

## **Título: MARCADORES PRONÓSTICO EN LA CARCINOGENESIS PULMONAR. RUTA SIAH2-DYRK2**

**Autores:** P. Moreno Casado<sup>1,3</sup>, M.A. Calzado Canales<sup>2</sup>, A. Álvarez Kindelán<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>UGC Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar.

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba.

<sup>3</sup>Grupo Asociado Neoplasias Torácicas-Trasplante Pulmonar.

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

**Autor para correspondencia:** Dra. Paula Moreno Casado.

F.E.A. Cirugía Torácica, FETCS.

UGC Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar.

Hospital Universitario Reina Sofía.

Avenida Menéndez Pidal s/n.

CP: 14004, Córdoba.

Email: pmoreno39@gmail.com

### **Declaraciones de descargo de responsabilidad:**

-Los autores declaran no haber recibido ningún tipo de financiación económica por parte de la industria farmacéutica para la elaboración del presente trabajo.

-El trabajo presentado forma parte del proyecto de investigación nº3/2010, financiado por la Fundación Neumosur, y denominado “Análisis de la quinasa Dyrk2 como marcador pronóstico del adenocarcinoma broncogénico”.

**Título abreviado:** existe un incremento en la expresión de SIAH2 en el cáncer de pulmón, tanto en el carcinoma epidermoide como en el adenocarcinoma. El incremento en la expresión de SIAH2 se relaciona además con el grado histológico y se acompaña de un descenso en los niveles de uno de sus sustratos, DYRK2.

**Resumen:** el cáncer de pulmón (CP) es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo. Su elevada mortalidad refleja, en parte, la limitada eficacia de las terapias actualmente disponibles. Dada la pobre supervivencia actual del CP, y la demostrada evidencia de que el diagnóstico precoz reduce la mortalidad, ha cobrado especial interés la búsqueda de biomarcadores.

Recientemente, se ha atribuido a DYRK2 un papel relevante en el desarrollo y progresión tumoral relacionado con la inducción de la apoptosis en respuesta al estrés oncogénico. Así, se identificó a DYRK2 como el gen más frecuentemente sobre-expresado en el adenocarcinoma de pulmón, siendo además un factor pronóstico favorable en estos tumores. Asimismo, se ha demostrado la existencia de una regulación mutua entre DYRK2 y la ubiquitin-ligasa SIAH2, en el control de la respuesta a hipoxia y el daño genotóxico.

La búsqueda de nuevas dianas y estrategias terapéuticas supone un paso clave para la lucha contra el cáncer de pulmón. El objetivo del trabajo fue investigar qué papel juegan las proteínas SIAH2-DYRK2 en la carcinogénesis pulmonar, así como determinar el impacto clínico-patológico de su expresión en el tejido neoplásico. La modulación de la

ruta SIAH2-DYRK2 podría ser empleada como una terapia dirigida en pacientes con cáncer de pulmón.

**Palabras clave:** Cáncer de pulmón, pronóstico, SIAH2, DYRK2, adenocarcinoma, carcinoma epidermoide.

**Abstract:** Lung cancer (LC) continues to be the leading cause of cancer-related mortality worldwide. The high mortality highlights the limited efficacy of available therapies for LC treatment. Given the poor survival rate of LC, and considering that early diagnosis reduces mortality, special interest exists nowadays in searching for lung cancer biomarkers.

Recently, it has been suggested a possible role of DYRK2 in the development and progression of tumors, related to the induction of apoptosis in response oncogenic stress. In this regard, DYRK2 was identified as the most commonly up-regulated gene in lung adenocarcinomas, as well as a favourable prognostic factor in these tumors. Moreover, a mutual regulation between DYRK2 and the ubiquitin-ligase SIAH2 in response to hypoxia and DNA-damage signaling pathways has been demonstrated.

It is of paramount importance to search for new targets and therapeutic strategies in lung cancer. The aim of the study was to analyse the role of SIAH2-DYRK2 in the development of lung cancer, and to assess the clinical and pathological effects of the expression of these proteins in lung cancer tissue. Modulation of the route SIAH2-DYRK2 might be used as a new targeted therapy in lung cancer patients.

**Keywords:** Lung cancer, prognosis, SIAH2, DYRK2, adenocarcinoma, squamous cell lung cancer.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. La supervivencia a los 5 años del CP apenas se ha modificado en las últimas 2-3 décadas, siendo del 11 - 15%<sup>1</sup>. La causa principal del CP es el tabaquismo<sup>2</sup>. Existen 2 categorías principales de CP, que corresponden al 95% de los casos: el carcinoma microcítico de pulmón, o cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP); y el carcinoma no microcítico de pulmón, o cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)<sup>3</sup>. El CPCNP (85%) se subdivide a su vez en otros 3 subtipos histológicos predominantes: carcinoma epidermoide o escamoso (20 - 30%), adenocarcinoma (30 - 40%), y carcinoma de células grandes (5 - 10%).

La mayoría de pacientes con CP presentan una enfermedad avanzada al diagnóstico, lo que refleja la agresividad de esta neoplasia<sup>4</sup>. El estadio tumoral TNM al diagnóstico es el factor con mayor impacto en la supervivencia a largo plazo<sup>5</sup>. La 8ª Edición del TNM elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, *International Association for the Study of Lung Cancer*) es la que está vigente en la actualidad<sup>6</sup>.

Dada la pobre supervivencia actual del CP y la evidencia existente de que el diagnóstico precoz reduce la mortalidad, ha cobrado especial interés la búsqueda de biomarcadores.

Las proteínas SIAH (*seven in absentia homolog*) son E3 ubiquitin-ligasas con dominio RING (*Really Interesting New Gene*) finger. Estas proteínas participan en la degradación de proteínas por poliubiquitinación por el proteasoma<sup>7-9</sup>. Hace 2 décadas se descubrió el primer miembro de la familia, denominado *seven in absentia (sina)*, en *Drosophila melanogaster*<sup>10, 11</sup>. En humanos, la familia de proteínas SIAH está formada por sólo 2 subunidades (SIAH1 y SIAH2), productos de 2 genes diferentes<sup>4, 7, 9, 12</sup>.

La ubiquitinación es considerada, hoy en día, una prometedoras diana terapéutica del cáncer. De hecho, se ha demostrado la eficacia clínica de algunos compuestos inhibidores del proteasoma como el bortezomid en tumores tales como el mieloma múltiple o el linfoma de manto<sup>13</sup>. El proceso de ubiquitinación es una cascada jerárquica en la que 3 tipos de enzimas (E1, E2 y E3) actúan secuencialmente para promover la transferencia de Ub a los sustratos. Se han descrito gran variedad de sustratos de SIAH2, los cuales regulan importantes rutas de señalización celular. Entre estos sustratos destacan PML, TRAF2, PPAR, AKAP121, HDAC3, DCC, b-catenina, HIPK2, y la familia de prolin-hidroxilasas reguladoras de hipoxia (PHDs). *SIAH2*, el gen que codifica SIAH2, se localiza en el cromosoma 3q25<sup>14</sup>. En humanos, *SIAH2* se expresa a nivel de ARNm en la mayoría de tejidos<sup>14</sup>. Se ha detectado una expresión de SIAH2 en la práctica totalidad de los tumores. A nivel celular, aunque SIAH2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, las formas fosforiladas de la proteína se localizan exclusivamente en el núcleo y el área perinuclear, de modo que la función de SIAH2 se relaciona con proteínas localizadas en esta zona de la célula<sup>15</sup>.

La expresión de SIAH2 se encuentra regulada tanto a nivel de ARNm como de proteína mediante auto-ubiquitinación, mientras que la regulación de su actividad se realiza a través de su unión a diferentes proteínas<sup>16, 17, 18</sup>. En humanos, HIPK2 y DYRK2, miembros de la familia de quinasas DYRK (*dual-specificity tyrosine-regulated kinases*), fosforilan SIAH2, modificando así su actividad<sup>19, 20</sup>.

El papel de las proteínas SIAH en el cáncer es controvertido. Los estudios que relacionan la expresión de SIAH con el desarrollo de cáncer en humanos son escasos y, además, presentan resultados contradictorios en cuando a la clasificación de SIAH como oncogén o como gen supresor tumoral. Por una parte, muchos grupos han demostrado un papel oncogénico de SIAH2 en cáncer de mama<sup>21, 22</sup>, próstata<sup>23, 24</sup> y hepatocarcinoma<sup>25</sup>. Pero, por el contrario, también se ha catalogado a SIAH (especialmente, a SIAH1) como gen supresor tumoral en el cáncer de mama<sup>26</sup>, cáncer de estómago<sup>27</sup> y el hepatocarcinoma<sup>28</sup>. El papel de la proteína SIAH2 en el CP en humanos sólo se ha analizado en profundidad en 2 ocasiones<sup>29, 30</sup>. En el primer trabajo, los autores demostraron que SIAH2 desempeña un papel crítico en la patogénesis del CP, abriendo así la posibilidad de inhibir la actividad de SIAH como nueva terapia dirigida<sup>29</sup>. Los autores encontraron una fuerte asociación entre el incremento en la expresión de SIAH y la proliferación celular tumoral. Recientemente, Muller y cols. han analizado mediante inmunohistoquímica la expresión de SIAH2 en muestras de CBCNP procedentes de 3 cohortes de pacientes diferentes, encontrando mayores niveles de expresión en el carcinoma epidermoide<sup>30</sup>.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

### **Selección de pacientes:**

Se obtuvieron prospectivamente muestras de tejido pulmonar de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón sometidos a tratamiento quirúrgico en el Hospital

Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) entre enero de 2011 y diciembre de 2012. El Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía autorizó la colección, almacenamiento y utilización de las muestras en el Biobanco de tejidos de Córdoba. Se obtuvo de los pacientes el consentimiento informado para la cesión de las muestras excedentes del diagnóstico. Todas las muestras fueron revisadas histológicamente por 2 patólogos expertos en cáncer de pulmón. El 56% de los pacientes intervenidos presentaron un estadio clínico I (IA, IB). No se incluyó ningún paciente con estadio clínico IIIB ó IV, puesto que no son candidatos a tratamiento quirúrgico por tratarse de estadios avanzados, así como tampoco se seleccionaron aquellos casos con estadio clínico IIIA con afectación ganglionar mediastínica sometidos a quimioterapia de inducción. El diagnóstico patológico de las muestras incluidas en el estudio fue de adenocarcinoma (ADC) en 36 casos y carcinoma epidermoide (EPI) en 40. Además del tumor, en todos los casos se obtuvo tejido pulmonar sano adyacente al tumor. Las muestras fueron preservadas: mediante inmersión inmediata en el líquido de preservación RNALater® (Sigma, S. Louis-MO, EEUU); por congelación directa a -80°C en solución OCT (*optimum cutting temperature*); y también incluidas en parafina tras fijación con formol.

### **Análisis histológico:**

Se llevaron a cabo estudios de inmunohistoquímica a partir de las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. Se obtuvieron secciones de 5 µm, se montaron en cristales y, tras desparafinarlas, se realizó una rehidratación gradual en series de etanol y agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y el anticuerpo murino anti-SIAH2 24E6H3 (Novus Biologicals®, Cambridge, Reino Unido) en dilución 1:40, o el anticuerpo policlonal de conejo anti-DYRK2 (AP7534a; Abgent, San Diego, California; EEUU) en dilución 1:50. Para cada cristal, se analizó la intensidad de la tinción de las células tumorales comparadas con el tejido sano en su periferia. La evaluación de la intensidad de la tinción frente a SIAH2 fue: 0, no tinción o tinción muy tenue en menos del 10% de las células tumorales; 1+, tinción tenue en más del 10% de las células tumorales; 2+, tinción débil-moderada en más del 10% de las células tumorales; y 3+, tinción muy intensa en más del 10% de las células tumorales. Para DYRK2 se utilizó la escala de evaluación publicada previamente (Yamashita et al., 2009): 0 ó 1+, se consideró como DYRK2 negativa; 2+ ó 3+ fue considerada como DYRK2 positiva.

### **Extracción de ARN y qRT-PCR:**

Se extrajo ARN total a partir de las muestras tumorales y de pulmón sano correspondiente, preservadas a -80°C en RNALater. Para ello, se seleccionaron fragmentos de tejido de unos 50 mg de peso, se homogeneizaron en un disgregador TissueLyser LT (Qiagen®) y, posteriormente, se extrajo el ARN en un QIAcube (Qiagen®) empleando el RNasy® Mini Kit (Qiagen®). Se cuantificó la pureza del ARN obtenido inicialmente por determinación de la absorbancia en un NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA; EEUU) y después, mediante microchips Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (BIO-RAD, Madrid, España). La retrotranscripción del ARNm a ADNc fue llevada a cabo mediante iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Madrid, España). Seguidamente, se realizó una amplificación de los productos de retrotranscripción empleando el iQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de detección iCYCLER (Bio-Rad, Madrid, España), normalizando frente a la expresión del gen de β-actina, HPRT y la media de ambas (β-actina, HPRT).

### **Determinación de la expresión de proteínas:**

Se realizó una extracción de proteínas a partir de tejido (unos 50 mg) preservado en RNALater a -80 °C, procedentes tanto de tumor como de su correspondiente tejido sano. Para ello, cada fragmento tisular fue resuspendido en 300 µL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 10% NP-40) y suplementado con inhibidores de fosfatasa (500 mM NaF, 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) e inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina y PMSF). Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida 8-10% (SDS-PAGE), y transferidas después a una membrana fluoruro de polivinilideno durante 30 minutos a 20 voltios. Las membranas fueron incubadas en un tampón con leche desnatada al 5% , lavadas 3 veces consecutivas en TTBS e incubadas con el anticuerpo primario y secundario correspondiente. Finalmente fueron reveladas mediante sistema de quimioluminiscencia. Para la cuantificación de las intensidades de señal se empleó el software ImageJ v1.45.

### **Modelo de diferenciación a fenotipo epidermoide con células BEAS-2B:**

La línea celular BEAS-2B (SIGMA; European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Reino Unido) corresponde a células del epitelio bronquial humano. Se llevó a cabo un modelo de diferenciación *in vitro* de células epiteliales bronquiales a células de carcinoma epidermoide de pulmón. Tras mantenerlas en cultivo en medio libre de suero LHC-9 (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EEUU) y con una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, se logró una diferenciación a fenotipo de carcinoma pulmonar epidermoide incubando las células en el referido medio LHC-9 enriquecido con 10% de suero fetal bovino (FBS) durante 7 días. Se analizó su expresión mediante western-blot.

### **Análisis estadístico:**

Para detectar diferencias entre variables categóricas se utilizaron la  $\chi^2$  cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher. Para comparar medias entre variables cuantitativas, se empleó la t de student para muestras independientes y datos con distribución normal, mientras que el test de Mann-Whitney se empleó cuando no se pudo determinar la distribución normal. Se usó el test de Kruskal-Wallis para variables con más de 2 categorías. Para determinar la relación entre 2 variables continuas se empleó la regresión lineal. Se consideraron como significativos valores de P inferiores a 0,05. Para el análisis estadístico se empleó el software SPSS (SPSS para Mac: SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

## **RESULTADOS**

Nuestro grupo analizó muestras de 76 de pacientes con CP y su correspondiente tejido sano adyacente (n = 36 ADC, n = 40 EPI). Como se muestra en la Figura 1, se detectaron cambios sutiles en la expresión de SIAH2 a nivel génico tanto en las muestras de adenocarcinoma como en el carcinoma epidermoide, aunque no estadísticamente significativos.

A continuación, investigamos si la expresión de SIAH2 a nivel proteico se encuentra alterada en el CP. Para ello, se llevó a cabo una extracción de proteínas totales de las mismas 76 muestras de pacientes con CP, y se comparó la expresión de SIAH2 a nivel proteico en las muestras tumorales con la del tejido sano correspondiente. Como se

muestra en la Figura 2, encontramos que la expresión de SIAH2 a nivel proteico estaba incrementada de forma significativa tanto en el adenocarcinoma como en el carcinoma epidermoide comparado con el tejido sano correspondiente (Figuras 2A y 2B). Además, tras analizar las veces de inducción de SIAH2 en el tumor respecto al tejido sano del mismo paciente, se evidenció que la mayor expresión de SIAH2 se encuentra en el adenocarcinoma, en el que la expresión se vio incrementada por 4 veces, comparado con el carcinoma epidermoide, en el que la expresión se incrementó 2 veces (Figura 2C). Debido a la diferencia observada en la inducción de SIAH2 a nivel de ARNm y de proteína, decidimos analizar en más detalle una selección de 16 muestras (8 ADC y 8 EPI). Como se muestra en la Figura 2D, en la mayoría de los casos la expresión de SIAH2 a nivel proteico se encuentra incrementada, independientemente de la expresión de SIAH2 a nivel génico. Estos resultados apuntarían hacia la existencia de un cambio o alteración en mecanismos de control a nivel post-transcripcional en las células tumorales respecto al tejido pulmonar sano.

Para evaluar si la expresión de SIAH2 puede ser asociada a la carcinogénesis pulmonar, decidimos analizar mediante inmunohistoquímica la expresión de SIAH2 y su patrón de localización en el CP, en la cohorte completa de pacientes. Se observó que la expresión de SIAH2 era intensa en ambos tipos tumorales (adenocarcinoma y carcinoma epidermoide) siendo la expresión predominantemente nuclear (Figura 3). La intensidad de tinción en las muestras de CP fue fuerte y homogénea, respecto al tejido sano adyacente, que presentaba una tinción celular aislada y ocasional.

A continuación, para determinar si la expresión endógena de SIAH2 a nivel proteico se modifica con el grado de agresividad tumoral, analizamos la expresión de SIAH2 en diferentes tipos de CP, incluyendo adenocarcinoma bien diferenciado, adenocarcinoma pobremente diferenciado y carcinoma epidermoide. Como se muestra en la Figura 4, el porcentaje de células tumorales que expresaban SIAH2 se incrementó con el grado histológico, siendo mayor en las muestras de tumores pobremente diferenciados. Un hallazgo importante fue la existencia de una diferente expresión de SIAH2 entre el carcinoma epidermoide y el adenocarcinoma, siendo la intensidad de tinción más elevada en el carcinoma epidermoide que en el adenocarcinoma.

Para determinar la repercusión clínica de la expresión de SIAH2 en el CP, analizamos la relación entre diferentes características clínico-patológicas y los cambios en la expresión de SIAH2 a nivel de ARNm y proteína, tanto en tumores como en el tejido sano correspondiente. Cabe destacar que se evidenció la existencia de una correlación positiva entre la expresión de SIAH2 a nivel proteico y el valor del SUV<sub>máx</sub> del tumor ( $p = 0,014$ ). Otra observación importante fue la existencia de una correlación positiva entre el incremento del tamaño del tumor y la mayor captación de 18 FDG ( $p = 0,012$ ) (Figura 5).

Finalmente, decidimos correlacionar la expresión de SIAH2 con la de alguno de sus substratos. Para ello, evaluamos el posible impacto de la regulación mutua entre la expresión de SIAH2 y DYRK2, previamente demostrada<sup>20</sup>, en el CP. Se observó un incremento significativo en la expresión de DYRK2 en las muestras de tejido sano comparado con el correspondiente tejido tumoral (Figura 6A), lo que sugeriría que la sobreexpresión de SIAH2 se asociaría a un descenso en la expresión de sus substratos. Por último, corroboramos los resultados anteriores empleando un modelo *in vitro* de diferenciación de células progenitoras a células de carcinoma broncogénico. Para ello,

se analizaron los niveles de expresión de SIAH2 y DYRK2 a nivel de ARNm y proteína en la línea celular de epitelio bronquial humano BEAS-2B. Se encontró una expresión inversa entre los niveles de expresión de SIAH2 y de DYRK2, tanto en las células de epitelio bronquial humano normal, como en las diferenciadas a fenotipo de carcinoma epidermoide (Figura 6B), sin observarse por el contrario cambios significativos en la expresión a nivel de ARNm. Estos resultados del modelo de diferenciación *in vitro* refuerzan la asociación entre la expresión de SIAH2 a nivel proteico en el CP observado en las muestras tumorales, que a su vez se asocia a un descenso en la expresión de sus substratos tales como DYRK2.

## DISCUSIÓN

Se han publicado resultados contradictorios en cuanto al papel de SIAH (oncogén o gen supresor tumoral) en la progresión neoplásica. Sin embargo, datos procedentes de estudios *in vitro*, modelos animales y cohortes de pacientes han demostrado un papel predominante de SIAH2 como oncogén en tumores sólidos y neoplasias hematológicas<sup>31</sup>. Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan esta observación, puesto que observamos que el incremento en la expresión de SIAH2 dependía del grado histológico del tumor.

Varios autores han señalado la importancia de SIAH2 en la carcinogénesis. Así, Schmidt y cols.<sup>32</sup> encontraron que la reducción de la función de SIAH incrementaba la apoptosis celular y tenía efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral en el cáncer de páncreas. El mismo grupo demostró la existencia de una fuerte asociación entre el incremento en la expresión de SIAH y la proliferación de las células tumorales en el CP (aunque los autores no diferenciaron entre las 2 isoformas de la proteína)<sup>29</sup>, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. En otro trabajo, empleando un modelo singénico de cáncer de mama, los autores mostraron que el bloqueo del sitio de unión a sustrato de SIAH se asociaba a una disminución del crecimiento tumoral y un bloqueo de la angiogénesis<sup>33</sup>. En un trabajo reciente realizado también en células de cáncer de pulmón los autores comprobaron que SIAH2 aceleraba la degradación de TYK2 (*Non-receptor tyrosine-protein kinase* TYK2) por el proteasoma, lo que producía una inactivación de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*). Además, se encontró una mayor expresión de SIAH2 en determinados subtipos histológicos de CP (carcinoma epidermoide), en línea con lo encontrado por nuestro grupo en el presente trabajo.

Se ha evidenciado la existencia de una regulación mutua entre DYRK2 y SIAH2 en respuesta a hipoxia<sup>20</sup>. DYRK2 es una proteína de la familia DYRK (*dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinases*), las cuales desempeñan una función primordial en la ruta de señalización en respuesta al daño al ADN y en la proliferación celular. Además, se ha descrito una menor expresión de DYRK2 en tumores agresivos<sup>34</sup>. En el presente trabajo encontramos que el incremento en la expresión de SIAH2 suprimía la expresión de DYRK2, lo que sugiere que el acúmulo de SIAH2 podría relacionarse de forma inversa con la expresión de proteínas clave en el control de la progresión tumoral y la invasión de los tejidos, tales como DYRK2 o STAT3. De esta manera, SIAH2 podría ser empleada como una potencial diana terapéutica en el CP.

El aspecto más relevante y novedoso de nuestro trabajo fue el llevar a cabo, por primera vez, un análisis de la expresión de SIAH2 en el CP a diferentes niveles. Demostramos la existencia de una inducción en la expresión de SIAH2 a nivel génico en el carcinoma

epidermoide respecto al pulmón sano, aunque no significativa. Por el contrario, no encontramos diferencias en la expresión de SIAH2 en el adenocarcinoma. En cuanto a la expresión de SIAH2 a nivel proteico, encontramos una mayor expresión de SIAH2 en el CP en ambos subtipos histológicos comparado con el pulmón sano, siendo estos hallazgos estadísticamente significativos. Las diferencias observadas en la expresión de SIAH2 a nivel génico y proteico podrían deberse a la existencia de alguna alteración a nivel post-transcripcional.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican la existencia de una asociación entre la expresión de SIAH2 y el cáncer de pulmón, que a su vez se asocia con el grado histológico, la captación de fluodesoxiglucosa y un descenso en la expresión de substratos de SIAH2 tales como DYRK2. Estas observaciones apuntan hacia el posible uso de SIAH2 como marcador diagnóstico y pronóstico en el cáncer de pulmón. En concreto, el análisis de SIAH2 podría mejorar el proceso diagnóstico del cáncer de pulmón, y podría mejorar el conocimiento que se tiene actualmente de su pronóstico. Además, podría convertirse en diana terapéutica del cáncer de pulmón, mediante su uso como terapia dirigida.

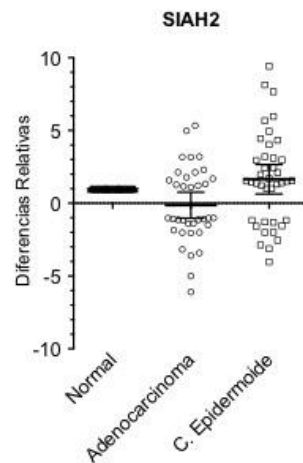
## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Butler CA, Darragh KM, Currie GP et al. Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute? *Respir Med* 2006; 100: 1642-1646.
- 2 Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21S-49S.
- 3 Travis W.D. BEMHH, Harris CC. Pathology and Genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. In: Press I, ed. Lyon, France, 2004.
- 4 Spiro SG, Gould MK, Colice GL et al. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132: 149S-160S.
- 5 Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 694-705.
- 6 Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 39-51.
- 7 Lorick KL, Jensen JP, Fang S et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11364-11369.
- 8 Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 35857-35860.
- 9 Tang AH, Neufeld TP, Kwan E et al. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* 1997; 90: 459-467.
- 10 Carthew RW, Neufeld TP, Rubin GM. Identification of genes that interact with the sina gene in Drosophila eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11689-11693.



- 11 Li S, Li Y, Carthew RW et al. Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* 1997; 90: 469-478.
- 12 Hu G, Zhang S, Vidal M et al. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997; 11: 2701-2714.
- 13 Jones RJ, Chen Q, Voorhees PM et al. Inhibition of the p53 E3 ligase HDM-2 induces apoptosis and DNA damage--independent p53 phosphorylation in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5416-5425.
- 14 Hu G, Chung YL, Glover T et al. Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* 1997; 46: 103-111.
- 15 Khurana A, Nakayama K, Williams S et al. Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *J Biol Chem* 2006; 281: 35316-35326.
- 16 Depaux A, Regnier-Ricard F, Germani A et al. Dimerization of hSiah proteins regulates their stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 857-863.
- 17 Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; 7: 915-926.
- 18 Nakayama K, Frew IJ, Hagensen M et al. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 2004; 117: 941-952.
- 19 Calzado MA, de la Vega L, Moller A et al. An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 85-91.
- 20 Perez M, Garcia-Limones C, Zapico I et al. Mutual regulation between SIAH2 and DYRK2 controls hypoxic and genotoxic signaling pathways. *J Mol Cell Biol* 2012; 4: 316-330.
- 21 Behling KC, Tang A, Freydin B et al. Increased SIAH expression predicts ductal carcinoma in situ (DCIS) progression to invasive carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 717-724.
- 22 Chan P, Moller A, Liu MC et al. The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R19.
- 23 Qi J, Nakayama K, Cardiff RD et al. Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* 2010; 18: 23-38.
- 24 Qi J, Tripathi M, Mishra R et al. The E3 ubiquitin ligase Siah2 contributes to castration-resistant prostate cancer by regulation of androgen receptor transcriptional activity. *Cancer Cell* 2013; 23: 332-346.
- 25 Brauckhoff A, Malz M, Tschaharganeh D et al. Nuclear expression of the ubiquitin ligase seven in absentia homolog (SIAH)-1 induces proliferation and migration of liver cancer cells. *J Hepatol* 2011; 55: 1049-1057.
- 26 Bruzzoni-Giovanelli H, Fernandez P, Veiga L et al. Distinct expression patterns of the E3 ligase SIAH-1 and its partner Kid/KIF22 in normal tissues and in the breast tumoral processes. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 10.
- 27 Kim H, Jeong W, Ahn K et al. Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2042-2049.
- 28 Yoshibayashi H, Okabe H, Satoh S et al. SIAH1 causes growth arrest and apoptosis in hepatoma cells through beta-catenin degradation-dependent and -independent mechanisms. *Oncol Rep* 2007; 17: 549-556.

- 29 Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1606-1629.
- 30 Muller S, Chen Y, Ginter T et al. SIAH2 antagonizes TYK2-STAT3 signaling in lung carcinoma cells. *Oncotarget* 2014; 5: 3184-3196.
- 31 Wong CS, Sceneay J, House CM et al. Vascular normalization by loss of Siah2 results in increased chemotherapeutic efficacy. *Cancer Res* 2012; 72: 1694-1704.
- 32 Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU et al. Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer Res* 2007; 67: 11798-11810.
- 33 Moller A, House CM, Wong CS et al. Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene* 2009; 28: 289-296.
- 34 Taira N, Mimoto R, Kurata M et al. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin Invest* 2012; 122: 859-872.



**Figura 1:** Expresión de SIAH2 a nivel génico en el cáncer de pulmón. Se realizó una extracción de ARN total a partir de tejido, evaluándose la integridad del mismo y se analizaron los cambios en la expresión de SIAH2 en las muestras tumorales respecto al tejido sano del mismo paciente, mediante PCR cuantitativa, expresándose como veces de inducción. Las eficiencias de amplificación fueron validadas y normalizadas frente a  $\beta$ -actina y HPRT, realizándose el cálculo de las veces de inducción o inhibición en la expresión génica mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE (desviación estándar).

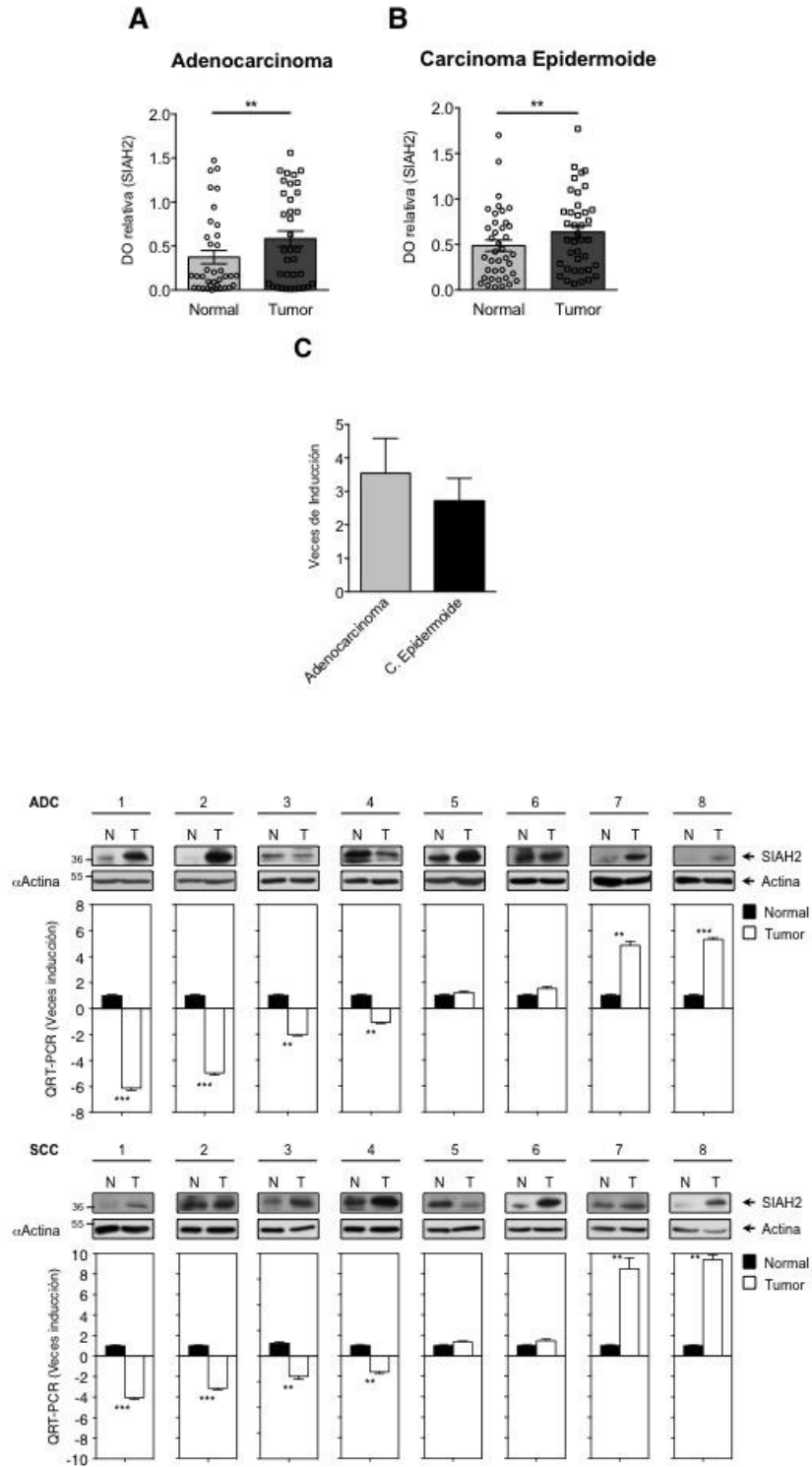
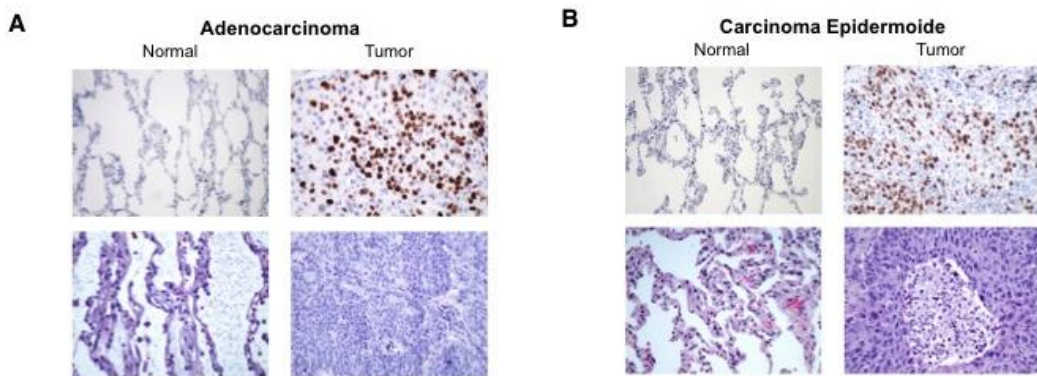


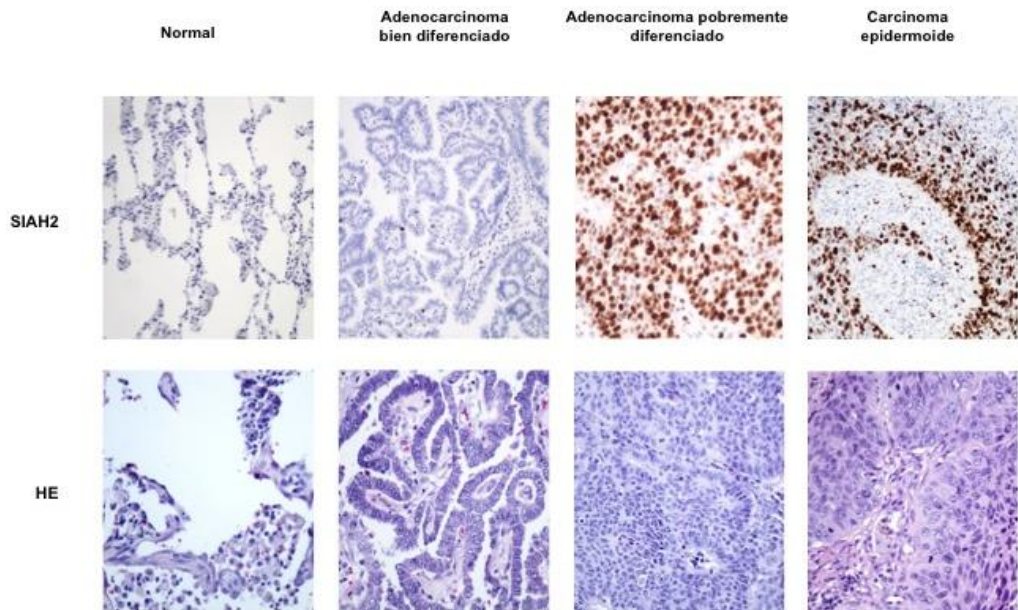
Fig 2

**Figura 2:** Expresión de SIAH2 a nivel proteico en el cáncer de pulmón comparado con el tejido pulmonar sano correspondiente (A, B). Se realizó una extracción de proteínas totales a partir de muestras de adenocarcinoma o carcinoma epidermoide así como del tejido sano correspondiente para cada caso. Se analizó la expresión de SIAH2 a nivel proteico mediante western blot, cuantificándose las bandas por densitometría tras normalizar frente a la

intensidad de señal de la actina. Los resultados se muestran como expresión relativa de densidades ópticas, representando el valor medio  $\pm$  desviación estándar (DE),  $**p < 0.001$ . *C*: Representación de las veces de inducción de la expresión de SIAH2 en las muestras tumorales comparadas con el tejido pulmonar sano correspondiente del mismo paciente. Los resultados representan el valor medio  $\pm$  DE. *D*: Resultados de una selección de 16 pacientes (8 ADC, 8 EPID) con un amplio rango de expresión diferencial de ARNm entre el tejido normal (N) y el tumor (T). Se analizó la expresión de SIAH2 a nivel proteico por inmunoblot (panel superior) y la expresión a nivel génico por PCR cuantitativa (panel inferior). Los datos representan el valor medio  $\pm$  DE de 3 experimentos ( $**p < 0.001$  y  $***p < 0.0001$ ).

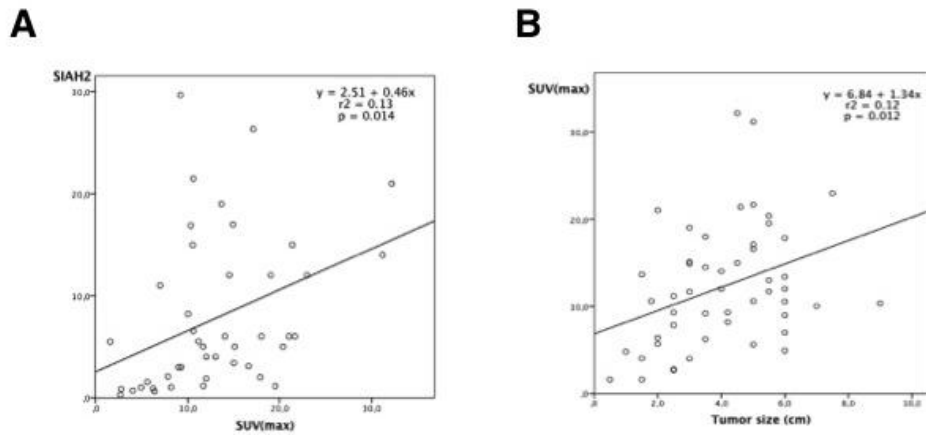


**Figura 3:** Expresión de SIAH2 en el adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide por inmunohistoquímica. Imágenes representativas de neoplasia pulmonar y su tejido sano adyacente teñido con el anticuerpo de SIAH2 y hematoxilina-eosina (x100).

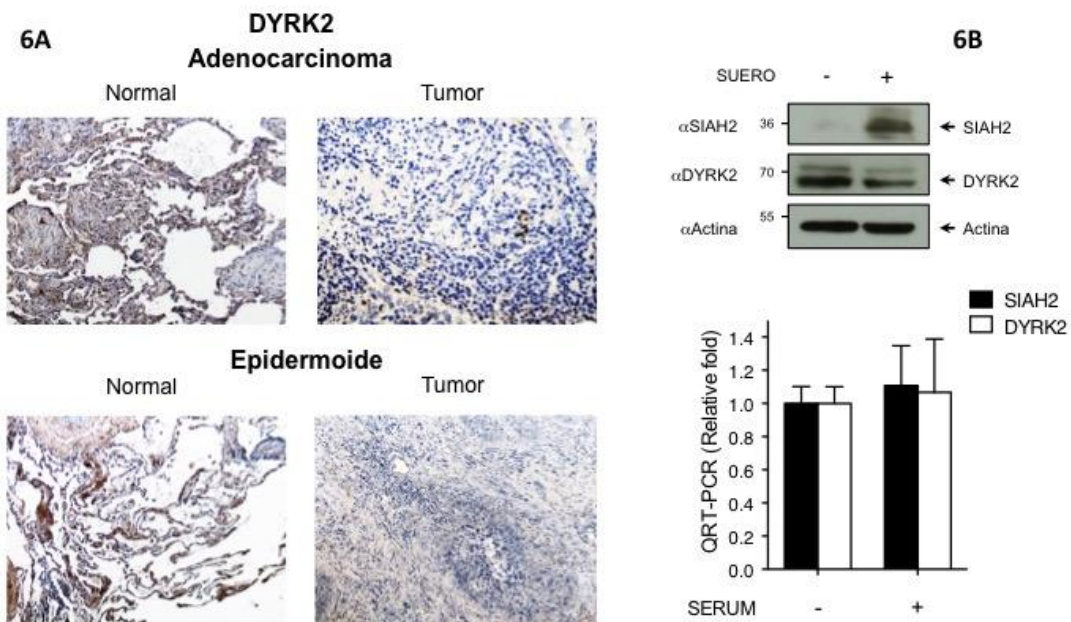


**Figura 4:** Asociación entre la expresión de SIAH2 y el grado tumoral. Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico de SIAH2 en el tejido pulmonar sano, adenocarcinoma bien diferenciado, adenocarcinoma pobremente diferenciado, y carcinoma epidermoide. El tejido pulmonar sano presentó una

tinción nuclear ocasional, comparado con una intensidad de tinción moderada en el adenocarcinoma bien diferenciado, y una muy intensa tinción en el adenocarcinoma pobremente diferenciado y en el carcinoma epidermoide. (HE: hematoxilina-eosina) (x100).



**Figura 5:** Gráfico de dispersión que muestra los resultados del análisis de correlación de Pearson. **A:** Correlación positiva entre la expresión de SIAH2 a nivel proteico y la captación de fluodesoxiglucosa (medida como SUVmax) por el tumor primario ( $p = 0.014$ ),  $r2 = 0.13$ ). **B:** Correlación positiva entre el creciente tamaño tumoral y la captación de fluodesoxiglucosa por el tumor ( $p = 0.012$ ,  $r2 = 0.12$ ).



**Figura 6:** La expresión de SIAH2 a nivel proteico se correlaciona con la expresión de DYRK2. **A:** Imágenes representativas de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, así como del correspondiente tejido sano, teñidas con el anticuerpo DYRK2 (x100). **B:** Las células BEAS-2B fueron cultivadas con o sin suero durante 7 días, posteriormente lisadas, y la expresión proteica evaluada por inmunoblot con los anticuerpos correspondientes (panel superior). La expresión de ARNm se muestra en el panel inferior. Se presentan los resultados de inmunoblot de 3 experimentos independientes, indicándose las posiciones y los pesos moleculares en kDa.