GR (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz), CA anti-Beta-ACTIN (13854, Sigma Aldrich). Para el western-blot, las células fueron recogidas directamente de las placas de cultivo en tampón de lisis, para proteínas. Las muestras fueron desnaturalizadas, sonicadas y tratadas con un agente reductor (DTT ó β-mercaptoetanol). Para la resolución y detección de los niveles de expresión de proteínas, un total de 50 mg de proteína se separaron por SDS-PAGE, y transferidas a una membrana PVDF. Los anticuerpos secundarios utilizados para el Western-blot fueron: cabra- anti-ratón IgG conjugado con HRP (del Ingles horse radish peroxidase) y cabra anti-conejo conjugado con HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos se utilizaron a una dilución final de 1:5000. Para los ensayos de inmunofluorescencia, los clones estables e inducibles para BRG1 salvaje y su versión mutante (668-758Δ) se cultivaron sobre un cubreobjetos. Tras la inducción de la expresión de BRG1 y/o los diferentes tratamientos hormonales, los cubreobjetos fueron fijados con un 4% de PFA (paraformaldehído). Las preparaciones se lavaron en PBS y se bloquearon con 2% BSA/0.1% Tritón X-100 en PBS. Para la detección y localización de las diferentes proteínas se utilizaron

anticuerpos secundarios Alexa 568 and Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregón, USA) a 1:200. Todas las preparaciones se montaron con medio de montaje DePeX (BDH suministros de laboratorio, Poole, UK).

La inmunohistoquímica de MYC y BRG1 se realizó sobre cortes histológicos de 5 micras de grosor de tumores embebidos en parafina. Los tejidos fueron des-parafinados e hidratados siguiendo un protocolo estándar, utilizando Xilol y una batería de alcoholes de 100% 96% 80% y 70% respectivamente. Para la detección específica de las proteínas se utilizó el kit de inmunohistoquímica (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados fueron anti-BRG1 H88 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anti-C-MYC N262 (1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Tras el proceso de detección específica, los tejidos fueron deshidratados nuevamente, teñidos con hematoxilina y preparados en medio de montaje DePeX (BDH suministros de laboratorio, Poole, UK), para su análisis bajo microscopio.

Análisis de expresión génica global con microarrays de de expresión.

Para el análisis de microarrays de expresión génica, se extrajo 1 µg de RNA total de cada muestra (H1299tr-BRG1Mut y H1299tr-BRG1Wt a las 6, 12 y 24 horas con y sin inducción de BRG1 ó su versión mutante, por doxiciclina). Como control de calidad se midió la integridad del RNA y se observó que el número R.I.N (del inglés, *RNA integrity number*) se encontraba en el rango de 9,0 a 10,0, el máximo posible, utilizándose para dicha medición la tecnología Lab-chip en el Agilent 2100 Bioanalyzer. Como muestras de referencia para la hibridación y el análisis de expresión génica se utilizaron las mismas líneas celulares, H1299tr-BRG1Mut y H1299tr-BRG1Wt, antes de la inducción de la expresión de BRG1 con doxiciclina. Para el marcaje de las muestras de RNA con diferentes fluorocromos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo) se utilizó la versión 5.5 del kit comercial y se siguieron las instrucciones del fabricante (manual de Agilent G4140-90050 de febrero de 2007). El marcaje con Cy3 se utilizó para las muestras referencia (RNA de las células H1299tr-BRG1Wt y H1299tr-BRG1Mut no inducidas con doxiciclina), mientras que el marcaje con Cy5 se utilizó en el RNA de las mismas líneas tras la inducción con doxiciclina (tras la recuperación de la expresión de BRG1 ó su versión mutante). La hibridación competitiva de los diferentes grupos de muestras marcadas con los fluorocromos Cy3 y Cy5 se realizó en la plataforma de expresión humana 4x44K (Agilent microarrays ID014850, P/N G4112F). Para el análisis de la señal de fluorescencia se utilizó un escáner de microarrays de DNA G2505B (Agilent). Las imágenes fueron cuantificadas mediante el software de extracción de Agilent (ver. 9.5). La intensidad de fluorescencia de cada elemento de la matriz del array se sustrajo

del fondo local mediante filtrado de la señal y la normalización de datos se realizó como se describió previamente (Medina et al., 2005). Posteriormente, tras el análisis técnico y la normalización de los datos de expresión, fueron seleccionados los genes que cumplieron con los criterios siguientes: i) no cambiaban su expresión en los clones que recuperaban la expresión de BRG1 mutante, ii) aumentaban o reprimían su expresión por lo menos una vez y media (1.5 veces) tras la recuperación de la forma salvaje de BRG1 en comparación con el mutante y iii) aumentaron su expresión, o fueron reprimidos, en al menos dos puntos diferentes a lo largo del tiempo entre las 6, 12 y 24 horas.

RT-PCR cuantitativas a tiempo real

Para confirmar los cambios de expresión de las dianas seleccionadas se extrajo el RNA total de las muestras y se sometió a transcripción reversa para convertir el RNA en cDNA, mediante el uso del Kit SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se utilizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), utilizando SYBR green y primers específicos en el detector de secuencias ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Las reacciones se realizaron por triplicado técnico y biológico. Como genes control se utilizaron *GUSB* y β -*ACTINA*.

Ensayo de formación de colonias

Para los ensayos de formación de colonias se utilizaron los vectores de expresión pcDNA4/TO-BRG1wt y pcDNA4/TO-BRG1mut. Se sembraron, por separado, alrededor 150.000 células de las líneas de cáncer de pulmón H1299, H23 y A549 en cada placa de 60 mm de diámetro, con los medios de cultivo DMEM ó RPMI con 10% (v/v) de suero fetal bovino. Veinticuatro horas después de ser sembradas, las células fueron transfectadas con ambos vectores utilizando el reactivo de transfección *Transfast* (Promega, WI) y sometidas a presión antibiótica por adición de 0.2mg/ml de Zeocina en el medio de cultivo. Tras dos semanas de cultivo, las células fueron teñidas con Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y el número de colonias fue contado, *de visu*. Cada ensayo se realizó por triplicado, y el número final de colonias, así como las diferencias entre los diferentes puntos fue promediado entre los triplicados biológicos.

Generación de cultivos fluorescentes y análisis de citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando el FACS Aria del sistema clasificador de células (Becton Dickinson). Las líneas celulares H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, fueron transfectadas con dos vectores que codificaban para las proteínas GFP para marcar H1299tr-BRG1wt y mRFP para marcar la línea H1299tr-BRG1mut. Tras la transfección, las células se

mantuvieron en cultivo y se seleccionaron por intensidad de fluorescencia, mediante el FACSaria, por tres veces, una vez cada 15 días, mientras se seguían manteniendo las células en cultivo con el fin de aislar y estabilizar las poblaciones fluorescentes. El recuento de células se llevó también a cabo con el FACSaria del sistema clasificador de células (Becton Dickinson). Para ello se cultivaron conjuntamente ambas poblaciones fluorescentes, a partes iguales, y después fueron inducidas para la recuperación de BRG1 y tratadas con diferentes medios condicionados, con 10% de suero fetal bovino, con medio condicionado con ácido retinoico, condicionado con dexametasona o la combinación de ambos. El total de eventos de cada muestra fueron analizados por triplicado. Para garantizar la homogeneidad de las medidas, se contaron todos los eventos de las poblaciones verde y roja, en cada una de las muestras mixtas de los cultivos condicionados, recogidas en el mismo volumen de PBS/EDTA 2 mM, contabilizadas durante el mismo tiempo. Se aplicó una corrección para garantizar que la fluorescencia de color rojo detectada interfiriera de forma mínima en la fluorescencia verde de GFP, según las recomendaciones del fabricante. Todos los datos primarios se procesaron a través de la versión 6.1.2 del software BDFACS Diva.

Modelos murinos: xenográfico y ortotópico

Para los experimentos *in vivo* se emplearon machos de ratones atímicos de la cepa *nu/nu* de 4-5 semanas de vida, los animales fueron mantenidos siempre en un ambiente estéril. El diseño experimental y los procedimientos de manipulación y sacrificio de los animales, fue aprobado por el comité del servicio del animalario del IDIBELL. Para la generación de los tumores, un total de 2×10^6 células de las líneas celulares H1299tr-BRG1mut y H1299tr-BRG1wt fueron ortotópicamente inyectadas en el pulmón de los ratones. A los animales incluidos dentro del grupo control se les abasteció con agua con un 1% de glucosa, mientras que a los animales tratados se les incluyó en el agua de bebida, 1% de glucosa más 2mg/ml de doxiciclina *ad libitum*. Tras la inyección inicial, se dejaron pasar 20 días sin tratamiento alguno, para permitir que los tumores se formasen. Tras la evidencia de la aparición de tumores en los animales, estos fueron aleatoriamente repartidos en tres grupos diferentes: dos grupos formados por aquellos que fueron inyectados con células H1299tr-BRG1mut ó H1299tr-BRG1wt, y estos últimos fueron a su vez, separados en dos subgrupos mas, formados por aquellos que eran tratados con 1% de glucosa y el subgrupo que fue tratado con 2mg/ml de doxiciclina. Todos los individuos que recibieron la inyección de la línea H1299tr-BRG1mut fueron tratados continuamente con 2mg/ml de doxiciclina. Después de 10 días de inducción con doxiciclina, y sin interrumpir en ningún momento ésta, los ratones de los 3 grupos anteriores fueron

repartidos de nuevo, aleatoriamente, para suministrar los diferentes tratamientos hormonales. Se formaron dos nuevos subgrupos de animales, aquellos que recibieron la combinación de RA y DEX (RA: 10 mg/kg/día, 3 veces/semana; DEX: 0.4 mg, 3 veces/semana) y grupos de animales que no recibieron tratamientos. La supervivencia de los animales fue seguida durante más de 27 semanas (189 días). Los animales fueron sacrificados cuando mostraron dificultades respiratorias, que fueron subsecuentemente asociadas a la confirmación de la presencia y crecimiento de las células tumorales en el pulmón. Para el análisis histopatológico de los tumores, los pulmones fueron quirúrgicamente extraídos, fijados y embebidos en parafina. Se realizaron posteriormente secciones de 5 micras de grosor que fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), usando protocolos estandarizados. Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía óptica. La valoración de la invasividad y el grado de infiltración de los tumores formados y la presencia de crecimiento multifocal a distancia fueron evaluadas contando con la colaboración del Dr. Enric Condom, jefe del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge. Se asignó un valor binario (ausencia, 0; presencia, 1) de cada una de las características para cada tumor.

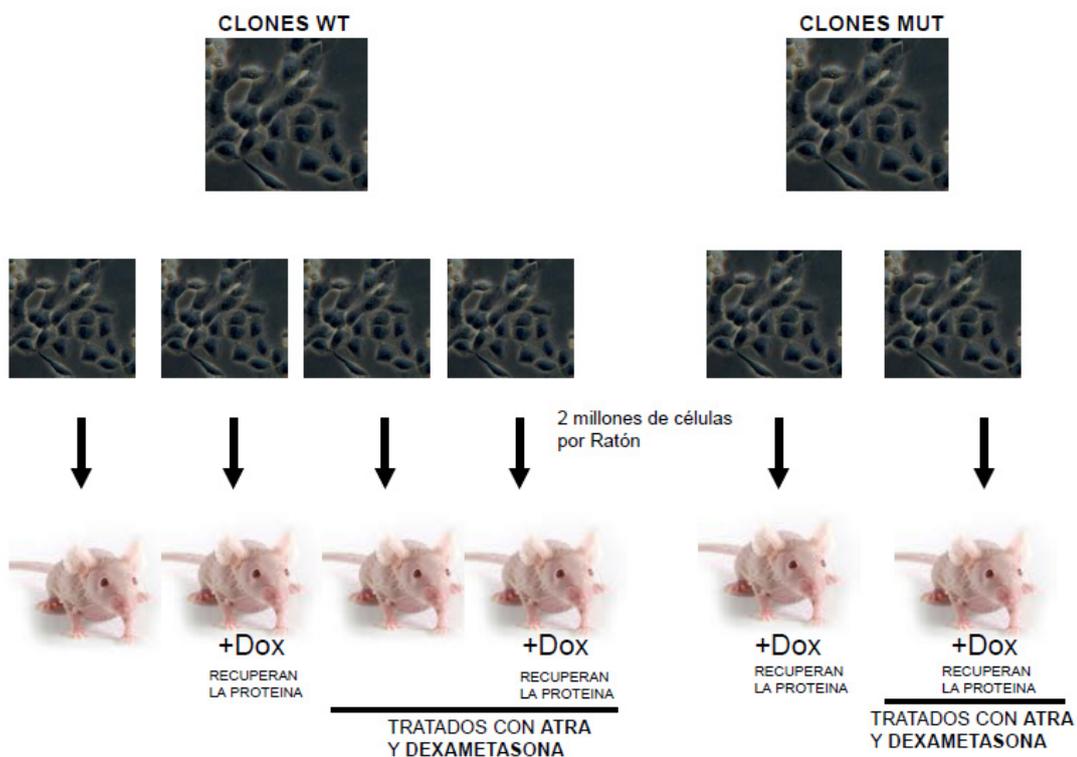


Figura 2.2: Esquema del diseño experimental llevado a cabo para la recuperación y reexpresión inducible de BRG1 y sus variantes mutadas in vivo, para la formación de tumores ortotópicos en pulmón.

Análisis estadístico y bioinformático

El análisis de los datos se realizó utilizando el test t-student de dos colas, en muestras no pareadas. Todos los datos presentados son medias de experimentos independientes y muestran el valor de la media \pm la desviación estándar (sd). Para la estimación de la supervivencia en cada grupo de ratones, se utilizó el análisis de Kaplan-Meier. Para calcular la igualdad en la distribución de la supervivencia entre los diferentes grupos, se calculó el estadístico log rank. Se consideró significativo cualquier test con un p-valor inferior a 0.05.

Para el análisis de enriquecimiento conjunto de genes (GSEA), los datos crudos del repositorio de la base de datos, *Gene Expression Omnibus* (GEO) (Edgar et al. 2002), indicados en cada caso, fueron normalizados usando el algoritmo RMA (del inglés, *Robust Multiarray Average algorithm*) disponible en el programa *Bioconductor's affy*. Para construir el listado con el ranking de expresión de cada conjunto de datos, se utilizó el programa *limma* que permite obtener el estadístico t. El análisis de enriquecimiento conjunto de genes (GSEA), fue aplicado al listado con el ranking de expresión. Después de aplicar el test Kolmogorov-Smirnoff, nuestros conjuntos de genes se consideraron significativamente enriquecidos entre los sets comparados cuando el FDR < 0.25 , un punto de corte bien establecido para la identificación de conjuntos de genes biológicamente relevantes (Subramanian et al., 2005).

RESULTADOS

1. El gen *BRG1* está frecuentemente inactivado en cáncer de pulmón.

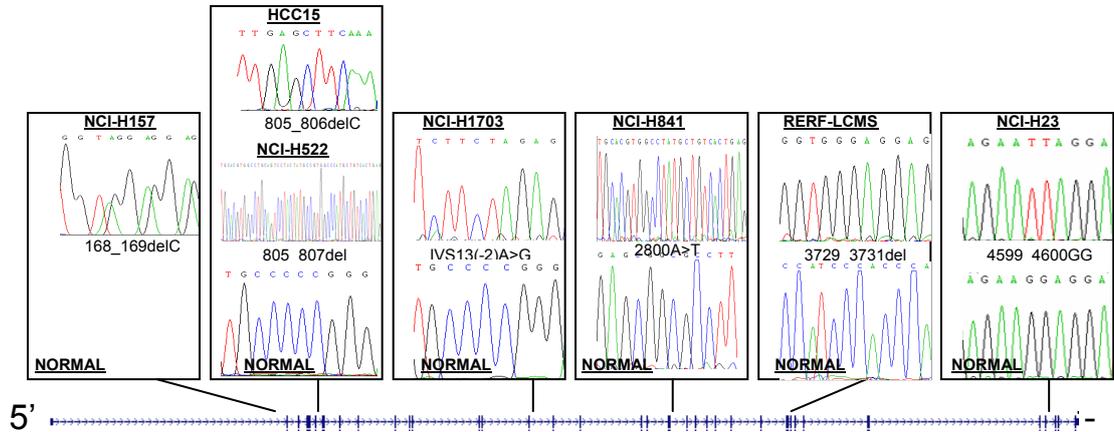
Con el objetivo de evaluar la presencia de alteraciones en el gen *BRG1*, se secuenció su cDNA en 59 líneas celulares de cáncer de pulmón de diferentes subtipos histopatológicos. El análisis determinó que un total de 14 (24%) líneas contenían mutaciones en *BRG1* (Tabla 1). En todos los casos las mutaciones identificadas resultaron ser homocigotas, indicando la ausencia del alelo salvaje, mediante pérdida de heterocigosidad (LOH). La inmensa mayoría de las mutaciones generaban codones stop prematuros, prediciendo la ausencia de proteína *BRG1* (Figura 1A-B), lo cual apoya su naturaleza inactivadora. Únicamente dos de las mutaciones identificadas no daban lugar a codones stop y ambas se localizaban dentro del dominio helicasa/ATPasa (Figura1B). Se ha comprobado que la sustitución de un solo aminoácido en esa región provoca la pérdida total de la actividad ATPasa de *BRG1* (Smith and Peterson 2005). Una de las mutaciones que no generaba proteína truncada, detectada en la línea H2126, producía una sustitución del triptófano por arginina en el codón 764. La otra mutación, identificada en la línea H1703, consistía en un cambio de A>G en la secuencia consenso del sitio aceptor de *splicing*, en el exón 13. En este último caso no se altera la pauta de lectura pero se produce una proteína más corta, debido a la eliminación de los exones 14 y 15. Solamente se tuvo acceso a ADN normal pareado, extraído de tejido normal sano del mismo paciente, de la línea H2126. El análisis de *BRG1* en esta muestra mostró ausencia de mutación alguna, lo que indica el origen somático (específico del tumor) de la mutación de *BRG1* para esta línea. También cabe de destacar la mutación identificada en la línea H23, un cambio en tándem GG>TT. Este tipo de sustituciones parecen ser provocadas por la exposición a acetaldehído, sustancia que se encuentra presente en el humo del tabaco y en los gases emitidos por los automóviles (Matsuda et al. 1998). Esta mutación predice una proteína truncada con un dominio ATPase intacto pero sin bromodominio. Finalmente, se realizó un western-blot de *BRG1* en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón. El resultado evidenció la ausencia de proteína *BRG1* en aquellas líneas celulares que presentaban mutaciones inactivadoras que generaban codones stop prematuros y que, por lo tanto, predecían proteínas truncadas (Figura 4.1b y C).

Tabla 4.1. Descripción de las mutaciones identificadas en BRG1 en las 59 líneas celulares de cáncer de pulmón evaluadas. NSCLC=37; SCLC=19; otros tipos=3.

Línea celular	Región	Efecto Producido
Cáncer de Pulmón de Célula no Pequeña (NSCLC)		
A427	Delección exones 23-35	Truncado
A549	2184-2206del	L728fs
HCC15	805-806delC	G271fs
Ma29	3166G>T	E1056X
NCI-H23	4599-4600GG>TT	E1533X
NCI-H157	168-169delC	P57fs
NCI-H522	805-807delCC	P269fs
NCI-H661	3475-3476delG	G1161fs
NCI-H1299	1677-1746del	E559fs
NCI-H1703	IVS13-2A>G	E668-Q758 del.
NCI-H1819	3254-3270del	L1084fs
NCI-H2126	2290T>A	W764R
RERF-LCMS	3729-3731delGC	R1245fs
FRECUENCIA TOTAL NSCLC [13/37=35%]		
Cáncer de pulmón de célula pequeña		
NCI-H841	2800A>T	K934X
FRECUENCIA TOTAL SCLC [1/19=5%]		

La numeración se fijó acorde con la ausencia del exón 27. Todas las mutaciones fueron homocigotas. Las mutaciones en las líneas H1299 y A427 fueron publicadas previamente (Wong et al.2000). Secuencia de referencia NM_003072.2. Todas las mutaciones fueron validadas sobre DNA genómico. *Homo sapiens chromosome 19 reference assembly* NC_000019.8). La A del ATG inicial de transcripción se considera como +1

A



B

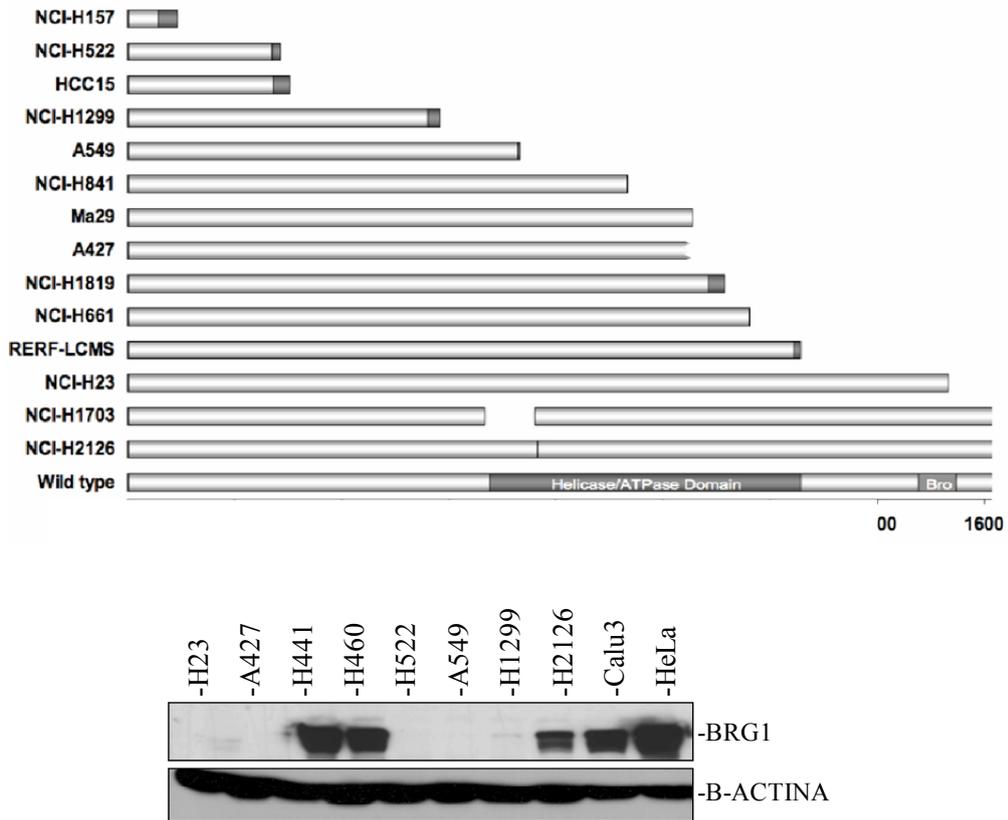


Figura 4.1. Mutaciones inactivadoras de *BRG1* en líneas de cáncer de pulmón. **A**, cromogramas representativos de mutaciones y localización de éstas a lo largo del gen *BRG1*. Se muestra también la secuencia normal en cada caso. Las diferentes líneas verticales en la estructura del gen se corresponden con cada uno de los 35 exones de que consta *BRG1*. **B**, representación esquemática de los efectos de las mutaciones sobre la proteína *BRG1*. El color gris oscuro indica el lugar de la proteína que ya no está en pauta. La línea vertical en la H2126 indica el lugar del cambio de aminoácido. La representación de la estructura normal de *BRG1* está en la parte inferior. Los números indican la posición de los aminoácidos. **C**, Western Blot de *BRG1* en diferentes líneas de cáncer de pulmón donde se demuestra la ausencia de expresión de *BRG1*, en las líneas portadoras de mutaciones homocigotas de naturaleza truncante.

2. Descripción de isoformas en BRG1

Dado que el estudio se realizó sobre el cDNA de *BRG1*, fue posible detectar varias variantes transcripcionales. En el presente trabajo, se han contabilizado hasta 4 variantes distintas, debidas a dos sitios de *splicing* alternativos, uno en el intrón 29 y otro en el exón 31 (Figura 4.2). Dichas variantes originan 4 mensajeros distintos de *BRG1*, que predicen proteínas ligeramente diferentes (Figura 4.2C). Para determinar con exactitud la frecuencia de las diferentes variantes transcripcionales, se secuenciaron 80 clones procedentes de una mezcla de cDNAs de diferentes tejidos de 10 individuos (Figura 4.2D). En el análisis no fue posible detectar, en ningún caso, la secuencia correspondiente al exón 27 de *BRG1*, descrita en el GenBank y en otras bases de datos públicas *online*. Presumiblemente, este exón podría ser un producto de *splicing* alternativo, específico de algún tejido. Sin embargo, no se puede descartar que, en realidad, no exista dicha variante y que constituya una secuencia errónea, depositada en la base de datos. Así pues, según nuestros datos actuales *BRG1* codifica para una proteína de 1614 aminoácidos, a diferencia de los 1647 que han sido previamente publicados.

Los nuevos transcritos alternativos identificados en el presente trabajo han sido depositados en el GenBank

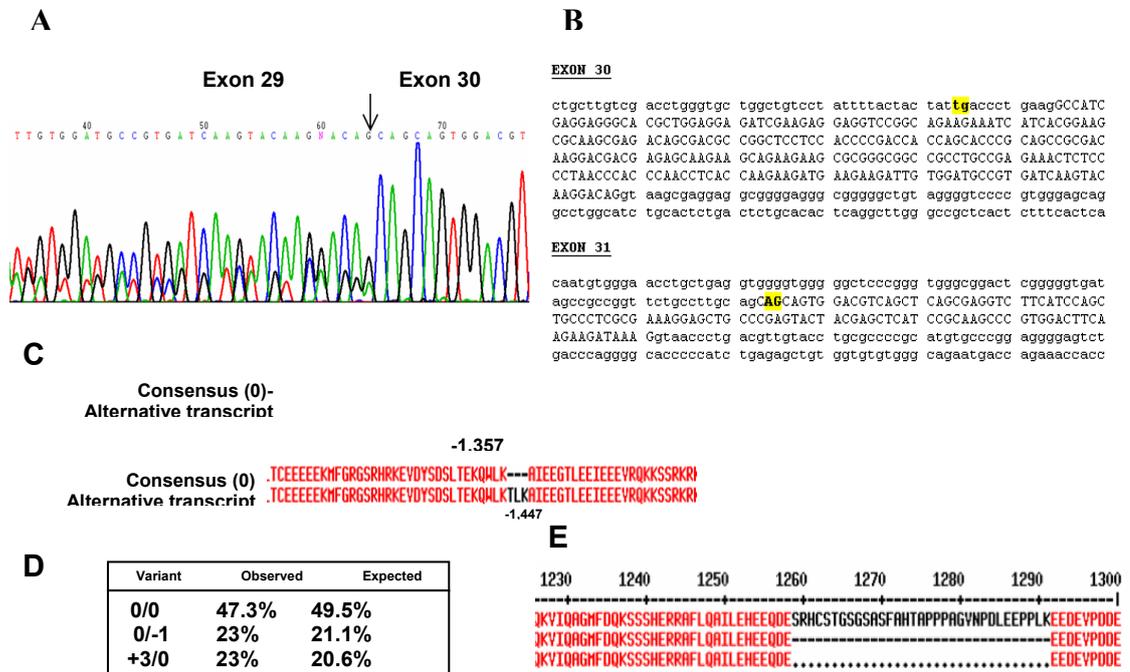


FIGURA 4.2. Identificación de los diferentes transcritos provenientes de sitios alternativos de *splicing*. **A**, cromograma que muestra la presencia de distintas variantes transcripcionales en el exón 29. **B**, los sitios de *splicing* alternativo están indicados en amarillo, los exones están en letras mayúsculas. **C**, proteína predecible usando el sitio consenso (0) y las diferentes isoformas derivadas de los sitios alternativos de *splicing*: 29(+3) y el 31(-1). **D**, frecuencia relativa de las diferentes isoformas tras secuenciar 80 clones de cDNA normal de diferentes tejidos de 10 individuos, **E**, Aminoácidos adicionales (en negro) que se corresponden con la proteína con exon 27

3. Las alteraciones en BRG1 son mutuamente excluyentes con la amplificación en los genes de la familia MYC

Además del tipo de mutación, se determinó el contexto etiológico, histopatológico y genético, en el que se producían las mutaciones. Se observó que las alteraciones en *BRG1* eran significativamente más frecuentes en líneas de cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), tipo histopatológico que comprende aproximadamente el 80% de los tumores de pulmón, que en el cáncer de pulmón de célula pequeña (SCLC). Así pues, el 35% (13/37) de las líneas de NSCLC presentaron mutaciones en *BRG1* en comparación con el 5% (1/19) en las líneas de SCLC ($P < 0.05$; Fisher's Exact test). Esta frecuencia, coloca a *BRG1* como el cuarto gen más frecuentemente alterado en cáncer de pulmón, después de *TP53*, *P16/INK4A* y *LKB1* (Figura 4.3A). Además, las mutaciones en *BRG1* se encontraron tanto en líneas derivadas de individuos fumadores como de no fumadores, de diferente género y etnia. También cabe comentar que las mutaciones en *BRG1* coexistían con alteraciones en otros oncogenes y genes supresores tumorales típicamente alterados en cáncer de pulmón, tales como *KRAS*, *LKB1*, *NRAS*, *P16/INK4A* y *TP53* (Figura 4.3B). Ello indica que su papel biológico es independiente a los atribuidos a estos genes, pudiendo cooperar con ellos en el desarrollo tumoral. Es interesante destacar que *LKB1* y *BRG1* se sitúan relativamente cercanos dentro del brazo cromosómico 19p13, y ambos están frecuentemente co-alterados en el cáncer de pulmón. Teniendo en cuenta que la LOH en este brazo cromosómico es muy frecuente y suele abarcar ambos genes, un solo "golpe" provocaría la eliminación de los dos alelos en ambos genes supresores tumorales simultáneamente. Finalmente, en la serie de líneas celulares de cáncer de pulmón evaluadas, no se observaron alteraciones concomitantes en *MYC* y *BRG1*. Es decir, las líneas que presentaban amplificación en cualquiera de los genes de la familia *MYC* (*MYC*, *MYCL* y *MYCN*) no presentaba mutaciones en *BRG1* ($P < 0.05$; Test de Fisher), sugiriendo que la función de *MYC* y *BRG1* en cáncer están relacionadas.

Estudio de la actividad reguladora de la transcripción y de la capacidad para suprimir el crecimiento celular de las formas mutadas de BRG1.

Tal y como se ha mostrado en la figura 1C, la mayoría de las mutaciones identificadas predicen proteínas truncadas y, por lo tanto, no tienen proteína BRG1 detectable por western-blot. Las dos únicas mutaciones que no predecían una proteína truncada son una sustitución que cambia un aminoácido altamente conservado (W764R) y la delección de una base que elimina unos 90 aminoácidos (E668-Q758 del), sin alterar la pauta de lectura. Ambas mutaciones afectan al dominio ATPasa (Figura 4A). Para verificar la falta de función se clonaron, en el vector de expresión pcDNA4/TO, ambas versiones mutantes de BRG1 y se expresaron en la línea de cáncer de pulmón humano (NCI-H1299, en adelante H1299) que carece de BRG1 debido a una pequeña delección homocigota intragénica (Wong et al. 2000). Como era de esperar, la proteína con la mutación E668-Q758del (en adelante 668-758Δ) era de menor tamaño que la versión salvaje de BRG1 y que el mutante W764R (Figura 4B). Para determinar el efecto de estas mutaciones se llevó a cabo un ensayo *in vitro*, previamente descrito (Johnson et al. 2008). En este ensayo se co-transfectan en la línea H1299, las diferentes construcciones de BRG1, conjuntamente con un plásmido que lleva clonado un promotor de fuerte respuesta al receptor de glucocorticoides MMTV (del inglés, *Mouse Mammary Tumoral Virus*), precediendo al gen de la luciferasa, que sirvió de gen reportero. De esta manera fue posible estudiar la contribución de BRG1 a la regulación hormono-dependiente de la transcripción del promotor MMTV. El análisis reveló un incremento, de cinco a ocho veces, de la transcripción del MMTV-dependiente de hormonas, al co-transfectar las células con la versión salvaje de BRG1, en comparación con las transfectadas con cualquiera de las formas mutantes o con el vector vacío (Figura 4.4). Esto indica una falta de actividad de todos los mutantes de BRG1 testados en el experimento.

Asimismo, se comparó la eficacia de la versión salvaje de BRG1 y de los dos mutantes para suprimir el crecimiento celular, en las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y A549, esta última también deficiente en BRG1 (Tabla 1 anexo). Los resultados evidenciaron que la sobreexpresión de la versión salvaje de BRG1, pero no de los dos mutantes, suprimía de forma significativa la formación de colonias (Figura 4.4D).

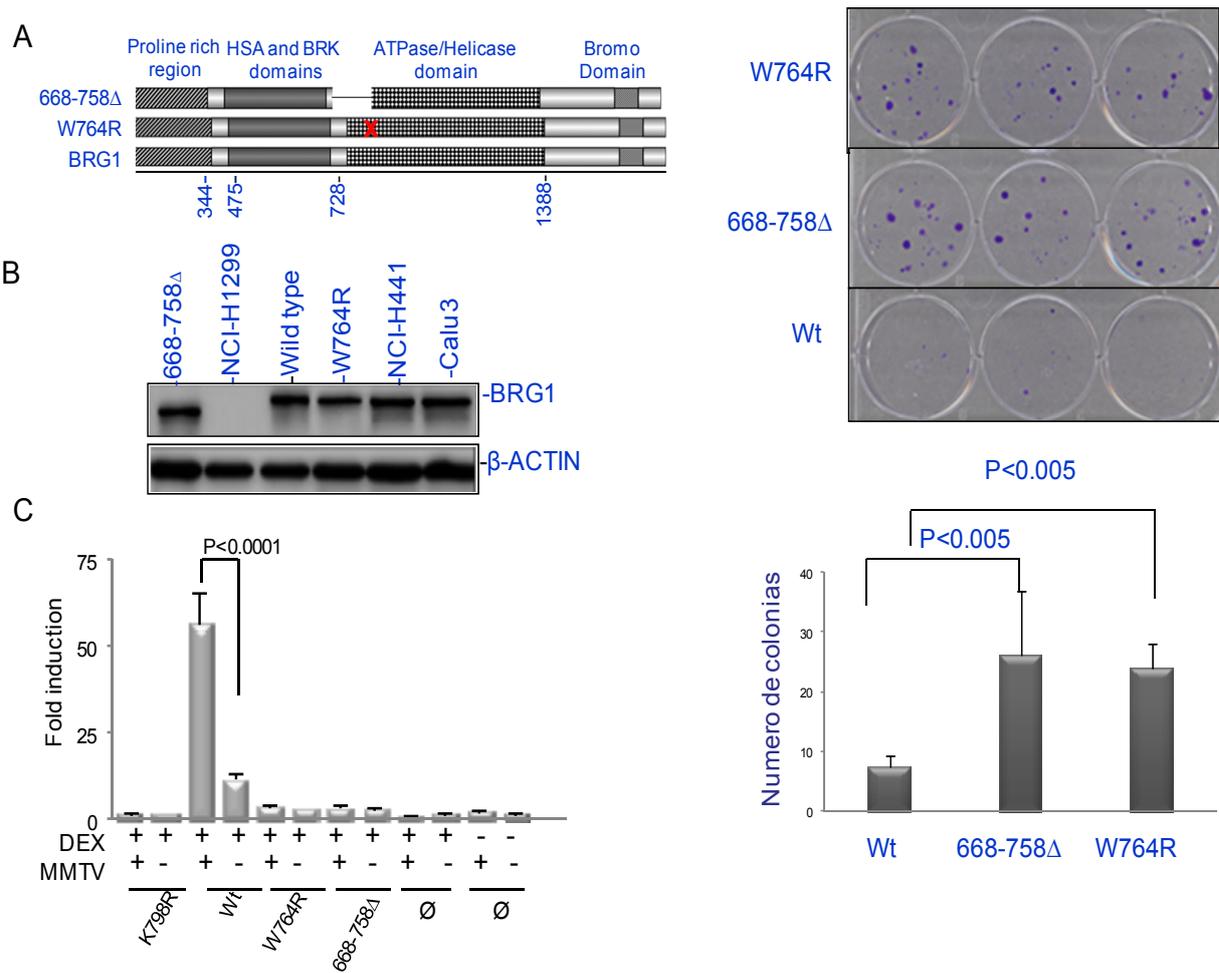


Figura 4.4. A, Representación esquemática de BRG1 y de dos mutantes (668-758Δ and W764R) identificados en células de cáncer humano. **B**, western blot que muestra la expresión ectópica de las tres formas clonadas de BRG1. La 668-758Δ, consiste en una delección en fase, que origina una proteína de menor tamaño. La línea parental H1299 y dos líneas celulares salvajes para *BRG1* también se incluyen en el WB. **C**, la recuperación de BRG1 en la línea H1299 potencia la actividad transcripcional del MMTV en células expuestas a dexametasona (DEX). Las células fueron cotransfectadas con MMTV-LTR-luciferasa y el plásmido RENILLA (control interno) junto con las diferentes construcciones de BRG1. La versión K798R es un mutante inactivo de BRG1 (ver Métodos). Los datos mostrados son de dos experimentos independientes. **D**, a diferencia de los mutantes, BRG1 salvaje reduce la formación de colonias en la línea H1299. En el panel inferior, cuantificación del ensayo con cristal violeta. Barras de error DE de tres réplicas.

La restitución de BRG1 en células tumorales de pulmón recupera los programas de expresión propios del tejido pulmonar sano.

Para determinar las consecuencias en la expresión global que se derivaban de restituir BRG1 en células deficientes, se generaron dos líneas isogénicas, a partir de la línea celular de cáncer de pulmón H1299, que expresaban *BRG1* salvaje y mutante, de forma estable e inducible por doxiciclina (denominadas a partir de ahora H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut). Como se muestra en la figura 5 la expresión ectópica de BRG1 es detectable 6 horas después de la inducción con doxiciclina, y se mantiene estable a lo largo del tiempo. El sistema demostró ser robusto y no se evidenció expresión de BRG1 en ausencia de doxiciclina (Figura 4.5A). Además, mediante inmunofluorescencia, se confirmó que más del 90% de las células de ambas poblaciones expresaban de forma ectópica BRG1 y que su localización celular se restringía al núcleo, tal y como era de esperar dada la naturaleza de la actividad de la proteína (Figura 5B).

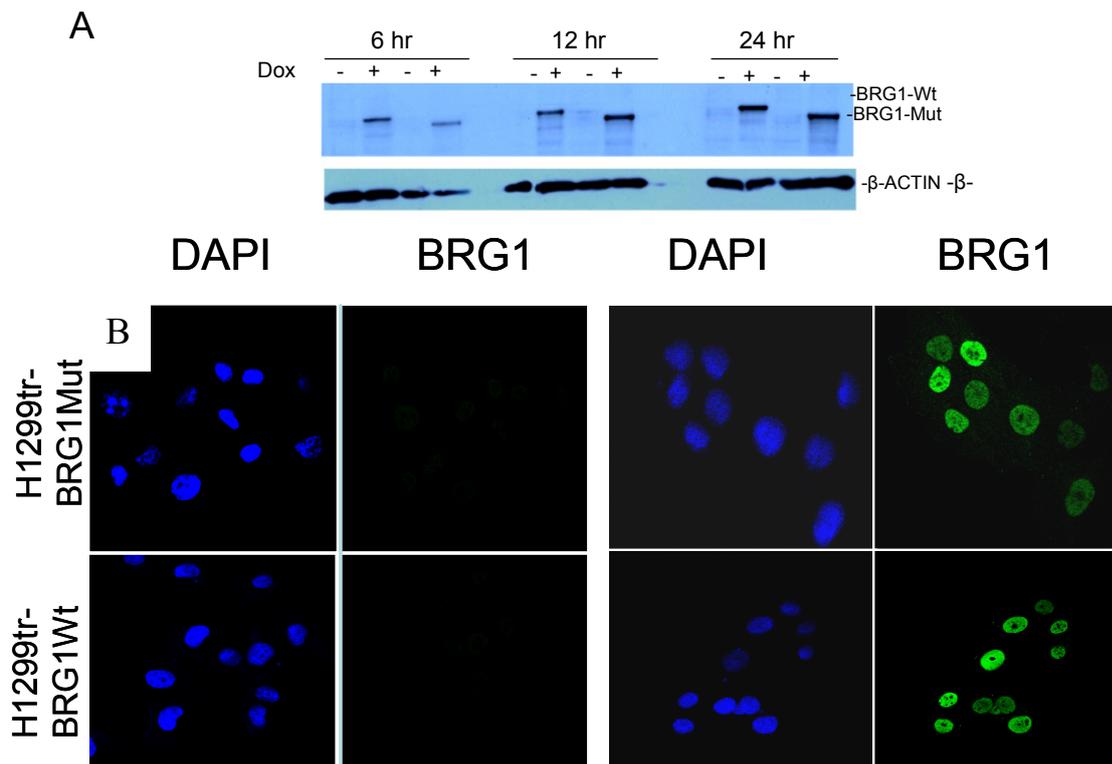


FIGURA 4.5. A, Western blot donde se muestra la expresión de la forma mutante (668-758Δ) y salvaje de BRG1 bajo el control del sistema *tet-repressor* en presencia (+) o ausencia (-) de doxiciclina (2 ng/μl) a diferentes tiempos. También se muestra la β-ACTINA, utilizada como control de carga. **B**, Imagen de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-BRG1, muestra la inducción y la localización nuclear de las proteínas mutante y salvaje de BRG1.

Dado que la ATPasa principal del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, BRG1, afecta al control de la expresión génica, se decidió comparar los perfiles de expresión de las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut. Para ello se extrajo el RNA total de ambas líneas antes y después de inducir la expresión de BRG1 con doxiciclina a diferentes tiempos: 6, 12 y 24 horas. El RNA se hibridó en un microarray de expresión y se compararon los niveles de expresión global en las diferentes líneas, tiempos y condiciones. El análisis determinó que cerca de 460 genes estaban diferencialmente expresados entre las líneas H1299tr-BRG1wt y la línea H1299tr-BRG1mut. Los cambios de expresión, en un grupo seleccionado de genes, fueron confirmados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR) (Figura 4.6). Con el objetivo de poder confirmar si los cambios de expresión dependientes de BRG1 eran generalizables y se podrían extender a otras líneas celulares de cáncer de pulmón, se recuperó, de forma transitoria, BRG1 salvaje y su versión mutante en las líneas NCI-H23 y A549, deficientes para BRG1 (Ver Tabla 1). La recuperación de BRG1 en estas líneas reprodujo, en muchos de los genes seleccionados, los cambios de expresión observados anteriormente (Figura ANEXO).

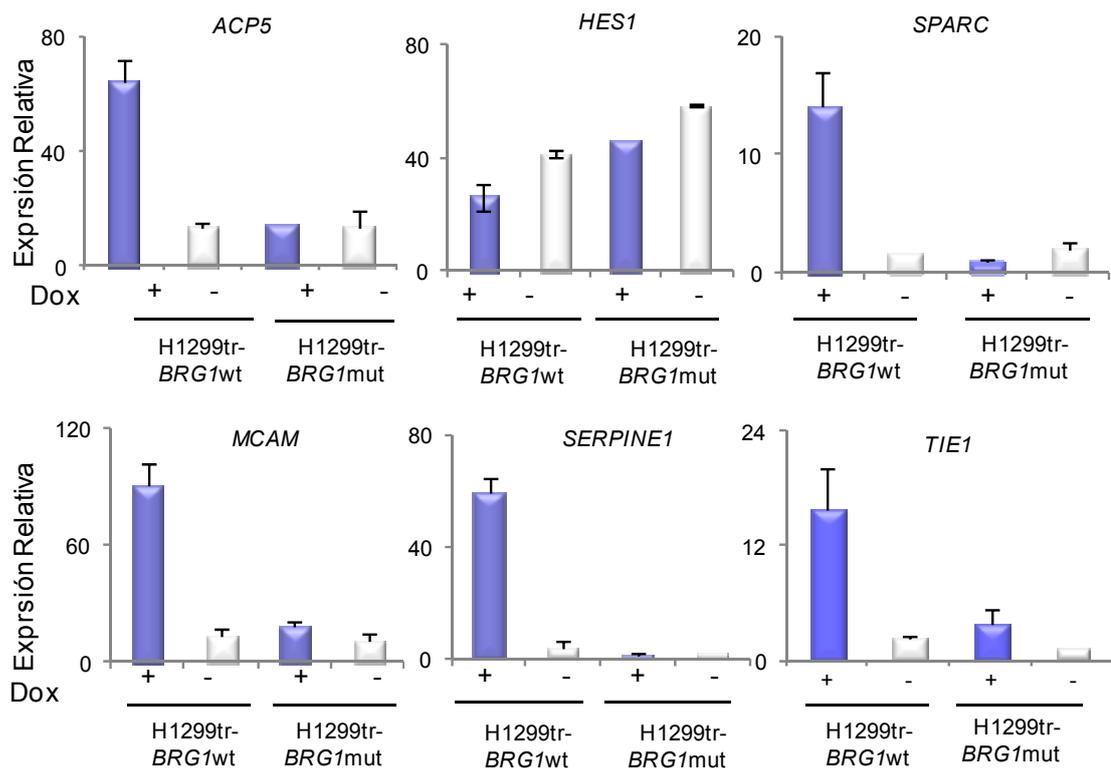


FIGURA 4. 6. RT-PCR cuantitativa a tiempo real, que verifica los cambios de expresión en un grupo seleccionado de genes, identificados en el microarrays de expresión, después de restituir BRG1. Los valores de expresión mostrados son relativos al gen usado como control de carga, *GUSB*, tras la inducción de BRG1 salvaje y mutante. Las barras indican la media de expresión con su correspondiente desviación estándar, procedente de tres réplicas independientes.

El análisis bioinformático posterior de los datos obtenidos, entre ellos el análisis del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) *David Gene Ontology* (DGO), generó diferentes subconjuntos de genes que se asociaban a varias funciones biológicas, destacando el desarrollo embrionario y el desarrollo-diferenciación de órganos y tejidos. Cabe destacar, que la firma genética obtenida contenía también múltiples genes de respuesta a ácido retinoico (en adelante RA), genes de respuesta a glucocorticoides (en adelante DEX) y varias dianas transcripcionales de MYC (Tabla 1 anexo) (Fernández et al. 2003). Además, fue interesante observar que muchos de los genes pertenecientes a la firma de BRG1 se expresaban en el tejido pulmonar sano y, algunos de ellos (*ACP5*, *AQP1*, *CDH5*, *TIE1*), constituían marcadores específicos de pulmón (<http://biogps.gnf.org>) (Figura ANEXO). Ello sugería que BRG1 contribuye a la diferenciación del tejido pulmonar.

Para investigar más a fondo esta cuestión, se obtuvo el perfil de expresión de 69 muestras de tumores primarios de pulmón y 6 muestras de tejido pulmonar sano, procedente de un trabajo anterior de nuestro grupo (Angulo et al. 2008) (GSE8569). Mediante un análisis estadístico supervisado se extrajeron 1.355 genes que constituían el perfil de expresión del pulmón normal frente a las muestras tumorales. Se observó que muchos de los genes que mostraban expresión elevada en el tejido normal, comparado con el tumoral, coincidían con los genes sobre-expresados al recuperar BRG1 en líneas deficientes (Figura 4.7A). A continuación se compararon los perfiles de expresión obtenidos después de recuperar BRG1 salvaje (firma BRG1) y se contrastó con el perfil de expresión del tejido pulmonar normal obtenido al comparar los tejidos pulmonares normales con su correspondiente tejido tumoral (GSE8569 y GDS1650). Para la comparación de perfiles de expresión se utilizó el análisis de tipo GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*). Este análisis permitió confirmar que, efectivamente, había una extraordinaria coincidencia entre la firma BRG1 y el perfil de expresión del tejido pulmonar normal, al compararlo con el tumoral. La comparación resultó estadísticamente muy significativa (Figura 7B-C). Por lo tanto, la recuperación de BRG1 en líneas deficientes para el mismo restaura, al menos parcialmente, la expresión génica del pulmón normal. Además, la firma BRG1 se comparó también con el conjunto de genes que se transcriben a lo largo del desarrollo embrionario del pulmón en ratones (GDS3447/8). El análisis GSEA mostró que, de forma muy significativa, la firma de BRG1 era comparativa muy similar al perfil de expresión de los pulmones en estadios finales del desarrollo embrionario (Figura 4.7D). En conjunto, estos experimentos y las observaciones derivadas, relacionan la inactivación de *BRG1* en cáncer de pulmón con la pérdida de la capacidad celular para desarrollar un programa de diferenciación propia del tejido pulmonar normal.

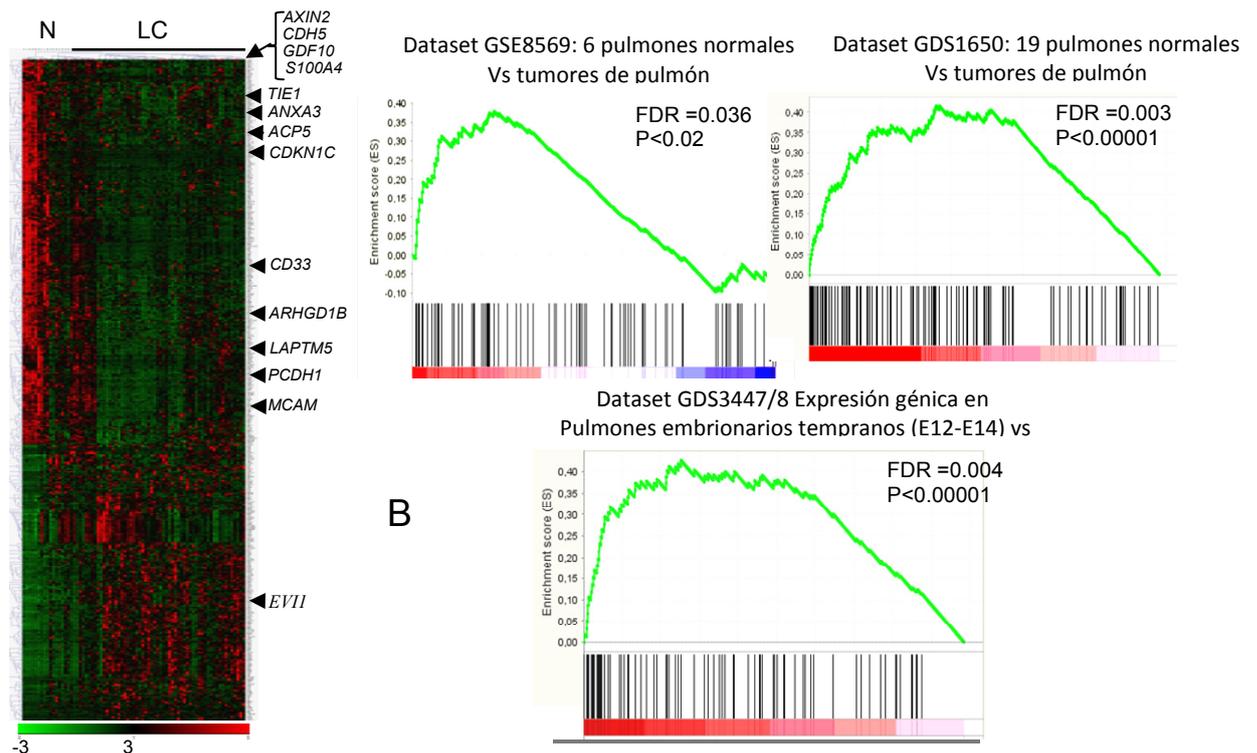


FIGURA 4.7. A, Clúster jerárquico bidimensional de los genes diferencialmente expresados entre 69 tumores primarios de pulmón (LC) y 6 pulmones normales (N). Las flechas indican los transcritos coincidentes entre aquellos diferencialmente expresados entre las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut. B-D Representación gráfica del *ranking* de genes derivados de la comparación (usando GSEA) de la firma BRG1 contra los diferentes conjuntos de datos indicados. Los valores correspondientes del p-valor y FDR (*false discovery rate*) están indicados.

BRG1 es reclutado en las E-boxes de las dianas transcripcionales de MYC.

El análisis genético (Figura 3B) mostró que las alteraciones en *BRG1* convivían con alteraciones en distintos genes implicados en la tumorigénesis, excepto con *MYC*. Por otra parte, el perfil de expresión resultante de restaurar *BRG1*, incluye a diversas dianas transcripcionales de *MYC* y al mismo *MYC* (Tabla 1 Anexo). Estas observaciones, junto con los datos anteriormente publicados que mostraban una relación funcional entre el complejo SWI/SNF y *MYC* (Cheng et al. 1999; Pal et al. 2003), sugerían que la función supresora de tumores de *BRG1* implica el control de la actividad transcripcional de *MYC*. Para verificar la hipótesis, se utilizó en primer lugar la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si *BRG1* es reclutada en los elementos consenso reconocidos por *MYC*, las *E-boxes*, dentro de los promotores de los genes regulados por *BRG1* (Tabla 1 Anexo). Con este fin se precipitó la cromatina de las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, utilizando un anticuerpo específico contra *BRG1*. Como control se usó IgG de conejo. Para determinar si se había producido enriquecimiento de ADN de estas regiones se utilizó la técnica de PCR cuantitativa, utilizando *primers* específicos que flanqueaban las *E-boxes* en los promotores de los genes diana de *MYC*, es este caso de *ACP5*, *AQP1*, *HES1* y *SERPINE1*. Los datos obtenidos

mostraban un enriquecimiento relativo de BRG1 en los promotores evaluados, por lo menos, diez veces superior después de la inducción de BRG1 salvaje, confirmando que BRG1 es reclutado en dichos promotores (Figura 4.8A). Curiosamente, la forma mutante, que carece de los residuos que participan en el sitio de unión de ATP, mostró poco o ningún enriquecimiento. Ello podría indicar una alteración en la estructura de la proteína que influye la unión o la estabilidad de la unión al ADN. En este sentido, cabe comentar que no se conoce ninguna secuencia de ADN consenso, específica de reconocimiento para BRG1 o para el complejo SWI/SNF. Para determinar si la ocupación de BRG1 en las E-boxes era un fenómeno específico y no circunstancial, se analizaron regiones distantes (>1.000-pb) de las E-boxes. Los resultados mostraron que el enriquecimiento de BRG1 era mayor en las E-boxes que en las regiones control, lo que confirma que BRG1 es reclutada específicamente en las regiones de unión de MYC (Figura 4.8B). Además, se evaluó y confirmó la ocupación de BRG1 en promotores de otros genes que, según el microarray de expresión, estaban fuertemente regulados por BRG1. Así pues, se observó enriquecimiento de BRG1 en el promotor de *MCAM*, entre otros (Figura Anexo).

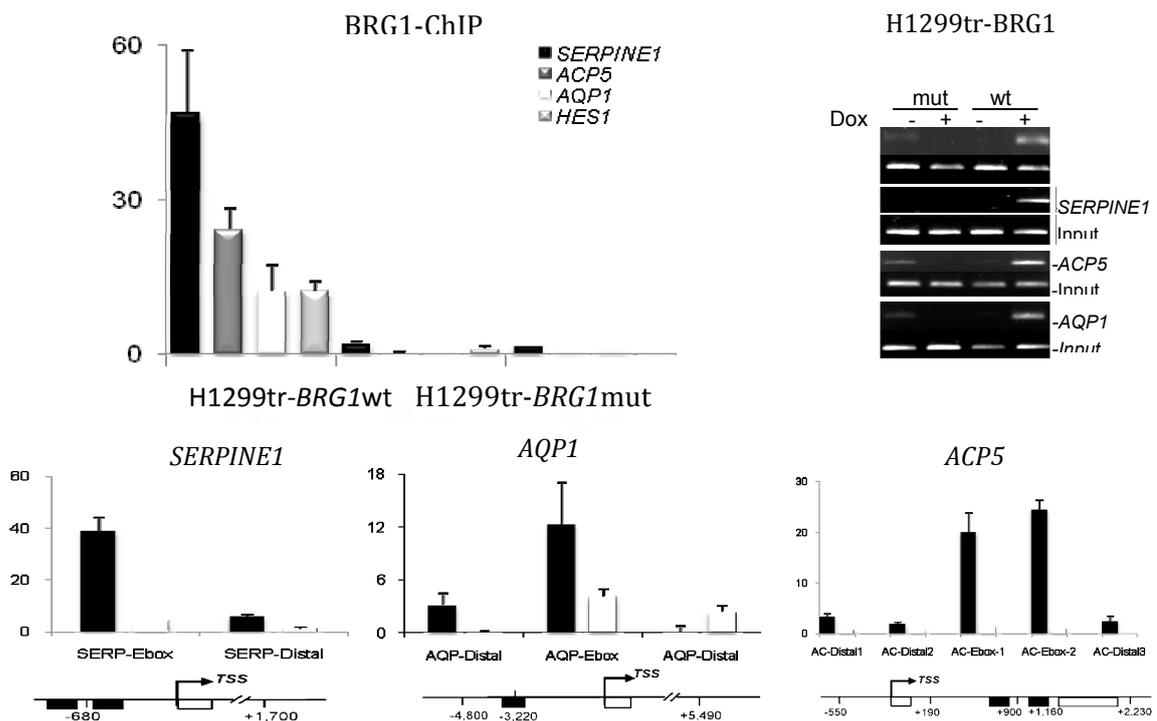


FIGURA 4.8. Análisis de ChIP donde se muestran los niveles de enriquecimiento de BRG1, medidos por PCR cuantitativa. **A**, en las E-boxes de las dianas transcripcionales de MYC. Gel de agarosa al 2% que muestra el resultado del enriquecimiento de BRG1 tras una PCR semicuantitativa (-) sin inducción o (+) inducidas con 2ng/ul de doxiciclina. **B**, Barrido a lo largo del promotor indicado, usando PCR cuantitativa a tiempo real, sobre los fragmentos inmunoprecipitados con anti-BRG1. Las barras representan el enriquecimiento relativo en la línea H1299tr-BRG1wt (Negro) y en H1299tr-BRG1mt (blanco) en diferentes genes. La localización de las E-boxes está indicada (cajas negras) y su posición numérica es relativa al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas.

A continuación, y una vez confirmada la presencia de BRG1 en promotores diana de MYC, se realizó ChIP para determinar si MYC estaba siendo reclutado en las *E-boxes* de manera dependiente de BRG1. Utilizando el mismo grupo de *primers* que en el experimento anterior, se observó que MYC también ocupaba el promotor de *AQP1* y *SERPINE1*, sólo tras la inducción de la expresión de BRG1 salvaje (Figura 9). Estos datos, combinados con los resultados de expresión, indican que la co-ocupación de BRG1 y MYC en estos promotores es necesaria para promover la expresión de dichos genes. Por el contrario, en el caso de *HES1* y *ACP5*, el reclutamiento de MYC a sus promotores fue mayor en ausencia de BRG1, lo que indica que, de alguna manera, BRG1 impide o reduce el acceso de MYC a estos promotores. Además, los resultados sugieren que MYC controla positivamente la expresión de *HES1* y negativamente la de *ACP5*, y que no existe co-ocupación de BRG1 y MYC en el promotor de *HES1* y *ACP5* (Figura 9).

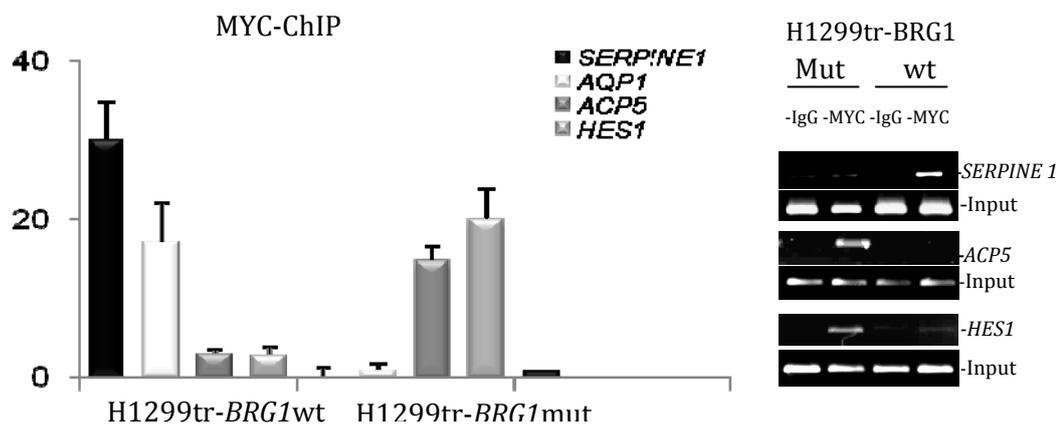


FIGURA 4.9. Determinación de la ocupación de MYC en las E-boxes de los genes indicados. Las barras muestran los resultados de la PCR cuantitativa del ChIP de MYC en la línea H1299tr-BRG1wt y en la H1299tr-BRG1mut, después de la inducción de BRG1. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas. Gel de agarosa al 2% que muestra el resultado del enriquecimiento de MYC tras una PCR semicuantitativa (-) sin inducción o (+) inducidas con 2ng/μl de doxiciclina.

Con el objetivo de confirmar la coincidencia entre los genes regulados por MYC y BRG1, se realizaron nuevos análisis de comparación de perfiles de expresión por GSEA. En este caso, la firma BRG1 se comparó con los perfiles de expresión de pulmones de embriones de ratones transgénicos para *MYCN* (GSE6077) o *MYC* (GSE10954) y que, por lo tanto, expresaban altos niveles de *MYCN* y *MYC*, respectivamente. En esta ocasión los resultados también mostraron similitudes significativas. En concreto, la firma BRG1 correlacionaba de forma inversa con el perfil de expresión de los pulmones embrionarios que sobre-expresan *MYCN* (FDR<0.001). Por otra parte, la correlación de la firma BRG1 con los perfiles de expresión de los pulmones, en

este caso tumorales, que sobre-expresan *MYC* también era inversa, pero no llegaba a ser estadísticamente significativa (FDR=0.1) (Figura 4.10). Así pues, en su conjunto, los datos sugieren una función antagónica entre la función supresora de tumores de *BRG1* y la actividad oncogénica de *MYC*. Ello sería consistente con la presencia de alteraciones genéticas mutuamente excluyentes entre *BRG1* y *MYC* en cáncer de pulmón, tal y como se observó en el estudio mutacional de *BRG1* (Figura 4.3) (Medina et al., 2008).

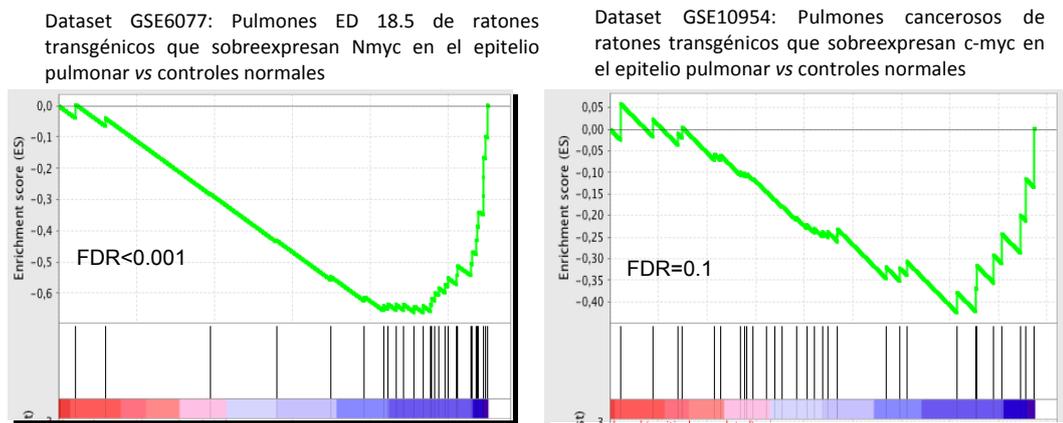


FIGURA 4.10. Representación gráfica del análisis, utilizando GSEA, de la comparación de perfiles de expresión de *BRG1* y de los pulmones embrionarios de ratones transgénicos para *MYCN* y *MYC*. Las gráficas muestran el ranking de genes derivados de las dos comparaciones. Los valores correspondientes al p-valor y al FDR (*false discovery rate*) están indicados.

BRG1 es necesario para promover cambios morfológicos y fenotípicos en las células, provocados por señales externas y mediados por receptores nucleares.

En las células de mamíferos, los receptores nucleares de hormonas y vitaminas median importantes programas específicos de transcripción génica reclutando el complejo SWI/SNF a elementos reguladores tipo *cis* en los promotores de sus dianas transcripcionales (Yoshi-naga et al. 1992; Sumi-ichinose et al 1997; Fryer and Archer 1998; Belandia et al. 2002; Inoue et al. 2002; Marshal et al. 2003; Flajojet et al 2007). De entre los programas de regulación de la transcripción mediados por estos receptores nucleares se encuentran la diferenciación y la inflamación. De acuerdo con esto, en el presente trabajo se observó que la firma *BRG1* incluye genes que son dianas transcripcionales conocidas de los receptores de glucocorticoides y del ácido retinoico (Tabla Anexo 1). Ante este escenario, se planteó la hipótesis de que la inactivación de *BRG1* en cáncer permitía a la célula abolir la respuesta a estos receptores. El ácido retinoico y los corticoides son fundamentales para el desarrollo pulmonar embrionario y para mantener la homeostasis pulmonar normal (Malpel et al. 2000; Cole et al. 2004). También se sabe que, en células sensibles, el ácido retinoico induce cambios morfológicos que

están relacionados con la diferenciación celular (Pahlman et al. 1984). Para testar la hipótesis, se evaluó si al restaurar BRG1 en células deficientes se producían cambios en el fenotipo o disminuía el crecimiento celular de manera dependiente de glucocorticoides (DEX) o ácido retinoico (RA). En primer lugar, para descartar una posible falta de efecto debido a la ausencia de los receptores correspondientes, se determinaron los niveles de ambos receptores nucleares en el modelo de estudio. Se confirmó la presencia del receptor de glucocorticoides en la línea parental H1299 y en las líneas isogénicas derivadas (Figura 4.11A). Asimismo, en la línea H1299 ha sido descrita la expresión detectable de varios tipos de receptores del ácido retinoico después del tratamiento con RA (Choi et al. 2007). En este trabajo se determinaron los niveles del receptor β del ácido retinoico (*RARB*) en respuesta a RA y se observó un aumento en los niveles de expresión del mismo que fueron significativamente mayores en la línea H1299tr-BRG1wt que en la H1299tr-BRG1mut (Figura 4.11B).

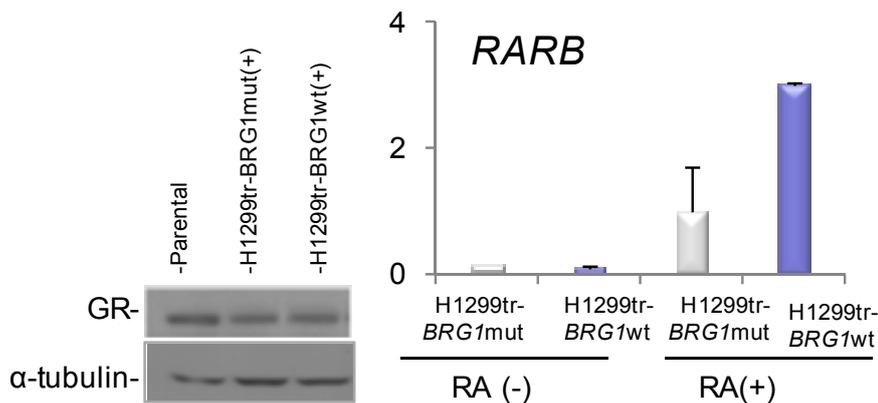


FIGURA 4.11. Determinación de los niveles de los receptores de glucocorticoides y de ácido retinoico. **A**, Detección de los niveles endógenos del receptor de glucocorticoides, en la línea H1299 y sus líneas isogénicas derivadas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut. La α -tubulina se utilizó como control de carga. **B**, RT-PCR cuantitativa a tiempo real donde se muestra el incremento en la expresión del receptor β de ácido retinoico, tras tratar ambas líneas con RA. Nótese que el incremento es mucho mayor tras recuperar BRG1 salvaje. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas.

El tratamiento, durante cuatro días, de ambas líneas con DEX o RA mostró cambios morfológicos, claros e inequívocos, en más del 90% de las células del cultivo. Estos cambios ocurrían sólo en aquellas células en las que se inducía la expresión de BRG1 salvaje (Figura 4.12). La línea H1299 parental y las líneas isogénicas derivadas, están compuesta por células muy indiferenciadas y de forma pseudoesférica. Tras el tratamiento con DEX las células adquirieron una morfología de aspecto aplanado, con células de mayor tamaño y un citoplasma aumentado. Se observaron también filamentos organizados de tubulina. Por otro lado, la exposición a RA también produjo cambios en la morfología celular, pero en esta

ocasión las células adoptaron un aspecto alargado, de tipo fusiforme, y con el citoplasma menos ensanchado (Figura 12).

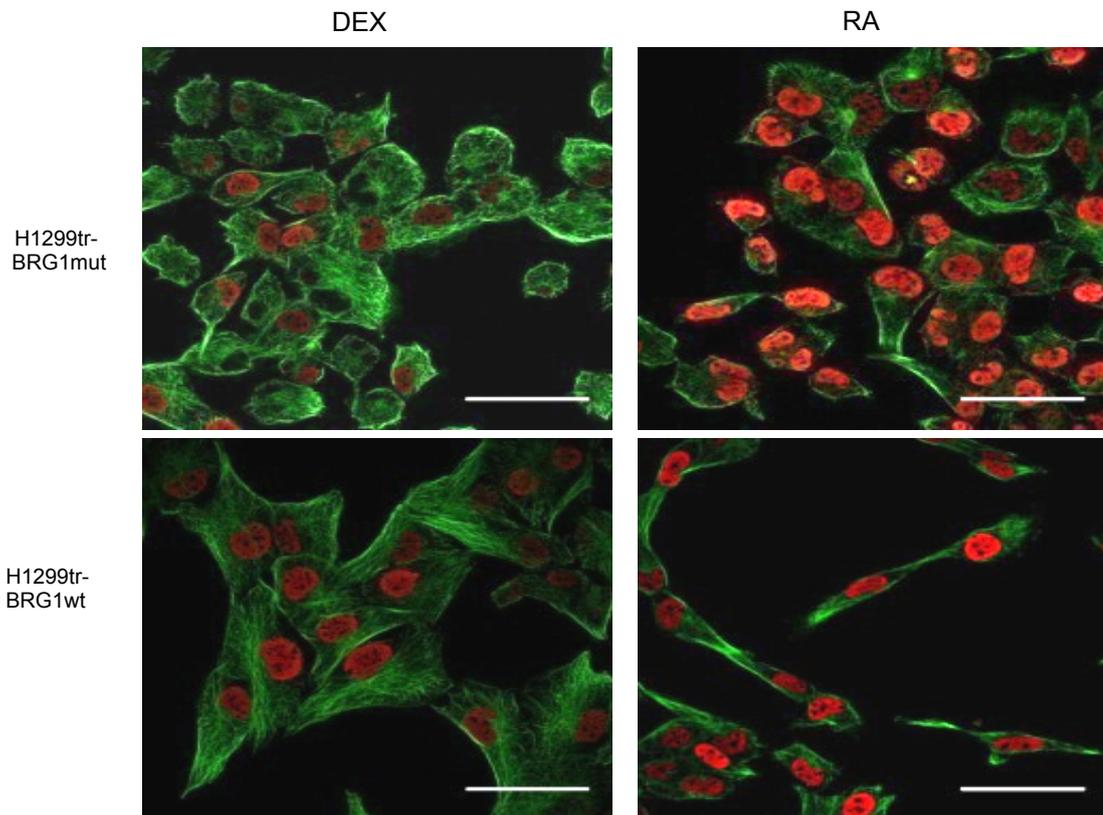


FIGURA 4.12. Inmunofluorescencia de las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut. BRG1 está marcada con un anticuerpo secundario en rojo, Alexa Fluor 568, y la α -TUBULINA en verde, Alexa Fluor 468. Las células fueron tratadas con DEX y RA durante 96 horas, tras una depleción de suero de 16 horas. Escala, 50 μ m.

Para mejorar y evidenciar mejor la especificidad y dependencia de BRG1 de los cambios morfológicos observados, así como para poder monitorizar el crecimiento del cultivo, se añadió al modelo inducible para BRG1 dos construcciones nuevas, que expresaban dos proteínas fluorescentes de forma estable (ver métodos). Esta estrategia permitió diferenciar por colores las poblaciones que expresan BRG1 salvaje (con EGFP, de color verde) y mutante (con RFP, de color rojo). El marcaje con fluorescencia permitió avanzar en el estudio del efecto de la recuperación de BRG1 en función del ambiente, en este caso hormonal, ya que nos permitía mezclar ambas poblaciones y cultivarlas conjuntamente. Para ello, se co-cultivaron el mismo número de células H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut (marcadas en verde y rojo, respectivamente), se expusieron a RA y/o DEX y se siguió su crecimiento en tiempo real y los cambios morfológicos y fenotípicos, usando microscopia de fluorescencia. Como se muestra en la figura 4.13, sólo las células verdes sufrieron los cambios morfológicos previamente descritos. En las células con doble tratamiento (DEX+RA), se observaron cambios fenotípicos

intermedios a los anteriormente descritos, células con aspecto muy organizado, fusiformes y con un citoplasma ensanchado de aspecto más plano y de mayor tamaño (Figura 4.13).

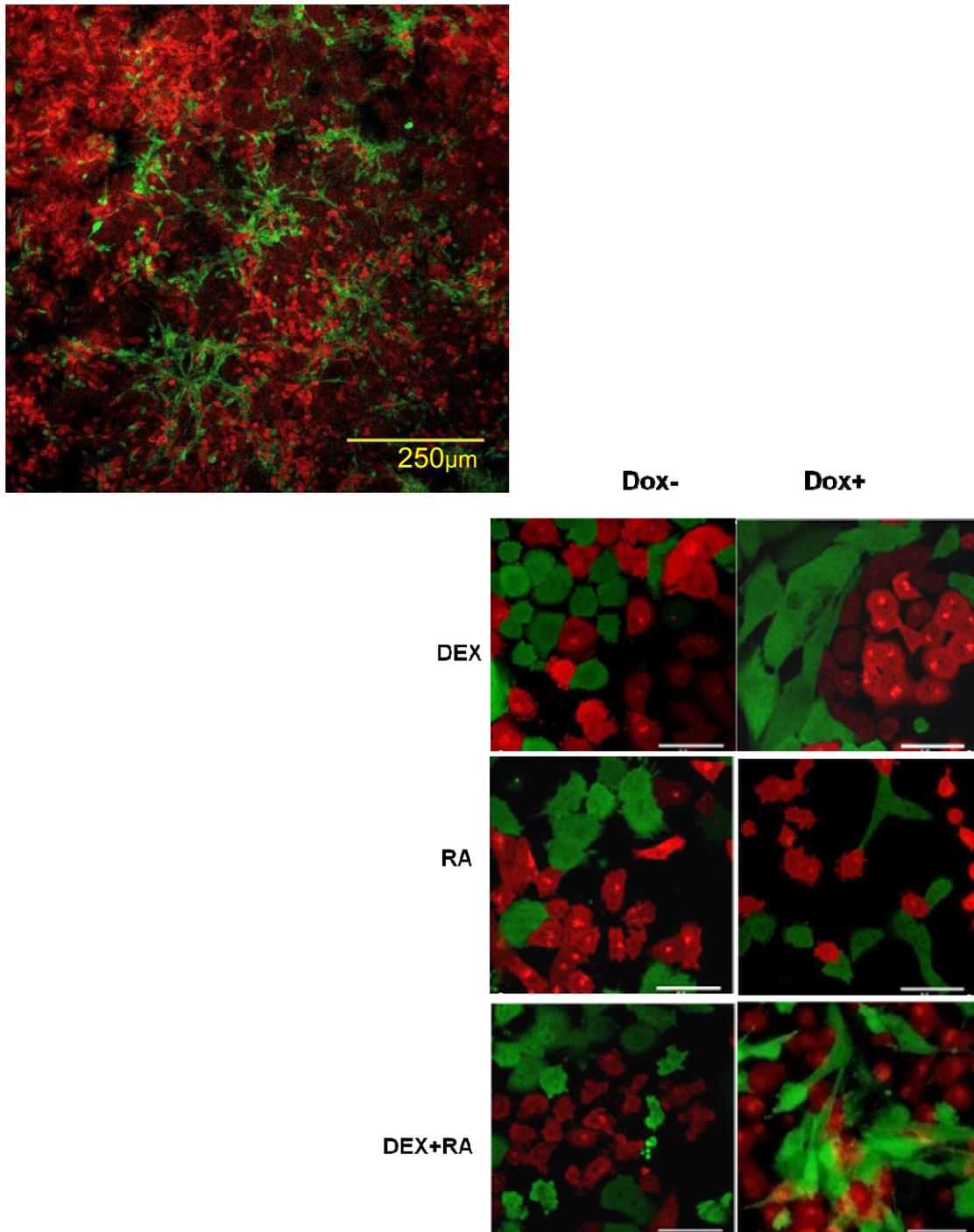


FIGURA 4.13. Co-cultivo de las líneas H1299-trBRG1wt y H1299-trBRG1mut marcadas con fluorocromos verde y rojo respectivamente. **A**, Las células fueron crecidas y tratadas con RA, DEX ó DEX+RA. En el panel derecho se muestran los cultivos donde se indujo la expresión de BRG1 y su mutante con doxiciclina (DOX+). Solo las células verdes (BRG1 salvaje) adquirieron cambios morfológicos apreciables. En el panel izquierdo se muestran los controles, es decir las mismas células tratadas con hormonas pero sin recuperar expresión de BRG1 (Dox-). Las células fueron crecidas en cultivos condicionados con RA, DEX ó DEX+RA. La expresión de BRG1 fue inducida con 2 ng/µl of doxiciclina, tras la inducción, las células fueron tratadas con 0.5 µM RA y 1 µM DEX durante 4 días. **B**, Foto a menor aumento del cultivo conjunto de las líneas H1299-trBRG1wt y H1299-trBRG1mut marcadas con fluorocromos verde y rojo respectivamente.

A continuación se llevó a cabo una inmunofluorescencia para detectar cambios en la reorganización de las fibras de actina. De forma similar a lo observado anteriormente con las fibras de tubulina, el tratamiento con DEX indujo también la redistribución de la actina, pasándose de una red desorganizada de fibras a la presencia de filamentos organizados (Figura 4.14). Estos cambios concuerdan con los filamentos de actina observado por otros autores (Asp et al. 2002; Rosson et al. 2005).

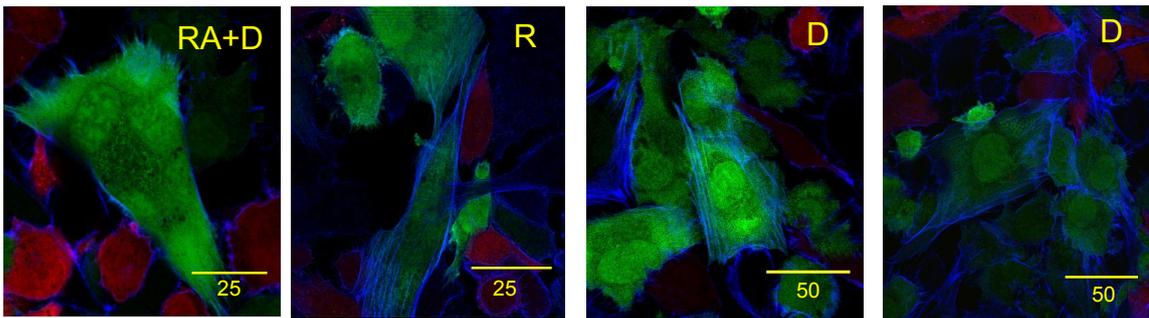


FIGURA 4.14. Inmunofluorescencia, en azul, con anti-phalloidina (arriba). Se observa que sólo las células verdes (BRG1 salvaje) muestran cambios morfológicos y señal de actina polimerizada.

La recuperación de BRG1 salvaje reduce el crecimiento celular

Además de los cambios morfológicos, se evaluó el efecto de la recuperación de BRG1 y la influencia de los diferentes tratamientos en la supresión del crecimiento celular. La inducción de BRG1 redujo significativamente el crecimiento celular en comparación con la inducción de BRG1 mutado (Figura 4.15). Sin embargo, el efecto no se vio significativamente incrementado por el tratamiento con RA o DEX. En conjunto, estas observaciones demuestran el papel fundamental de BRG1 para mediar la respuesta a la activación de determinados receptores nucleares.

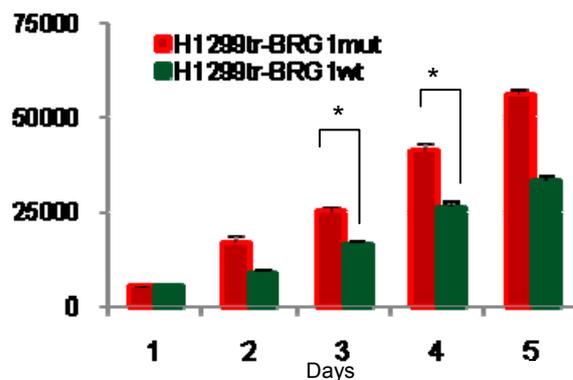


FIGURA 4.15. Contaje, por citometría de flujo, de las células que expresan GFP (verde) y RFP (rojo) correspondientes con las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, después de la inducción con doxiciclina (2 ng/μl, 24 h). Barras de error de cuatro replicados. *, $P < 0.01$

BRG1 es necesario para regular los niveles de MYC y de dianas transcripcionales de los receptores de corticoides y ácido retinoico.

En el presente trabajo se ha demostrado que BRG1 regula la actividad transcripcional de MYC (Figura 3.7 y 3.8). Previamente se publicó que la exposición al RA y DEX reducía los niveles de MYC (Doyle et al., 1989). Ante este escenario, se planteó la hipótesis de que BRG1 podría ser necesario para regular dicha disminución en la expresión de MYC en respuesta a RA y DEX. Tal y como se muestra en la figura 3.16, después de tratar las células con los diferentes compuestos, sólo aquellas que expresan BRG1 salvaje mostraron una reducción apreciable de la proteína MYC. Estas observaciones confirman que, efectivamente, la presencia de BRG1 activo es necesaria para reducir los niveles de MYC en respuesta a RA y DEX (Figura 4.16). A continuación, y para profundizar en las bases moleculares que subyacen a los cambios morfológicos derivados del tratamiento con RA y DEX, se determinó, para cada tratamiento hormonal, la especificidad y la dependencia de la modulación de la transcripción de 13 genes, seleccionados entre aquellos contenidos en la firma de BRG1 (Tabla 1 Anexo). En la Figura 3.16 se representa un *heatmap* con un resumen de los resultados. Los cambios transcripcionales se pudieron agrupar como: A) no relacionados o moderadamente relacionados con el RA o DEX (*IL11*, *ACP5*), B) dependientes de RA (*SPARC*, *TIE1*), C) dependientes de DEX (*FBLIM1*, *MCAM*, *PCDH1*, *SERPINE1*, *TAGLN*, *WNT7B*) ó D) dependiente de ambos RA y DEX (*AQP1*, *MYC*). En el caso de *HES1*, cuya expresión disminuía al restituir BRG1 y al cultivar las células en un medio convencional con FBS, se observó un fuerte incremento en su expresión después del tratamiento con RA o con DEX. Este efecto se producía de forma independiente a BRG1. Es interesante observar que algunos transcritos dependientes de DEX, tales como *FBLIM1*, *SERPINE1* y *TAGLN*, están relacionados con el citoesqueleto de actina (Goodman et al. 2003; Tu et al. 2003; Ghosh et al. 2011) y pudiera ser que contribuyan a los cambios fenotípicos de reorganización de fibras de actina y tubulina observados al tratar las células con DEX (Figura 4.14).

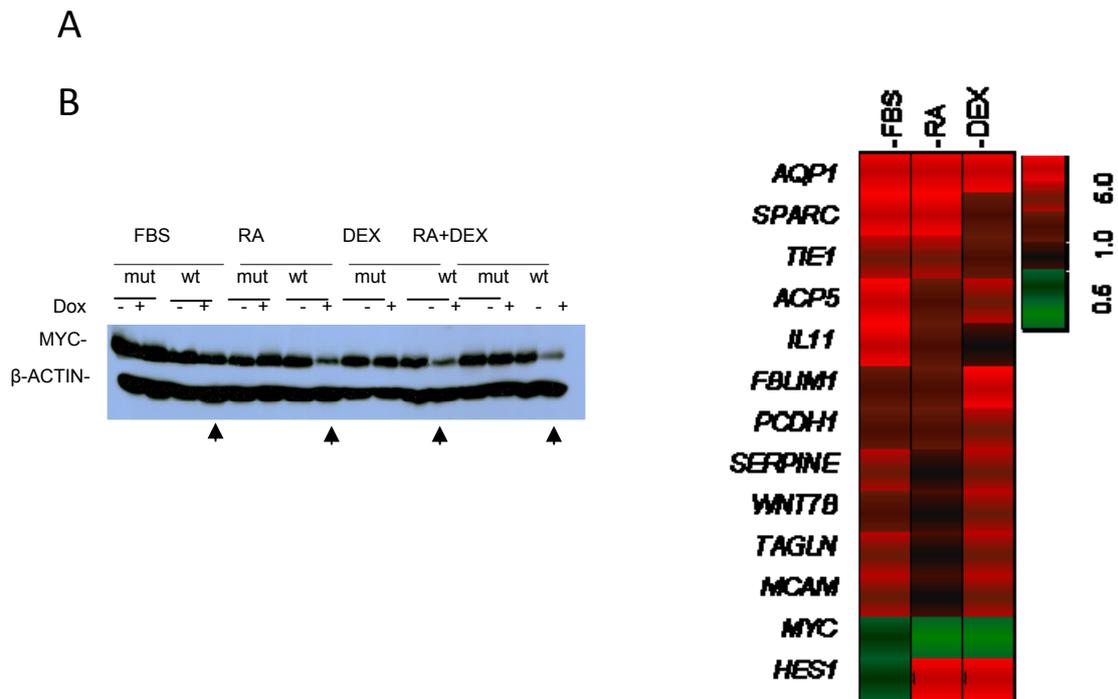


FIGURA 4.16. Cambios de expresión inducidos por RA y DEX y dependientes de BRG1. **A**, Reducción de los niveles de MYC, medidos por western Blot, en las células que recuperan la expresión de BRG1 después de ser tratadas 0.5 μ M RA ,1 μ M DEX, ambos (RA+DEX) durante 24h o no tratadas mantenidas en FBS (*fetal bovine serum*). Se utilizó β -ACTINA como control de carga. **B**, Heatmap representativo de los niveles de expresión de los diferentes genes, en los diferentes tratamientos o mantenidas en FBS en la línea H1299tr-BRG1wt. Los niveles de expresión son relativos a un control interno (*GUSB*) y relativos a su vez a los niveles alcanzados en la línea control H1299tr-BRG1mut, para cada condición.

Reclutamiento dinámico de BRG1 y MYC en los promotores de las dianas transcripcionales de los receptores de corticoides y ácido retinoico

Habiendo demostrado que BRG1 es necesario para mediar la respuesta, en forma de cambios fenotípicos y de expresión, a los tratamientos con DEX y RA (Figura 4.12 a 4.16), se planteó la cuestión de si dichos cambios implicaban cambios mecánicos en el reclutamiento de BRG1 a los promotores de dichos genes. Para comprobar los mecanismos moleculares que subyacen a esta dinámica, se utilizó la técnica de CHIP, utilizando nuevamente un anticuerpo específico contra BRG1. En esta ocasión se observó un patrón dinámico en las uniones de BRG1 a los promotores de los genes, donde el reclutamiento de BRG1 se asociaba coherentemente con el aumento o disminución en el patrón dinámico de expresión que se producía en cada caso, tras los diferentes tratamientos hormonales (Figura 4.17). Por ejemplo, en el caso de *SPARC* cuya expresión se inducía tras el tratamiento con RA pero no con DEX, BRG1 es reclutado en su promotor sólo cuando se recupera la forma salvaje de BRG1 y en las células tratadas con RA.

Asimismo, *SERPINE1*, cuya expresión se incrementa notablemente tras el tratamiento con DEX, presenta reclutamiento específico de BRG1 a su promotor sólo cuando las células se trataron con DEX. Por otro lado, *AQP1*, cuya expresión se incrementa en todas las condiciones testadas, presentaba enriquecimiento de BRG1 en su promotor también en todas las condiciones.

Posteriormente, se determinó la dinámica de reclutamiento de MYC a los promotores de sus dianas transcripcionales, en función de los diferentes tratamientos y su potencial dependencia de la recuperación de BRG1. El patrón de reclutamiento de MYC a los promotores de los genes tras el tratamiento con DEX y RA, la co-ocupación de MYC y BRG1 en dichos promotores y su relación con los cambios de expresión de los mismos, se mostró muy compleja y diferente, en función de cada diana transcripcional (Figura 4.17). Por ejemplo, la expresión de *AQP1*, una diana transcripcional de MYC y un transcrito específico de pulmón, aumenta tras el tratamiento con DEX o RA y, este cambio en la expresión es acompañado con un reclutamiento de MYC a su promotor en ambas condiciones. Sin embargo, el caso de *SERPINE1* otra diana que presentaba un incremento de su expresión tras el tratamiento con DEX, mostró reclutamiento de MYC a su promotor tras el tratamiento tanto con DEX como con RA. En conjunto, los datos mostraron que la ocupación de BRG1 en los promotores es un proceso muy dinámico que se adapta y varía para ajustarse los diferentes ambientes a los que se expone a las células.

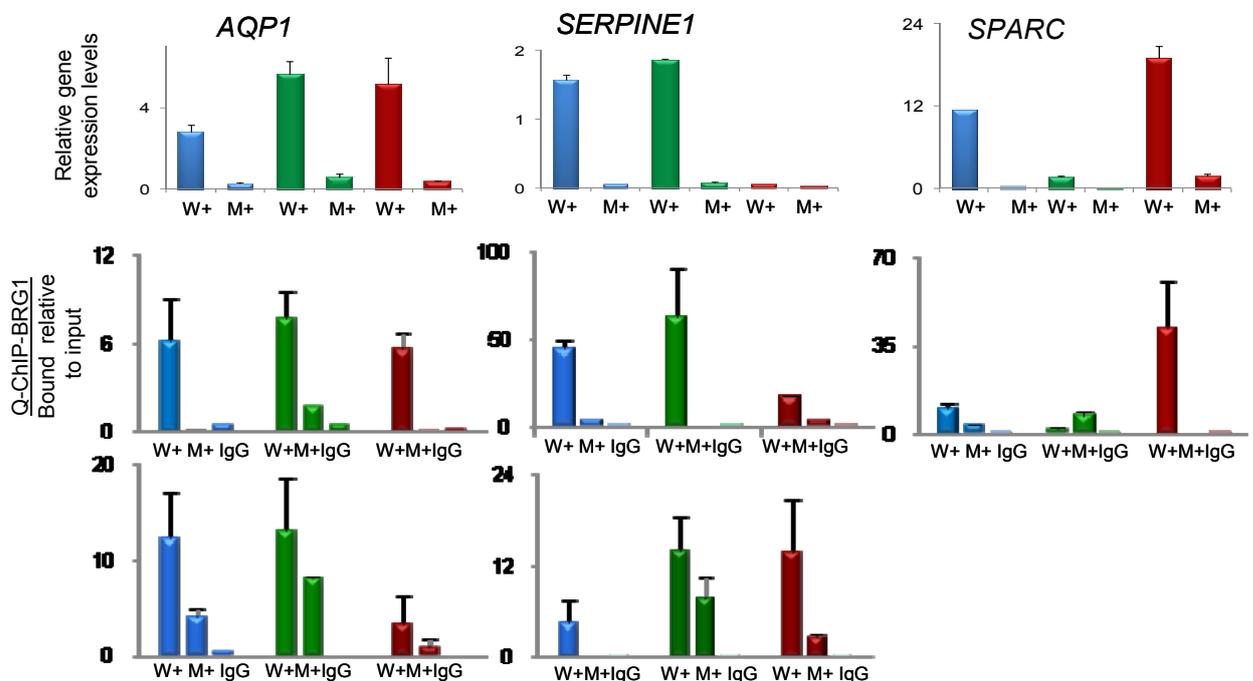


FIGURA 4.17. A, Niveles de expresión de los diferentes transcritos relativos a *GUSB*, en cada condición, después de la inducción de la expresión de BRG1 en la línea H1299tr-BRG1wt (W+) o en la H1299tr-BRG1mut (M+). Las barras azules indican los valores en alcanzados en cultivos con FBS, *fetal bovine serum*; Las barras rojas indican, el tratamiento con RA; las barras verdes, en tratamiento con DEX. **B**, Panel superior: ChIP de BRG1 en las células W+ o M+, después de la inducción de BRG1 para cada condición (azul, FBS; rojo, RA y verde, DEX), seguido de PCR

cuantitativa, para determinar el enriquecimiento relativo al input de BRG1, en los promotores de los genes. Los inmuprecipitados con IgG se usaron como control negativo. Panel inferior: ChIP de MYC en las células W+ o M+, después de la inducción de BRG1 para cada condición, seguido de PCR cuantitativa. Los inmuprecipitados con IgG se usaron también como control negativo

La supresión de la expresión de MYC, tras el tratamiento con RA o DEX, requiere de un desplazamiento en la ocupación de BRG1 dentro del locus de MYC.

Una vez demostrada la relación funcional entre MYC y BRG1 y, con el objetivo de establecer la causa de la reducción en la expresión de MYC tras la recuperación de la expresión de BRG1, se determinó si existía un reclutamiento específico de BRG1 en el locus de MYC. Con este fin, se utilizó de nuevo la técnica de ChIP y el posterior análisis, por PCR cuantitativa, de 44 fragmentos solapantes a lo largo de más de 10-Kpb del locus de MYC (Figura 418A-B). Los resultados mostraron que, previo al tratamiento con RA o DEX, BRG1 ocupaba preferencialmente regiones intrónicas en las siguientes posiciones: -1860 a -1600; +755 a +1600 y +3800 a +4165-pb desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen MYC. Sin embargo, la exposición de las células a RA o DEX provocó un cambio en la ocupación de BRG1, desde su posición en regiones eminentemente intrónicas, al sitio de inicio de la transcripción (TSS) y a regiones correspondientes con los exones de MYC. Así pues, los datos muestran que el posicionamiento de BRG1 en la región TSS y en los exones se asocia a una disminución de los niveles de MYC. Asimismo, la forma mutante de BRG1 no mostró ocupación específica en ninguna de las condiciones testadas (Figura 4.18C). Fue interesante comprobar que las regiones donde se observaba reclutamiento de BRG1 coinciden con aquellas altamente conservadas entre los vertebrados, indicando que dichas regiones tienen una importante función reguladora para el control de la expresión de MYC (Figura 4.18B). Estos datos sugieren que, a través de la inactivación de BRG1, las células tumorales evitan una óptima represión transcripcional de MYC, dejando unos niveles constitutivamente elevados de expresión de este oncogen.

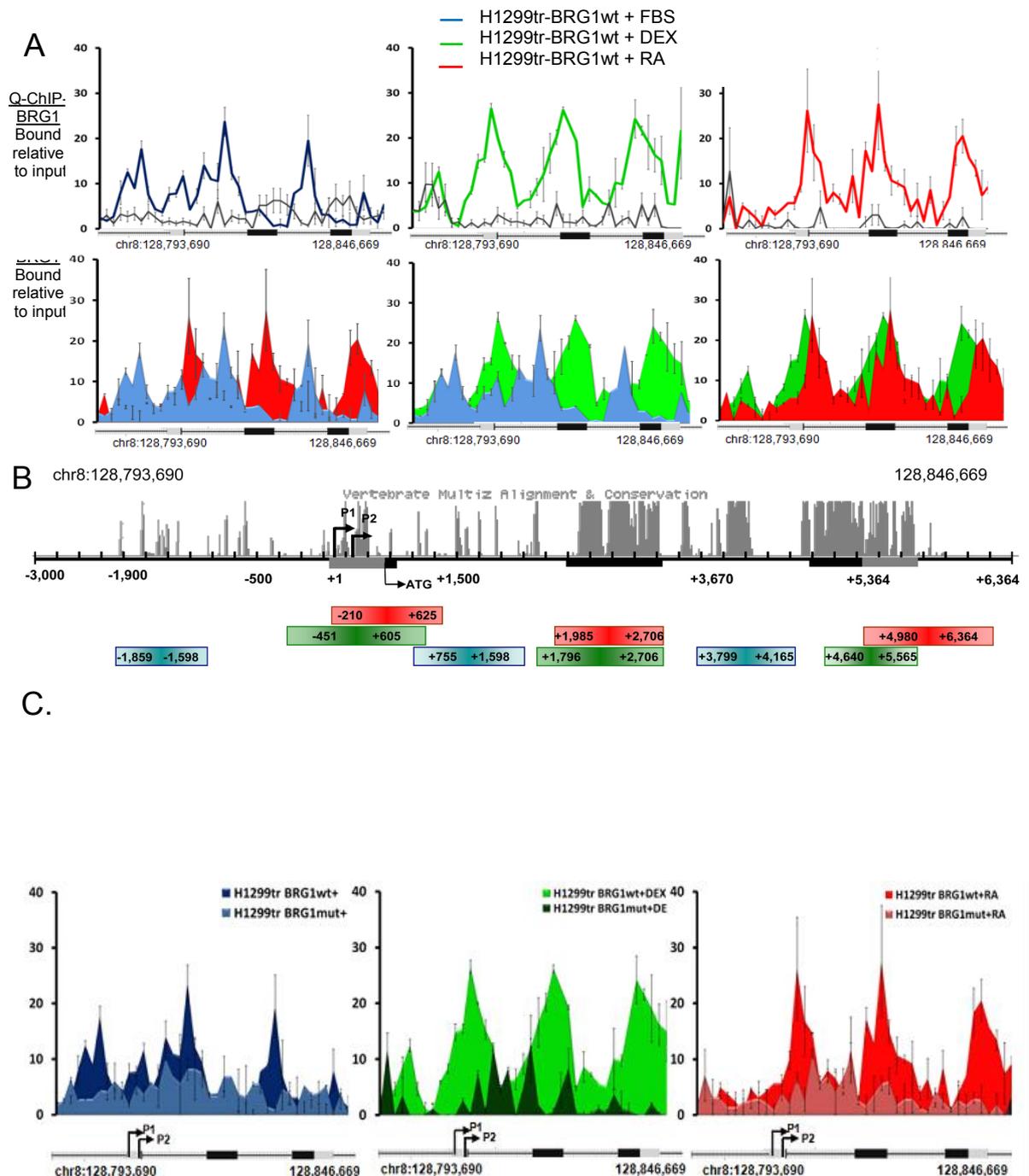


FIGURA 4.18. ChIP de barrido que muestra el enriquecimiento de BRG1, relativo al input, en el locus de *MYC*, en diferentes condiciones. **A**, En el panel de arriba, las líneas azul, roja y verde hacen referencia al enriquecimiento de BRG1 en células cultivadas en condiciones de FBS, RA y DEX respectivamente. La línea negra muestra el control de inmunoprecipitación, IgG. En panel de abajo se muestra una comparación, por parejas, de los diferentes lugares de unión de BRG1 al locus de *MYC*, respetando el código de colores anterior, para cada condición. **B**, Representación del locus humano de *MYC*. Se indican las zonas conservadas evolutivamente (áreas verticales grises), los exones (cajas negras), las regiones 5' y 3' UTR (cajas grises a ambos extremos). Las cajas azules, rojas y verdes esquematizan

las principales posiciones de enriquecimiento de BRG1, numeradas en relación al TSS, para cada una de las condiciones de cultivo. Los promotores mínimos de *MYC*, P1 y P2, también están indicados. C, Se muestra una comparación de pares entre la señal específica de BRG1 salvaje y la señal obtenida con el mutante.

La recuperación de BRG1 en líneas deficientes restituye la respuesta a RA mientras que interferencia en la expresión de BRG1 evita la diferenciación inducida por RA

Con el objetivo de corroborar por otros medios la relación entre BRG1 y la respuesta a RA, se determinó la capacidad de un panel de líneas celulares de cáncer, incluyendo la línea parental utilizada en nuestro modelo NCI-H1299, de incrementar los niveles de expresión del citocromo *CYP26A1* en respuesta a RA. *CYP26A1* tiene regiones de unión al receptor de RA y es una diana transcripcional bien conocida de esta hormona. Está bien establecido que *CYP26A1* codifica para una enzima necesaria en el metabolismo del RA y que se incrementa en aquellas células que muestran respuesta a este compuesto (Rochette-Egly et al. 2000). Del conjunto de líneas utilizadas, se observó que aquellas portadoras de mutaciones inactivadoras en *BRG1* eran completamente refractarias a la inducción de *CYP26A1* por RA, mientras que las células con amplificación de *MYC* mostraban una capacidad moderada de incrementar *CYP26A1* dependiente de RA (Figura 19). Por otra parte, la línea SH-SY5Y, derivada de un neuroblastoma y utilizada de forma general como modelo de respuesta a RA mostraba un incremento muy significativo de *CYP26A1* como respuesta al tratamiento con RA. La recuperación de BRG1 en las líneas H1299tr-BRG1wt restituyó esta de forma clara la capacidad de incrementar los niveles del citocromo (Figura 4.19A). Además de líneas de cáncer de pulmón, estas observaciones fueron confirmadas en líneas celulares derivadas otros tipos de cáncer, en concreto en las líneas Hs578T y DU145, derivadas de cáncer de mama y próstata, respectivamente. Ambas líneas celulares son deficientes en *BRG1* debido a mutaciones inactivadoras (Wong et al., 2000) Tal y como se muestra en la figura 4.19B, los niveles de *CYP26A1* aumentaban de forma muy significativa después de transfectar con la forma salvaje de BRG1, pero no con la forma mutante.

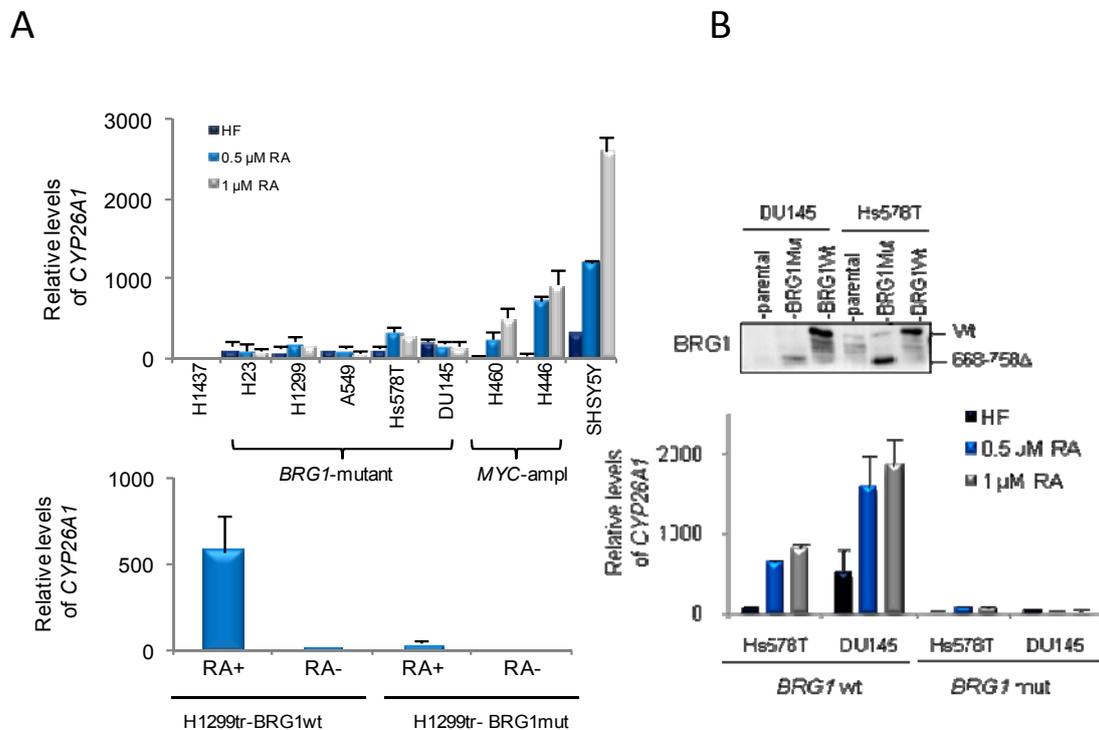


FIGURA 4.19. Niveles de expresión de *CYP26A1* relativos al control de carga *GUSB*. **A**, en un panel de líneas tumorales y en las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, tratadas con diferentes concentraciones de RA o mantenidas en medio libre de hormonas (HF). La presencia de mutaciones en *BRG1* y amplificación de *MYC* para las diferentes células está indicado. La línea celular de pulmón H1437 y el neuroblastoma SH-SY5Y no presentan mutaciones en *BRG1* ni tienen amplificación en *MYC*. **B**, en las líneas celulares Hs578T y DU145 derivadas de tumores de mama y próstata, respectivamente, después de la reintroducción de BRG1 salvaje ó mutante y tratadas con RA o mantenidas en medio HF. El western-blot muestra la expresión ectópica de BRG1 y su versión mutante en la Hs578T, Obsérvese que la línea parental muestra niveles endógenos, aunque inactivos de BRG1, debido a una mutación homocigota de cambio de aminoácido (p.Pro197Ser) (Wong et al., 2000). Barras de error, muestran la desviación estándar de tres réplicas.

A continuación se utilizaron métodos de interferencia de RNA para acabar de demostrar el requerimiento de BRG1 para una respuesta adecuada a RA. Se interfirió la expresión de BRG1 en líneas celulares salvajes para BRG1 que responden a RA, en concreto la línea SH-SY5Y, derivada de un neuroblastoma y la H446 de cáncer de pulmón (Pahlman et al. 1984; Geradts et al. 1993). Para ello, las células fueron infectadas con cinco lentivirus que portaban diferentes shRNAs contra BRG1. Dos de ellos, shRNAs # 1 y # 4, redujeron los niveles de BRG1 de forma consistente en un 80 y el 90% en la línea H446 y hasta el 50 y el 60% en la SH-SY5Y (Figura

4.20B). Para asegurar que el efecto fenotípico obtenido tras la interferencia era debido a la pérdida de expresión de BRG1, se tuvo especial cuidado en controlar los niveles endógenos de BRM, que es otra ATPasa del complejo SWI/SNF, similar en secuencia a BRG1 (Kwon et al., 2007). En los experimentos se determinó que los niveles de BRM eran altos en la línea H446 y bajos en la SH-SY5Y. Los niveles de expresión de BRM no se vieron afectados por los shRNAs # 1 y # 4 (Figura 4.20A). El tratamiento con RA producía una disminución notable de los niveles MYC en las células SH-SY5Y, mientras que en la línea H446 éstos no se modificaban, probablemente debido a que estas células tienen amplificación génica de *MYC*. Por otro lado, la interferencia de BRG1 impidió la disminución de MYC y de su diana transcripcional *NCL* (nucleolina), tras el tratamiento con RA (Figura 4.20C).

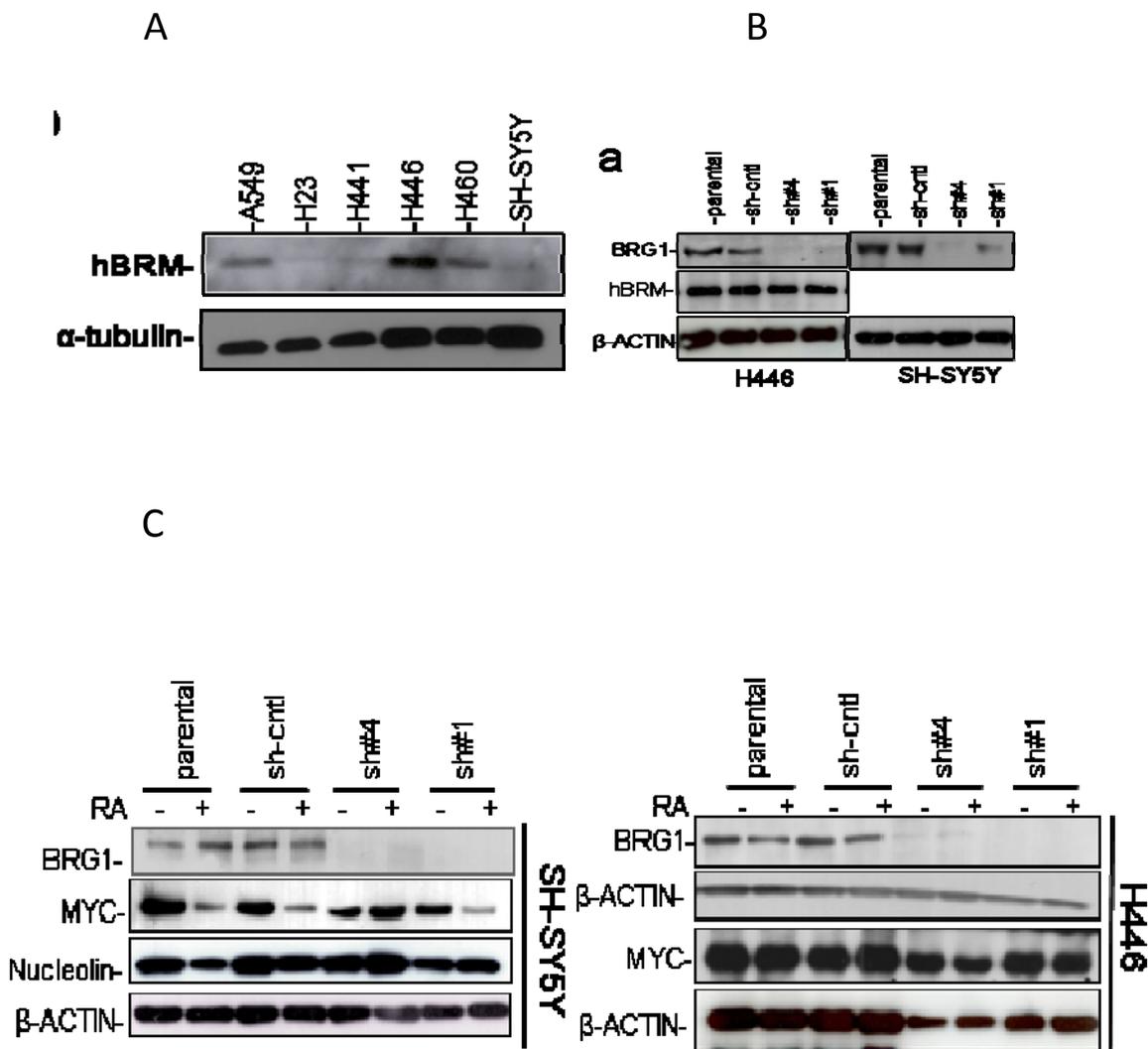


FIGURA 4.20. A. Western blot de BRM en un panel de líneas celulares. La α -tubulina se utilizó como control de carga. B. Western blot de BRG1 y BRM en las líneas H446 y SH-SY5Y, tras la infección lentiviral con los shRNAs contra BRG1. Los niveles de BRM no cambiaron. La β -actina se utilizó como control de carga. C. Inhibición de la expresión proteica, con dos shRNAs contra BRG1 (sh#1 and sh#4). En la SH-SY5Y inhibe la capacidad de las células de reducir los niveles de MYC y de su diana transcripcional Nucleolina, tras el tratamiento con RA. El shRNA

scramble (sh-cntl) fue usado como control. En la línea H446, la inhibición en la expresión de BRG1 no alteró los niveles de MYC, debido a su expresión constitutiva, provocada por amplificación génica de MYC en esta línea. Además de prevenir los cambios en los niveles de MYC, cuando se interfería BRG1 no se observaba el incremento en los niveles de *CYP26A1*, al tratar con RA. Esto sucedía en mayor medida en la línea SH-SY5Y, aunque también en la H446 (Figura 4.21).

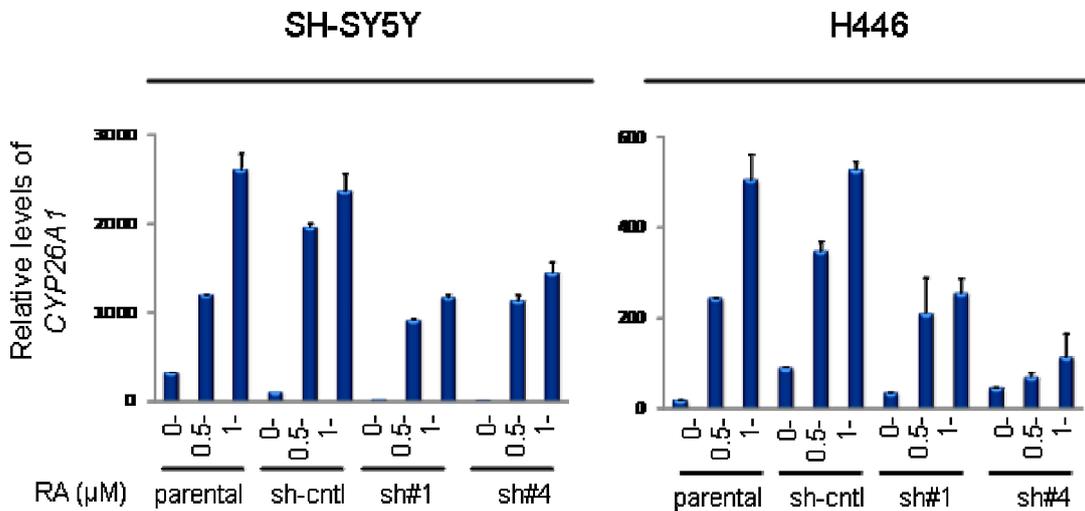


FIGURA 4.21. Niveles de expresión de *CYP26A1*, relativos al control de carga *GUSB*, después de inhibir la expresión de BRG1 en la línea SH-SY5Y y la H446 tras el tratamiento con RA durante 24 h.

Es conocido que el tratamiento con RA provoca unos cambios morfológicos muy notables en la línea SH-SY5Y, diferenciando terminalmente las células, que adquieren un fenotipo marcadamente neuronal (Pahlman et al. 1984). En el presente trabajo se pudo comprobar que la interferencia de BRG1 impedía dichos cambios morfológicos asociados a la diferenciación por RA (Figura 4.22). Por otra parte, la línea celular H446, salvaje para *BRG1* y con amplificación conocida de *MYC*, no sufre cambios morfológicos evidentes tras tratar con RA (Geradts et al., 1993). Sin embargo, se observó que la interferencia de *BRG1*, produjo la aparición de un número significativo de masas esféricas de células que crecían dinámicamente tanto en suspensión como adheridas a la placa (Figura 4.22). Estos cambios se observaban en experimentos realizados con ambos shRNAs.

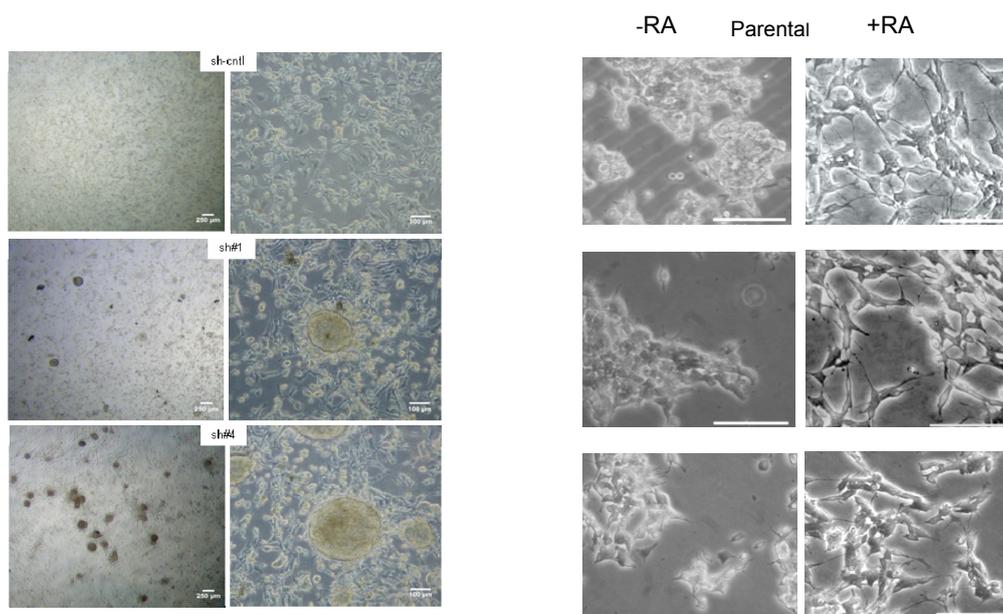


FIGURA 4.22. Imágenes de contraste de fase, de las células indicadas, tras la inhibición en la expresión de *BRG1* antes y después del tratamiento con RA. Escala, 100 μm . **A**, Línea celular SH-SY5Y, se observa una falta de capacidad de las células interferidas con *BRG1* (sh#4) de adquirir un fenotipo claramente diferenciado, en comparación con los cambios observados en la célula parental y en el control (sh-scramble). **B**, Línea celular H446, se aprecian cambios en la morfología celular solo al interferir *BRG1*, pero no en la línea parental o en el control (sh-scramble).

La recuperación de BRG1 en modelos xenograts y ortotópicos de cáncer de pulmón reduce la formación de tumores, inhibe la capacidad invasiva y aumenta el tiempo medio de supervivencia.

Para poder comparar la capacidad tumorigénica de las líneas H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut, *in vivo*, se realizaron distintos experimentos en ratones. El primero constituye un modelo de inyección subcutáneo estándar en ratones *atímicos nu/nu* (*Nude-Foxn1nu*). En este modelo se midió la capacidad de crecimiento de ambas sub-líneas, en función de la presencia o ausencia de BRG1. Para ello, se inyectó en cada ratón y a ambos lados de la espalda, las células H1299tr-BRG1wt ó H1299tr-BRG1mut, con o sin inducción de BRG1 con doxiciclina. En total se evaluaron cuatro tipos de implantes xenográficos, con un número total de 6 implantes por cada tipo: 1) H1299tr-BRG1mut no inducidos (MUT); 2) H1299tr-BRG1mut inducidos (MUT-dox); 3) H1299tr-BRG1wt no inducidos (WT) y 4) H1299tr-BRG1wt inducidos (WT-dox). Para inducir la expresión de BRG1 se añadió doxiciclina al agua de bebida. En el grupo de tumores inducidos, se observaron diferencias de crecimiento de modo que los tumores que expresaban BRG1 mutantes eran de mayor tamaño que aquellos que expresaban BRG1 salvaje. Por el contrario, en el grupo de tumores no inducidos, el tamaño de los tumores era similar (Figura 4.23).

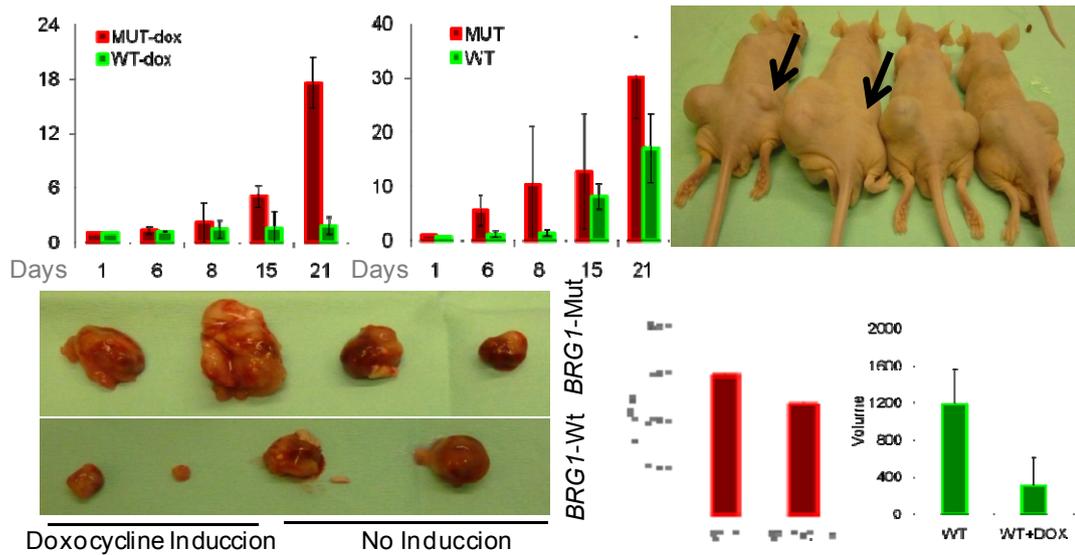


FIGURA 4.23. Efecto de BRG1 en implantes de células tumorales en ratones inmunodeprimidos. **A**, análisis comparativo de la progresión del tamaño de los tumores xenográficos. Barras rojas, H1299tr-BRG1mut; Barras verdes, H1299tr-BRG1wt inducidos (dox) o no inducidos con doxiciclina. **B**, imagen representativa de ratones tratados, dos de la derecha, y no tratados, dos de la izquierda, con doxiciclina. Las flechas marcan ejemplos de tumores H1299tr-BRG1wt inducidos (dox). **C**, imagen macroscópica de varios de los tumores extraídos, en los diferentes grupos. **D**, Comparativa del promedio del volumen tumoral, en los diferentes grupos, H1299tr-BRG1wt y H1299tr-BRG1mut inducidos o no inducidos con doxiciclina. Las barras representan el volumen tumoral medio de cada grupo y la correspondiente desviación estándar.

En el segundo modelo de estudio, y para establecer unas condiciones lo más próximas posibles a la fisiología original del tumor, se implantaron las células en el parénquima pulmonar de los ratones inmunodeprimidos, usándose para este fin la técnica de inyección intrapulmonar. En este caso también se estudió el posible efecto de los tratamientos con DEX y RA. Los animales fueron distribuidos al azar en seis grupos diferentes, con un total de 18 a 20 ratones por grupo. Los grupos estaban compuestos por ratones inyectados ortotópicamente con: H1299tr-BRG1mut tratados con doxiciclina (grupo 1); H1299tr-BRG1wt tratados con doxiciclina (grupo 2); H1299tr-BRG1wt no tratados (grupo 3); H1299tr-BRG1mut tratados con doxiciclina, RA y DEX (grupo 4); H1299tr-BRG1wt tratados con doxiciclina, RA y DEX (grupo 5) y H1299tr BRG1wt tratados sólo con RA y DEX (grupo 6). Se observó que las células inyectadas dieron lugar a tumores ortotópicos y que fueron capaces de recuperar BRG1 mutante y salvaje cuando fueron tratados con doxiciclina, añadida en el agua de bebida (Figura 4.24A).

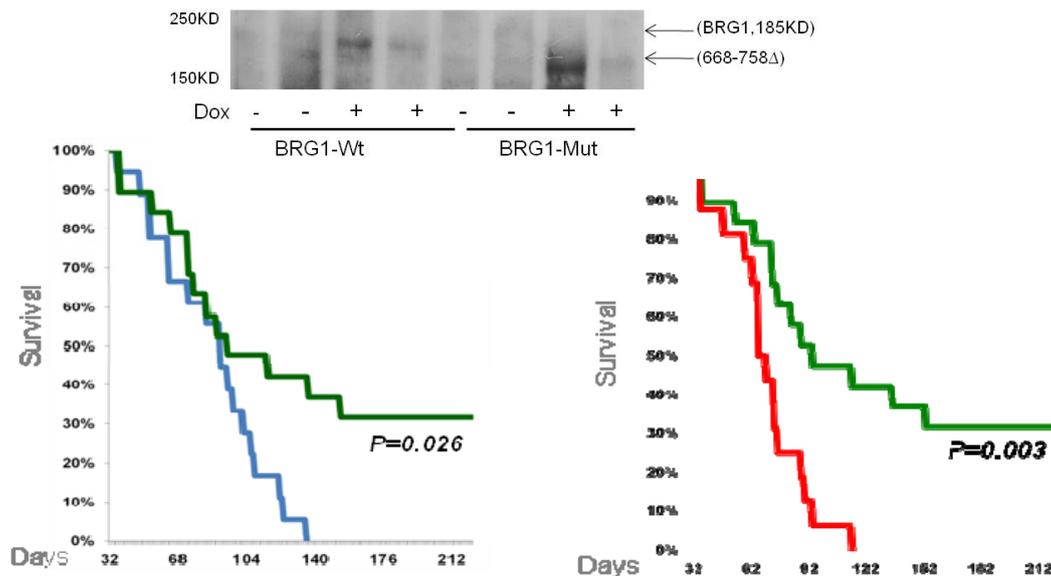


FIGURA 4.24. A, Western blot representativo de varios tumores ortotópicos de pulmón, que confirman la capacidad de recuperar la expresión de BRG1 en el modelo *in vivo*. **B,** Curvas Kaplan-Meier que muestran la probabilidad de supervivencia global en los diferentes grupos de ratones. La línea roja corresponde a H1299tr-BRG1mut tratados con doxiciclina (n=16); la línea verde corresponde a H1299tr-BRG1wt tratados con doxiciclina (n=19); y la línea azul corresponde a H1299tr-BRG1wt sin inducir la expresión de BRG1 (n=19). Los p-valores, se obtuvieron del análisis log-rank (Mantel-Cox).

El objetivo principal de este experimento fue la comparación de la supervivencia general en los ratones portadores de la línea H1299tr-BRG1wt y la línea H1299tr-BRG1mt. La supervivencia fue seguida durante 32 semanas (225 días). El análisis estadístico Log-rank (Mantel-Cox) (Figura X) reveló un aumento significativo en la supervivencia de los ratones en cuyos tumores se recuperó la expresión de BRG1 (grupos 2 y 5), que alcanzaron un tiempo de supervivencia media de $125,8 \pm 15,8$ días. En los ratones cuyos tumores expresaban la versión mutante de BRG1 (grupos 1 y 4) tan sólo se alcanzó un tiempo medio de supervivencia de $70 \pm 5,2$ días, significativamente inferior al grupo que expresaba la forma salvaje ($p=0,003$). Como control adicional, el grupo de ratones que fue implantado con la línea H1299trBRG1wt, pero sin expresión de BRG1, al no recibir doxiciclina, (grupos 3 y 6) alcanzó un tiempo medio de supervivencia de $87 \pm 6,5$ días, también significativamente inferior al grupo que expresaba la forma salvaje ($p=0,026$) y muy similar al que recuperó la versión mutante.

Además de la supervivencia global, se llevaron a cabo estudios histopatológicos de todos los tumores. Se pretendía investigar las características particulares de los tumores que se formaron en los diferentes grupos de ratones y que podrían explicar las diferencias en la agresividad de crecimiento del tumor provocada por la recuperación de BRG1. Para ello, se analizaron los tumores macroscópicamente e histopatológicamente. Como se muestra en la figura 4.24B, los tumores que expresaron BRG1 mostraron una marcada disminución en la

capacidad de invasión, es decir, tenían menos tumores que presentaban lesiones multifocales y con invasión en los tejidos adyacentes, al contrario de lo observado en los tumores de ratones que recuperaban BRG1 mutante o en aquellos en los que no se recuperó la expresión de BRG1. En estos grupos, las lesiones multifocales y el alto grado de invasividad estuvieron presentes en la inmensa mayoría de los individuos (Figura 4.25A). Estos análisis mostraron que en algunos de los tumores en los que se recuperó la expresión de BRG1 salvaje había presentes células con aspecto alargado, que recuerda a los cambios morfológicos adquiridos por las células H1299tr-BRG1wt en los cultivos después del tratamiento con RA y DEX (Figura 4.25B).

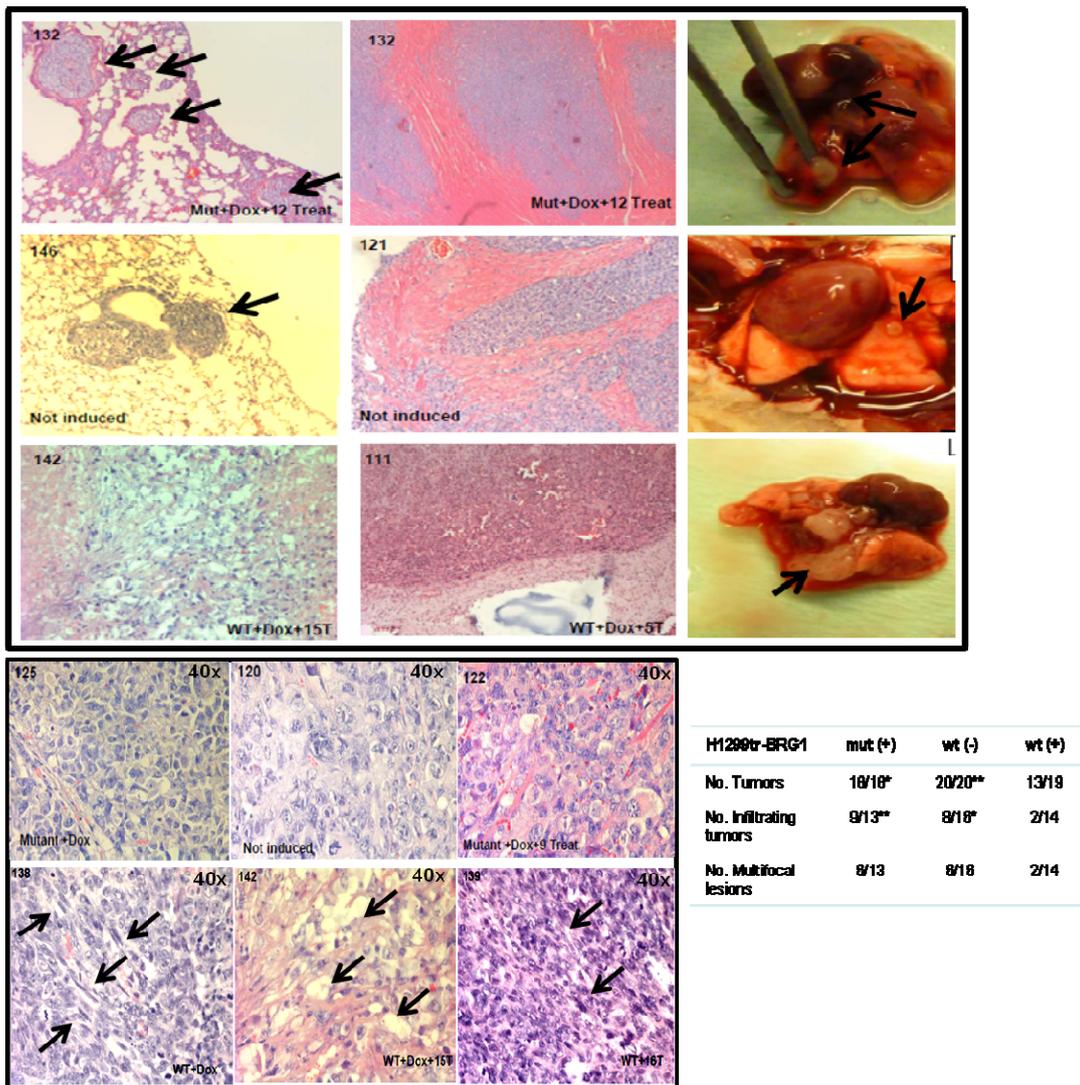


FIGURA 4.25. A. Análisis de los tumores formados por las líneas H1299tr-BRG1wt and H1299tr-BRG1mut cuando fueron implantadas ortotópicamente en el pulmón. **A,** En el panel de la izquierda y central se muestran imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) representativas de los tumores que se originaron en los distintos grupos. En el panel de la derecha se muestran imágenes macroscópicas de los tumores. **B,** Número de tumores y frecuencia de los tumores que presentaban características invasivas y presencia de lesiones multifocales. (+) y (-), indica que tumores están o no tratados con doxiciclina. 5 tumores H1299tr-BRG1mut (+), 4 tumores H1299tr-BRG1wt (-) y 5 tumores H1299tr-BRG1wt (+) no pudieron ser analizados. Los asteriscos señalan la significancia estadística (test de Chi-cuadrado) comparando los grupos H1299tr-BRG1mut (+) o H1299tr-BRG1wt (-) con H1299tr-BRG1wt (+). * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 . **C,** H&E representativas de los tumores generados en los ratones tras la inyección intrapulmonar con las diferentes líneas. Las flechas indican las células con apariencia alargada.

Por lo tanto, la restitución de BRG1 en tumores deficientes mejoró significativamente la supervivencia global y redujo la capacidad invasiva del tumor. Los tratamientos con RA y DEX no proporcionaron ventajas adicionales a la recuperación de BRG1, en la supervivencia o la reducción en la invasión tumoral en ninguno de los grupos. Es posible que los niveles de retinoides y corticoides presentes en el suero de los animales, en respuesta a los daños causados por la presencia de células tumorales, que pudieran llegar a ser incluso más elevados de lo normal debidos al stress y a la presencia de células tumorales, resulten suficientes para inducir respuesta. En este contexto, el tratamiento con RA y DEX exógenos no conferirían beneficios adicionales. Asimismo, se evaluó si los principales cambios de expresión identificados en las células en cultivo, eran extrapolables a los tumores ortotópicos que se formaron en los ratones. Para medir los cambios de expresión se extrajo el RNA de los tumores ortotópicos y se realizó RT-PCR cuantitativa a tiempo real con este material. Se observó que los tumores generados a partir de las células H1299tr-BRG1wt inducidas con doxiciclina, tenían unos niveles de *CYP26A1* y *RARB*, principales marcadores de respuesta a RA, más elevados que el resto de tumores. Al mismo tiempo, los niveles de *MYC*, eran significativamente menores en este grupo de tumores (Figura 4.26A). De la misma forma que el tratamiento con RA no incrementaba la supervivencia de los ratones cuyos tumores expresaban BRG1 salvaje, tampoco aumentaba los niveles de *CYP26A1* y *RARB* en ningún grupo de tumores. Los niveles de *MYC* en estos tumores también fueron determinados mediante inmunohistoquímica (Figura 4.26A), confirmando los resultados que arrojaba la RT-PCR cuantitativa.

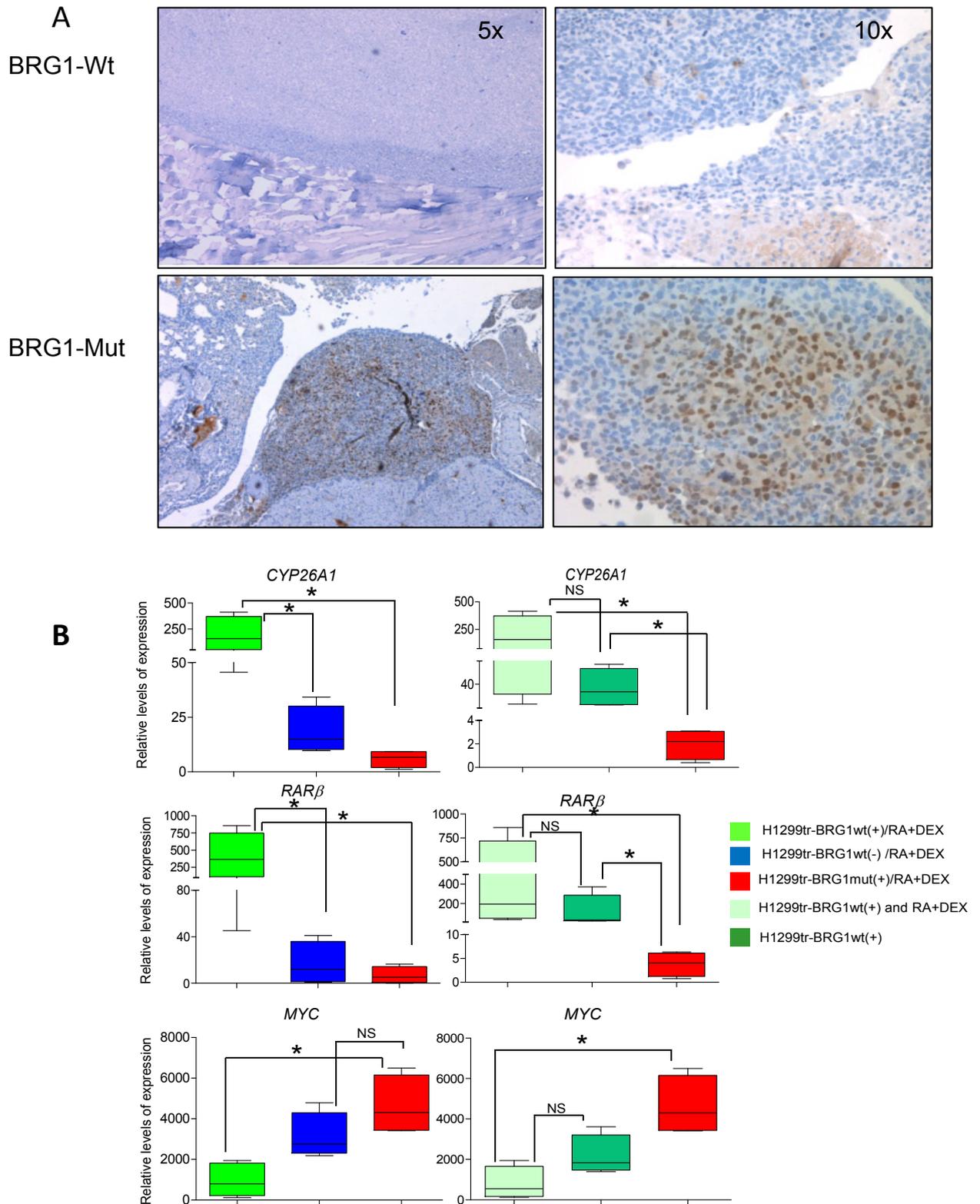


Figura 4.26. A, Análisis, por RT-PCR cuantitativa a tiempo real, de la expresión de tres de los principales genes diana del receptor del ácido retinoico en los tumores ortotópicos de pulmón, en función de la presencia o ausencia de BRG1 salvaje. **B,** inmunohistoquímica para determinar los niveles de proteína MYC, en los tumores ortotópicos de pulmón.

Actualización del análisis comparativo entre las alteraciones en MYC y en BRG1, en tumores y líneas celulares de cáncer de pulmón y en líneas celulares derivadas de neuroblastomas.

Finalmente, se valoró una serie de tumores de pulmón, dispuestos en microarrays de tejidos, que contiene muestras de 122 tumores primarios de pulmón de célula no pequeña. Sobre estos tumores se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos anti-MYC. Se compararon los resultados con los datos de inmunohistoquímica de BRG1, disponibles para estos tumores (Rodríguez-Nieto et al. 2011). Se observó que, de la misma manera que en las líneas celulares no co-existe la amplificación de MYC con la inactivación de BRG1, aquellos tumores que mostraban muy baja o nula expresión de BRG1 nunca fueron coincidentes con aquellos que mostraban niveles muy elevados de proteína MYC, lo cual es indicativo de una amplificación génica subyacente ($P=0,042$; Fisher Exact test) (Figura 4.27A).

Además, de la verificación en tumores primarios de pulmón, y teniendo en cuenta que en la base de datos de COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations In Cancer, <http://www.sanger.ac.uk>), ya se determina de forma sistemática el estado de BRG1 en líneas celulares, se pudo extender el análisis comparativo de mutaciones en BRG1 y amplificación en los genes de la familia MYC en un panel más amplio de líneas celulares de cáncer de pulmón ($n=65$). Estos nuevos datos siguen confirmando la naturaleza mutuamente excluyente de estos dos tipos de alteraciones genéticas ($P<0.0005$; Fisher Exact test)(Figura 4.27B). En la base de datos COSMIC, también existe información sobre el estado de BRG1 en otros tipos de cáncer, entre ellos los neuroblastomas. Este tipo de tumores se caracteriza por presentar amplificación del oncogen MYCN, con una frecuencia muy elevada. En dicha base de datos consta que uno de los neuroblastomas tiene una mutación inactivadora de BRG1. Tal y como se puede observar en la figura 4.27, dicho neuroblastoma no tiene amplificación de MYC. Aunque los datos no son significativos, dado el bajo número de tumores evaluados, los resultados son interesantes y sugieren que la relación mutuamente excluyente BRG1-MYC se podrá extender a otros tipos de cáncer.

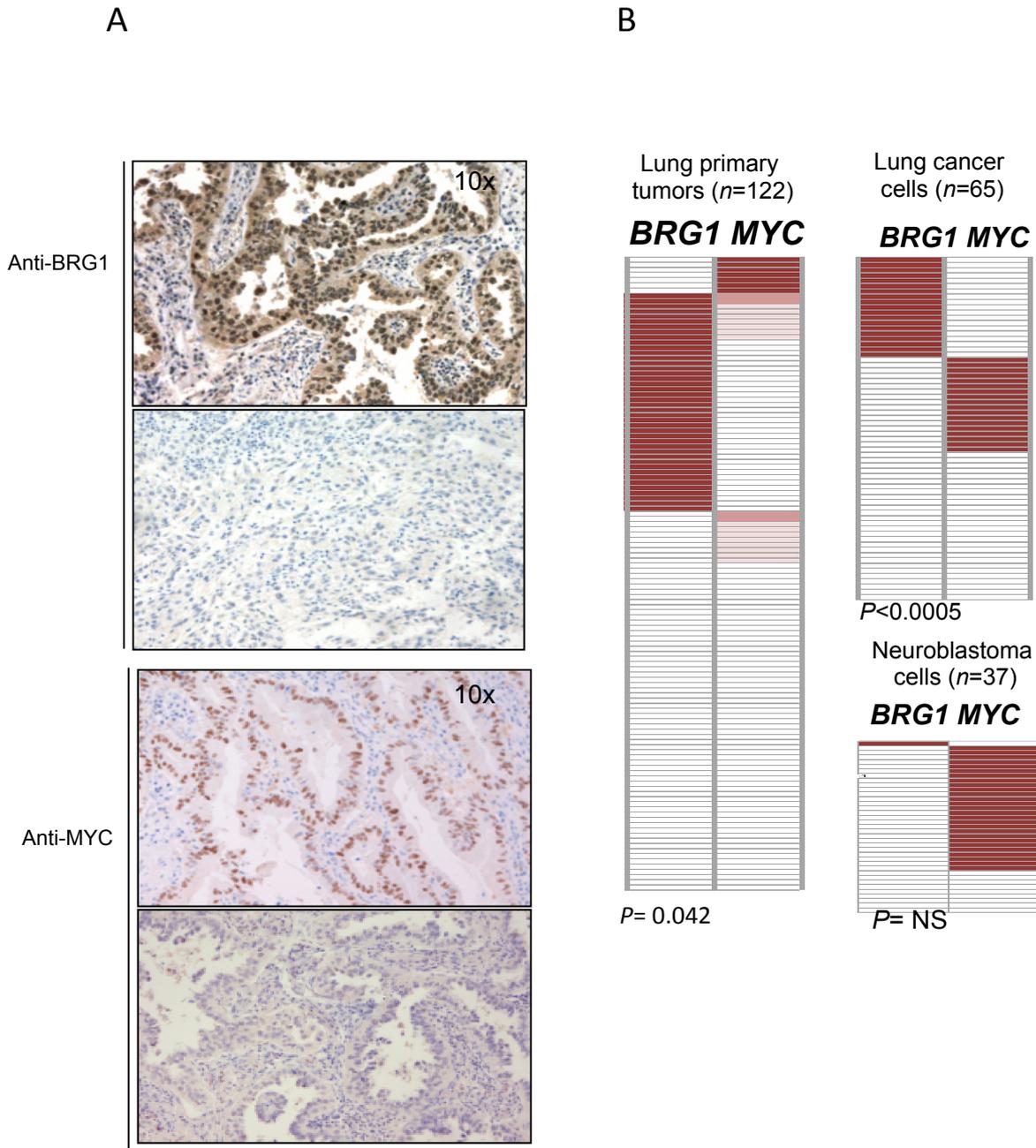


Figura 4.27. A, Ejemplo representativo del análisis de inmunohistoquímica de MYC y BRG1 en 122 tumores primarios de pulmón humanos dispuestos en microarrays de tejidos. **B**, En el panel de la izquierda, tabla esquemática que muestra los resultados globales de los 122 tumores primarios, donde se contrasta pérdida de expresión de BRG1 y sobreexpresión de MYC. En los paneles de la derecha, se representa la tabla esquemática que demuestra la presencia mutuamente excluyente de mutaciones en *BRG1* y amplificación de los oncogenes de la familia *MYC*, en líneas celulares de cáncer de pulmón y de neuroblastomas.

DISCUSIÓN

El análisis realizado en casi 60 líneas de cáncer de pulmón muestra una tasa de inactivación de *BRG1* en más de una tercera parte de los NSCLC, que por otra parte representa el subtipo histopatológico de aproximadamente el 80% de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. Acompañando esta observación se debe destacar también que todas las alteraciones se presentaron en homocigosis, ya que el alelo remanente se había perdido mediante LOH. Este dato muestra que *BRG1* cumple perfectamente el criterio de "two-hits" propuesto por Knudson (Knudson 1971) y confirma, de forma inequívoca, que *BRG1* es un gen supresor tumoral. En base a los datos presentados, *BRG1* constituye el cuarto gen más frecuentemente alterado en NSCLC, después de *TP53*, *P16/INK4A* y *LKB1*. Estos datos son muy relevantes y reflejan la importancia de *BRG1* en el desarrollo del cáncer de pulmón. Si bien un estudio previo había detectado mutaciones en *BRG1* en diferentes líneas celulares de cáncer, el bajo porcentaje de mutaciones identificado sugería que la importancia de este gen supresor tumoral en cáncer era escasa (Wong, Shanahan et al. 2000). Anteriormente se había descrito pérdida de expresión de *BRG1* en tumores primarios y líneas celulares de cáncer de pulmón, en un porcentaje aproximado del 30% (Reisman et al. 2003), aunque en dicho trabajo tan solo se reportó la pérdida de expresión en tumores primarios medida por técnicas de inmunohistoquímica, sin profundizar en la naturaleza o mecanismos que llevaban a la pérdida de expresión. Los datos del presente trabajo indican que la pérdida de proteína *BRG1* es debida, casi con toda seguridad a mutaciones en *BRG1*. Así pues, teniendo en cuenta la elevada frecuencia de mutaciones en el cáncer de pulmón identificadas en el presente trabajo, *BRG1* debe ser considerado como uno de los más importantes genes supresores tumorales conocidos, al menos en este tipo de cáncer.

También es importante destacar la naturaleza de las alteraciones identificadas en *BRG1*, ya que la práctica totalidad de éstas predecían para una proteína truncada. En los dos únicos casos en que las mutaciones no predecían para una proteína truncada: línea H1703 con una mutación en un sitio aceptor de *splicing* y H2126 con un cambio puntual de aminoácido, cabe destacar que las mutaciones recaían en un dominio altamente conservado y absolutamente crucial para la correcta función de la proteína, que es el caso del dominio ATPasa/helicasa (Revisado por Reisman et al.2009; Wilson & Roberts, 2011). Ello apoya que estas mutaciones afectan a la actividad de la proteína. Además, la naturaleza somática de la mutación en H2126, la única línea para la que se disponía de tejido normal del mismo paciente, descarta la posibilidad de que el cambio de aminoácido constituya un polimorfismo e indica claramente que se trata de una mutación originada en el proceso tumoral. Finalmente, los estudios de actividad de *BRG1* llevados a cabo mediante protocolo bien establecidos para este fin (Johnson, T.A., et al 2009) mostraron claramente que dichas formas de *BRG1*

mutantes, 668-758Δ y W764R, no tenían capacidad alguna de modificar la expresión del gen reportero dependiente del promotor MMTV, por lo que confirma la naturaleza inactivadora de estas dos formas mutantes para BRG1. La falta de actividad de estas mutaciones quedó también patente en los ensayos de formación de colonias. Dichos ensayos pusieron de manifiesto la capacidad de la forma salvaje de BRG1 de inhibir el crecimiento celular *in vitro*, reflejo directo de su capacidad supresora de tumores, mientras que las formas mutantes, incapaces de devolver al complejo su capacidad reguladora de la transcripción, no conseguían suprimir el crecimiento de las colonias. Estos ensayos, en conjunto, resaltan la importancia del dominio ATPasa y por lo tanto su capacidad como enzima remodelador de cromatina, para la actividad supresora tumoral de BRG1. En este sentido, otros trabajos donde se recupera la expresión de BRG1 en líneas deficientes para esta proteína, muestran que la introducción de *BRG1* es suficiente para revertir su fenotipo transformado. Este hecho ha sido asociado por algunos autores a que la actividad de BRG1 es capaz de provocar una parada en el ciclo celular mediada a través de la proteína Rb (Dunaief, Strober et al. 1994; Reisman, Strobeck et al. 2002; Kang, Cui et al. 2004)

La secuenciación de *BRG1* utilizando como material el cDNA también permitió identificar nuevas variantes transcripcionales del gen *BRG1*. En concreto, se observaron al menos cuatro isoformas de BRG1 que no habían sido previamente descritas y que se pudieron caracterizar, tanto en la composición de su secuencia a nivel de DNA como en la frecuencia de expresión de las mismas. Si bien la isoforma mayoritaria descrita (NM_003072.2) se detectó en aproximadamente la mitad de los transcritos testados, al menos dos de ellas, la variante que cuenta con una serina de menos y la que añade tres aminoácidos nuevos, se expresan en un porcentaje cercano al 20%. Teniendo en cuenta esta frecuencia relativamente elevada, sería interesante ahondar en la relevancia y el significado biológico de dichas variantes. En el presente trabajo no pudo detectarse la variante que contiene el exón 27 según la secuencia que consta en el GenBank. Dado que este análisis no contenía todos los tipos de tejidos humanos posibles, no se pudo determinar si esta variante constituye una isoforma muy minoritaria que se expresa específicamente en algún tejido o en un momento del desarrollo determinado o se trata de un error.

Actualmente, está ampliamente aceptado en cáncer el hecho de que las proteínas que actúan en una misma ruta biológica nunca se encuentran simultáneamente alteradas en un mismo tumor. Esto se podría explicar porque una doble alteración en una misma vía no confiere a la célula tumoral ninguna ventaja adaptativa nueva. En el cáncer de pulmón existen múltiples ejemplos de este fenómeno, como son las alteraciones mutuamente excluyentes en *RB* y *P16/INK4A* o en *KRAS*, *EGFR*, *ERBB2* y *MET*. El presente trabajo muestra que las

mutaciones en *BRG1* conviven con alteraciones en *KRAS*, *LKB1*, *NRAS*, *P16/INK4A* y *TP53*, pero no con amplificación en ninguno de los genes de la familia *MYC*. Este último dato resulta muy interesante porque indica que existe una relación biológica en el cáncer, entre un supresor tumoral como es *BRG1*, y oncogenes muy importantes, como son los oncogenes de la familia *MYC*. Esta relación de mutua exclusividad en las alteraciones podría, a su vez, explicar la baja tasa de mutaciones detectadas en el subtipo histopatológico SCLC, ya que en este subtipo las alteraciones de los genes *MYC*, *L-MYC* y *N-MYC* son mucho más frecuentes que en NSCLC (18% en SCLC *versus* 8% en NSCLC (Shiraishi, Noguchi et al. 1989; Richardson and Johnson 1993).

En este trabajo se describe una firma de expresión de *BRG1*, establecida al restituir *BRG1* de forma estable e inducible, en una línea celular de cáncer de pulmón. Esta firma de expresión contenía elementos que participan conjuntamente en los procesos de desarrollo embrionario, organogénesis y diferenciación. También se observó que muchos de los genes recuperados en el modelo de pulmón son también elementos de respuesta a las señales del factor transformante de crecimiento β (TGF- β) (Xi et al, 2008), uno de los reguladores más importantes de los procesos de diferenciación en mamíferos. Todos estos procesos han sido relacionados con la función de *BRG1* y con los complejos SWI/SNF en tejido muscular y neuronal, entre otros (De la Serna et al, 2001, Seo et al, 2005). Cuando la firma de expresión de *BRG1* se contrastó con perfiles de expresión de bases de datos públicas, fue interesante comprobar cómo dicha firma de expresión reproducía de forma muy consistente el patrón de expresión del tejido pulmonar sano. Además, y dado el papel de los complejos SWI/SNF en desarrollo, se comparó la firma de expresión de *BRG1* con los cambios de expresión que se producen durante el desarrollo embrionario del pulmón, extraídos también de bases de datos públicas, y nuevamente se vio una relación directa entre la firma de *BRG1* y los pulmones de embriones en estados avanzados, al compararlos con estados tempranos. Todas estas observaciones sugieren que la inactivación de *BRG1* en el cáncer previene la diferenciación o promueve la desdiferenciación de las células. Estas observaciones serían compatibles con uno de los papeles atribuidos a los complejos SWI/SNF, donde la pérdida de SNF5/INI1, otro supresor tumoral del complejo SWI/SNF, se ha asociado con la activación de los programas asociados a células madre y su auto-renovación (Wilson et al., 2010). En este respecto nuestras observaciones irían en la línea de observaciones anteriores y otros datos que aparecieron durante el desarrollo de este trabajo, donde se asocian la función de los complejo SWI/SNF y a *BRG1*, con la diferenciación de tejidos normales sanos, en los cuales *BRG1*, participa activamente en la diferenciación de los osteoclastos (Flowers, S. et al. 2009), o los trabajos donde se asocia la función de BAF60, miembro de los complejos SWI/SNF, con el desarrollo del

corazón (Lickert, h. et al 2004). También es interesante mencionar los descubrimientos de complejos SWI/SNF específicos de tejido, que mantienen los programas de expresión propios de cada tipo celular como ocurre en el desarrollo neuronal (Lessard, J. et al 2007) o el descubrimiento del esBAF, un complejo SWI/SNF de composición particular que mantiene los programas de las células madre pluripotenciales (Ho, L. et al.2009). De la misma manera, otros trabajos reflejan como la pérdida de miembros de los complejos SWI/SNF, como en el caso de SNF5/INI1, provocan la aparición de tumores rhabdoides compuestos por células muy agresivas e indiferenciadas (Versteeg, I. et al 1998).

Apoyando el papel de BRG1 en diferenciación, otro de los elementos llamativos de la firma de expresión de BRG1 en el modelo de pulmón, fueron un conjunto de genes que están directamente controlados por receptores nucleares, destacando el receptor de glucocorticoides y el receptor de ácido retinoico (ver tabla suplementaria 1). La pérdida de la capacidad de respuesta a glucocorticoides (GC) y a ácido retinoico (RA) es un fenómeno conocido en el cáncer de pulmón, y en otros tumores sólidos, independiente de que los tumores expresen o no los receptores nucleares correspondientes (Kim et al, 1995; Waters et al, 2004). Los GC y el RA juegan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario del pulmón y en la función normal del pulmón (Malpel et al, 2000; Cole et al, 2004). Además, es especialmente conocido el papel del RA y los GC en la prevención del cáncer de pulmón, ya que mantienen la homeostasis de dicho tejido. En este sentido, se ha descrito que la deficiencia de RA genera tumores de pulmón en ratones (Saffiotti et al., 1967), mientras que la falta de respuesta a los GC, que están implicados en la disminución y control de los procesos inflamatorios en los epitelios del pulmón, constituyen un factor de riesgo para el cáncer de pulmón, especialmente en los fumadores (Shi et al., 2009). También se sabe que, en células sensibles, el RA induce cambios morfológicos que están relacionados con la diferenciación celular (Pahlman et al. 1984). Por otra parte, es conocido que existe una relación entre los receptores de hormonas con los complejos SWI/SNF. Por ejemplo, se ha publicado que la actividad remodeladora de los complejos SWI/SNF es necesaria para permitir la transcripción del receptor de RA y de los receptores de GC (Ostlund Farrants et al, 1997; Nagaich et al, 2004). Además, las proteínas BAF60c1 y BAF60c2, ambas subunidades de los complejos SWI/SNF interactúan físicamente con los receptores de RA (Flajollet et al., 2007). En general, los datos del presente trabajo ponen claramente de manifiesto que, en el contexto del cáncer, la inactivación de *BRG1* impide la respuesta de la célula al RA y GC, contribuyendo así al desarrollo de tumores de pulmón. Esto queda patente en varios de los resultados presentados.

Por una parte, se observa que los cambios morfológicos que se producen en las células de cáncer de pulmón como consecuencia de los tratamientos con GC y RA, en las mismas condiciones y dosis de tratamiento hormonal, durante el mismo periodo de tiempo, sólo suceden después de restituir BRG1 salvaje. En los modelos de trabajo presentados aquí, los cambios morfológicos fueron distintos en función de la hormona (RA o GC) y, a su vez, distintos de la combinación de ambas, hecho que pone de manifiesto la activación de distintos programas de expresión bajo el control directo de cada receptor nuclear. Especialmente en el caso del tratamiento con GC, los cambios morfológicos se asocian a una reorganización de las fibras de actina y de beta-tubulina. En este sentido, es interesante observar que algunos transcritos dependientes de la acción de los GC, como son *FBLIM1*, *SERPINE1* y *TAGLN*, están relacionados con la estructura y el citoesqueleto de actina (Goodman et al. 2003; Tu et al. 2003; Ghosh et al. 2011) y podrían explicar los cambios fenotípicos y la re-organización de fibras de actina y tubulina observados al tratar las células con dexametasona.

Por otra parte, se comprobó que la presencia de BRG1 era necesaria para inducir cambios de fenotipo asociados a la respuesta a RA en otros tipos de tumores, destacando muy especialmente los resultados en las células SH-SY5Y, derivadas de neuroblastoma. Es conocido que el tratamiento con RA en esta línea celular provoca unos cambios morfológicos muy notables, diferenciando terminalmente estas células que adquieren un fenotipo marcadamente neuronal (Pahlman et al., 1984). Tal y como se muestra en los resultados, esta habilidad se vio severamente comprometida en estas células al eliminar BRG1. En el contexto del papel fundamental de BRG1 para inducir cambios morfológicos en respuesta a RA, cabe también destacar los resultados de la interferencia de BRG1 en la línea de cáncer de pulmón H446, que tiene BRG1 activo pero no muestra cambios destacables derivados del tratamiento con RA. Sin embargo, la ablación del BRG1 provocó unos cambios dramáticos en el aspecto del cultivo, independientes de la presencia de RA, dando lugar a la formación de múltiples masas de esferas, de un aspecto fuertemente indiferenciado, que se mantenían en el cultivo, en una altísima proporción. Recientemente, se ha publicado que la línea H446 está formada por dos sub-poblaciones de células que probablemente representan dos diferentes subtipos histopatológicos de las mismas células: una sub-población minoritaria, compuesta de pequeñas células flotantes individuales, y otra sub-población mayoritaria, compuesta de células adherentes (Calbo et al., 2011). Sin embargo, no se puede concluir que la aparición de masas esféricas, observadas en el presente trabajo al interferir *BRG1*, se correspondan con el mismo tipo de células que se describió anteriormente, ya que la morfología observada no es coincidente. Asimismo, dichas esferas podrían indicar una disminución adquirida en el grado de diferenciación de las células, por lo que se podría especular sobre la posibilidad de haber

comprometido muy seriamente, al inhibir la expresión de BRG1 de forma efectiva, los programas de auto-renovación (*self-renewal*) y la capacidad de diferenciación de la línea. El requerimiento de BRG1 para la respuesta a RA también se confirmó mediante otro tipo de ensayos, en concreto midiendo el cambio en los niveles de expresión de *CYP26A1*, un marcador paradigmático de la respuesta a RA (Pahlman et al., 1984). Sólo al restituir BRG1 en líneas de cáncer de pulmón, se incrementaban los niveles de *CYP26A1* en respuesta a RA. De forma similar sucedía con la regulación transcripcional de los receptores del RA. Este análisis, además, se hizo extensivo a un panel de líneas derivadas de tumores en diferentes tejidos como son la mama y próstata. Este grupo de experimentos mostraron que las conclusiones extraídas de la función de BRG1 en el contexto de pulmón, pueden ser extrapolables a tumores derivados de otros tejidos. Además, se confirmó también que la interferencia de BRG1 en las células SH-SY5Y eliminaba de forma muy significativa su capacidad de incrementar los niveles *CYP26A1*. En definitiva, estos resultados indican que la inactivación de *BRG1* en el cáncer previene la respuesta a RA y GC. Esta función de BRG1 no puede ser compensada por ningún otro de los complejos remodeladores de cromatina, incluyendo aquellos que contienen BRM como ATPasa principal, ya que algunas de las líneas celulares refractarias al tratamiento con RA mostraron niveles detectables de proteína BRM. Además, en los experimentos de interferencia de BRG1 se comprobó que los niveles de BRM no resultaban modificados.

Es conocido que el tratamiento con RA y GC inhibe la expresión de MYC (Doyle et al, 1989; MEDH et al, 2001). Además, también se sabe que el complejo SWI/SNF es reclutado en el promotor de MYC para activar o reprimir la transcripción de células en proliferación y durante la diferenciación celular, respectivamente (Chi et al, 2003; Nagl et al, 2006). Coherentemente con estos datos previos, los resultados de este trabajo demuestran que la presencia de BRG1 salvaje es un requisito necesario para controlar y reducir los niveles de MYC en respuesta al RA y GC. En primer lugar, en el perfil de expresión de BRG1 se observan numerosas dianas transcripcionales de MYC, incluyendo al mismo MYC que ve reducida su expresión en presencia de BRG1 (ver tabla suplementaria X). Además, se confirma la reducción de los niveles de MYC en respuesta a la acción del RA y GC y se demuestra claramente que este fenómeno es dependiente de la presencia de BRG1. Estos resultados están basados en los experimentos de restitución de BRG1 en líneas deficientes y en la interferencia de BRG1 en la línea SH-SY5Y que expresa de forma endógena BRG1 salvaje. Curiosamente, este fenómeno no se observó en la línea de cáncer de pulmón, H446, que posee unos niveles endógenos de MYC muy elevados a causa de una amplificación del gen según consta en la base de datos del proveedor de la ATCC. Es por ello que, aunque en esta línea celular el complejo SWI/SNF esté

intacto, MYC se encuentra fuera de cualquier tipo de regulación fisiológica, lo que explica que sea completamente refractaria a su regulación negativa por RA o GC. También es interesante observar, como se muestra en la figura 19A, que la respuesta a RA medida en función de su capacidad de incrementar los niveles de *CYP26A1*, en diversas líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer, agrupadas según su estatus de alteraciones en *BRG1* o *MYC*. Mientras que ninguna de las células con mutación en *BRG1* era capaz de responder RA, las células con amplificación en genes de la familia *MYC* mostraban cierta capacidad, aunque modesta, de activar la transcripción de este citocromo. Estas observaciones sugieren que, dado que BRG1 está activo en esas células, mantiene cierta capacidad para mediar la respuesta a RA y GC. No obstante, esta respuesta no es óptima debido a los elevadísimos niveles de MYC que, de alguna forma, obstaculizan los procesos de diferenciación promovidos por estos compuestos. En conjunto, todos estos resultados apuntan a una relación funcional directa entre BRG1 y MYC, tal y como se había predicho en el análisis genético, donde se mostraba que las alteraciones en *BRG1* no coexistían con las alteraciones en oncogenes de la familia *MYC*.

Tal y como se ha descrito, otra de las observaciones remarcables de la firma de expresión de BRG1 era la existencia de numerosas dianas transcripcionales de MYC y del mismo *MYC*. Dado que el complejo SWI/SNF regula la transcripción génica promoviendo la accesibilidad de los factores y la maquinaria de transcripción a promotores concretos, es lógico presuponer que estos cambios en los niveles de MYC y de sus dianas, sea debido a la acción directa de BRG1, a través de su actividad en el complejo SWI/SNF. En línea con estas observaciones, previamente se había observado que BRG1 es requerido para la represión de la diana transcripcional de MYC, *Cad* (Pal et al., 2003). En el presente trabajo se analizó el enriquecimiento relativo de BRG1 en los promotores de distintas dianas transcripcionales de MYC y la co-ocupación de BRG1 y MYC en dichos promotores. Concretamente, se examinaron las regiones consenso de unión de MYC, las E-boxes, en los promotores de *ACP5*, *SERPINE1*, *AQP1* y *HES1*. Los resultados confirmaron que BRG1 era reclutado a esas regiones de forma muy específica. La ocupación de MYC en estos mismos promotores presentaba un comportamiento muy variable, en función de la diana evaluada. Los casos de *SERPINE1* y *AQP1* son ejemplos de co-ocupación y cooperación directa entre MYC y BRG1, ya que el aumento de su expresión está asociado a la presencia conjunta de BRG1 y MYC en su promotor. Sin embargo, *ACP5* y *HES1* no presentan co-ocupación de MYC y BRG1 en sus promotores y son más complejos de interpretar. *ACP5*, un transcrito que incrementa sus niveles en presencia de BRG1 salvaje y que es muy específico del pulmón adulto según las bases de datos del NCBI,

recluta MYC a su promotor sólo en ausencia de BRG1, lo que asocia la presencia de MYC con una represión transcripcional de este gen. En el caso de *HES1*, la ocupación de MYC también varía en función de la presencia de BRG1, aunque en este caso la unión de MYC a su promotor, potencia su expresión y es la pérdida de unión de MYC a su promotor cuando BRG1 está presente, lo que inhibe su expresión. Cabe destacar, como un elemento de calidad, los datos pertenecientes a la versión mutante de BRG1, 668-758Δ, ya que el mutante mostró poca o nula capacidad para ocupar los promotores de los genes diana de MYC, y su expresión tampoco modificó la ocupación de MYC mismo en sus dianas. Todo ello indica que MYC puede contribuir tanto a la activación como a la represión transcripcional. En este sentido se ha demostrado que MYC es capaz de reprimir su propia transcripción de manera dosis dependiente cuando es sobrepresado de manera ectópica (Penn, L.J et al 1990; Grignani, F. et al 1990) y, por otro lado, se han descrito mecanismos a través de los cuales MYC, en base a su capacidad de unión al DNA actuaría reprimiendo la expresión de genes mediante la interacción con los factores MIZ1 y SP1. Este complejo multiprotéico sería capaz de desplazar elementos coactivadores de la expresión, reclutando complejos corepresores (Mao, D.Y. et al 2004 Adhikary, S. et al. 2005 kleine-kohlbrecher, D. et al. 2006). En este contexto nuestros datos aportan un nivel de regulación, en el cual, la modulación de la expresión de las dianas transcripcionales de MYC, variaría en función de la presencia o ausencia de BRG1 y de los complejos SWI/SNF, bien sea por facilitar el acceso de nuevo a promotores que no se encuentren accesibles en ausencia de BRG1, o bien al orquestar su función redirigiendo a MYC, a través de la unión física de este con INI1 (Cheng, S.W. et al.1999), a unirse a unas dianas y no a otras, en función del contexto en el que se encuentre la célula, como es el caso expuesto en este trabajo de la presencia de AR o GC en el medio. Para poder trasladar nuestro análisis a otras dianas transcripcionales y darle así un carácter global a los resultados, decidimos comparar la firma de expresión de BRG1, con los perfiles de expresión que se producen en modelos de ratón que tienen amplificación génica de *C-myc* y *N-myc* en el pulmón. En ambas comparaciones, el análisis bioinformático corroboró nuestros resultados, ya que muestran una fuerte relación inversa, entre los perfiles de expresión de los pulmones con amplificación de los genes *Myc*, y el perfil de expresión de BRG1. Estos datos confirman que existe una relación funcional, eminentemente antagónica, entre MYC y BRG1 en los procesos de cambios de expresión relacionados con la diferenciación en cáncer de pulmón y argumenta a favor de que en cáncer de pulmón no se encuentren mutaciones inactivadoras de *BRG1* coexistiendo con amplificaciones de los genes *MYC*.

Uno de los papeles clásicos atribuidos a la sobreexpresión de los genes *MYC*, es la de inhibir los proceso de diferenciación (Langdon, W.Y. et al. 1986, Coppola, J.A. et al 1986, Gandarillas, A et al. 1997 Prochownik, E et al 1986) y esta característica es opuesta a la atribuida a los complejos SWI/SNF (revisado por Wilson and W. M. Roberts.2011). En este sentido, tanto la sobreexpresión de alguno de los miembros de la familia *MYC* como las mutaciones inactivantes de *BRG1* conferirían a la célula la capacidad de mantener un estado indiferenciado, lo cual es una característica del desarrollo del cáncer.

El perfil de *BRG1* también muestra una ligera disminución de los niveles de *MYC*, lo cual sugiere que, además de contribuir a la regulación transcripcional de las dianas de *MYC*, *BRG1* regula la transcripción de *MYC*. Estos cambios en los niveles de *MYC* eran mucho más evidentes al tratar las células con RA o GC. Por ello estudió el posible reclutamiento de *BRG1* en el locus de *MYC*, especialmente en relación con los tratamientos con RA y GC, examinando una región muy extensa de unos 10.000-pb. Los resultados mostraron que, efectivamente, *BRG1* es reclutado en el locus de *MYC* y que su posicionamiento sufre cambios en función de los diferentes tratamientos. Estos cambios ocurren desde regiones promotoras e intrónicas, donde se observa el mayor enriquecimiento de *BRG1* en condiciones de cultivo con FBS, hacia las regiones exónicas después de los tratamientos hormonales. Dada la naturaleza de la actividad de los complejos SWI/SNF, este fenómeno sugiere que el reposicionamiento de nucleosomas a lo largo del locus de *MYC* sería, en parte, el responsable de la inhibición de *MYC* derivada de la exposición a RA y GC. En particular, cabe destacar la ocupación de *BRG1* en el exón 1, donde se encuentran las regiones promotoras mínimas de *MYC*, P1 y P2, que son responsables de la activación de su transcripción, pero que también se han relacionado con mecanismo de autorregulación negativa de *MYC* (Facchini et al., 1997). También es importante destacar que todas las regiones ocupadas por *BRG1* a lo largo del locus de *MYC*, incluyendo las regiones intrónicas, estaban evolutivamente muy conservadas. Este fenómeno anima a profundizar aun mas en este estudio, ya que sugiere la participación de quizá múltiples factores, que conjuntamente con los receptores nucleares descritos, puedan reconocer secuencias consenso dentro de esas zonas intrónicas conservadas y que puedan de esta manera, interactuar potencialmente con los complejos SWI/SNF, en el mantenimiento e inhibición de la expresión de *MYC*. En conjunto y, en el contexto del cáncer de pulmón, estos datos indicarían que un *BRG1* inactivo frenaría este mecanismo de autorregulación, lo que resulta en una expresión constitutiva e intensa de *MYC*. Asimismo, este fenómeno explicaría también lo observado en publicaciones anteriores donde se describen fallos en el control de la autorregulación negativa de *MYC* en muchas líneas celulares de origen tumoral (Facchini et al., 1997).

Finalmente, el presente trabajo muestra también los resultados de un buen modelo pre-clínico, *in vivo*, donde las células que expresan BRG1 de forma estable e inducible fueron ortotópicamente implantadas en el parénquima pulmonar de ratones inmunodeprimidos, originando tumores que expresaban BRG1 salvaje o mutante al inducir con doxiciclina. La recuperación de la expresión BRG1 salvaje en los tumores ortotópicos aumentaba de forma muy significativa la supervivencia de los ratones e incluso impidió, en algunos casos, la formación misma de los tumores, al comparar con aquellos grupos de ratones donde se recuperó la forma mutante de BRG1, o simplemente no se indujo expresión alguna. Otro aspecto relevante fue el análisis macroscópico e histopatológico de los tumores, ya que los tumores que carecían de la actividad BRG1, eran mucho más invasivos y generaban múltiples nuevos focos de crecimiento. Además dichos tumores presentaban un mayor grado de infiltración en los tejidos circundantes, invadiendo fibras musculares, ganglios linfáticos entre otros. Contrario a esto, los tumores que recuperaron la actividad de BRG1, si bien no dejaron de crecer en tamaño, aunque sí lo hicieron más lentamente, presentaban un aspecto radicalmente distinto, ya que salvo alguna excepción, los tumores de este grupo no presentaron crecimientos focales a distancia, ni mostraron el grado de capacidad invasiva de los grupos anteriores. Paralelo a esto se debe destacar que en algunos tumores del grupo de BRG1, se encontraron células con morfologías muy similares a las descritas en los modelos *in vitro*, mostrando que también *in vivo*, la recuperación de BRG1 favorecía la modificación de los patrones de expresión en pro de algún grado de diferenciación, que no alcanzaban las células de los tumores mutantes para *BRG1*. También se observó que los tumores con expresión de BRG1 salvaje recuperaban la expresión de *CYP26A1*, *RARβ* y se disminuía la expresión de *MYC*. Paradójicamente no había diferencias significativas, tan solo una ligera tendencia, ni en los niveles de estos marcadores, ni en la supervivencia global, entre los grupos que recuperaron la expresión de BRG1 salvaje y aquellos que además de recuperar la expresión de BRG1 salvaje, fueron tratados con RA y GC por vía peritoneal. Ello indicaba que, de alguna manera, los niveles endógenos de corticoides debidos al estrés provocado por el propio tumor y los niveles de ácido retinoico incluidos en la dieta de los animales, fueran quizá suficientes para mediar la acción de BRG1. No obstante, tratándose de un modelo *in vivo*, hay que tener en cuenta que los tumores están expuestos a muchos más factores en el medio y hormonas propias del animales cuya incidencia y actividad no podemos controlar. También fue posible analizar los niveles de expresión de MYC mediante inmunohistoquímica en estos tumores, demostrando como estos niveles eran más bajos en los tumores en los que se recuperaba la expresión de salvaje de *BRG1*. En definitiva, estos resultados demuestran como la recuperación de BRG1, *in vivo*, en células donde se encontraba inactivado por mutación, es capaz de inhibir y retardar el

crecimiento tumoral, así como de evitar la formación de crecimientos a distancia y de reducir la capacidad invasiva de los tumores, evidenciándose de nuevo, el papel supresor tumoral de BRG1.

En conjunto, la frecuencia relativamente alta de la inactivación de *BRG1* por mutaciones en el cáncer de pulmón (Medina et al., 2008) y la fuerte capacidad de BRG1 como un supresor del crecimiento y la invasión tumoral, hacen hincapié en el papel de BRG1 en el desarrollo de cáncer de pulmón y destaca el valor de terapias de investigación dirigidas a restaurar la actividad de BRG1 o a buscar rutas de letalidad sintética en las que intervenga la actividad de BRG1 y de los complejos SWI/SNF. Estos datos proporcionan pruebas convincentes de que, a través de la inactivación de *BRG1*, las células tumorales adquiere la capacidad de prevenir o revertir la diferenciación y evitar la respuesta a los programas de expresión génica inducidos por la actividad de los receptores nucleares dependientes de hormonas. Una característica bien establecida de muchos tipos de células tumorales, especialmente los de cáncer de pulmón, es su capacidad de crecimiento de forma independiente de los factores de crecimiento, lo cual se logra mediante la activación constitutiva de receptores de factores de crecimiento (por ejemplo EGFR, MET) o moléculas de transducción de señales (por ejemplo, RAS, BRAF). Junto a esta capacidad, nuestros resultados indican que las células tumorales también son refractarias a la señalización de los receptores nucleares, manteniendo así el crecimiento celular independiente del medio. Todas estas observaciones, resultados y mecanismos descritos en los últimos apartados nos llevan a pensar de forma especulativa en que la resistencia intrínseca a los tratamientos de estrógenos o antagonistas de andrógenos, en tumores de mama y pacientes con cáncer de próstata, respectivamente, también podría ser atribuible a la inactivación de las mutaciones *BRG1*, aún no descritas, o de otros miembros de los complejos SWI/SNF.

CONCLUSIONES

1.- El gen *BRG1* se puede considerar un *bona fide* gen supresor tumoral, importante en el desarrollo del cáncer de pulmón. El gen *BRG1* está inactivado en cáncer de pulmón, mediante mutaciones homocigotas y específicas de tumor. La gran mayoría de las mutaciones codifican para proteínas truncadas.

2.- *BRG1* constituye el cuarto gen más frecuentemente alterado en el cáncer de pulmón de célula no pequeña. Su frecuencia de mutaciones, alrededor del 35%, está inmediatamente por detrás del gen supresor tumoral *LKB1* y por delante de las mutaciones en el oncogén *KRAS*.

3.- La pérdida de *BRG1*, en el contexto del cáncer, afecta a la correcta diferenciación de las células. La recuperación de *BRG1* en células de cáncer de pulmón devuelve a las células tumorales unos perfiles de expresión muy próximos a los perfiles del tejido pulmonar sano.

4.- Los resultados genéticos y funcionales muestran una relación funcional entre *BRG1* y *MYC*, lo que indica que tanto la amplificación de *MYC* como la inactivación de *BRG1* tienen efectos funcionales análogos en el desarrollo tumoral. Por una parte, las alteraciones en *BRG1* y los genes de la familia *MYC* son mutuamente excluyentes. Por otra parte, *BRG1* se une al promotor de *MYC* y al de dianas transcriptionales de *MYC* para regular sus niveles de expresión. Del mismo modo, *BRG1* es necesario para la disminución de los niveles de expresión de *MYC* durante los procesos de diferenciación.

5. La ausencia de BRG1 confiere a la célula resistencia a señales ambientales mediadas por receptores nucleares en respuesta a retinoides y corticoides, entre otros. Esta capacidad que adquiere la célula tumoral está muy relacionada con la pérdida de diferenciación que desencadena la falta de función de BRG1 en el cáncer. La recuperación de la expresión de BRG1, restauró la capacidad de las células tumorales para responder a las señales hormonales del ambiente, como corticoides y ácido retinoico y capacitó a las células para modificar sus programas de expresión modulados por dichos receptores nucleares.

6.- La inducción de la expresión de BRG1 en tumores formados en los pulmones de ratones atímicos muestra su potente capacidad y función como supresor tumoral. La restitución de BRG1 aumentó la supervivencia global e inhibió la capacidad invasiva del tumor.

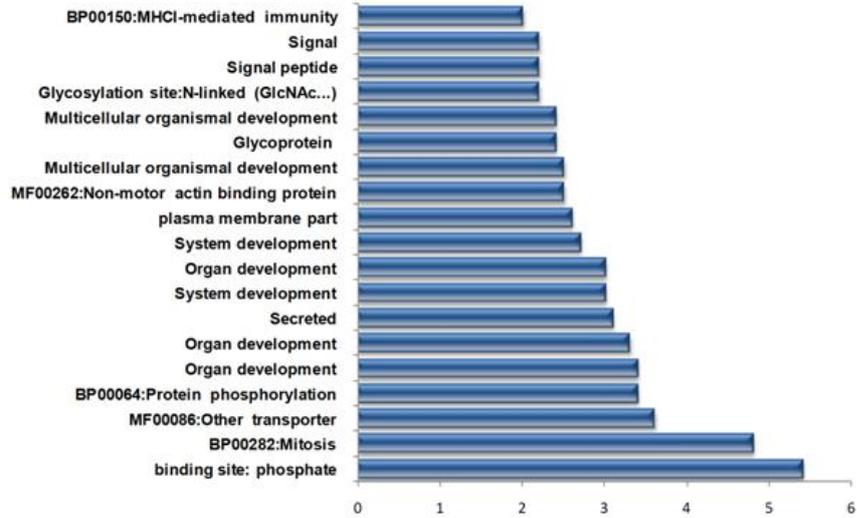
ANEXOS

TABLA SUPLEMENTARIA 1. Cambios de expresión en los genes seleccionados (>1.5 ó <0.67 de expresión relativa, en al menos dos ocasiones). **U**, sobreexpresados y **D**, reprimidos. Los genes subrayados son dianas transcripcionales de MYC (de acuerdo con <http://myccancergene.org/>).

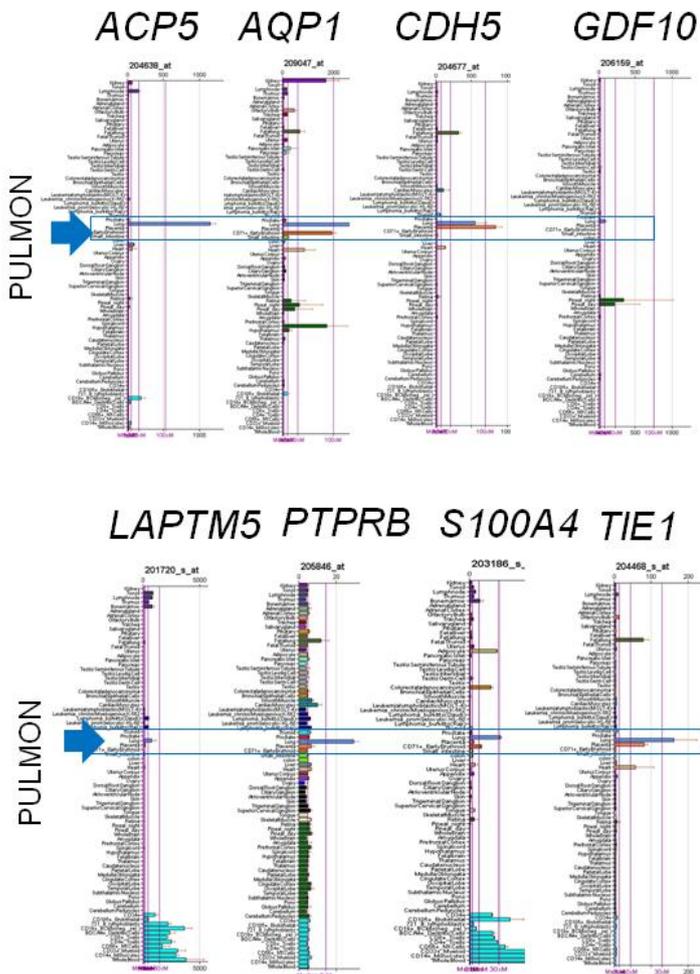
Gene Symbol	Descripción	Ratio Wt/Mut		
		6hr	12hr	24hr
Genes relacionados con el receptor del ácido retinoico				
ACP5*	Homo sapiens acid phosphatase 5, tartrate resistant, mRNA [NM_001611]	-	U	U
AGT	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8), mRNA [NM_000029]	U	U	U
ANXA3	annexin A3, mRNA [NM_005139]	U	U	U
APAF	apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), transcript variant 3, mRNA [NM_181861]	-	D	D
BMF	Bcl2 modifying factor, transcript variant 1, mRNA [NM_001003940]	-	U	U
HES1	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila), mRNA [NM_005524]	-	D	D
EGR1	early growth response 1, mRNA [NM_001964]	D	D	D
LAMB1	laminin, beta 1, mRNA [NM_002291]	-	U	U
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian), mRNA [NM_002467]	-	D	D
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1, mRNA [NM_006096]	-	U	U
NRP1	neuropilin 1 (NRP1), transcript variant 1, mRNA [NM_003873]	-	U	U
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, mRNA [NM_005252]	D	D	D
SPARC	secreted protein,acidic, cysteine-rich (osteonectin), mRNA [NM_003118]	-	U	U
TAGLN	transgelin, transcript variant 1, mRNA [NM_001001522]	-	U	U
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1, mRNA [NM_005424]	U	U	U
Genes relacionados con el receptor de glucocorticoides e inflamación				
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase (isoform E) , transcript variant 1, mRNA [NM_000480]	-	U	U
ANXA1	annexin A1, mRNA [NM_000700]	-	U	U
BMF	Bcl2 modifying factor, transcript variant 1, mRNA [NM_001003940]	-	U	U
BMP15	bone morphogenetic protein 15, mRNA [NM_005448]	U	-	U
CD33	CD33 molecule (CD33), transcript variant 1, mRNA [NM_001772]	-	U	U
EGR1	early growth response 1, mRNA [NM_001964]	D	D	D
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group) (AQP1), mRNA [NM_198098]	-	U	U
EGR4	early growth response 4, mRNA [NM_001965]	-	D	D
IL11	interleukin 11, mRNA [NM_000641]	U	U	U
IL28RA	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor), transcript variant 1, mRNA [NM_170743]	-	U	U
LY96	lymphocyte antigen 96, mRNA [NM_015364]	-	U	U
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian), mRNA [NM_002467]	-	D	D
MCAM	melanoma cell adhesion molecule, mRNA [NM_006500]	-	U	U
SERPINE 1	serpin peptidase inhibitor,clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1,mRNA [NM_000602]	U	U	U
TLR3	toil-like receptor 3, mRNA [NM_003265]	-	U	U
TMEM173	transmembrane protein 173, mRNA [NM_198282]	-	U	U
Genes relacionados con la vía de acción del TGFβ				
BMP15	bone morphogenetic protein 15, mRNA [NM_005448]	U	-	U
EVI1	ecotropic viral integration site 1, mRNA [NM_005241]	-	D	D
GDF10	growth differentiation factor 10 (GDF10), mRNA [NM_004962]	-	U	U
IL11	interleukin 11, mRNA [NM_000641]	U	U	U
INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide), mRNA [NM_002192]	U	U	-
NRP1	neuropilin 1 (NRP1), transcript variant 1, mRNA [NM_003873]	-	U	U
WNT7B	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 7B (WNT7B), mRNA [NM_058238]	U	U	U
Genes relacionados con la estructura celular y la diferenciación				
ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta, mRNA [NM_001175]	-	U	U
ARL14	ADP-ribosylation factor-like 14 , mRNA [NM_025047]	-	D	D
AXIN2	axin 2 (conductin, axil) (AXIN2), mRNA [NM_004655]	U	U	-
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle, mRNA [NM_001299]	U	U	U
CDH5	cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium) (CDH5), mRNA [NM_001795]	-	U	U
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) (CDKN1C), mRNA [NM_000076]	-	U	U
CYTB	Cytochrome b. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P00156] [ENST00000361789]	-	D	D
DOK4	docking protein 4, mRNA [NM_018110]	-	U	U
FUT1	fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, Hblood group), mRNA [NM_000148]	-	U	U
FBLIM1	filamin binding LIM protein 1, transcript variant 1, mRNA [NM_017556]	-	U	U
ECSM2	Endothelial cell-specific molecule-2 (ECSM2) mRNA, complete cds. [DQ462572]	-	U	U
HDAC4	histone deacetylase 4 (HDAC4), mRNA [NM_006037]	-	U	U
KRT83	keratin, hair, basic, 3, mRNA [NM_002282]	-	U	U
KRT86	keratin, hair, basic, 6 (monilethrix), mRNA [NM_002284]	-	U	U
LAPTM5	lysosomal associated multispansing membrane protein 5 (LAPTM5), mRNA [NM_006762]	-	U	U
LYG2	lysozyme-like, mRNA [NM_175735]	-	D	D
PBX2	pre-B-cell leukemia transcription factor 2, mRNA [NM_002586]	-	D	D
PCDH1	protocadherin 10 (PCDH10), transcript variant 2, mRNA [NM_020815]	-	U	U
PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B, mRNA [NM_002837]	U	U	U
S100A4	S100 calcium binding protein A4 (S100A4), transcript variant 1, mRNA [NM_002961]	-	U	U

CUADRO SUPLEMENTARIO 2

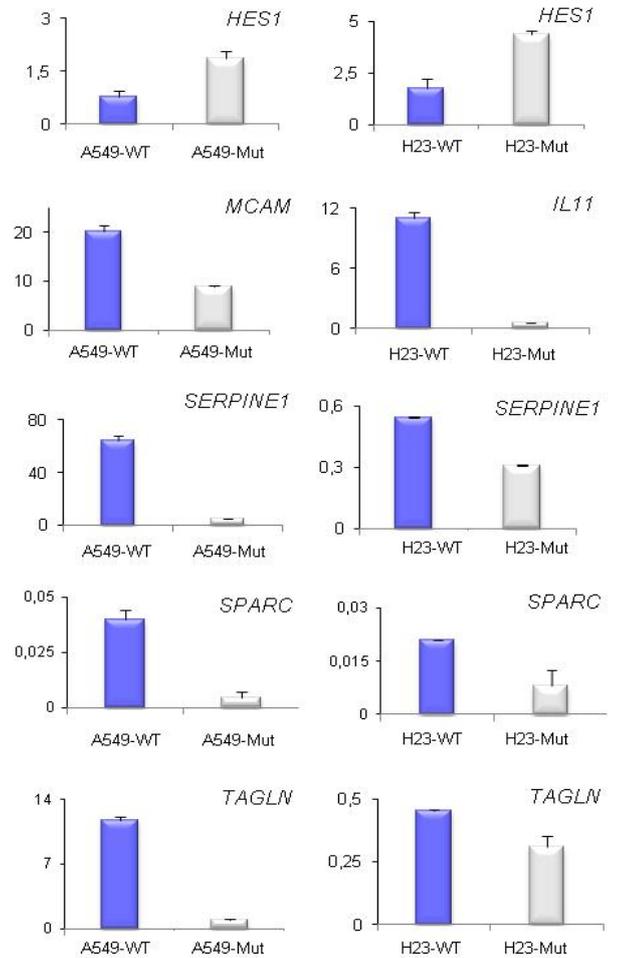
A



B



C



BIBLIOGRAFIA

A

-Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, et al. 1999. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Nat. Acad Sci [USA]* 96:7382-7387.

-Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 3:471-475.

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

-Arias, Jaime (2000) (en español). *Enfermería médico-quirúrgica, Volumen 1*. Editorial Tebar. pp. 119. ISBN 8495447037. <http://books.google.co.ve/books?id=Oo9mSTz6lowC>.

-Asp, P., Wihlborg, M., Karlén, M., and Farrants, A.K. (2002). Expression of BRG1, a human SWI/SNF component, affects the organisation of actin filaments through the RhoA signalling pathway. *J. Cell Sci.* 115, 2735-2746.

B

-Belloni PN, Garvin L, Mao CP, Bailey-Healy I, Leaffer D: Effects of all-trans-retinoic acid in promoting alveolar repair. *Chest* 2000, 117(5 Suppl 1):235S-241S.

-Billin, A. N. & Ayer, D. E. (2006). The Mlx network: evidence for a parallel Max-like transcriptional network that regulates energy metabolism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 255–278

-Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS, et al. 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102:257-265.

-Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211–1217

- Boris G. Wilson and Charles W. M. Roberts (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. in cancer*, 11:481-492

-Bray, F., R. Sankila, et al. (2002). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995." *Eur J Cancer* 38(1): 99-166.

BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:4314-4324.

-Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, et al. (2000). A Brg1 null mutation in the mouse reveals

-Bultman, S.J., Herschkowitz, J.I., Godfrey, V., Gebuhr, T.C., Yaniv, M., Perou, C.M., and Magnuson, T. (2008). Characterization of mammary tumors from Brg1 heterozygous mice. *Oncogene* 27, 460-468.

C

-Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Meuwissen, R., and Berns, A. (2011). A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell*. 19,:244-256.

- Carlson M, Osmond BC, Botstein D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98: 25–40.

-Cheng SW, Davies KP, Yung E, Beltran RJ, Yu J, Kalpana GV. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* 22:102-105.

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

-Chi, T.H., Wan, M., Lee, P.P., Akashi, K., Metzger, D., Chambon, P., Wilson, C.B., and Crabtree, G.R. (2003). Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity* 19,169-182.

-Chiba, H., Muramatsu, M., Nomoto, A., and Kato, H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 22, 1815-1820.

-Choi, E.J., Whang, Y.M., Kim, S.J., Kim, H.J., and Kim, Y.H. (2007). Combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma in vitro. *J Korean Med Sci.* 22,S52-60.

-Classon, M. and E. Harlow (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." *Nat Rev Cancer* 2(12): 910-7.

- Cole T.J., Solomon N.M., Van Driel R., Monk J.A., Bird D., Richardson S.J., Dilley R.J., and Hooper S.B.(2004). Altered epithelial cell proportions in the fetal lung of glucocorticoid receptor null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 613-619.
- Collins, LG; Haines C, Perkel R, Enck RE (January 2007). «Lung cancer: diagnosis and management». *American Family Physician (American Academy of Family Physicians)* 75 (1): pp. 56–63.
- Commonly diagnosed cancers worldwide, Cancer Research UK (Apr 2005). Consultado el 11-01-2008
- Coppola, J. A. & Cole, M. D. (1986). Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature* 320, 760–763
- Cote J, Quinn J, Workman JL, Peterson CL. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265: 53–60.
- Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J. and Calame, K. (1982) Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* 218, 1319-1321

D

- Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal, et al. (1982). Oncogene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299(5878): 61-3.
- de Alboran, I. M. et al. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity* 14, 45–55
- De la Serna. I.L., Carlson, K.A., and Imbalzano, A.N. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.* 27,187-190.
- Dechassa, M. L. et al. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes. *Mol. Cell* 38, 590–602
- Doyle, L.A., Giangiulo, D., Hussain, A., Park, H.J., Yen, R.W., and Borges, M. (1989). Differentiation of human variant small cell lung cancer cell lines to a classic morphology by retinoic acid. *Cancer Res.* 49,6745-6751.
- Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J, et al. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79:119-130.

-Dunaief, J. L., B. E. Strober, et al. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79(1): 119-30.

F

-Facchini, L.M., Chen, S., Marhin, W.W., Lear, J.N., and Penn, L.Z. (1997). The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol. Cell Biol.* 17:100-114

.-Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J, Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 17, 1115-1129

-Flajollet, S., Lefebvre, B., Cudejko, C., Staels, B., and Lefebvre, P. (2007). The core component of the mammalian SWI/SNF complex SMARCD3/BAF60c is a coactivator for the nuclear retinoic acid receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 270, 23-32.

- Flowers, S., Nagl, N. G., Jr, Beck, G. R., Jr & Moran, E. (2009). Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 10067–10075

-Frank H. Netter, M. D. *Atlas de Anatomía Humana*. Barcelona: Masson, 1996.

-Fryer, C.J., and Archer, T.K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* 393, 88-91.

-Fukuoka J, Fujii T, Shih JH, Dracheva T, Meerzaman D, Player A, (2004). Chromatin remodeling factors and BRM/BRG1 expression as prognostic indicators in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:4314-4324.

G

-Gallant, P., Shiio, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M. & Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523–1527

-Gallant, P. (2006). Myc/Max/Mad in invertebrates: the evolution of the Max network. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 235–253

-Gandarillas, A. & Watt, F. M. (1997) c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev.* 11, 2869–2882.

-Geradts, J., Chen, J.Y., Russell, E.K., Yankaskas, J.R., Nieves, L., and Minna, J.D. (1993) Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth Differ.* 4:799-809.

-Ghosh, A.K., and Vaughan, D.E. (2011). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* Apr 4. [Epub ahead of print]

-Giardiello, F. M., J. D. Brensinger, et al. (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119(6): 1447-53.

-Giardiello, F. M., J. D. Brensinger, et al. (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119(6): 1447-53.

-Goodman, A., Goode, B.L., Matsudaira, P., and Fink, G.R. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol. Biol Cell.* 14, 2617-2629.

H

-Hainaut, P., T. Hernandez, et al. (1998). IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26(1): 205-13.

-Hansis C, Barreto G, Maltry N, Niehrs C. (2004). Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol* 14:1475-1480.

-Hendricks, K.B., Shanahan, F., and Lees, E. (2004). Role for BRG1 in cell cycle control and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.* 24, 362-376.

-Hsiao, P.W., Fryer, C.J., Trotter, K.W., Wang, W., and Archer, T.K. (2003). BAF60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Mol. Cell Biol.* 23, 6210-6220.

J

-Jeghers, H., K. V. Mc, et al. (1949). Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med* 241(25): 993, illust; passim.

-Johnson, T.A., Elbi, C., Parekh, B.S., Hager, G.L., and John, S. (2008). Chromatin remodeling complexes interact dynamically with a glucocorticoid receptor-regulated promoter. *Mol. Biol. Cell* 19:3308-3322.

K

- Kadam, S. & Emerson, B. M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377-389

- Khavari PA, Peterson CL, Tamkun JW, Mendel DB, Crabtree GR. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* 366: 170-174.

-Kang, H., K. Cui, et al. (2004). "BRG1 controls the activity of the retinoblastoma protein via regulation of p21CIP1/WAF1/SDI." *Mol Cell Biol* 24(3): 1188-99.

-Kim, Y.H., Dohi, D.F., Han, G.R., Zou, C.P., Oridate, N., Walsh, G.L., Nesbitt, J.C., Xu, X.C., Hong, W.K., Lotan, R., et al. (1995). Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. *Cancer Res.* 55, 5603-5610.

-Kohl, N.E. et al. (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367

-Kumar, Vinay; Ramzi S. Cotran y Stanley L. Robbins (2008) (en español). *Patología humana* (7ma edición). Elsevier, España. pp. 500.

-Kwon, C.S., and Wagner, D. (2007). Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet.* 23, 403-412.

-Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E., and Green, M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* 370, 477-481.

L

-Langdon, W. Y., Harris, A. W., Cory, S. & Adams, J. M. (1986) The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E μ -myc transgenic mice. *Cell* 47, 11–18

- Lorch, Y., Maier-Davis, B. & Kornberg, R. D. (2010). Mechanism of chromatin remodeling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 3458–3462

M

-Malpel, S., Mendelsohn, C., and Cardoso W.V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057-3067

-Marignani PA, Kanai F, Carpenter CL. (2001). LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J Biol Chem* 276:32415-32418.

-Mao, D. Y. et al. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr. Biol.* 13, 882–886(2003).

-Massaro GD, Massaro D, Chambon P: Retinoic acid receptor α regulates pulmonary alveolus formation in mice after, but not during, perinatal period. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 284(2):L431-433.

-Massaro GD, Massaro D, Chan WY, Clerch LB, Ghyselinck N, Chambon P, Chandraratna RA: Retinoic acid receptor- β : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics* 2000, 4(1):51-57.

-Matsuda, T, Kawanishi M, Yagi T, Matsui S, Takebe H. 1998. Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases.. *Nucleic Acids Res* 26:1769-1774.

- Matsumoto S Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, et al. 2007. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene* 26:5911-5918.
- McMahon, S. B., Wood, M. A. & Cole, M. D. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* 20, 556–562 (2000).
- Medh, R.D., Wang, A., Zhou, F., and Thompson, E.B. (2001). Constitutive expression of ectopic c-Myc delays glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM-C7 cells. *Oncogene* 20,4629-4639.
- Medina PP, Carretero J, Ballestar E, Angulo B, Lopez-Rios F, Esteller M, Sanchez-Cespedes M. (2005). Transcriptional targets of the chromatin-remodelling factor SMARCA4/BRG1 in lung cancer cells. *Hum Mol Genet* 14: 973-982.
- Medina PP, Carretero J, Fraga MF, Esteller M, Sidransky D, Sanchez-Cespedes M. (2004). Genetic and epigenetic screening for gene alterations of the chromatin-remodeling factor, SMARCA4/BRG1 in lung tumors. *Genes Chrom Cancer* 41:170-177.
- Medina, P.P., and Sanchez-Cespedes, M. (2008). Involvement of the chromatin-remodeling factor BRG1/SMARCA4 in human cancer. *Epigenetics* 3:64-68b.
- Medina, P.P., Carretero, J., Ballestar, E., Angulo, B., Lopez-Rios, F., Esteller, M., and Sanchez-Cespedes, M. (2005). Transcriptional targets of the chromatin-remodelling factor SMARCA4/BRG1 in lung cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 973-982.
- Medina, P.P., Romero, O.A., Kohno, T., Montuenga, L.M., Pio, R., Yokota, J., and Sanchez-Cespedes M. (2008). Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum. Mut.* 29, 617-622a.
- Minna, JD (2004). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill. pp. 506–516
- Morrisey EE, Savani RC: Midkine: a potential bridge between glucocorticoid and retinoid effects on lung vascular development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28(1):5-8.

N

-Nagaich, A.K., Walker, D.A., Wolford, R., and Hager, G.L. (2004). Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell.* 14, 163-174.

-Nagl, N.G.Jr., Zweitzig, D.R., Thimmapaya, B., Beck, G.R. Jr., and Moran, E. (2006). The c-myc gene is a direct target of mammalian SWI/SNF-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest. *Cancer Res.* 66,1289-1293.

-Nair, S. K. & Burley, S. K. (2006).Structural aspects of interactions within the Myc/Max/Mad network.*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 123–143

-Nakayama, T., M. Kaneko, et al. (1985). Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* 314(6010): 462-4.

-Neel B.G., Hayward W.S., Robinson, H.L., Fang, J. and Astrin, S. M. (1981) Avian Leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell* 23, 323-334

O

-Ostlund Farrants, A.K., Blomquist, P., Kwon, H., and Wrangé, O. (1997). Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex. *Mol Cell Biol.* 17, 895-905.

P

-Påhlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., and Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 14:135-144.

-Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P., and Sif, S. (2003). mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol. Cell Biol.* 23, 7475-7487.

-Peterson, C.L. (2002). Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams. *Curr. Biol.* 12, R245-247.

-Peterson, C.L., Dingwall, A., and Scott, M.P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2905-2908.

-Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, et al. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92(6): 713-23.

-Prochownik, E. V. & Kukowska, J. (1986) Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* 322, 848–850.

R

-Reisman DN, Strobeck MW, Betz BL, Sciarrotta J, Funkhouser W Jr, et al. 2002. Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression. *Oncogene* 21:1196-1207.

-Reisman, D. N., M. W. Strobeck, et al. (2002). "Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression." *Oncogene* 21(8): 1196-207.

-Reisman, D.N., Sciarrotta, J., Wang, W., Funkhouser, W.K., and Weissman, B.E. (2003). Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 63.560-566.

- Reisman, D. N., S Glaros and EA Thompson (2009) The SWI/SNF complex and cancer *Oncogene* 28, 1653–1668

-Reyes, J. C. et al. (1998). Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma(SNF2 α). *EMBO J.* 17, 6979–6991

-Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Taneja, R., and Chambon, P. (2000). The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol. Endocrinol.* 14, 1398-1410.

-Rodriguez-Nieto, S., Cañada, A., Pros, E., Pinto, A.I., Torres-Lanzas, J., Lopez-Rios, F., Sanchez-Verde, L., Pisano, D.G., and Sanchez-Cespedes, M. (2011). Massive parallel DNA pyrosequencing analysis of the tumor suppressor BRG1/SMARCA4 in lung primary tumors. *Hum. Mut.* 32, E1999-2017.

-Rosson, G.B., Bartlett, C., Reed, W., and Weissman, B.E. (2005). BRG1 loss in MiaPaCa2 cells induces an altered cellular morphology and disruption in the organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Physiol.* 205,286-294.

-Rosti, G; Bevilacqua G, Bidoli P et al. (March 2006). «Small cell lung cancer». *Annals of Oncology* 17 (Suppl. 2): pp. 5–10

-Rottmann, S. & Luscher, B. (2006) The Mad side of theMax network: antagonizing the function of Myc andmore. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 63–122).

-Roussel, M. F., Cleveland, J. L., Shurtleff, S. A. & Sherr, C. J. (1991) Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature*353, 361–363

-Rouvière, H. y Delmas, A. *Anatomía Humana*. Barcelona: Masson, 9ª ed., 1996.

-Rubin, Philip; Jacqueline P. Williams (2003). *Oncologia Clinica* (8va edición). Elsevier, España. pp. 823. ISBN 8481746274.

S

-Saffiotti, U., Montesano, R., Sellakumar, A.R., and Borg, S.A. (1967). Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 20, 857-864.

- Saha, A., Wittmeyer, J. & Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA aroundhistones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 437–447

- Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, et al. (2001). Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 61:1309-1313.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, et al. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 62:3659-3662.
- Sasaki, H., S. Shimizu, et al. (2006). EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients. *Int J Cancer* 118(1): 180-4.
- Schwab, M. et al Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-248 (1983)
- Seo, S., Richardson, G.A., and Kroll, K.L. (2005). The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* 132,105-151.
- Shen, H. et al. The SWI/SNF ATPase Brm is a gatekeeper of proliferative control in prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 10154–10162 (2008).
- Shen-ong, G. L., Keath, E.J., Piccoli, S.P. and Cole, M.D. Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobuline-gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell* 31, 443-452 (1982)
- Shi, W., Chen, F., and Cardoso, W.V. (2009). Mechanisms of lung development contribution to adult lung disease and relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6, 558–563.
- Shieh, S. Y., M. Ikeda, et al. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91(3): 325-34.
- Shiraishi, M., M. Noguchi, et al. (1989). Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 49(23): 6474-9.

-Shopland, D. R., H. J. Eyre, et al. (1991). Smoking-attributable cancer mortality in 1991: is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? *J Natl Cancer Inst* 83(16): 1142-8.

-Singhal, N., Graumann, J., Wu, G., Arauzo-Bravo, M.J., Han, D.W., Greber, B., Gentile, L., Mann, M., and Schöler, H.R. (2010). Chromatin-remodeling components of the BAF complex facilitate reprogramming. *Cell* 141, 943-55.

-Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244(4905): 707-12

-Smith CL, Peterson CL. 2005. A conserved Swi2/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol Cell Biol* 25:5880-5892.

-Sudarsanam P, Winston F. 2000. The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* 16:345-351.

T

-Thomas RK et al. 2007. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39:347-351.

-Travis, WD; Travis LB, Devesa SS (January 1995). «Lung cancer». *Cancer* 75 (Suppl. 1): pp. 191–202.

- Trotter KW, Archer TK. (2008). The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal* 6: e004.

- Tschanz SA, Damke BM, and Burri PH. Influence of postnatally administered glucocorticoids on rat lung growth. *Biol Neonate*68: 229–245, 1995.

-Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., and Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 113,37-47.

V

-Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, et al. 1998. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394:203-206.

-Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., and Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203-206.

W

-WANG, SOPHIA SSAMET, JONATHAN M. Tabaquismo y cáncer: la promesa de la epidemiología molecular. *Salud pública Méx* 1997, vol. 39, no. 4, pp. 331-345.

-Warwick, Williams. Gray: Anatomía. Madrid: Editorial Harcourt, 36ª ed., 1995

-Waters, C.E., Stevens, A., White, A., and Ray DW. (2004). Analysis of co-factor function in a glucocorticoid-resistant small cell carcinoma cell line. *J. Endocrinol.* 183, 375-383.

-Wei, Q., J. Gu, et al. (1996). Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res* 56(17): 3975-9.

-Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state *Nature* 448:318-324.

-Westerman, A. M., M. M. Entius, et al. (1999). "Peutz-Jeghers syndrome: 78-year follow-up of the original family." *Lancet* 353(9160): 1211-5.

-Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.J., Koellhoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., and Roberts, C.W. (2010). Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 18, 316-328.

-Winston F, Allis CD. (1999). The bromodomain: a chromatin targeting module? *Nat Struct Biol* 6: 601-604.

-Wong AK, Shanahan F, Chen Y, Lian L, Ha P, Hendricks K, et al. (2000) BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* 60:6171-177.

-Wong, A.K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., Ghaffari, S., Iliev, D., Penn, B.,

-Woodland, A. et al. (2000). BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res.* 60, 6171-6177.

Z

-Zhang, Y., Sif, S., and DeWille, J. (2007). The mouse C/EBPdelta gene promoter is regulated by STAT3 and Sp1 transcriptional activators, chromatin remodeling and c-Myc repression. *J. Cell Biochem.* 102, 1256-1270.