

---

Tesis doctoral

La ciclina CNTD2: un nuevo inductor del desarrollo tumoral

Abril Sánchez Botet

---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-  
NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

[ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0  
Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0  
International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)







**UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**La ciclina CNTD2: un nuevo inductor del  
desarrollo tumoral**

**ABRIL SÁNCHEZ BOTET**

**2018**







# **La ciclina CNTD2: un nuevo inductor del desarrollo tumoral**

**Abril Sánchez Botet**

Memoria de la tesis doctoral presentada por Abril Sánchez Botet, para optar al título de Doctor por la Universitat Internacional de Catalunya.

Trabajo realizado en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya, bajo la dirección del Doctor Josep Clotet Erra y codirigido por la Doctora Mariana Ponte Cardoso.

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universitat Internacional de Catalunya

Sant Cugat del Vallés, 2018

**Dr. Josep Clotet Erra**

Director de tesis

**Dra. Mariana Ponte Cardoso**

Codirectora de tesis



**Todas estas cosas había una vez, cuando  
yo soñaba un mundo al revés...**

*Jose Agustín Goytisolo*





# **AGRADECIMIENTOS**

---



Todavía me acuerdo del primer día como si fuera ayer, cuando mi madre me dejó en la puerta de la que sería mi casa durante los siguientes 4 años. Estaba nerviosa, como una niña que va al colegio por primera vez, pero sola y muy lejos de casa. Con un nudo en la barriga avancé por el pasillo hasta donde se leía en un letrero: “laboratorio de biomedicina”. Entré y vi a una persona de espaldas. Tímidamente le pregunté: ¿sabes dónde está el despacho del Doctor Josep Clotet?. Y así es como entré a formar parte de esta familia, mi familia de Barcelona.

Esa chica de espaldas era Marta, que junto con Eva y Marta (Palito) me acogieron desde el primer día como a una hermana pequeña, o como a “la hija”, como diría Nati. Gracias por arroparme y por hacerme sentir que no estaba sola en esos primeros meses de adaptación. Gracias por los consejos, el apoyo, las salidas a Plataforma y a la playa, el viaje a Madrid que nunca olvidaré, las coca-colas zero y los zumos de piña, y por supuesto, gracias por las patatas bravas. En especial Marta, gracias por haber sido mi compañera del sur, por avisarme de como cerrar las bolsas de anticuerpo desde el primer día, por compartir tan largas charlas en las que aburríamos hasta a los pasajeros del tren, por las cenas románticas y por los momentos de llanto.

Gracias Samu y Sara por haberme enseñado mis primeras cosas aquí. Por hacerme ir corriendo de una punta a otra del laboratorio (Samu) y por enseñarme a crecer (Sara).

Gracias Mariana y Nati por ser mis mamás, por enseñarme (o intentarlo) a tener paciencia y a ser más tolerante ante la frustración. Vuestras sesiones de psicología no tienen precio.

Gracias a Núria Casals, a Rut, a Rosi y a Miguel por vuestra sonrisa y la alegría que desprendéis. Por ser un ejemplo y poder siempre contar con vosotros.

Gracias a Bárbara, Reyes y a Laura, por compartir tantas ideas y opiniones, por apoyarnos y animarnos, y sobre todo por las risas.



Gracias a Helena y a Bego. A Bego por ser mi compañera de viaje porque cada días me das los mejores buenos días. Sin ti esas esferitas no habrían crecido igual. A Helena por tener las conversaciones más profundas y por nuestras ganas de cambiar el mundo.

Gracias a Nuria y Alexis, por ser mis minifósiles y por la ayuda en momentos de desesperación.

Cris, María y Eli. Nunca pensé que aquí encontraría a personas con las que congeniaría tanto. Habéis sido un pilar fundamental en los últimos años. Eli, gracias por tus locuras, tus historias con “el Jaime” que tanto nos han hecho reír y por gustarte tanto los animales como a mí. María, gracias por tu bondad, por estar siempre dispuesta a ayudar, por aportarme la calma que me hace falta y a la vez ser tan divertida. Cris, gracias por tus abrazos, por tu sonrisa, por contagiarme la felicidad, por ser tan distinta y a la vez tan igual a mí.

Javi, gracias por tu sabiduría. Por estar pendiente de mí y hacerme ver que todo saldría bien.

Gracias a mi jefe, a Pep, por haber aprendido a entendernos, por haber creído en mí. Por haber transformado a un torbellino con muchas ganas de aprender y hacer cosas en alguien con más cabeza y organización. Por haberme convertido en investigadora.

Gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermana. Gracias por hacer que nada cambie, mantener nuestras peleillas para que hacer la tesis sea más distraída, y por enterrarme en lomo y jamón cada vez que vuelvo a casa. Gracias a mi bebé, Ángel, por darme la ilusión de que el tiempo pase para volver y ver como creces. Gracias Luky por tus ánimos incondicionales, porque ya eres parte de nuestra familia.

Y a ti Agus. Sin ti nada de esto habría sido posible. Gracias por dejar Austria y creer que el doctorado aquí era posible, gracias por cada día que pasamos juntos lejos de casa haciendo un nuevo hogar de cualquier lugar en el que estemos.

# ÍNDICE

---



## INTRODUCCIÓN

<b>1. REGULADORES DEL CICLO CELULAR: CDKS Y CICLINAS .....</b>	<b>3</b>
1.1 El ciclo celular .....	3
1.2 Complejos <i>CDKs</i> -ciclinas .....	4
1.3 Complejos <i>CDKs</i> -ciclinas en cáncer .....	5
1.4 Nuevas ciclinas.....	6
1.4.1 CNTD1 .....	8
1.4.2 CNTD2 .....	8
1.4.3 CCNG1 .....	9
1.4.4 CCNG2 .....	9
1.4.5 CCNI.....	10
1.4.6 CCNO .....	10
1.4.7 CCNY .....	11
1.4.8 SPY1 .....	11
<b>2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER .....</b>	<b>12</b>
2.1 Cáncer colorrectal .....	12
2.2 Cáncer de pulmón.....	12
2.3 Cáncer de mama .....	13
<b>3. BIOLOGÍA DEL CÁNCER .....</b>	<b>14</b>
3.1 Proliferación .....	15
3.2 Transición <i>Epithelial-to-mesenchymal (EMT)</i> .....	15
3.3 <i>Cancer stem cells (CSCs)</i> .....	17
3.4 Migración e invasión .....	17
3.5 Resistencia a fármacos .....	18
3.5.1 Transportadores <i>ABC</i> .....	19

## HIPÓTESIS

Hipótesis.....	23
----------------	----

## OBJETIVOS

Objetivos .....	27
-----------------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. ANÁLISIS DE RNA.....</b>	<b>33</b>
1.1 <i>RT-PCR</i> .....	33
1.2 <i>Q-PCR</i> .....	33
<b>2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>35</b>
2.1 Extracción de proteína de tejido parafinado .....	35
2.2 Extracción de proteína de líneas celulares.....	35
2.3 Fraccionamiento celular .....	35

2.4 Cuantificación de proteínas.....	36
2.4.1 Bradford .....	36
2.4.2 BCA.....	36
2.5 <i>Western Blot</i> .....	37
2.6 Inmunofluorescencia .....	38
2.7 Inmunohistoquímica.....	38
<b>3. PRODUCCIÓN DE VIRUS .....</b>	<b>40</b>
3.1 Construcciones plasmídicas .....	40
3.1.1 Vectores lentivirales .....	40
3.1.2 Clonación de CNTD2 y CCNO .....	41
3.2 Transfección.....	43
3.3 Recogida de sobrenadantes y concentración vírica.....	43
3.4 Titulación .....	44
3.5 Infección.....	45
<b>4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR .....</b>	<b>45</b>
4.1 Líneas celulares .....	45
4.2 Viabilidad celular .....	46
4.3 Conteo celular .....	46
4.4 Formación de colonias .....	47
4.5 Crecimiento en <i>soft-agar</i> .....	47
4.6 Migración por <i>wound healing</i> .....	47
4.7 Migración por Transwell.....	48
4.8 Análisis de ciclo celular .....	48
4.9 Silenciamiento de CNTD2 .....	49
4.10 Formación de esferas .....	50
4.10.1 En suspensión .....	50
4.10.2 En Matrigel .....	51
<b>5. RATONES XENÓGRAFOS .....</b>	<b>51</b>
<b>6. MUESTRAS CLÍNICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....</b>	<b>52</b>

## RESULTADOS

### CAPÍTULO 1: CNTD2 promueve la proliferación y migración en cáncer colorrectal .....57

1. Los niveles de expresión de CNTD2 y CCNO se encuentran alterados en tejidos de cáncer colorrectal. .... 59
2. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la proliferación en células de cáncer de colon..... 63
3. La sobreexpresión de CNTD2 promueve la migración de las células de CCR ..... 67

4. La sobreexpresión de CNTD2 promueve la transición a células madre cancerígenas. ....	70
5. La sobreexpresión de CNTD2 acelera el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> .....	72
6. CNTD2 como factor pronóstico y diana terapéutica de CCR. ....	73

**CAPÍTULO 2: CNTD2 incrementa la desdiferenciación y la resistencia a fármacos en las células cancerígenas. .... 77**

1. CNTD2 se encuentra sobreexpresado en varios tipos tumorales .....	79
2. Los niveles de expresión de CNTD2 son mayores en modelos celulares menos diferenciados .....	80
3. CNTD2 incrementa el número de CSCs.....	82
4. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la expresión de marcadores de CSCs...	84
5. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la expresión de marcadores de pluripotencia.....	85
6. La sobreexpresión de CNTD2 otorga resistencia a fármacos a través de transportadores ABC .....	87
7. CNTD2 se expresa en células pluripotentes y disminuye con la diferenciación...	89
8. CNTD2 se encuentra en el núcleo de las células tumorales.....	90

**DISCUSIÓN**

Discusión.....	93
----------------	----

**CONCLUSIONES**

Conclusiones .....	105
--------------------	-----

**ABREVIATURAS**

Abreviaturas .....	109
--------------------	-----

**BIBLIOGRAFÍA**

Bibliografía .....	113
--------------------	-----

**ANEXO 1: Protocolos**

Protocolos .....	127
------------------	-----

**ANEXO 2: Artículos**

Artículos .....	151
-----------------	-----



# **INTRODUCCIÓN**

---



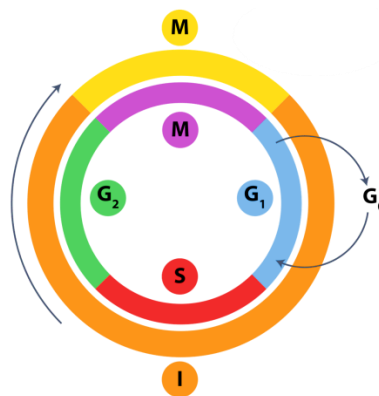


## 1. REGULADORES DEL CICLO CELULAR: CDKS Y CICLINAS

### 1.1 El ciclo celular

El ciclo celular es un proceso fundamental y ordenado en el que el *DNA* de una célula se replica y los cromosomas homólogos son equitativamente distribuidos a dos células hijas<sup>1</sup>. Tradicionalmente el ciclo celular se ha dividido en dos etapas: la mitosis, que hace referencia al proceso de división celular, y la interfase, que es el periodo entre dos mitosis. La interfase a su vez se divide en tres fases:  $G_1$ , S y  $G_2$ . Durante la fase  $G_1$  la célula se prepara para la síntesis de *DNA*, en S se produce la replicación y en  $G_2$  la célula se prepara para entrar en mitosis. Sin embargo la mayoría de las células en mamíferos entran en un estado de quiescencia denominado  $G_0$ <sup>2</sup>.

Muchos reguladores clave del ciclo celular son activados o inactivados en puntos específicos del ciclo, como es el caso de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (*CDKs*), que ven su acción modulada por las ciclinas, y es este control traduccional el que permite que se puedan producir cambios rápidos y reversibles entre las distintas fases para que se dé una respuesta tanto a condiciones fisiológicas como patológicas<sup>1</sup>.



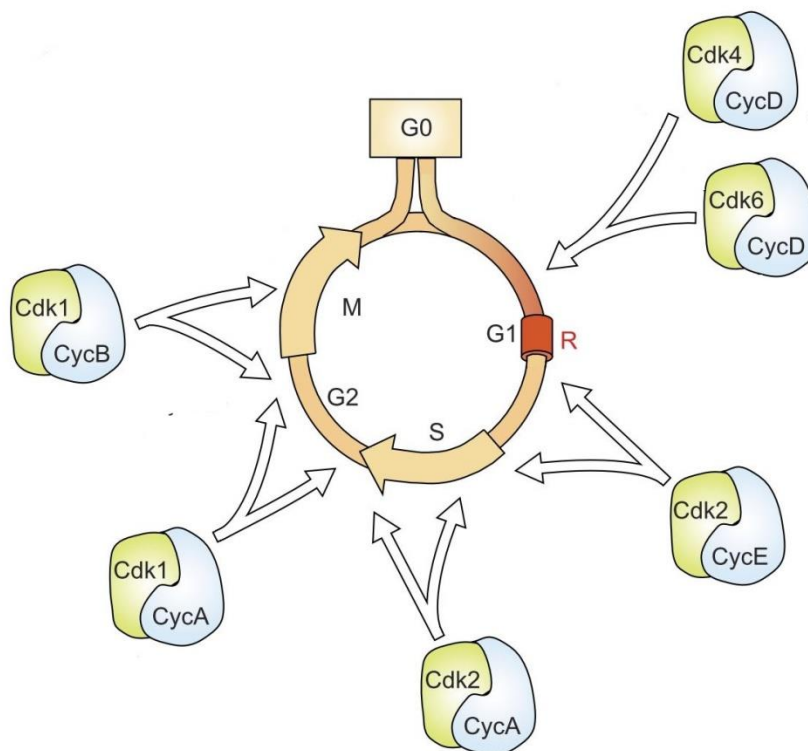
**Figura 1. Representación de las principales fases del ciclo celular.** Adaptada de Richard Wheeder, 2006<sup>3</sup>.

### 1.2 Complejos *CDKs*-ciclinas

Las *CDKs* son subunidades catalíticas que pertenecen a una amplia familia de serina/treonina proteína quinasas que en muchos casos están involucradas en el control de la progresión a través del ciclo celular<sup>4</sup>. La activación catalítica de las *CDKs* requiere su unión con una subunidad activadora denominada ciclina<sup>5</sup>. A estos reguladores de las *CDKs* se les otorgó como nombre el término ciclina, en primera instancia, por su capacidad de ser sintetizadas y degradadas a lo largo del ciclo celular, aunque hoy en día se sabe que no todas son sintetizadas y destruidas de forma cíclica, ni tienen como función la activación de una *CDK*<sup>6</sup>. Actualmente estas proteínas están estructuralmente definidas por la presencia de un dominio de unos 100 aminoácidos denominado *cyclin box*, que interacciona con la *CDK*<sup>6</sup>.

La progresión a través de  $G_1$  está regulada por complejo mecanismo que involucra al menos a tres *CDKs*: *CDK4*, *CDK6* y *CDK2* y sus respectivos reguladores<sup>7</sup>. En el comienzo, las señales mitóticas inducen la síntesis de la ciclina D, así como la translocación de *CDK4* o *CDK6* al núcleo. Estos complejos activos gracias a las ciclinas D, fosforilan a su vez a los miembros de la familia de retinoblastoma (Rb), que incluyen a pRb, p107 y p130, y los inactivan<sup>8</sup>. Las proteínas Rb actúan reprimiendo la transcripción mediante el bloqueo de las ciclinas E, que son necesarias a su vez para activar a *CDK2* y completar la fase  $G_1$ . La inactivación de pRb es crucial para la transcripción de genes que serán necesarios en las siguientes fases del ciclo, como son los genes que codifican para las ciclinas A y B<sup>5</sup>. Las ciclinas A se acumulan durante la fase S, mientras que la síntesis de las ciclinas B no se hace evidente hasta la transición  $G_2$ -M<sup>1</sup>. Al final de la fase  $G_1$  la ciclina E deja de estar unida a *CDK2*, y se da el paso a la fase S gracias a la unión de las ciclinas A con esta *CDK2*<sup>9,10</sup>. Cuando va a terminar la fase S, las ciclinas A se asocian con *CDK1* para dar el salto a la fase  $G_2$ , fase en la que se va a proceder a la replicación del DNA. Una vez se ha hecho el pase entre estas dos fases, las ciclinas A son degradadas mediante mecanismos de ubiquitinación, y las ciclinas B pasan a ser activamente sintetizadas para unirse a *CDK1*, lo que permitirá al ciclo avanzar hasta la mitosis, ya que estos complejos promueven la separación de los centrosomas mediante la fosforilación de la proteína motora asociada al centrosoma

Eg5, además de estar implicados en otros procesos como la condensación de los cromosomas o la rotura de la lámina nuclear<sup>5</sup>. Finalmente, la inactivación de los complejos CDK1-ciclina B es necesaria para la adecuada finalización de la mitosis, y es llevada a cabo mediante la ubiquitinación y degradación proteolítica de las ciclinas B<sup>11</sup>.



**Figura 2. Papeles de los complejos CDK-ciclinas en la regulación del ciclo celular.** *Adaptada de Malumbres y Barbacid, Genome Biol, 2004<sup>5</sup>*

### 1.3 Complejos CDK-ciclinas en cáncer

Durante los últimos años una gran cantidad de información científica ha demostrado la relevancia de la desregulación del ciclo celular en la aparición de muchos tipos de cánceres<sup>12,13</sup>. Los tumores acumulan mutaciones que resultan en la activación constitutiva de señales pro-mitogénicas y respuestas ineficaces a las señales anti-mitogénicas que conducen a la proliferación exacerbada de las células tumorales<sup>5</sup>. Estas alteraciones no solo conllevan a la proliferación descontrolada, sino que aumentan la susceptibilidad a la acumulación de alteraciones genéticas adicionales que pueden contribuir a la progresión tumoral y a un fenotipo más agresivo<sup>14</sup>. Por tanto, entender los

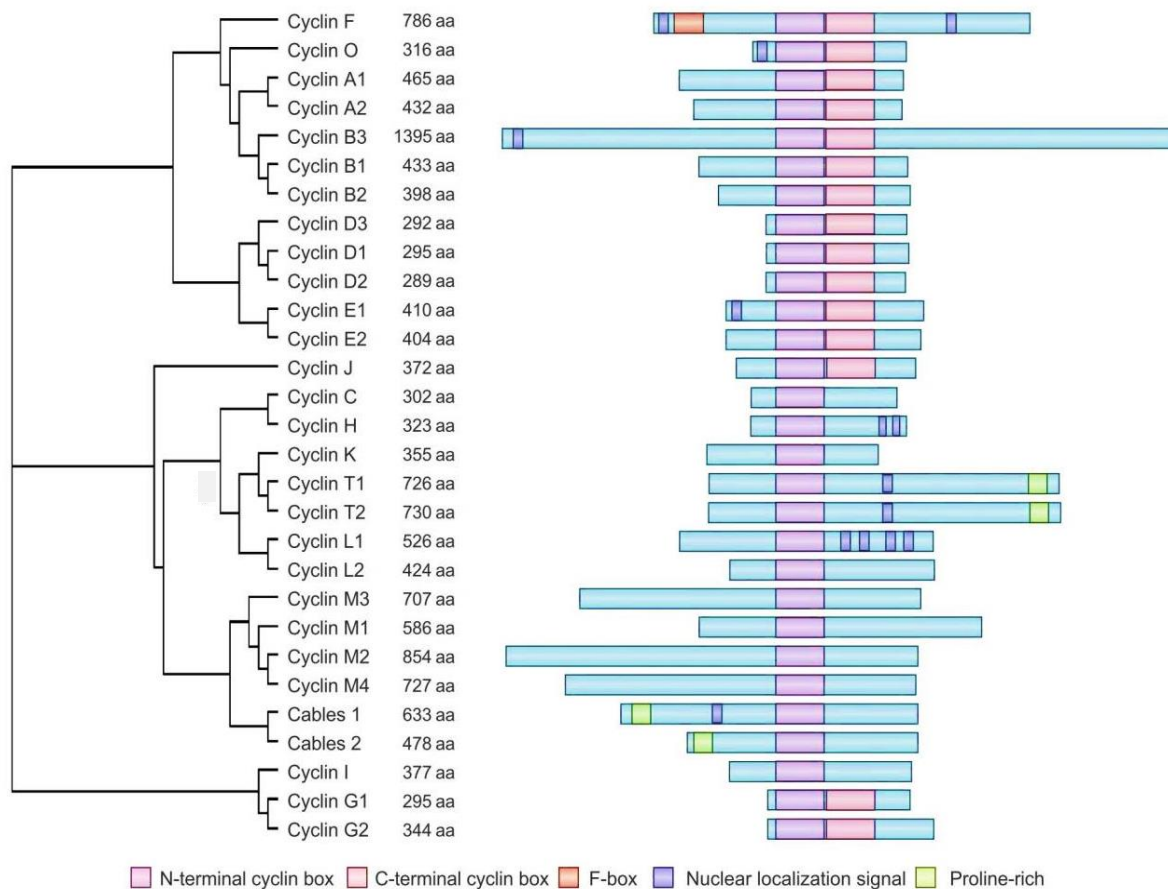
mecanismos moleculares que llevan a la división inapropiada de las células cancerígenas nos permitirá identificar dianas que sean terapéuticamente manipulables para detener su crecimiento<sup>15</sup>. Por estos motivos, durante los últimos años, las *CDKs* se han revelado como objetivos farmacológicos muy atractivos en práctica clínica para el desarrollo de drogas antitumorales<sup>16</sup>, pero también es importante tener en cuenta el papel esencial que presentan las ciclinas, quienes son los primeros reguladores de las *CDKs* y en muchos casos han demostrado también estar implicadas en los procesos tumorales<sup>16</sup>.

Por ejemplo, la sobreexpresión de la ciclina B1 ha sido descrita en diferentes cánceres como mama, colon, pulmón, gástrico o próstata<sup>16</sup>. En cáncer de mama la elevada expresión de la ciclina B1 está correlacionada con un grado tumoral elevado<sup>17</sup>, gran tamaño y nódulos positivos, al igual que en cáncer de pulmón y de colon es un indicativo de mal pronóstico<sup>18,19</sup>. Otra ciclina que se encuentra alterada en cáncer es la ciclina D1, necesaria para mantener el crecimiento tumoral y la capacidad de auto-renovación de las células, y cuya depleción reduce la migración de las células cancerígenas<sup>20</sup>. Por otro lado, la ciclina A correlaciona con mal pronóstico en cáncer de mama, con carcinogénesis y metástasis en cáncer de colon y contribuye a la invasión en cáncer de próstata<sup>21</sup>. Finalmente, ciclina E se ha encontrado a altos niveles de expresión en etapas tempranas de cáncer de mama, así como en melanoma y carcinoma de ovario<sup>15,16</sup>.

### 1.4 Nuevas ciclinas

Además de las ya bien conocidas ciclinas canónicas, la anotación y comienzo de comprensión del genoma humano presentado en 2001 han ido desvelando progresivamente la presencia de una 29 nuevos genes que codifican para proteínas que comparten una secuencia común con las primeras: la *cyclin box*<sup>5</sup> (Fig. 3).

En la revisión de Malumbres y Barbacid de 2005 se puede encontrar más información sobre la familia de ciclinas<sup>5</sup>.



**Figura 3. Proteínas de mamíferos con un dominio *cyclin-box*.** Adaptada de Malumbres y Barbacid, *Genome Biol*, 2005<sup>5</sup>

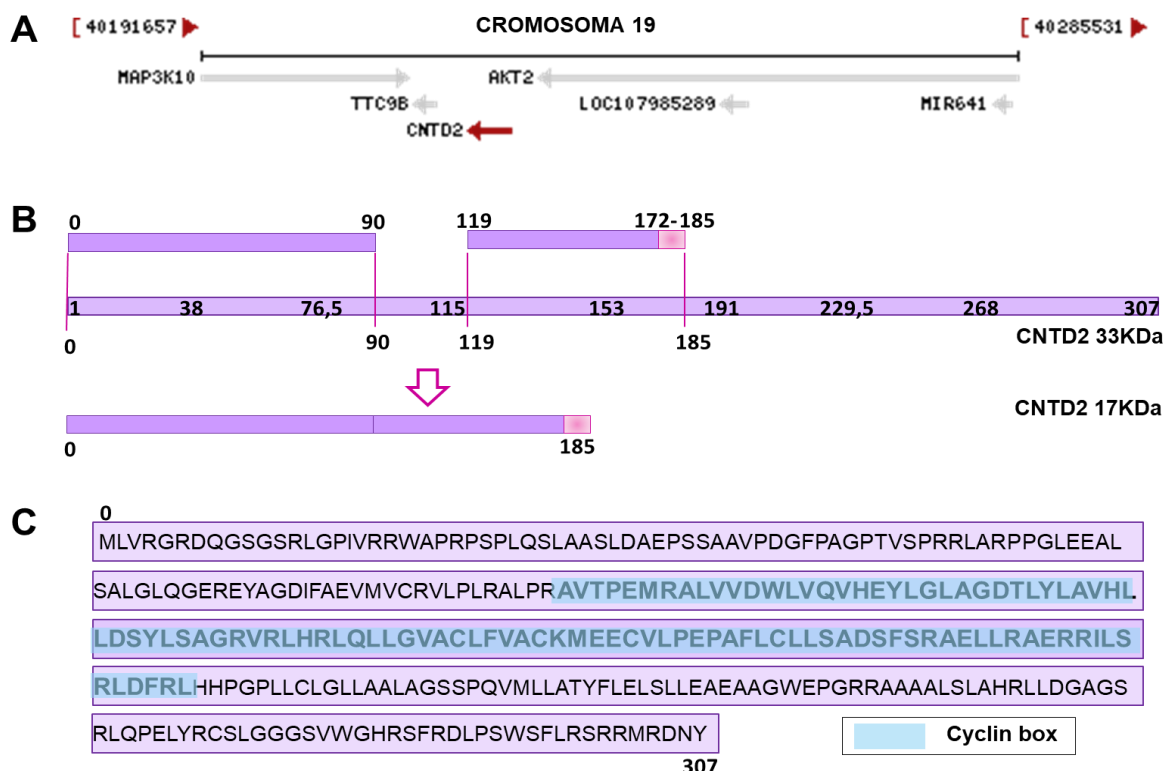
Hasta ahora el conocimiento sobre estas “nuevas ciclinas” es escaso: si tienen un comportamiento que fluctúa a lo largo del ciclo, si están relacionadas con alguna *CDK*, cuál es su función, etc. Lo que sí proponen varios autores es que algunas de estas ciclinas están implicadas en procesos tumorales como ya venían estando las ciclinas canónicas: la ciclina G1 favorece la expansión de células madre cancerígenas en cáncer de hígado<sup>22</sup>; la ciclina I promueve la resistencia a cisplatina en cáncer cervical<sup>23</sup>, incrementa la proliferación celular en cáncer de ovario<sup>24</sup> y se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama<sup>25</sup>. Por estos motivos no es demasiado aventurado prever que estas nuevas ciclinas estarán de una forma u otra vinculadas con la regulación del ciclo celular si bien su función y posible desregulación en los distintos tipos de cánceres queda por discernir.

## 1.4.1 CNTD1

La ciclina CNTD1 es el ortólogo de *C. elegans* COSA-1, una nueva ciclina que ha demostrado promover la recombinación CO (*crossover*) junto a MSH-4/MSH-5 y ZHP-3<sup>26</sup>. Además, ha sido identificada como un mediador esencial en el proceso de la segregación cromosómica durante la meiosis I, ya que coordina los procesos de asociación entre las proteínas HEI10 y RNF212 con los componentes de la maquinaria de segregación cromosómica<sup>27</sup>.

## 1.4.2 CNTD2

La ciclina CNTD2 o ciclina P es una de las nuevas ciclinas que han aparecido recientemente cuya historia supone un lienzo en blanco: no se conoce ninguna pareja *CDK*, si interviene en el ciclo celular, si está regulada cíclicamente, o donde se localiza celularmente, entre otras cuestiones. De esta ciclina sólo se conoce que se encuentra en el cromosoma 19 junto al gen AKT2 (Fig. 4A), que sólo presenta una *cyclin box* y que tiene dos isoformas reconocidas por NCBI<sup>28</sup> (Fig. 4B), siendo la mayor de 33kDa y la menor, producto de un *splicing* alternativo (Fig. 4C).



**Figura 4. CNTD2.** (A) Localización cromosómica. (B) Isoformas. (C) Secuencia proteínica.

Las únicas publicaciones sobre esta ciclina se basan en análisis *high throughput* y señalan que CNTD2 es uno de las 25 proteínas que más frecuentemente se encuentran amplificadas en cáncer colorrectal<sup>29</sup> y que su promotor se encuentra hipometilado en carcinoma de células pequeñas<sup>30</sup>, lo que podría significar un aumento de expresión del gen en células cancerígenas respecto al tejido sano.

Por otro lado, resultados independientes de dos grupos de investigación han propuesto una relación entre CNTD2 y la vía NF-KB<sup>31,32</sup>.

### 1.4.3 CCNG1

La expresión de CCNG1 es activada transcripcionalmente por p53<sup>33</sup> y se expresa cíclicamente alcanzando sus niveles máximos en la fase G2/M<sup>34</sup>. Esta ciclina interacciona con las CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, y CDK6<sup>35</sup>.

El papel de CCNG1 no está claro en cáncer, ya que mientras en algunos casos como en cáncer de hígado aumenta la proliferación celular<sup>36</sup>, promueve la metástasis y la transición epitelial a mesenquimal (*EMT*)<sup>37</sup>, e incrementa la expansión de las células madre cancerígenas (*CSCs*) mediante la inducción de SOX2<sup>22</sup>, en otros contextos parece tener una función oncosupresora, como por ejemplo en células de endometrio, donde se relaciona con supresores tumorales como PP2A<sup>38</sup>.

### 1.4.4 CCNG2

Varias evidencias apuntan que la ciclina G2 puede actuar como supresor tumoral dependiendo del tipo tumoral. Inhibe la progresión del ciclo celular mediante la interacción con PP2A, reduciendo la fosforilación de CDK2 y produciendo errores en la citocinesis<sup>39</sup>. Además se ha relacionado el aumento de la expresión de CCNG2 en cáncer de pulmón con la reducción en la proliferación y migración celular<sup>40</sup>, por lo que la baja expresión de esta ciclina está correlacionada con un incremento en la progresión tumoral y mal pronóstico<sup>41</sup>.



### 1.4.5 CCNI

La ciclina I tiene una expresión cíclica a lo largo del ciclo celular y se acumula principalmente en las fases G2/M<sup>42</sup>. Esta ciclina interacciona con CDK5 reteniéndola en el núcleo y este complejo actúa disminuyendo la apoptosis en células diferenciadas<sup>43</sup>.

Además recientes resultados de nuestro grupo de investigación presentan a CDK6 como un nuevo interactor de CCNI (Quandt *et al*, datos no publicados). La sobreexpresión de este complejo estaría incrementando la proliferación celular y la multi-resistencia a fármacos en líneas de cáncer de pulmón<sup>44</sup>, además de otorgando resistencia a cisplatina en cáncer cervical<sup>23</sup>. Finalmente cabe resaltar los elevados niveles de expresión de CCNI en cáncer de ovario y mama y que su expresión está correlacionada con un aumento en la proliferación y la angiogénesis<sup>24,25</sup>.

### 1.4.6 CCNO

La ciclina O se expresa durante la fase S del ciclo, tiene una localización nuclear<sup>45</sup> y regula la actividad de la CDK2<sup>46</sup>.

Los primeros estudios de esta ciclina señalan como uno de sus papeles fisiológicos el de inducir la apoptosis en células linfoides mediante la formación de complejos activos con CDK2 a través de la activación de las caspasas<sup>47</sup>, viendo su actividad modulada a través de p53 y de los miembros de la familia Bcl-2<sup>48</sup>.

Por otro lado, se ha relacionado a esta ciclina con procesos de movilidad celular, ya que mutaciones en la misma reduce el número de cilios en células multiciliadas<sup>49</sup> y actúa como un regulador necesario en la formación de deuteromas<sup>50</sup>, lo que está relacionado con patologías como desórdenes crónicos pulmonares<sup>49,51</sup>, hidrocefalea e infertilidad<sup>52</sup>.

Finalmente la ciclina O está altamente expresada en ovocitos y ha demostrado ser importante en el proceso de maduración de los mismos<sup>45</sup>.

### 1.4.7 CCNY

La ciclina Y se expresa en la membrana de las células<sup>53</sup> y tiene un comportamiento fluctuante con un aumento de expresión en G2/M<sup>54</sup>. Se ha descrito la interacción de esta ciclina con CDK14 y CDK16<sup>53,55</sup>, y en cuanto a sus funciones, por un lado CCNY está involucrada en procesos fisiológicos como la espermatogénesis<sup>53</sup>, la adipogénesis<sup>56</sup> y la comunicación entre neuronas post-mitóticas<sup>57</sup>, pero también juega un papel esencial en diversos tipos tumorales ya que incrementa la proliferación celular en glioma<sup>58,59</sup> y aumenta la migración e invasión en células de cáncer de ovario<sup>60</sup> y de carcinoma hepático<sup>61</sup>. Además, resultados recientes de nuestro grupo de investigación, han demostrado la interacción entre el complejo CDK16-CCNY y PRC1 (Hernández-Ortega *et al*, datos no publicados), proteína cuya implicación en cáncer ha sido ampliamente demostrada para cáncer de mama<sup>62</sup>, de vejiga<sup>63</sup>, hígado<sup>64</sup>, páncreas<sup>65</sup> o cánceres gástricos<sup>66</sup>.

### 1.4.8 SPY1

En este caso, SPY1 carece de “*cyclin box*”, pero es capaz de interactuar con las CDK1 y CDK2 gracias a un dominio llamado “*RINGO box*”<sup>67,68</sup>. Además se expresa cíclicamente y su degradación también se produce de forma cíclica, gracias a la acción del proteosoma<sup>68,69</sup>.

SPY1 tiene un papel importante en ciclo celular<sup>67</sup> y en proliferación<sup>70</sup> y se ha encontrado una expresión exacerbada en líneas y tejidos tumorales, como son el cáncer de hígado, de cerebro y de mama<sup>71-72</sup>, habiéndose descrito en este último sus capacidades de inducir tumorigénesis y resistencia a tamoxifeno a través de la vía ERK1/2<sup>73,74</sup>.

## 2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

### 2.1 Cáncer colorrectal

Hace unas décadas el cáncer colorrectal (CCR) tenía una incidencia baja, pero en la actualidad se ha convertido en el tercer cáncer más común en el mundo<sup>75</sup>. Esta incidencia creciente se puede explicar por el envejecimiento de la población, los hábitos no saludables de dieta, la baja actividad física y la obesidad en los países occidentales<sup>76</sup>.

En los últimos años han aparecido tratamientos nuevos para el CCR primario y metastásico, pero a pesar de los avances en las terapias quirúrgicas y farmacológicas las curvas de supervivencia se han mantenido prácticamente invariables en los últimos años, por lo que se hacen necesarios programas de detección temprana y nuevas dianas terapéuticas para evitar las resistencias producidas a la quimioterapia existente<sup>76</sup>.

Tanto los factores genéticos como ambientales juegan un papel importante en la etiología del CCR, aunque la mayoría de los cánceres son esporádicos y tienen un historial familiar negativo. Los pólipos de colon que aparecen en la zona derecha (que incluye el ciego, el colon ascendente y el colon transversal), normalmente se caracterizan por una excesiva metilación de las islas CpG. Por el contrario, los pólipos que emergen en la parte izquierda del colon (que incluye el colon descendente, sigmoide y el recto), frecuentemente lleva mutaciones KRAS<sup>76</sup>.

Además de las mutaciones KRAS, otras mutaciones muy frecuentes son las BRAF, proteína miembro de la familia RAF quinasas que transduce señales debajo de RAS a través de la vía MAPK. BRAF aparece mutado en un 10% de los CCRs, principalmente en la V600, que incrementa la actividad de BRAF traduciéndose en un mal pronóstico y menor esperanza de vida<sup>77</sup>.

### 2.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón ha sido el cáncer con mayor presencia durante las últimas décadas, y continúa siendo el que produce un mayor número de muertes en el mundo ya que supone un 20% del total de fallecimientos producidos por cáncer<sup>75</sup>. Debido a la

ausencia de síntomas clínicos y de programas de detección efectivos, la mayoría de los cánceres de pulmón son diagnosticados en estadios avanzados<sup>78</sup>.

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (*Non-small-cell lung cancer* o *NSCLC*), que incluye adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes, representa el 85% de todos los casos de cáncer de pulmón, mientras que el cáncer de pulmón de células pequeñas constituye el 15% restante<sup>79</sup>. A pesar de que el NSCLC es mucho más común que el SCLC, tiene mejor pronóstico ya que el SCLC es más agresivo y se disemina rápidamente<sup>80</sup>.

El tabaco es el primer factor de riesgo en este cáncer, y a pesar de que la incidencia está disminuyendo en los países desarrollados parece que en países menos desarrollados está incrementando, probablemente por una legislación más liviana respecto al consumo de tabaco<sup>79</sup>.

### **2.3 Cáncer de mama**

Es el segundo cáncer más común en el mundo y supone el 14,4% de las muertes por cáncer<sup>75</sup>. El cáncer de mama aparece cuando un tumor maligno se desarrolla en el tejido mamario, principalmente en los lóbulos y conductos responsables de la producción de leche<sup>75</sup>.

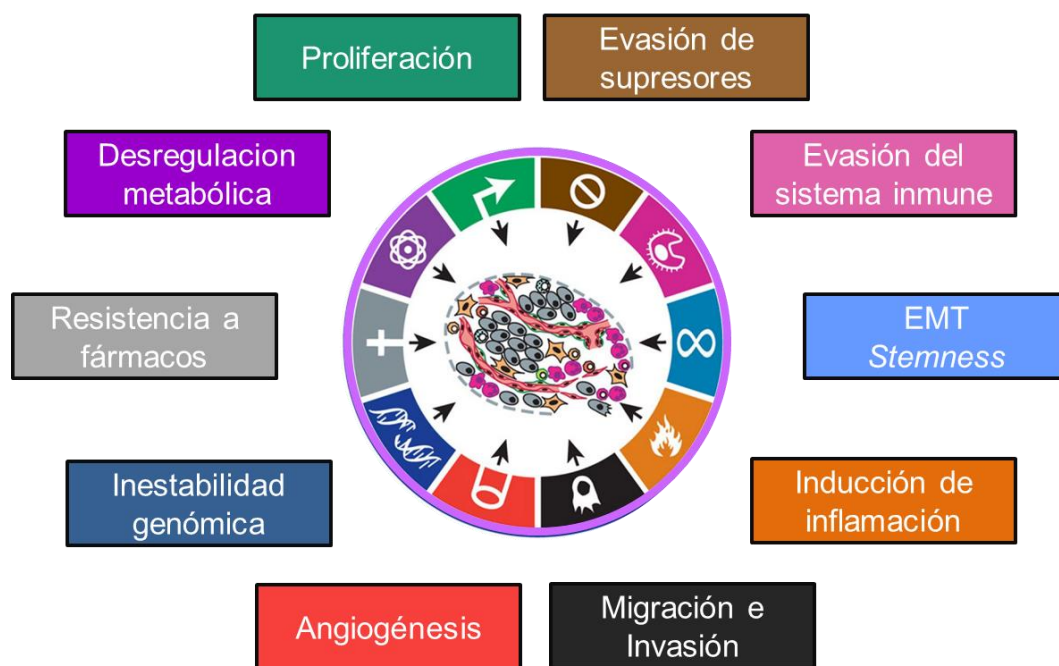
La mayoría de los cánceres de mama son de origen epitelial y se clasifican como carcinomas, los cuales se organizan en una amplia variedad de subtipos que se diferencian tanto en la morfología como en el comportamiento biológico<sup>81</sup> y la clasificación más general es la que los subdivide en carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y carcinoma ductal invasivo (IDC). La diferencia principal entre ambos es que en el primero se produce la contención de las células por la membrana basal de los conductos mientras que en el segundo no, lo que permite la migración de las células a otros tejidos. El IDC es el más prevalente e invasivo y comprende el 80% de los casos<sup>82</sup>.

Entre los diferentes factores de riesgo que se han asociado con el desarrollo del cáncer de mama, encontramos la edad, la obesidad, el consumo de alcohol, la exposición a estrógenos y la herencia génica, particularmente de mutaciones en BRCA1 y BRCA2<sup>82</sup>.

### 3 BIOLOGÍA DEL CÁNCER

Durante los últimos años se ha empezado a comprender que los tumores no pueden entenderse como simples masas celulares<sup>83</sup> y que el cáncer no es en realidad una sola enfermedad sino múltiples enfermedades de diferentes tejidos englobadas en un solo nombre<sup>84,85</sup>.

Existen una serie de signos distintivos que aparecen en mayor o menor medida en este tipo de patologías y que a su vez son responsables de la gran diversidad dentro del tumor (heterogeneidad intratumoral) y entre los procesos tumorales de diferentes individuos (heterogeneidad intertumoral). Estos signos, o *Hallmarks*, como hizo popular Hanahan en sus revisiones de 2000 y 2011, están presentes en todos los tumores y algunos de ellos van a ser brevemente comentados a continuación<sup>83</sup>.



**Figura 5. Esquema de las principales propiedades de los cánceres.** Adaptada de Hanahan et al, *Cell*, 2011<sup>83</sup>.

## 3.1 Proliferación

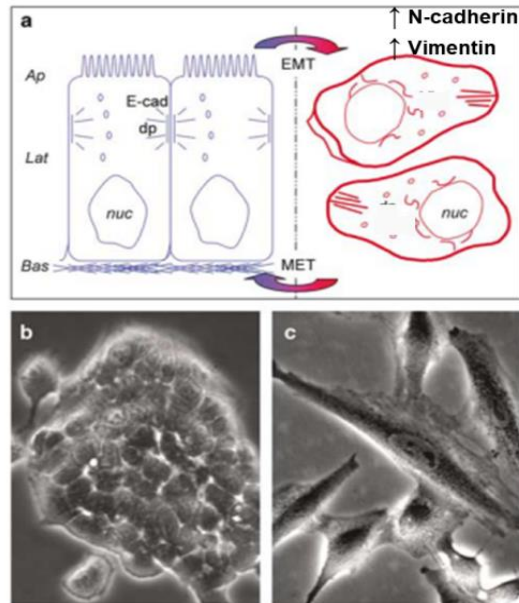
Indiscutiblemente, el rasgo fundamental de las células tumorales es su capacidad para proliferar indiscriminadamente. En los tejidos sanos, hay un control exhaustivo en la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento, que regulan minuciosamente la progresión a través del ciclo celular, y por tanto, la división de las células<sup>83</sup>. A pesar de la presencia de señales de crecimiento, en las células cancerígenas continúa habiendo sistemas de control, como son los llamados supresores tumorales como retinoblastoma (Rb) o p53; controles que han de ser superados para alcanzar una proliferación exacerbada<sup>86</sup>.

Además, las células cancerígenas tienen la capacidad de enviar señales para estimular a células sanas del estroma, y obtener como respuesta factores de crecimiento para su desarrollo<sup>83</sup>.

Para poder detectar células con una velocidad de crecimiento superior al resto, se ha estado empleando ampliamente el análisis de la expresión del marcador de proliferación ki-67, que ya está comúnmente establecido en clínica como un marcador pronóstico<sup>87</sup>.

## 3.2 Transición Epitelial a Mesenquimal (*Epithelial-to-Mesenchymal Transition* o *EMT*)

Las células epiteliales y mesenquimales representan dos de los principales tipos celulares en mamíferos. Las células epiteliales se caracterizan por las interacciones cohesivas entre células, la formación de capas celulares continuas y la inmovilidad dentro de su ambiente local, entre otras. Por otro lado, las células mesenquimales se diferencian de las anteriores en que no tienen interacciones entre ellas, por lo que no se forman capas celulares continuas, además de tener propiedades invasivas (Fig. 6)<sup>88</sup>.



**Figura 6. EMT.** (A) Modificaciones celulares asociadas con la EMT. En azul células epiteliales unidas por E-cadherina y en rojo células mesenquimales que han incrementado sus niveles de N-cadherina y Vimentina. (B y C) Imágenes representativas de los modelos arriba mencionados. *Adaptada de Larue L, et al, Oncogene, 2005*<sup>88</sup>.

La EMT es un proceso biológico por el cual una célula epitelial no-móvil polarizada, sufre una serie de modificaciones bioquímicas para convertirse en una célula móvil no polarizada con capacidad invasiva y mayor resistencia apoptosis<sup>89</sup>. La EMT juega un papel esencial durante las primeras etapas de la invasión y la metástasis de los carcinomas<sup>90</sup>.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) es el principal inductor de la EMT, pero múltiples factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o Wnt han demostrado inducir este proceso<sup>91</sup>. Los cambios de expresión génica asociados a la EMT están mediados por factores de transcripción como Snail, Slug, Twist, ZEB1 y ZEB2, que se encargan de suprimir la expresión de la E-cadherina. Por otro lado, estos factores de transcripción se encargan de la activación de genes asociados con la *stemness* como la N-cadherina, la Vimentina o la fibronectina. La mayor característica de la EMT es el llamado “*cadherin switch*”, por el cual se invierte la expresión de la E-cadherina con la de la N-cadherina y la Vimentina<sup>92</sup>.

### 3.3 *Cancer stem cells (CSCs)*

Estudios en los últimos años demostraron que las células que pasan por un proceso de *EMT* pueden adquirir características de célula madre, lo que indicaba una relación muy interesante entre *EMT* y la *stemness*<sup>91</sup>. Por otro lado, la mayoría de los cánceres manifiestan una clara heterogeneidad tanto fenotípica como funcional entre sí. Esta heterogeneidad, además de a otros factores que se han mencionado previamente, es también atribuible a las células madre cancerígenas o *CSCs*. Estas células, aunque se encuentran en una baja proporción en los tumores, tienen la capacidad de auto-renovarse y de generar células tumorales diferenciadas<sup>92</sup>. Además son unas de las responsables de la adquisición de resistencia a los fármacos y de la migración y metástasis tumoral<sup>91</sup>. Hay diversas rutas de señalización implicadas en favorecer el desarrollo de estas *CSCs*, entre las que se encuentran Wnt, Notch, NF-K $\beta$  o AKT/mTOR<sup>93</sup>.

El método más utilizado para identificar *CSCs* se basa en la detección de marcadores de membrana como es CD44 que se ha identificado como un marcador de superficie habitual para las *CSCs* de diferentes tumores como gástricos, de mama o glioma<sup>94,95</sup>, solo o en conjunto con otros como CD133, SCF, ALDH<sup>96</sup>. Por otro lado, los factores de transcripción propios de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG, también se han utilizado como marcadores de *CSCs*<sup>97</sup> ya que tienen un papel esencial en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia, por lo que se comienzan a utilizar como marcadores prometedores en el tratamiento del cáncer<sup>91,98</sup>.

### 3.4 Migración e invasión

Los procesos de migración e invasión celular son los responsables de dar al tumor la capacidad de invadir tejidos colindantes y por tanto transformar un tumor local en una metástasis sistémica<sup>99</sup> y las metástasis son las responsables del 90% de las muertes relacionadas con cáncer<sup>86</sup>. Para llevar a cabo estos procesos han de producirse una serie de cambios biológicos en las células, que comienzan con una invasión local a través de la matriz extracelular. A continuación se produce una intravasación a la vasculatura y la circulación de las células cancerígenas por los vasos sanguíneos hasta



alcanzar un nuevo lugar donde desarrollarse. Para ello, necesitan salir de los vasos para introducirse en el parénquima (extravasación) y comenzar a formar los pequeños nódulos de células tumorales<sup>83</sup>.

La adquisición de propiedades de *EMT* durante la progresión tumoral está asociada con el aumento de migración, mediante la transformación de células epiteliales en células capaces de invadir, resistir a la apoptosis y diseminar. Diferentes factores de transcripción como Snail, Slug, Twist y proteínas estructurales como la Vimentina y la E-cadherina son responsables de orquestar la maquinaria de migración<sup>83</sup>, siendo la disminución de esta última particularmente importante<sup>88</sup>.

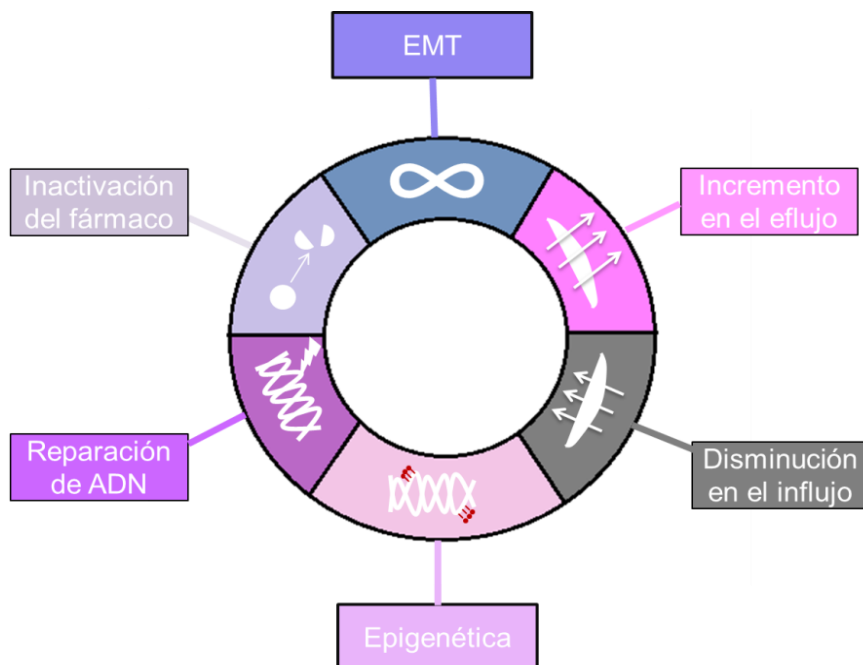
### 3.5 Resistencia a fármacos

El tratamiento del cancer ha ido incrementando su especificidad en los últimos años: desde el uso de agentes citotóxicos generales en los años 40 o los productos anticancerígenos naturales como las antraciclinas en los 60, hasta al uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas en la actualidad, que ha mejorado la respuesta al cancer y reducido los efectos secundarios, aunque no ha terminado de ser la solución para la mayoría de pacientes con metástasis<sup>100</sup>.

La resistencia a fármacos es un fenómeno que aparece cuando las enfermedades se vuelven tolerantes a los tratamientos farmacológicos gracias a mutaciones de *DNA* o cambios metabólicos que promueven la inhibición y degradación de los fármacos<sup>101</sup>.

Diversos autores han propuesto diferentes vías por las cuales las células cancerígenas pueden llegar a hacerse resistentes a los tratamientos (Fig. 7). Algunos de estos mecanismos consisten en la inactivación de los fármacos, que hace referencia a la interacción de las drogas con proteínas u otras moléculas que consiguen modificarlas, degradarlas parcialmente o compartimentalizarlas; la reparación del *DNA* para fármacos que tienen como mecanismo de acción el daño al *DNA*, como los basados en platino; la *EMT* a partir de la cual los tumores sólidos se vuelven metastáticos y disminuyen la expresión de marcadores de adhesión para viajar por el organismo; los cambios epigenéticos como la metilación del *DNA* y la modificación de histonas mediante acetilación o metilación, con el fin de boquear o desbloquear la expresión de genes, en

el primer caso, o de cambiar la conformación de la cromatina, en el segundo caso. Sin embargo el mecanismo principal encargado de generar multi-resistencia es el mediado por bombas de eflujo e influjo, como los transportadores *ABC* o *ATP-binding cassette*<sup>101</sup>.



**Figura 7. Sistemas de resistencia de las células tumorales a quimioterapéuticos**

### 3.5.1 Transportadores *ABC*.

Los transportadores ABC forman parte de una de las familias de proteínas más mayoritarias. La estructura básica de estas proteínas consiste en la combinación de dominios transmembrana y un dominio de unión a ATP, y utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para realizar un movimiento de sustrato a través de la membrana<sup>102</sup>.

Durante la secuenciación del genoma humano se terminó la caracterización de 48 genes ABC (Tabla 1). Dentro de estos transportadores, hay algunos de influjo, capaces de introducir sustancias en el citoplasma celular, y otros de eflujo, encargados de exportar moléculas al exterior celular<sup>103,104</sup>.

# INTRODUCCIÓN

Family	Member	Alias	Expression	Function
ABCA	ABCA1 ABCA2 ABCA3 ABCA4 ABCA5 ABCA6 ABCA7 ABCA8 ABCA9 ABCA10 ABCA11 ABCA12	ABC1 ABC2 ABC3, ABCC ABCR	Ubiquitous Brain Lung Rod photoreceptors Muscle, heart, testes Liver Spleen, thymus Ovary Heart Muscle, heart Stomach Low in all tissues	Removal of cholesterol and PLs onto HDL particles Drug resistance Surfactant protection N-retinydilester-PE efflux
ABCB	ABCB1 ABCB2 ABCB3 ABCB4 ABCB5 ABCB6 ABCB7 ABCB8 ABCB9 ABCB10 ABCB11	MDR1, PGP TAP1 TAP2 PGP3, MDR3  MTABC3 ABC7 MABC1  MTABC2 SPGP, BSEP	Adrenal, kidney, brain Ubiquitous, ER Ubiquitous, ER Liver Ubiquitous Mitochondria Mitochondria Mitochondria Heart, brain Mitochondria Liver	Multidrug resistance Peptide transport into the ER Peptide transport into the ER Phosphatidylcholine transport  Iron transport Heme transport Heme transport  Bile salt transport
ABCC	ABCC1 ABCC2 ABCC3 ABCC4 ABCC5 ABCC6 ABCC7 ABCC8 ABCC9 ABCC10 ABCC11 ABCC12	MRP1 MRP2, cMOAT MRP3, cMOAT-2 MRP4, MOAT-B MRP5, MOAT-C MRP6 CFTR SUR SUR2 MRP7 MRP8 MRP9	Ubiquitous Liver Lung, intestine, liver Prostate Ubiquitous Kidney, liver Exocrine tissues Pancreas Heart, muscle Low in all tissues Low in all tissues Low in all tissues	Drug resistance Organic anion transport Drug resistance Nucleoside transport Nucleoside transport  Chloride ion transport Sulfonylurea receptor
ABCD	ABCD1 ABCD2 ABCD3 ABCD4	ALD ALD1,ALDR PMP70, PXMP1 PMP69, P70R	Peroxisomes Peroxisomes Peroxisomes Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCE	ABCE1	OABP	Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate-binding protein
ABCF	ABCF1 ABCF2 ABCF3	ABC50	Ubiquitous Ubiquitous Ubiquitous	
ABCG	ABCG1 ABCG2 ABCG4 ABCG5 ABCG8	ABC8, Human white ABCP, MXR, BCRP White2 Sterolin 1 Sterolin 2	Ubiquitous Placenta, intestine Liver Liver, intestine Liver, intestine	Cholesterol transport Drug resistance  Sterol transport Sterol transport

**Tabla1. Transportadores ABC humanos y sus características básicas.** Adaptado de Glavinas H, et al. *Metabolism and Toxicity*, 2004 <sup>102</sup>.

La sobreexpresión de algunos transportadores de eflujo o la reducción de los de influjo produce multiresistencia a diferentes quimioterapéuticos. Algunos de los quimioterapéuticos comunmente utilizados actualmente en práctica clínica son la cisplatina, el gefitinib, el paclitaxel y el palbociclib. En el caso de cáncer de colon, el 5-Fluorouracil, el camptotecan (análogo de la camptotecina) o la oxaliplatina. Y en el caso del cáncer de mama, el tamoxifeno, la doxorubicina y el paclitaxel (Tabla 2).

	ACCIÓN	TIPO CÁNCER
CISPLATINA	Inhibidor de la síntesis de ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN.	pulmón, sarcoma, linfoma, ovario
GEFITINIB	Inhibidor del dominio tirosin kinasa del receptor EGFR	pulmón
PACLITAXEL	Anti-microtúbulos. Inhibe la formación del huso mitótico y bloquea la mitosis	pulmón, mama, ovario, cabeza y cuello
5-FLUOROURACILO	Antimetabolito antagonista de la pirimidina. Inhibe la síntesis de ADN.	mama, colorrectal, vejiga, ovario, páncreas, riñón, próstata, cérvix, endometrio, cabeza y cuello.
CAMPTOTECAN	Inhibidor de la topoisomerasa I. Inhibe la síntesis de ADN	colorrectal
OXALIPLATINA	Agente alquilante. Inhibe la síntesis de ADN. Actúa en fase de reposo celular	colorrectal
TAMOXIFENO	modulador selectivo de receptores de estrógeno (bloquea la acción del estrógeno para evitar el desarrollo de las células)	mama
DOXORUBICINA	Inhibidor de la topoisomerasa II. Inhibe la síntesis de ADN	mama, ovario, pulmón, mieloma, linfoma, sarcoma

**Tabla 2. Algunos quimioterapéuticos utilizados en práctica clínica**

Los transportadores de eflujo ABCC1, ABCB1 y ABCG2 son los que más comunmente se encuentran sobreexpresados y causan resistencias,<sup>105,106</sup> pero dependiendo del fármaco que se trate, es más frecuente encontrar alteraciones en unos transportadores u otros, y por ello en la Tabla 3 encontramos un resumen de transportadores que otorgan una mayor resistencia dependiendo del quimioterapéutico con el que se trate<sup>107, 108</sup>.

	PULMÓN		PULMÓN/MAMA	COLON			MAMA	
	PACLITAXEL	GEFITINIB	CISPLATINA	5-FU	CAMPTOTECINA	OXALIPLATINA	TAMOXIFENO	DOXORUBICINA
ABCC1 (MRP1)								
ABCC2 (MRP2)								
ABCC3 (MRP3)								
ABCC5 (MRP5)								
ABCC11								
ABCB1 (MDR/PGP1)								
ABCB4								
ABCB5								
ABCG2								
ATP7A/B								

**Tabla 3. Transportadores ABC humanos según la resistencia a cada tipo de fármaco.**

El estado de diferenciación de un tumor, puede ser un contribuyente a la resistencia adquirida. De hecho, la elevada expresión de E-cadherina está asociada a una mayor sensibilidad a inhibidores de EGFR y HER2, lo que hace pensar que los cánceres con características epiteliales pueden ser más sensibles a terapias dirigidas, mientras que aquellos con características mesenquimales sean más resistentes a agentes de daño a *DNA*<sup>109</sup>. Por otro lado, una característica intrigante de las *CSCs* es que expresan elevados niveles de transportadores ABC, propiedad que de hecho se puede utilizar como marcador diagnóstico tumoral. Como resultado de esto, algunas de las *CSCs* pueden sobrevivir a la quimioterapia y hacer resurgir al tumor<sup>110,111</sup>.

Dirigir las terapias a bloquear la *EMT* en el mantenimiento de las *CSCs* es una estrategia prometedora ya que hay varios estudios que muestran que algunos agentes terapéuticos son capaces de modular el estado de diferenciación de un tumor<sup>109</sup>.

# **HIPÓTESIS**

---



La comprensión del genoma humano ha desvelado la presencia de varias nuevas ciclinas cuya función e implicación en la aparición de procesos tumorales es totalmente desconocida.

Así pues la hipótesis en que sustenta el presente proyecto es que estas nuevas ciclinas pueden jugar un papel específico y desconocido en el desarrollo de células de alguno de los cánceres con mayor incidencia en nuestra sociedad, como son el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón y el cáncer de mama.



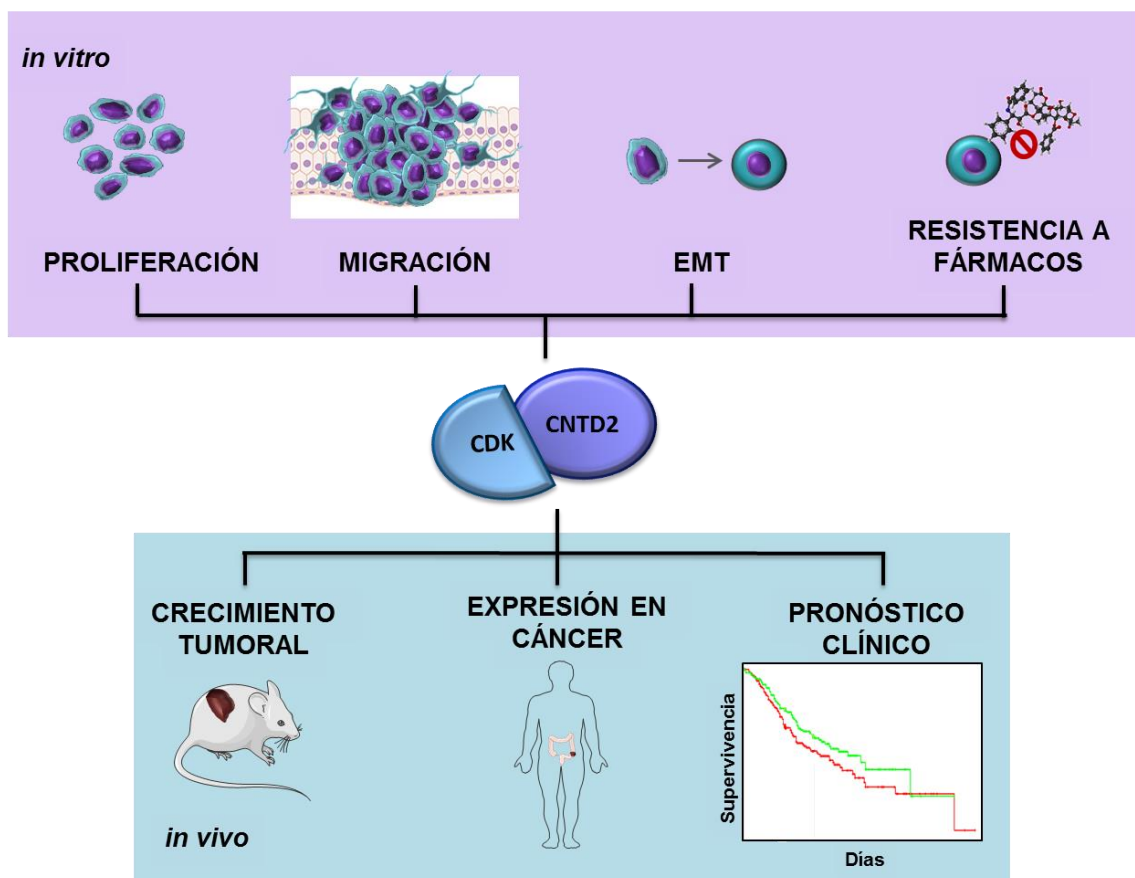


# **OBJETIVOS**

---



1. Estudiar la expresión de las nuevas ciclinas en cáncer colorrectal.
2. Estudiar el papel de las ciclinas sobreexpresadas en la proliferación de células de cáncer colorrectal.
3. Estudiar la implicación de la ciclina CNTD2 en procesos de desarrollo tumoral como la migración y transición epitelial-mesenquimal.
4. Estudiar la implicación de la ciclina CNTD2 en el desarrollo de células madre cancerígenas en cáncer colorrectal, de mama y de pulmón.
5. Estudiar la implicación de la ciclina CNTD2 en la multi-resistencia a fármacos en cáncer colorrectal, de mama y de pulmón.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. ANÁLISIS DE RNA

### 1.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó tanto para células en adhesión como para esferas. En el primer caso, las células fueron sembradas en pocillos de p24 y 24 horas más tarde se levantaron mediante tripsinización y se centrifugaron a 300g para la obtención del pellet. En el caso de las esferas, éstas fueron sembradas en pocillos de p24 de baja adhesión (Corning, 3473), siendo necesarios las esferas de tres pocillos para extraer una cantidad suficiente de RNA. Las células en suspensión se recogieron y centrifugaron a 300g para obtener el pellet. En ambos casos se utilizó un kit comercial de columnas para extraer el RNA (Quiagen, 74106), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 1.2 RT-PCR

La cuantificación del RNA se realizó por duplicado mediante espectrofotometría utilizando el lector de placas micro-placas Synergy HT de Biotek®. A continuación se obtuvo cDNA mediante RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) a partir de 500ng de RNA y gracias a la enzima transcriptasa inversa Mu-MLV® 1 hora a 37°C. La siguiente tabla resume los componentes empleados en la RT-PCR.

cDNA	500ng
Oligos aleatorios (309080)	2µl
Nucleótidos (GC 013-004)	4µl
Mu-MLV (Lucigen, 3022)	2µl
RNAsin (30281-2)	0,5µl
Agua	Hasta completar 20µl

Tabla 4. Componentes para 20 µl de reacción de RT-PCR

### 1.3 Q-PCR

Para cuantificar la expresión de algunos genes mediante q-PCR (*quantitative PCR*) se utilizaron 2µl de cDNA y SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (1725275) en un volumen de reacción de 20µl. La siguiente



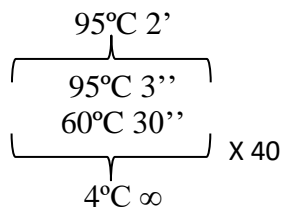
## MATERIAL Y MÉTODOS

tabla resume los componentes empleados en la *q-PCR* por cada muestra, y cada una de ellas se analizó por triplicado.

cDNA	2 $\mu$ l
Oligo Forward	1 $\mu$ l
Oligo Reverse	1 $\mu$ l
SYBR Green (BioRad, 172-5261)	10 $\mu$ l
Agua	6 $\mu$ l

**Tabla 5. Componentes para 20  $\mu$ l de reacción de *q-PCR***

Las condiciones de *q-PCR* se resumen en la Tabla 6 y los oligonucleótidos empleados en la Tabla 7.



**Tabla 6. Condiciones de la *q-PCR***

<b>Actina Forward</b>	TCCACCTTCCAGCAGATGTG
<b>Actina Reverse</b>	GCATTTGCGGTGGACGAT
<b>18S Forward</b>	CTACCACATCCAAGGAAGGCA
<b>18S Reverse</b>	TTTTTCGTCACCTCCCCG
<b>CNTD2 Forward</b>	CTGGTGGTAGACTGGCTGGT
<b>CNTD2 Reverse</b>	AGCACGCACTCTTCCATTTT
<b>OCT4 Forward</b>	GTGGAGAGCAACTCCGATG
<b>OCT4 Reverse</b>	TGCAGAGCTTTGATGTCTCTG
<b>Sox2 Forward</b>	TGG CGA ACC ATC TCT GTG GT
<b>Sox2 Reverse</b>	CCA ACG GTG TCA ACC TGC AT
<b>Nanog Forward</b>	CAG AAG GCC TCA GCA CCT AC
<b>Nanog Reverse</b>	ATT GTT CCA GGT CTG GTT GC
<b>ABCC1 Forward</b>	F: TGCCCTACCTGACCCTCGGC
<b>ABCC1 Reverse</b>	R: ACACCCAGTCAGGCTCCGCA
<b>ABCC2 Forward</b>	TCTCTCGATACTCTGTGGCAC
<b>ABCC2 Reverse</b>	CTGGAATCCGTAGGAGATGAAGA
<b>ABCC3 Forward</b>	GCTGGGCTGGGAAACCGGAC
<b>ABCC3 Reverse</b>	TGGGTGCAGCCTGGAACAGC
<b>ABCC5 Forward</b>	CCCGCCCCAGGCAGGGAATG
<b>ABCC5 Reverse</b>	TGTGTCTCTGACGGCGTCTCCTT

**Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la *Q-PCR* en 5'-3'**

## **2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **2.1 Extracción de proteína de tejido parafinado**

Se seleccionaron bloques parafinados de 10µm con un porcentaje mayor del 80% de contenido tumoral, junto a su control sano correspondiente. Para la extracción de proteínas las secciones de tejido fueron desparafinadas y rehidratadas mediante sucesivos lavados en xileno, etanol 100°, etanol 96° y etanol 70°. Después se incubaron en hielo con 100µl de tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH=8.8, 200mM DTT, 2% SDS) durante cinco minutos, y a 100°C durante 20 minutos. A continuación se colocaron en un mezclador durante 2 horas a 80°C a una velocidad de 750rpm para la completa extracción proteínica. Finalmente se centrifugaron a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas disueltas.

### **2.2 Extracción de proteína de líneas celulares**

Las líneas celulares cultivadas en pocillos de p6 fueron lavadas con PBS frío y *escrapeadas* con 80µl de tampón de lisis (20mM TRIS, 5mM EDTA, 1% NP40 (IGEPAL CA-630), 150mM NaCl, pH 7.4), suplementado con inhibidores de proteasas (88266, Thermo Fisher Scientific) y fosfatasas (88667, Thermo Fisher Scientific). Después se incubaron 30 minutos en hielo y se sonicaron en tres ciclos de 8 segundos a máxima potencia. Finalmente, se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas disueltas.

### **2.3 Fraccionamiento celular**

Para el fraccionamiento celular se utilizó un kit de fraccionamiento celular (78840, Thermo Fisher Scientific) y se siguieron las instrucciones del fabricante. En resumen, se levantaron 500000 células en cultivo mediante tripsinización, se lavaron con PBS y se añadieron 50µl del primer tampón de lisis (CEB) para

extraer las proteínas de la parte citosólica durante 15 minutos a 4°C. Este tampón suponía una lisis suave mediante la generación de poros en la membrana celular.

A continuación se centrifugó a 500g durante 5 minutos y se recogió la fracción citosólica. Al pellet celular se le añadieron 20µl del segundo tampón de lisis (MEB), se resuspendieron suavemente y se incubaron durante cinco minutos en hielo. Tras la incubación se centrifugó a 3000g durante 5 minutos y se recogió la fracción que contenía las proteínas de membrana disueltas. Finalmente al pellet se le añadió 25µl del último tampón (NEB) suplementado con 100mM CaCl<sub>2</sub> y 75 unidades de Nucleasa Micrococal. Esta última fracción fue agitada vigorosamente, incubada 25 minutos en hielo y finalmente 5 minutos a 37°C, para permitir la degradación del *DNA* unido a las proteínas de la fracción nuclear. Tras las incubaciones se centrifugó a 16000g durante 5 minutos y se recogió la fracción nuclear.

### **2.4 Cuantificación de proteínas**

#### **2.4.1 Bradford**

Para la cuantificación de las proteínas se realizó una recta patrón con BSA con concentraciones del 0µg/µl a 8µg/µl en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 2µl por duplicado de cada una de las muestras previamente vorteadas, y finalmente se añadieron 200µl de Bradford (5000205, BioRad) a cada uno de los pocillos. Tras cinco minutos de reacción se midió la absorbancia a 595nm utilizando el lector de placas micro-placas Synergy HT de Biotek®. Tras calcular la concentración proteica en cada muestra se prepararon 30µg de proteína diluidas en agua y Laemmli buffer.

#### **2.4.2 BCA**

La cuantificación de las fracciones celulares tuvo que hacerse mediante BCA ya que el tampón de lisis NEB interfería con el Bradford. Para ello se preparó una recta patrón de 0µg/µl a 20µg/µl con BSA en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadieron 2µl por duplicado de cada

una de las muestras previamente vorteadas, y finalmente se añadieron 200µl de BCA (23227 Thermo Fisher) preparado según las instrucciones del fabricante, a cada uno de los pocillos. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, se midió la absorbancia a 562nm utilizando el lector de placas microplacas Synergy HT de Biotek®. Tras calcular la concentración proteica en cada muestra se prepararon 20µg de proteína para la fracción citosólica, 15µg para la fracción de membrana y 10µg para la fracción nuclear, en todos los casos diluidas en agua y Laemmli buffer.

## 2.5 Western Blot

Una vez cuantificadas, las muestras fueron hervidas a 90°C durante 5 minutos y se cargaron los geles de acrilamida comerciales de gradiente entre 7,5 y 15% (5671034, Biorad). La electroforesis se realizó a 200V en hielo durante 45 minutos, tiempo tras el cual se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF previamente activadas con metanol a 400mM durante 1h en hielo. Una vez terminada la transferencia se tiñeron las proteínas con el reactivo de *Ponceau* (141194, Sigma) durante 5 minutos seguidos de 3 lavados de 1 minutos, y se realizaron fotografías de la carga total para la posterior normalización. Para desteñir las membranas se hicieron 3 lavados de 5 minutos con *TBS* con 0,1% de *Tween 20* (*TBS-T*) y se procedió al bloqueo de las mismas con leche desgrasada disuelta al 5% en *TBS-T* durante 30 minutos en agitación. Finalmente se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 8) durante toda la noche a 4°C, a excepción del anti-ACTINA, el anti-GAPDH y el anti-FLAG que se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron las membranas con *TBS-T* y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 8). Para detectar los anticuerpos unidos a *HRP* (*Horseshoe Peroxidase*), se utilizó el sustrato Luminata Forte (WBLUF0500, Millipore) capaz de emitir quimioluminiscencia detectable por el fotodocumentador (GBOX SYNGENE).

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	PRIMARIO WB	PRIMARIO IF	SECUNDARIO WB
ACTINA	INVITROGEN	MA1-91399	1::10000		RATÓN 1::30000
CASPASA 9	SANTA CRUZ	SC-73548	1::200		RATÓN 1::20000
CCN CABLES1	ABCAM	ab75535	1::3000		CONEJO 1::20000
CNTD1	ABCAM	ab126998	NO FUNCIONA		CONEJO
CCN CNTD2	SIGMA	HPA045615	1::500	CONEJO 1::400	CONEJO 1::20000
CCNA	SANTA CRUZ	SC-751	1::1000		CONEJO 1::20000
CCNG1	SANTA CRUZ	SC-320	1::200 5%		CONEJO 1::10000
CCNG2	SANTA CRUZ	sc-7266	NO FUNCIONA		CONEJO
CCNI	SANTA CRUZ	SC-5547	1::200		CONEJO 1::20000
CCNJ	SANTA CRUZ	SC-104859	NO FUNCIONA		CABRA
CCNO	ABCAM	ab47682	1::500		CONEJO 1::20000
CCNY	ABCAM	ab114086	1::1000		CONEJO 1::20000
CD44	SANTA CRUZ	SC7297	1::400		RATÓN 1::20000
CD133	ELABSCIENCE	E-AB-33462	1::400		CONEJO 1::20000
E-CADHERINA	SANTA CRUZ	SC-8426	1::200		RATÓN 1::20000
FLAG	SIGMA	F3040	1::500		RATÓN 1::30000
GAPDH	CusAb	CSB-PA00025A0Rb	1::10000		CONEJO 1::20000
KI-67	BD Pharmingen	556003		RATÓN 1::200	
GFP	CELL SIGNALING	#2956	1::500	CONEJO 1::200	CONEJO 1::30000
LÁMINA B	SANTA CRUZ	sc-6216	1::200		CABRA 1::20000
N-CADHERINA	BD Transduction Laboratories	610921	1::1000		RATÓN 1::20000
Na-K ATPasa	SANTA CRUZ	sc-58628	1::200	RATÓN 1::400	RATÓN 1::20000
SPY1	ABCAM	ab227383			
P53	SANTA CRUZ	SC-1314	1::200		CABRA 1::20000
VIMENTINA	SANTA CRUZ	SC-7558	1::200		CABRA 1::20000
<b>SECUNDARIO WB</b>					
CONEJO	Amersham Bioscience	9340			
RATÓN	Jackson Immuno R	515-035-003			
CABRA	Jackson Immuno R	705-035-147			
<b>SECUNDARIO IF</b>					
CONEJO Alexa 488	Invitrogen	A11008		1::1000	
CONEJO Alexa 594	Invitrogen	A11012		1::1000	
RATÓN Alexa 488	Invitrogen	A11001		1::1000	
RATÓN Alexa 594	Invitrogen	A11005		1::1000	

**Tabla 8: Anticuerpos utilizados para el Western Blot (WB) o la Inmunofluorescencia (IF)**

## 2.6 Inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia las células fueron sembradas en cubres previamente tratados con poli-lisina (P4707, Sigma) durante 1 hora a 37°C, en placas de p24, a una densidad de 30000 células por pocillo. Tras 24 horas se fijaron las células con paraformaldehído al 4% frío durante 15 minutos. A continuación las células se lavaron y bloquearon con PBS 1% Tritón y 10% suero de caballo durante 1 hora. Tras el bloqueo se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 8). Después se hicieron varios lavados para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido, y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente en condiciones de oscuridad (Tabla 8).

Finalmente, y tras limpiar el exceso de secundario, se tiñó el núcleo con Hoechst 33258 (14530, Sigma) a una concentración de 1:1000 durante 5 minutos. Posteriormente las preparaciones fueron montadas en portaobjetos utilizando Fluoromount-G® (0100-01, Southern Biotech) como medio de montaje.

### **2.7 Inmunohistoquímica**

La tinción inmunohistoquímica de las muestras parafinadas de pacientes se realizó en la unidad de anatomía patológica de la Universidad Internacional de Catalunya a partir de secciones de 4µm utilizando la plataforma BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems Inc.). Las secciones se introdujeron en el procesador que automáticamente desparafinizó las muestras mediante el reactivo EZ-PREP y las pre-trató con la solución acondicionadora CC2 6.1(950-124, Roche) durante 30 minutos a 95°C. A continuación se añadieron los anticuerpos CNTD2, CCNO a una dilución 1:100 (Tabla 8), y finalmente la inmunoreactividad fue detectada mediante el kit de detección ultraView Universal DAB Detection Kit (760-500, Roche).

En el caso de la tinción para los tumores de ratones xenógrafos, se realizó en el Hospital de Bellvitge mediante la plataforma Dako Omnis (Dako, Agilent Technologies, Inc.). La recuperación de los epítomos se realizó mediante el reactivo EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako, Agilent Technologies, Inc.). Posteriormente las secciones se incubaron con el anticuerpo primario Ki67 (GA626, Ki-67, clone MIB-1, *ready-to-use*, Dako, Agilent Technologies, Inc.) y la señal del anticuerpo fue detectada mediante el sistema EnVision FLEX /HRP (Dako, Agilent Technologies, Inc.).

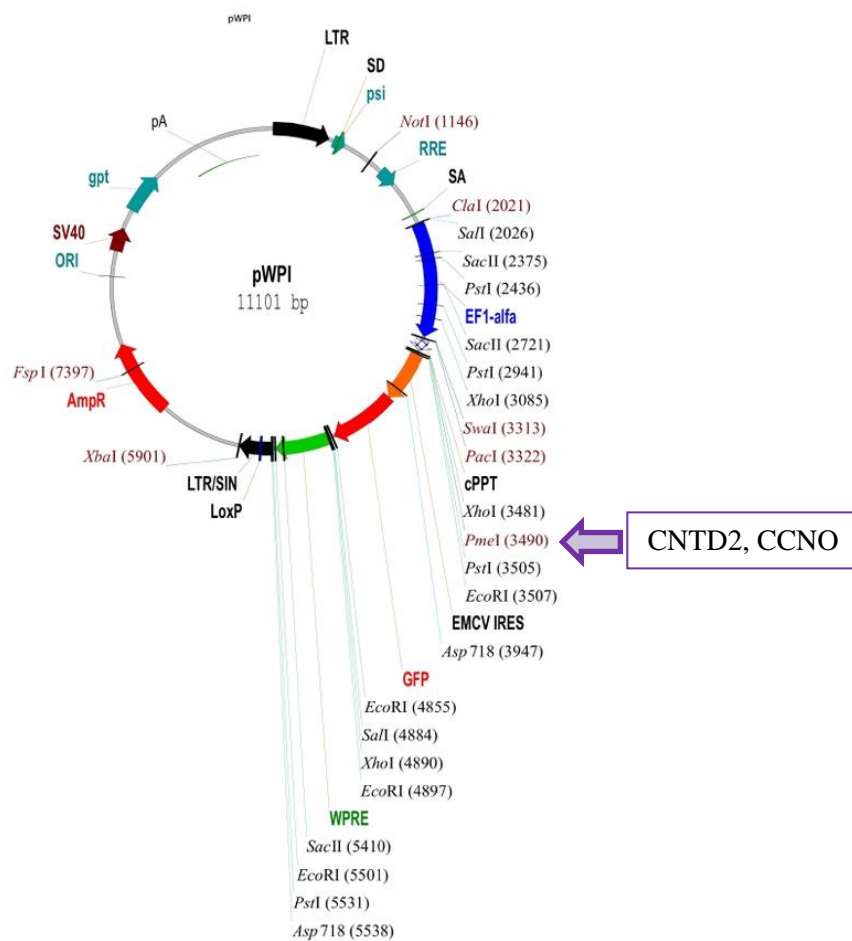
### 3. PRODUCCIÓN DE VIRUS

#### 3.1 Construcciones plasmídicas

##### 3.1.1 Vectores lentivirales

El sistema de producción de virus necesita tres vectores diferentes: un primer vector pWPI (12254, Addgene), en el que se clona el gen de interés, y dos vectores de empaquetamiento vírico como son el psPAX2 (12260 Addgene) y el pMD2.G (12259, Addgene).

En el plásmido pWPI se clonaron tanto CNTD2 como CCNO mediante recombinación por *pmeI* (Fig. 8). Este plásmido lleva un gen reportero GFP para indicar que se ha producido la infección y permitir la posterior titulación vírica.



**Figura 8: Representación del pWPI.** CNTD2 y CCNO fueron introducidas por recombinación en *pmeI*.

### 3.1.2 Clonación de CNTD2 y CCNO

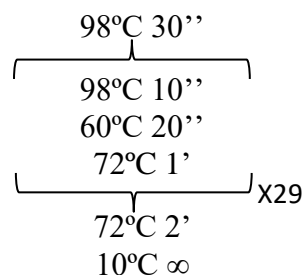
Para poder introducir las secuencias de CNTD2 y CCNO en pWPI, ambas fueron amplificadas a partir de *cDNA* de la línea celular HT-29 mediante PCR utilizando las secuencias de oligonucleótidos que se establecen en la Tabla 9 y que incluyen la fusión de un Flag en C-terminal, así como las condiciones de PCR de la Tabla 10. La CCNO pudo ser amplificada sin problema con las condiciones de la Tabla 11, pero en el caso de CNTD2 no fue posible, por lo que se compró el *cDNA* (gBlock; IDT) siguiendo la secuencia anotada en NCBI (NM\_024877.3) (Tabla 12).

<b>CNTD2 Forward</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGCTGGTGAGAGGCAGGGAC
<b>CNTD2 Reverse</b>	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGTCGTCATCCTTGT AATCATAATTGTCTCTCATTC
<b>CCNO Forward</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGGTGACCCCTGTCCCACC AGCCCTCGAG
<b>CCNO Reverse</b>	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGTCGTCATCCTTGT AATCTTTCGAGCTCGGGGGCAGGCTGCACTTCTCGC

**Tabla 9: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de CNTD2 y CCNO** para su clonación en pWPI en 5'-3'. En morado la secuencia del pWPI, en azul la secuencia de restricción de PmeI, en verde el Flag y en rojo el ATG y la señal de terminación.

Q5	1 µl
Buffer Q5 5x	10 µl
Nucleótidos	4 µl
Oligonucleótido Forward	0,5 µl
Oligonucleótido Reverse	0,5 µl
<i>cDNA</i>	1 µl
Agua mQ	33 µl

**Tabla 10: Componentes para 50µl de PCR**



**Tabla 11: Condiciones de la PCR**



```

ATGCTGGTGAGAGGCAGGGACCAGGGGTCCGGCTCCCGGCTCGGGCCT
ATCGTTAGGCGCTGGGCCCCAGGCCCTCTCCTTTGCAGAGTCTCGCTG
CCTCCCTCGACGCAGAGCCTTCAAGCGCCGCAGTCCCCGACGGCTTCCC
CGCGGGCCCCACTGTCTCCCAAGACGCCTGGCGAGGCCGCCGGGGCTG
GAGGAGGCGCTGAGCGCGCTGGGGCTGCAGGGAGAACGCGAGTACGCC
GGGGACATCTTCGCCGAAGTCATGGTGTGCCGCGTGCTGCCCTGAGAG
CCCTGCCCCGCGCTGTGACCCCGGAGATGCGCGCCCTGGTGGTAGACTG
GCTGGTCCAGGTGCACGAGTACCTGGGTCTGGCTGGTGACACACTTTAT
CTGGCGGTTACCTGCTTGATTCTACCTGAGCGCTGGCCGCGTGCGTCT
ACATCGCCTGCAGCTGCTGGGCGTGGCTTGCCTGTTTGTGGCGTGCAA
ATGGAAGAGTGCCTGCTTCCCGAGCCCGCCTTCTCTGCCTCCTGAGCG
CGGACTCCTTCTCACGGGCGGAGCTGCTGCGCGCCGAGCGTCGCATCCT
GAGCCGCTGGATTTCCGGCTGCACCACCCCGGCCCGCTGCTGTGCCTC
GGGCTGCTGGCCGCGCTGGCAGGGAGCAGCCCCAGGTGATGTTACTTG
CCACCTACTTCTGGAGCTGTCTTTGCTGGAGGCCGAGGCGGGCGGGATG
GGAGCCGGGTTCGTCGTGCGGCTGCGGCTCTGAGCCTGGCGCACCGCTTG
CTCGACGGGGCGGGCTCCAGGCTCCAGCCAGAACTTTACAGGTGTAGTC
TTGGCGGAGGAAGTGTATGGGGTCACCGCAGCTTCAGGGACTTACCTTC
CTGGTCATTTTACGGTCTCGGAGAATGAGAGACAATTATTGA
    
```

**Tabla 12: GBlock de CNTD2**

Los productos de *PCR* fueron separados en un gel de agarosa al 0,8% y las bandas amplificadas purificadas mediante el kit Nucleo Spin Gel and *PCR* clean up (740609.250, Machery Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante. Por otro lado, pWPI fue digerido por *pmeI* (RO5605, Biolab) durante 1h 30 minutos (Tabla 13), y el producto fue purificado como se ha explicado anteriormente. Finalmente se realizó la recombinación del pWPI y los respectivos insertos mediante la reacción con la recombinasa (ST0345, takara) durante 1h a 50°C (Tabla 14).

pWPI	2 µl
Buffer 10x	3 µl
<i>pmeI</i>	1 µl
Agua mQ	24 µl

**Tabla 13: Componentes para la restricción de pWPI por *pmeI***

pWPI	3 µl
CCNO o CNTD2	5 µl

**Tabla 14: Componentes para la recombinación**

### 3.2 Transfección

Para la producción de lentivirus se transfectaron los tres plásmidos en HEK-293T mediante transfección por fosfato cálcico. Las células fueron sembradas a una densidad de 500000 células/mL en placas de 10cm de diámetro 24 horas antes de la transfección. Para cada uno de las construcciones se transfectaron tres placas con las cantidades indicadas en la Tabla 15, en la que se añadió el HeBS gota a gota en constante agitación. Se dejó reposar la mezcla durante 20 minutos para formar los microcristales y se añadieron 1,5ml de la mezcla a cada placa gota a gota.

<b>pWPI 1mg/ml</b> (Control, CCNO, CNTD2)	45µl
<b>pMD2.G 1mg/ml</b>	15,9 µl
<b>psPAX 1mg/ml</b>	29,1µl
<b>TE 0,1X</b> (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH 8)	1,3 ml
<b>Agua Tamponada</b> (MQ suplementada con 2,5mM HEPES pH 7,3)	727µl
<b>CaCl<sub>2</sub> 2,5M</b>	223 µl
<b>HeBS 2X</b> (280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O. pH 7)	2,25 ml

**Tabla 15. Transfección con CaCl<sub>2</sub> para la producción de lentivirus.**

### 3.3 Recogida de sobrenadantes y concentración vírica

A la mañana siguiente de la transfección se procedió a cambiar el medio de las placas por 5ml de medio nuevo, y tras 8 horas de incubación se recogieron los medios de las placas y se mantuvieron a 4°C. Tras la recogida del primer medio se volvieron a añadir 5ml nuevos de medio fresco, y tanto a la mañana como la tarde siguientes se repitió el proceso de recogida.

Tras las tres recogidas de sobrenadantes, éstos se centrifugaron en tubos concentradores (VS2042, Sartorius) hasta reducir el volumen y tener los virus concentrados en unos 300µl de medio, que fue alicuotado y guardado a -80°C durante un máximo de tres meses.

### 3.4 Titulación

Para la titulación se sembraron células HEK-293T a una concentración de 30000 células/pocillo, en pocillos de p24 y en un volumen de 250µl (la mitad del volumen habitual, para favorecer la infección). Las células fueron infectadas con volúmenes crecientes de virus, como indica el esquema (Fig. 9). Un pocillo se dejó sin infectar para utilizarlo como control negativo de la fluorescencia, y otros dos se utilizaron para contar el número de células en el momento de la infección.

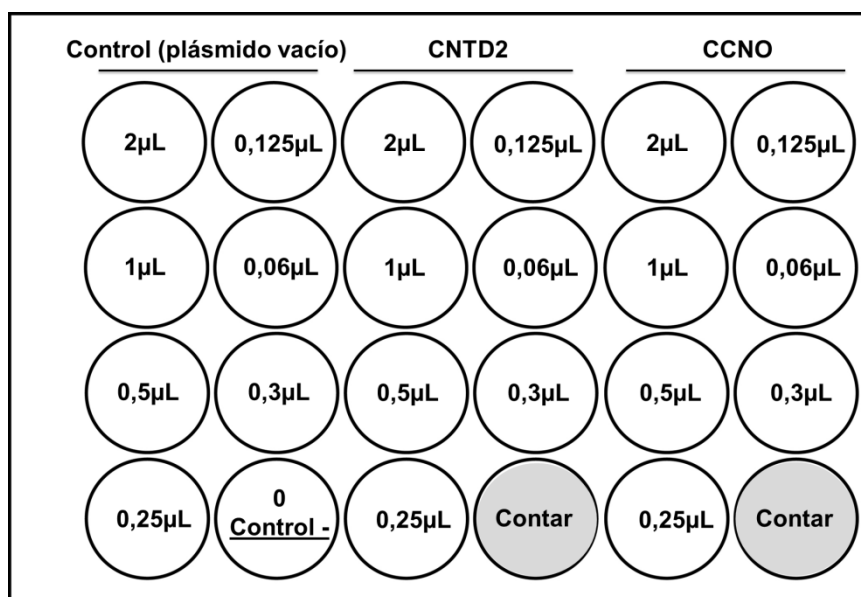


Figura 9. Esquema de infecciones para la titulación de los lentivirus

Al día siguiente se añadió 1ml de medio nuevo a cada pocillo, sin sobrepasar las 15 horas desde la infección, y a los dos días tras la infección se recogieron las células mediante tripsinización para analizar su contenido de GFP (es decir, la cantidad de células infectadas), ya que es el tiempo necesario para que los virus se integren y se expresen correctamente los constructos. La intensidad de GFP fue detectada con un BD FACSCalibur™ mediante el detector FL-1. Cada pocillo al que se añadió un volumen de virus determinado, tenía un porcentaje de infección distinto, que crecía proporcionalmente y permitió hacer una recta de regresión lineal, a partir de la cual se pudo calcular el número de unidades víricas (TU) por ml:

$$\frac{\text{TU}}{\text{ml}} = \frac{\% \text{ Células GFP positivas} \times \text{Número de células}}{\mu\text{l de virus añadidos}}$$

### 3.5 Infección

Una vez titulados los virus, se infectaron las células a diferentes concentraciones de virus para seleccionar las mejores condiciones, esto es, se calcularon las MOI (*multiplicity of infection*), para cada tipo celular. Al igual que en la titulación, las células se sembraron en la mitad del volumen habitual, fueron infectadas con niveles crecientes de MOIs, y al día siguiente se diluyeron los virus con 1ml de medio nuevo. Dos días después se analizó el porcentaje de infección por citometría de flujo con el BD FACSCalibur™ mediante el detector FL-1 y los niveles de expresión por *Western Blot*. Para el cálculo de los MOI se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{volumen de virus (ml)} = \text{volumen de la placa (ml)} \times \frac{\text{n}^{\circ}\text{células}}{\text{ml}} \times \frac{1\text{ml}}{\text{TU}} \times \frac{\text{n}^{\circ}\text{ virus (MOI)}}{1\text{ célula}}$$

## 4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

### 4.1 Líneas celulares

Se utilizaron diferentes líneas celulares tumorales de cáncer de pulmón, colon y mama, así como la línea celular no tumoral HEK-293T para la producción de lentivirus (Tabla 16). Independientemente de la línea utilizada, todas fueron cultivadas a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (D5671, Sigma) o RPMI (R8758, Sigma) suplementado con 10% suero fetal bobino (FBS, F7524, Sigma), 1% de glutaMAX (35050, Life Technologies), 1% penicilina/estreptomicina (P0781, Sigma). Los niveles de micoplasma fueron monitorizados periódicamente.

	TEJIDO	TIPO DE TUMOR	MEDIO	MUTACIÓN										
				KRAS	RB1	SMAD 4	TP53	BRAF	PIK3CA	APC	MYC	CDKN2A	PTEN	
A549	PULMÓN	CARCINOMA PRIMARIO	DMEM											
H1395	PULMÓN	ADENOCARCINOMA	RPMI											
HCA7	COLON	ADENOCARCINOMA	DMEM											
HT115	COLON	ADENOCARCINOMA	DMEM											
HT29	COLON	ADENOCARCINOMA	DMEM											
LoVo	COLON	ADENOCARCINOMA METÁSTASIS (NÓDULO LINFÁTICO)	DMEM											
MCF7 (ER+)	MAMA	ADENOCARCINOMA METÁSTASIS (PLEURA)	DMEM											
MDA-MB-231 (ER-)	MAMA	ADENOCARCINOMA METÁSTASIS (PLEURA)	DMEM											
HEK-293T	RIÑÓN		DMEM											

Tabla 16. Líneas celulares empleadas.

### 4.2 Viabilidad celular tras tratamiento con fármacos

La viabilidad celular se analizó mediante *MTT* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Este sustrato es captado por las células vivas y reducido por la NADH reductasa, hasta formar un precipitado violeta que puede ser disuelto en DMSO y cuantificado por su absorbancia.

Las células fueron sembradas a una densidad de 60000/pocillo para las A549, 100000/pocillo para las LoVo y 150000/pocillo para las MCF7 en placas de p24. Tras 24 horas desde la siembra las células fueron tratadas con los diferentes fármacos (Tabla 17). Se añadió un volumen máximo de 1µl por pocillo para evitar la toxicidad del DMSO y para evitar errores de pipeteo y la posible precipitación de los fármacos, se realizaba una mezcla previa en un volumen de 20µl por pocillo, teniendo en cuenta el número de pocillos a tratar de cada fármaco y concentración. Las células fueron tratadas durante 72 horas, tiempo tras el cual se incubaron con el reactivo *MTT* a una concentración final de 0,2mg/ml (M5655, Sigma) durante 1 hora a 37°C. Tras este tiempo se aspiró el medio y se disolvieron los cristales formados mediante DMSO, que fue cuantificado a 570nm en el lector de placas Synergy HT de Biotek®.

	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
CISPLATINA	Sigma	C2210000
GEFITINIB	Cell Signaling	4765
PACLITAXEL	Sigma	T1912
5-FLUOROURACILO	Sigma	F6627
CAMPTOTECINA	Sigma	C9911
OXALIPLATINA	Cayman	13106
TAMOXIFENO	Sigma	T5648
DOXORUBICINA	Sigma	44583

Tabla 17. Fármacos empleados.

### 4.3 Conteo celular

Las células LoVo y HT-29 fueron sembradas a una densidad de 20000 células por pocillo en una p24, y 24 horas después fueron infectadas. Tras cuatro días de la infección las células fueron tripsinizadas, centrifugadas a 300g y resuspendidas en 500µl para ser contadas con la cámara de Neubauer bajo el objetivo 10x.

#### **4.4 Formación de colonias**

Las células LoVo y HT-29 fueron sembradas a densidades muy bajas de 300 y 200 células en placas p6. Tras 24 horas las células se infectaron e incubaron durante 15 días para promover la formación de colonias individuales. Cuando éstas fueron visibles se fijaron con metanol a -20°C durante 5 minutos, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con 0,1% cristal violeta (C3886, Sigma) durante 30 minutos en oscuridad. Tras varios lavados las colonias fueron fotografiadas, el cristal violeta fue extraído mediante ácido acético al 10%, y la absorbancia fue medida a 570nm en el lector de placas Synergy HT de Biotek®.

#### **4.5 Crecimiento en *soft-agar***

Las placas p6 fueron cubiertas con una fina capa de medio suplementado con 1% agarosa. A continuación se mezclaron 800 células por pocillo (tanto de LoVo como de HT-29) con medio de cultivo al 0,6% de agarosa, para llegar a una concentración final de 0,3%. Esta suspensión celular fue añadida a las placas pretratadas una vez solidificadas, y finalmente cada pocillo se cubrió con medio completo, que fue suplementado cada tres días. Después de 21 días, cuando las colonias se hicieron visibles, se tomaron imágenes utilizando el programa GeneSnap (Sygene) y las colonias fueron contadas mediante la herramienta GeneTools (Syngene).

#### **4.6 Migración por *wound healing***

Las células LoVo y HT-29 fueron sembradas en placas p24 a una densidad de 250000 células/pocillo. Tras 24 horas, las células estaban a elevada confluencia y se realizó una herida vertical en cada uno de los pocillos con una punta de pipeta amarilla. Se lavaron los pocillos con PBS con el fin de arrastrar las células levantadas, y se añadió DMEM con bajo contenido en FBS (0,5%), para limitar el movimiento de las células a la migración y evitar así su proliferación. En este punto se obtuvieron imágenes del tiempo 0 a lo largo de la estría, y tanto 24 como 48 horas más tarde se repitieron estas fotografías. La

distancia recorrida por las células cada día fue calculada en  $\mu\text{m}$  mediante el programa Image J, y correspondía a las diferencias en el cierre de la herida entre el día 0 y los días 1 y 2 respectivamente.

### 4.7 Migración por Transwell

En los ensayos de migración por transwell, se sembraron 50000 células LoVo y HT-29 en la parte superior de una cámara transwell de  $8\mu\text{m}$  de poro (CLS3482, Corning). Las células, en el compartimento superior, fueron cultivadas en medio DMEM con bajo porcentaje en suero (0,5% FBS), con el fin de promover el movimiento migratorio hacia la cámara inferior, en la que se añadió DMEM con un elevado porcentaje en suero (10% FBS). Tras 18 horas de migración se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se tiñeron con cristal violeta 0,1% durante 30 minutos en oscuridad. Las células no-migradoras de la parte superior de la cámara fueron exhaustivamente retiradas con un bastoncillo, y se realizaron fotografías del compartimento inferior del *transwell*. Finalmente, para tener una cuantificación más precisa del porcentaje de migración respecto al control, se extrajo el cristal violeta con ácido acético al 10% y se midieron las absorbancias a 570nm en el lector de placas Synergy HT de Biotek®.

### 4.8 Análisis de ciclo celular

Las células previamente infectadas fueron tripsinizadas y fijadas con etanol al 70% en rotación y a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces con etanol y se incubaron con yoduro de propidio (P4170, Sigma) y *RNAsa* (A2760, Applichem) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Finalmente se analizó el porcentaje de células en cada fase del ciclo por citometría de flujo con el BD FACSCalibur™ mediante el detector FL-2.

#### 4.9 Silenciamiento CNTD2

Para el silenciamiento de CNTD2 en las líneas, se probaron diferentes secuencias de *siRNAs* contra CNTD2 (Tabla 18). Los *siRNAs* se transfectaron a diferentes concentraciones (5, 10, 30 y 50nM) durante 72h con un volumen de Lipofectamina 2000 (1168-027, Invitrogen) de 1µl para cada pocillo de p24 siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se cambió el medio de las células por medio sin antibiótico antes de comenzar la transfección. A continuación se mezcló DMEM sin suplementar con la lipofectamina en un *ependorf* y se incubaron durante 15 minutos. Durante este tiempo de incubación, se fue añadiendo en otro *ependorf* el DMEM sin suplementar con el *siRNA* y al finalizar el tiempo se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó durante otros 15 minutos para permitir la formación de las micelas. Finalmente se añadió la mezcla de transfección gota a gota en cada uno de los pocillos. Como control se utilizó un *siRNA scrambled*, y para comprobar la transfección se empleó un *siRNA* fluorescente.

siRNA	STOCK	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	SECUENCIA		STOCK
FLUORESCENTE	-20	ORIGENE	158415952			5.000 nM
SCRAMBLE	-20	IDT	51-01-14-03	SENSE	rCrGrUrUrCrGrCrGrUrArUrArUrArCrGrC rGrUrArT	5.000 nM
			51-01-14-04	ANTISENSE	rArUrArCrGrCrGrUrArUrArUrArCrGrCrG rArUrUrArArCrGrArC	
CNTD2	-20	ORIGENE	SR312715A	UNIQUE 27MER siRNA duplexes	rGrArArCrUrUrArCrArGrGrUrGrUrArGrUr CrUrUrGrGrCrG	5.000 nM
	-20	ORIGENE	SR312715B	UNIQUE 27MER siRNA duplexes	rArGrArArCrGrArArGrGrArUrCrArCrCrCrAr GrGrCrCrUrCrG	5.000 nM
	-20	ORIGENE	SR312715C	UNIQUE 27MER siRNA duplexes	rUrGrArGrArGrArCrArArUrUrArUrUrGrArGr GrArGrGrArGrG	5.000 nM
	-20	ORIGENE		SENSE	rGrArCrUrUrArCrCrUrUrCrCrUrGrGrUrCrAr UrUrUrUrUrArC	5.000 nM
			ANTISENSE	rCrCrCrUrGrArArUrGrGrArArGrGrArCrCrA rGrUrArArArArUrG		

Tabla 18. *siRNAs* empleados en el silenciamiento



### 4.10 Formación de esferas

De entre los diferentes métodos que actualmente existen para enriquecer la subpoblación de CSCs dentro de un cultivo de células en adhesión, encontramos el cultivo de esferas<sup>112</sup>. Mediante este sistema, se pueden seleccionar las CSCs mediante su cultivo en suspensión o embebidas en Matrigel, en un medio de desdiferenciación suplementado con factores de crecimiento<sup>113</sup>. Estos ensayos se basan en la resistencia a la anoikis; para células diferenciadas es imprescindible la adhesión a una matriz para mantener la homeostasis, y la interrupción de este anclaje conduce a la anoikis, una forma de muerte celular programada<sup>114</sup>. Sin embargo las células madre tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones independientes de anclaje, por lo que al cultivar a la población de células cancerígenas en suspensión, las células diferenciadas sufrirán anoikis y solo sobrevivirán las CSCs<sup>115</sup>.

En la práctica estos ensayos tienen algunas limitaciones. Entre ellas, es necesario que las células estén completamente separadas individualmente para evitar agregados en la formación de esferas que permita el crecimiento de células diferenciadas como esferoides. Además hay que controlar escrupulosamente la densidad de siembra y el tamaño de las esferas<sup>116</sup>. Sin embargo, si estos ensayos se hacen cuidadosamente pueden suponer una herramienta muy útil para estudiar el potencial “*stem*” *in vitro*<sup>117</sup>.

#### 4.10.1 En suspensión

Para la formación de esferas en suspensión, se sembraron 5000 células de cada una de las líneas celulares en placas de baja adhesión (3473, Corning) y en 500µl de medio de desdiferenciación consistente en DMEM F12 (31331-028, Gibco), B27 (17504044, Gibco), hEGF (AF 100-15, Peprotech), hFGF (100-18B, Peprotech), y heparina (H4784, Sigma). El medio fue suplementado tres veces por semana y tras 7-10 días se procedió al conteo de las esferas.

#### **4.10.2 En Matrigel**

Para la formación de esferas en Matrigel, se sembraron 100 células de cada una de las líneas en caso de sobreexpresión o 300 células en caso de silenciamiento en 30µl de Matrigel (356230, Corning) en hielo. El Matrigel con las células se añadió a placas de p48 y se dejó solidificar a 37°C durante 30 minutos. Tras este tiempo se añadieron 250 µl de medio de desdiferenciación a cada pocillo, y se incubaron a 37°C durante 15 días hasta observar la formación de esferas. El medio fue suplementado tres veces por semana y tras este tiempo se fotografiaron y contaron las esferas bajo el objetivo 4x del microscopio.

### **5. RATONES XENÓGRAFOS**

Se utilizaron 7 ratones atímicos macho de 5 semanas (CrI:UN-Foxn1nu, Envigo) para los experimentos con cada línea celular. Se inyectaron subcutáneamente  $3 \times 10^6$  células control o infectadas con CNTD2, previamente disueltas en Matrigel, a ambos costados de cada ratón. El crecimiento tumoral fue monitorizado cada tres días y la longitud (L), y anchura (W) se midió durante 9 semanas tras la inoculación. Pasados 70 días se sacrificaron los ratones y se pesaron los tumores resultantes (g). Así fue como se obtuvo el cálculo del volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) a partir de la fórmula  $V = \pi / (6 \times L \times W^2)$ . Este estudio fue realizado en el IDIBELL, donde se cuenta con la aprobación del Comité ético de Experimentación animal.

### **6. MUESTRAS CLÍNICAS**

Las muestras de CCR y su tejido sano adyacente fueron obtenidas de 55 pacientes diagnosticados en el Hospital General de Catalunya y el Hospital Universitari Sagrat Cor. Las muestras se seleccionaron atendiendo al contenido tumoral (se escogió un mínimo del 80%), y los pacientes se eligieron en base a haber sido diagnosticados de cáncer de colon primario y no haber recibido ni quimioterapia ni radiación previas a la cirugía. Las muestras se fijaron en

formaldehído y fueron embebidas en parafina (FFPE), de acuerdo con los procedimientos rutinarios de estos hospitales. Los tumores fueron clasificados histológicamente, según su grado y estadio de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud. Las características de estos pacientes se incluyen en la Tabla 20. Este estudio fue aprobado por el comité ético de Investigación Clínica del Hospital General de Catalunya (CEIC) y se realizó de acuerdo a sus directrices. En algunos casos no fue posible ni necesario obtener el consentimiento informado de los pacientes debido al carácter retrospectivo del estudio, pero se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes vivos.

### 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para hacer el análisis estadístico de las muestras hay que tener en cuenta varios factores. En primer lugar, las variables pueden ser de tipo cualitativo (edad, sexo, etc.) o cuantitativo (nivel de expresión, nivel de intensidad, número de colonias, etc.). Además, hay que determinar si la muestra sigue una distribución normal (campana de Gauss) o no normal, ya que en el primer caso utilizaremos pruebas paramétricas y en el segundo no paramétricas. Finalmente, hablaremos de muestras apareadas si los sujetos se parecen mucho en sus características o si se trata de medidas sobre el mismo sujeto. En caso contrario, hablaremos de muestras independientes o no relacionadas.

En la Tabla 19 se resumen los test que se emplearon en este trabajo dependiendo del tipo de muestra utilizada. Los datos se representaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (SEM) y los p-valores se consideraron como \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ .

DISTRIBUCION	VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	RELACIÓN	PRUEBA ESTADÍSTICA
Normal (Paramétrico)	Cuantitativa	Cuantitativa	No relacionadas	T-student muestras independientes
No normal (No paramétrico)	Cuantitativa	Cuantitativa	No relacionadas	Mann-Whitney
	Dicotómica (Grado histológico, sexo, pM)	Cuantitativa (Ratio T/N)	No relacionadas	Mann-Whitney
	Policotómica (pT, pN)	Cuantitativa (Ratio T/N)	No relacionadas	Prueba de Kruskal-Wallis
<b>COVARIACION</b> (medidas de dos variables en los mismos sujetos o unidades de análisis del estudio)				
No normal (No paramétrico)	Cuantitativa (Edad, Ganglios)	Cuantitativa (Ratio T/N)		Correlación de Spearman

Tabla 19. Pruebas estadísticas empleadas según el tipo de muestra





# **RESULTADOS**



---

## **CAPÍTULO 1**

### **CNTD2 promueve la proliferación y migración en cáncer colorrectal**





## 1. Los niveles de expresión de CNTD2 y CCNO se encuentran incrementados en tejidos de cáncer colorrectal.

Durante los últimos años, los complejos CDK-ciclina se han revelado como objetivos farmacológicos muy atractivos en la práctica clínica para el desarrollo de drogas antitumorales. Por este motivo parece interesante discernir si las nuevas ciclinas se encuentran de una forma u otra alteradas en cáncer<sup>16</sup>.

De la amplia familia de proteínas que contienen al menos un dominio “*cyclin box*”, un residuo de 150 aminoácidos que determina el sitio de unión con las *CDKs*, se han dividido las ciclinas en dos grupos bien diferenciados. En primer lugar, las ciclinas canónicas, consideradas como aquellas que tienen un papel bien estudiado en ciclo celular y cuyas parejas *CDKs* son conocidas, y por otro lado las ciclinas transcripcionales, en donde se agrupan todas aquellas que forman complejos con *CDKs* de transcripción para regular procesos de daño a DNA o transcripción. Sin embargo, hay un tercer grupo de ciclinas que comparten el dominio “*cyclin box*” pero que no han sido aún bien caracterizadas, y cuyas funciones o parejas *CDKs* no se conocen. Esta subfamilia de ciclinas, a la que nos hemos referido como nuevas ciclinas, incluye SPY1, CCNI, CCNG1, CCNG2, CCNJ, CNTD2, CCNO, FAM58A, CCNY y CNTD1.

Teniendo en cuenta que las ciclinas están normalmente reguladas mediante mecanismos post-traduccionales y que los estudios *high-throughput* publicados hasta ahora no han permitido proponer un papel para las mismas, decidimos monitorizar los niveles de proteína finales como una medida de expresión de estos genes. Por esta razón, sólo las nuevas ciclinas con anticuerpos previamente validados por nuestro grupo (Gasa *et al*, 2017)<sup>44</sup>, fueron incluidos en el presente estudio, entre las que se encontraban CCNG1, CCNG2, CCNO, CCNI, CCNY, SPY, CNTD1 y CNTD2.

La expresión de estas ciclinas fue analizada en cuatro líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal, HCA-7, H115, HT-29 y LoVo, y comparamos sus niveles de expresión con la línea fibroblástica procedente de colon sano CCD-18Co. La expresión de la ciclina canónica A (CCNA), se utilizó como control, y ya como está descrito, CCNA se encontraba incrementada en ambas líneas

## RESULTADOS

---

cancerígenas en comparación con el control sano, mientras que el patrón de las nuevas ciclinas era variable (Fig. 1A). Los niveles de expresión de CCNO eran significativamente mayores en todas líneas tumorales comparadas con la normal, mientras que CCNY y CCNG1 tenían una mayor expresión en HT-29 (Fig. 10). Por otro lado, las ciclinas CNTD1, CCNI, SPY1, CCNG2 y CNTD2 no pudieron ser detectadas en estas líneas celulares. Estos resultados muestran que algunas de las nuevas ciclinas podrían estar desreguladas en CCR y que su expresión es específica del tipo celular.

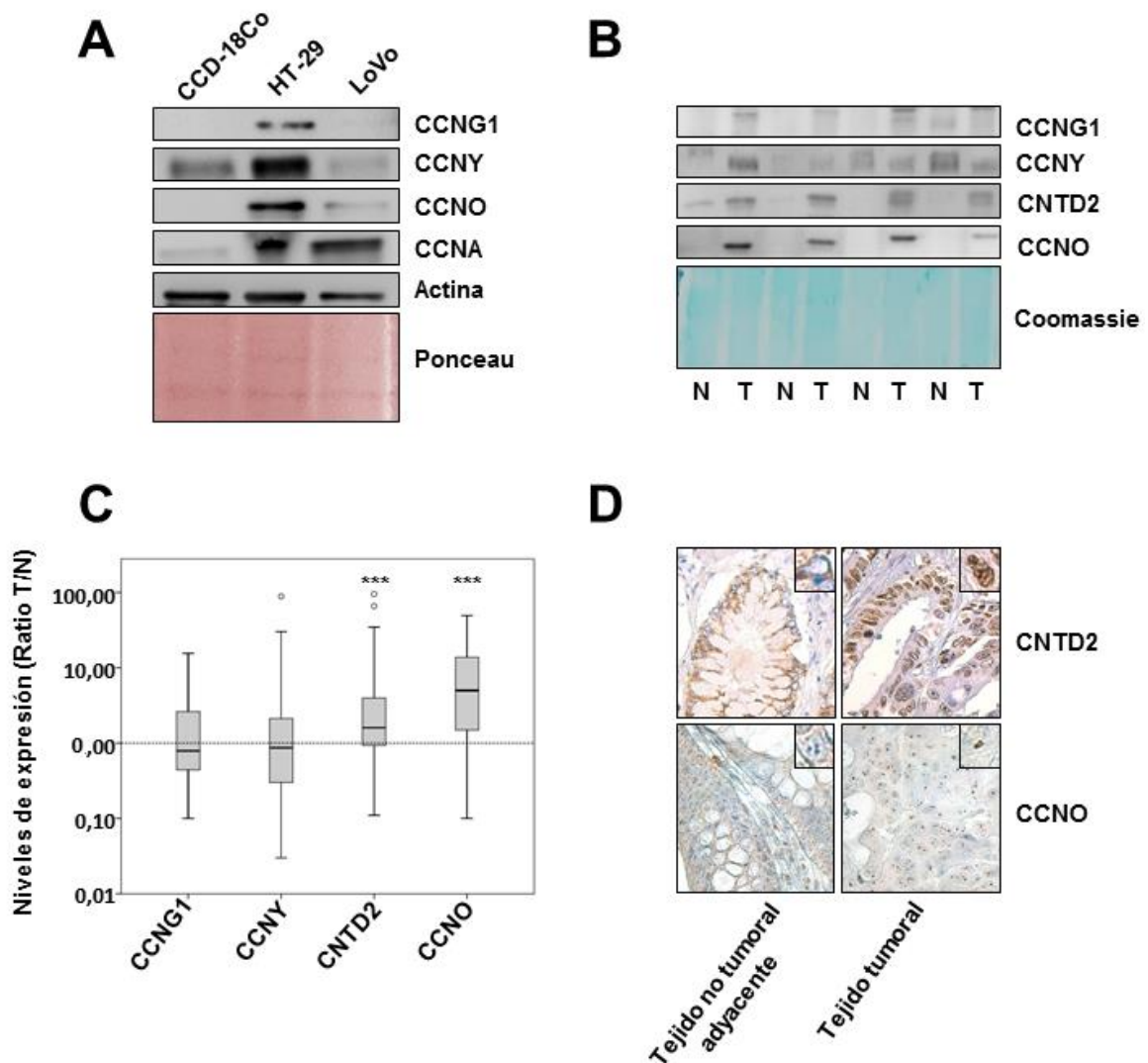
A continuación monitorizamos los niveles de expresión de las nuevas ciclinas en 55 muestras de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) de pacientes con adenocarcinoma colorrectal (Tabla. 20) y su tejido adyacente no tumoral. La expresión de las ciclinas fue determinada por *Western Blot* y se estableció el ratio entre los niveles de expresión del tejido tumoral y el normal (Ratio T/N) una vez normalizados los datos con el *coomassie* de la membrana.

La expresión de CNTD1, CCNI, SPY1 y CCNG2 de nuevo no fue detectada en las muestras de pacientes y las ciclinas CCNG1 y CCNY no presentaron diferencias entre el tejido tumoral y el normal. Sin embargo, las ciclinas CNTD2 y CCNO presentaban niveles de expresión significativamente mayores en el tejido tumoral comparado con el tejido sano adyacente (Figs. 10B y 10C). Por este motivo estas dos ciclinas fueron seleccionadas para una posterior caracterización en líneas celulares *in vitro*.

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por *Western Blot* se examinaron seis parejas de tejido cancerígeno y sano de pacientes de CCR mediante inmunohistoquímica, en la que se detectó una tinción positiva en el tejido tumoral para CNTD2, que además se encontraba principalmente localizada en el núcleo (Fig. 10D), y para CCNO, la cual podría estar concentrada en el nucléolo de las células tumorales (Fig. 10D).

		Número (%)
Grado histológico	Bajo	49 (89,1%)
	Alto	6 (10,9%)
Ganglios +		30 (54,5%)
Estadío	I	-
	II	22 (40%)
	III	26 (47,3%)
	IV	7 (12,7%)
Sexo	Mujer	30 (54,5%)
	Hombre	25 (45,5%)
Edad		71,1 (34 - 92)
Localización del tumor	Izquierda	19 (34,5%)
	Derecha	31 (56,4%)
	Transversal	5 (9,1%)

**Tabla 20.** Características clínico-patológicas de los sujetos incluidos en el estudio.



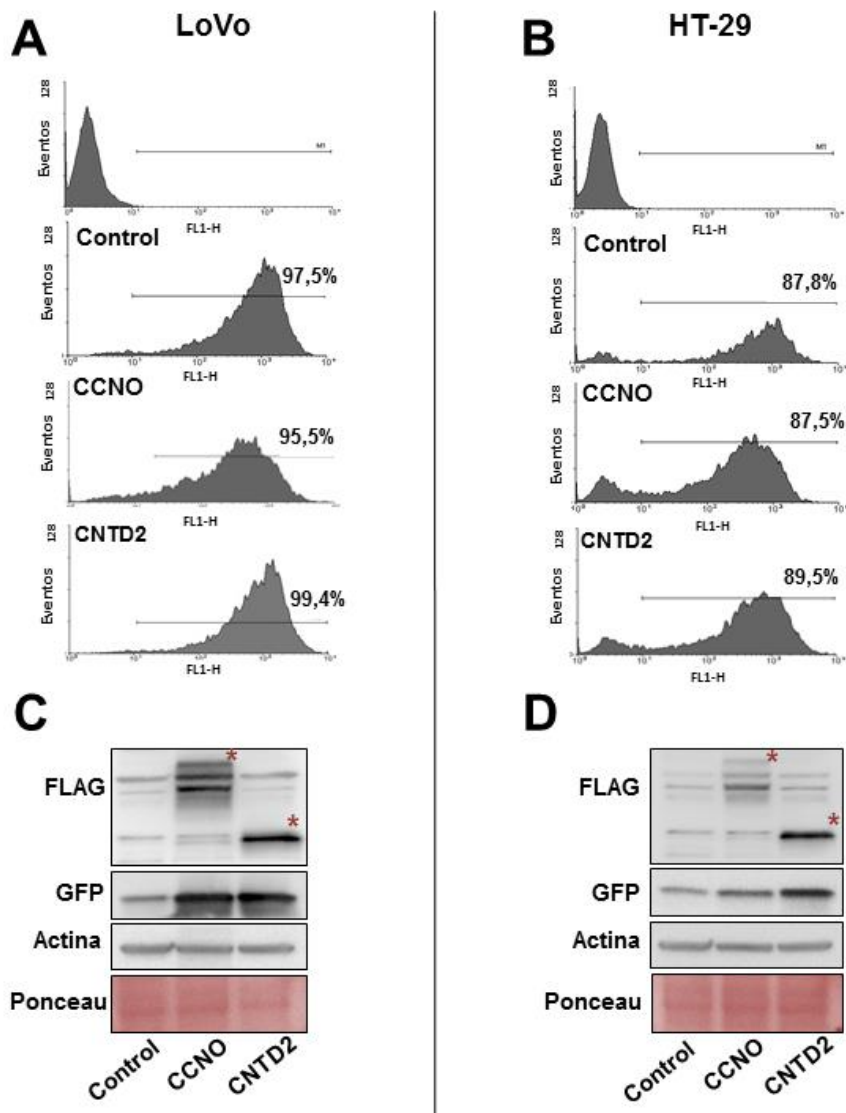
**Figura 10. CCNO y CNTD2 se encuentran sobreexpresadas en tejidos de CCR.**

(A) Imágenes representativas de la expresión de varias nuevas ciclinas en las líneas celulares humanas de CCR HCA-7, HT115, HT-29 y LoVo, en comparación con la línea fibroblástica de colon CCD-18Co. (B) Imágenes representativas de la expresión de las nuevas ciclinas en muestras de tejidos FFPE normales (N) y tumorales (T) de pacientes de CCR. (C) Las bandas fueron cuantificadas mediante el programa LI-COR Image Studio Software y normalizadas con el coomassie y los resultados representados mediante un gráfico de caja y bigotes. Los bigotes indican el rango de niveles de la muestra y la barra horizontal dentro de la caja, la mediana (n=55). \*\*\*P < 0.001 vs tejido normal, Wilcoxon test. (D) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica realizada en las muestras normales y tumorales de pacientes de CCR, marcadas con anticuerpos para CNTD2 y CCNO. En ambos casos los niveles de expresión proteica son mayores en el tejido tumoral. CNTD2 se localiza principalmente en el núcleo mientras que CCNO se encuentra en la región nucleolar (aumento 63x).

## **2. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la proliferación en células de cáncer de colon.**

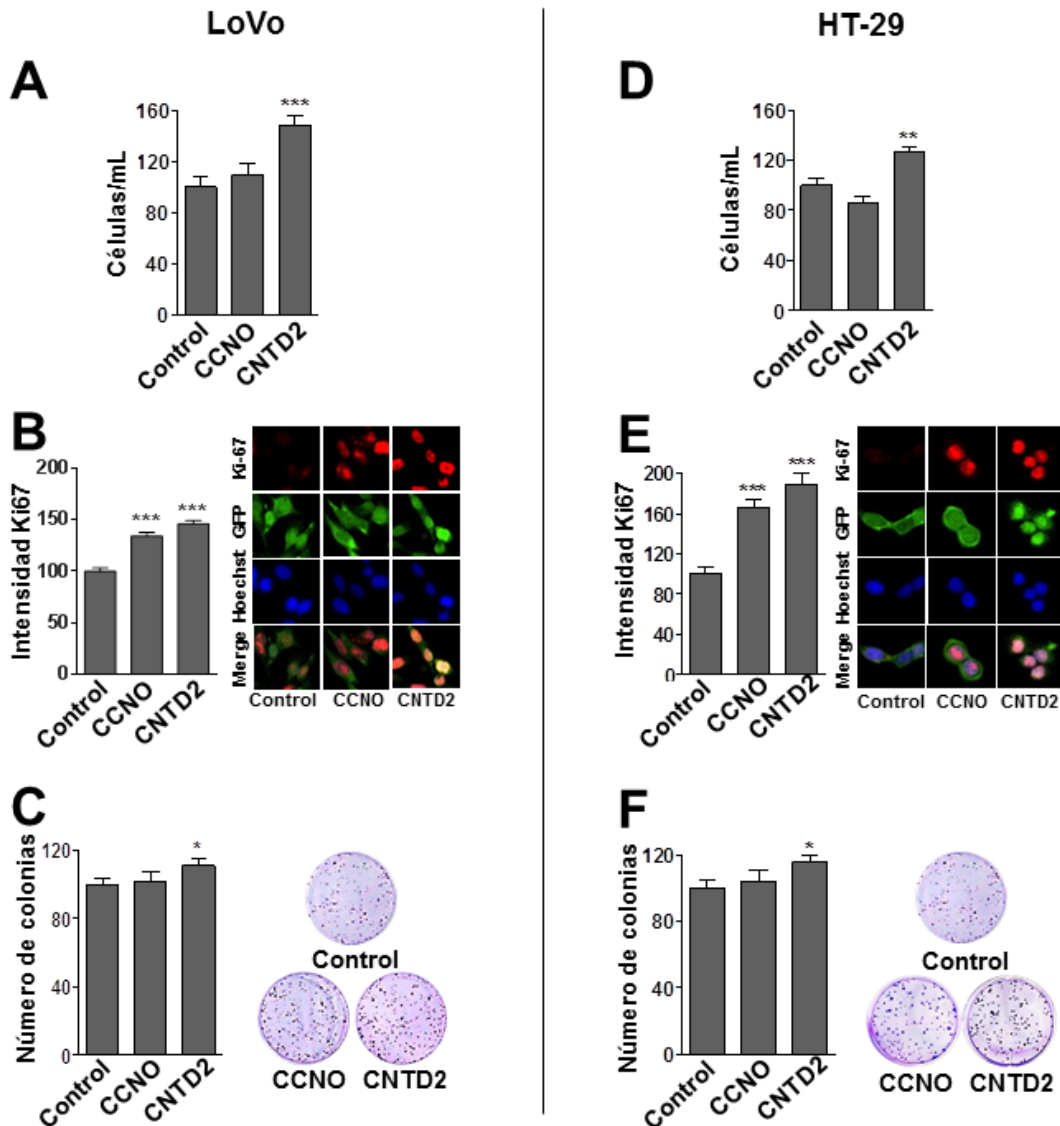
Con el fin de evaluar el papel de CCNO y CNTD2, ambas ciclinas fueron clonadas en un vector lentiviral y sobreexpresadas en las líneas de cáncer de colon: LoVo y HT-29. Se seleccionaron estas líneas celulares, en primer lugar, por ser frecuentemente citadas como modelos representativos de adenocarcinoma colorrectal. En segundo lugar, por las diferencias en sus fondos genéticos, ya que las HT-29 presenta BRAF mutado, mientras que LoVo es BRAF *wild type*. Finalmente, el hecho de que las HT-29 procedan de un tumor primario, mientras que las LoVo hayan sido obtenidas de un nódulo metastásico las convierten en modelos atractivos para este estudio.

Ambas líneas se infectaron con un lentivirus vacío (control) o con el vector viral expresando CCNO o CNTD2. Los niveles de infección fueron evaluados mediante citometría de flujo gracias a un GFP reportero mediante el cual se pudo determinar un porcentaje de infección de alrededor del 90% para una infección con 20 MOI (Figs. 11A y 11B), mientras que la expresión de los constructos se verificó mediante *Western Blot* (Figs. 11C y 11D).



**Figura 11. Sobreexpresión de CCNO y CNTD2 en células de CCR.** Las células LoVo y HT-29 fueron infectadas con el vector lentiviral vacío (control) o con el constructo que se indica. (A, B) El análisis de las infecciones por citometría de flujo revela que prácticamente el total de las poblaciones analizadas se encuentran infectadas (C, D) El análisis por *Western Blot* de las células infectadas confirma la correcta sobreexpresión de los constructos. Se utilizó un anticuerpo contra flag para detectarlos.

Mientras que la sobreexpresión de CCNO no produjo un claro efecto en la proliferación celular, la sobreexpresión de CNTD2 incrementó el número de células (Figs. 12A y 12D), la intensidad del marcador de proliferación Ki-67 (Fig. 12B y 12E), así como la capacidad formadora de colonias (Figs. 12C y 12F) tanto en células LoVo como en HT-29. Estos resultados muestran un fenotipo robusto de proliferación independientemente del estatus de *BRAF*.

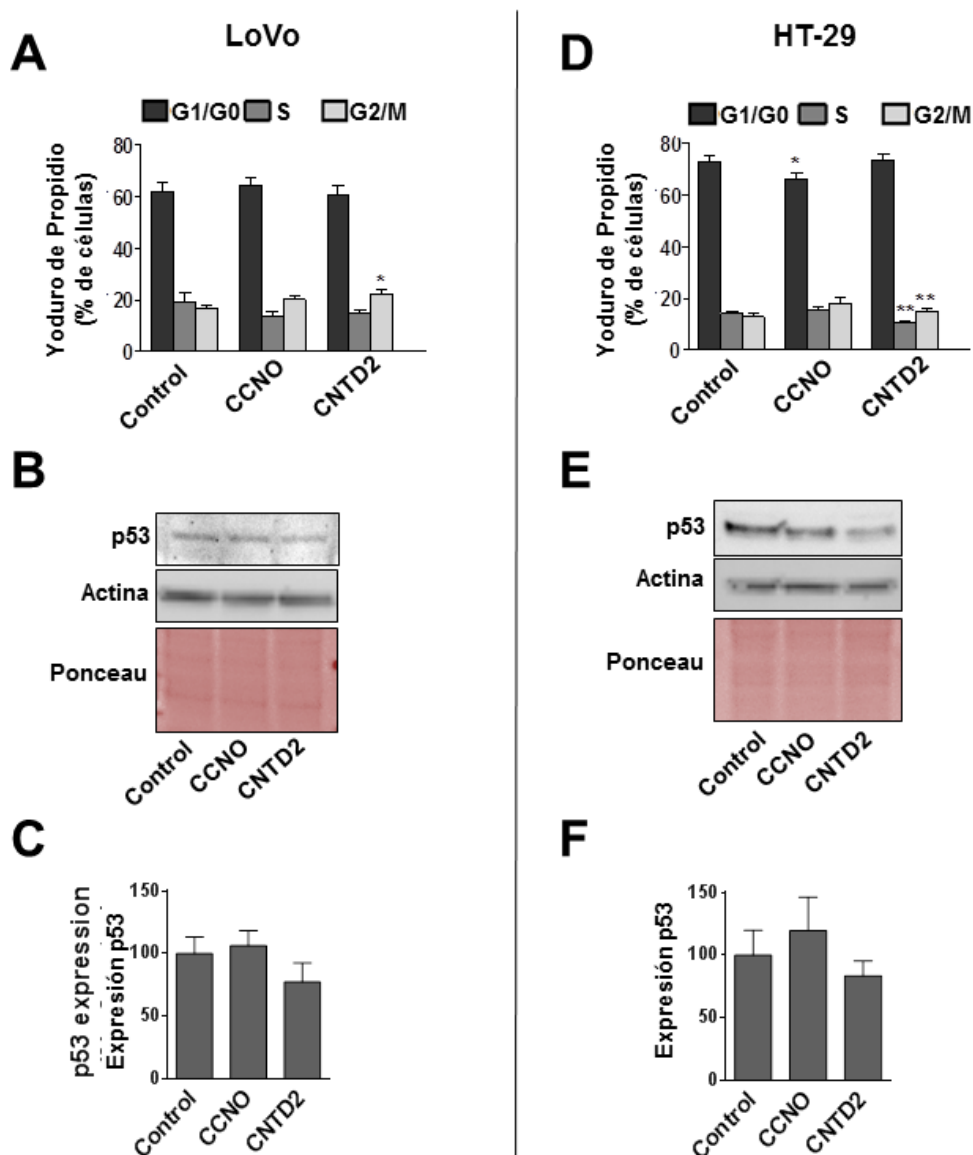


**Figura 12. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la proliferación en células de CCR.** (A, D) El número de células de CCR fue evaluado mediante conteo. Las columnas representan la media  $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control, Mann-Whitney test. (B, E) La proliferación de las células fue evaluada por inmunotinción con Ki-67. Las columnas muestran un experimento representativo de 4, en los que se cuantificaron 100 células de cada condición mediante el programa NisElement (NIKON), \*\*\*P < 0.001 vs control, T-student test. (C, F) La eficiencia de la formación de colonias se determinó dejando crecer las colonias durante 15 días y posterior tinción. Las columnas representan la media  $\pm$ SEM de seis experimentos independientes realizados por triplicado, \*P < 0.05 vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.



## RESULTADOS

Además, los análisis de ciclo celular en LoVo y HT-29 sobreexpresando CCNO y CTND2 mostraron que sólo el último produjo alteraciones de ciclo, apareciendo una disminución del porcentaje de células en fase S y un incremento en las fases G2/M (Figs. 13A y 13D). Para determinar si el incremento de la proliferación podía estar acompañado de una disminución en la expresión del supresor tumoral p53 se analizaron sus niveles por *Western Blot*, y a pesar de una ligera disminución en las células que sobreexpresaban CNTD2, no se obtuvieron diferencias significativas (Figs. 13B, 13C, 13E y 13F).



**Figura 13. La sobreexpresión de CNTD2 produce una leve aceleración del ciclo celular.** (A, D) El ciclo celular se analizó mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Las columnas representan la media  $\pm$ SEM de seis experimentos independientes realizados por triplicado, \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. (B, E) Análisis por *Western Blot* de la expresión de p53. (C, F) . Los niveles de expresión fueron cuantificados con el programa LI-COR Image Studio Software, normalizados con Ponceau y representados respecto al control.

### 3. La sobreexpresión de CNTD2 promueve la migración de las células de CCR.

Para investigar si estas nuevas ciclinas podían aumentar la capacidad de las células de CCR para establecer metástasis se determinó el ratio de expresión T/N en todas las ciclinas de esta investigación en pacientes con diferentes grados de nódulos linfáticos regionales (N=0 o nódulos linfáticos regionales no afectados, N=1 o metástasis en 1 a 3 nódulos linfáticos, N=2 o metástasis en 4 o más nódulos linfáticos). Esta y otras correlaciones pueden encontrarse en la Tabla 21.

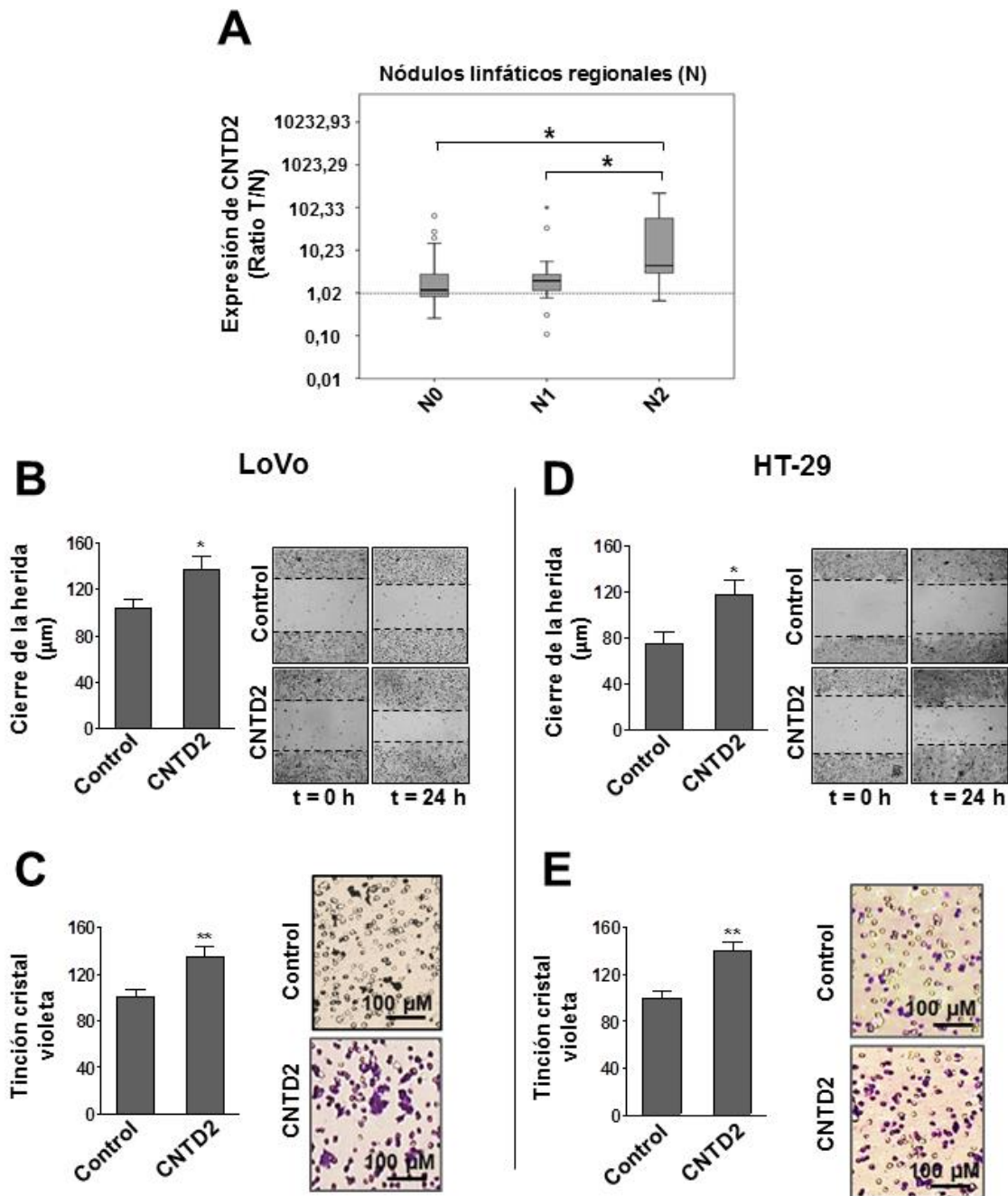
De todas las ciclinas testadas sólo se encontró una correlación positiva entre la expresión de CNTD2 y los distintos grados de nódulos linfáticos regionales (Fig. 14A). Este resultado sugiere que aparte de su implicación en proliferación celular, la sobreexpresión de CNTD2 podría contribuir a la migración celular y el desarrollo de metástasis. Para confirmar esta hipótesis, se monitorizó el efecto de la sobreexpresión de CNTD2 en la movilidad celular de las líneas de CCR mediante un primer ensayo de migración por herida, y observamos que la sobreexpresión de CNTD2 incrementaba significativamente la velocidad de migración de las células LoVo y HT-29 en comparación con las células control (Figs. 14B y 14D). Confirmamos este resultado mediante un ensayo de migración por *transwell*, en el que pudimos confirmar que la sobreexpresión de CNTD2 mejoraba la capacidad migratoria de las células LoVo y HT-29 respecto al control, observándose más células migratorias en la parte inferior del pocillo (Figs. 14C y 14E).

Estos resultados estarían indicando que la sobreexpresión de CNTD2 podría jugar un papel importante en el desarrollo de metástasis en CCR.

## RESULTADOS

	Cables1		CCNG1		CCNO		CCNY		CNTD2	
	Mediana	Pvalor	Mediana	Pvalor	Mediana	Pvalor	Mediana	Pvalor	Mediana	Pvalor
<b>Grado histológico</b>										
<b>Bajo</b>	1,8 (0,8-6,9)	NA	0,7 (0,4-2,0)	0,34	5,6 (1,7-22,5)	0,71	1,2 (0,3-2,1)	0,86	1,9 (0,9-5,12)	0,84
<b>Alto</b>	NA		1,3 (0,7-3,2)		7,6 (0,5-26,8)		0,3 (0,3-15,2)		2,1 (0,5-5,3)	
<b>Ganglios +</b>	r= -0,1	0,57	r= 0,1	0,56	r=-0,12	0,4	r=0,04	0,82	r=0,29	<b>0,03*</b>
<b>Ganglios -</b>	r= 0,1	0,66	r= -0,01	0,94	r=-0,2	0,07	r=-0,01	0,94	r=-0,1	0,48
<b>pT</b>										
<b>2</b>	NA	0,24	1,4 (0,1-2,7)	0,55	7,0 (3,6-12,1)	0,35	10,5 (6,3-17,8)	<b>0,03*</b>	2,5 (0,3-4,7)	0,61
<b>3</b>	1,0 (0,8-5,1)		0,8 (0,3-1,7)		4,9 (1,0-21,6)		0,9 (0,3-2,0)		2,7 (1,1-10,5)	
<b>4</b>	3,2 (2,9-6,9)		0,7 (0,5-2,9)		14,1 (2,3-38,4)		0,4 (0,3-0,9)		2,8 (1,2-5,5)	
<b>pN</b>										
<b>0</b>	2,6 (0,7-7,2)	0,76	0,5 (0,3-1,8)	0,36	5,1 (2-42,7)	0,32	0,4 (0,1-7,8)	0,69	1,2 (0,8-4,2)	<b>0,01 *</b>
<b>1</b>	1,0 (0,9-15,6)		1,5 (0,7-2,9)		5,7 (1,8-16,0)		1,4 (0,4-10,5)		5,7 (1,8-16,0)	
<b>2</b>	1,0 (0,7-5,5)		0,6 (0,3-2,2)		5,0 (0,53-22,8)		0,5 (0,3-1,3)		5,0 (0,53-22,8)	
<b>pM</b>										
<b>0</b>	1,4 (0,8-5,6)	0,57	0,7 (0,4-2,6)	1,00	6,1 (1,9-23,5)	0,37	1,2 (0,3-3,2)	0,19	1,9 (1,0-5,7)	0,21
<b>1</b>	4,4 (1,8-6,9)		0,6 (0,4-1,5)		1,7 (1,0-24,7)		0,3 (0,3-0,4)		0,9 (0,3-0,4)	
<b>Sexo</b>										
<b>Mujer</b>	1,0 (0,8-3,2)	0,26	1,0 (0,4-3,1)	0,09	4,9 (1-32,6)	0,52	0,9 (0,3-2,7)	0,76	1,5 (0,9-4,9)	0,57
<b>Hombre</b>	2,1 (0,9-10,8)		0,7 (0,2-1,3)		6,5 (2,0-18,8)		1,0 (0,3-4,1)		6,5 (2,0-18,8)	
<b>Edad</b>	r= -0,1	0,76	r= -0,1	0,70	r=0,18	0,18	r=0,31	0,09	r=-0,11	0,43
<b>Lugar del tumor</b>										
<b>Izquierda</b>	1,0 (0,8-8,0)	0,21	0,7 (0,3-1,7)	0,18	1,0 (1,0-17,1)	0,11	1,2 (0,3-2,1)	0,92	2,0 (1,0-5,6)	0,39
<b>Derecha</b>	1,8 (0,7-2,5)		1,3 (0,5-5,2)		6,5 (1,7-14,5)		0,5 (0,3-13,3)		1,3 (0,7-3,3)	
<b>Transversal</b>	13,5 (7,0-20,1)		0,7 (0,3-1,6)		32,9 (14,3-71,8)		0,8 (0,3-1,3)		32,9 (14,3-71,8)	

**Tabla 21. Correlaciones entre la ratio T/N y las diferentes características de los pacientes.** Se analizaron estadísticamente mediante Mann-Whitney las relaciones entre la ratio T/N y sexo, grado histológico pM; mediante Spearman las relaciones entre ratio T/N y edad o ganglios; y mediante Krustal-wallis la correlación entre ratio T/N y pT o pN. Se encontró una correlación significativa entre el tamaño del tumor primario (pT 2) y una mayor expresión de CCNY en el tumor. Por otro lado también se observó que los pacientes con Ganglios + y con mayor infiltración metastásica en nódulos presentaban un mayor ratio T/N de CNTD2.

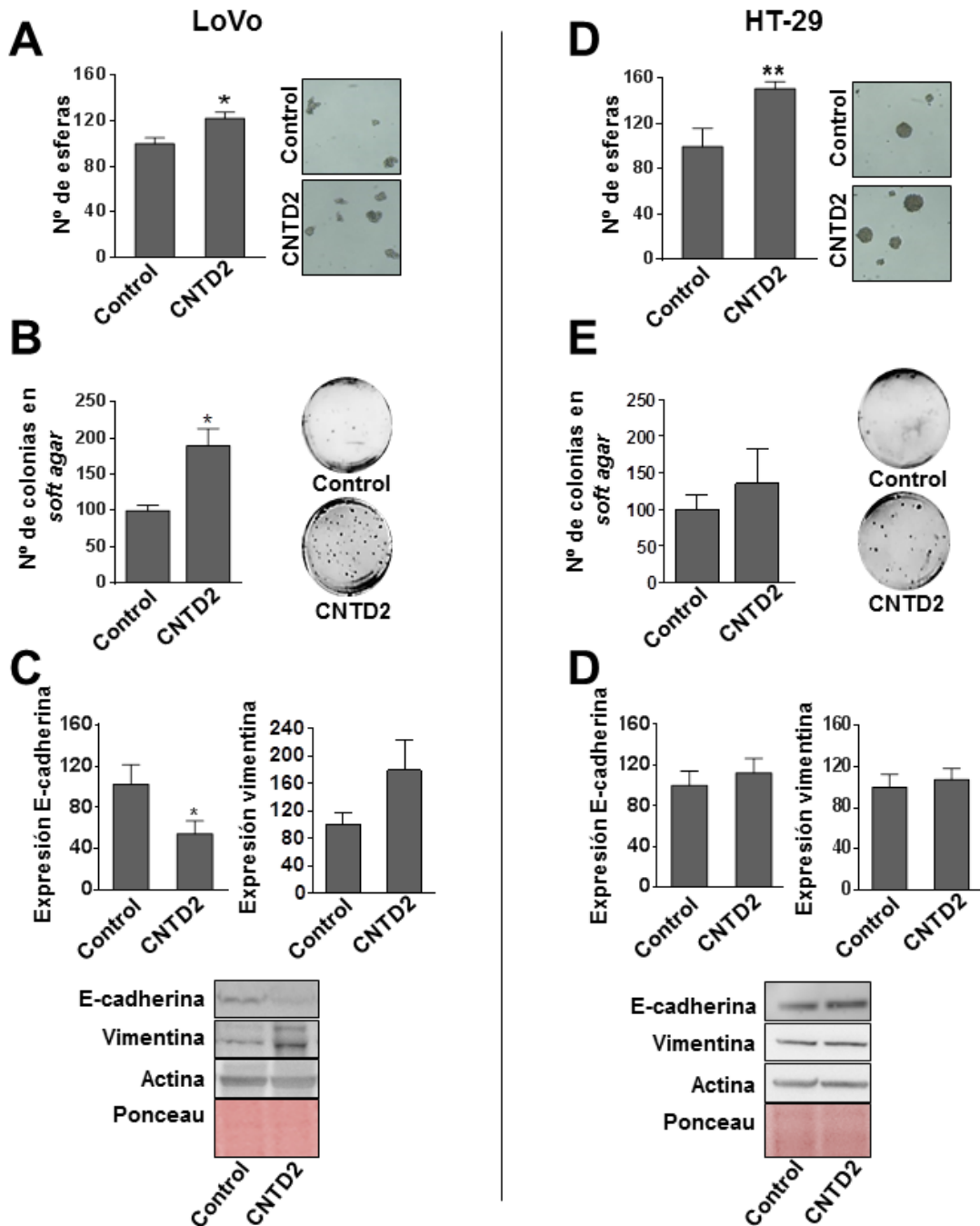


**Figura 14. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la migración en células de CCR.** (A) El ratio T/N ratio de CNTD2 fue evaluado en pacientes con diferente grado de nódulos linfáticos regionales (N), N0 (n=25), N1 (n=18) o N2 (n=12) y se representó en un gráfico de caja y bigotes. \*P < 0.05, Mann-Whitney test. (B, D) La capacidad migratoria de las células de CCR se evaluó mediante un ensayo de herida y los resultados se expresaron como longitud recorrida por las células durante el cierre de la herida en µm. Cada columna representa la media ± SEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. \*P < 0.05 vs control, Mann-Whitney test. (C, E) La migración de las células se monitorizó por ensayo de *transwell*. Tras la 24h de migración, las células de la cámara inferior se tiñeron con cristal violeta y se cuantificó midiendo la absorbancia a 595nm tras la extracción del colorante con ácido acético. Las columnas representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado, \*\*P < 0.01 vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

#### 4. La sobreexpresión de CNTD2 promueve la transición a células madre cancerígenas.

Con el objetivo de migrar a través del organismo, colonizar otros tejidos y establecer metástasis distante, las células tumorales necesitan volverse “independientes del anclaje” y modular su fenotipo para adquirir propiedades mesenquimales. Esta capacidad es denominada “*epitelial to mesenchymal transition*” o *EMT*<sup>118</sup>.

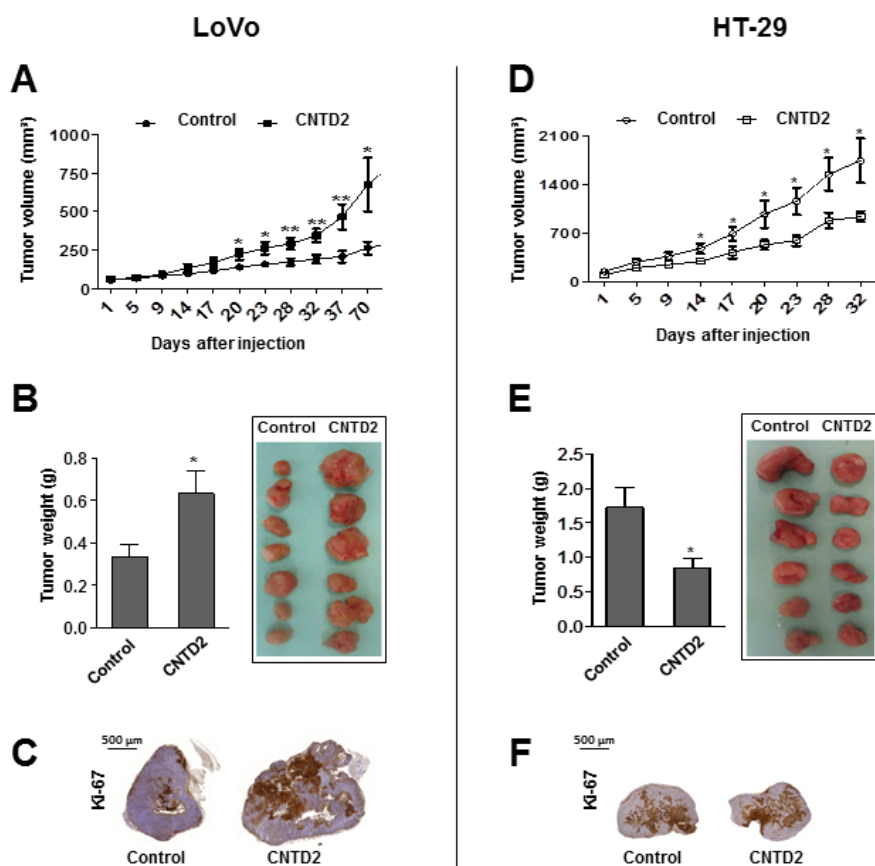
Para evaluar si la sobreexpresión de CNTD2 promovía estas propiedades asociadas con la *stemness* de las células de CCR, las células fueron cultivadas en suspensión en placas de baja adhesión y en un medio de desdiferenciación, sin suero y rico en factores de crecimiento con el objetivo de enriquecer la población en células madre cancerígenas (*Cancer stem cells* o *CSCs*). Las *CSCs* se pueden cultivar en suspensión bajo medio de desdiferenciación para generar esferas<sup>119</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de CNTD2 incrementaba el número de esferas en los cultivos en suspensión de las células LoVo y HT-29 en comparación con el control (Figs. 15A y 15D), lo que sugiere que CNTD2 podría estar implicado en la capacidad de autorenovación (*self-renewal*), característica de las *CSCs*. Por otro lado, en un ensayo de crecimiento independiente de anclaje en las que se cultivaron las células en *soft-agar*, el incremento de CNTD2 estimuló la formación de colonias no adheridas sólo en las células LoVo (Figs. 15B y 15E). A continuación analizamos el efecto de la sobreexpresión de CNTD2 en marcadores de *EMT* mediante *Western Blot*. Mientras que en las células LoVo la sobreexpresión de CNTD2 redujo de forma significativa la expresión de E-cadherina y mostró una tendencia de incremento en los niveles de vimentina, no se observaron alteraciones en cuanto a los marcadores de *EMT* en las HT-29 (Figs. 15C y 15F), indicando que CNTD2 podría tener diferente impacto en el proceso de *EMT* y crecimiento independiente de anclaje dependiendo del estado de *BRAF*.



**Figura 15. La sobreexpresión de CNTD2 promueve la transición a CSCs.** (A, D) El número de esferas se contabilizó en células de CCR sobreexpresando lentivirus vacío y CNTD2 sembradas en suspensión con medio de desdiferenciación. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes realizados por triplicado, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control, Mann-Whitney test. (B, E) El efecto de CNTD2 en el crecimiento independiente de anclaje fue determinado mediante el cultivo de las células de CCR en *soft-agar*. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes realizados por triplicado, \*P < 0.05 vs control, Mann-Whitney test. (C, D) El efecto CNTD2 en la expresión de marcadores de *EMT* como E-cadherin y vimentina fue analizado por *Western Blot*. Los niveles de expresión fueron cuantificados con el programa LI-COR Image Studio Software y normalizados con Ponceau. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de ocho experimentos independientes of, \*P < 0.05 vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

### 5. La sobreexpresión de CNTD2 acelera el crecimiento tumoral *in vivo*

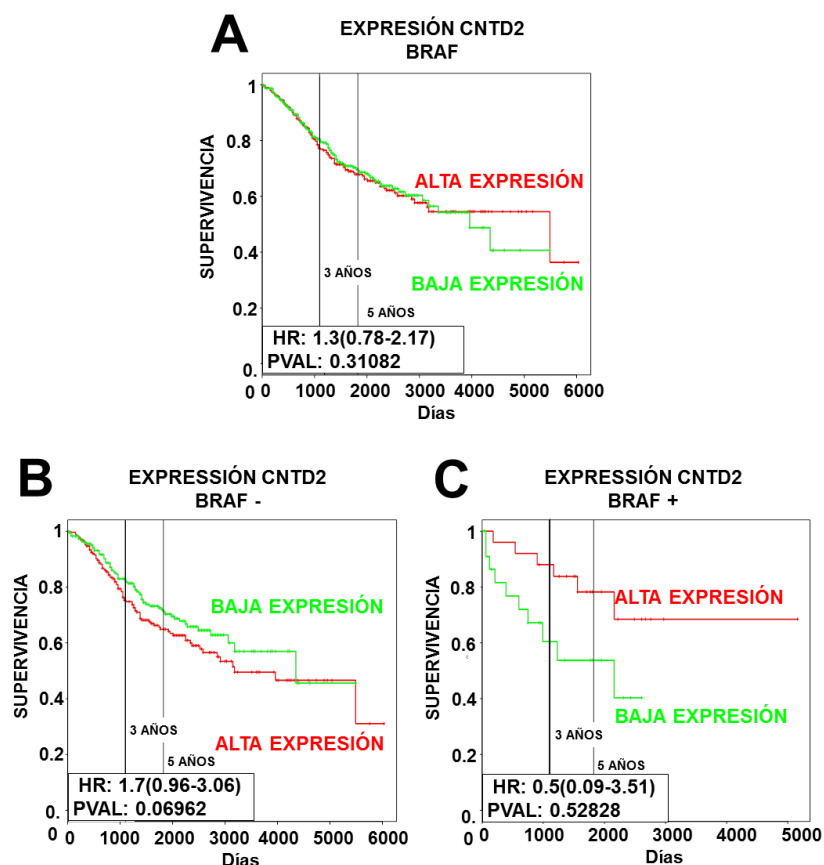
Basándonos en los resultados *in vitro*, cabría esperar que la sobreexpresión de CNTD2 incrementara el crecimiento tumoral *in vivo*. Por ello, las células LoVo y HT-29 infectadas con el vector vacío o CNTD2 fueron inyectadas subcutáneamente a ambos lados del costado de ratones *nude*. Los tumores derivados de las células LoVo que sobreexpresaban CNTD2 crecían a mayor velocidad que los controles (Fig. 16A), y pasados 70 días tras la inoculación, tanto el tamaño tumoral como la expresión de Ki-67 eran mayores (Figs. 16B y 16C). Sorprendentemente, en el caso de los ratones inoculados con HT-29, CNTD2 redujo la velocidad de crecimiento tumoral y el tamaño de los mismos a tiempo final, mientras que la expresión de Ki67 se mantuvo idéntica a la del control (Figs. 16D, 16E y 16F). Este resultado podría sugerir que un contexto genético como puede ser la mutación BRAF podría regular las consecuencias de la sobreexpresión de CNTD2 *in vivo*.



**Figura 16. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa el crecimiento tumoral *in vivo*.** (A, D) El volumen tumoral fue medido a distintos tiempos tras la inoculación de las células de CCR (n=7). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control, Mann-Whitney test. (B, E) Tras 70 días los ratones fueron sacrificados y los tumores pesados. \*P < 0.05, vs control, Mann-Whitney test. (C, F) Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de Ki67 en los tumores. Escala: 500 μm.

## 6. CNTD2 como factor pronóstico y diana terapéutica de CCR.

Para investigar el impacto pronóstico de CNTD2 en CCR, construimos curvas de Kaplan-Meier representando la supervivencia global de pacientes de CCR, utilizando el software PROGgeneV2 y seleccionando la web Marisa<sup>120</sup>, por su fiabilidad. Mientras los niveles de expresión de CNTD2 no parecían afectar a la supervivencia global de pacientes de CCR de todos los tipos histológicos para los cuales se había estudiado el estado de BRAF (Fig. 17A), la estratificación de pacientes reveló que la elevada expresión de CNTD2 tendía a presentar un peor pronóstico en pacientes con BRAF- (Fig. 17B). Por otro lado, y de acuerdo con nuestros resultados en ratón, una elevada expresión de CNTD2 parecía mejorar la supervivencia en aquellos pacientes que presentaban BRAF+ (Fig. 17C).



**Figura 17. Valor pronóstico de CNTD2 en CCR.** Mediante la herramienta PROGgeneV2 software (<http://watson.compbio.iupui.edu/chirayu/proggene/database/?url=proggene>) y seleccionando la base de datos Marisa (GSE39582, n=578) se realizaron curvas de Kaplan-Meier- (A) Gráfica de la supervivencia a lo largo del tiempo de pacientes de CCR de todos los tipos histológicos, (B) sin mutación en BRAF o (C) con mutación en BRAF, según los niveles de expresión de CNTD2. Las curvas rojas representan una elevada expresión de CNTD2, mientras que las curvas verdes representan una baja expresión.









---

## **CAPÍTULO 2**

### **CNTD2 incrementa la dediferenciación y la resistencia a fármacos en las células cancerígenas**

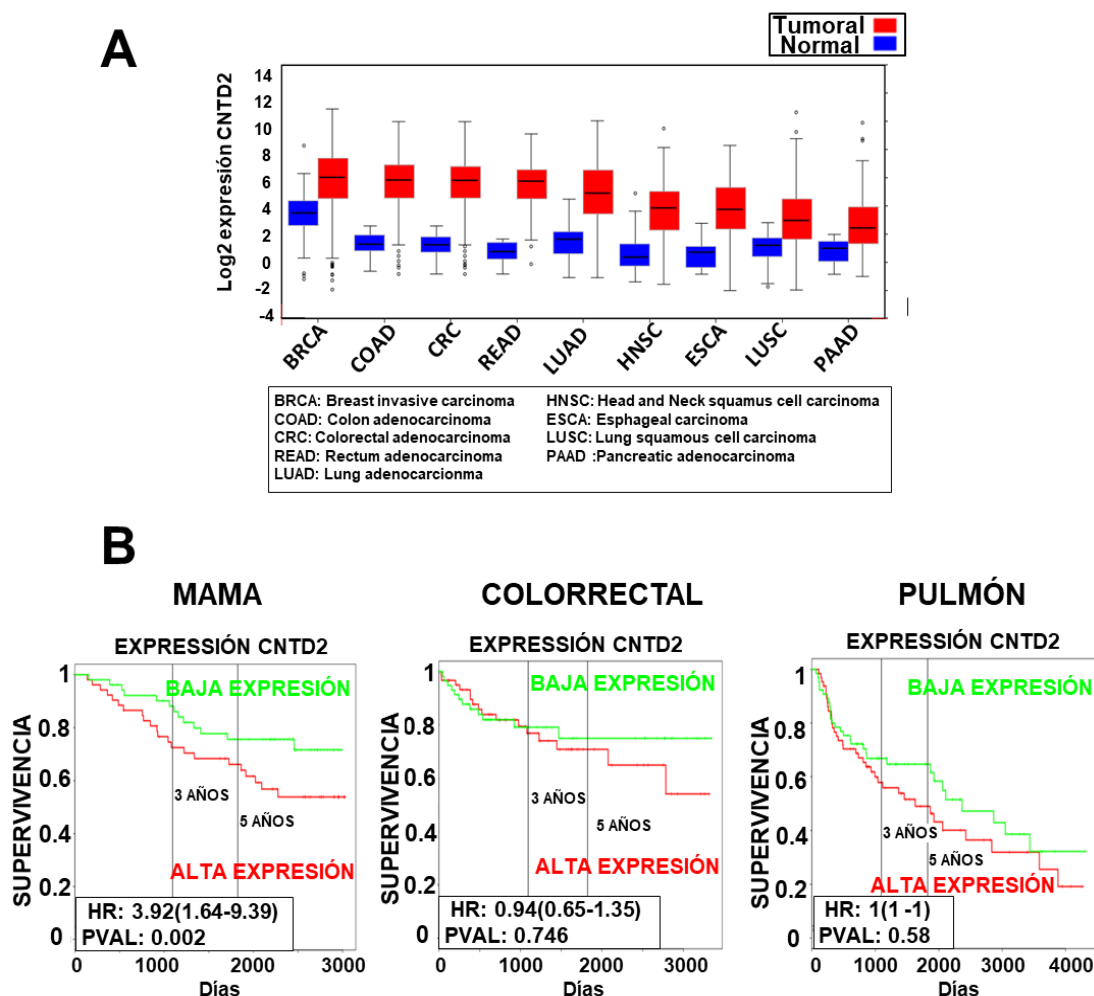


## 1. CNTD2 se encuentra sobreexpresado en varios tipos tumorales

Los resultados previos señalaban a CNTD2 como un posible precursor del cáncer colorrectal (CCR), al encontrarse en niveles elevados en muestras tumorales de pacientes y al ser capaz de incrementar la proliferación y migración de las células *in vitro*. Por este motivo decidimos estudiar si además de en CCR, CNTD2 presentaba una expresión diferencial entre tejido tumoral y sano en otros tipos tumorales. Utilizando la base de datos FIREBROWSE, pudimos comprobar *in silico*, que CNTD2 presentaba diferentes niveles de expresión entre el tejido tumoral y normal en cáncer colorrectal (COAD, CRC, READ), pero también había grandes diferencias en cáncer de mama (BRCA) y cáncer de pulmón (LUAD) (Fig. 19A).

Además de las diferencias entre el tejido tumoral y el sano, al realizar curvas de supervivencia en cada uno de estos cánceres (mama, colorrectal y pulmón) mediante la base de datos PROGgeneV2, pudimos observar como una elevada expresión de CNTD2 suponía un peor pronóstico para los pacientes (Fig. 19B).

Debido a los elevados niveles de expresión de CNTD2, así como su mal pronóstico en pacientes de cáncer de mama, colon y pulmón, decidimos continuar con los estudios en modelos celulares de estos tres tipos de cáncer.



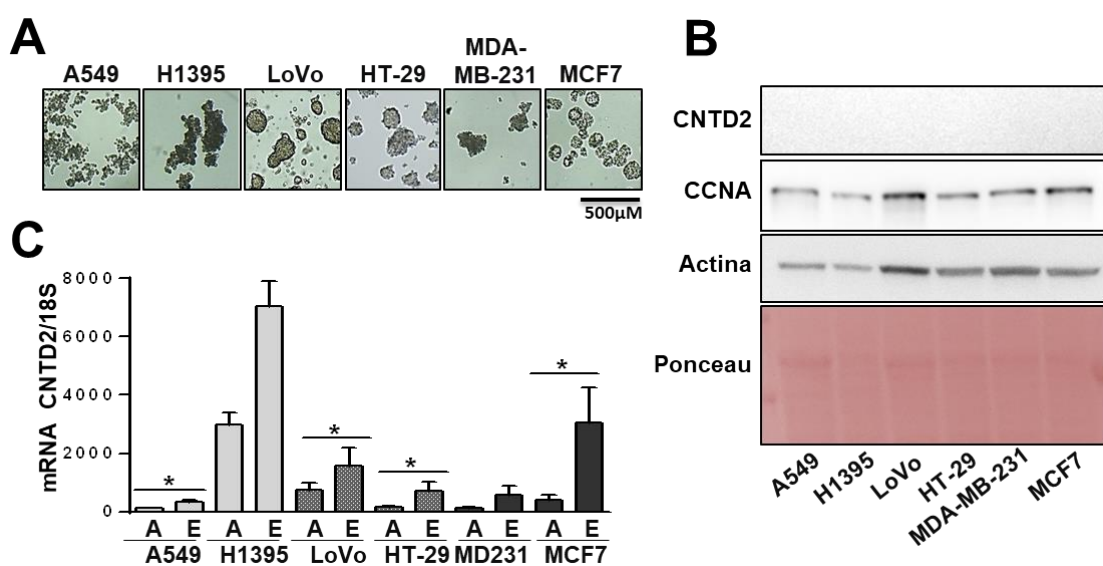
**Figura 19. Expresión diferencial de CNTD2 en tejidos normales y tumorales.** (A) Diferencias en los niveles de expresión de CNTD2 entre el tejido tumoral y el tejido sano adyacente en varios tipos de cancer según la base de datos FIREBROWSE (<http://firebrowse.org/>). (B) Curvas de supervivencia de CNTD2 en los tres tipos de cáncer en los que se expresa más mediante la herramienta PROGgeneV2 y seleccionando las bases de datos GSE42568, n=104 para mama, GSE38832, n=120 para colon y GSE34573, n=130 para pulmón.

## 2. Los niveles de expresión de CNTD2 son mayores en modelos celulares menos diferenciados

Cada vez más evidencias sugieren que muchos tipos de cánceres podrían estar orquestados por la intervención de las células madre cancerígenas (CSCs). Estas células parecen ser responsables de características como la agresividad tumoral y las resistencias a radiación y quimioterapia<sup>119</sup>. Las CSCs son capaces de experimentar *EMT*, característica que permite a las células migrar y producir

metástasis en otros tejidos, por lo que las CSCs se han convertido en un elemento clave para el desarrollo de terapias<sup>121</sup>.

En el anterior capítulo, la sobreexpresión de CNTD2 demostró incrementar la capacidad de *EMT* de células de CCR, por lo que sería interesante determinar si CNTD2 podría tener un papel como inductor de células iniciadoras de tumor, esto es, de CSCs. Basándonos en este antecedente, producimos esferas en suspensión de líneas celulares de cáncer de mama, colon y pulmón y comparamos los niveles de expresión de CNTD2 con sus respectivas células en cultivo adherente (Fig. 20A). Intentamos analizar la expresión de CNTD2 en estas líneas mediante *Western Blot*, pero los niveles de expresión proteica son demasiado bajos para la detección por anticuerpos (Fig. 20B), por lo que decidimos analizarlos mediante *q-RT-PCR* normalizando los valores frente al 18S, *housekeeping* que ha demostrado no variar sus niveles en la comparación de células adherentes y esferas<sup>122</sup> (Fig. 20C).



**Figura 20. La expresión de CNTD2 es mayor en modelos menos diferenciados.** (A) Esferas en suspensión de dos modelos celulares de cada uno de los cánceres con mayor expresión de CNTD2. A549 y H1395 como representación de cáncer de pulmón; LoVo y HT-29 como representación de cáncer colorrectal y MDA-MB-231 como representación de cáncer de mama (B) *Western Blot* de CNTD2 en las líneas celulares anteriores. (C) *Q-RT-PCR* que analiza las diferencias de expresión entre las líneas celulares anteriormente mencionadas cultivadas en adhesión, y cultivadas como esferas en placa de baja adhesión y en medio de desdiferenciación (medio de tumor-esferas). Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes, \*P < 0.05, Adhesión (A) vs esfera (E), Mann-Whitney test.

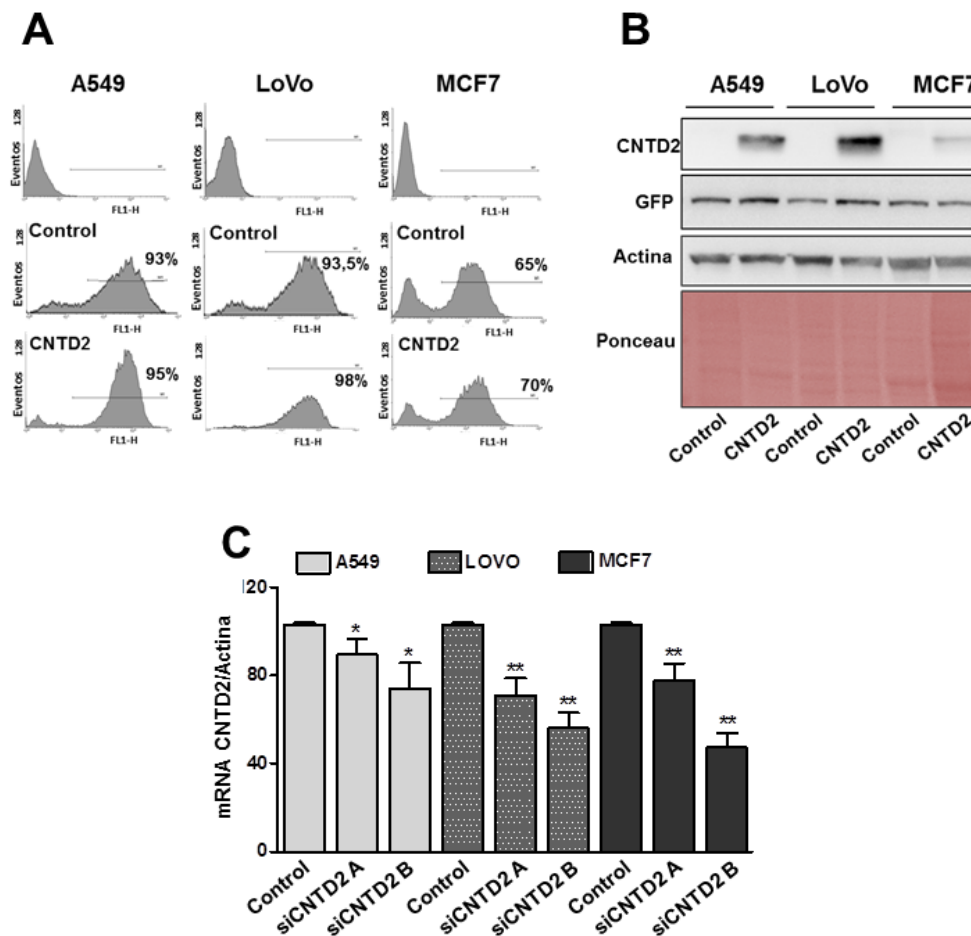


### 3. CNTD2 incrementa el número de esferas.

Dado que la expresión de CNTD2 parecía estar de alguna forma vinculada a células más indiferenciadas, decidimos comprobar si la sobreexpresión de CNTD2 tendría como consecuencia un aumento de la población de CSCs, o si por lo contrario su silenciamiento produciría una reducción de las mismas. Para la realización de estos experimentos se decidió tomar como modelo una línea celular de cada uno de los tres cánceres en los que las diferencias de expresión de CNTD2 entre el tejido tumoral y el normal son más evidentes. Por ello se seleccionaron las líneas A549, como modelo de cáncer de pulmón, LoVo como modelo de cáncer de colon, y MCF7 como modelo de cáncer de mama, que además tenían en común el fondo genético BRAF-.

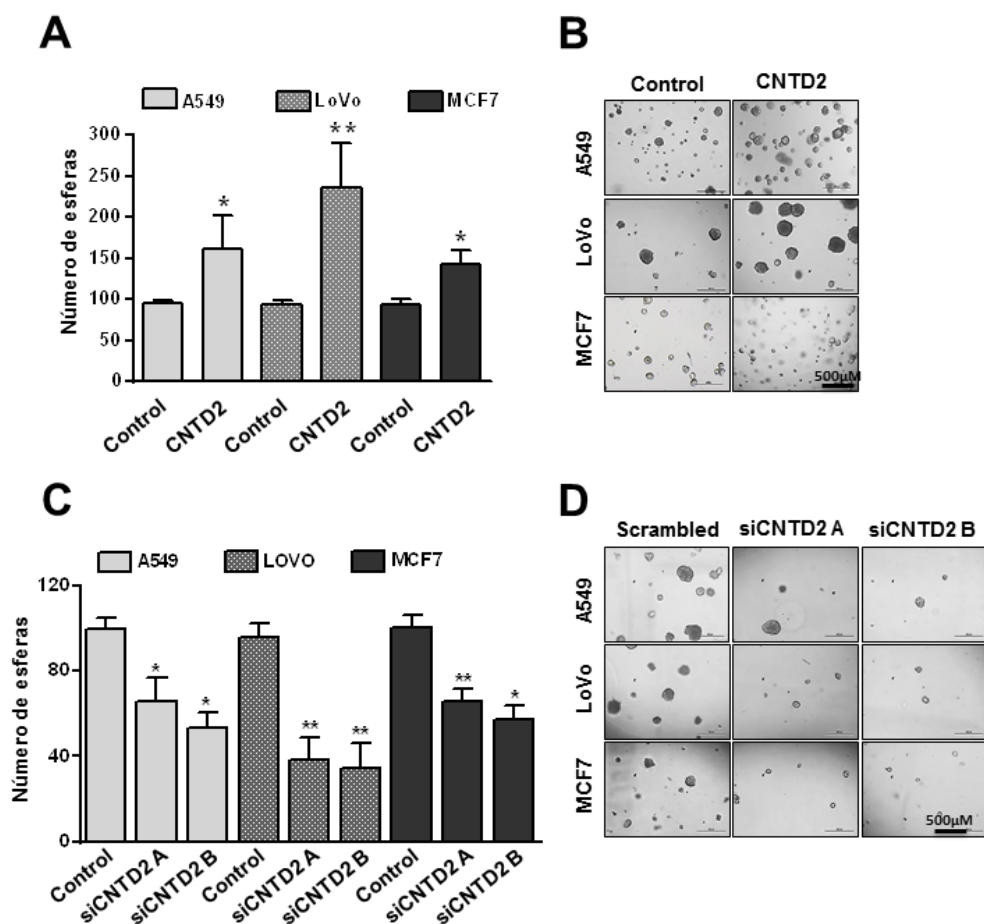
Para los experimentos de sobreexpresión se procedió a infectar las tres líneas celulares con lentivirus vacíos (control) o con el constructo de CNTD2, hasta obtener el mayor porcentaje de infección posible para cada línea celular, sin dañar su fisiología. Se probaron diferentes MOI y finalmente se seleccionaron 20 MOI para A549 y LoVo y 50 MOI para MCF7. El porcentaje de cada infección fue analizado mediante citometría de flujo gracias al GFP reportero del vector lentiviral (Fig. 21A). A continuación se comprobó la expresión de CNTD2 mediante *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-CNTD2 (Fig. 21B).

En cuanto a los experimentos de silenciamiento, se emplearon dos *siRNAs* diferentes (A y B), dirigidos frente a la secuencia de CNTD2. Se emplearon tres concentraciones de ambos *siRNAs* (10nM, 30nM y 50nM) durante 72h y se seleccionó la mejor concentración (50nM) para los experimentos. El silenciamiento de CNTD2 fue monitorizado mediante qRT-PCR (Fig. 21C).



**Figura 21. Sobreexpresión y silenciamiento de CNTD2.** (A) Las células A549, LoVo y MCF7 fueron infectadas con el vector lentiviral vacío (control) o con CNTD2, y se analizó la eficiencia de infección mediante citometría de flujo. (B) El análisis por *Western Blot* de las células infectadas confirma la correcta sobreexpresión de CNTD2. (C) CNTD2 fue silenciado en A549, LoVo y MCF7 con las secuencias de *siRNA* A y B a 50nM durante 72h y la disminución de la expresión de CNTD2 fue monitorizada mediante *q-RT-PCR*. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes, \* $P < 0.05$  vs scrambled, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del *scrambled*

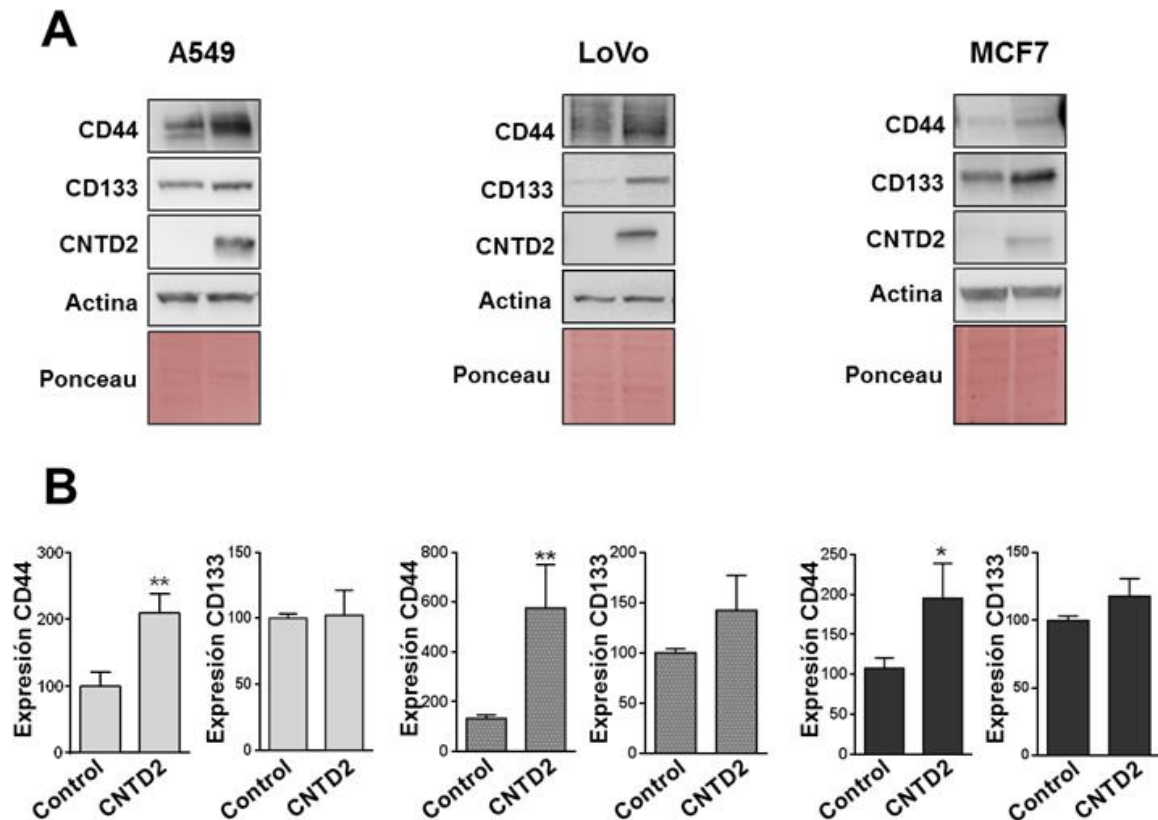
Tras la sobreexpresión o el silenciamiento de CNTD2 en las tres líneas celulares se procedió a la siembra de las mismas en condiciones de dediferenciación. Para el enriquecimiento de CSCs de los cultivos en adhesión, se contaron las células y se embebieron en Matrigel con el objetivo de generar una matriz en la que se pudiera evitar su adhesión y facilitar el posterior conteo de las esferas generadas. Además del Matrigel, se añadió medio de dediferenciación libre de suero y rico en factores de crecimiento. La sobreexpresión de CNTD2 generó un mayor número de esferas en las tres líneas celulares (Fig. 22A y 22B), y el silenciamiento de CNTD2, fue capaz de reducir significativamente el crecimiento de las esferas (Fig. 22C y 22D).



**Figura 22. CNTD2 incrementa la formación de CSCs en tres tipos de cáncer.** (A) Efecto de la sobreexpresión de CNTD2 en la formación de esferas. Las líneas celulares fueron infectadas con el lentivirus vacío o con CNTD2 y posteriormente fueron sembradas en Matrigel y suplementadas con medio de tumor-esferas. Tras 10 días de cultivos se contaron las esferas bajo el microscopio de contraste de fases. (B) Imágenes representativas del efecto de la sobreexpresión. (C) Efecto del silenciamiento de CNTD2 mediante las secuencias A y B a 50nM durante 72h. En ambos casos las columnas representan la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes realizados en triplicado, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control. (D) Imágenes representativas del efecto del silenciamiento.

#### 4. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la expresión de marcadores de CSCs

Numerosos artículos advierten de la importancia del reconocimiento de las CSCs en cáncer y han relacionado la expresión de determinados marcadores de membrana como CD44 y CD133 con la presencia de las mismas<sup>96</sup>. La sobreexpresión de CNTD2, además de aumentar el número de esferas, fue capaz de incrementar significativamente el marcador de *stemness* CD44, y sólo parcialmente el marcador CD133 en A549, LoVo y MCF7 en cultivos en adhesión (Fig. 23).



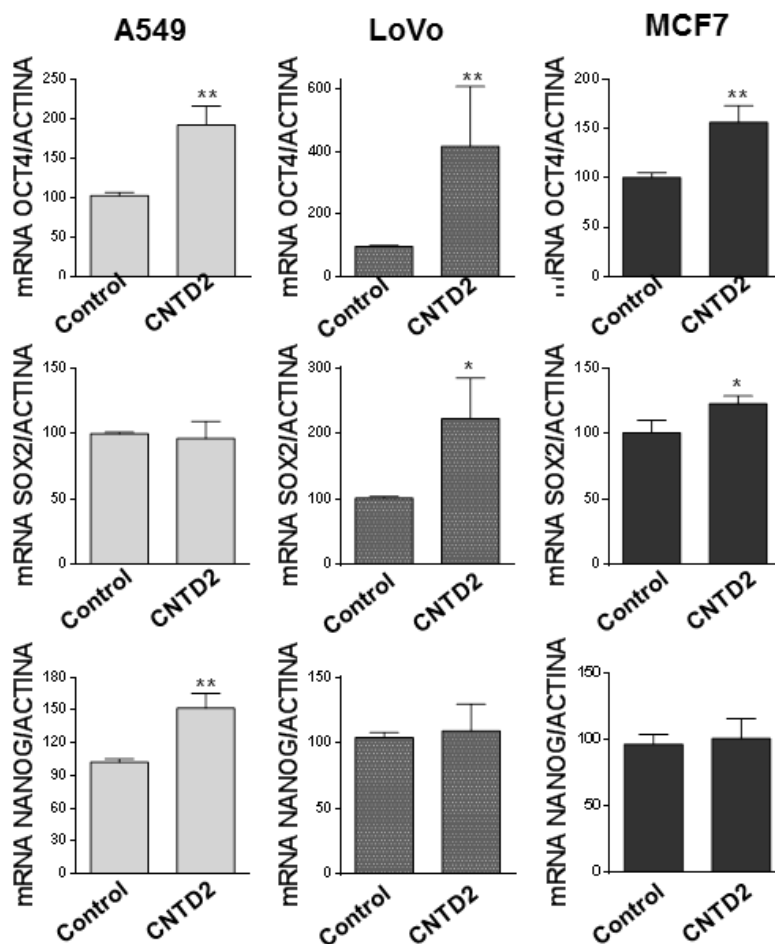
**Figura 23. CNTD2 incrementa la expresión de CD44.** (A) Se analizó la expresión de los marcadores de stemness CD44 y CD133 en líneas adherentes para determinar si la sobreexpresión de CNTD2 producía un aumento en la población positiva para los mismos. (B) Los niveles de expresión fueron cuantificados con el programa LI-COR Image Studio Software y normalizados con Ponceau. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de diez experimentos independientes of, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

### 5. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la expresión de marcadores de pluripotencia.

Además de los marcadores de *stemness* como CD44 y CD133, se ha estado estudiando si los factores de inducción de pluripotencia, como SOX2, OCT4 y NANOG podrían influir en la generación de *CSCs*. Recientemente se ha demostrado que estos factores aparecen altamente expresados en diversos cánceres, y se han relacionado con las capacidades de desdiferenciación de los mismos<sup>123</sup>. Para investigar si estos factores veían alterada su expresión con la sobreexpresión de CNTD2, partimos de la población enriquecida en *CSCs*, ya que son las únicas células dentro de la heterogeneidad tumoral que expresan

## RESULTADOS

estos marcadores y analizamos los niveles de OCT4, SOX2 y NANOG mediante q-RT-PCR (Fig. 24). En las tres líneas tumorales estudiadas se produjo un aumento significativo de los niveles de expresión de OCT4 tras la sobreexpresión de CNTD2. Además, en el caso de las LoVo y las MCF7, SOX2 también vio aumentados sus niveles, y únicamente en A549, NANOG incrementó.

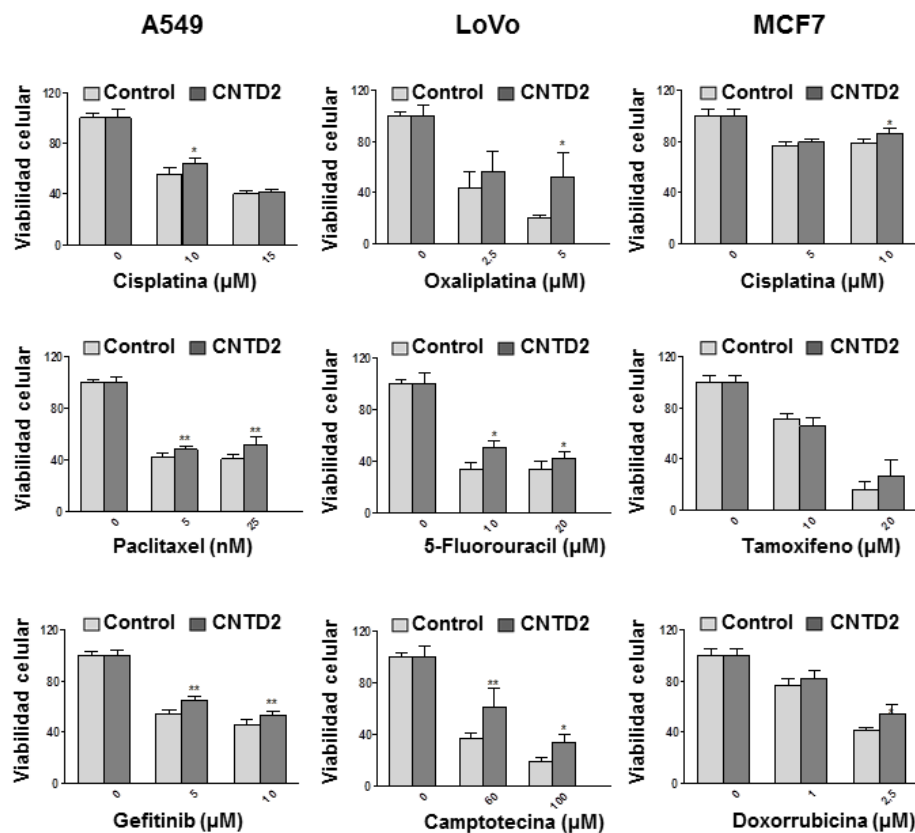


**Figura 24. CNTD2 incrementa la expresión de marcadores de pluripotencia en esferas.** Las líneas infectadas con lentivirus vacíos o sobreexpresando CNTD2 fueron sembradas en suspensión en condiciones de dediferenciación. Tras 7 días de cultivo se analizaron en las CSCs resultantes los niveles de expresión de OCT4, SOX2 y NANOG por q-RT-PCR y se normalizaron con actina. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes realizados en triplicado, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

## 6. La sobreexpresión de CNTD2 otorga resistencia a fármacos a través de transportadores ABC.

Otra consecuencia de los procesos de *EMT* y de la aparición de *CSCs* es que en ambos casos juegan un papel esencial durante el desarrollo de resistencia a fármacos, y encontrar las bases moleculares responsables de estos procesos se ha convertido en primordial para desarrollar nuevas terapias frente al cáncer<sup>124</sup>.

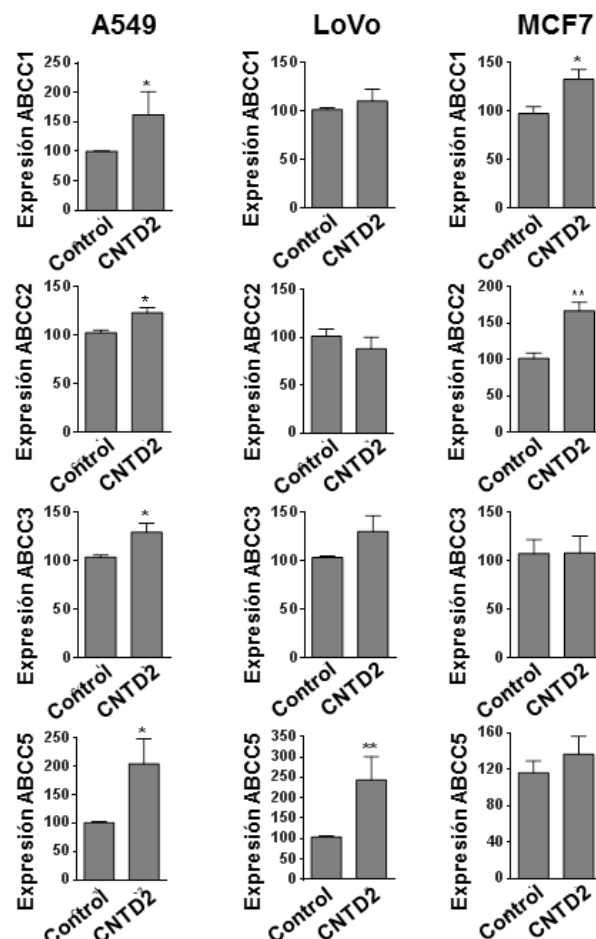
Con el fin de explorar si CNTD2 podía inducir algún tipo de resistencia a quimioterapéuticos, se trataron las tres líneas celulares representantes de cada tipo tumoral (pulmón, colon y mama) con diferentes fármacos y concentraciones durante 72h (Fig. 25). La sobreexpresión de CNTD2 pareció otorgar cierta resistencia a los diferentes fármacos dado que las células A549 y LoVo que sobreexpresaban CNTD2 presentaban mayor viabilidad que el control. En el caso de las MCF7 había una tendencia a incrementar la viabilidad con CNTD2, pero esta solo fue significativa ante el tratamiento con cisplatina.



**Figura 25. La sobreexpresión de CNTD2 otorga mayor viabilidad tras el tratamiento con fármacos.** Las células A549, LoVo y MCF7 infectadas con el vector vacío o con CNTD2 fueron tratadas con diferentes concentraciones de fármacos durante 72h, y los niveles de viabilidad celular se analizaron por MTT. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes realizados en triplicado, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

## RESULTADOS

Uno de los principales mecanismos de resistencia a fármacos es producido por un incremento de eflujo a través de las membranas celulares gracias a una serie de transportadores, como los pertenecientes a la familia *ABC*. Tanto la *EMT* como la expresión de marcadores de *stemness* han sido relacionados con un aumento de estos transportadores<sup>125</sup>. A continuación decidimos analizar si la resistencia mostrada hacia los fármacos se podía relacionar con un aumento en la expresión de algún transportador de membrana de la familia *ABC*. Para ello se analizaron por *q-RT-PCR* los transportadores *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* y *ABCC5*, en las líneas infectadas con el lentivirus vacío o *CNTD2* (Fig. 26), al ser que presentan alteraciones más frecuentemente en las resistencias a los fármacos que utilizamos (Tabla 3).

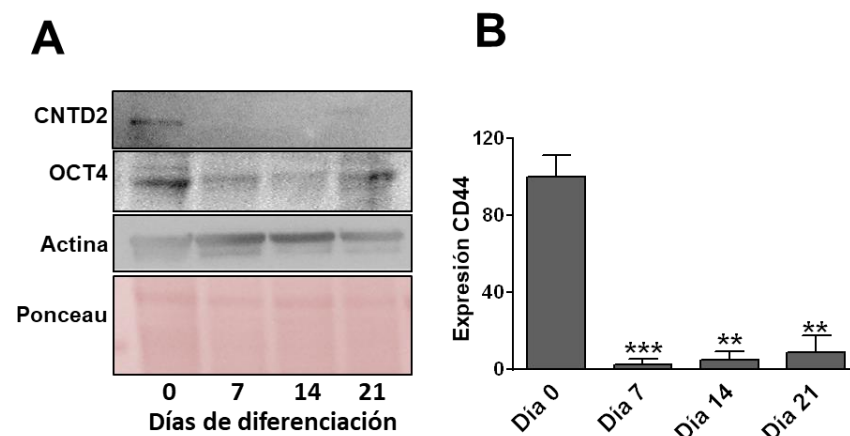


**Figura 26. La sobreexpresión de *CNTD2* incrementa la expresión de transportadores *ABC*.** Se analizaron mediante *q-RT-PCR* las expresiones de 4 transportadores de la familia *ABC* comúnmente implicados en la resistencia a fármacos: *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* y *ABCC5*, y comparamos su expresión entre las células A549, LoVo y MCF7 infectadas con el vector vacío o con *CNTD2*. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes realizados en triplicado, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. Los resultados se representan como porcentaje del control.

La sobreexpresión de CNTD2 supuso un incremento en los transportadores ABCC1 y ABCC2 en células A549 y MCF7, mientras que ABCC3 y ABCC5 se incrementaron en A549 y LoVo.

### 7. CNTD2 se expresa en células pluripotentes y disminuye con la diferenciación.

CNTD2 es una proteína que a pesar de estar altamente expresada en tejidos tumorales, no aparece ni en líneas celulares ni en tejidos sanos del organismo, con excepción del sistema nervioso central. Los resultados de este proyecto muestran claras evidencias de que CNTD2 no solo juega un papel en cáncer, sino que lo hace a través de la inducción de *stemness*. Para confirmar esta hipótesis, quisimos averiguar si CNTD2 podría aparecer en algún modelo fisiológico que estuviera relacionado con la desdiferenciación. Para ello empleamos un modelo de células pluripotentes obtenidas de la pulpa dental (*Dental pulp pluripotential stem cells, DPPSCs*), tratadas con factores de diferenciación a osteoclasto a 0, 7, 14 y 21 días. De cada uno de estos días se extrajeron las proteínas y se realizó un *Western Blot*. CNTD2 apareció en las *DPPSCs* a día 0, y perdió por completo su expresión con el proceso de diferenciación (Fig. 27).

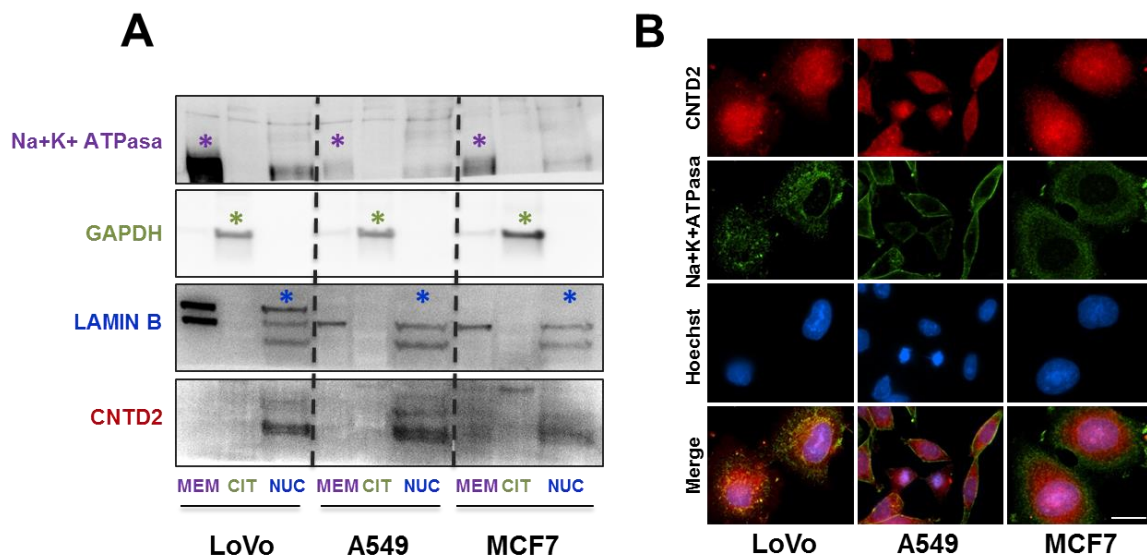


**Figura 27. CNTD2 se expresa en células pluripotentes.** (A) Western Blot de *DPPSCs* diferenciadas a osteoclasto durante 21 días. (B) Cuantificación mediante el programa LI-COR y normalización con Ponceau. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs Dia 0, T-student test. Los resultados se representan como porcentaje del control.



**8. CNTD2 se encuentra en el núcleo de las células tumorales**

Hasta este momento no había sido posible la detección de los niveles proteicos de CNTD2 en ninguna línea celular mediante Western Blot, pero varios indicios señalaban que CNTD2 podría estar localizado en el núcleo. Por este motivo decidimos explorar esta posibilidad mediante el fraccionamiento de las tres líneas celulares (A549, LoVo y MCF7) mediante un kit comercial. La primera fracción correspondiente al citoplasma podía ser detectada por la presencia de GAPDH. La segunda fracción, que correspondía a las proteínas de membrana, se identificó por la presencia de la bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa. Finalmente el contenido nuclear y las proteínas unidas a *DNA*, se encontraron en la tercera fracción, reconocible por la presencia de Lámina B. El análisis de las fracciones mostró que CNTD2 se encontraba localizado en el núcleo de las células tumorales (Fig. 28A). Estudios preliminares de la localización de CNTD2 mediante inmunofluorescencia han corroborado estos resultados (Fig. 28B).



**Figura 28. CNTD2 se encuentra en el núcleo de las células tumorales.** (A) Fraccionamiento celular de las líneas A549, LoVo y MCF7 que permitió concentrar los niveles de CNTD2 en la fracción nuclear. (B) Inmunofluorescencia de A549, LoVo y MCF7 donde se comprueba que la proteína CNTD2 se localiza principalmente en el núcleo. Escala 20µm.





# **DISCUSIÓN**

---



Durante los últimos años, el principio de que el cáncer es una “enfermedad de genes” ha transformado la visión sobre el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad<sup>126</sup>. En la evolución del cáncer, la heterogeneidad intra-tumoral e inter-tumoral están directamente correlacionadas con las diferencias en las posibilidades de éxito a la hora de derrotar a la enfermedad<sup>29</sup>.

A pesar de los avances en diagnóstico y nuevas terapias, muchos pacientes de cáncer recaen tras los tratamientos y desarrollan metástasis, lo que se traduce en pronósticos pobres y baja supervivencia<sup>127,128</sup>. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia de nuevos estudios que tengan como fin profundizar más en las bases moleculares de esta enfermedad y así permitir la identificación de nuevos factores predictivos y pronósticos, así como nuevas dianas terapéuticas.

### **¿Las nuevas ciclinas están sobreexpresadas en CCR?**

En esta tesis doctoral se realizó un análisis de la expresión de seis nuevas ciclinas en tejidos de CCR, el cual reveló que algunas se encontraban sobreexpresadas y podían tener una implicación en el desarrollo y progresión del CCR. De esta forma, la expresión de las ciclinas CCNO y CNTD2 apareció incrementada en el tejido tumoral frente al tejido sano de los pacientes (Figs. 10B y 10C).

### **CCNO**

La sobreexpresión de CCNO no incrementa el número de células LoVo y HT-29, a pesar de presentar mayores niveles del marcador de proliferación ki-67 (Fig. 12B y 12E). Estos resultados podrían indicar que la proliferación desregulada puede estar produciendo una mayor mortalidad celular, por ejemplo, debido a un incremento de la apoptosis. Sin embargo, la sobreexpresión de CCNO tanto en las células LoVo como en HT-29 no produce un aumento significativo de Caspasa-9 (resultados no mostrados). Por lo tanto, quizá sería necesario evaluar otro tipo de marcadores de apoptosis tal y como sugiere el trabajo de Roig *et al*<sup>47</sup>, en el que se describe el papel fisiológico de CCNO en células linfoides, donde es capaz de inducir apoptosis mediante la activación de

la Caspasa-3 y sin alterar el ciclo celular.

Por otro lado, de acuerdo a la base de datos Kaplan-Meier Plotter, la sobreexpresión de CCNO está correlacionada con una reducción en la supervivencia de pacientes de cáncer de pulmón y mama (datos no mostrados), lo que sustenta que el papel de CCNO puede ser dual, como ocurre con otros reguladores de ciclo<sup>129</sup>. Por tanto, aunque algunos datos pueden señalar a CCNO como un potencial oncogén, son necesarios más estudios para dilucidar el papel molecular de esta ciclina.

## **CNTD2**

En esta tesis también se muestra, por primera vez, que la ciclina CNTD2 se encuentra acumulada en muestras de CCR (Figs. 10B-10D). Este resultado ha pasado indetectable en otros análisis transcriptómicos y proteómicos<sup>130</sup>, lo que llevaría a la pregunta de por qué el papel de este gen no ha sido puesto de manifiesto hasta ahora. Como posibles respuestas, en primer lugar cabe tener en cuenta que la baja expresión y estabilidad de las ciclinas suele ser un factor limitante para la detección mediante análisis proteómicos<sup>131</sup>, lo que explicaría que CNTD2 en particular también haya pasado desapercibida. Con respecto a los análisis transcriptómicos hay que tener en cuenta que las ciclinas tienen generalmente una regulación postranscripcional, lo que hace que el incremento de la expresión de muchas ciclinas no sean detectada apropiadamente<sup>132</sup>. Por último y no menos importante, CNTD2 es un gen que fue anotado recientemente<sup>133</sup>, lo cual ha impedido su detección en muchos de los estudios *high-throughput*, sencillamente porque no figuraba en las bases de datos; es más, actualmente sigue sin figurar anotado en el genoma de *Mus musculus* y de otros organismos (probablemente el alto contenido en C/G podría explicar el por qué esta zona haya tenido tantas dificultades de secuenciación y anotación (Gasa *et al.* datos no publicados)). En definitiva, hasta ahora CNTD2 no había sido incluido en la mayoría de los análisis de *microarray* y únicamente con el desarrollo de la tecnología RNA-seq, que permite identificar transcritos no anotados, se ha comenzado a monitorizar.

## ¿Es CNTD2 un oncogén?

Son interesantes los diferentes indicios que podrían apuntar a esta ciclina como un nuevo oncogén. En primer lugar, CNTD2 se expresa más en tejidos tumorales que en tejidos sanos. Este hecho ocurre tanto en pacientes de CCR como hemos indicado anteriormente, como en pacientes de cáncer de pulmón tal y como nuestro grupo ha publicado recientemente (Gasa *et al*, 2017)<sup>44</sup>. Además, otros autores como Haan *et al*, presentaron un análisis genómico de pacientes con CCR metastásico en el que CNTD2 aparecía entre los genes más frecuentemente amplificados en varios tipos de tumores<sup>29</sup>. Por último, son varias las bases de datos las que apoyan estos resultados: según *FIREBROWSE*, el análisis diferencial de la expresión de CNTD2 entre muestras tumorales y sanas revela diferencias en pacientes de cánceres de pulmón, mama, colon, cabeza y cuello o esófago (Fig. 19), y la base de datos *cBioPortal for Cancer Genomics* señala que las alteraciones genéticas que aparecen en CNTD2 en diferentes tipos de tumor, son en su gran mayoría amplificaciones. Por supuesto que la mera sobreexpresión de un gen no tiene por qué significar una relación causa-efecto en la aparición de una enfermedad. Sin embargo, el hecho que la expresión de CNTD2 se encuentre alterada en tumores tan diferentes, sugiere que la desregulación de este gen podría ser un requisito común para el inicio de la oncogénesis.

Además, en esta tesis se pone de manifiesto por primera vez el papel de CNTD2 en la proliferación de CCR. La sobreexpresión de CNTD2 induce el crecimiento celular, la capacidad formadora de colonias y la expresión del marcador de proliferación ki-67 en células HT-29 y LoVo (Fig. 12), así como el crecimiento tumoral *in vivo* (Fig. 16). Así mismo, el silenciamiento de CNTD2 en LoVo reduce significativamente el número de células (Fig. 18A y B). Curiosamente ningún otro estudio hasta ahora ha demostrado la implicación de CNTD2 en la proliferación celular, a excepción de la publicación de nuestro grupo en cáncer de pulmón<sup>44</sup>.

Finalmente, la tercera característica que tiene que tener un oncogén es la capacidad de diseminación<sup>134</sup>. En este trabajo se ha mostrado que CNTD2 induce



la diseminación de líneas celulares de cáncer de colon pero, además, recientemente se ha demostrado que esta propiedad de CNTD2 también aparece en líneas celulares de pulmón<sup>44</sup> y no sólo eso: las metástasis en hígado presentan niveles de expresión de CNTD2 más altos que tumores primarios dentro del mismo paciente<sup>135</sup>.

Con todos estos datos, y teniendo en cuenta que la expresión de CNTD2 tiene un efecto negativo para los pacientes según las curvas de supervivencia de algunos cánceres como mama, colon y pulmón (Fig. 19B), propongo a CNTD2 como un nuevo oncogén independiente de un tipo tumoral concreto.

### **¿CNTD2 participa en la EMT?**

Aproximadamente el 90% de los cánceres aparecen en tejidos epiteliales, y sin embargo la primera causa de muerte es la diseminación de las células tumorales a los órganos distantes<sup>136</sup>. La *EMT* permite a las células perder las uniones que las anclan al tejido epitelial y viajar para invadir otros tejidos, por lo que ha demostrado ser un proceso necesario en la invasión y metástasis tumoral<sup>33</sup>.

La sobreexpresión de CNTD2 incrementa el número de colonias capaces de crecer independientes de anclaje en *soft-agar*, y disminuye la expresión de E-cadherina en células LoVo (Fig. 15C), resultado que apoya a los obtenidos en cáncer de pulmón<sup>44</sup>. Los niveles de vimentina no sufren cambios significativos, pero cada vez más autores defienden la idea de que dentro de un tumor hay células a diferentes niveles de *EMT* porque es un proceso de transición y todos ellos pueden producir metástasis<sup>137</sup>. En cada uno de los estadios predominan diferentes marcadores de *EMT*, y mientras que la E-cadherina suele estar presente en etapas tempranas, la vimentina es más frecuente en etapas intermedias<sup>137</sup>, por lo que nuestros resultados podrían indicar que CNTD2 induce los estadios tempranos de la *EMT*, en los cuales la disminución de E-cadherina es particularmente importante<sup>88</sup>.

### **¿El efecto de CNTD2 depende del fondo genético?**

La sobreexpresión de CNTD2 genera tumores de mayor tamaño derivados de las células LoVo *in vivo* (Figs. 16A y 16B) y, sin embargo, en los ratones xenógrafos inoculados con HT-29 se observa el efecto contrario (Figs. 16D y 16E). Aunque diversas variables podrían contribuir a estas diferencias, existe una característica destacable de gran relevancia clínica, y es que ambas líneas difieren en el estatus de BRAF: mientras que las células LoVo son BRAF<sup>-</sup>, las células HT-29 son BRAF<sup>+</sup>. Este resultado parece concordar con la tendencia encontrada en los datos clínicos obtenidos a partir de RNA, en los que, la sobreexpresión de CNTD2 en pacientes de CCR podría promover diferentes resultados en la supervivencia de los pacientes en función del estatus del gen BRAF (Fig. 17). Sin embargo, dado el bajo número de pacientes evaluados, serían necesario estudios con una cohorte mayor y en los que se monitorizara el nivel de proteína para sacar conclusiones más robustas.

BRAF es una de las quinasas que más frecuentemente aparece mutada en cáncer<sup>77</sup>. Forma parte de la vía de ERK, y al encontrarse mutada en el V600E se encuentra constitutivamente activa<sup>138</sup>, por lo que estos pacientes cuentan con un mal pronóstico y resistencia a los tratamientos convencionales.

Hasta ahora no se ha descrito ninguna proteína que mejore las expectativas de vida en un fondo genético BRAF<sup>+</sup>, por lo que la observación de que CNTD2 actúa aumentando la supervivencia de los pacientes en este contexto, constituye un nuevo camino para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a los cánceres BRAF<sup>+</sup>, que en la actualidad son bastante limitadas<sup>77</sup>.

El mecanismo por el cual CNTD2 tiene esta doble acción dependiendo del estatus de BRAF no está claro. El “principio Goldilocks”, la idea de que ciertos factores biológicos han de estar estrictamente controlados, ha sido sugerido para explicar la señalización RAF, ya que dependiendo de sus niveles de expresión puede desencadenar la progresión del ciclo celular, o bien su arresto<sup>139</sup>. Además, la hiperactivación de la vía de las MAPK ha demostrado inducir la activación de los supresores tumorales p16 y p19<sup>140</sup>. Por tanto, se podría especular que CNTD2 podría ejercer su acción oncogénica mediante la activación de la vía MAPK, y

que este efecto en células BRAF+, que ya muestran una desregulación en la señalización inducida por las MAPK, podría sobrecargar al sistema y finalmente conducir a la célula a parar su división a través de la activación de supresores tumorales. Sin embargo, parece evidente que es necesario un conocimiento más profundo de esta nueva ciclina para poder llegar a comprender esta dualidad y trasladarlo en una nueva estrategia terapéutica para pacientes con cánceres BRAF+. En este sentido, si bien las estrategias tradicionales se basan en la inhibición de una proteína diana, en algunos casos como en éste, no parece la aproximación más adecuada, y algunos grupos de investigación están trabajando para lograr una mayor activación del objetivo farmacológico, que finalmente conllevaría a un beneficio terapéutico<sup>139</sup>.

### **¿CNTD2 promueve el desarrollo tumoral mediante la inducción de la desdiferenciación?**

Uno de los componentes mayoritariamente involucrados en el desarrollo, la diversidad y la agresividad tumoral son las CSCs: una subpoblación de células desdiferenciadas con características mesenquimales<sup>91,92</sup>. Considerando que la inducción de la *EMT* en las células cancerígenas resulta en la adquisición de propiedades invasivas, metastáticas y de resistencia a fármacos, cada vez más evidencias sugieren que la emergencia de CSCs se debe en parte a la *EMT*<sup>136</sup>. Al comparar los modelos celulares en adhesión de cáncer de pulmón, colon y mama con sus respectivas esferas se observa un incremento significativo de la expresión de CNTD2 en las condiciones de desdiferenciación (Fig. 20C), y de acuerdo a resultados anteriores, estas diferencias fueron mayores en las líneas celulares con un fondo genético BRAF- comparadas con las BRAF+. Además la sobreexpresión de CNTD2 incrementa el número de esferas, mientras que su silenciamiento produce una disminución (Fig. 22). Estos resultados nos estarían indicando, en primer lugar que CNTD2 tiene una mayor expresión en células más indiferenciadas, lo cual está en consonancia con el hecho de que se exprese en células pluripotentes y pierda su expresión a medida que éstas se diferencian (Fig. 27), y por otro lado, que CNTD2 es necesario para la formación de CSCs.

El hecho de que la sobreexpresión de CNTD2 induzca la expresión de los marcadores de *stemness* CD44 y CD133 en las tres líneas celulares en adhesión concuerda con las observaciones de diversos autores, los cuales defienden la necesidad de que se produzca un incremento en marcadores mesenquimales y de pluripotencia para que se produzca el desarrollo de las CSCs<sup>35-38</sup>. Teniendo en cuenta que en los cultivos en adhesión sólo un pequeño porcentaje de la población está desdiferenciada, pequeños cambios en la expresión de marcadores de *stemness* pueden conllevar importantes aumentos en la población de CSCs. Además también aumentan los niveles del marcador de pluripotencia OCT4 en las CSCs de las tres líneas y Sox2 en dos de ellas (Fig. 24).

Estos resultados muestran un nuevo papel descrito por primera vez para CNTD2 en la desdiferenciación celular y ahora se requieren más estudios para aclarar los mecanismos subyacentes a estas acciones. Por una parte, diversos autores han demostrado la implicación de algunos complejos CDKs-ciclinas en la regulación de la diferenciación celular<sup>141</sup>, como CCNA, CCND, CCNC<sup>4</sup>, e incluso la nueva ciclina CCNY<sup>142</sup>. Hasta ahora se consideraba que cada complejo CDK-ciclina debía estar activo en un punto concreto para permitir la progresión a lo largo del ciclo, y por tanto, la inactivación de cualquiera de ellos provocaría el bloqueo en esa fase<sup>143</sup>. Sin embargo, Liu *et al*<sup>144</sup> han desafiado este dogma recientemente, y demuestran que dependiendo del modelo celular, y concretamente en células embrionarias de ratón (mESCs) las ciclinas de G1 no son esenciales para la progresión del ciclo, y en cambio, son completamente primordiales para el mantenimiento de la pluripotencia ya que regulan la fosforilación de Nanog, OCT4 y Sox2<sup>144</sup>. Además el concepto de ciclicidad no es tan absoluto, ya que se ha demostrado que las mESC expresan constitutivamente CDK2 a lo largo del ciclo, y esto está ligado a la expresión constitutiva de las ciclinas E y A, que permiten el mantenimiento de la *stemness*<sup>145</sup>. Por otro lado, el mantenimiento de la pluripotencia en G2 está relacionado con la sobreexpresión de la ciclina B1 y la consecuente activación de la vía TGF- $\beta$ <sup>146</sup>. Dado que la mayoría de estos resultados se han obtenido a partir de células madre embrionarias, neurales o hematopoyéticas, pero sería interesante clarificar si el

efecto de CNTD2 en la desdiferenciación celular está relacionado con el ciclo celular, ya sea de forma individual o asociado a una CDK. A este respecto, y teniendo en cuenta que CNTD2 presenta una *cyclin box*, sería razonable esperar que interaccionase con una CDK aunque hasta ahora no ha sido posible identificarla ni mediante ensayos de doble híbrido ni de *trapping* (Quandt *et al*, resultados no publicados).

Sin embargo, CNTD2 guarda ciertas similitudes con el marcador de pluripotencia OCT4 tales como que tiene un papel crucial en la autorenovación y mantenimiento de la pluripotencia, es usado como marcador de CSCs, tiene una localización nuclear y su expresión otorga a las células tumorales un comportamiento más agresivo<sup>97,98</sup>. Además el hecho de que CNTD2 solo pueda ser detectado mediante tratamiento con DNAsas (Fig. 28A) podría sugerir que se encuentra unido al DNA, y resultados no publicados de nuestro grupo de investigación demuestran que interacciona con una proteína del complejo mediador, en concreto MED23. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de CNTD2 incrementa la de OCT4, que ambos parecen necesarios para la formación de CSCs, y que los dos tienen una localización nuclear, podría plantearse la hipótesis tentativa de que CNTD2 es un factor de transcripción que podría estar activando a OCT4, o como se ha mencionado anteriormente, CNTD2 podría activar de manera indirecta a OCT4 a través de ERK<sup>147</sup>, al igual que el marcador de stemness CD44, aunque no se pueda descartar su participación en otras rutas tales como Wnt, mTOR y NFκβ<sup>148-150</sup>.

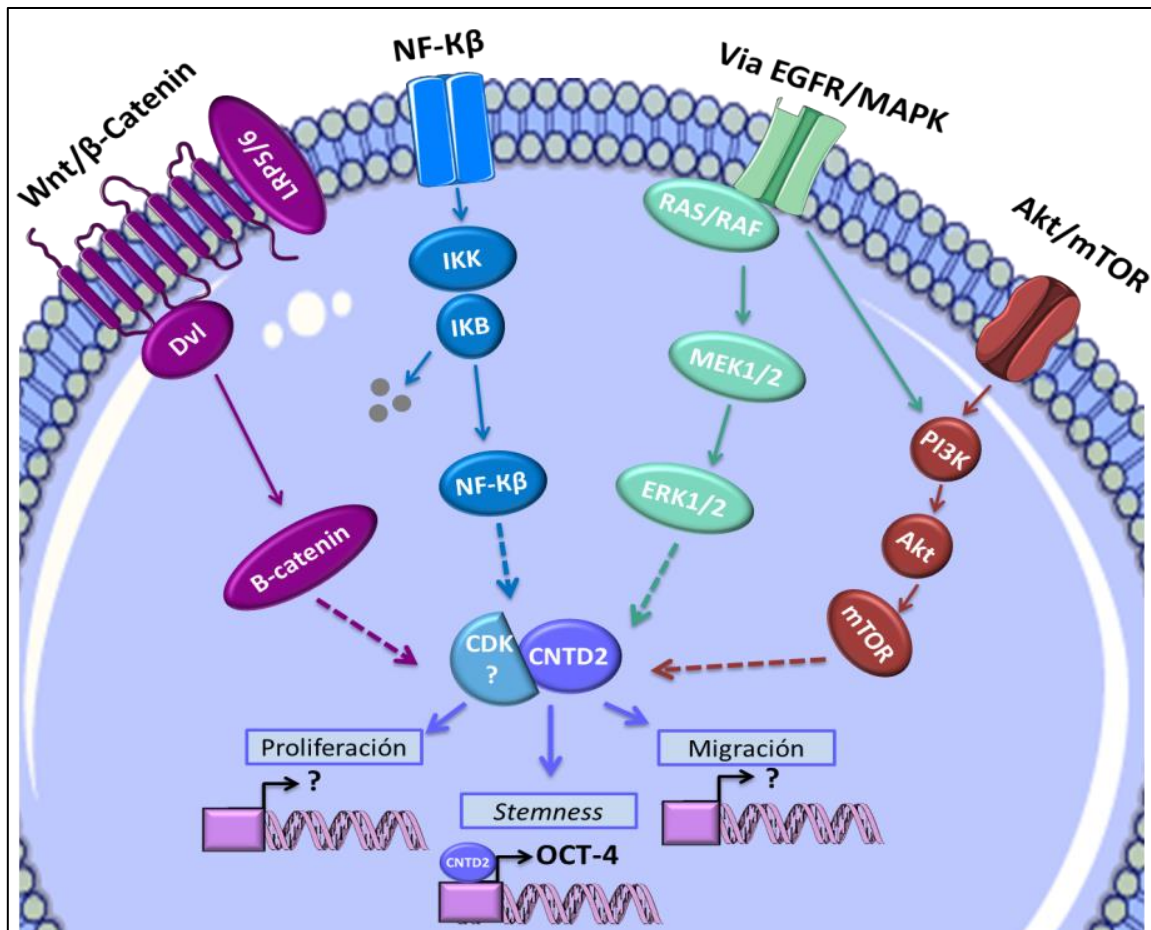


Figura 29. Posibles vías de actuación de CNTD2.

### ¿CNTD2 induce multiresistencia a fármacos?

Una característica de las CSCs es que son capaces de inducir la multiresistencia a los fármacos<sup>149</sup> y la sobreexpresión de CNTD2 también induce esta propiedad (Fig. 25). Este resultado condujo al estudio del efecto de CNTD2 sobre la expresión de varios miembros de la familia de transportadores ABC, cuya expresión se vio incrementada (Fig. 26). En el caso de cáncer de pulmón, la sobreexpresión de CNTD2 produjo un aumento de los transportadores de membrana ABCC1, ABCC2, ABCC3 y ABCC5. El incremento de transportadores ABCC1 explicaría la multiresistencia a paclitaxel, cisplatina y gefitinib, ABCC2 la resistencia a paclitaxel y cisplatina y ABCC3 a cisplatina. En el caso de cáncer de colon, se alteró la expresión los transportadores ABCC3 y ABCC5, que median el eflujo de 5-Fluorouracil. Finalmente, en el caso de las células de cáncer de mama, la sobreexpresión de CNTD2 condujo al aumento de los transportadores ABCC1 y ABCC2, responsables de la multiresistencia a

cisplatina, tamoxifeno y doxorubicina.

Por tanto, la sobreexpresión CNTD2 otorgó cierta multi-resistencia a las diferentes líneas celulares probadas, mediante la inducción de transportadores de eflujo de fármacos, probablemente por su capacidad de inducir *stem cells*.

### **Visión general**

Colectivamente, estos nuevos descubrimientos alrededor de esta ciclina desconocida podrían ser relevantes en terapia frente al cáncer. Todas las evidencias mostradas, junto al hecho de que CNTD2 únicamente se expresa en cerebro y no en otros tejidos del cuerpo humano (Fig. 18C), nos llevan a plantearnos que la reducción en la expresión de CNTD2 en las células tumorales podría suponer una nueva terapia dirigida en cáncer gracias a la incapacidad de los fármacos para superar la barrera hematoencefálica.

# CONCLUSIONES





1. CNTD2 y CCNO se encuentran sobreexpresados en pacientes con cáncer colorrectal.
2. La sobreexpresión de CNTD2 y CCNO produce un aumento de la proliferación en células de cáncer colorrectal.
3. La sobreexpresión de CNTD2 produce un aumento de la migración celular en células de cáncer colorrectal.
4. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa el crecimiento tumoral en ratones xenógrafos en células LoVo (BRAF-) y lo disminuye en células HT-29 (BRAF+).
5. La sobreexpresión de CNTD2 podría suponer un mal pronóstico para pacientes de cáncer colorrectal BRAF- y un buen pronóstico para los BRAF+.
6. La sobreexpresión de CNTD2 incrementa la formación de *cancer stem cells* y la expresión de marcadores de *stemness* en cáncer de colon, pulmón y mama.
7. La sobreexpresión de CNTD2 puede contribuir a incrementar la resistencia a fármacos posiblemente mediante la expresión de transportadores ABC.



# **ABREVIATURAS**



**cDNA:** DNA codificante

**CDK:** Cyclin Dependent Kinase

**CSC:** Cancer stem cell

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DPPSCs:** Dental Pulp Pluripotential Stem Cells

**EMT:** Epithelial to mesenchymal transition

**FBS:** Fetal bovine serum

**HRP:** Horseradish Peroxidase

**MAP:** mitogen-activated protein kinase

**MOI:** Multiplicity of infection

**Q-PCR:** Quantitative polymerase chain reaction.

**RT-PCR:** Reverse transcription polymerase chain reaction.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---





1. Tarn, WY. & Lai, MC. Translational control of cyclins. *Cell Div.* 6, 5 (2011).
2. Vermeulen, K., Van Bockstaele, DR., Berneman, ZN., Vermeulen, K., Van Bockstaele, DR. & Berneman, ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149 (2003).
3. Disponible en [www.ck12.org](http://www.ck12.org) (Consultado en Abril de 2018).
4. Casimiro, MC., Crosariol, M., Loro, E., Li, Z. & Pestell, RG. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. *Genes Cancer* 3, 649–57 (2012).
5. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641 (2005)
6. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122 (2014).
7. Sherr, CJ. & Roberts, JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512 (1999).
8. Sherr, CJ. & Roberts, JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18, 2699–2711 (2004).
9. Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S. & Laskey, RA. Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J. Cell Sci.* 113, 1929–1938 (2000).
10. Petersen, BO., Lukas, J., Sorensen, CS., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* 18, 396–410 (1999).
11. Harper, JW., Burton, JL. & Solomon, MJ. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev.* 16, 2179–2206 (2002).
12. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222–231 (2001).
13. Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298–306 (2004).
14. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166 (2009).
15. Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, PW. Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909–2915 (2005).

16. Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M. & Morris, MC. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. *Cancers (Basel)* 7, 179–237 (2015).
17. Suzuki, T., Urano, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., *et al.* Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 98, 644–651 (2007).
18. Wang, A., Yoshimi, N., Ino, N., Tanaka, T. & Mori, H. Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123, 124–127 (1997).
19. Otto, T. & Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 93–115 (2017).
20. Choi, YJ., Li, X., Hydrbring, P., Sanda, T., Stefano, J., Christie, AL., *et al.* The requirement for cyclin D function in tumor maintenance. *Cancer Cell* 22, 438–451 (2012).
21. Li, JQ., Miki, H., Saoo, K., Nishioka, M., Ohmori, M & Imaida, K. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum. Pathol.* 33, 1006–1015 (2002).
22. Wen, W., Han, T., Chen, C., Huang, L., Sun, W., Wang, X., *et al.* Cyclin G1 Expands Liver Tumor-Initiating Cells by Sox2 Induction via Akt/mTOR Signaling. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1796–1804 (2013).
23. Li, R., Liu, G. Z., Luo, S. Y., Chen, R. & Zhang, J. X. Cyclin I promotes cisplatin resistance via Cdk5 activation in cervical cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 4533–4541 (2015).
24. Cybulski, M., Jarosz, B., Nowakowski, A., Jeleniewicz, W., Seroczynski, P. & Mazurek-Kociubowska, M. Cyclin I correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 127, 217–222 (2012).
25. Landberg, G., Nilsson, K., Jirström, K., Rydén, L., Kitching, R., Burger, AM. & Seth, A. Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression. *Breast Cancer Res. Treat.* 89, 313–316 (2005).
26. Holloway, JK., Sun, X., Yokoo, R., Villeneuve, AM. & Cohen, PE. Mammalian CNTD1 is critical for meiotic crossover maturation and deselection of excess precrossover sites. 205, 633–641 (2014).
27. Qiao, H., Rao, HBD., Yang, Y., Fong, J., Cloutier, J., Deacon, D., *et al.* Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nat. Genet.* 46, 194–199 (2014).

28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79935> (Consultado en Abril de 2018)
29. Haan, JC., Labots, M., Rausch, C., Koopman, M., Tol, J., Mekenkamp, LJ., Van de Wiel, MA., *et al.* Genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Nat. Commun.* 5, 5457 (2014).
30. Carvalho, RH., Haberle, V., Hou, J., Van Gent, T., Thongjuea, S., Van Ijcken, W., *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling of non-small cell lung carcinomas. *Epigenetics Chromatin* 5, 9 (2012).
31. Gewurz, BE., Towfic, F., Mar, JC., Shinnars, NP., Takasaki, K., Zhao, B., *et al.* Genome-wide siRNA screen for mediators of NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109, 2467–2472 (2012).
32. Niehl, A., Appaix, F., Boscá, S., Sanden, B., Nicoud, JF., Bolze, F., *et al.* Fluorescent Tobacco mosaic virus-Derived Bio-Nanoparticles for Intravital Two-Photon Imaging. *Front. Plant Sci.* 6, 1244 (2015).
33. Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, YA., Ryo, A. & Lee, SW. Modulation of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation. *Oncogene* 22, 1678 (2003).
34. Seo, HR., Lee, DH., Lee, HJ., Baek, M., Bae, S., Soh, JW., *et al.* Cyclin G1 overcomes radiation-induced G2 arrest and increases cell death through transcriptional activation of cyclin B1. *Cell Death Differ.* 13, 1475–1484 (2006).
35. Piscopo, DM. & Hinds, PW. A role for the cyclin box in the ubiquitin-mediated degradation of cyclin G1. *Cancer research* 68, 5581–5590 (2008).
36. Jensen, MR., Factor, VM., Fantozzi, A., Helin, K., Huh, CG. & Thorgeirsson, SS. Reduced hepatic tumor incidence in cyclin G1-deficient mice. *Hepatology* 37, 862–870 (2003).
37. Wen, W., Din, J., Sun, W., Fu, J., Chen, Y., Wu, K., *et al.* Cyclin G1-mediated epithelial-mesenchymal transition via phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling facilitates liver cancer progression. *Hepatology* 55, 1787–1798 (2012).
38. Okamoto, K., Li, H., Jensen, MR., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, SS., *et al.* Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol. Cell* 9, 761–771 (2002).
39. Bennin, DA., Don, AS., Brake, T., McKenzie, JL., Rosenbaum, H., Ortiz, L., *et al.* Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 277, 27449–27467 (2002).

40. Yao, D., Cui, H., Zhou, S. & Guo, L. Morin inhibited lung cancer cells viability, growth, and migration by suppressing miR-135b and inducing its target CCNG2. *Tumour Biol.* 39 (2017).
41. Xiao, X., Zhou, L., Cao, P., Gong, H. & Zhang, Y. MicroRNA-93 regulates cyclin G2 expression and plays an oncogenic role in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 46, 161–174 (2015).
42. Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U. & Kamada, S. Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle* 12, 2617–2624 (2013).
43. Brinkkoetter, PT., Olivier, P., Wu, J., Henderson, S., Krofft, R., Pippin, J., *et al.* Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *J. Clin. Invest.* 119, 3089–3101 (2009).
44. Gasa, L., Sánchez-Botet, A., Quandt, E., Hernández-Ortega, S., Jiménez, J., Carrasco-García, MA., *et al.* A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer. *Sci. Rep.* 7, 1–12 (2017).
45. Ma, JY., Ou-Yang, YC., Luo, YB., Wang, ZB., Hou, Y., Han, ZM., *et al.* Cyclin O regulates germinal vesicle breakdown in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 88, 110 (2013).
46. Kim, DOH., Park, JH., Lee, B., Jang, KO., Chung, IS., & Han, YS. Phosphorylation of cyclin O, a novel cyclin family protein containing a cyclin-like domain, is involved in the activation of cyclin-dependent kinase 2. *Oncol. Lett.* 8, 2769–2775 (2014).
47. Roig, MB., Roset, R., Balsiger, NA., Anfosso, A., Cabellos, L., Garrido, M., *et al.* Identification of a novel cyclin required for the intrinsic apoptosis pathway in lymphoid cells. *Cell Death Differ.* 16, 230–243 (2009).
48. Roset, R. & Gil-Gomez, G. Measurement of changes in Cdk2 and cyclin o-associated kinase activity in apoptosis. *Methods Mol. Biol.* 559, 161–172 (2009).
49. Wallmeier, J., Al-Mutairi, DA., Chen, CT., Loges, NT., Pennekamp, P., Menchen, T., *et al.* Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Genet.* 46, 646–651 (2014).
50. Funk, MC., Bera, AN., Menchen, T., Kuaes, G., Thriene, K., Lienkamp, SS., *et al.* Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. *EMBO J.* 34, 1078–1089 (2015).

51. Villa, M., Crotta, S., Dingwell, K., Hirst, E., Gialitakis, M., Ahlfors, H., *et al.* The aryl hydrocarbon receptor controls cyclin O to promote epithelial multiciliogenesis. *Nat. Commun.* 7, 12652 (2016).
52. Núñez-Ollé, M., Jung, C., Terré, B., Balsiger, N., Plata C., Roset, R., *et al.* Constitutive Cyclin O deficiency results in penetrant hydrocephalus, impaired growth and infertility. *Oncotarget* 8, 99261–99273 (2017).
53. Mikolcevic, P., Sigl, R., Rauch, V., Hess, MW., Pfaller, K., Barisic, M., *et al.* Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 32, 868–879 (2012).
54. Agostini, A., Brunetti, M., Davidson, B., Göran, T., Heim, S., Panagopoulos., *et al.* Identification of novel cyclin gene fusion transcripts in endometrioid ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* "in press" (2018).
55. Mikolcevic, P., Rainer, J. & Geley, S. Orphan kinases turn eccentric: A new class of cyclin Y-activated, membrane-targeted CDKs. *Cell Cycle* 11, 3758–3768 (2012).
56. An, W., Zhang, Z., Zeng, L., Yang, Y., Zhu, X. & Wu, J. Cyclin Y Is Involved in the Regulation of Adipogenesis and Lipid Production. *PLoS One* 10, e0132721 (2015).
57. Park, M., Watanabe, S., Poon, VY., Ou, CY., Jorgensen, EM & Shen, K. CYY-1/cyclin Y and CDK-5 differentially regulate synapse elimination and formation for rewiring neural circuits. *Neuron* 70, 742–757 (2011).
58. Xu, Y., Wang, Z., Wang, J., Li, J., Wang, H. & Yue, W. Lentivirus-mediated knockdown of cyclin Y (CCNY) inhibits glioma cell proliferation. *Oncol. Res.* 18, 359–364 (2010).
59. Sun, T., Co, NN. & Wong, N. PFTK1 interacts with cyclin Y to activate non-canonical Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 163–168 (2014).
60. Liu, H., Shi, H., Fan, Q. & Sun, X. Cyclin Y regulates the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells via Wnt signaling pathway. *Tumour Biol.* 37, 10161–10175 (2016).
61. Shi, K., Ru, Q., Zhang, C. & Huang, J. Cyclin Y Modulates the Proliferation, Invasion, and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Med. Sci. Monit.* 24, 1642–1653 (2018).
62. Shimo, A., Nishidate, T., Ohta, T., Fukuda, M., Nakamura, Y & Katagiri, T. Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 98, 174–181 (2007).

63. Kanehira, M., Katagiri, T., Shimo, A., Takata, R., Shuin, T., Miki, T., *et al.* Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. *Cancer Res.* 67, 3276–3285 (2007).
64. Chen, J., Rajasekaran, M., Xia, H., Zhang, X., Kong, SN., Sekar, K., *et al.* The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Gut* 65, 1522–1534 (2016).
65. Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, J., Tsunoda, T., Ohigashi, H., Murata, K., *et al.* Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* 23, 2385–2400 (2004).
66. Zhang, B., Shi, X., Xu, G., Kang, W., Zhang, W., Zhang, S., *et al.* Elevated PRC1 in gastric carcinoma exerts oncogenic function and is targeted by piperlongumine in a p53-dependent manner. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 1329–1341 (2017).
67. Cheng, A., Gerry, S., Kaldis, P. & Solomon, MJ. Biochemical characterization of Cdk2-Speedy/Ringo A2. *BMC Biochem.* 6, 19 (2005).
68. Dinarina, A., Perez, LH., Davila, A., Schwab, M., Hunt, T. & Nebreda, AR. Characterization of a new family of cyclin-dependent kinase activators. *Biochem. J.* 386, 349–355 (2005).
69. Gutierrez, GJ., Vöggtlin, A., Castro, A., Ferby, I., Salvagiotto, G., Ronai, Z., *et al.* Meiotic regulation of the CDK activator RINGO/Speedy by ubiquitin-proteasome-mediated processing and degradation. *Nat. Cell Biol.* 8, 1084–1094 (2006).
70. Porter, LA., Dellinger, RW., Tynan, JA., Barnes, EA., Kong, M., Lenormand, JL., *et al.* Human Speedy: a novel cell cycle regulator that enhances proliferation through activation of Cdk2. *J. Cell Biol.* 157, 357–366 (2002).
71. Barnes, EA., Porter, LA., Lenormand, JL., Dellinger, RW. & Donoghue, DJ. Human Spy1 promotes survival of mammalian cells following DNA damage. *Cancer Res.* 63, 3701–3707 (2003).
72. Ke, Q., Ji, J., Cheng, C., Zhang, Y, Lu, M., Wang, Y., *et al.* Expression and prognostic role of Spy1 as a novel cell cycle protein in hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 87, 167–172 (2009).
73. Golipour, A., Myers, D., Seagroves, T., Murphy, D., Evan, G., Donoghue, DJ., *et al.* The Spy1/RINGO family represents a novel mechanism regulating mammary growth and tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 3591–3600 (2008).

74. Ferraiuolo, RM., Tubman, J., Sinha, I., Hamm, C. & Porter, LA. The cyclin-like protein, SPY1, regulates the ERalpha and ERK1/2 pathways promoting tamoxifen resistance. *Oncotarget* 8, 23337–23352 (2017).
75. Disponible en <https://www.iarc.fr/International> (Consultado en Abril de 2018).
76. Kuipers, EJ., Grady, WM., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, JJ., Boelens, PG., *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15065 (2015).
77. Dankner, M., Rose, AAN., Rajkumar, S., Siegel, PM. & Watson, IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* "in press" (2018).
78. Zappa, C. & Mousa, SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* 5, 288–300 (2016).
79. Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, DP., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 1–16 (2015).
80. Gazdar, AF., Bunn, PA. & Minna, JD. Small-cell lung cancer: What we know, what we need to know and the path forward. *Nat. Rev. Cancer* 17, 725–737 (2017).
81. Caldas, C. & Stingl, J. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 791–799 (2007).
82. Klevos, GA., Ezuddin, NS., Vinyard, A., Ghaddar, T., Gort, T., Almuna, A., *et al.* A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. *J. Radiol. Nurs.* 36, 158–165 (2017).
83. Hanahan, D. & Weinberg, RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
84. Whiteside, TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904–5912 (2013).
85. Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* 8, 761–773 (2017).
86. Fouad, YA. & Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7, 1016–1036 (2017).
87. Li, LT., Jiang, G., Chen, Q. & Zheng, JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol. Med. Rep.* 11, 1566–1572 (2015).
88. Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443–7454 (2005).



89. Serrano-Gomez, SJ., Maziveyi, M. & Alahari, SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol. Cancer* 15, 1–14 (2016).
90. Nakajima, S., Doi, R. & Toyoda, E. N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 4125–4133 (2004).
91. Wang, S., Jiang, J., Liang, X & Tang, Y. Links between cancer stem cells and epithelial and mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* 8, 2973-2980 (2015).
92. Sato, R., Semba, T., Saya, H & Arima, Y. Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets *Stem Cells* 34, 1997-2007 (2016).
93. Matsui, WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Med. J.* 95, S8-S19 (2016).
94. Basakran, NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med. J.* 36, 273–279 (2015).
95. Yan, Y., Zuo, X. & Wei, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1033–1043 (2015).
96. Wang, C., Xie, J., Manning, HC., Gore, JC & Guo, N. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 28, 1301–1308 (2012).
97. Liu, A., Yu, X. & Liu, S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin. J. Cancer* 32, 483–487 (2013).
98. Sedaghat, S., Gheytaichi, E., Asgari, M., Roudi, R., Keymoosi, H & Madjd, Z. Expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and CD133 in Transitional Cell Carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 25, 196–202 (2017).
99. Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* 147, 992–1009 (2011).
100. Gottesman, MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53, 615-627 (2002).
101. Longacre, M., Snyder, N. & Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)* 6, 1769–1792 (2014).
102. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. & Sarkadi, B. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Curr. Drug*

- Deliv. 1, 27–42 (2004).
103. Jabir, RS., Ho, GF., Annuar, MABA. & Stanlas, J. Association of Allelic Interaction of Single Nucleotide Polymorphisms of Influx and Efflux Transporters Genes With Nonhematologic Adverse Events of Docetaxel in Breast Cancer Patients. *Clin. Breast Cancer* "in press" (2018).
  104. Belkahla, S., Hag, AU., Gitenay, D., Alexia, C., Gondeau, C., Vo, DN., *et al.* Changes in metabolism affect expression of ABC transporters through ERK5 and depending on p53 status. *Oncotarget* 9, 1114–1129 (2018).
  105. Fletcher, JI., Haber, M., Henderson, MJ. & Norris, MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* 10, 147–156 (2010).
  106. Yong, L., Ming, C., Anil, K & Ezharul, C. Reversing multidrug resistance in breast cancer cells by silencing ABC transporter genes with nanoparticle-facilitated delivery of target siRNAs. *Int. J. Nanomedicine* 7, 2473–2481 (2012).
  107. Zhang, S., Chen, H., Liu, K & Sun, Z. Inferring protein function by domain context similarities in protein-protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 10, 395 (2009).
  108. Sun, L., Ke, J., He, Z., Chen, Z., Huang, Q., Ai, W., *et al.* HES1 Promotes Colorectal Cancer Cell Resistance To 5-Fu by Inducing Of EMT and ABC Transporter Proteins. *J. Cancer* 8, 2802-2808 (2017).
  109. Singh, A & Settleman, J. EMT cancer stem cells and drug resistance. *Oncogene* 29, 4741–4751 (2011).
  110. Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 275-284 (2005).
  111. Begicevic, R. & Falasca, M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells : Beyond Chemoresistance. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2362 (2017).
  112. Calvet, CY., André, FM. & Mir, LM. The Culture of Cancer Cell Lines as Tumorspheres Does Not Systematically Result in Cancer Stem Cell Enrichment. *PLoS ONE* 9, e89644 (2014).
  113. Gilbert, CA. & Ross, AH. Cancer Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Therapies. *J Cell. Biochem.* 108, 1031–1038 (2009).
  114. Chen, YC., Ingram, P., Fouladdel, S., McDermott, S., Azizi, E., Wicha, M. *et al.* High-Throughput Single-Cell Derived Sphere Formation for Cancer Stem-Like Cell Identification and Analysis. *Sci. Rep.* 6, 27301 (2016).

115. Dontu, G., Abdallah, WM., Foley, JM., Jackson, KW., Clarke, MF., Kawamura, MJ. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17, 1253–1270 (2003).
116. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay For Stem Cells. *Cell stem cell* 8, 486–498 (2011).
117. Lee, CH., Yu, CC., Wang, BY. & Chang, WW. Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget* 7, 1215–1226 (2016).
118. Guadamillas, MC., Cerezo, A. & Pozo, MA. Overcoming anoikis pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* 124, 3189–3197(2011).
119. Kim, IG., Kim, SY., Choi, SI., Lee, JH., Kim, KC & Cho, EW. Fibulin-3-mediated inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and self-renewal of ALDH+; lung cancer stem cells through IGF1R signaling. *Oncogene* 33373, 3908–3917 (2014).
120. Marisa, L., Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, MC., et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med.* 10, e1001453 (2013).
121. Liu, YS., Hsu, HC., Tseng, KC., Chen, HC. & Chen, SJ. Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* 67, 791–799 (2013).
122. Lemma, S., Avnet, S., Salerno, M., Chano, T. & Baldini, N. Identification and validation of housekeeping genes for gene expression analysis of cancer stem cells. *PLoS One* 11, e0149481 (2016).
123. Wang, P., Wan, W., Xiong, SL., Feng, H. & Wu, N. Cancer stem-like cells can be induced through dedifferentiation under hypoxic conditions in glioma, hepatoma and lung cancer. *Cell Death Discov.* 3, 16105 (2017).
124. Li, P., Yang, R. & Gao, WQ. Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. *Mol. Cancer* 13, 55 (2014).
125. Du, B. & Shim, JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules* 21, 965 (2016).
126. Misale, S., Bozic, I., Tong, J., Peraza-Penton, A. Lallo, A., Baldi, F., et al. Vertical suppression of the EGFR pathway prevents onset of resistance in colorectal cancers. *Nat. Commun.* 6, 8305 (2015).

127. Arnold M., Sierra MS., Laversanne M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 633-691 (2016)
128. Tie, J., Gibbs, P., Lipton, L., Christie, M., Jorissen, RN., Burgess, AW., *et al.* Optimizing targeted therapeutic development: Analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAFV600E mutation. *Int. J. Cancer* 128, 2075–2084 (2011).
129. Golsteyn, RM. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett.* 217, 129–138 (2005).
130. Corbo, C., Cevenini, A. & Salvatore, F. Biomarker discovery by proteomics-based approaches for early detection and personalized medicine in colorectal cancer. *Proteomics Clin. Appl.* 11, 1–34 (2017).
131. Yang, J., Zhao, Y., Kaalita, M., Li, X., Jamaluddin, M., Tian, B., *et al.* Systematic Determination of Human Cyclin Dependent Kinase (CDK)-9 Interactome Identifies Novel Functions in RNA Splicing Mediated by the DEAD Box (DDX)-5/17 RNA Helicases. *Mol. Cell. Proteomics* 17, 2701-2721 (2015).
132. Chen, G., Gharib, TG., Huang, CC., Taylor, JMG., Misek, DE., Kardia, SL., Giordano, TJ., *et al.* Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313 (2002).
133. Wee, ZN., Yatim, SMJ., Kohlbauer, VK., Feng, M., Goh, JY., Bao, Y., *et al.* IRAK1 is a therapeutic target that drives breast cancer metastasis and resistance to paclitaxel. *Nat. Commun.* 6, 1–15 (2015).
134. Vicente-dueñas, C., Romero-camarero, I., Cobaleda, C. & Sánchez-García, I. Function of oncogenes in cancer development. *EMBO J.* 32, 1502–1513 (2013).
135. Kim, SK., Kim, SY., Kim, JH., Roh, SA., Cho, DH., Kim, YS., Kim, JC. A nineteen gene-based risk score classifier predicts prognosis of colorectal cancer patients. *Mol. Oncol.* 8, 1653–1666 (2014).
136. Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751 (2010).
137. Blanpain, C. Cancer cell origin and tumor heterogeneity. Personal communication in *Mechanisms of Metastasis* (2018).
138. Fisher, ML., Grun, D., Adhikary, G., Xu, W & Eckert, RL. Inhibition of YAP function overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma cancer stem cells. *Oncotarget* 8, 110257–110272 (2017).

139. Amin, ARMR., Karpowicz, PA., Carey, TE., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, ZG., *et al.* Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Semin. Cancer Biol.* 35, S55–S77 (2015).
140. Serrano, M., Lin, AW., Mccurrach, ME., Beach, D. & Lowe, SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* 88, 593–602 (1997).
141. Julian, LM., Carpenedo, RL., Rothberg, JL. & Stanford, WL. Formula G1: Cell cycle in the driver's seat of stem cell fate determination. *Bioessays* 38, 325–332 (2016).
142. Zeng, L., Cai, C., Li, S., Wang, W., Li, Y., Chen, J., *et al.* Essential Roles of Cyclin Y-Like 1 and Cyclin Y in Dividing Wnt-Responsive Mammary Stem / Progenitor Cells. *Plos genet.* 12, e1006055 (2016).
143. Arand, J. & Sage, J. G1 cyclins protect pluripotency. *Nat. Cell Biol.* 19, 149–150 (2017).
144. Liu, L., Michowski, W., Inuzuka, H., Shimizu, K., Nihira, NT., Chick, JM., *et al.* G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nat. Cell. Biol.* 19, 177-188 (2017).
145. Boward, B., Wu, T., Dalton, S. Control of cell fate through cell cycle and pluripotency networks. *Stem Cells* 34, 1427–1436 (2017).
146. Lange, C & Calegari, F. Cdks and cyclins link G1 leght and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 15, 1893-1900 (2010).
147. Zhang, X., Hua, R., Wang, X., Huang, M., Gan, L., Wu, Z., *et al.* Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer. *Oncotarget* 7, 9815–9831 (2016).
148. Yong, X., Tang, B., Xiao, YF., Qin, Y., Luo, G., Hu, CG., *et al.* *Helicobacter pylori* upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 374, 292–303 (2016).
149. Zheng, HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 8, 59950–59964 (2017).
150. Zhao, QW., Zhou, YW., Li, WX., Kang, B., Zhang, X Q., Yang, Y., *et al.* Akt-mediated phosphorylation of Oct4 is associated with the proliferation of stem-like cancer cells. *Oncol. Rep.* 33, 1621–1629 (2015).

# **ANEXO I: PROTOCOLOS**

---



## PROTOCOLO FACS PARA CICLO CELULAR

1. Recoger las células mediante tripsinización, contar y centrifugar 50.000 células de cada condición a 300g 3'
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 150  $\mu$ L de PBS1X MUY suavemente con puntas amarillas.
3. Añadir gota a gota 350  $\mu$ L de etanol 96° ice-cold (el porcentaje final será de 70°) a la pared del falcon a la vez que se mueve muy suavemente en vortex, y dejar a 4°C al menos 4horas/overnight.
4. Centrifugar a 300g 3 minutos y eliminar el etanol
5. Lavar cada tubo con 1mL de PBS1x, resuspender y centrifugar a 300g 3 minutos x2
  - *Mientras se termina la centrifugación del segundo lavado, preparar el medio de resuspensión:*

0,5 mL de medio por cada placa con PBS, RNAsa 100ug/mL y IP 20 ug/mL

RNAsa:

Cfinal: 100 ug/mL

Cinicial: 10 mg/mL

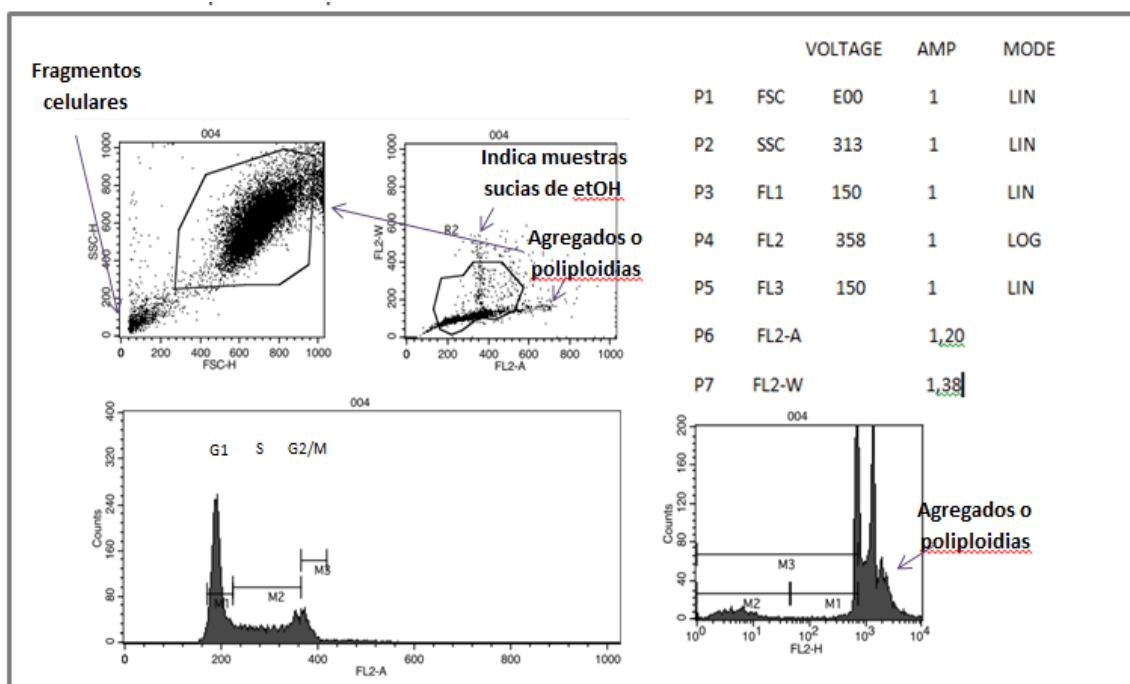
IP:

Cfinal: 20 ug/mL

Cinicial 1mg/mL

Añadir PBS hasta llegar al volumen final.

6. Resuspender el pellet de células limpio de etanol en 500 uL de PBS+RNAsa+IP, de forma que tendremos una concentración de 100.000 células/mL



7. Incubar 1h37°C/O.N 4°C



## PROTOCOLO SINCRONIZACIÓN: DOBLE BLOQUEO TIMIDINA (Hela, HEK293, HT-29, A549)

### DIA 1: SIEMBRAR LAS CÉLULAS

1. Sembrar las células en DMEM+1% Glu+1% P/S+10% FBS.
  - Nota: en el caso de las HEK293 tratar previamente las placas con poliL y tener mucho cuidado con los lavados porque se despegan enseguida
  - *Las células tras 24h en cultivo tienen que tener una confluencia de aproximadamente el 20-30%. Tras 48h un 40-60% y tras 72 horas una confluencia máxima del 80%.*

	<b>Placas 35mm (2mL)</b>	<b>Placas 60mm (5mL)</b>
Hela	100.000 cls/mL	
HT-29	250.000 cls/mL	250.000 cls/mL (1.250.000cls/pocillo)
A549	150.000 cls/mL	75.000 cls/mL (375.000cls/pocillo)
HEK293T	150.000 cls/mL	

### DIA 2: PRIMER BLOQUEO TIMIDINA

1. Añadir timidina a cada pocillo para que la concentración final sea de 1,25 mM, e incubar 16 horas. Mover suavemente la placa para que se reparta en el medio.
  - *Si se ha preparado la timidina a una concentración de 206mM, añadir 17µL a 2mL o 42,5 µl a 5mL*
  - *Recomiendo añadir a las 17:00 para lavar tras 16 horas, a las 9:00 del día siguiente*

### DIA 3: SEGUNDO BLOQUEO TIMIDINA

1. Tras 16 horas con el primer bloqueo de timidina hacer 2 lavados con 2mL de PBS 1x estéril con cuidado y añadirles medio nuevo para liberar a las células durante 8 horas.
  - *Recomiendo lavar a las 9:00 y liberar las células hasta las 17:00*
2. Tras 8 horas de *release*, añadir 1,25 mM para realizar el segundo bloqueo con timidina durante 12-16 horas. Mover suavemente la placa para que se reparta en el medio.
  - *Añadir 17µL a 2mL o 42,5 µl a 5mL del stock a 206mM*
  - *Recomiendo hacer el segundo bloqueo a las 18:00 para hacer la salida tras 12 horas, a las 8 del día siguiente.*

DIA 4: SALIDA

1. Tras 14 horas con el segundo bloqueo de timidina hacer 2 lavados con 2mL de PBS 1x estéril con cuidado y añadirles medio nuevo para liberar las células. Hacer para todos los pocillos excepto para el tiempo 0.
2. Una vez se han liberado todas las células coger el tiempo 0. Coger los tiempos cada 2 horas desde que se liberaron.

Para coger los tiempos:

- 2.1 Aspirar el medio
- 2.2 Añadir 300µL de tripsina e incubar a 37°C 3 minutos
- 2.3 Bloquear la tripsina con 500µL de medio completo
- 2.4 Recoger las células y centrifugar a 300g 3 minutos
- 2.5 Aspirar el sobrenadante con mucho cuidado de no absorber el pellet
- 2.6 Resuspender el pellet en 350µL de PBS1X y resuspender MUY suavemente con puntas amarillas.
  - Pasar 200µL a un eppendorf y centrifugar a 300g 3' para congelar el pellet a -80°C para western blot
- 2.7 A los 150µL restantes añadir gota a gota etanol 96° ice-cold (70° finales) a la pared del falcon a la vez que se mueve muy suavemente en vortex, y dejar a 4°C al menos 4horas hasta que se realice el FACS
  - *Recomiendo comenzar la salida a las 8:00*

**PREPARACIÓN TIMIDINA**

1. Partimos de 1g de Sigma en polvo a T.A
2. En campana, preparo un stock a 50mg/mL añadiendo 20 mL de agua millipore autoclavada al bote con 1g de Timidina. Agitar hasta su disolución
3. Se puede filtrar la solución con un poro de 0,2 µm y se pasa a un falcon nuevo.
4. Hacer alícuotas y guardar a -20°C

P.M= 242.23g/mol

242,23g ----- 1mol

1 g ----- x

$$x = 4,12 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \rightarrow \frac{4,12 \text{ mmol}}{20 \text{ mL} = 0,02 \text{ L}} = 206 \text{ mM}$$

## PROTOCOLO SINCRONIZACIÓN: TIMIDINA- NOCODAZOL (Hela, HT-29, A549)

### DIA 1: SIEMBRAR LAS CÉLULAS

2. Sembrar las células en DMEM+1% Glu+1% P/S+10% FBS.
  - *Las células tras 24h en cultivo tienen que tener una confluencia de aproximadamente el 20-30%. Tras 48h un 40-60% y tras 72 horas una confluencia máxima del 80%.*

	<b>Placas 35mm (2mL)</b>	<b>Placas 60mm (5mL)</b>
Hela	100.000 cls/mL	
HT-29	250.000 cls/mL	250.000 cls/mL (1.250.000cls/pocillo)
A549	150.000 cls/mL	75.000 cls/mL (375.000cls/pocillo)

### DIA 2: INCUBAR

### DIA 3: BLOQUEO TIMIDINA Y NOCODAZOL

1. Añadir timidina a cada pocillo para que la concentración final sea de 2 mM, e incubar 8 horas. Mover suavemente la placa para que se reparta en el medio.
  - *Recomiendo añadir a las 8:00 para lavar tras 8 horas, a las 16:00.*
  - *Añadir 45µL a pocillos de 5mL o 18µL a pocillos de 2mL del stock 206mM*
2. Tras 8 horas de incubación con nocodazol, hacer 2 lavados con 2mL de PBS1X estéril con cuidado y añadirles medio nuevo para liberar las células durante 3 horas.
  - *Recomiendo liberar a las 16:00 hasta las 20:00*
3. Tras 3 horas de reléase, añadir nocodazol 50nM e incubar durante 12 horas
  - *Añadir 2µL a pocillos de 2mL o 4,5 a pocillos de 5mL del stock 0,05mg/mL*
  - *Si se ha liberado a las 16:00 añadir a las 20:00*

### DIA 4: SALIDA

1. Tras 12 horas con bloqueo de nocodazol, hacer 2 lavados con 2mL de PBS 1x estéril con cuidado y añadirles medio nuevo para liberar las células. Hacer para todos los pocillos excepto para el tiempo 0.
2. Una vez se han liberado todas las células coger el tiempo 0. Coger los tiempos cada 2 horas desde que se liberaron.

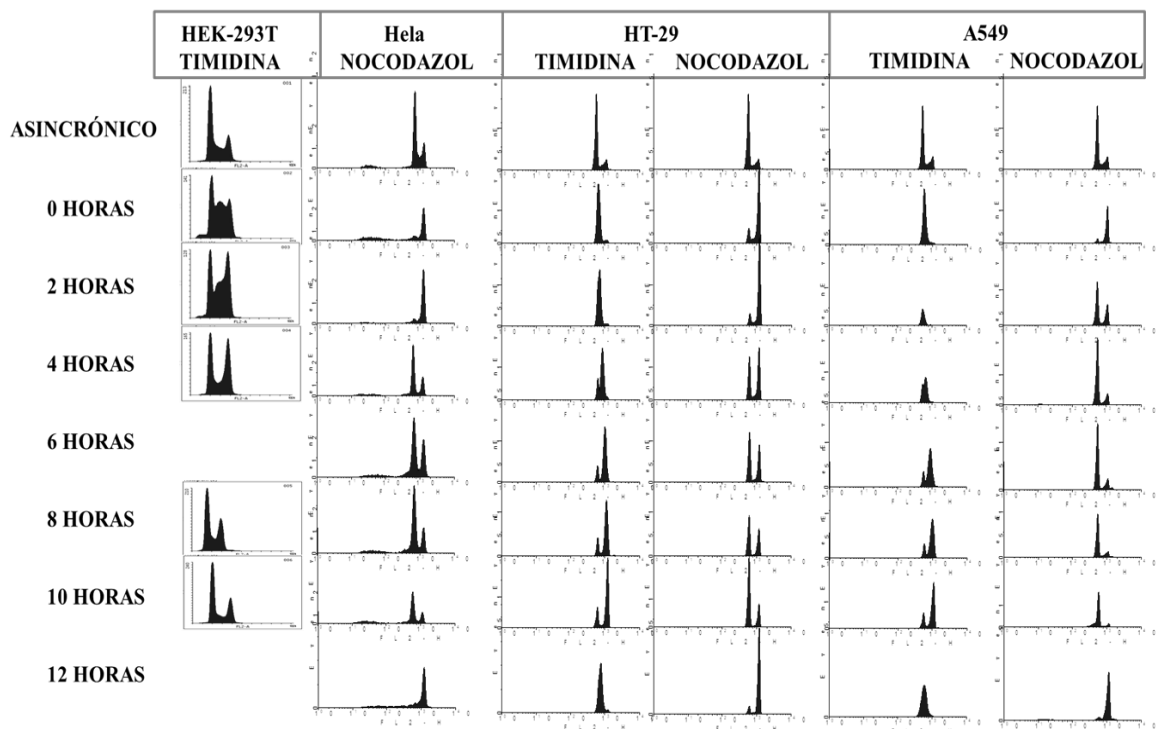
Para coger los tiempos:

- 2.1 Aspirar el medio
- 2.2 Añadir 300µL de tripsina e incubar a 37°C 3 minutos
- 2.3 Bloquear la tripsina con 500µL de medio completo
- 2.4 Recoger las células y centrifugar a 300g 3 minutos
- 2.5 Aspirar el sobrenadante con mucho cuidado de no absorber el pellet
- 2.6 Resuspender el pellet en 350µL de PBS1X y resuspender MUY suavemente con puntas amarillas.
  - Pasar 200µL a un eppendorf y centrifugar a 300g 3' para congelar el pellet a -80°C para western blot
    - a. A los 150µL restantes añadir gota a gota 350µL de etanol 96° ice-cold (el porcentaje final será de 70°) a la pared del falcon a la vez que se mueve muy suavemente en vortex, y dejar a 4°C al menos 4horas hasta que se realice el FACS

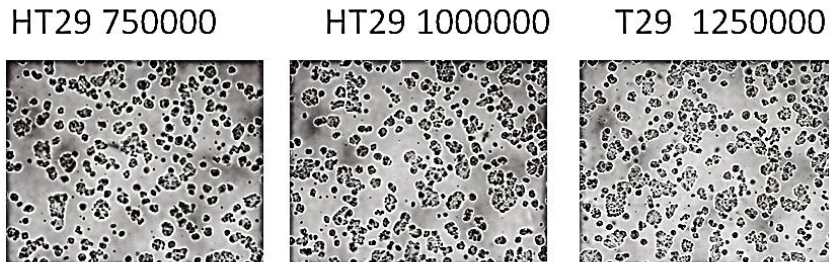
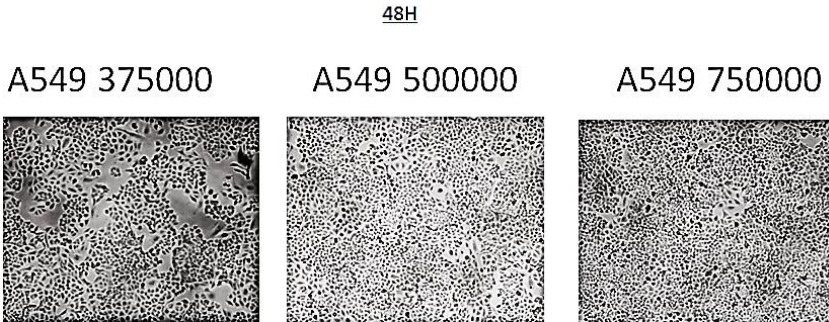
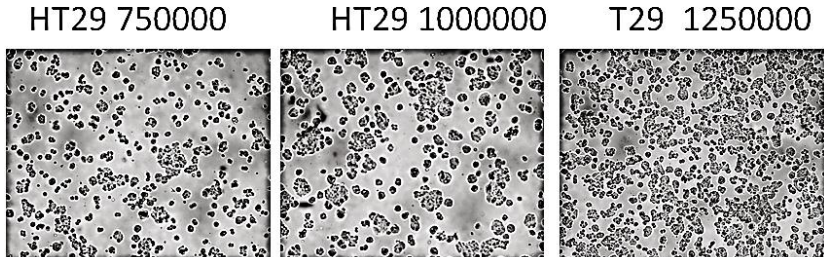
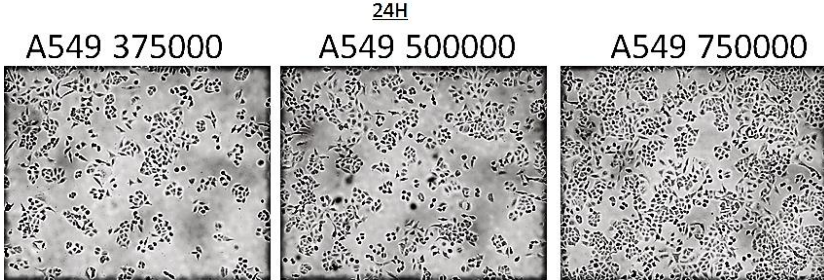
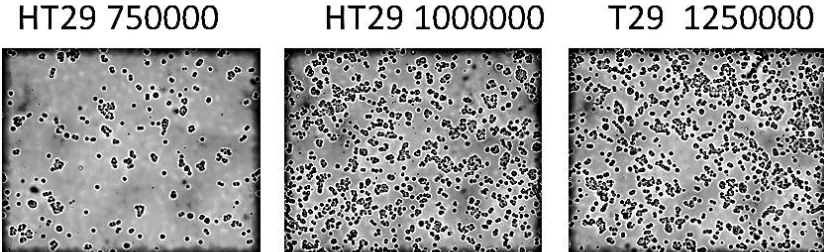
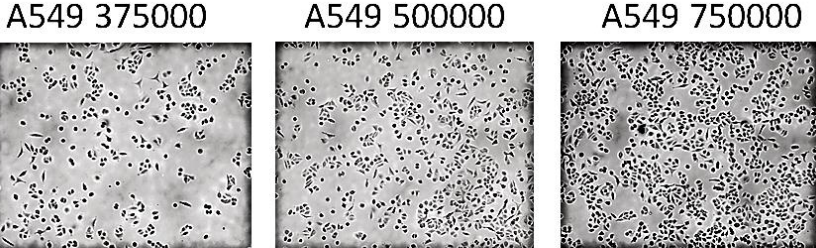
- *Recomiendo comenzar la salida a las 8:00*

## REPARACIÓN NOCODAZOL

1. El stock está a 5mg/mL y la concentración final a utilizar es de 50ng/mL, por lo que vamos a preparar un stock intermedio a 50µg/mL:
  - **STOCK 5mg/mL.** Preparo el stock pesando 2mg y disolviéndolo en 400µL de DMSO
  - **STOCK 0,05mg/mL.** Hago una dilución 1:100 del stock: 10µL en 990µL. Preparo alícuotas de 25µL de este stock.



ANEXO CRECIMIENTO DE CÉLULAS



## PROTOCOLO MIGRACIÓN TRANSWELL

### A549 (POCILLOS TRANSWELL CORNING P24 8uM poro)

1. Sembrar 30000-50000 cls A549, o 200.000 cls HT29/LoVo en 100uL en la parte superior de los pocillos transwell en DMEM 1%P/S 1%GLUTAMAX 0,5% FBS
  - *Si quieres ver un aumento en migración será mejor poner menos células, y si quieres ver una disminución en la migración poner más o disminuir el tiempo*
2. Añadir a los pocillos de p24 600uL de medio 10%FBS que servirá como quimio-atrayente.
  - *Esto ha de hacerse DESPUÉS de llenar la parte superior del transwell, o se permeabilizará y filtrará todo lo que pongamos después en el transwell)*
3. Sembrar 2 pocillos en otra placa con la misma cantidad de células para hacer una prueba de siembra a las 3h
4. Agitar muy bien las placas en cruz para que las células no queden en el centro pero tener cuidado de que no se salgan por los huecos del transwell
5. Incubar 18horas a 37°C

A las 3h: teñir con cristal violeta y medir la absorbancia para ver si se ha sembrado el mismo número de células en cada pocillo

A las 18 horas en A549 o 24h en HT29/LoVo:

- Retirar el medio del inserto con pipeta
- Cambiar a una p24 nueva
- Preparar 3 matraces con PBS1x donde iremos sumergiendo los transwell con unas pinzas para lavarlos
- Lavar 2 veces con PBS1X
- Fijar con 600 uL metOH 100% 15' a -20°C
- Lavar 2 veces con PBS1X y dejar seco
- Teñir con 0,2% cristal violeta 30' TA en oscuridad sin agitación
- Lavar 2 veces con PBS1X
- Con un bastoncillo quitar los restos de arriba muy bien pero con cuidado de no romper la membrana del transwell
- Hacer 5 fotos de cada uno en el microscopio
- Contar / extraer el cristal violeta con ácido acético al 10%
 

Extracción con acético:

  - Añadir 300uL de acético al 10% y dejar 10' a TA para que se disuelva
  - Añadir 200uL de H2O millipore para no intoxicarnos al medir
  - Medir la absorbancia a 595 nm





HT29 y LOVO (POCILLOS TRANSWELL CORNING P24 8uM poro)

1. Sembrar 100000-300000 cls en 100uL en la parte superior de los pocillos transwell en DMEM 1%P/S 1%GLUTAMAX 0,5% FBS
  - *Si quieres ver un aumento en migración será mejor poner menos células, y si quieres ver una disminución en la migración poner más o disminuir el tiempo*
6. Añadir a los pocillos de p24 600uL de medio 10%FBS que servirá como quimio-atrayente.
  - *Esto ha de hacerse DESPUÉS de llenar la parte superior del transwell, o se permeabilizará y filtrará todo lo que pongamos después en el transwell)*
2. Sembrar 2 pocillos en otra placa con la misma cantidad de células para hacer una prueba de siembra a las 3h
3. Agitar muy bien las placas en cruz para que las células no queden en el centro pero tener cuidado de que no se salgan por los huecos del transwell
4. Incubar 24 horas a 37°C

A las 3h: teñir con cristal violeta y medir la absorbancia para ver si se ha sembrado el mismo número de células en cada pocillo

A las 18 horas:

- Retirar el medio del inserto con pipeta
- Cambiar a una p24 nueva
- Preparar 3 matraces con PBS1x donde iremos sumergiendo los transwell con unas pinzas para lavarlos
- Lavar 2 veces con PBS1X
- Fijar con 600 uL metOH 100% 15' a -20°C
- Lavar 2 veces con PBS1X y dejar seco
- Teñir con 0,2% cristal violeta 30' TA en oscuridad sin agitación
- Lavar 2 veces con PBS1X
- Con un bastoncillo quitar los restos de arriba muy bien pero con cuidado de no romper la membrana del transwell
- Hacer 5 fotos de cada uno en el microscopio
- Contar / extraer el cristal violeta con ácido acético al 10%

Extracción con acético:

- Añadir 300uL de acético al 10% y dejar 10' a TA para que se disuelva
- Añadir 200uL de H2O millipore para no intoxicarnos al medir
- Medir la absorbancia a 595 nm



## PROTOCOLO MIGRACIÓN *WOUND HEALING*

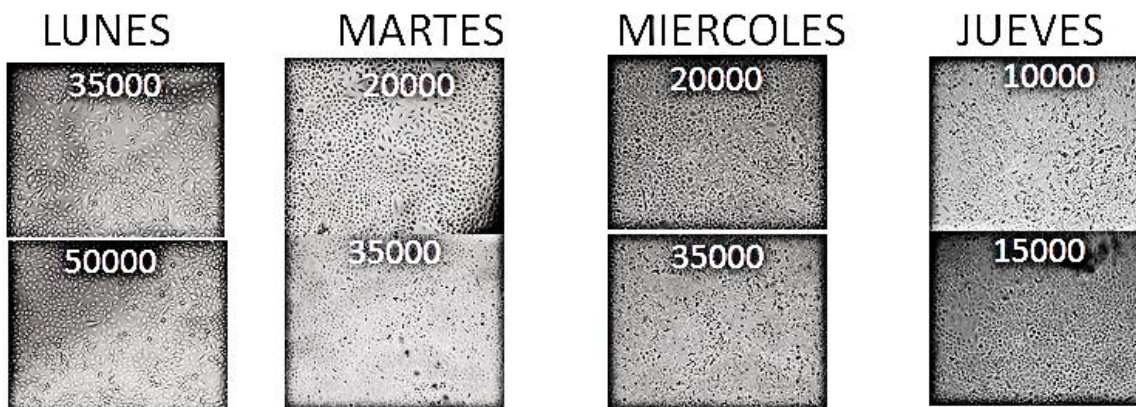
Antes de empezar:

- Hacer siempre pruebas de confluencia en los pocillos que necesites y al tiempo que necesites antes de comenzar (no todos sembramos igual). Además servirá para cualquier línea celular que utilices. Tienen que estar a alta confluencia el día del scratch, pero ten en cuenta que durante 24-72 horas estarás monitorizando la migración, y no pueden levantarse.
- Cuidado al hacerlo en líneas que se levantan fácilmente como las HEK-293. Tratar primero con poliL 1h 37°C y hacer los lavados con mucha suavidad.

### A549

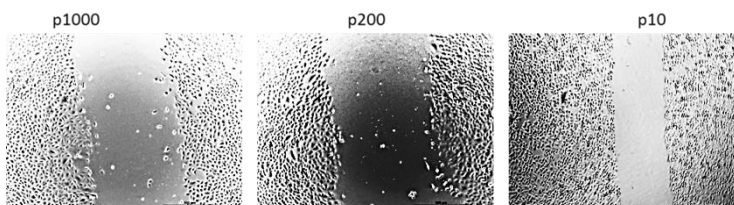
1. Marcar los pocillos con un puntito arriba y abajo para poder hacer el scratch
2. Sembrar las células A549 para que el día del scratch estén a un 100% de confluencia. *Para el día siguiente utilizar 300000cls/pocillo*

#### Siembra de un viernes en p24



3. Cuando hayan alcanzado la confluencia, hacer una raya con una punta de pipeta blanca estéril de forma perpendicular al pocillo y apretando en todos por igual.

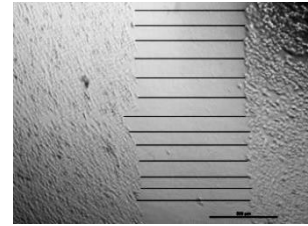
#### Prueba del scratch con distintas pipetas



4. Lavar con PBS1x para quitar las células que se han levantado. Es importante que no queden células en la raya porque después las confundiremos con migradoras.
5. Cambiar el medio por medio al 0,5% de FBS para evitar la proliferación
6. Sacar fotografías en este momento (tiempo 0) y a las 24 y 48 horas, o hacer un *timing* si se cree necesario.

7. Cuantificación:

- Hacer 50 medidas del scratch con el programa GIMP2
- Hacer 3-5 replicados por experimento.
- Hacer el promedio de las medidas.
- Restar  $t_0-t_{24}$  y  $t_0-t_{48}$
- Calcular con el programa cuanto es un  $\mu\text{M}$  y así averiguar la velocidad de migración en  $\mu\text{M}/\text{día}$

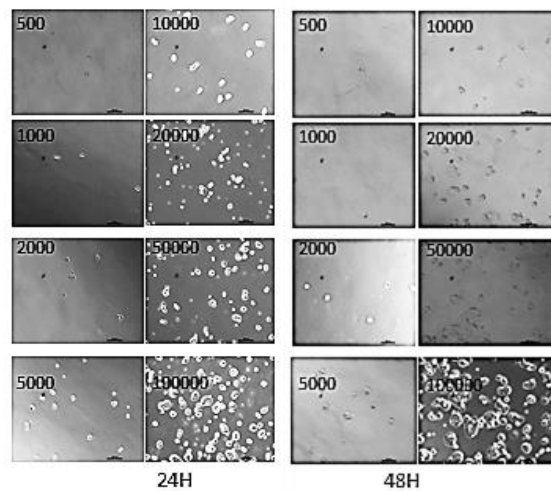


**HT29 Y LoVo**

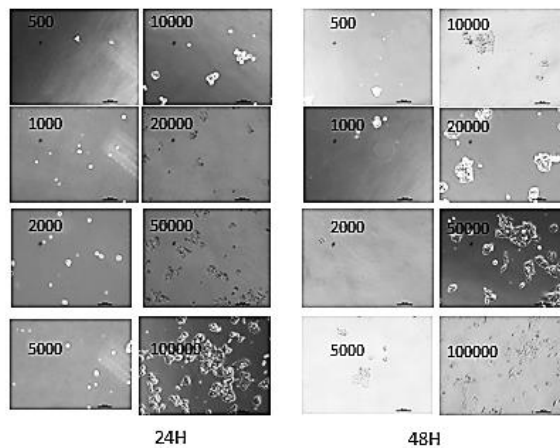
1. Marcar los pocillos con un puntito arriba y abajo para poder hacer el scratch
2. Sembrar las células para que el día del scratch estén a un 100% de confluencia. *Para el día siguiente utilizar 1.000.000*
3. El resto del protocolo es igual

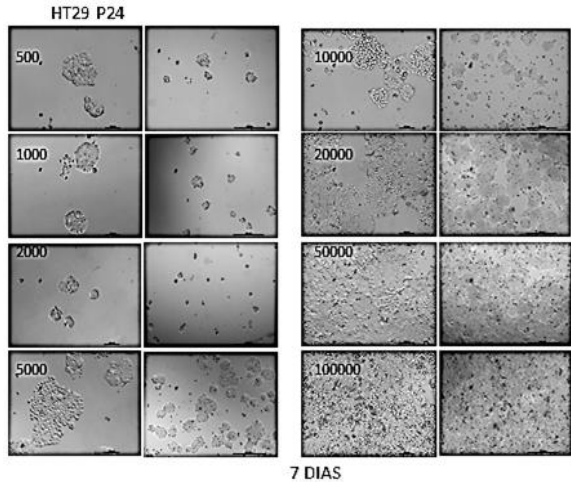
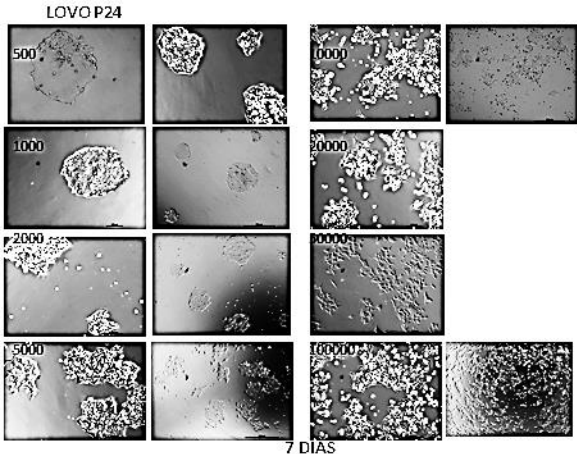
**Siembra de un viernes en p24**

HT29 P24



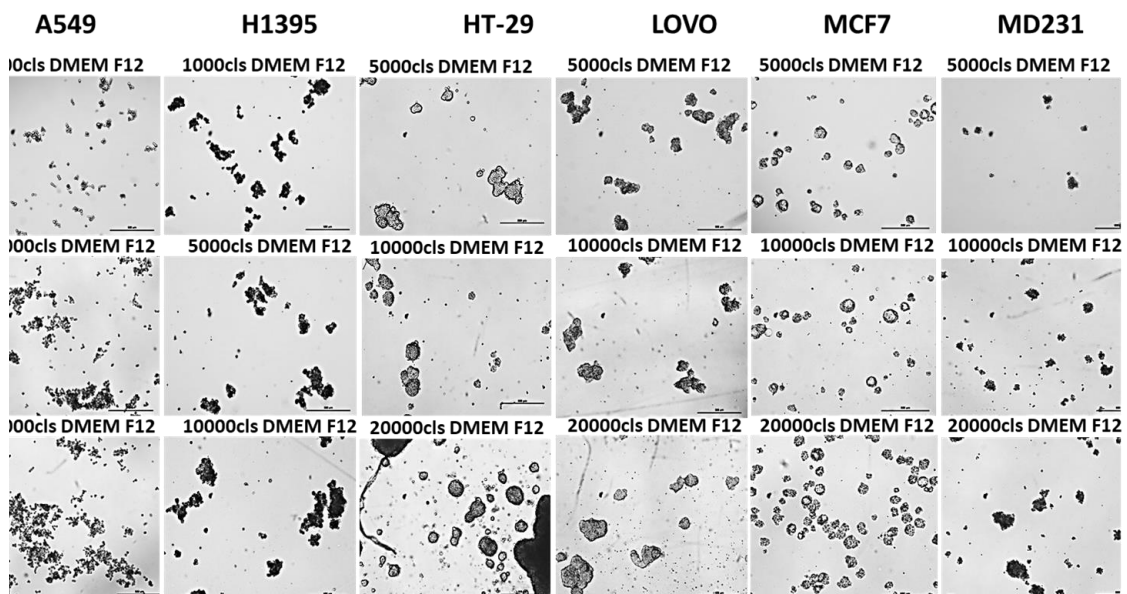
LOVO P24





## PROTOCOLO FORMACIÓN DE ESFERAS EN PLACAS DE BAJA ADHESIÓN

1. Preparar el medio de desdiferenciación fresco cada semana. Preparar la cantidad que se vaya a utilizar ya que los factores de crecimiento son muy caros.
2. Los componentes son los siguientes:
  - DMEM F12 (31331-028, Gibco)
  - B27 (17504044, Gibco) 50x → 10x
  - hEGF (AF 100-15, Peptotech) 100ug/ml → 20 ng/ml
  - hFGF (100-18B, Peptotech) 10ug/ml → 20 ng/ml
  - Heparina (H4784, Sigma) →
    - *La B27 es fotosensible y por tanto tiene que mantenerse protegida de la luz, al igual que el medio de desdiferenciación.*
    - *Filtrar el medio con un poro de 22um y una jeringuilla.*
3. Tripsinizar las células, bloquear las células con medio **DMEM+FBS** una vez levantadas y centrifugar a 300g para eliminar el medio.
4. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células para proceder a su contaje. Dependiendo de la línea celular será necesario sembrar un número diferente de células para la formación de esferas, pero en general 5000 es un número adecuado. En cada pocillo de p24 añadiremos además de las células, 500uL de medio de desdiferenciación, y se suplementará cada 2-3 días con 100uL de medio nuevo.
  - *Si los volúmenes necesarios para sembrar 5000-10000 células en cada pocillo superan los 40uL, centrifugar a 500g y quitar el sobrenadante sin apurar al máximo para no llevarnos las pocas células que tenemos (el pellet no será visible), para que el medio DMEM no interfiera con el de desdiferenciación que añadiremos después.*
  - *A los 7-10 días dependiendo de la línea habrán crecido las esferas. Se pueden recoger mediante centrifugación y guardar el pellet a -80°C.*



## **PROTOCOLO FORMACIÓN DE ESFERAS EN MATRIGEL**

### **Antes de empezar:**

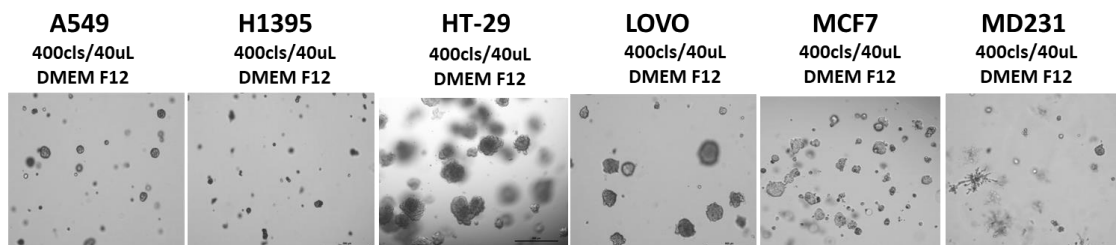
Consideraciones sobre el matrigel (354234, Corning):

- Trabajar siempre en hielo, el Matrigel empieza a gelificar a temperatura ambiente.
- Cuando llegue el Matrigel dejarlo descongelarse en la nevera O.N
- Alicuotar el Matrigel una vez descongelado para evitar ciclos de congelación-descongelación en alícuotas de 500 µl.
- Sacar las alícuotas de Matrigel que se necesiten a hielo una hora antes de comenzar con el experimento para que se descongelen.
- Antes de sembrar el Matrigel en las placas, precalentarlas en el incubador a 37°C
- Siempre que sea posible trabajar con los eppendorfs las puntas frías del -20°C
- Preparar el medio de tumoresferas fresco cada semana. No puede durar más de 7 días y por tanto siempre hay que prepararse la cantidad que se va a utilizar para no desperdiciarlo.

### **Cultivo de tumoresferas en matrigel:**

1. Tripsinizar las células, bloquear las células con medio **DMEM+FBS** una vez levantadas y centrifugar a 300g para eliminar el medio.
2. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en un volumen pequeño (100uL) de **medio de desdiferenciación** para disgregarlas muy bien con la pipeta antes de contarlas. Una vez bien resuspendidas añadir un mayor volumen que nos permita contar bien: unas 40 células por cuadrante (tampoco más porque si no al sembrar pocas células cometeremos mucho error).
  - *Es muy importante que estén bien disgregadas, sobre todo si se va a hacer comparación de dos condiciones y se quieren sembrar exactamente el mismo número de célula. Hay que tener en cuenta que vamos a sembrar un número muy reducido de células en muy poco volumen y es muy fácil cometer error, por lo que no puede ver agregados.*
  - *En caso de tener un número pequeño de células, por ejemplo al recoger un pocillo p24 de una infección o silenciamiento,*
3. Contar por triplicado cada pocillo y sembrar 100 células para experimentos de sobreexpresión, o 300 para experimentos de silenciamiento (las células están más machacadas con la lipofectamina) para una placa de p48.
4. Haremos cada experimento por triplicado, por lo que por cada condición prepararemos en un eppendorf las células por 3,5.
  - *Si los volúmenes que añadimos son mayores de 10uL, centrifugar a 500g y quitar el sobrenadante sin apurar al máximo para no llevarnos las pocas células que tenemos (el pellet no será visible), ya que el medio disolverá al Matrigel. Si son menores, añadiremos el matrigel encima.*

5. Una vez añadidas las células pondremos los eppendorf en hielo y añadiremos el matrigel. Por cada pocillo pondremos 30uL de Matrigel, por lo que multiplicaremos por 3,5 y añadiremos 105uL de matrigel.
6. Resuspender muy suavemente con la pipeta p200 y proceder al sembrado del Matrigel con las células. Para sembrar cada pocillo utilizaremos una punta nueva de filtro y expulsaremos el Matrigel con las células con mucho cuidado en el centro del pocillo hasta que formen una cúpula. Hay que tener mucho cuidado de no introducir burbujas al sembrar el Matrigel.
  - *Para eliminar las burbujas si ha quedado alguna se puede utilizar una aguja de jeringuilla estéril.*
  - *Otro sistema para evitar burbujas es no apretar hasta el segundo tope del émbolo, pero para ello tendremos que poner más cantidad de Matrigel y poner la pipeta en 35uL para que más o menos nos eche 30uL.*
7. Una vez sembradas, incubar la placa a 37°C durante 15-30' para que el Matrigel solidifique.
8. Tras esta incubación, cubrir los pocillos con 250uL de medio de desdiferenciación
9. Añadir 100 uL de medio nuevo cada 2- 3 días (lunes, miércoles y viernes)
  - *Las tumoresferas tardan más en crecer en Matrigel, aproximadamente entre 15-20 días.*
10. Para recoger las tumoresferas bastará con disolver el Matrigel en medio muy frío y romperlo con la pipeta. Mediante centrifugación podremos obtener un pellet y guardarlo a -80°C.



## PROTOCOLO FRACCIONAMIENTO CELULAR

### BUFFERS CASEROS

*Adaptado de S Baghiroba, et al. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells, MethodsX, 2015.*

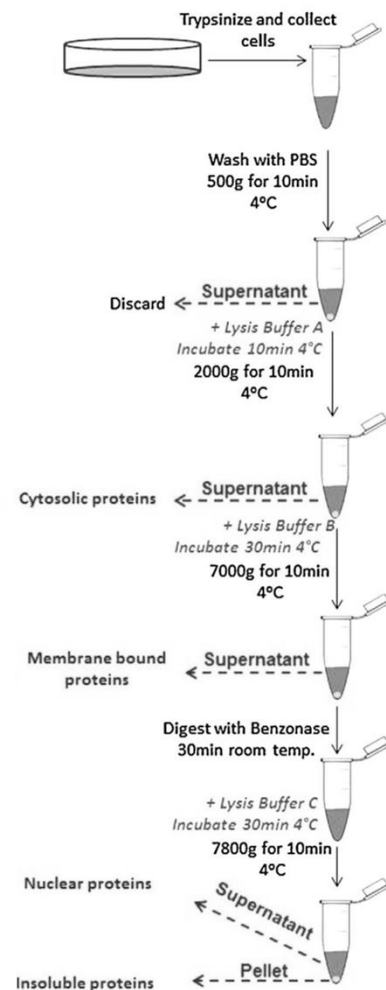
#### Antes de empezar

Preparar los siguientes tampones y mantenerlos a 4°C durante un máximo de 1 mes:

<b>Lysis buffer A</b>	
NaCl	150 mM
HEPES (pH 7.4)	50 mM
Digitonin (Sigma, D141)	25 µg/mL
Hexylene glycol (Sigma, 112100)	1 M
Protease inhibitor cocktail <sup>B</sup>	1% v:v
<b>Lysis buffer B</b>	
NaCl	150 mM
HEPES (pH 7.4)	50 mM
Igepal (Sigma, I7771)	1% v:v
Hexylene glycol	1 M
Protease inhibitor cocktail <sup>B</sup>	1% v:v
<b>Lysis buffer C</b>	
NaCl	150 mM
HEPES (pH 7.4)	50 mM
Sodium deoxycholate	0.5% w:v
Sodium dodecyl sulfate	0.1% w:v
Hexylene glycol	1 M
Protease inhibitor cocktail <sup>B</sup>	1% v:v

#### Procedimiento

1. Recoger las células mediante tripsinización y posterior bloqueo con medio suplementado con FBS.
2. Centrifugar las muestras y eliminar el sobrenadante para quedarnos con el pellet.
3. Lavar el pellet con PBS1x y volver a centrifugar para quedarnos con el pellet
  - El pellet se podrá recoger y guardar a -80°C o procesar en el momento.
4. Añadir el tampón A suplementado con inhibidores de proteasas. La cantidad de tampón de lisis dependerá de la línea celular y número de células.
  - Para una placa de 10mL al 80% de confluencia, añadir 200uL de tampón, para una placa de 5mL añadir 100uL y para una de 2mL añadir 50uL.
5. Incubar con el tampón A durante 10-20 minutos en una noria a 4°C
  - En varias líneas celulares se ha observado que el tampón de lisis A no tiene el efecto deseado en 10 minutos, y por ello se deja durante 15-20 minutos.



6. Centrifugar las células a 2000g 10min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de citoplasma.

- Al recoger el sobrenadante tener mucho cuidado de no coger nada del *pellet* para evitar contaminaciones. Es recomendable recoger un poco menos de volumen de sobrenadante y el restante, apurarlo con una pipeta y desecharlo, para que quede el *pellet* muy seco.

7. Incubar con el tampón B suplementado de inhibidores de proteasas durante 10-20 minutos en hielo. Vortear para resuspender el *pellet*.

- En algunos casos se tuvieron problemas en esta fracción ya que el tampón B parecía disolver también las proteínas de núcleo, por lo que se tuvo que reducir el tiempo de incubación, el volumen y eliminar la agitación de las muestras.

8. Centrifugar las células a 7000g 10min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de membrana.

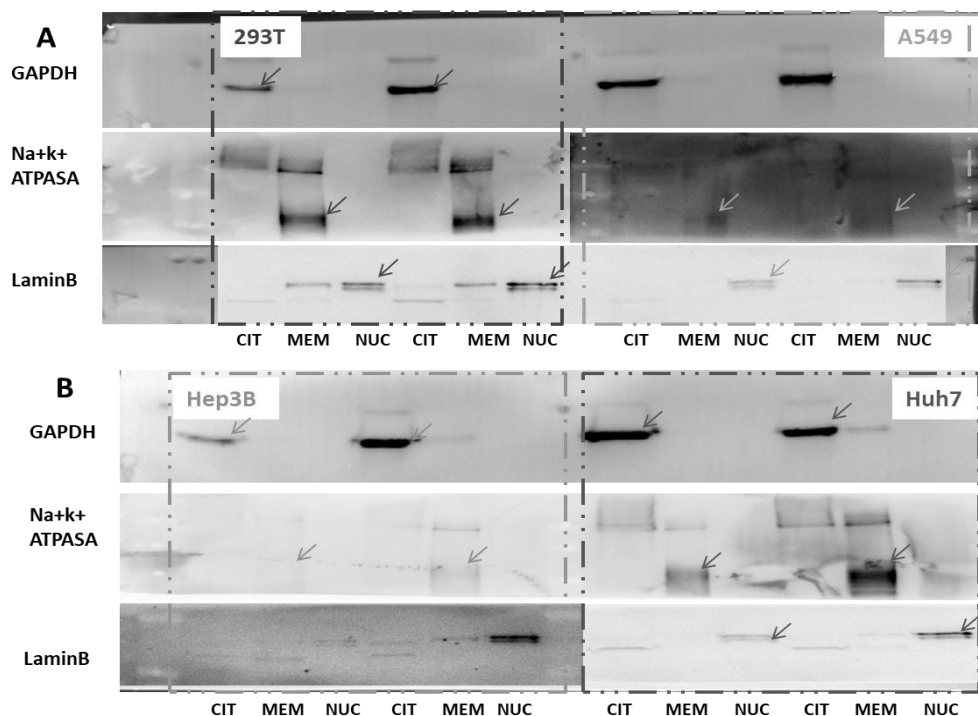
- Al recoger el sobrenadante tener mucho cuidado de no coger nada del *pellet* para evitar contaminaciones. Es recomendable recoger un poco menos de volumen de sobrenadante y el restante, apurarlo con una pipeta y desecharlo, para que quede el *pellet* muy seco.

9. Finalmente se incuba con el tampón C suplementado de inhibidores de proteasas durante 20 minutos en hielo. Vortear para resuspender el *pellet*.

10. Añadir 5µL de 100mM CaCl<sub>2</sub> y 3µL de Micrococcal Nucleasa (300 unidades) por cada 100µL de tampón C. Incubar durante 5 minutos a 37°C.

- Para una placa de 10mL al 80% de confluencia, añadir 100uL de tampón, para una placa de 5mL añadir 50uL y para una de 2mL añadir 25uL.

10. Centrifugar las células a 7800g 10min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de núcleo.





## **PROTOCOLO FRACCIONAMIENTO CELULAR KIT** **THERMOFISHER**

*Adaptado de Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells,*

*78840 Thermo Scientific*

### **Antes de empezar**

- El kit proporciona una tabla con los volúmenes recomendados para cada tamaño de pellet:

**Table 1. Reagent volumes for different packed cell volumes.\***

Packed Cell Volume (μL)	CEB (μL)	MEB (μL)	NEB (μL)
10	100	100	50
20	200	200	100
50	500	500	250
100	1000	1000	500

\*For HeLa cells,  $2 \times 10^6$  cells is equivalent to 20μL packed cell volume.

En mi caso he modificado los volúmenes ya que siempre se me contamina la fracción de membrana con núcleo, y he intentado disminuir esta contaminación al máximo.

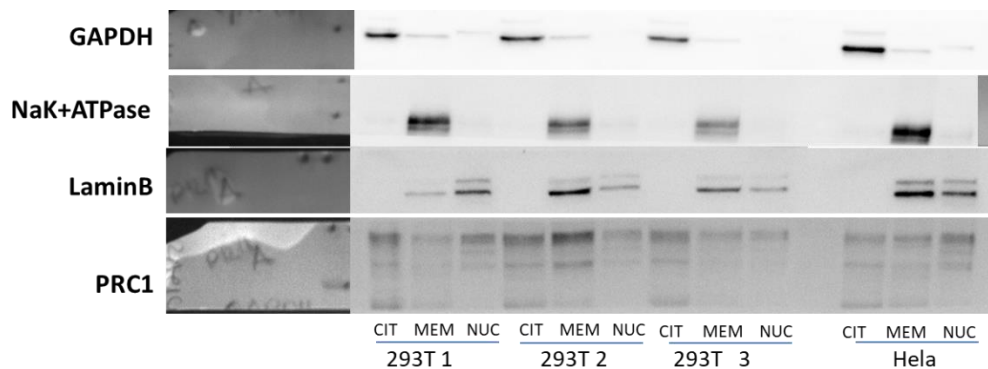
Para 1000000 células, que son unos 10uL de volumen de pellet (packed cell volume), utilizar 100uL de CEB, 50uL de MEB y 50uL. Si se quiere utilizar un número de células menor, de 500000 células, solo hay que reducir estos números a la mitad.

- Al preparar los tampones, añadir 1:100 inhibidores de proteasas.

### **Procedimiento**

1. Recoger las células mediante tripsinización y posterior bloqueo con medio suplementado con FBS.
2. Centrifugar las muestras y eliminar el sobrenadante para quedarnos con el pellet.
3. Lavar el pellet con PBS1x y volver a centrifugar para quedarnos con el pellet
  - El pellet se podrá recoger y guardar a -80°C o procesar en el momento.
4. Añadir el tampón CEB suplementado con inhibidores de proteasas. La cantidad de tampón de lisis dependerá de la línea celular y número de células.
5. Incubar con el tampón CEB durante 10 minutos en una noria a 4°C
6. Centrifugar las células a 500g 5min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de citoplasma.
  - Al recoger el sobrenadante tener mucho cuidado de no coger nada del *pellet* para evitar contaminaciones. Es recomendable recoger un poco menos de volumen de sobrenadante y el restante, apurarlo con una pipeta y desecharlo, para que quede el *pellet* muy seco.
7. Incubar con el tampón MEB suplementado de inhibidores de proteasas durante 5 minutos en hielo.

- Esta fracción es muy delicada ya que suele disolver las proteínas del núcleo. Por ello hemos reducido el tiempo de incubación a 5 minutos y solo se mezcla mediante pipeteo suave, nunca vorteo.
- Centrifugar las células a 3000g 5min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de membrana.
    - Al recoger el sobrenadante tener mucho cuidado de no coger nada del *pellet* para evitar contaminaciones. Es recomendable recoger un poco menos de volumen de sobrenadante y el restante, apurarlo con una pipeta y desecharlo, para que quede el *pellet* muy seco.
  - Finalmente se incuba con el tampón NEB suplementado de inhibidores de proteasas durante 20 minutos en hielo. Vortear para resuspender el *pellet*.
  - Añadir 5µL de 100mM CaCl<sub>2</sub> y 3µL de Micrococcal Nucleasa (300 unidades) por cada 100µL de tampón C. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
  - Centrifugar las células a 5000g 5min a 4°C y recoger el sobrenadante, que contendrá la fracción de núcleo.
  - Medir la cantidad de proteína con BCA.



**ESQUEMA DE NÚMERO DE CÉLULAS PARA  
SEMBRADO**

CONFLUENCIA 70-80%	p24				p6		
	24h	48h	72h	7 DIAS	24h	48h	72h
<b>283T</b>	30.000				300.000		
<b>A549</b>	80.000				300.000	250.000	200.000
<b>Hela</b>	80.000				300.000		
<b>HEP-3B</b>					300.000		
<b>HT-29</b>	200.000	150.000		20.000	500.000	400.000	300.000
<b>Huh-7</b>					600.000		
<b>LoVo</b>	150.000	125.000		50.000	600.000		
<b>MBA-MD-231</b>				30.000	500.000		
<b>MCF7</b>	150.000	125.000		30.000	600.000		






## **ANEXO 2: ARTÍCULOS**

---



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer

L. Gasa<sup>1</sup>, A. Sanchez-Botet<sup>1</sup>, E. Quandt<sup>1</sup>, S. Hernández-Ortega<sup>1</sup>, J. Jiménez<sup>1</sup>, M. A. Carrasco-García<sup>1,2</sup>, S. Simonetti<sup>1,2</sup>, S. J. Kron<sup>3</sup>, M. P. Ribeiro<sup>1</sup>, E. Nadal<sup>4</sup>, A. Villanueva<sup>5</sup> & J. Clotet<sup>1</sup>

As lung cancer has increased to the most common cause of cancer death worldwide, prognostic biomarkers and effective targeted treatments remain lacking despite advances based on patients' stratification. Multiple core cyclins, best known as drivers of cell proliferation, are commonly deregulated in lung cancer where they may serve as oncogenes. The recent expansion of the cyclin family raises the question whether new members might play oncogenic roles as well. Here, we investigated the protein levels of eight atypical cyclins in lung cancer cell lines and formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) human tumors, as well as their functional role in lung cancer cells. Of the new cyclins evaluated, CNTD2 was significantly overexpressed in lung cancer compared to adjacent normal tissue, and exhibited a predominant nuclear location. CNTD2 overexpression increased lung cancer cell viability, Ki-67 intensity and clonogenicity and promoted lung cancer cell migration. Accordingly, CNTD2 enhanced tumor growth *in vivo* on A549 xenograft models. Finally, the analysis of gene expression data revealed a high correlation between elevated levels of CNTD2 and decreased overall survival in lung cancer patients. Our results reveal CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer, suggesting value as a prognostic biomarker and therapeutic target in this disease.

Lung cancer is expected to be responsible for over 275,000 deaths in the European Union in the year of 2016, representing more than 20% of total cancer mortality<sup>1</sup>. Around 80% of lung cancers are non-small-cell lung cancers (NSCLC), whose management remains challenging despite recent advances based on tumor genetic stratification using relevant biomarkers, such as EGFR, ALK, ROS-1, MET and KRAS<sup>2</sup>. While surgery or radiotherapy can cure early stage, localized tumors, high rates of local and distant relapse still occur<sup>3</sup>. Even then, the majority of NSCLC patients are not candidates for surgery due to their advanced or metastatic disease at diagnosis<sup>4</sup>. Despite progress in targeted therapies, most NSCLCs do not present known targetable mutations. Only one in five NSCLC patients respond to the approved checkpoint blockade immunotherapies<sup>5</sup>. Therefore, a deeper understanding of the molecular alterations underlying lung cancer development and progression may contribute not only to the identification of therapeutic targets, but also to the establishment of new prognostic and predictive biomarkers.

Loss of growth control is a hallmark of cancer and a common target of cancer therapeutics. Progression through the cell cycle is regulated by members of the cyclin-dependent kinase family (CDKs), a group of highly conserved serine/threonine kinases that must associate with cyclin proteins to phosphorylate their substrates<sup>6</sup>. Cyclin binding provides each CDK with targeting domains that mediate substrate binding and determine sub-cellular localization, which in turn determine biological specificity. As such, specific cyclin-CDK complexes are associated with each major transition in the cell cycle. Many cancers display inappropriate expression of the canonical cell cycle cyclins. Here, they may serve as oncogenes by activating cell cycle CDKs to support deregulated cancer cell proliferation. In the case of lung cancer, upregulation of cyclin B1, which binds CDK1 to drive

<sup>1</sup>Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Pathology Department, Hospital Universitari General de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Chicago, USA. <sup>4</sup>Department of Medical Oncology and Program in Molecular Mechanisms and Experimental Therapeutics in Oncology, Catalan Institute of Oncology (ICO) Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Chemoresistance and Predictive Factors Group, Program Against Cancer Therapeutic Resistance (ProCURE), Catalan Institute of Oncology (ICO) Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. L. Gasa and A. Sanchez-Botet contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.P.R. (email: [mpontecardosoribeiro@uic.es](mailto:mpontecardosoribeiro@uic.es)) or J.C. (email: [jclotet@uic.es](mailto:jclotet@uic.es))



mitosis, was linked to a poor prognosis in NSCLC<sup>7</sup>. Likewise, decreased overall survival was observed in tumors overexpressing cyclin D1 which activates CDKs 4 and 6 in G1 phase<sup>8</sup>. In turn, EGFR inhibition downregulates cyclin D1, suggesting loss of cyclin-CDK activity may mediate effects of EGFR inhibitors<sup>9</sup>. Small molecules such as the approved agent palbociclib (Ibrance, Pfizer) and other cyclin D-CDK4/6 inhibitors demonstrate activity in multiple cancers including NSCLC, validating CDKs as therapeutic targets<sup>10,11</sup>.

Most studies of lung cancer initiation and progression have limited their analysis to the canonical cyclins such as cyclin D, ignoring many other expressed genes that encode a characteristic “cyclin box”, the ~150 residue domain that determines CDK binding<sup>12,13</sup>. While some of these “new” candidate cyclins are now known to bind the non-cell cycle CDKs that control transcription<sup>14</sup>, others remain “orphans”, where their CDK partner(s) remain to be identified<sup>15</sup>. Based on results from genetic model systems, some of these orphan cyclins are likely to serve regulatory roles in cell proliferation. Strikingly, the possible roles of non-canonical cyclins, including the orphan cyclins, remain largely unexplored in malignancies including lung cancer, and may lead to the development of innovative therapeutic strategies that complement cisplatin-based chemotherapy or CDK inhibitors.

Notably, previous analyses of altered gene expression in lung cancer have not identified orphan cyclins and being overexpressed or silenced. Nonetheless, the weak correspondence between the transcriptome and proteome often observed in normal cells also presents significant challenges in lung cancer<sup>16</sup>. The discordance likely reflects the importance of post-transcriptional control in determining cellular protein levels<sup>17,18</sup>. Given the many post-translational mechanisms that determine the abundance of canonical cyclins, we considered that a direct assessment of protein levels would be needed to detect altered expression of the orphan cyclins.

In the present work, we used immunodetection to probe expression of eight orphan cyclins in human lung cancer cell lines, as well as in resected NSCLC tumors and identified CNTD2 as commonly overexpressed in lung cancer. Studies in lung cancer cell lines and xenograft mouse models as well as patient data suggested altered expression of CNTD2 may have functional significance. Our work suggests that non-canonical cyclins such as CNTD2 have the potential to serve as oncogenes in lung cancer and have potential as prognostic markers in NSCLC.

## Results

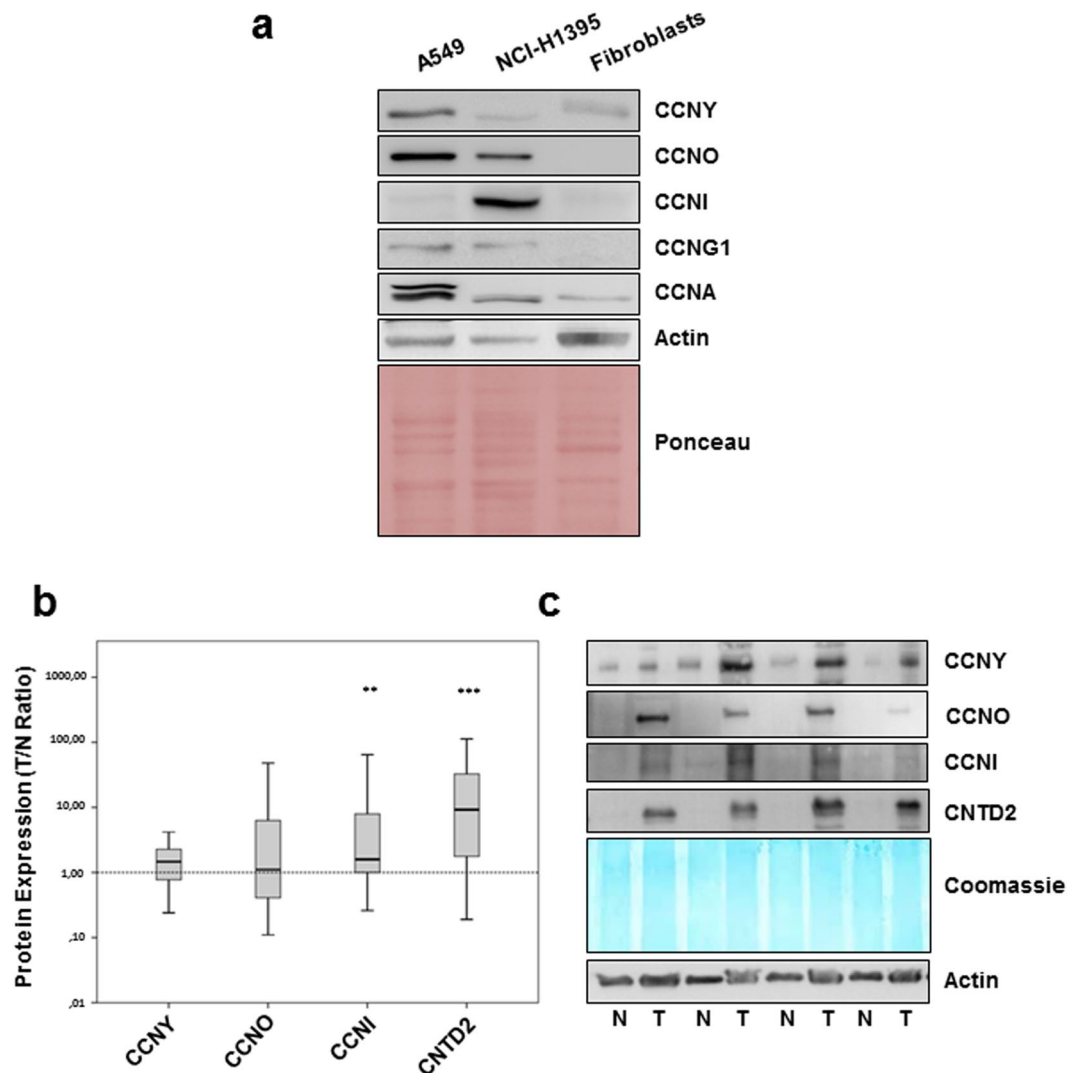
**The expression of CNTD2 and CCNI is increased in lung cancer tissues.** To investigate the potential role of orphan cyclins in lung cancer, the expression of CCNG1, CCNG2, CCNI, CCNO, CCNY, CNTD1, CNTD2 and SPY1 was investigated in two lung adenocarcinoma cell lines, A549 and NCI-H1395, relative to a primary culture of human fibroblasts by Western blot (Fig. 1a) using antibodies validated against recombinant proteins (Supplementary Fig. S1). Examining expression of the canonical CCNA, as a positive control, revealed CCNA is up-regulated in both cancer cell lines, and particularly in A549 cells, relative to the normal fibroblasts (Fig. 1a). Expression of CNTD1, CNTD2, CCNG2, or SPY1 was undetectable in the tumor or normal cells (Supplementary Fig. S2a). However, compared to normal fibroblasts, expression of CCNY, CCNO and CCNG1 was higher in A549 cells while levels of CCNO, CCNG1 and CCNI were higher in NCI-H1395 cells (Fig. 1a). These results indicate that the expression of some orphan cyclins might be misregulated in lung cancer and that the pattern of their expression is cell type-specific. These observations were further supported by comparing the expression of orphan cyclins in NCI-H1395 cells and in the human lung fibroblast MRC-5 cell line (Supplementary Fig. S2b).

In order to further investigate the orphan cyclin expression in lung cancer, Western blot analysis was performed in 43 formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) human lung cancer samples and paired adjacent non-tumor lung tissue. Patient characteristics are summarized in Supplementary Table S1. The expression ratio between tumor and normal tissues (T/N ratio) was determined after normalization using Coomassie staining of the membrane. Median protein expression of CCNY, CCNO, CCNI, and CNTD2 was higher in lung cancer than normal lung tissue, but statistical significance was only found for CCNI and CNTD2 (Fig. 1b and c). The 17 kDa isoform of CNTD2 described by Uniprot was also expressed, but no difference was observed between normal and tumor tissue (data not shown).

Confirming the results obtained of Western analysis, examining six pairs of lung cancer and paired adjacent normal tissue by immunohistochemistry demonstrated positive staining for CNTD2, CCNO and CCNI while adjacent normal lung was generally negative (Fig. 2). A weak signal of CCNY was detected in both tumor and normal tissues (Fig. 2). CNTD2 was predominantly localized to the nuclei of tumor cells, while the CCNI localized to the nuclear membrane and CCNO appeared concentrated in nucleoli.

**Overexpression of CNTD2 and CCNI enhances the proliferation of lung cancer cells.** To examine potential roles for orphan cyclins in cancer cell growth or survival, A549 cells were transduced with empty lentiviral vector (control) or constructs expressing CCNI, CCNO, CCNY or CNTD2 (Fig. 3). Flow cytometry to detect GFP expression from lentivirus indicated an infection efficiency above 85% (data not shown) while Western blot confirmed overexpression (Fig. 3a). Cell viability evaluated by MTT assay 5 days after transduction revealed a significant impact of CCNI and CNTD2 overexpression on cell viability (Fig. 3b). Suggesting an effect on cell proliferation, A549 cells overexpressing CCNI and CNTD2 exhibited significantly higher Ki-67 staining (Fig. 3c and d). On the other hand, the expression of caspase-9 was monitored by western blot in A549 cells overexpressing CNTD2 and CCNI, and no significant alterations were found relative to control (Supplementary Fig. S3). Overexpression of CCNI and CNTD2 also increased clonogenicity of A549 cells, although statistical significance was only found for CNTD2 (Fig. 3e and f). Examining effects on cell survival, A549 cells overexpressing CCNI were also slightly less sensitive to cisplatin, gefitinib, and paclitaxel while overexpression of CNTD2 had little or no effect (Supplementary Fig. S4).

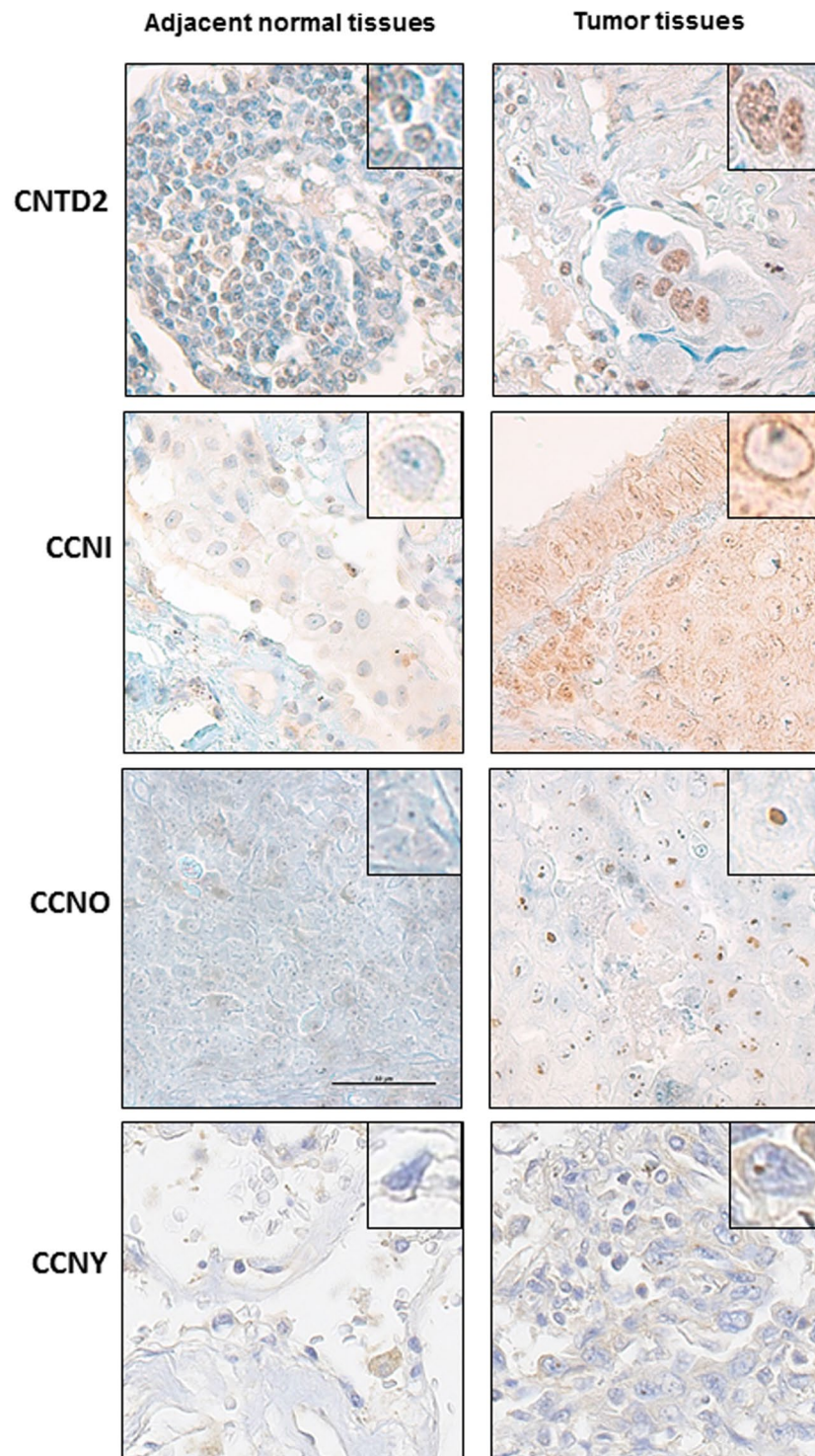
**The overexpression of CNTD2 promotes lung cancer cell migration.** To explore potential links between orphan cyclin expression and metastasis, we determined the T/N ratio for each cyclin in tumors from



**Figure 1.** CNTD2 and CCNI are overexpressed in human lung cancer tissues. The expression of orphan cyclins was evaluated by western blot analysis. **(a)** Representative images of the expression of orphan cyclins in human lung adenocarcinoma cell lines, A549 and NCI-H1395, and in normal fibroblasts. **(b)** The protein expression of orphan cyclins in human FFPE lung cancer tissues and paired-adjacent non-tumor lung tissue is presented as box plots of the expression ratio between tumor and normal lung tissues (T/N ratio), where the whiskers indicate the range of the data and the horizontal bars represent the median ( $n = 43$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs normal tissues, Wilcoxon test. **(c)** Representative images of the orphan cyclins protein expression in human normal (N) and tumor (T) FFPE lung tissue.

patients with metastasis (M1) and without metastasis (M0). The T/N expression ratio of CCNO and CNTD2 was higher among patients with distant metastasis, but statistical significance was only found for CNTD2 (Fig. 4a). Although further studies with a large number of patients are required to confirm this observation, this exploratory investigation prompts us to test the potential effects of CNTD2 on cancer cell motility. For this purpose, confluent monolayers of A549 cells overexpressing CCNO or CNTD2 were scratched and wound closure determined 48 h later. A549 cells infected with empty vector were used as controls and reduced FBS media was used to suppress cell proliferation. As shown in Fig. 4b and c, migration of A549 cells overexpressing CNTD2 was significantly increased in comparison to control cells while CCNO did not significantly affect cell migration. Similarly, transwell assays demonstrated greater migration of A549 cells overexpressing CNTD2 to the lower chamber compared with control (Fig. 4d and e). Toward exploring potential mechanisms, we examined effects of CNTD2 upregulation on expression of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers. A549 cells overexpressing CNTD2 expressed significantly lower levels of E-cadherin but N-cadherin was slightly increased (Supplementary Fig. S5), indicating CNTD2 might influence the EMT.

**High levels of CNTD2 are associated with enhanced tumor growth *in vivo* and decreased overall survival of lung cancer patients.** In order to investigate the effect of CNTD2 expression on lung cancer growth *in vivo*, we examined xenografts in nude mice formed by injection of A549 cells infected with empty

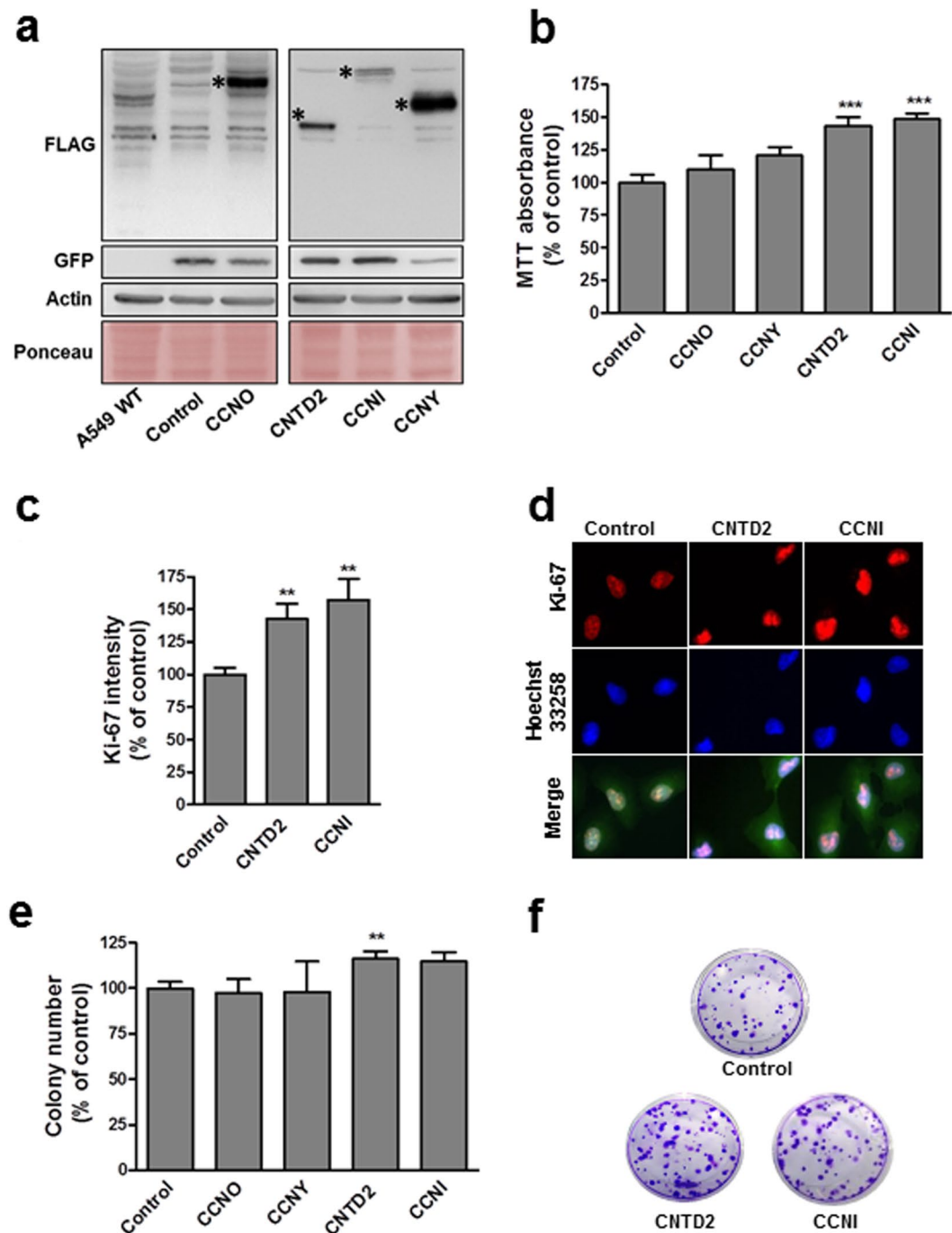


**Figure 2.** Cellular location of overexpressed orphan cyclins in human lung tissues. Representative images of the immunohistochemical staining of human lung adenocarcinoma samples with CNTD2, CCNI, CCNY and CCNO antibodies. Adjacent normal tissues were used as a control. Magnification 60x. The square reveals a detail of a representative cell with a magnification of 100x.

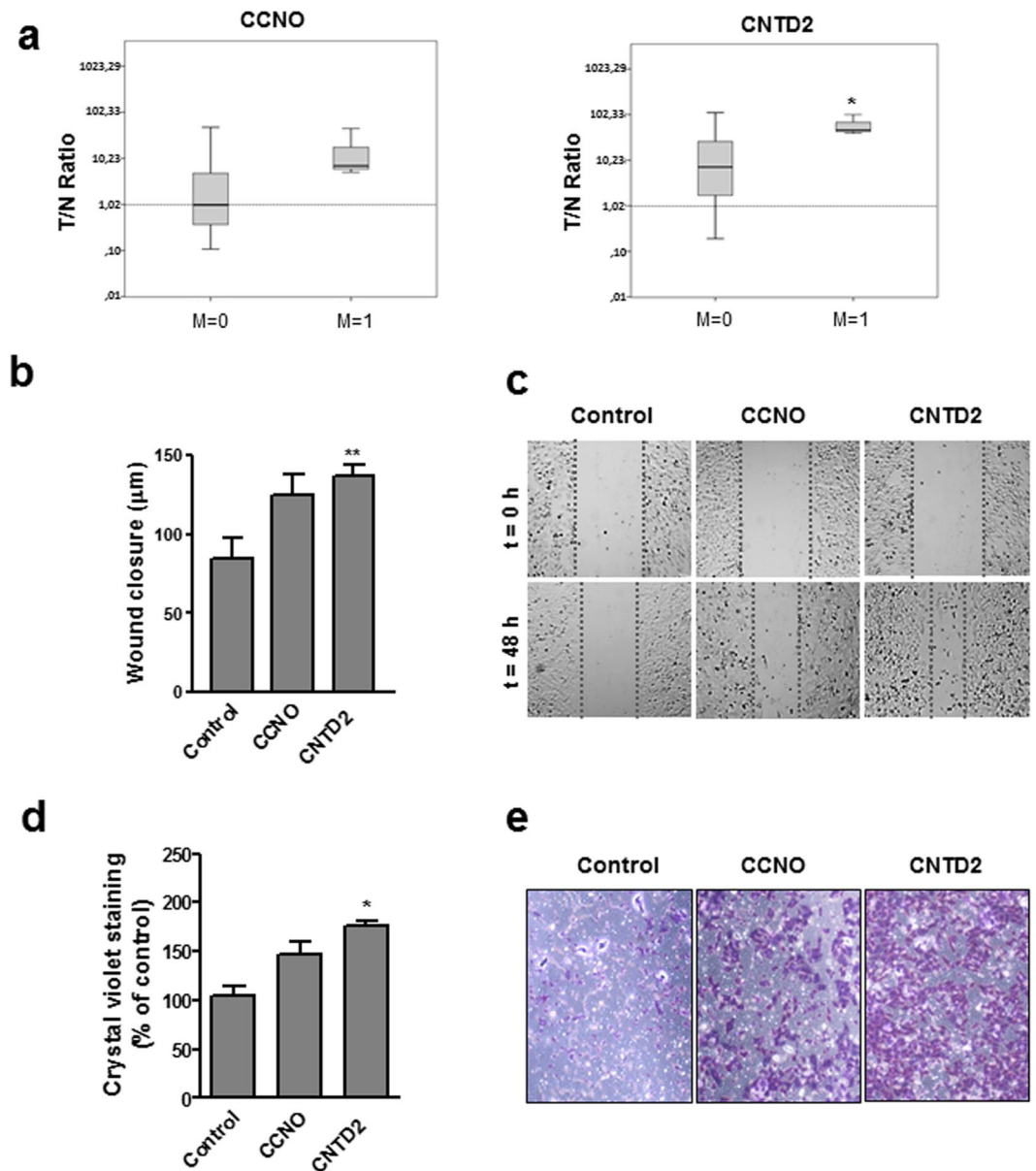
vector (control) or overexpressing CNTD2. As shown in Fig. 5, A549 cells overexpressing CNTD2 formed faster growing tumors.

Finally, the prognostic value of CNTD2 gene expression in a large set of lung cancer patients was assessed. We used Kaplan-Meier Plotter to compare overall survival of patients stratified according to levels of CNTD2 expression. High CNTD2 expression correlated with reduced overall survival (Fig. 6a). A similar analysis of ovarian,





**Figure 3.** Overexpression of CCNI and CNTD2 increases the proliferation of A549 cells. A549 cells were infected with empty lentiviral vector (control) or with the indicated cyclin-overexpressing construct. **(a)** Western blot analysis confirmed cell infection (the asterisks show the expected band size). The flag indicates the protein expression level, the GFP the infection level and both the ponceau and the actin are used as loading controls. **(b)** A549 cell viability was evaluated by the MTT assay. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments performed in quadruplicates. \*\*\* $P < 0.001$  vs control, Mann-Whitney test. **(c)** The proliferation of A549 cells was evaluated by ki-67 immunostaining. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*\* $P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. **(d)** Representative images of A549 cells immunostained for ki-67. Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33258 and merged images are shown in the bottom row. **(e)** Efficiency of cell colony formation of A549 cells. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed in quintuplicates. \*\* $P < 0.01$ , vs control, Mann-Whitney test. **(f)** Representative images of the colony formation assay.

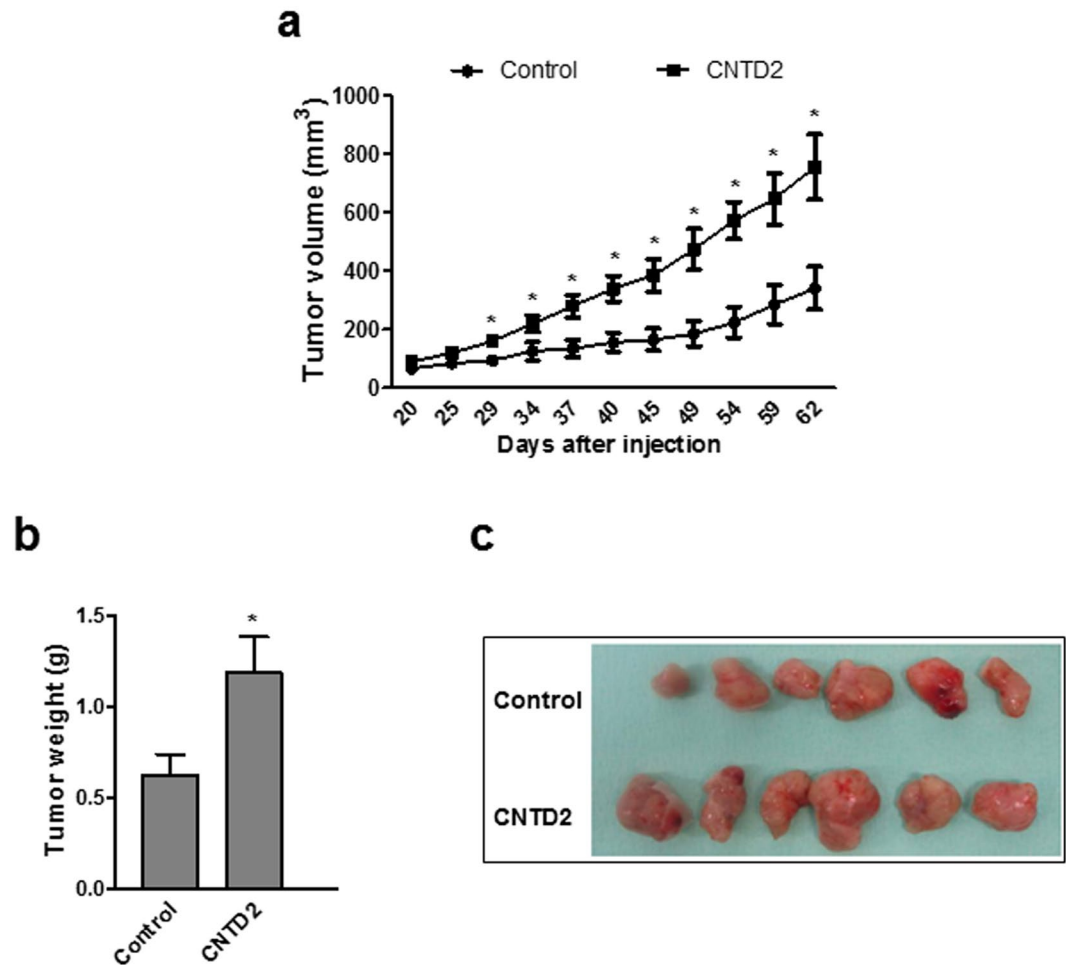


**Figure 4.** Overexpression of CNTD2 enhances the migration of A549 cells. **(a)** The T/N ratio of CCNO and CNTD2 was evaluated in FFPE lung tissue samples obtained from patients with (M1,  $n = 3$ ) and without metastasis (M0,  $n = 40$ ) and is represented as box plots.  $*P < 0.05$ , when compared to normal tissues, Mann-Whitney test. **(b)** The migration of A549 cells was evaluated by the wound assay and the results are expressed as wound closure in  $\mu\text{m}$ . The columns represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicates.  $**P < 0.01$  vs control, Mann-Whitney test. **(c)** Representative images of the wound assay were acquired at 0 and 48 h; the dotted lines define the areas lacking cells. **(d)** A549 cell migration was monitored by the transwell assay and estimated by quantifying the crystal violet staining intensity measured as the absorbance at 595 nm. The columns represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed in triplicate.  $*P < 0.05$  vs control, Mann-Whitney test. **(e)** Representative images of the transwell assay after crystal violet staining.

breast, and gastric cancer revealed that high CNTD2 expression also predicted shorter overall survival but only for gastric cancer (Fig. 6b).

## Discussion

The management of lung cancer remains a major challenge given that it is often diagnosed at an advanced stage of the disease that has a dismal prognosis. As the oncogenesis of lung cancer involves multiple molecular alterations, the development of new biomarkers would be helpful to guide treatment selection, as well as to avoid unnecessary toxicity and to improve the outcomes<sup>5</sup>. In the present study, we conducted an unbiased screening of the protein



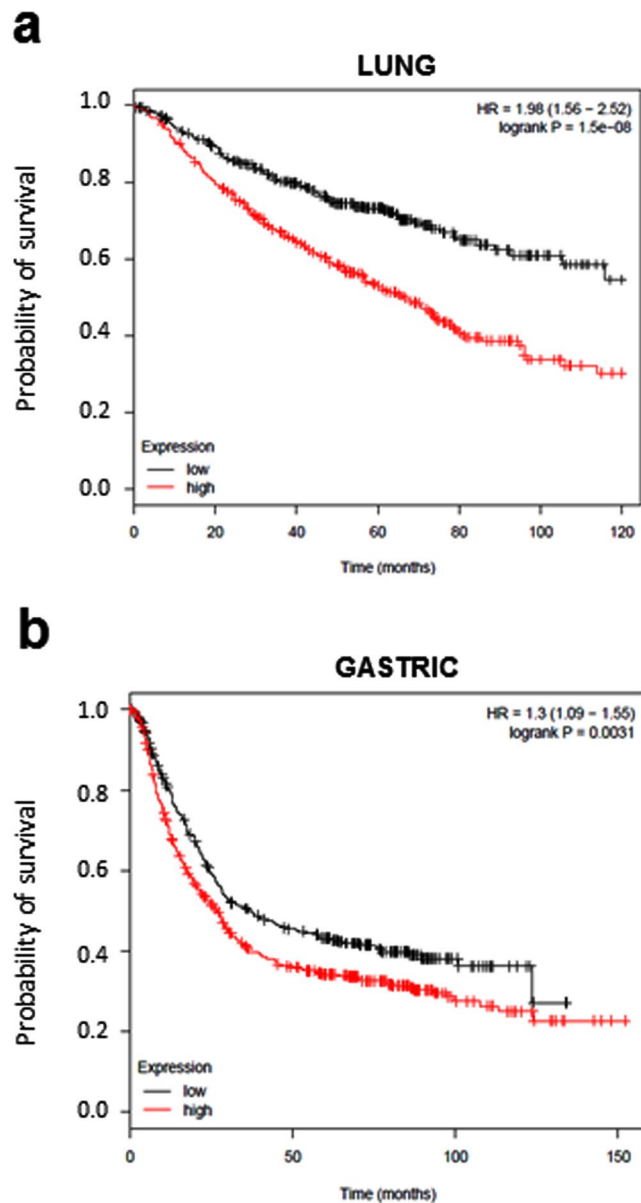
**Figure 5.** CNTD2 overexpression significantly enhances tumor growth *in vivo*. **(a)** The tumor volumes were measured at the indicated number of days after mice were transplanted with A549-empty vector (control) and A549-CNTD2 ( $n = 7$ ). \* $P < 0.05$ , vs control, Mann-Whitney test. **(b)** At day 62, the tumors were resected and weighed. \* $P < 0.05$ , vs control, Mann-Whitney test. **(c)** Representative images of the tumors resected at day 62 obtained from A549-empty vector (control) and A549-CNTD2 cell-transplanted mice.

levels of eight orphan cyclins in lung cancer tissues, which revealed that some are deregulated and might be important factors in lung cancer development.

In our samples of FFPE tissues, we were unable to detect the expression of CCNG1, CCNG2, CNTD1 and SPY1 (Supplementary Fig. S2a). Interestingly, the Kaplan-Meier plots indicate that the overexpression of these cyclins is not associated with a worse prognosis of lung cancer patients (Supplementary Fig. S6a). On the contrary, high levels of CCNG1 were correlated with an increased overall survival of these patients (Supplementary Fig. S6a), pointing the high expression of CCNG1 as a good prognostic factor in lung cancer.

Moreover, according to the Kaplan-Meier Plotter database, CCNO upregulation is significantly associated with a reduced overall survival of lung cancer patients (Supplementary Fig. S6a), suggesting that CCNO is another orphan cyclin involved in the malignancy of the disease. However, we could not find a correlation between CCNO overexpression and the proliferation phenotype or the migration ability in A549 cells (Figs 3 and 4); indeed, although the upregulation of CCNO slightly increases the migration of A549 cells, no statistical significance was found in our experimental setting (Fig. 4). Taken together, these results indicate that CCNO might be implicated in processes other than the proliferation and migration of lung cancer cells. Accordingly, it was reported that CCNO is an important element for the physiology of lungs, and that mutations in the CCNO gene result in congenital lung disease affecting the multiciliated lung cells<sup>19</sup>.

In the present study, we found no statistical difference regarding the expression of CCNY in healthy and tumor tissues (Fig. 1b and c). In line with this observation, the expression of this protein does not correlate with the overall survival of lung cancer patients (Supplementary Fig. S6a), suggesting that CCNY might not play a role in lung cancer disease. On the other hand, the role of CCNY is clearly established in certain tumors, such as glioma<sup>20</sup> and ovarian cancer<sup>21</sup> indicating that its role in tumorigenesis might be tissue-specific. While previous reports have shown that CCNY is overexpressed in samples obtained from NSCLC patients<sup>22</sup>, we were unable to detect overexpression of CCNY in our samples (Fig. 1b and c). Since the work conducted by Yue *et al.*<sup>22</sup> determined the



**Figure 6.** Prognostic value of CNTD2 on lung cancer survival. Kaplan-Meier plots were built using the Kaplan-Meier plotter software (<http://kmplot.com/lung/>). The overall survival of (a) lung cancer (n = 726) and (b) gastric cancer patients (n = 867) of all subtypes expressing different levels of CNTD2 is shown. Red colored lines represent the patients with high gene expression, while black colored lines represent patients with low gene expression. The hazard ratio (HR) with 95% confidence intervals, as well as the logrank P-values are shown.

levels of CCNY mRNA, while we measured the protein levels, these conflicting results may reflect the different readouts, in agreement with the observation that the protein expression in lung adenocarcinomas does not always correlate with the levels of the corresponding mRNA<sup>16</sup>, highlighting the importance of measuring the protein levels in this disease.

Our study detected that CCNI is upregulated at the protein level in human samples of NSCLC (Fig. 1b and c). Moreover, the overexpression of this cyclin increased the proliferation of A549 cells, as suggested by the results of the MTT assay (Fig. 3b) and ki-67 staining (Fig. 3c and d), unveiling a role for this cyclin in lung cancer cell proliferation. Interestingly, CCNI overexpression was also associated with worse response to anticancer agents (Supplementary Fig. S4), which is in agreement with the observation that CCNI promotes resistance to cisplatin in cervical cancer<sup>23</sup>. In our study, the resistance provided by CCNI seems to be unrelated with the chemical structure of the drugs, and further studies are now warranted to clarify whether multidrug resistance proteins might be implicated in this response. Moreover, CCNI was linked to angiogenesis in ovarian<sup>24</sup> and breast cancers<sup>25</sup>, suggesting that its role in cancer may go beyond cell proliferation. Remarkably, the Kaplan-Meier analysis did not find a correlation between CCNI overexpression and the overall survival of lung cancer patients of all histopathological types, but statistical significance could be found when the same analysis was performed only in

patients with adenocarcinoma (Supplementary Fig. S6b). Given the variability in lung cancers, it is plausible that CCNI may have a relevant role in some lung cancer subtypes; indeed, the two adenocarcinoma cell lines analyzed display significant differences regarding CCNI expression relative to normal human fibroblasts (Fig. 1a).

Our results show that CNTD2 is important for both the proliferation and migration of A549 cells (Figs 3 and 4), and suggest that it may enhance lung cancer cell migration by promoting the EMT (Supplementary Fig. S5). The association between CNTD2 expression and a more aggressive phenotype was further corroborated by the results obtained *in vivo* (Fig. 5), as well as by the dramatic correlation between high levels of CNTD2 and a decreased overall survival of a large set of lung cancer patients (Fig. 6).

Interestingly, our results represent a new piece of information that has remained undetected by the analysis of large-scale genomic datasets screenings, such as the one provided by the web-based resource cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org><sup>26</sup>), which reported a low frequency of CNTD2 alterations in cancer. Likewise, the website-based software Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/lung/><sup>27</sup>) indicates similar levels of mRNA of CNTD2 in normal and lung cancer tissues. On the other hand, the Oncomine database (<http://www.oncomine.org>) demonstrates that high levels of CNTD2 mRNA are present in lung cancer tissues (Supplementary Fig. S7a), in line with our findings (Fig. 1b and c). Although we did not measure the levels of mRNA in our samples, these conflicting evidences reinforce the need to monitor the final product of gene expression, rather than the intermediate.

Strikingly, we were unable to detect CNTD2 protein expression in lung cancer cell lines (Supplementary Fig. S2a). According to the Expression Atlas database (<https://www.ebi.ac.uk>), CNTD2 is expressed in a few lung cancer cell lines (Supplementary Fig. S7b). While A549 cells present low levels of mRNA, the NCI-H1395 cells are among those showing higher levels of CNTD2 mRNA (Supplementary Fig. S7b), but the level of protein expression is still not appreciable to allow the antibody detection (Supplementary Fig. S2a). Such observations may suggest that CNTD2 expression is differentially regulated in cultured cells as compared with tissues.

CNTD2 is probably the less characterized of the orphan cyclins. While little is known about the cellular functions of CNTD2, its predominant nuclear location (Fig. 2) may implicate CNTD2 in transcription regulation as described for other cyclins. On the other hand, its name (CNTD2 stands for Cyclin N-terminal domain-containing protein 2) shows that this protein contains a cyclin box domain and, hence, that it might interact with some CDK. We have tried to detect the partners of CNTD2 by immunoprecipitation coupled to mass spectrometry, but we have not yet been able to identify any CNTD2-associated CDK (Ribeiro *et al.*, unpublished observations). Therefore, whether this still orphan cyclin performs its nuclear function alone or in association with a CDK remains to be elucidated.

Here we report that CNTD2 is upregulated in human lung cancer tissues and correlates with worse prognosis. Our findings suggest that CNTD2 is an oncogenic driver in lung cancer, and further studies that may shed some light on the physiological and pathological role of CNTD2 are now warranted. Interestingly, CNTD2 does not seem to be expressed in normal tissues<sup>28</sup>, suggesting that this cyclin may represent a specific target for future therapies. The identification of CNTD2 interactors would possibly pave the way for the development of new therapeutic strategies targeting CNTD2.

## Methods

**Clinical samples.** Lung cancer tissue samples and adjacent non-tumor lung tissue were obtained from 43 patients diagnosed with NSCLC at the Hospital Universitari General de Catalunya and Hospital Universitari Sagrat Cor. For inclusion in this study, a patient must have had a diagnosis of primary lung cancer and did not receive chemotherapy or radiation therapy before surgery. The samples were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin (FFPE) according to routine procedures at these hospitals. Histologically, the tumors were classified according to the 2015 World Health Organization histologic classification of lung cancers and were reviewed by the same pathologist. Among the 43 samples, 28 were adenocarcinomas and 15 were squamous cell carcinomas. The tumors were staged using the TNM staging system and the patients' characteristics are summarized in Supplementary Table S1. This study was approved by the Comitè Ètic de Investigació Clínica (CEIC) de idcsalud Hospital General de Catalunya and carried out in accordance with the approved guidelines. The requirement to obtain informed consent was waived by the Ethics Committee because of the retrospective nature of the study, but an informed consent was obtained from living patients.

**Cell lines and Reagents.** The human lung adenocarcinoma cell lines A549 (purchased in 2014 from Sigma-Aldrich) and NCI-H1395 (purchased in 2016 from ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich). The human lung fibroblast cell line MRC-5 was purchased from ATCC in 2016 and cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC). Cells were used for no more than 5 passages after thawing. The media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). The cells were kept at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Cisplatin, paclitaxel and gefitinib were purchased from Sigma-Aldrich. Mycoplasma contamination was monitored periodically.

**Protein extraction from FFPE tissues.** Sample blocks consisting of >80% tumor tissue were selected along with paired normal controls. Following standard methods for protein extraction<sup>29, 30</sup>, tissue sections (10 μm) were deparaffinized and rehydrated. After incubation on ice with 100 μl of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH = 8.8, 200 mM DTT, 2% SDS) for 5 min, and placed at 100 °C for 20 min. Then, samples were placed on a thermomixer for 2 h, at 80 °C and 750 rpm. Afterwards, the samples were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was collected for subsequent analysis.



**Protein extraction from human cell lines.** Cultured human cell lines were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and placed on lysis buffer, containing 20 mM TRIS, 5 mM EDTA, 1% NP40 (IGEPAL CA-630), 150 mM NaCl, pH 7.4, supplemented with Pierce Phosphatase Inhibitor Mini tablets (#88667, Thermo Fisher Scientific) and with Pierce Protease Inhibitor tablets (#88266, Thermo Fisher Scientific). Extracts were sonicated and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatants collected.

**Western blot analysis.** Protein concentration was quantified by Bradford assay (BioRad). Gel samples were denatured at 90 °C for 5 min and 25 µg of total protein was separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). All the information regarding the commercial primary antibodies used is indicated in Supplementary Table S2. After blocking, the membranes were incubated with the primary antibody in TBS-T + 5% non-fat milk overnight at 4 °C. After extensive washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse, -rabbit, and -goat IgG secondary antibodies (Jackson Laboratories) for 1 h at room temperature. After additional washes, the membranes were developed using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) following manufacturer's instructions, and images were taken with GeneSnap (Syngene). The density of the bands was analyzed using the Image Studio Lite (Li-Cor) software.

**Validation of antibodies.** Human orphan cyclins were cloned in pGBKT7 vector (Clontech) as Gal4 DNA-binding domain (DNA-BD) fusion proteins, which were expressed in the yeast strain AH109. Western blot analysis against both the Gal4 DNA-BD and the corresponding cyclin confirmed the validity of the antibodies (Supplementary Fig. S1).

**Immunodetection.** Immunohistochemical staining of FFPE samples was performed on 4 µm sections using a BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems Inc.). The following polyclonal antibodies were used: CNTD2 (ab179781, Abcam) at a dilution of 1:100; CCNO (ab47682, Abcam) at a dilution of 1:100; CCNI (H-279, Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:50; and CCNY (ab114086, Abcam) at a dilution of 1:100. The sections were introduced in the stainer and automatically deparaffinized with the reactive EZ-PREP and treated with CC2 cell conditioning 6.1 for antigen retrieval for 30 min at 95 °C. After incubation with antibodies, immunoreactivity was detected with Kit uView DAB with diaminobenzidine (DAB) as a chromogen and counterstained with hematoxylin. Appropriate controls were included. For protein staining, two categories were recorded: negative and positive; only convincing staining was designated as positive.

For Ki-67 analysis, A549 infected cells were seeded on poly-L-lysine coated coverslips in 24 well plates at a density of 25,000 cells per well and, after 24 h, the cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde at 4 °C for 15 min. Afterwards, the cells were blocked with PBS containing 0.1% Triton and 10% horse serum for 1 h, followed by incubation with Ki-67 antibody (556003, BD Pharmingen) diluted at 1:200 for 1 h at room temperature. The coverslips were washed several times with PBS and incubated for 1 hour at room temperature with anti-mouse fluorescent secondary antibody at 1:1,000 dilution in the dark. After additional washes with PBS, the nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (14530, Sigma-Aldrich) and the slides coverslipped. Image analysis was performed using NIS-Elements AR 4.13.04 software. Between 50 and 70 cells were analyzed per condition.

**Viral cloning and transduction.** To engineer lentiviral constructs expressing the cyclins under investigation, human cDNA of CCNO, CCNI and CCNY were amplified from HT-29 cells with a C-terminal FLAG tag. CNTD2 was purchased as a gBlock (IDT) based on Ensembl sequence ENST00000430325.6. The primer sequences used in this study are indicated in the Supplementary Table S3.

All the sequences were cloned into pWPI lentiviral expression vector (#12254, Addgene) at the *PmeI* restriction site. For lentivirus production, 45 µg of lentiviral expression vector were cotransfected with 12.9 µg of pMD2.G and 29.1 µg of psPAX2 into HEK293-T cells in 10 cm plates using calcium phosphate. The virus-containing supernatant was collected at 24 h and 48 h post-transfection, and concentrated using the Sartorius VS2042 Vivaspin 20 concentrator (Sartorius) and the viral titer determined. For overexpression studies, A549 cells were infected with 10 MOI of lentivirus.

**Cell viability and colony formation assays.** Cell viability was evaluated by MTT assay. Cells were grown in 48 well plates at a density of 1,500 cells per well. Seventy-two hours later, the cells were infected, and after 5 days the cells were incubated with MTT solution (Sigma) for 1 h, at 37 °C. Formazan crystals were dissolved in DMSO and quantitated by measuring the absorbance in a Synergy HT plate reader at 570 nm. The reduction of MTT is expressed as percentage of the absorbance value obtained in the control which was considered 100%. For experiments using anti-cancer agents, cells were seeded in 24 well plates at a density of 60,000 cells per well, and after 24 h the cells were treated with cisplatin, paclitaxel, or gefitinib. MTT assay was performed as described above 72 h later.

For colony formation assay, A549 cells were seeded into 6 well plates at a density of 100 cells per well and cultured for two weeks. Colonies were fixed with 100% cold methanol, washed with PBS and stained with 0.1% crystal violet for 30 min at room temperature. The number of colonies was determined and survival calculated as a percentage of the control.

**Wound healing and transwell migration assays.** For wound healing assay, cells were seeded into 24 well plates at a density of  $2.5 \times 10^5$  of cells per well and grown to confluency. The cell monolayer was scratched with a 10 µl pipette tip, washed with PBS to remove detached cells from the plates, and incubated in DMEM containing 0.5% FBS. Images were acquired at 0 and 48 h under a 4× magnification and the distance between one side of the wound and the other was measured using ImageJ. Cell migration was determined by calculating the wound closure, which corresponds to the difference between the size of the wound at 0 h and at the indicated time point, and it is expressed as µm.

For migration assays, cells were seeded into the upper chamber of an 8 µm pore size insert (Corning) in an uncoated 24 well plate at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well. The cells were cultured in DMEM containing 0.5% FBS, and allowed to migrate to the lower compartment containing DMEM 10% FBS for 18 h. The nonmigratory cells on the surface of the upper chamber were removed with a cotton tip, and the migratory cells attached to the lower membrane surface were fixed with cold methanol for 15 min at 4 °C and stained with 0.1% crystal violet for 30 min at room temperature. Cells were imaged under a 10× objective. To estimate the number of cells in the lower compartment, the crystal violet dye was dissolved using acetic acid at 10% and absorbance was measured at 595 nm. The crystal violet staining intensity is expressed as percentage of the absorbance value obtained in the control which was considered 100%.

**Tumor xenografts.** Athymic nude mice male (Crl:NU-Foxn1nu) (n = 7) at 5-weeks-old male (Envigo, Italy) of age were subcutaneously injected in each flank with a total of  $3 \times 10^6$  A549-empty vector or A549-CNTD2-transfected cells soaked in 100 µL of Matrigel (BD Biosciences). Tumor growth was monitored by measuring tumor width (W) and length (L) until mice were killed, 62 days after injection. After allowing them to grow for several weeks, tumor volume (mm<sup>3</sup>) was estimated from the formula  $V = \pi/(6 \times L \times W^2)$  and at the mice sacrifice the tumors were dissected out and weighed (g). All mouse experiments were approved by the IDIBELL Animal Care Committee and the methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

**Kaplan-Meier analysis.** For survival analyses, the overall survival of patients divided into low and high expression groups according to the median expression of the gene of interest was presented as Kaplan-Meier plots. The analysis was conducted as described (<http://kmpplot.com/lung/>) selecting only patients with surgical margins negative and tested for significance by two-tailed log rank t test<sup>27</sup>.

**Statistical analysis.** Unless otherwise stated, data are represented as the mean ± standard error of the mean (SEM) with P-values: \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01; \*P < 0.05. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test, except for the expression ratio between tumor and normal tissues which was analyzed using the Wilcoxon test. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5 and the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.

## References

- Malvezzi, M. *et al.* European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Ann. Oncol.* **27**, 725–731 (2016).
- Korpanty, G. J., Graham, D. M., Vincent, M. D. & Leighl, N. B. Biomarkers that currently effect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1 and KRAS. *Front. Oncol.* **4**, 204 (2014).
- Goldstraw, P. *et al.* Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* **378**, 1727–1740 (2011).
- Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y.-W. & Buchanan, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim. Biophys. Acta* **1856**, 189–210 (2015).
- Olaussen, K. A. & Postel-Vinay, S. Predictors of chemotherapy efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer: a challenging landscape. *Ann. Oncol.* **27**, 2004–2016 (2016).
- Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166 (2009).
- Cooper, W. A. *et al.* Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology* **55**, 28–36 (2009).
- Sterlacci, W. *et al.* Deregulation of p27 and cyclin D1/D3 control over mitosis is associated with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer, as determined in 405 operated patients. *J. Thorac. Oncol.* **5**, 1325–1336 (2010).
- Kobayashi, S. *et al.* Transcriptional profiling identifies cyclin D1 as a critical downstream effector of mutant epidermal growth factor receptor signaling. *Cancer Res.* **66**, 11389–11398 (2006).
- Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M. & Bischoff, J. R. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 16–21 (2008).
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C. & Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 130–146 (2015).
- Murray, A. W. & Marks, D. Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature* **409**, 844–846 (2001).
- Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630–641 (2005).
- Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* **15**, 122 (2014).
- Mikolcevic, P., Rainer, J. & Geley, S. Orphan kinases turn eccentric: A new class of cyclin Y-activated, membrane-targeted CDKs. *Cell Cycle* **11**, 3758–3768 (2012).
- Chen, G. *et al.* Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 304–313 (2002).
- Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
- Li, L. *et al.* Integrated omic analysis of lung cancer reveals metabolism proteome signatures with prognostic impact. *Nat. Commun.* **5**, 5469 (2014).
- Wallmeier, J. *et al.* Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat. Genet.* **46**, 646–651 (2014).
- Xu, Y. *et al.* Lentivirus-mediated knockdown of cyclin Y (CCNY) inhibits glioma cell proliferation. *Oncol. Res.* **18**, 359–364 (2010).
- Liu, H., Shi, H., Fan, Q. & Sun, X. Cyclin Y regulates the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells via Wnt signaling pathway. *Tumor Biol.* **37**, 10161–10175 (2016).
- Yue, W. *et al.* Cell cycle protein cyclin Y is associated with human non-small-cell lung cancer proliferation and tumorigenesis. *Clin. Lung Cancer* **12**, 43–50 (2011).
- Li, R., Liu, G. Z., Luo, S. Y., Chen, R. & Zhang, J. X. Cyclin I promotes cisplatin resistance via Cdk5 activation in cervical cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **19**, 4533–4541 (2015).
- Cybulski, M. *et al.* Cyclin I correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **127**, 217–222 (2012).
- Landberg, G. *et al.* Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression. *Breast Cancer Res. Treat.* **89**, 313–316 (2005).
- Gao, J. *et al.* Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p11 (2013).
- Gyorffy, B., Surowiak, P., Budczies, J. & Lánckzy, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **8**, e82241 (2013).

28. Petryszak, R. *et al.* Expression Atlas update - An integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.* **44**, D746–D752 (2016).
29. Guo, H. *et al.* An efficient procedure for protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for reverse phase protein arrays. *Proteome Sci.* **10**, 56 (2012).
30. Addis, M. F. *et al.* Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics* **9**, 3815–3823 (2009).

### Acknowledgements

This work was supported by funding from the Spanish Government, MINECO (grant Ref: BFU 2013-44189-P) and the Fundació La Marató de TV3 (project number 20131010). The authors wish to acknowledge Marta Pérez, Dylan Beckwith and Laura Cívico for technical support. We thank Nuria Casals for valuable scientific discussion and Pau Mezquita for his kind collaboration in the preliminary design of the project. We also thank Marc Campayo from the Hospital Universitari Mutua Terrassa for the helpful discussion of the results.

### Author Contributions

L.G., A.S.B., E.Q., S.H.O., M.A.C.G., S.S., E.N., A.V., M.P.R. and J.C. designed the experiments. L.G., A.S.B., E.Q., S.H.O., M.A.C.G., S.S., E.N. and A.V. conducted the experiments and analyzed the results. M.P.R. and J.C. drafted the manuscript. J.J., M.A.C.G., S.J.K., E.N. and A.V. reviewed the manuscript. S.J.K., M.P.R., and J.C. provided guidance on the whole project. All authors read and approved the final manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at doi:[10.1038/s41598-017-10770-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-10770-8)

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

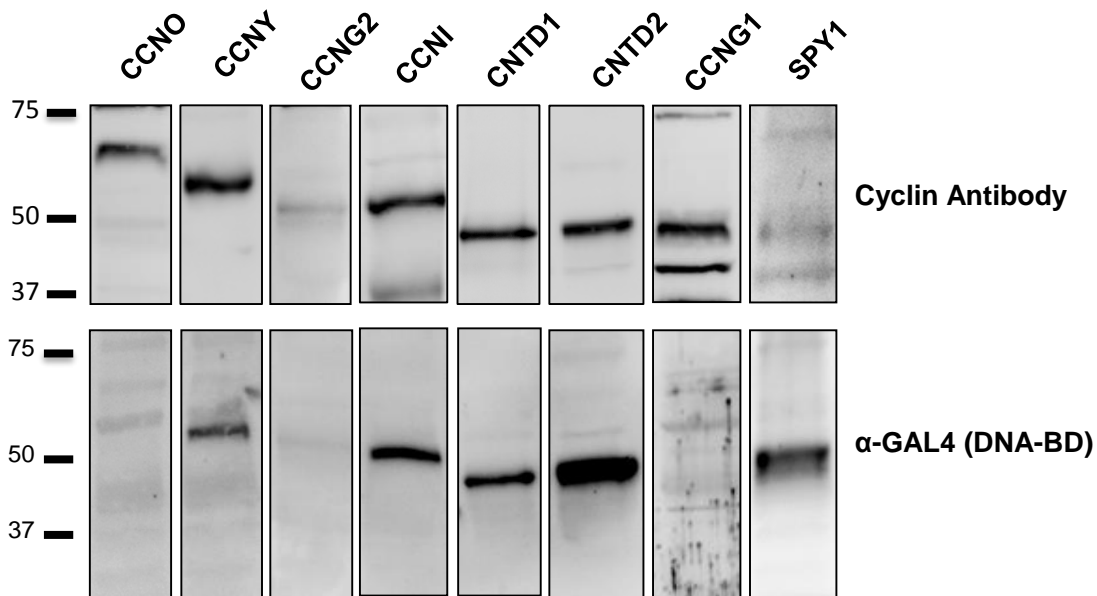
© The Author(s) 2017

# **A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer**

Gasa L<sup>&</sup>, Sanchez-Botet A<sup>&</sup>, Quandt E, Hernández-Ortega S, Jiménez J, Carrasco-García MA, Simonetti S, Kron SJ, Ribeiro MP<sup>\*</sup>, Nadal E, Villanueva A, Clotet J<sup>\*</sup>

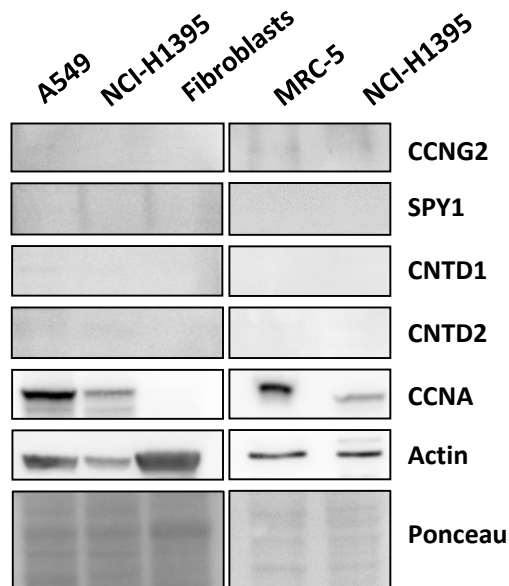
<sup>&</sup>Contributed equally

<sup>\*</sup>Corresponding authors

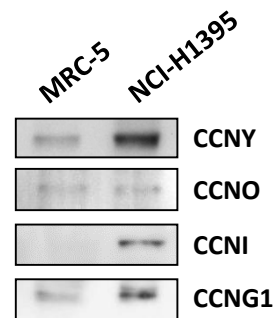


**Supplementary Figure S1. Validation of the cyclins antibodies.** The cyclins were cloned into pGBKT7 vector as Gal4 DNA-binding domain (DNA-BD) fusion proteins and expressed in the yeast strain AH109. The cyclins expression was detected using an anti-Gal4 antibody (bottom panel) and, afterwards, each lane was reprobated with the corresponding commercial antibody (top panel).

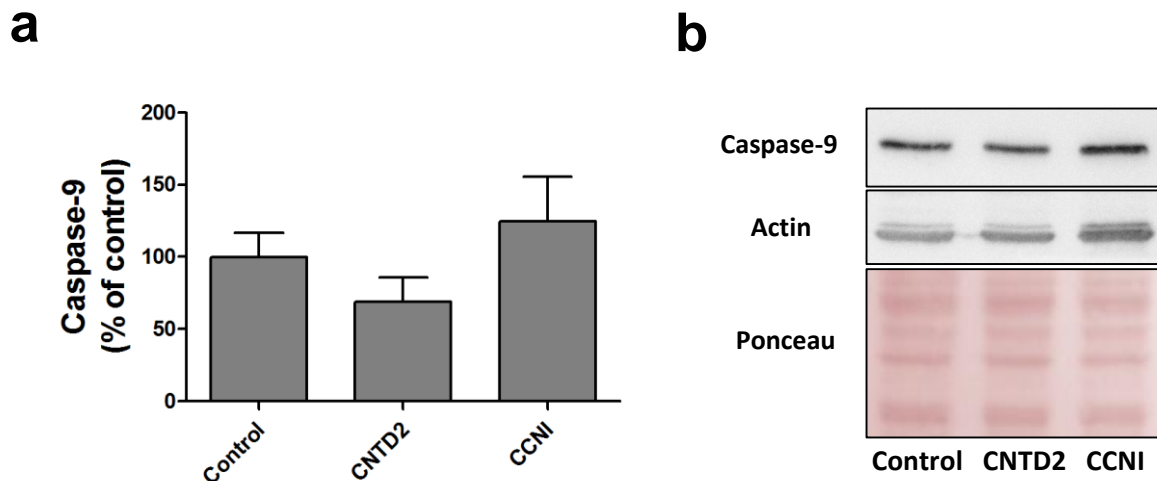
**a**



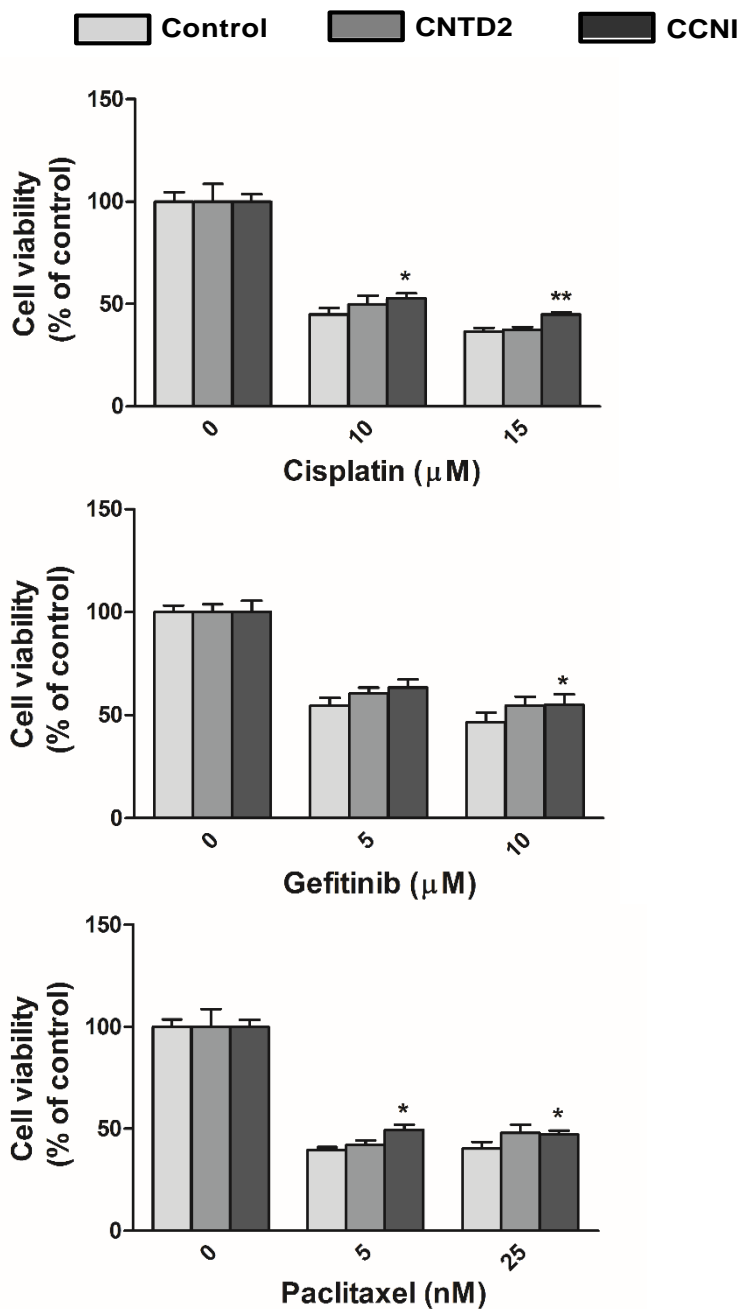
**b**



**Supplementary Figure S2. Orphan cyclins expression in human lung cell lines.** The protein expression level of orphan cyclins was evaluated by western blot in lung adenocarcinoma cell lines, A549, NCI-H1395, a primary culture of fibroblasts, and in the human lung fibroblast cell line MRC-5. (a) The expression of CNTD1, CNTD2, CCNG2 and SPY1 was undetectable in all the cells tested. (b) Representative images of the western blot analysis in NCI-H1395 and in the MRC-5 cells. The corresponding loading control is shown in (a).

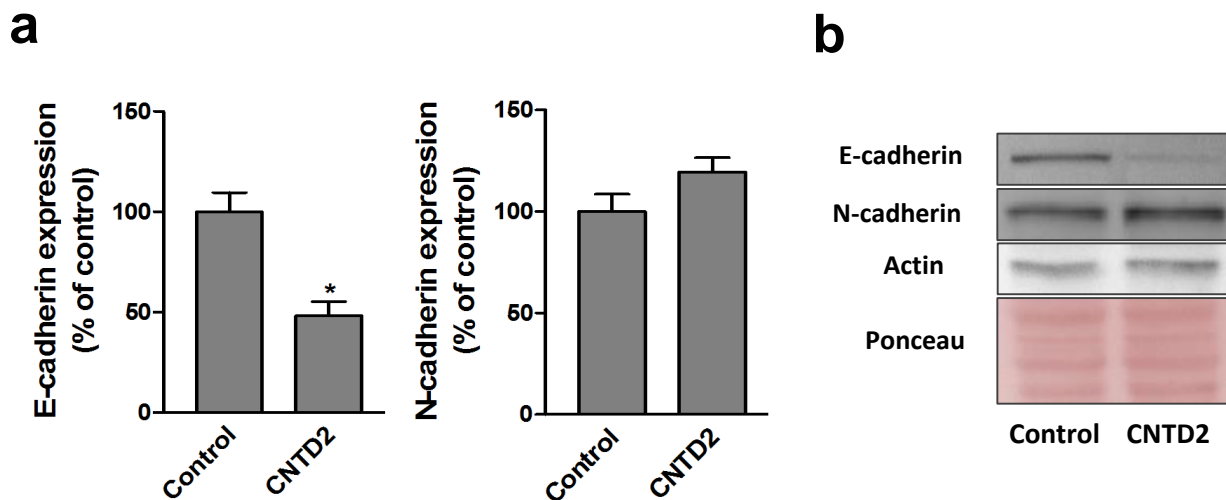


**Supplementary Figure S3. CNTD2 and CCNI overexpression does not promote A549 lung cancer cells apoptosis.** The expression of Caspase-9 was monitored in A549 cells infected with empty lentiviral vector (control) or with the indicating cyclin-overexpressing construct by western blot. (a) After normalization with Ponceau, the overexpression effect of the cyclins tested on caspase-9 was quantitated. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments, Mann-Whitney test. (b) Representative images of the western blot analysis.



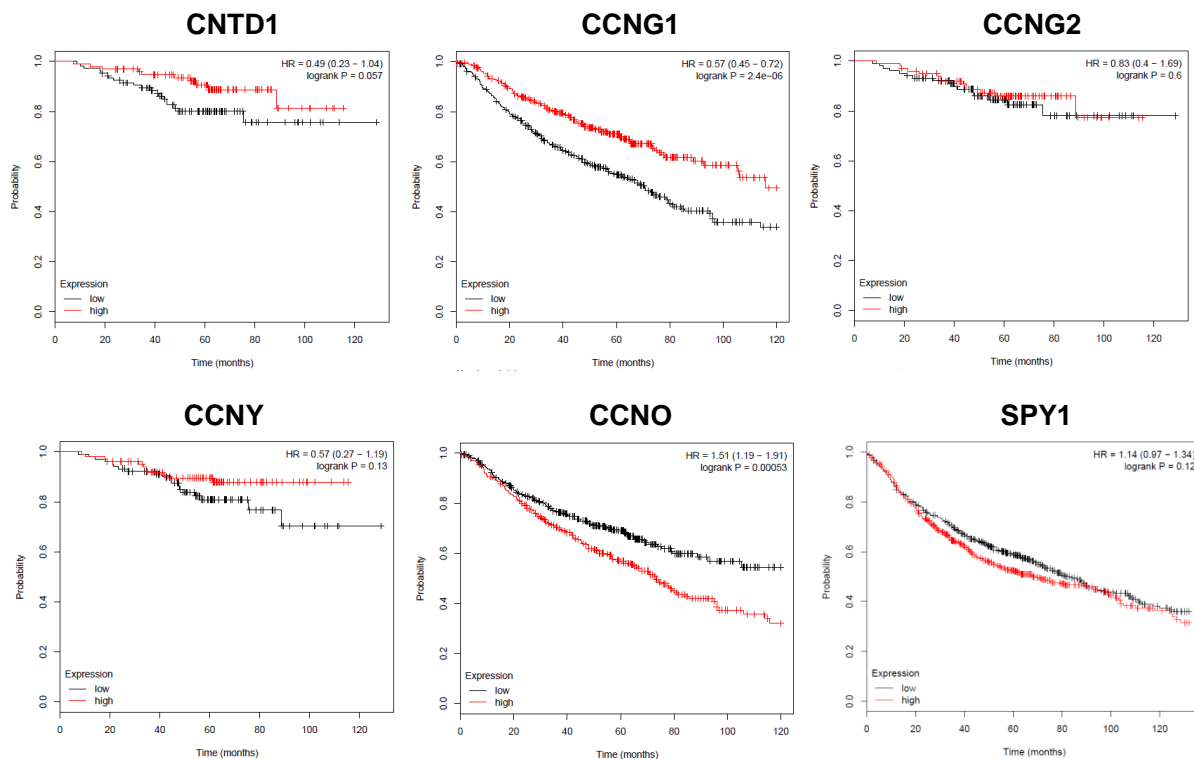
**Supplementary Figure S4. CCNI overexpression is associated with increased lung cancer resistance against antitumoral agents.** A549 cells infected with empty lentiviral vector (control) or with the cyclin-overexpressing construct for CCNI and CNTD2 were treated with the indicated concentrations of cisplatin, gefitinib and paclitaxel. Cell viability was estimated by the MTT assay 72 h later and is expressed as percentage of untreated cells. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments performed in quadruplicates. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control under the same drug treatment, Mann-Whitney test.



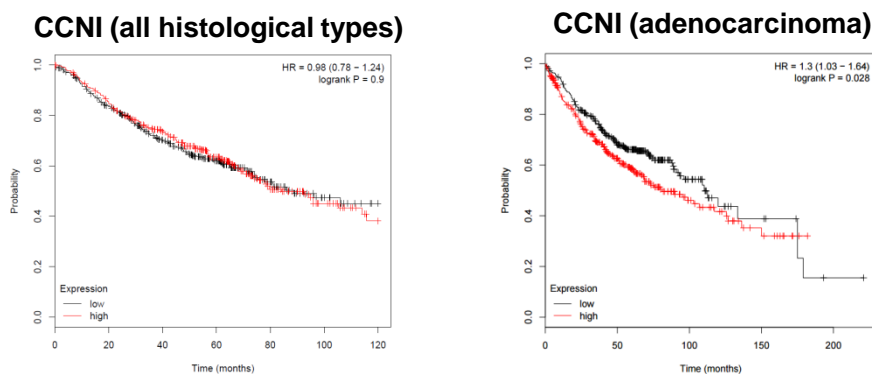


**Supplementary Figure S5. CNTD2 promotes the EMT.** The expression of E-cadherin and N-cadherin was monitored in A549 cells infected with empty lentiviral vector (control) or with CNTD2-overexpressing construct by western blot. (a) The effect of CNTD2 overexpression on cadherin expression was quantitated after normalization with Ponceau and is expressed as percentage of control. Columns represent the mean  $\pm$  SEM of twelve independent experiments. \* $P < 0.05$  vs control, Mann-Whitney test. (b) Representative images of the western blot analysis.

a

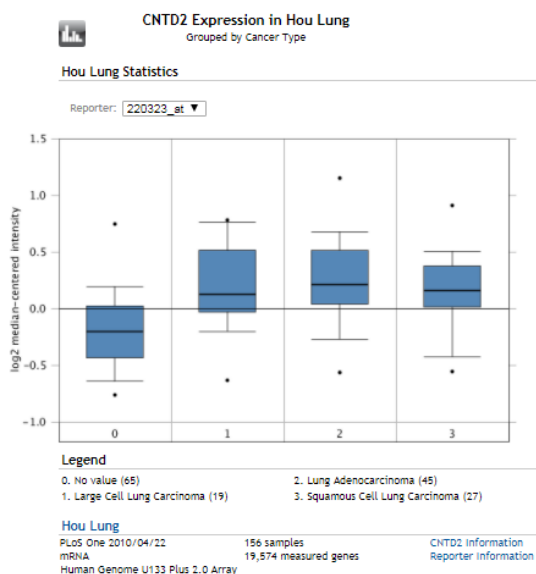


b



**Supplementary Figure S6. Prognostic value of orphan cyclins on the overall survival of lung cancer patients.** (a) Kaplan-Meier plots representing the overall survival of lung cancer patients of all histological types (n=726) expressing different levels of the indicated cyclins. (b) Kaplan-Meier plots showing the correlation between different expression levels of CCNI and the overall survival of lung cancer patients of all histological types (left panel, n=1926) and adenocarcinoma (right panel, n=867). Red colored lines represent the patients with high gene expression, while black colored lines represent patients with low gene expression. The hazard ratio (HR) with 95% confidence intervals, as well as the logrank P-values are shown.

a



b

Showing 1 of 1 genes found and 0 similarly expressed genes: Download all results  0.5 15?

**LUNG ADENOCARCINOMA**

Gene	ABC-1	COLO 699	Calu-3	DV-90	HCC1334	HCC192	HCC2270	HCC2279	HCC2302	HCC2935	HCC364	HCC4006	HCC4011	HCC461	HCC515	HCC78	HCC827	LXF-289	MOR	NCI-H1355	NCI-H1373	NCI-H1595	NCI-H1573	NCI-H1648	NCI-H1650	NCI-H1781	NCI-H1792	NCI-H1793	NCI-H15975	NCI-H2009	NCI-H2073	NCI-H820	RERF-LC-K3	RERF-LC-OK	VMRC-LCD			
CNTD2																																						

**NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA**

Gene	CAL-12T	EBC-1	EKVX	H322T	HCC-15	HCC1171	HCC2885	HCC366	HCC44	HOP-62	KNS-62	LXFL529	NCI-H1155	NCI-H1299	NCI-H1437	NCI-H1568	NCI-H1581	NCI-H1623	NCI-H1651	NCI-H1693	NCI-H1703	NCI-H1734	NCI-H1770	NCI-H1838	NCI-H1869	NCI-H1915	NCI-H1944	NCI-H2023	NCI-H2030	NCI-H2106	NCI-H2110	NCI-H2122	NCI-H2126	NCI-H2135	NCI-H2172	NCI-H2228		
CNTD2																																						

**LUNG CARCINOMA**

Gene	A-427	A549	BEN	Calu-1	ChaGo-K-1	EPLC-272H
CNTD2						

**Supplementary Figure S7. Differential CNTD2 expression in human lung cancer tissues and cancer cell lines.** (a) Levels of CNTD2 mRNA in human lung cancer samples of different histological types (65 normal samples, 19 large carcinoma samples, 45 lung adenocarcinoma samples and 27 squamous cell carcinoma samples) according to the Oncomine database (<http://www.oncomine.org>). (b) CNTD2 mRNA levels in different human lung cancer cell lines according to the Expression Atlas website (<https://www.ebi.ac.uk>).

		Number (%)
<b>Histologic Type</b>		
	Adenocarcinoma	28 (65.1%)
	Squamous cell carcinoma	15 (34.9%)
<b>Stage</b>		
	I	25 (58.1%)
	II	12 (27.9%)
	III	3 (7%)
	IV	3 (7%)
<b>Sex</b>		
	Female	14 (32.6%)
	Male	29 (67.4%)
<b>Age (years)</b>		
		65,9 (60 -74)
<b>Smoking history</b>		
	Never smoke	6 (14%)
	Ever smoke	34 (79%)
	-	3 (7%)
<b>Other tumors</b>		
	Never	38 (88.4%)
	Ever	5 (11.6%)

**Supplementary Table S1.** Clinicopathologic features of the subjects included in the study (n=43).

Cat. No	Antibody	Species	Dilution	Company
2956	GFP	Rabbit	1:500	Cell Signaling
ab179781	CNTD2	Rabbit	1:2,000	Abcam
ab47682	CCNO	Rabbit	1:500	Abcam
NB100-2521	SPY1	Rabbit	1:550	Novus Biologicals
ab114086	CCNY	Rabbit	1:1,000	Abcam
ab126998	CNTD1	Rabbit	1:6,000	Abcam
sc-320	CCNG1	Rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology
sc-7266	CCNG2	Goat	1:500	Santa Cruz Biotechnology
sc-5547	CCNI	Rabbit	1:400	Santa Cruz Biotechnology
F3165	FLAG	Mouse	1:500	Sigma-Aldrich
610921	N-Cadherin	Mouse	1:1,000	BD Biosciences
sc-73548	Caspase-9	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology
sc-1500	E-Cadherin	Goat	1:200	Santa Cruz Biotechnology
A5316	$\beta$ -Actin	Mouse	1:1,000	Sigma-Aldrich

**Supplementary Table S2.** List of antibodies and corresponding working dilutions.

	FORWARD	REVERSE
<b>CCNO</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGG TGACCCCCTGTCCCACCAGC CCCTCGAG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCG TCGTCATCCTTGTAATCTTTCGAGCT CGGGGGCAGGCTGCACTTCTCGC
<b>CNTD2</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGC TGGTGAGAGGCAGGGAC	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCG TCGTCATCCTTGTAATCATAATTGTC TCTCATTC
<b>CCNI</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGA AGTTTCCAGGGCCTTTG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCG TCGTCATCCTTGTAATCCATGACAG AAACAGGCTG
<b>CCNY</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGG GGAACACTACCTCG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCG TCGTCATCCTTGTAATCAGAGATGAT GGCTGGGG

**Supplementary Table S3.** Sequences of the primers used.