
Tesis doctoral

Noves Ciclines:

Omplint una escletxa a la Biologia del càncer

Laura Gasà Colom



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](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

NOVES CICLINES: OMLINT UNA ESCLETXA A LA BIOLOGIA DEL CÀNCER

Laura Gasa Colom

2018



NOVES CICLINES: OMLINT UNA ESCLETXA A LA BIOLOGIA DEL CÀNCER

Laura Gasà Colom

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat
Internacional de Catalunya, Barcelona 2018.

Treball dirigit pel Dr. Josep Clotet Erra i codirigit per la Dra. Mariana
Ponte Cardoso Ribeiro del Departament de Ciències Bàsiques de la
Universitat Internacional de Catalunya.

Programa de Doctorat en Ciències de la Salut de la Universitat
Internacional de Catalunya.

A la meva família,

Agraïments

M'agradaria agrair a tota la gent amb la que he tingut l'oportunitat de treballar i conèixer durant aquests anys. Caps, directors i companys de la UIC, de departament, de grup, de laboratori, del clínic...gràcies per l'ajuda, consells i bons moments compartits.

En especial, m'agradaria mencionar al Pep, per la confiança i donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest grup. A la Montse, per l'ajuda constant i riures infinits. A la Lourdes, per ser la meva companya al començament del camí. A l'Eva, per orientar-me i ajudar-me als meus inicis. A la Núria, pels últims retocs. A l'Abril, pel treball compartit i bons moments viscuts. I a la Mariana, pel seu somriure i suport vital per tirar endavant.

No em puc oblidar dels companys de despatx, Juan Carlos i Cris, gràcies per les classes privades d'estadística, riures i suport continu. A la María i la Sílvia, gràcies per sempre ser-hi. I a les incorporacions més recents, Núria, Carla i Àurea, treballar amb gent com vosaltres és realment un gust.

Aquest treball però, no hauria estat possible sense el recolzament constant de la meva família, gràcies per creure en mi. Als meus pares, per la llavor del camí ensenyat i après. A l'Oriol, per saber escoltar i donar sense esperar res a canvi, aquesta portada n'és un bonic exemple. I per últim, a tu Andreu, perquè junts som molt més que un.

ÍNDEX

Índex

ABREVIATURES	15
INTRODUCCIÓ	19
1. El cicle cel·lular.....	21
2. Les noves ciclines	25
3. Càncer de pulmó.....	27
3.1 Caracterització dels pacients amb càncer de pulmó	28
4. Cicle cel·lular i el carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (CPCNP).....	32
HIPÒTESI	35
OBJECTIUS.....	39
MATERIAL I MÈTODES	43
1. Línies cel·lulars i reactius	45
2. Pacients.....	45
3. Extracció de proteïna de línies cel·lulars	46
3.1 Proteïnes totals	46
3.2 Extracció proteïnes citosòliques i nuclears.....	46
4. Extracció de proteïna de teixits parafinats (FFPE).....	46
5. Validació dels anticossos	47
6. Western Blot	47
7. Detecció immunològica	48
7.1. Immunohistoquímica	48
7.2. Anàlisi Ki-67.....	48

8. Construcció de virus	49
9. Assajos de viabilitat cel·lular i de formació de colònies	50
10. Assajos de migració	51
10.1 <i>Wound healing</i>	51
10.2 <i>Transwell</i>	51
11. Assaig de <i>Soft agar</i>	52
12. Transfecció siRNA	52
13. PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR)	53
14. Comptatge cel·lular.....	53
15. Models xenògrafs tumorals	54
16. Corbes de supervivència.....	54
17. Anàlisi estadístic	54
RESULTATS.....	57
Capítol 1: Característiques de les eines bioquímiques	59
1. Validació dels anticossos	61
2. Estudi de l'anticòs de CNTD2	63
3. Condicions d'extracció de CNTD2.....	67
Capítol 2: Paper de les noves ciclines al carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (CPCNP)	69
1. Les noves ciclines tenen expressions diferencials segons la línia cel·lular	71
2. CNTD2 i CCNI estan sobreexpressades en teixits humans de pacients amb càncer de pulmó.....	73
3. La sobreexpressió de CCNI i CNTD2 augmenta la proliferació en cèl·lules tumorals de pulmó	77

4. La sobreexpressió de CNTD2 augmenta la migració de les cèl·lules A549.....	81
5. L'increment de CNTD2 intracel·lular està associat amb un augment del creixement tumoral <i>in vivo</i>	87
6. L'increment de l'expressió de CNTD2 és un indicador de mal pronòstic en pacients amb adenocarcinoma de pulmó	89
DISCUSSIÓ.....	93
1. CNTD1, CCNG2 i SPY 1, no són rellevants pel càncer de pulmó.....	95
2. CCNG1, possible gen supressor al càncer de pulmó?.....	96
3. CCNY i la importància de la proteïna	97
4. CCNO, ciclina important per la progressió tumoral	98
5. CCNI, oncogen i marcador pronòstic dels pacients amb càncer de pulmó.....	99
6. CNTD2, nou oncogen i innovadora diana terapèutica	101
CONCLUSIONS	111
REFERÈNCIES.....	115
ANNEXES.....	125
1. Annex I: Protocol d'extracció de proteïna de teixits parafinats (FFPE)	127
2. Annex II: Codis SPSS utilitzats pels anàlisis estadístics amb pacients.....	131
PUBLICACIÓ	133

ABREVIATURES

ADC	Adenocarcinoma
CDK	Quinases dependents de ciclins
CPCNP	Carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites
CPCP	Carcinoma pulmonar de cèl·lules petites
<i>DNA</i> -BD	Domini d'unió al <i>DNA</i>
EGFR	Receptor de creixement epidèrmic
EMT	Transició epiteli-mesènquima
FFPE	Fixades amb formaldehid i inclustades en parafina
FBS	Sèrum boví fetal
HR	Hazard ràtio
IHQ	Immunohistoquímica
MTT	Bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
OMS	Organització Mundial de la Salut
PBS	Tampó fosfat salí
pRb	Proteïna del retinoblastoma
RT-qPCR	PCR quantitativa en temps real
SCC	Carcinoma de cèl·lules escamoses
SEM	Error estàndard de la mitjana
TBS-T	Buffer salí Tris suplementat amb Tween-20

INTRODUCCIÓ

1. El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és un procés altament conservat constituït per un conjunt d'esdeveniments ordenats que condueixen a la formació de dues cèl·lules filles amb cromosomes idèntics als de la mare. El trobem dividit en quatre fases principals, G_1 , S, G_2 i M (Figura 1). La fase G_1 (de *Gap*, buit) és el període inicial del cicle cel·lular, les cèl·lules sintetitzen *RNA* i proteïnes per preparar-se per la síntesi de *DNA* i la replicació dels cromosomes, que es donarà immediatament després a la fase S (de síntesi). Després d'avançar a través de la fase G_2 (*Gap 2*), les cèl·lules comencen el procés de mitosi, fase M (mitòtica), on es reparteixen el contingut nuclear (mitosi) i citoplasmàtic (citocinesi), donant lloc a dues cèl·lules filles.

Quan les cèl·lules deixen de proliferar, ja sigui perquè reben senyals antimitogèniques específiques, que eviten la seva divisió, o per l'absència d'una senyalització mitogènica adequada que estimuli la seva proliferació, surten del cicle i entren en un estat de repòs conegut com a fase G_0 .

La progressió a través del cicle cel·lular està regulada per les quinases dependents de ciclina (CDK), un grup de serina/treonina quinases altament conservades que requereixen la unió amb les ciclins, subunitats reguladores, per poder fosforilar els seus substrats. Els nivells de les ciclins, augmenten i disminueixen en moments específics durant el cicle, oscil·lació que els hi dóna el nom (Graña and Reddy 1995).

Les cèl·lules humanes contenen múltiples *loci* que codifiquen per les CDKs i les ciclins (13 i 25, respectivament) (Malumbres and Barbacid 2005). Tot i que cada cop hi ha més evidències de que les ciclins tenen funcions addicionals o funcions no canòniques, com per exemple en la transcripció dels gens, reparació del *DNA*, mort cel·lular, diferenciació cel·lular i metabolisme (Hydbring, Malumbres, and Sicinski 2016), un determinat subconjunt de complexos CDK-ciclina estan directament implicats en la regulació del cicle cel·lular. Aquests

darrers, se'ls anomena complexos canònics, entre el que hi trobem tres CDKs d'interfase (CDK2, CDK4 i CDK6), una CDK mitòtica (CDK1) i deu ciclines que pertanyen a quatre classes diferents (A, B, D i ciclines de tipus E) (Figura 1) (Malumbres and Barbacid 2009).

A l'inici del cicle, els factors de creixement indueixen l'expressió de la ciclina D, que durant la fase inicial de G₁, formarà complexos amb les CDK 4/6. Aquests complexos tenen la proteïna del retinoblastoma (pRb) com un dels substrats més importants. La fosforilació, i inhibició, de la pRb provoca l'alliberament dels factors de transcripció de la família E2F que activen els gens que codifiquen per la ciclina E, permetent la formació del complex ciclina E-CDK2 a la fase final de G₁ i controlant d'aquesta manera la transició G₁/S (Malumbres and Barbacid 2001). En entrar a la fase S, les ciclines D i E són ubiquitinades i degradades pel proteasoma (Elledge and Harper 1998), però els nivells mantinguts de E2F activen la transcripció del gen ciclina A, que formarà un complex amb la CDK2 i activarà les proteïnes necessàries per la síntesi del DNA. La CDK principal dels mamífers per la fase G₂ i la mitosis és la CDK1. Aquesta CDK, s'associa amb les ciclines A i B respectivament en cadascuna d'aquestes fases, permetent la finalització del cicle cel·lular amb la mitosi (Schwartz and Shah 2005).

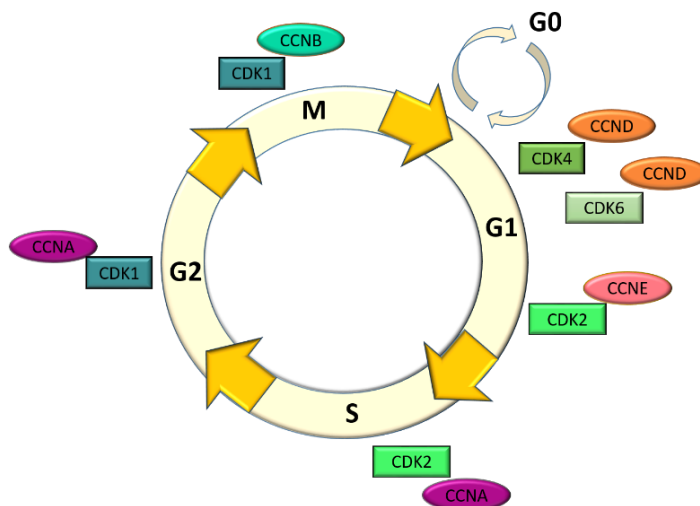


Figura 1. Cicle cel·lular de mamífer. Es representen les diferents fases del cicle cel·lular de mamífer amb els diferents complexos CDK-ciclina importants per cada fase.

Per tal que es pugui donar una correcta divisió cel·lular, les cèl·lules han desenvolupat un conjunt de punts de control (*checkpoints*) que detecten possibles defectes durant la síntesi de *DNA* o la segregació cromosòmica, vetllant d'aquesta manera, per que no es pugui superar una etapa del cicle, si l'etapa anterior no ha estat acabada amb èxit (L. Hartwell and Weinert 1989).

El correcte funcionament dels punts de control es troba freqüentment alterat a les cèl·lules tumorals, caracteritzades per la pèrdua del creixement controlat. Com que la majoria dels oncogens i els gens supressors tumorals són components de les vies de senyalització que controlen l'entrada i la sortida del cicle cel·lular (L. H. Hartwell and Kastan 1994), no és d'estranyar, que durant les dues últimes dècades, hagi aparegut molta literatura il·lustrant la rellevància de la desregulació del cicle cel·lular en els diferents tipus de càncer humà (Malumbres and Barbacid 2001, 2009).

Anàlisis moleculars de tumors humans, han demostrat que els reguladors del cicle cel·lular hi apareixen freqüentment mutats, posant de manifest, com n'és d'important mantenir el cicle cel·lular alhora de prevenir els processos tumorals (Malumbres and Barbacid 2001).

Aquestes alteracions inclouen la sobreexpressió de les ciclines canòniques, preferentment D1 i E1, que poden servir com a oncogens activant les CDKs de cicle cel·lular, afavorint d'aquesta manera la proliferació desregulada de les cèl·lules tumorals (Figura 2). Concretament la sobreexpressió de la ciclina E1, apareix freqüentment en tumors i se la correlaciona amb un pitjor pronòstic de la malaltia (Malumbres and Barbacid 2001).

Durant més d'una dècada s'han desenvolupat teràpies contra el càncer basades amb el paper de les CDKs. Els resultats de les fases clíniques però, no han estat del tot satisfactoris en quant als nivells d'activitat envers als de toxicitat d'aquestes molècules. És necessari doncs, conèixer una mica més el seu comportament per tal de poder preveure millor els beneficis terapèutics del seu bloqueig (Malumbres et al. 2008; Malumbres and Barbacid 2005).

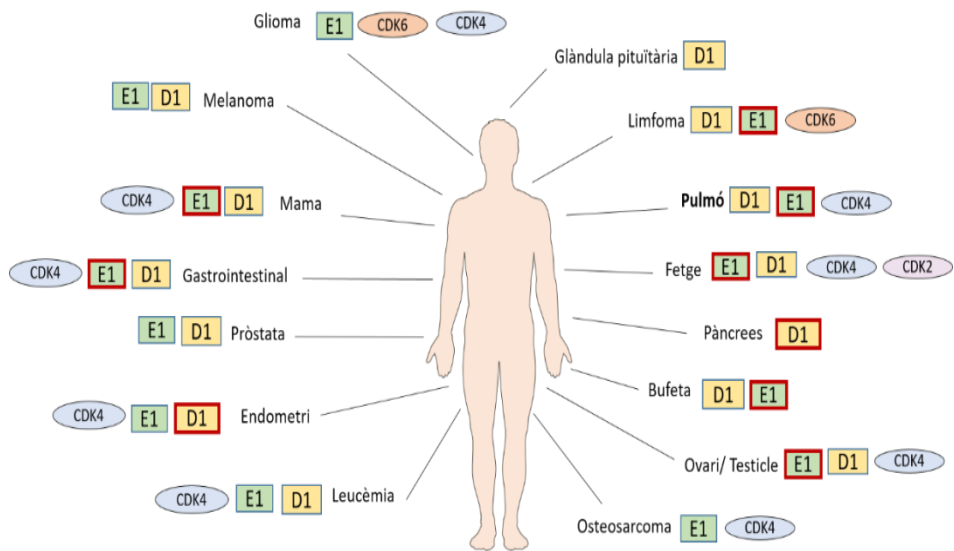


Figura 2. Mutació de les ciclines i CDKs en els principals tumors humans. Es mostren les mutacions de ciclines i CDKs que es produeixen en més del 10% dels tumors primaris. Les alteracions rellevants pel pronòstic del tumor estan indicades amb requadres vermells. Imatge modificada de Malumbres i Barbacid, 2001.

2. Les noves ciclines

La majoria dels estudis d'iniciació i progressió del càncer han limitat el seu anàlisi a les ciclines canòniques, com la ciclina D, ignorant molts altres gens expressats.

Amb l'anàlisi del genoma humà, es van identificar al menys 29 gens que codifiquen per un conjunt de proteïnes que comparteixen, igual que les ciclines canòniques, una regió conservada coneguda com a "caixa de ciclines" (Figura 3), domini d'uns 150 aminoàcids que defineix aquesta família ja que permet la unió de les ciclines amb la CDK corresponent.

Estructuralment, la majoria de les proteïnes que formen part de la família de les ciclines canòniques presenten dos caixes ciclina, una N-terminal necessària per la unió amb la CDK, i una C-terminal requerida pel correcte plegament de la ciclina en qüestió (Malumbres 2014). Tal i com es pot veure a la figura 3, però, la majoria de les ciclines novament aparegudes només presenten la caixa de ciclina N-terminal (Malumbres and Barbacid 2005).

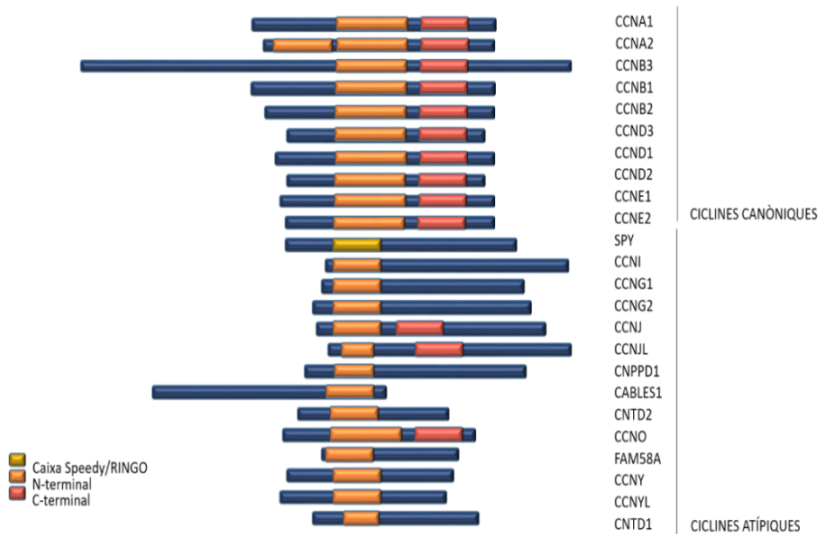


Figura 3. Classificació de les proteïnes ciclines, agrupades segons homologia de la caixa ciclina. A l'esquema es mostren les característiques estructurals més remarcables. Imatge modificada de Quandt et al, dades no publicades.

Aquesta característica estructural de les ciclines però, no es troba només limitada a elles. Hi ha altres molècules que tenen el domini de caixa de ciclina i la seva funció queda molt allunyada de ser activadors de les CDKs. Entre aquestes molècules hi tenim la proteïna del retinoblastoma (Rb), el factor de transcripció TFIIB i Cables (substrat enzimàtic de CDK5 i ABL1) (Malumbres 2014).

Encara que totes siguin batejades amb el nom de ciclina, de la majoria d'elles no es coneix encara, si són sintetitzades o eliminades de manera cíclica (Malumbres and Barbacid 2005; Murray and Marks 2001). Algunes d'elles són conegudes per controlar la transcripció unint-se a CDKs de transcripció com la Cdk7, Cdk8, Cdk11 i Cdk20 (Petra Mikolcevic, Rainer, and Geley 2012). Altres, les seves parelles CDK encara no han estat identificades (Malumbres 2014).

Tota aquesta falta d'informació fa que hi hagi una mica de controvèrsia alhora de nombrar aquestes ciclines últimament aparegudes. Se les coneix per tres noms diferents. Com que eren proteïnes amb una caixa ciclina, havien aparegut recentment i les seves funcions no eren conegudes, inicialment van ser batejades com a "noves ciclines". Alhora, i pel fet que no tenien cap CDK associada, també se les anomenava "ciclines òrfenes". Avui en dia però, aquesta informació ha canviat. Es coneixen algunes de les CDKs associades a algunes ciclines d'aquest grup. De les altres, fins que no s'estudiïn més les seves funcions, no podem encara descartar que no en tinguin i juguin papers com a factors de transcripció. D'altra banda, fent referència al fet que la majoria de les ciclines d'aquest grup, no totes, tenen una única caixa ciclina, alguns investigadors han començat a nombrar-les "ciclines atípiques".

En aquesta tesi, s'ha preferit nombrar-les com a noves ciclines, sent conscients que a mesura que vagi passant el temps i es vagin coneixent les seves funcions, serà un nom que caldrà canviar per un altre que, d'acord amb un bon anàlisi de la família al complet i les similituds entre elles, permeti agrupar-les amb més criteri.

3. Càncer de pulmó

El càncer de pulmó és un dels càncers més freqüentment diagnosticats i és la principal causa de mort relacionada amb càncer a tot el món (Gridelli et al. 2015). Aquest últim any a la Unió Europea, ha representat més del 20% de la mortalitat total per càncer (Malvezzi et al. 2017).

Hi ha diversos factors que expliquen aquesta elevada taxa de mortalitat. El primer de tots és el diagnòstic tardà del pacient. La cirurgia o la radioteràpia poden curar els tumors localitzats a la seva fase inicial però no són bones opcions pels estadis més avançats de la malaltia (Goldstraw et al. 2011). A més a més, molts d'ells encara tenen altes taxes de recidiva local i llunyana provocada per l'agressivitat biològica interna del tumor i la seva naturalesa heterogènia. Tots aquests factors ajuden a restringir el potencial dels tractaments sistèmics actuals, fet que indica que es necessiten millores urgents (Olaussen and Postel-Vinay 2016).

El càncer de pulmó primari es divideix en dos grups. El carcinoma pulmonar de cèl·lules petites (CPCP), que representa el 15% de tots els casos de càncer de pulmó i és considerat com un dels tumors malignes més característics a tot el camp de l'oncologia perquè tendeix a créixer i difondre molt ràpid. L'altre grup és el carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (CPCNP), el tipus de càncer de pulmó més abundant representant aproximadament un 85% dels casos diagnosticats per aquesta malaltia (Gridelli et al. 2015). Degut a aquest desequilibri entre els dos grups, moltes vegades, es parla només del CPCNP, ja que engloba la majoria de diagnòstics per càncer de pulmó. Fins la última dècada el CPCNP ha estat considerat com una única malaltia, tractament de la qual es limitava a quimioteràpia basada en cisplatí, aconseguint una resposta positiva en el 20% dels pacients i tenint una supervivència mitjana de només 8 mesos (Korpany et al. 2014).

Actualment, s'accepta que està format per un grup de malalties histològicament i molecularment molt heterogènies. Per aquest fet, la caracterització molecular dels tipus de tumors és una opció cada cop més recomanada pels oncòlegs, ja que proporciona opcions de tractament personalitzades i millors resultats per aquells pacients que

es troben en els estadis més avançats de la malaltia (Inamura 2018; Korpanty et al. 2014).

Malgrat els avenços recents que es basen en l'estratificació genètica del tumor utilitzant marcadors biològics rellevants com són EGFR, ALK, ROS-1, MET i KRAS, la gestió dels CPCNP continua sent desafiant. D'una banda, perquè la majoria dels pacients diagnosticats amb CPCNP no són candidats a la cirurgia a causa del seu estat avançat o metastàtic en el moment del diagnòstic (Lemjabbar-Alaoui et al. 2015). D'altra banda, perquè el número de pacients pels quals les teràpies dirigides existents tenen resultats positius continua sent molt petit, la majoria dels CPCNP no presenten mutacions conegudes i només un de cada cinc pacients respon a les immunoteràpies aprovades (Korpanty et al. 2014; Olausson and Postel-Vinay 2016).

3.1. Caracterització dels pacients amb càncer de pulmó

Un cop fet el diagnòstic, per poder planificar el tractament adequat en cada cas individual, és important fer una bona caracterització del tumor.

Primer de tot s'identifica el tipus de tumor segons la seva histologia o citologia. Els tumors de pulmó primaris es diferencien en CPCP o CPCNP. Els tumors del primer grup estan constituïts per cèl·lules petites amb citoplasma escàs, vores cel·lulars definides i nuclèol absent o poc visible. El CPCNP, és un tipus de tumor que s'inicia a les cèl·lules més abundants del pulmó, les cèl·lules epitelials. En funció del tipus de cèl·lula epitelial on s'inicia el tumor parlem de 1) l'adenocarcinoma (ADC), que comença a les cèl·lules que cobreixen els alvèols i produeixen moc, 2) el carcinoma de cèl·lules escamoses (SCC), comença a les cèl·lules llises i primes superficials dels pulmons, i 3) el carcinoma de cèl·lules grans, que comença en tipus cel·lulars diferents als descrits anteriorment. Dels tres, l'adenocarcinoma representa el 40% de tots els casos diagnosticats de CPCNP sent el tipus histològic més abundant.

Seguidament es procedeix a la classificació TNM del tumor, que descriu el seu abast anatòmic i està format per tres components, T,

que ens dóna informació de l'extensió del tumor primari, N, que aporta informació de si hi ha implicació de ganglis limfàtics i M, que resumeix si s'han donat metàstasis distants. Cada T, N, M alhora es divideix en diferents categories que defineixen encara més les característiques del tumor (Detterbeck et al. 2017).

Les pautes seguides per la classificació TNM en el càncer de pulmó s'exposen seguidament.

Pel tumor primari (T), destaquem 6 categories:

1. T0, si no hi ha evidència del tumor primari.
2. Tis (*in situ*), pels carcinomes *in situ*.
3. T1, pels tumors de 3 cm o menys.
4. T2, pels tumors entre 3 i 5 cm o bé amb afectació de bronqui principal a més de 2 cm de carina traqueal o invasió de pleura visceral.
5. T3, tumor entre 5 i 7 cm o bé, un tumor que envaeixi la paret toràcica, el nervi frènic o el pericardi parietal, o que hi hagi nòdul(s) en el mateix lòbul que el tumor primari.
6. T4, Tumor de més de 7 cm que envaeixi el mediastí, el cor, grans vasos, la tràquea, l'esòfag, el cos vertebral, la carina traqueal i el nervi recurrent laringi o bé, presència de nòdul(s) al lòbul contrari que el tumor primari.

El marcador de ganglis regionals (N), es divideix en 4 graus diferents:

1. N0, No metàstasi a ganglis regionals.
2. N1, Metàstasi en els ganglis peribronquials i/o hiliars ipsilaterals.
3. N2, Metàstasi en els ganglis mediastínic ipsilaterals i/o subcarinals.

4. N3, Metàstasi en els ganglis mediastínic i/o hiliars contralaterals, escalènics o supraclaviculars.

Finalment, el marcador de metàstasi distant (M), es divideix en dos en funció de si el pacient presenta (M1) o no (M0) metàstasi. Aquest és un paràmetre molt important ja que de ser positiu es veuen alarmantment reduïdes tant la supervivència global del pacient com l'èxit de les teràpies disponibles per tractar-lo, representant la principal causa de mort dels pacients amb càncer (Yadav et al. 2018).

El fenotip característic de les cèl·lules metastàsiques és la seva alta capacitat migratòria i invasiva. La desdiferenciació cel·lular, esdevé clau pels processos de transició epiteli-mesènquima (EMT). D'aquesta manera, les cèl·lules guanyen mobilitat i poden abandonar el tumor inicial per viatjar pel cos gràcies a la seva disseminació als vasos sanguinis. D'altra banda, en la majoria de càncers s'observa també una certa re-diferenciació, que permet a les cèl·lules tumorals fer la transició inversa, del mesènquima a l'epiteli (TME) i colonitzar un òrgan diferent i allunyat del tumor primari (Brabletz 2012).

A més a més d'aquests processos més establerts, els últims anys han anat apareixent algunes molècules que semblen ser importants per les cèl·lules iniciadores dels processos metastàsics, com per exemple la CD36, proteïna de membrana que capta i interioritza els àcids grassos, o la L1CAM, molècula implicada en l'adhesió cel·lular, entre altres. Com es veu en aquest exemple, aquestes molècules són i tenen funcions molt diferents, indicant la gran varietat i complexitat de factors i vies que influeixen sobre aquestes cèl·lules invasives. Per tot això, cada cop més, la metàstasi es tractada com una malaltia independent al càncer (Pascual et al. 2017; Valiente et al. 2014).

L'estadificació descriu també el grau d'extensió del tumor. És una informació clínica rellevant ja que s'utilitza per establir el pla individualitzat de tractament i el pronòstic del decurs de la malaltia. Parlem de cinc estadis segons combinacions de les diferents categories T, N, M; Estadi 0, el carcinoma inicial està present només a nivell de la capa cel·lular on s'ha iniciat, Estadi I (T1 N0 M0; T2 N0 M0), Estadi II (T2 N0 M0; T1 N1 M0; T2 N1 M0; T3 N0 M0), Estadi III (T* N3 M0) i Estadi IV (T* N* M1), on els asteriscs representen qualsevol número.

Altres informacions que es recullen i potser no són tant rellevants de cara al tractament del tumor, però si per ajudar a contextualitzar-lo i perquè no, prevenir-lo, són l'edat, el sexe i l'historial de tabaquisme del pacient, entre altres.

Hi ha molta bibliografia que recull la implicació del tabac i el càncer de pulmó, establint el tabaquisme com a la principal causa dels processos carcinogènics en aquest teixit (Furrukh 2013). Concretament, es relaciona el tabaquisme amb el grup de CPCNP, vinculant l'alt risc de patir aquesta malaltia als més de 500 milions de fumadors que hi ha a tot el món (Rahal et al. 2017).

Si mirem aquest factor per sexe, veiem que, malgrat que el càncer de pulmó afectava majoritàriament a homes, es preveu que en uns anys el paradigma canviï completament, sent les dones les més afectades. Aquest fet ve donat tant pel creixent número de dones que són fumadores actualment, com pel fet que les dones presenten una major susceptibilitat al càncer de pulmó en comparació amb els homes tenint una mateixa exposició de fumar durant tota la vida (Hansen et al. 2017; Martín-Sánchez et al. 2016).

4. Cicle cel·lular i el carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (CPCNP)

Hi ha diferents estudis que relacionen directament el càncer de pulmó, i amb ell el CPCNP, amb uns nivells alterats dels reguladors del cicle cel·lular.

Va ser demostrat que els nivells elevats de la ciclina B1, ciclina que s'uneix amb la CDK1 per regular la mitosi, estan estretament relacionats amb un pitjor pronòstic en pacients amb CPCNP (Cooper et al. 2009). Es coneix també, que la desregulació de la ciclina B1 té un paper important en la transformació neoplàsica. Estudis amb línies cel·lulars mostren que el silenciament d'aquesta ciclina es tradueix amb una disminució de la proliferació cel·lular i amb un augment dels nivells d'apoptosi (Yuan et al. 2004).

Resultats similars es van obtenir amb pacients que tenen tumors que sobreexpressen la ciclina D1, ciclina específica de la fase G₁ del cicle cel·lular. La seva expressió es relaciona amb una caiguda de la supervivència global en aquests pacients (Sterlacci et al. 2010).

Al seu torn, la inhibició del receptor de creixement epidèrmic (EGFR), relacionat amb els processos de transició epiteli-mesènquima (EMT) i doncs, en processos de progressió tumoral (Lo et al. 2007), disminueix també els nivells de ciclina D1, suggerint que la pèrdua de l'activitat CDK-ciclina pot venir mediada pels efectes dels inhibidors d'EGFR (Kobayashi et al. 2006).

Fàrmacs com l'agent aprovat palbociclib (Ibrance, Pfizer) i altres inhibidors dels complexos CDK4/6-ciclina D mostren activitat en múltiples càncers incloent els CPCNP, validant, un cop més, les CDKs com a objectius terapèutics (Asghar et al. 2015; Malumbres et al. 2008).

Sorprenentment, els possibles rols de les ciclins no canòniques romanen pràcticament inexplorats en tumors malignes, on el càncer de pulmó no n'és una excepció. Anàlisis previs basats en estudis d'alteracions d'expressió gènica, no han identificat les noves ciclins com a gens sobreexpressats o silenciats al càncer de pulmó. No obstant això, la relació entre el transcriptoma i el proteoma, que

observem sovint en teixits normals, encara no està ben caracteritzat en teixits tumorals, posant èmfasi en els complexos mecanismes, com la síntesi proteica, les modificacions postranscripcionals, i els processos de degradació, que regulen l'expressió de les proteïnes en un tumor (Chen et al. 2002). Estudis fets amb mostres de pacients amb adenocarcinoma de pulmó exemplifiquen aquest fet: hi ha una correlació entre els nivells de proteïna i els nivells de *mRNA* només en el 20% de totes les proteïnes analitzades, suggerint que en aquest tipus de tumors, els mecanismes transcripcionals prenen un paper molt important (Chen et al. 2002). Per tant, seria necessari una avaluació directa dels nivells de proteïna per detectar l'expressió alterada de les ciclines atípiques en aquest tipus de tumors.

L'estudi de les noves ciclines en un context de càncer de pulmó, podria ser molt interessant. Per una banda, s'identificaria per primera vegada el rol d'aquestes proteïnes, que igual que les ciclines canòniques, podrien tenir rols importants en la progressió tumoral. D'altra banda, estudiar-ho en càncer de pulmó, un dels tumors més diagnosticats i amb més mortalitat, podria contribuir al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques podent complementar la quimioteràpia basada en cisplatí o estratègies més innovadores com els inhibidors de les CDKs o la immunoteràpia.

HIPÒTESI

Per tot el que s'ha exposat anteriorment, la hipòtesi principal d'aquest estudi és que les noves ciclins podrien estar jugant un paper important en un tumor tant prevalent com és el càncer de pulmó, podent esdevenir nous marcadors pronòstic i noves dianes terapèutiques per a futures teràpies.

A continuació s'exposen els objectius fixats per tal de poder assolir-la.

OBJECTIUS

L'objectiu principal de treball és:

- Caracterització sistemàtica de les ciclins atípiques en un dels tumors més prevalents actualment.

Del que se'n deriven els següents objectius secundaris:

- Determinar la presència de les ciclins atípiques en mostres de pacients amb càncer de pulmó.
- Determinar els fenotips lligats a l'alteració d'aquestes ciclins.
- Establir possibles relacions entre els nivells de ciclins atípiques i l'historial clínic dels pacients.
- Estudiar la rellevància clínica de les ciclins atípiques alterades.

MATERIAL I MÈTODES

1. Línies cel·lulars i reactius

En aquest estudi s'han utilitzat dues línies d'adenocarcinoma de pulmó, la línia A549, (Sigma-Aldrich, 2014) i NCI-H1395, (ATCC, 2016), i una línia de fibroblast de pulmó MRC-5 (ATCC, 2016). Les dues línies tumorals utilitzen medi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich), mentre que la línia de fibroblasts va ser cultivada en medi Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC), tots però suplementats amb 10% de sèrum boví fetal (FBS; Sigma Aldrich) i un 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich). Les cèl·lules es mantenen amb incubadors a 37°C de temperatura i amb un 5% de CO₂.

2. Pacients

Les mostres de teixit tumoral de pulmó i mostres del teixit no tumoral adjacent es van obtenir de 43 pacients diagnosticats de càncer de pulmó de cèl·lules no petites (CPCNP) a l'Hospital Universitari General de Catalunya i a l'Hospital Universitari Sagrat Cor. Els requisits per ser inclosos a l'estudi són haver estat diagnosticats d'un càncer primari de pulmó i no haver rebut quimioteràpia o radioteràpia abans de l'operació. Les mostres van ser fixades amb formaldehid i inclustades en parafina (FFPE) d'acord amb els protocols d'aquests hospitals, analitzades pel mateix patòleg i classificades histològicament d'acord amb l'Organització Mundial de la Salut del 2015. De les 43 mostres, 28 van ser identificades histològicament com adenocarcinomes i 15 com a carcinoma de cèl·lules escamoses. Els tumors van ser classificats segons el sistema d'estadiatge TNM i les característiques dels pacients inclosos a l'estudi queden resumides a la taula 5. L'estudi va ser aprovat pel Comitè ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de idcsalud Hospital General de Catalunya, així com també pel Comitè ètic de la Universitat Internacional de Catalunya (CER).

3. Extracció de proteïna de línies cel·lulars

3.1. Extracció Proteïnes totals

Si no s'indica el contrari, per l'extracció de proteïna total, les cèl·lules es renten amb tampó fosfat salí (PBS) i a continuació, s'hi afegeix el tampó de lisi (20mM TRIS, 5mM EDTA, 1%NP40, 150mM NaCl, pH 7.4) suplementat amb inhibidors de fosfatasa i proteasa (Pierce Phosphatase Inhibidor Mini tablets; Thermo Fisher Scientific i Pierce Protease Inhibidor tablets; Thermo Fisher Scientific, respectivament). Els extractes es soniquen i centrifuguen a 14000 rpm durant 15minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant.

3.2. Extracció Proteïnes, prova diferents tampons

Per l'extracció de proteïnes les cèl·lules es renten amb tampó fosfat salí (PBS) i a continuació, s'hi afegeix el tampó de lisi, tampó hipotònic (10mM HEPES pH=7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl) suplementat amb inhibidors de fosfatasa i proteasa (Pierce Phosphatase Inhibitor Mini tablets; Thermo Fisher Scientific i Pierce Protease Inhibidor tablets; Thermo Fisher Scientific, respectivament), o bé, amb el tampó 20mM Tris-HCl pH=8.8, 200mM DTT, 2% SDS. Els extractes es soniquen i centrifuguen a 14000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant.

4. Extracció de proteïna de teixits parafinats (FFPE)

Les mostres estudiades contenen com a mínim un 80% de teixit tumoral i de cadascuna, hem obtingut teixit normal adjacent que utilitzem com a control. El protocol detallat de l'extracció es pot veure a l'Annex I, i a continuació es presenta un resum. Seguint els mètodes estàndards per l'extracció de proteïna, les seccions de teixit de 10µm, han estat desparafinades i rehidratades. Per cada mostra, s'hi afegeix 100 µl de tampó de lisis (20mM Tris-HCl pH=8.8, 200mM DTT, 2% SDS), s'incuba 5 minuts en gel i després 20 minuts a 100°C. En acabar,

es deixen les mostres a la *Eppendorf thermomixer* durant 2h i a 80°C i 750rpm. Finalment, es centrifuguen les mostres durant 15 minuts a 14000rpm i a 4°C. Es recull el sobrenedant per l'anàlisi de les mostres.

5. Validació dels anticossos

Per poder validar l'especificitat de les noves ciclines humanes, aquestes van ser expresades en un sistema heteròleg. Amb aquesta finalitat, van ser clonades com a proteïnes de fusió del Gal4 domini d'unió al *DNA (DNA-BD)* al vector pGBKT7 (Clontech) i expressades a la soca de llevat AH109. Gràcies a la comparació entre un *Western Blot* contra Gal4 *DNA-BD* i la corresponent ciclina, es va confirmar el correcte funcionament dels anticossos.

6. Western Blot

Després de la quantificació de proteïna pel mètode de Bradford (BioRad), les mostres es desnaturalitzen a 90°C durant 5 minuts. 25 µg de proteïna total es separa en un gel 10% SDS-PAGE i es transfereix a membranes de PVDF (Immobilon-P; Millipore). Després del bloqueig, les membranes s'incuben a 4°C tota la nit amb el corresponent anticòs primari en tampó salí Tris suplementat amb el detergent Tween-20 (TBS-T) + 5% llet. Els anticossos primaris utilitzats, queden recollits a la següent taula 1. Després de tres rentats de 10 minuts amb TBS-T, les membranes s'incuben a temperatura ambient durant 1h amb el corresponent anticòs secundari (horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse, -rabbit, -goat IgG; Jackson Laboratories). En acabar, fem tres rentats més de 10 minuts. Pel revelat, apliquem a les membranes Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) i obtenim les imatges amb l'aparell GeneSnap (Syngene). Finalment, analitzem la intensitat de les bandes amb el software Image Studio Lite (Li-Cor).

Num. Cat.	Anticòs	Espècie	Dilució	Casa Comercial
2956	GFP	Conill	1:500	Cell Signaling
ab179781	CNTD2	Conill	1:2,000	Abcam
ab47682	CCNO	Conill	1:500	Abcam
NB100-2521	SPY1	Conill	1:550	Novus Biologicals
ab114086	CCNY	Conill	1:1,000	Abcam
ab126998	CNTD1	Conill	1:6,000	Abcam
sc-320	CCNG1	Conill	1:200	Santa Cruz Biotechnology
sc-7266	CCNG2	Cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology
sc-5547	CCNI	Conill	1:400	Santa Cruz Biotechnology
F3165	FLAG	Ratolí	1:500	Sigma-Aldrich
610921	N-Cadherina	Ratolí	1:1,000	BD Biosciences
sc-73548	Caspase-9	Ratolí	1:200	Santa Cruz Biotechnology
sc-1500	E-Cadherina	Cabra	1:200	Santa Cruz Biotechnology
A5316	β -Actina	Ratolí	1:1,000	Sigma-Aldrich

Taula1 . Llista d'anticossos utilitzats amb les corresponents dilucions.

7. Detecció immunològica

7.1. Immunohistoquímica

La detecció immunològica de les mostres parafinades es va realitzar en seccions de 4 μ m utilitzant l'aparell BenchMark Ultra (Ventana Systems Inc.) i amb les dilucions i anticossos policlonals següents: 1:100 CNTD2 (ab179781, Abcam), 1:100 CCNO (ab47682, Abcam), 1:50 CCNI (H-279, Santa Cruz Biotechnology) i 1:100 CCNY (ab114086, Abcam). Les seccions són desparafinades automàticament amb el reactiu EZ-PREP i tractades amb el CC2 cell conditioning 6.1 durant 30 minuts a 95°C. La

detecció immunològica es realitza amb el Kit u View DAB amb diaminobenzidina (DAB) com a cromogen i contrastada amb hematoxilina. S'estableixen dues categories de tinció, negatiu i positiu.

7.2. Anàlisi Ki-67

Per l'anàlisi de Ki-67, les cèl·lules infectades són sembrades en plaques de 24 pouets i a una densitat de 50.000 cèl·lules/ml, sobre cobreobjectes tractats amb poli lisina. Després de 24h fixem les cèl·lules en paraformaldèhid fred al 4% durant 15 minuts i ho boquegem amb Triton X-100 al 0'1% en PBS i 10% de sèrum durant 1h. Seguidament, fem la incubació d'una hora amb una dilució 1:200 de l'anticòs ki-67 (556003, BD Pharmigen). Els cobreobjectes, són rentats diverses vegades amb PBS, incubats durant 1 hora a temperatura ambient i tapat de la llum amb una dilució 1:1000 l'anticòs secundari fluorescent *anti-mouse*. Després d'uns rentats addicionals amb PBS, tenim els nuclis amb Hoechst 33258 (14530, Sigma Aldrich). La captura de les imatges s'ha fet utilitzant el software de NIS-Elements AR 4.13.04. Analitzem entre 50 i 70 cèl·lules per condició.

8. Construcció de virus

Per obtenir lentivirus que expressin les noves ciclines, hem amplificat el *cDNA* de CCNO, CCNI i CCNY de les cèl·lules humanes A549, amb una FLAG tag al C-terminal. En el cas de CNTD2, després d'intentar varies vegades sense èxit la seva amplificació, hem comprat el clon de *cDNA* sencer (gBlock, IDT) generat a partir de la seqüència publicada a Ensembl ENST00000430325.6. Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats en aquest estudi es resumeixen a la taula 2.

Els *cDNAs* obtinguts, van ser clonats al lloc de restricció de *PmeI* del vector d'expressió lentiviral pWPI (#12254, Addgene). Per la producció lentiviral, les cèl·lules HEK293-T es co-transfecten amb fosfat càlcic i 45 µg del vector anterior amb 12.9 µg de pMD2G i 29.1 µg de psPAX2. Trobarem els virus als sobrenedants, que recollirem a les 24 i 48h després de la transfecció i els concentrarem utilitzant el concentrador Sartorius VS2042 Vivaspin 20 (Sartorius). Titularem els virus i

infectarem les cèl·lules A549 amb 10 MOI de lentivirus pels estudis de sobreexpressió.

	<i>FORWARD</i>	<i>REVERSE</i>
CCNO	GCCTCGAGGTTTAAACATGGT GACCCCTGTCCCACCAGCCC CTCGAG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCTTTCGAGCTC GGGGGCAGGCTGCACTTCTCGC
CNTD2	GCCTCGAGGTTTAAACATGCT GGTGAGAGGCAGGGAC	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCATAATTGTCTC TCATTG
CCNI	GCCTCGAGGTTTAAACATGAA GTTTCCAGGGCCTTTG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCCATGACAGAA ACAGGCTG
CCNY	GCCTCGAGGTTTAAACATGGG GAACACTACCTCG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCAGAGATGATG GCTGGGG

Taula 2. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats.

9. Assajos de viabilitat cel·lular i de formació de colònies

Utilitzem la tècnica del MTT per estudiar la viabilitat cel·lular. Sembrem les cèl·lules en plaques de 48 pouets a una densitat de 6000 cèl·lules/ml. 72 hores després, les cèl·lules són infectades, i després de 5 dies, incubades amb la sol·lució de MTT (Sigma) durant 1h a 37°C. Els cristalls de formazan es dissolen en DMSO i es quantifiquen mesurant l'absorbància a 570nm al lector de plaques Synergy HT. La reducció de MTT s'expressa com a percentatge de l'absorbància obtinguda al control, que es considerada el 100%.

Pels assajos de formació de colònies, 50 cèl·lules/ml d'A549 es sembren en plaques de 6 pouets i es deixen a l'incubador durant 2 setmanes. En acabar aquest període de temps, fixem les colònies formades amb metanol fred al 100%, les rentem amb PBS i les tenyim amb 0.1% de cristall violeta durant 30 minuts a temperatura ambient.

Determinem el número de colònies per condició i el representem com a percentatge del control.

10. Assajos de migració

Per mirar la capacitat migratòria de les nostres cèl·lules, hem utilitzat els assajos de *wound healing* i *transwell*.

10.1. *Wound healing*

En el cas de *wound healing*, sembrem les cèl·lules en plaques de 24 pouets a la densitat de 500.000 cèl·lules/ml i les deixem que arribin a confluència. En aquest moment, fem una ferida amb una punta d'una pipeta de 10µl, rentem les plaques amb PBS per eliminar les cèl·lules que hagin pogut quedar desadherides i deixem la placa a l'incubador amb medi DMEM 0.5% de FBS. Adquirim les imatges a les 0 i 48 hores amb l'objectiu de 4x i mesurem la distància entre un costat i l'altre de la ferida amb el programa ImageJ. La migració cel·lular es determina medint el temps de cicatrització de la ferida, i correspon a la diferència de tamany entre els punts 0 i 48h. Indiquem els resultats amb µm.

10.2. *Transwell*

En el cas de l'assaig de *transwell*, sembrem 100.000 cèl·lules/ml a la cambra superior (Corning) d'una placa descoberta de 24 pouets. Aquesta cambra, contè uns porus de 8µm, i les cèl·lules hi són sembrades amb medi DMEM 0.5% de FBS. Al compartiment inferior hi posem DMEM 10% FBS, i ho deixem a l'incubador durant 18h, esperant a que les cèl·lules migrin cap aquest segon compartiment. Un cop passat aques temps, les cèl·lules que no s'han mogut, les eliminem de la cambra superior amb una punta de cotó. Per la contra, les cèl·lules que han migrat i es troben adherides a la membrana inferior, es fixen amb metanol fred durant 15 minuts a la temperatura de 4°C i es tenyeixen amb 0.1% de cristall violeta durant 30 minuts a temperatura ambient. Obtenim imatges amb l'objectiu de 10x. Per

estimar el número de cèl·lules que han migrat cap al compartiment inferior, disolem el cristall violeta amb àcid acètic al 10% i medim l'absorbància a 595nm. Representem la intensitat de cristall violeta com a percentatge del valor d'absorbància obtingut al control, que considerem del 100%.

11. Assaig de *Soft agar*

Plaques de 6 pouets són pre-tractades amb 1% de solució d'agar i es deixen solidificar durant 30 minuts a temperatura ambient. Seguidament, 400 cèl·lules/ml es barregen amb medi de cultiu complet que contè 0.6% d'agar, quedant doncs a una concentració final de 0.3% d'agar. La suspensió cel·lular s'afegeix als pouets pre-tractats i es deixar solidificar durant 30 minuts. Per evitar la dessecació, cobrim cada pouet amb 100µl de medi DMEM i es va restablint cada 3 dies fins a un temps de 21 dies finals, on es prenen imatges de les colònies formades amb el software de GeneSnap (Syngene) i es compten automàticament amb el software de GeneTools (Syngene).

12. Transfecció *siRNA*

Les cèl·lules són sembrades en plaques de 48 pouets a la densitat de 120.000 cèl·lules/ml. Al dia següent, es transfecten dos *siRNA* de CNTD2 (OriGene, SR312715A) i un control negatiu utilitzant lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, 12566014). Després de 72h d'aquesta incubació, comptem les cèl·lules i fem l'extracció de *RNA* com s'explica a continuació.

13. PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR)

L'extracció de *RNA* es fa utilitzant el kit comercial *Nucleospin RNA isolation kit* (Macherey-Nagel, 740955). 1µg de *RNA* total s'utilitza per la síntesi del *DNA* complementari (*cDNA*) juntament amb els següents reactius 2µl de RTbuffer (F88903, Lucigen), 4 µl dNTP 10mM (D7295, Sigma), 2 µl de Random RT primers (309080, Exiqon), 0.5 µl d'enzim m-MuLV (30222, bioNova) i 2 µl de transcriptasa reversa (30281-1, bioNova) i fins a un volum total de 20 µl, que s'incubaran a 37°C durant 1h. La PCR quantitativa es fa amb *SYBR Green I Master Mix* (BioRad 1725271), i els valors obtinguts son normalitzats amb l'actina i calculats seguint la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els oligonucleòtids utilitzats queden recollits a la taula 3.

	<i>FORWARD</i>	<i>REVERSE</i>
Actina	TCCACCTTCCAGCAGATGTG	GCATTGCGGTGGACGAT
CNTD2	CTGGTGGTAGACTGGCTGGT	AGCACGCACTCTCCATTTT

Taula 3. Oligonucleòtids utilitzats pels experiments de PCR quantitativa a temps real.

14. Comptatge cel·lular

Un cop recollides les cèl·lules, amb tripsina, utilitzem la càmera de Neubauer per comptar. Cada condició es compta per triplicat a l'objectiu 10x. El número de cèl·lules s'expressa com a percentatge dels valors obtinguts a les cèl·lules control, que es consideren el 100%.

15. Models xenògrafs tumorals

Set ratolins mascles atímics (CrI:NU-Foxn 1nu) de 5 setmanes d'edat (Envigo, Italy) van ser injectats subcutàniament amb 3×10^6 cèl·lules A549 pèviament infectades amb la construcció sobreexpressada del vector buit o CNTD2. Es va monitoritzar el creixement tumoral medint la llargada (L) i amplada (A) del tumor fins que els ratolins van ser sacrificats 62 dies després de la ingecció. Amb aquestes mesures es van estimar els volums dels tumor (mm^3) seguint la fòrmula $V = \pi / (6 \times L \times A^2)$. Un cop sacrificats els ratolins es van pesar els tumors disseccionats. Tots els experiments han estat aprovats pel comitè de cura dels animals de l'IDIBELL i els protocols utilitzats estan d'acord amb les guies aprovades.

16. Corbes de supervivència

Utilitzant la web (<http://kmplot.com/lung/>) hem pogut generar les corbes de supervivència dels pacients amb les nostres característiques. Per fer-ho, hem dividit la mostra en dos grups (alta expressió i baixa expressió) d'acord amb l'expressió mitjana del nostre gen i ho hem representat amb els gràfics de Kaplan-Meier. L'estudi s'ha fet escollint els pacients que tenen marges negatius després de la cirurgia i el test estadístic utilitzat és la t de Student (T-test) logarítmica bilateral.

17. Anàlisi estadístic

Sempre que no s'indiqui el contrari, els valors es representen amb la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM), tenint en compte els p-valors següents: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

El test estadístic utilitzat per tots els experiments amb línies cel·lulars és el test de Mann-Whitney.

A l'anàlisi dels pacients on representem la ràtio entre el teixit tumoral i normal (T/N ràtio), utilitzem el test de Wilcoxon.

Per establir les correlacions entre l'historial clínic i les T/N ràtio obtingudes de les diferents noves ciclines, hem utilitzat tres tests diferents, el test de Mann-Whitney, el test de Krüskal-Wallis i la correlació de Spearman. S'ha escollit un test o altre en funció del tipus de variables comparades. La taula 4 recull el test utilitzat en cada cas.

S'ha utilitzat el GraphPad Prism 5 i el programa estadístic per les ciències socials (SPSS) 21.

Variable dependent		Quantitativa (T/N ràtio)	
Variable independent			
Qualitativa	2 grups	Tipus histològic Metàstasi distant (M) Sexe Historial fumador Historial altres tumors	U-Mann Whitney
	> 2 grups	Tumor primari (T) Ganglis limfàtics regionals (N)	Krüskal-Wallis
Quantitativa		Edat	Correlació Spearman

Taula 4. Resum tests no paramètrics utilitzats per establir les correlacions entre les noves ciclines i l'historial clínic dels pacients.

RESULTATS

CAPÍTOL 1

Caracterització de les eines bioquímiques

1. Validació anticossos

Aquest treball es centra amb l'estudi de les proteïnes de les noves ciclines presents al càncer de pulmó. És molt important doncs, tenir uns bons anticossos que ens permetin identificar de forma correcta la proteïna desitjada en cada cas. Tot i tenir disponibles diferents anticossos comercials, abans de començar a treballar es va decidir fer una validació dels anticossos amb un sistema d'expressió heteròloga. Les ciclines van ser clonades al vector pGBKT7 fusionat al domini d'unió al DNA (*DNA-BD*) i expressat a la soca de llevat AH109. D'aquesta manera, podem controlar amb l'anticòs α -GAL4 (*DNA-BD*) la quantitat real de proteïna expressada i comparar-la amb la senyal aportada per cada anticòs específic (Figura 4).

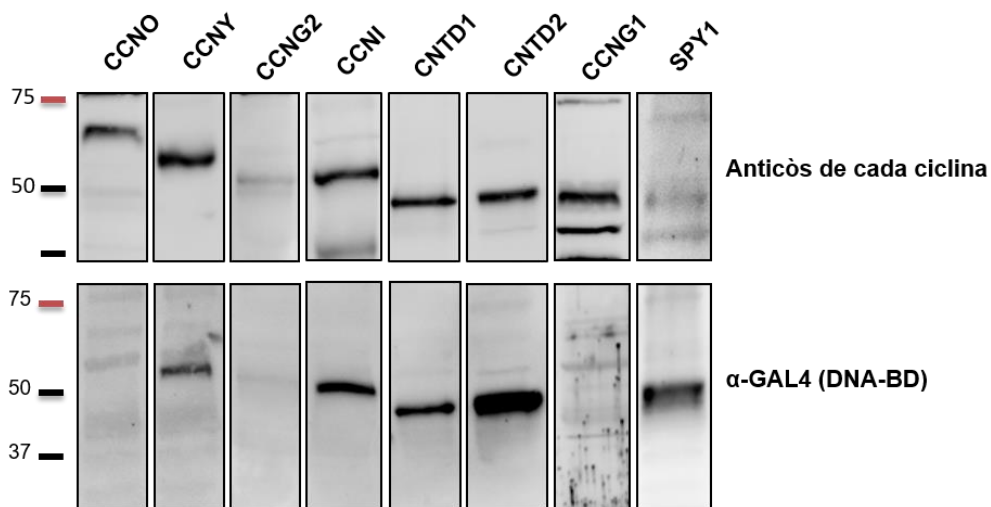


Figura 4. Validació dels anticossos de les ciclines. L'expressió de les ciclines es detecta utilitzant l'anticòs Gal4 (panell inferior) i després, cada carril va ser incubat amb el corresponent anticòs comercial (panell superior).

Aquest resultat ens mostra que la majoria dels anticossos que tenim disponibles presenten una bona sensibilitat. Els considerem òptims per realitzar el nostre estudi.

2. Estudi anticòs CNTD2

La proteïna de CNTD2 és tant nova i desconeguda, que no hi ha gaires anticossos disponibles al mercat i els que hi ha, detecten regions de CNTD2 similars. L'anticòs utilitzat, l'únic disponible en el moment de començar l'estudi, és de la casa comercial Abcam (Ab179781) és policlonal i detecta una regió de N-terminal de 50 aminoàcids (Figura 5a). Tal i com podem veure a la seva fitxa tècnica, és un anticòs validat per *western blot* (Figura 6a). Hem trobat un altre anticòs comercial disponible de Sigma Aldrich (HPA045615), que detecta una regió més gran també del N-terminal de CNTD2 (Figura 5b). Aquest anticòs però, només està validat per la tècnica d'IHQ (Figura 6b).

- a** MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAV**PDGFAGPTVSPRRLA**
RPPGLEEALSALGLQGEREYAGDIFAEMVVCRVLPLRALPRAVTPEMRALVVDWLQVHE
 YLGLAGDTLYLAVHLLDSYLSAGRVRLHRLQLLGVACLFVACKMEECVLPEPAFLCLLSADSF
 SRAELLRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMMLLATYFLELSLLEAEAAGWE
 PGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYRCSLGGGSVWGHRSFRDLPSWSFLRSRRMRD
 NY
- b** MLVRGRDQGGSG**SRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAV****PDGFAGPTVSPRRLA**
RPPGLEEALSALGLQGEREYAGDIFAEMVVCRVLPRLALPRAVTPEMRALVVDWLQVHE
 YLGLAGDTLYLAVHLLDSYLSAGRVRLHRLQLLGVACLFVACKMEECVLPEPAFLCLLSADSF
 SRAELLRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMMLLATYFLELSLLEAEAAGWE
 PGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYRCSLGGGSVWGHRSFRDLPSWSFLRSRRMRD
 NY
- c** MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAV**PDGFAGPTVSPRRLA**
RPPGLEEALSALGLQGEREYAGDIFAEMV**CRVLPLRALPRAV**TPEMRALVVDWLQVHE
 YLGLAGDTLYLAVHLLDSYLSAGRVRLHRLQLLGVACLFVACKMEECVLPEPAFLCLLSADSF
 SRAELLRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMMLLATYFLELSLLEAEAAGWE
PGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYRCSLGGGSVWGHRSFRDLPSWSFLRSRRMRD
 NY

Figura 5. Seqüències de CNTD2 reconegudes per cada anticòs. (a) Casa comercial Abcam, Ab179781. (b) Casa comercial Sigma Aldrich (HPA045615). (c) Anticòs realitzat per nosaltres. La zona blava correspon a la zona modelitzada.

Degut a la importància descoberta d'aquesta nova ciclina i a les poques eines disponibles per poder detectar-la, es va creure interessant generar el nostre propi anticòs en un model de conill.

Al no tenir CNTD2 cristal·litzada, vam haver de fer l'estudi d'immunogenicitat segons proteïnes homòlogues. De tota la seqüència de CNTD2, es va poder modelitzar des de l'arginina 78 (ARG78) fins a la cisteïna 276 (CYS276). Dins d'aquesta zona, hi ha un pèptid sense estructura bastant exposat (Figura 5c), que és contra el qual es va decidir fer l'anticòs (Biomedal).

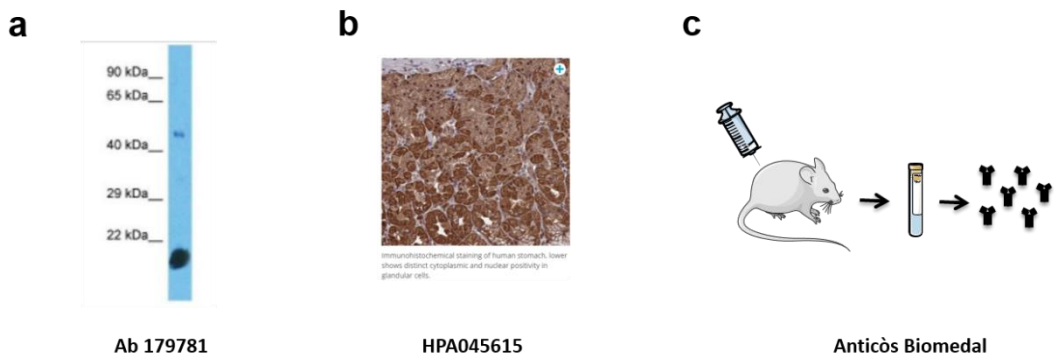


Figura 6. Imatges de les fitxes tècniques de les cases comercials de cada anticòs. (a) Casa comercial Abcam, Ab179781. (b) Casa comercial Sigma Aldrich (HPA045615). (c) Anticòs realitzat per Biomedal sota el nostre disseny.

Per comparar la sensibilitat dels tres anticossos, vam utilitzar un sistema d'expressió heteròloga seguint el mateix procediment que s'ha explicat anteriorment, clonant CNTD2 en una soca AH109 de llevat en un vector pGBKT7 com a proteïna de fusió al domini d'unió al DNA GAL4 (Figura 7).

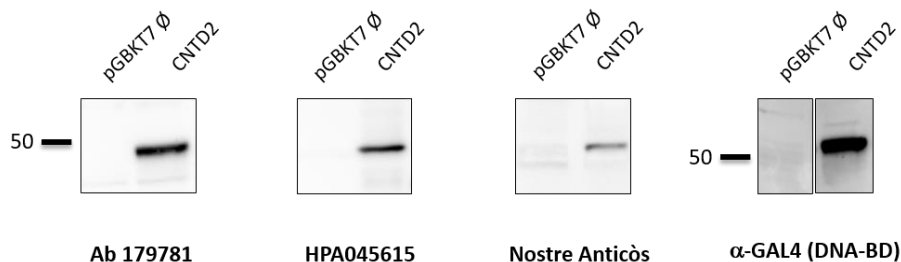


Figura 7. Sensibilitat dels anticossos per detectar CNTD2. Imatges representatives de l'expressió amb un sistema heteròleg. Detectem CNTD2 amb l'anticòs de dues cases comercials diferents, Abcam (Ab179781) i Sigma Aldrich (HPA045615) i amb l'anticòs generat per nosaltres, i amb l'anticòs control contra GAL4 (domini d'unió al DNA).

Tal i com es pot veure a la figura anterior, tenint una bona expressió de CNTD2, monitoritzada per la senyal que ofereix la detecció amb l'anticòs primari α -GAL4, es pot afirmar que els tres anticossos detecten la isoforma canònica correctament, sent l'anticòs de Abcam el més sensible i el generat per Biomedal el menys sensible.

Cap dels anticossos però, és capaç de detectar CNTD2 en un extracte de proteïna de diferents línies cel·lulars (Figura 8).

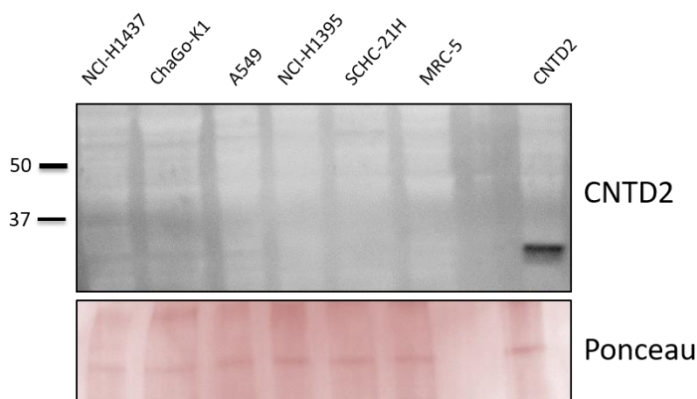


Figura 8. Detecció de CNTD2 en diferents línies cel·lulars. Imatge representativa de la transferència *western* que exemplifica els resultats negatius obtinguts amb els tres anticossos provats. L'últim carril (CNTD2) correspon a la línia cel·lular A549 infectada amb la construcció de CNTD2 i s'utilitza com a control positiu.

En aquest punt, estem segurs doncs, de que els anticossos utilitzats funcionen correctament, els hem validat per dos mètodes diferents, amb un sistema d'expressió heteròleg i amb una línia infectada amb la construcció que volem detectar.

D'altra banda, tot i saber que l'expressió de CNTD2 en línies cel·lulars és molt baixa, una explicació alternativa als resultats negatius d'expressió de CNTD2 en línies tumorals, podria ser el procediment utilitzat per l'extracció de proteïna.

3. Condicions d'extracció de CNTD2

És ben conegut que una preparació adequada de la mostra és essencial per tenir èxit quan realitzem *western blot*. Els tampons utilitzats durant l'extracció de proteïna, prenen un paper important, ja que l'estructura química dels seus detergents, la concentració de sal i el pH, són factors que afecten a la solubilització de les proteïnes. El mètode utilitzat doncs, dependrà del tipus de mostra de partida, de la localització subcel·lular de la proteïna en qüestió i de les condicions òptimes que requereixi l'anticòs per reconèixer l'epítop proteínic.

Pretenem doncs millorar els resultats obtinguts fins ara, provant diferents tampons d'extracció. Per fer-ho utilitzarem dues línies cel·lulars, A549, com a línia de treball i NCI-H1437 línia escollida per presentar uns nivells de *mRNA* de CNTD2 elevats segons la base de dades *Expression Atlas* (Figura 25) i la línia A549 que sobreexpressa CNTD2, que utilitzarem com a control positiu.

Els tampons d'extracció escollits seran 3:

- 1) Protocol basat en l'extracció de proteïnes amb un tampó hipotònic (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl).
- 2) Tampó de lisi i condicions utilitzades per l'extracció de proteïna dels teixits de pacients parafinats (20mM Tris-HCl pH 8.8, 200mM DTT, 2% SDS).
- 3) Tampó de lisi i condicions habituals en aquest treball (20mM TRIS, 5mM EDTA, 1% NP40, 150mM NaCl, pH 7.4 suplementat amb inhibidors de fosfatasa i proteasa).

Cap de les estratègies utilitzades ens ha permès veure l'expressió basal de CNTD2 a les línies A549 i NCI-H1437. Els resultats obtinguts amb la línia A549 que sobreexpressa CNTD2 es mostren a la figura 9. Com es veu, els tres tampons utilitzats són bons per l'extracció de CNTD2 quan la quantitat d'aquesta proteïna supera un determinat llindar, obtenint uns millors resultats pel tampó 2, tampó que com es veurà a continuació, s'ha utilitzat per l'extracció de proteïna dels teixits parafinats dels pacients.

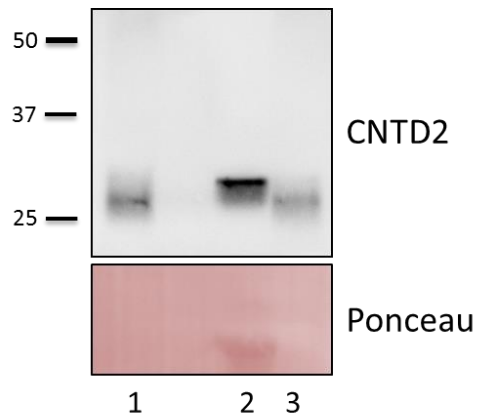


Figura 9. Condicions d'extracció de CNTD2. Transferència *western* de la prova d'extracció realitzada amb tres tampons diferents, on 1 representa l'extracció de proteïnes amb el tampó HEPES, 2 utilitzant el tampó de lisi dels teixits parafinats i 3, utilitzant el tampó de lisi habitual. La línia cel·lular utilitzada va ser la línia de pulmó A549 infectada amb la construcció de CNTD2.

Concloem que cap de les millores en les condicions d'extracció de proteïna és suficientment important per que ens permeti veure CNTD2. Considerem que les condicions treballades són òptimes i que el problema recau en la poca expressió d'aquesta proteïna en línies cel·lulars.

CAPÍTOL 2

Paper de les noves ciclins al carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (CPCNP)

1. Les noves ciclines tenen una expressió diferencial segons la línia cel·lular.

Per investigar si les noves ciclines juguen un paper important en el càncer de pulmó, es va decidir testar per la tècnica de *western blot* l'expressió de les següents ciclines, CCNG1, CCNG2, CCNI, CCNO, CCNY, CNTD1, CNTD2 i SPY1 en dues línies cel·lulars d'adenocarcinoma de pulmó, A549 i NCI-H1395, comparant-les amb un cultiu primari de fibroblasts humans (Figura 10a) o bé, amb una línia de fibroblasts de pulmó, MRC-5 (Figura 10b).

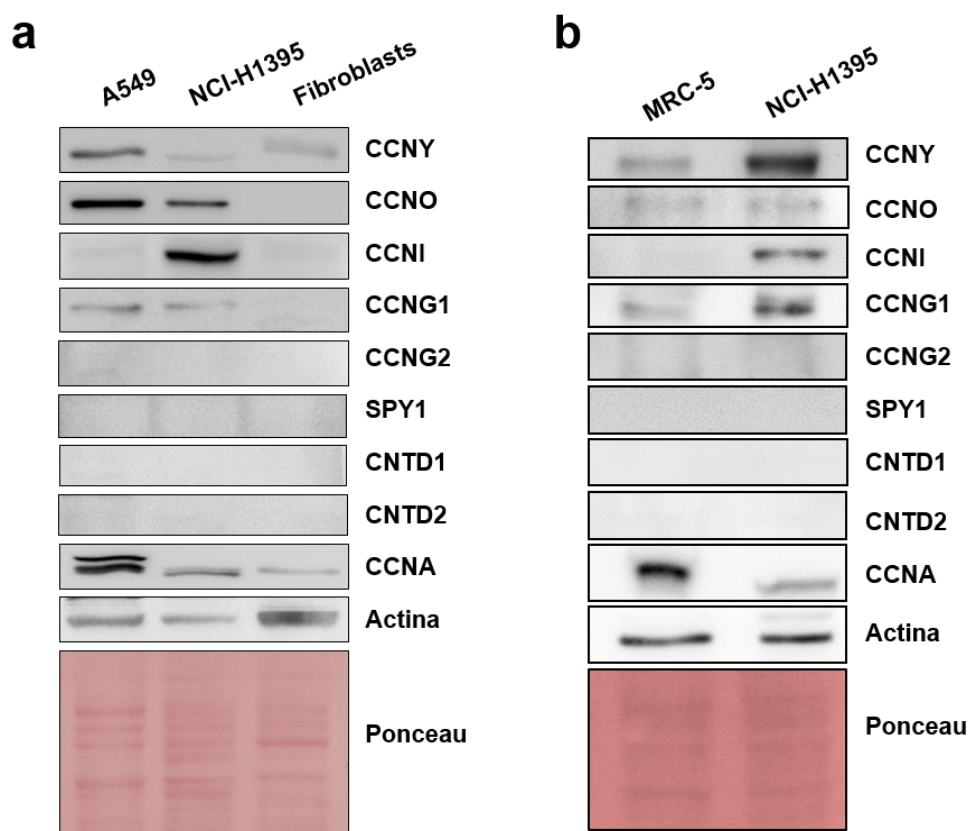


Figura 10. Les noves ciclines estan desregulades en un context de càncer de pulmó. Imatges representatives de l'expressió proteica de les noves ciclines (a) en dues línies cel·lulars humanes d'adenocarcinoma de pulmó, A549 i NCI-H1395, i uns fibroblasts humans i (b) en la línia tumoral NCI-H1395 i la línia de fibroblasts normals de pulmó MRC-5.

Com a control positiu, utilitzem l'expressió de la ciclina canònica CCNA; tal i com està descrit, aquesta ciclina es troba sobreexpressada a les dues línies tumorals utilitzades, particularment en A549, si les comparem amb els fibroblasts. Fixant-nos amb els resultats obtinguts veiem que, comparant-ho amb els fibroblasts, l'expressió de CCNY, CCNO i CCNG1 és més alta a la línia A549, mentre que CCNO, CCNG1 i CCNI ho són a la línia NCI-H1395. D'altra banda, l'expressió de CNTD1, CNTD2, CCNG2 o SPY1 no va ser detectada en cap de les tres línies utilitzades (Figura 10a).

Aquests resultats indiquen que l'expressió d'algunes noves ciclines podrien estar mal regulades en un context de càncer de pulmó. A més a més, semblaria que el patró d'expressió és específic de tipus cel·lular, observació que es reforça si comparem l'expressió de les ciclines CCNY, CCNO, CCNI i CCNG1, de la línia tumoral NCI-H1395 i de la línia de fibroblasts de pulmó, MRC-5 (Figura 10b).

2. CNTD2 i CCNI estan sobreexpressades en teixits humans de pacients amb càncer de pulmó.

Per continuar aprofundint sobre el rol de les noves ciclines en el càncer de pulmó, vam recollir 43 casos de pacients diagnosticats amb aquesta malaltia. Tots ells tenien un diagnòstic de càncer de pulmó de cèl·lules no petites (CPCNP), el tipus de tumor més majoritari quan parlem d'aquesta malaltia. De cada un d'ells, teníem una mostra de teixit tumoral així com també del teixit normal adjacent al tumor, que utilitzem com a control. Les característiques dels pacients inclosos a l'estudi estan recollides a la següent taula:

	Número (%)
Tipus histològic	
Adenocarcinoma	28 (65,1%)
Carcinoma de cèl·lules escamoses	15 (34,9%)
Estadi	
I	25 (58,1%)
II	12 (27,9%)
III	3 (7%)
IV	3 (7%)
Sexe	
Dona	14 (32,6%)
Home	29 (67,4%)
Edat (anys)	65,9 (60 - 74)
Historial fumador	
Mai ha fumat	6 (14%)
Ha fumat alguna vegada	34 (79%)
-	3 (7%)
Altres tumors	
Mai	38 (88,4%)
Alguna vegada	5 (11,6%)

Taula 5. Trets clinicopatològics dels pacients inclosos a l'estudi (n=43).

De les 43 mostres, 28 van ser identificades histològicament com adenocarcinomes (ADC) i 15 com a carcinoma de cèl·lules escamoses (SCC).

Els tumors van ser classificats segons el sistema d'estadiatge TNM, tenint més del 80% dels casos en estadis inicials de la malaltia. Apart, la nostra cohort de pacients contè més del 60% d'homes, té una mitjana d'edat de 65 anys i el 70% dels nostres casos han estat fumadors en algun moment de la seva vida.

Les mostres van ser fixades amb parafina (FFPE) i analitzades per *western blot*. Com a control de càrrega, utilitzem la membrana tenyida amb *Coomassie*. Després de la corresponent normalització dels carrils, vam determinar la ràtio d'expressió de cada nova ciclina entre el teixit tumoral i el normal (T/N ràtio) per cada individu analitzat.

L'expressió mitjana de proteïna per les ciclines CCNY, CCNO, CCNI i CNTD2 va resultar ser més alta a les mostres tumorals en comparació amb el teixit adjacent normal. Aquesta diferència, però, només va esdevenir estadísticament significativa per les ciclines CCNI i CNTD2 (Figura 11).

La isoforma de 17 kDa de CNTD2 descrita per *Uniprot* també s'expressa en aquestes mostres, però no hi ha diferències significatives entre el teixit tumoral i el normal (dades no mostrades).

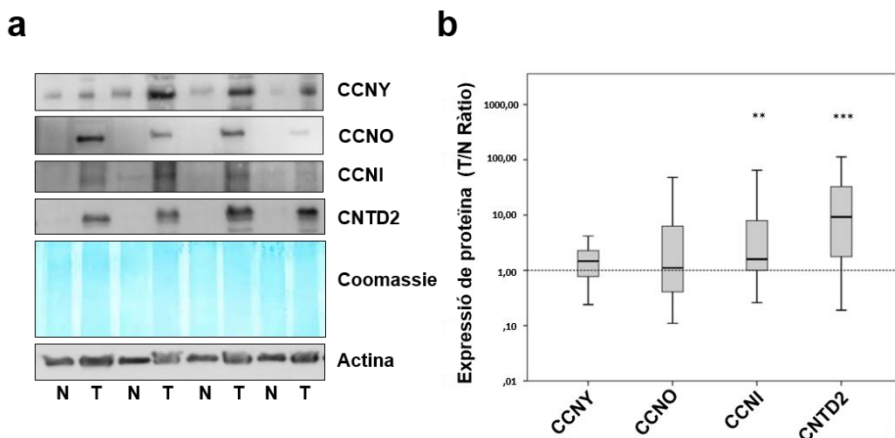


Figura 11. CNTD2 i CCNI estan sobreexpressades en teixits humans de pacients amb càncer de pulmó. (a) Imatge representativa de l'expressió proteica de les noves ciclines als teixits parafinats normal i tumoral de pulmó. (b) Representem amb diagrames de caixes l'expressió de les noves ciclines en mostres de teixit parafinat (FFPE) de pulmó tumoral humà i ho comparem amb el teixit adjacent normal, expressant la ràtio entre ells (T/N ràtio), on els bigotis indiquen el rang de valors obtinguts i la barra horitzontal la mediana (n=43). **P < 0.01, *** P < 0.001 vs teixit normal, test de Wilcoxon.

Per tal de confirmar els resultats bioquímics obtinguts, vam realitzar immunohistoquímica (IHQ) de sis pacients inclosos a l'estudi. De cada un d'ells, vam analitzar una mostra del teixit tumoral i la vam comparar amb el corresponent teixit normal adjacent. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 12, on podem tornar a veure una tinció positiva per les ciclines CNTD2, CCNO i CCNI al teixit tumoral, mentre que el teixit normal adjacent és generalment negatiu. En el cas de CCNY, detectem una senyal poc intensa tant en el teixit normal com en el tumoral.

Un dels punts forts de la tècnica d'IHQ és que et dona informació de la localització cel·lular de la proteïna analitzada. D'aquesta manera, podem dir que CNTD2 es troba predominantment localitzada al nucli, CCNI la trobem a la membrana nuclear, mentre que la ciclina CCNO es troba al nuclèol, totes tres però, específicament a les cèl·lules tumorals.

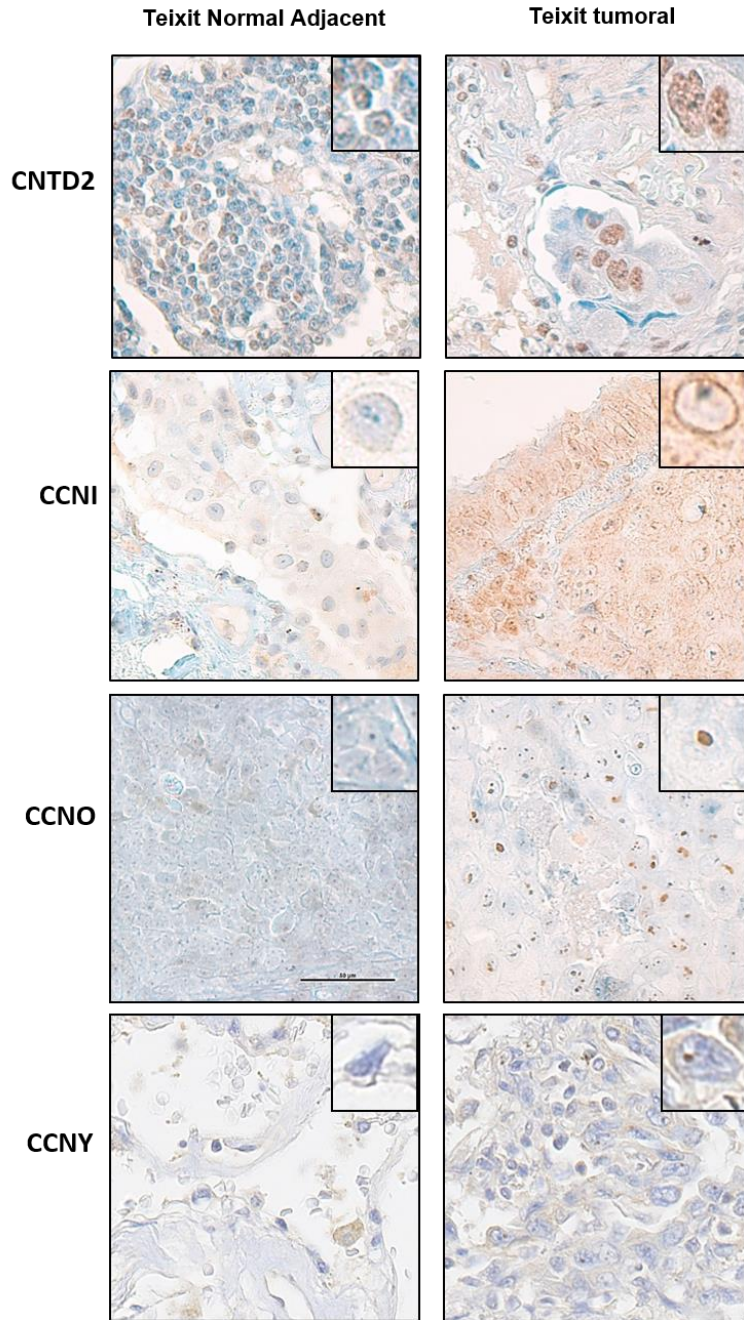


Figura 12. Localització cel·lular de les noves ciclines sobreexpressades en mostres humanes. Imatges representatives dels resultats IHQ de CNTD2, CCNI, CCNYO i CCNY fets en mostres d'adenocarcinoma de pulmó humà utilitzant el teixit adjacent normal com a control. 60x augment. Els requadres mostren una cèl·lula representativa del teixit amb 100x augment.

3. La sobreexpressió de CCNI i CNTD2 augmenta la proliferació en cèl·lules tumorals de pulmó.

Per tal de comprendre millor el rol que tenen aquestes ciclines dins del tumor, es van infectar cèl·lules A549 amb un vector lentiviral buit (control) o amb la construcció que expressa CCNI, CCNO, CCNY o CNTD2. Per determinar l'eficiència de la infecció, vam utilitzar citometria de flux detectant l'expressió de GFP, gen reporter de la infecció lentiviral. En tots els casos, tenim una infecció per sobre del 85% (dades no mostrades).

Paral·lelament, es va confirmar aquesta sobreexpressió per *western blot*, detectant la proteïna GFP, i el FLAG, proteïna de fusió amb la ciclina expressada en cada cas (Figura 13).

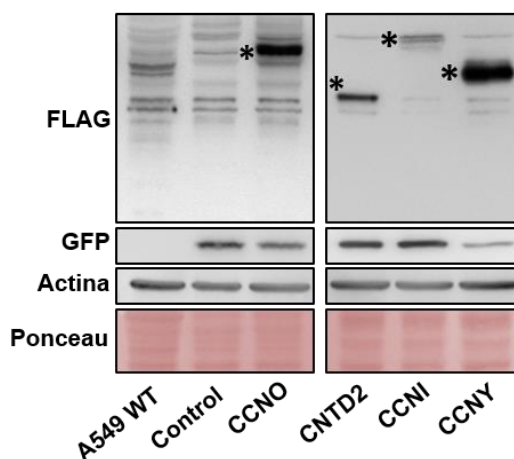


Figura 13. Confirmació de la infecció cel·lular. *Western blot* on es mostra els nivells de GFP, que indiquen que les cèl·lules han estat infectades, i els nivells de FLAG, que mostren la construcció sobreexpressada. Els asteriscs marquen la banda esperada en cada cas.

Degut a que els tumors es caracteritzen per tenir cèl·lules amb la proliferació augmentada, vam començar estudiant aquests fenotips. La viabilitat cel·lular es va testar amb l'assaig del MTT, que ens mostra la proporció de cèl·lules metabòlicament actives, gràcies a les deshidrogenases mitocondrials que poden reduir el compost de MTT a formazan, producte del que determinem l'absorbància. Es va

realitzar l'assaig 5 dies després de la infecció de les cèl·lules i obtenim que tant CCNI com CNTD2 influeixen significativament a la viabilitat cel·lular (Figura 14a).

Per estudiar un marcador més concret de proliferació cel·lular, es va utilitzar el ki-67, proteïna que augmenta a mesura que les cèl·lules es preparen per dividir-se. Les cèl·lules que tenen una viabilitat significativament augmentada, també presenten nivells de ki-67 significativament més alts, en comparació amb les cèl·lules control (Figura 14 b, c). Aquests resultats suggereixen que tant CCNI com CNTD2 tenen un efecte en la proliferació cel·lular.

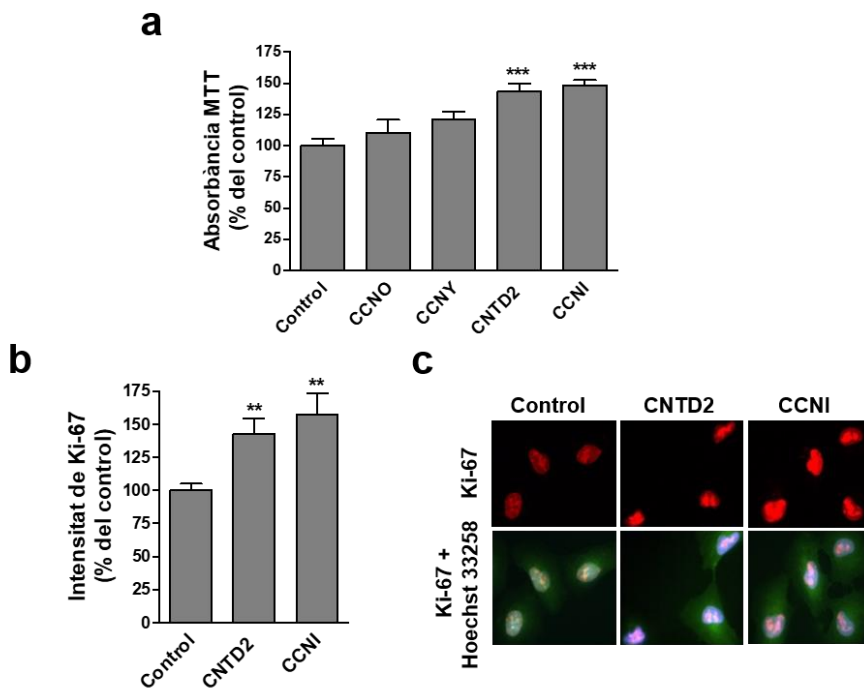


Figura 14. La sobreexpressió de les ciclines I i CNTD2 augmenta la proliferació en cèl·lules A549. (a) Avaluem la viabilitat cel·lular amb l'assaig de MTT. Representem en columnes la mitjana \pm SEM de 5 experiments independents realitzats en quadruplicat. (b) Utilitzem la tinció de ki-67 per testar la proliferació en A549. Les columnes representen la mitjana \pm SEM de quatre experiments independents. (c) Imatge representativa de les cèl·lules A549 tenyides per ki-67. Marquem els nuclis cel·lulars amb Hoechst 33258 i la superposició de les imatges es mostra al panell inferior. **P < 0.01 i ***P < 0.001 vs control, test de Mann-Whitney.

Un augment de la proliferació cel·lular podria ser degut per una disminució dels nivells d'apoptosi. Per confirmar si ens trobem en aquest context, vam monitoritzar l'expressió de la caspasa-9 per *western blot* en cèl·lules A549 que sobreexpressen CNTD2 i CCNI. En cap situació, vam obtenir canvis significatius en els nivells d'expressió d'aquesta caspasa. L'augment de viabilitat i proliferació cel·lular donada per les noves ciclines no sembla actuar doncs, per aquesta via (Figura 15).

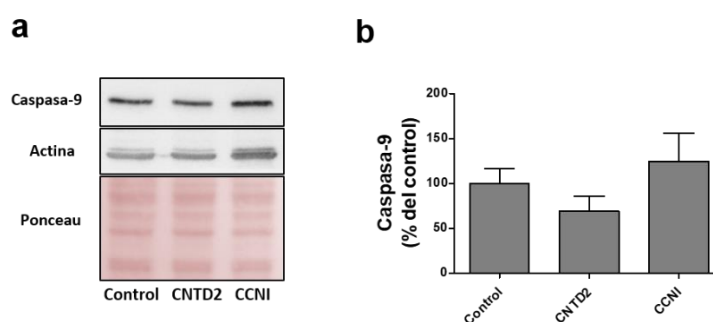


Figura 15. La sobreexpressió de CNTD2 i de CCNI no afecta a l'apoptosi de les cèl·lules A549. Seguim per WB l'expressió de la Caspasa-9 en cèl·lules A549 infectades amb el vector buit (control) o amb la construcció de la ciclina indicada. (a) Imatges representatives del *western blot*. (b) Quantificació dels nivells de caspasa-9 després de la normalització amb el *Ponceau*. Les columnes representen la mitjana \pm SEM de cinc experiments diferents, test de Mann-Whitney.

D'altra banda, un tret important de les cèl·lules proliferatives és la capacitat de formar colònies. En realitzar experiments sobre aquest fenotip, vam veure que la sobreexpressió de CCNI i CNTD2 en cèl·lules A549 promou la formació de colònies, encara que, només s'obtenen resultats estadísticament significatius en el cas de CNTD2 (Figura 16).

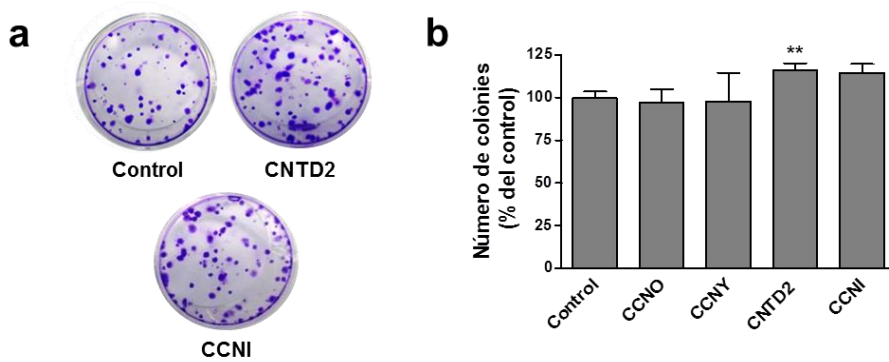


Figura 16. Capacitat de formar colònies de CNTD2. (a) Imatge representativa de l'experiment de formació de colònies. (b) Número de colònies formades en cèl·lules A549. Les columnes representen la mitjana \pm SEM de quatre experiments diferents. ** $P < 0.01$, vs control, test de Mann-Whitney.

4. La sobreexpressió de CNTD2 augmenta la migració de les cèl·lules A549.

Per tal d'estudiar millor el paper de les noves ciclines analitzades, es van establir correlacions estadístiques entre les ràtios (T/N) obtingudes dels anàlisis de *western blot* i la informació clínica dels pacients inclosos a l'estudi que teníem disponible. El resultat, correlacions de les ciclines CCNY, CCNI, CCNO i CNTD2 amb vuit trets de l'historial clínic de cada pacient, el tipus histològic, el grau TNM, l'edat, el sexe, l'historial fumador i l'historial d'altres tumors (Taula 6).

Les nostres variables no segueixen una distribució gaussiana normal, per tant, escollim les proves no paramètriques per fer tant les comparacions com les correlacions. Els tests i codis utilitzats queden recollits a l'apartat d'anàlisi estadístic de material i mètodes i a l'annex II, respectivament. De totes les comparacions realitzades vam trobar una diferència rellevant entre el marcador de metàstasi distant (M) i els nivells de CCNO i CNTD2 (Taula 6). La significació estadística però, només la vam obtenir en el cas de CNTD2. D'aquesta manera podem dir que, aquells pacients que han tingut metàstasi distant (M1) són els que presenten uns nivells més alts de CNTD2 (Figura 17).

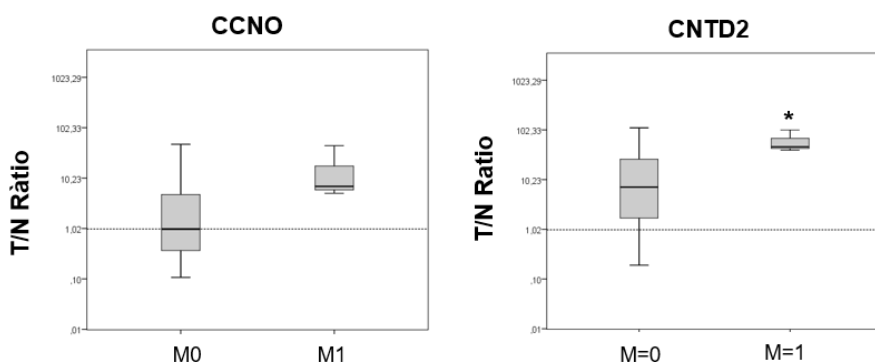


Figura 17. Box plot de mostres parafinades de pacients segons la metàstasi distant (M). Determinem la ràtio T/N de les ciclines CCNO i CNTD2 de les mostres parafinades de pacients de càncer de pulmó amb (M1, n=3) i sense metàstasi (M0, n=40) i la representem en box plot. *P < 0.05, quan ho comparem amb els teixits control, test de Mann-Whitney.

Variable	CCNI		CCNO		CCNY		CNTD2	
		P		P		P		P
Tipus histològic ^a								
ADK	1,0 (0,8-2,7)	0,03*	1,0 (0,4-4,5)	0,27	1,5 (0,9-2,3)	0,59	9,2 (1,8-36,4)	0,97
SCC	5,7 (1,9-28,8)		5,1 (0,5-13,6)		1,0 (0,4-2,7)		8,7 (1,7-31,1)	
Tumor primari (T) ^b								
1	2,0 (1,1-11,9)	0,37	1,0 (0,5-3,9)	0,86	2,3 (0,3-3,2)	0,72	11,6 (1,7-31,5)	0,82
2	4,5 (1,1-39,7)		2,9 (0,3-18,9)		1,2 (0,8-2,5)		9,2 (2,1-36,6)	
3	1,0 (0,6-3,3)		1,2 (0,5-4,6)		1,1 (0,5-1,7)		4,7 (0,3-36,3)	
4	NA		22,7 (0,4-45,1)				26,9 (7,0-46,9)	
Nòduls limfàtics (N) ^b								
0	1,5 (1,0-6,9)	0,08	1,1 (0,5-6,6)	0,81	1,5 (0,8-2,6)	0,52	8,3 (1,3-34,4)	0,44
1	35,4 (19,3-37,5)		2,61 (0,1-5,1)		NA		56,9 (11,8-102,2)	
2	0,9 (0,9-1,0)		12,5 (0,4-24,7)		NA		7,0 (5,1-15,2)	
Metàstasi distant (M) ^a								
0	1,6 (1,0-10,9)	0,46	1,0 (0,4-5,2)	0,05	1,4 (0,7-2,5)	0,79	7,2 (1,6-26,8)	0,02*
1	1,8 (0,3-3,3)		7,0 (6,1-26,1)		NA		46,9 (43,5-74,5)	
Sexe ^a								
Dona	1,0 (0,7-20,3)	0,49	0,7 (0,3-2,9)	0,21	1,6 (1,2-2,5)	0,46	3,6 (1,2-38,3)	0,38
Home	2,1 (0,9-7,5)		2,1 (0,8-10,6)		1,5 (0,4-2,5)		11,8 (1,8-31,6)	
Edat ^c	r = 0,02	0,92	r = 0,04	0,81	R = -0,28	0,23	r = -0,81	0,63
Fumador ^a								
Mai	12,9 (0,7-33,7)	0,38	4,3 (0,6-20,3)	0,54	1,5 (1,4-2,5)	0,46	23,4 (0,8-40,1)	0,93
Alguna vegada	1,6 (0,9-5,1)		1,0 (0,4-6,6)		1,2 (0,4-2,5)		8,3 (1,9-33,3)	
Altres tumors ^a								
Mail	1,7 (1,0-10,9)	0,45	1,0 (0,4-5,1)	0,42	1,5 (0,8-2,0)	0,27	9,6 (2,4-30,4)	0,56
Alguna vegada	1,3 (0,7-4,3)		7,0 (3,9-8,3)		2,8 (1,6-3,5)		2,5 (1,2-34,9)	

Taula 6. Relació de l'expressió proteica de les ciclines amb les dades clíniques dels pacients. Representem les medianses (rang interquartílic). a- p-valor aplicant el test de Mann-Whitney; b- p-valor aplicant el test de Kruskal-Wallis; r- Coeficient de correlació de Spearman. c- p-valor aplicant el test de Spearman. NA- test no aplicable per la manca de mostres. *P < 0,05 posats en negreta per distingir-los dels altres valors.

Tot i que hauríem de fer més estudis amb pacients d'aquestes característiques per confirmar aquesta observació, aquests resultats ens podrien estar indicant que aquestes ciclines estarien implicades en processos d'invasió cel·lular, per tant, els resultats ens empenyen a veure els efectes de migració d'aquestes ciclines.

El primer experiment realitzat per aquest propòsit, és el *wound healing*. En plaques confluents amb cèl·lules A549 que sobreexpressen CCNO o CNTD2, així com també amb les cèl·lules infectades amb el vector buit (control), es fa una "ferida" amb la punta d'una pipeta i esperem 48h a que es tanqui a causa de la migració de cèl·lules cap aquest punt. Per tal de suprimir la proliferació cel·lular i mesurar només l'efecte de la migració, reduïm el sèrum del medi de cultiu.

Com veiem a les imatges a i b de la figura 18, només les cèl·lules que tenen CNTD2 sobreexpressat, presenten nivells de migració significativament més alts que les cèl·lules control.

De manera complementària a l'experiment anterior, fem un assaig de migració amb *transwell*. Amb aquesta prova, corroborarem els resultats anteriors, demostrant que les cèl·lules A549 que sobreexpressen CNTD2 presenten un augment de la capacitat migratòria en comparació amb les cèl·lules control (Figura 18 c i d).

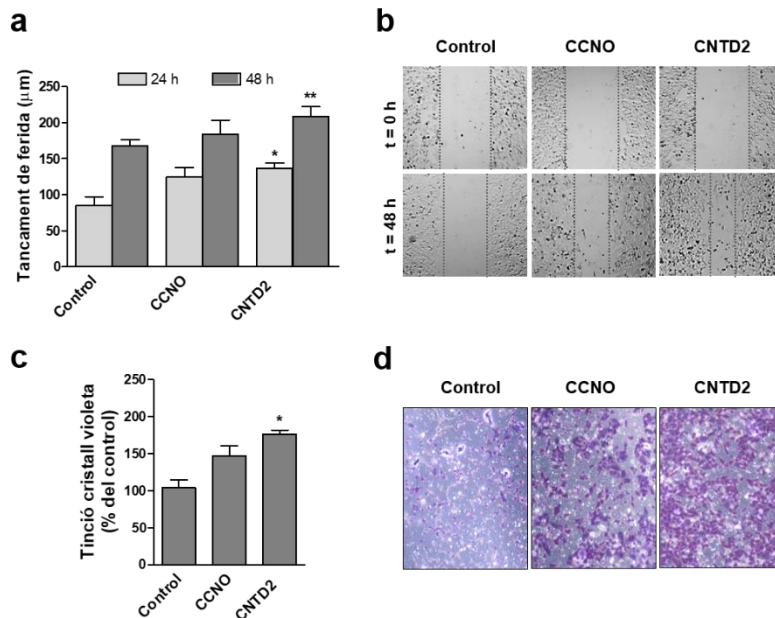


Figura 18. La sobreexpressió de CNTD2 augmenta la migració de les cèl·lules A549. (a) Quantificació de tres experiments diferents de l'assaig de la ferida, realitzats en triplicats. Representem els resultats en funció del tancament de la ferida en µm. Les columnes representen la mitjana ± SEM. *P < 0.05, **P < 0.01 vs control, test de Mann-Whitney. (b) Imatges representatives de l'assaig captades a les 0 i 48h; les línies discontinues marquen l'àrea que queda sense cèl·lules. (c) Monitoritzem la migració de les cèl·lules A549 amb l'assaig de *transwell* i en fem una estimació quantificant la intensitat de tinció del cristall violeta mesurada a l'absorbància de 595nm. Les columnes representen la mitjana ± SEM de quatre experiments independents realitzats per triplicats. *P < 0.05 vs control, test de Mann-Whitney. (d) imatges representatives de l'assaig de *transwell* després de la tinció amb cristall violeta.

Per poder viatjar pel cos, colonitzar altres teixits i establir metàstasis distants, les cèl·lules tumorals han de tenir la capacitat de créixer de manera independent d'ancoratge i adquirir un fenotip similar al de la transició epiteli-mesènquima (EMT). Per tal d'estudiar els mecanismes pels quals CNTD2 desenvolupa aquesta propietat, vam mirar un dels marcadors de EMT, les cadherines. Són les principals molècules d'adhesió cel·lular, mantenint d'aquesta manera les unions cèl·lula-cèl·lula i doncs, l'estructura dels diferents teixits animals. Per estudis d'aquest tipus, es miren els nivells d'expressió d'E-cadherina i d'N-cadherina, ja que està descrit que a mesura que les cèl·lules es van

tornant més mesenquimals, perden l'expressió de les E-cadherines mentre que van augmentant les N-cadherines. Comparant els seus nivells d'expressió en cèl·lules A549 que tenen CNTD2 expressat i en cèl·lules que no, vam observar que el fet de tenir aquesta ciclina implica tenir nivells significativament més baixos de E-cadherina, tenint la N-cadherina lleugerament augmentada (Figura 19). CNTD2 doncs, podria estar jugant un paper en aquest procés.

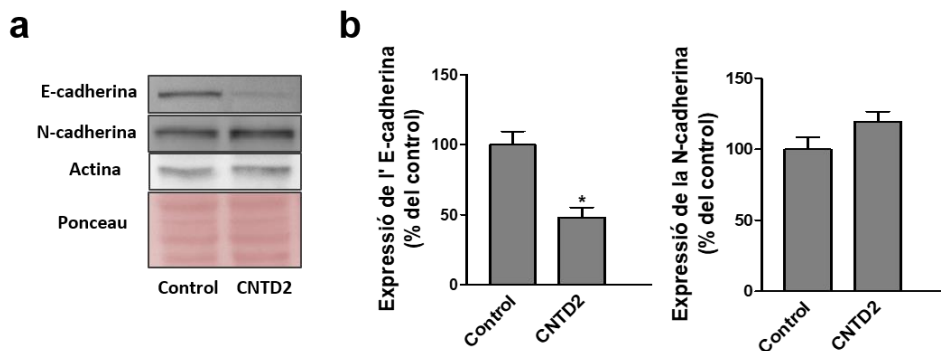


Figura 19. CNTD2 promou la EMT. Mirem per WB l'expressió d'E-cadherina i la N-cadherina en cèl·lules A549 infectades amb el vector buit (control) o amb la construcció de CNTD2 sobreexpressada. (a) Imatges representatives dels *western blot*. (b) Quantificació de l'efecte de la sobreexpressió de CNTD2 sobre les cadherines després de la normalització amb el *Ponceau*. Es representa com a percentatge del control. Les columnes representen la mitjana \pm SEM de dotze experiments diferents. *P < 0.05 vs control, test de Mann-Whitney.

L'altre tret característic de les cèl·lules més agressives és la capacitat de créixer sense estar adherides. Per veure si CNTD2 posseeix aquesta capacitat, vam realitzar experiments de *soft agar*. Aquesta tècnica, ens permet sembrar cèl·lules, que en el nostre cas són A549 que sobreexpressen CNTD2 i cèl·lules control, barrejades amb agar de manera que no poden créixer adherides a la placa de cultiu com ho fan habitualment.

Després de 21 dies, es van comptar les colònies amb un programa automàtic. Els resultats ens mostren que la sobreexpressió de CNTD2

estimula la formació de colònies de manera independent d'ancoratge en cèl·lules A549, tal i com es pot veure a la figura 20.

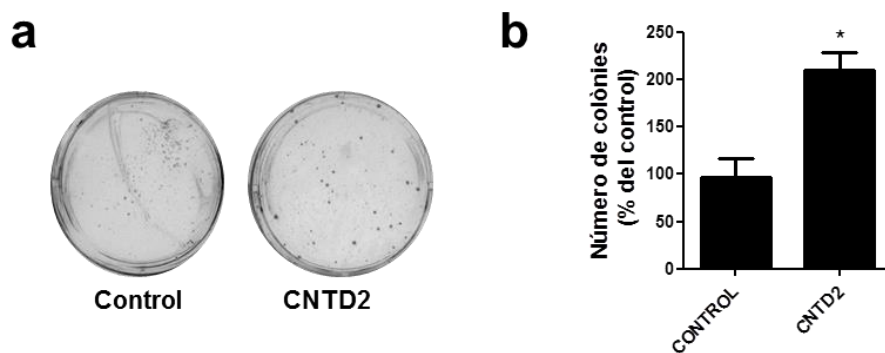


Figura 20. Efecte de CNTD2 sobre el creixement independent d'ancoratge. (a) Imatge representativa de l'experiment *soft agar*. (b) Número de colònies formades en cèl·lules A549. Les columnes representen la mitjana \pm SEM. * $P < 0.01$, vs control, test de Mann-Whitney.

5. L'increment de CNTD2 intracel·lular està associat amb un augment del creixement tumoral *in vivo*.

Els resultats obtinguts *in vitro*, ens van portar a especular que la sobreexpressió de CNTD2 podria promoure també, el creixement tumoral *in vivo*. L'animal escollit va ser el ratolí, és un dels models més utilitzats per la seva relativa similitud amb l'esser humà i el potencial que això representa a l'hora de poder reproduir malalties de manera fidel i permetre tant l'estudi del seu desenvolupament com l'assaig de teràpies experimentals. Concretament els ratolins de la soca Nude, s'utilitzen de manera comú al laboratori ja que gràcies a una mutació al gen *Foxn1* no tenen tim, i doncs, no tenen limfòcits T, responsables de la immunitat cel·lular. Aquest fet els fa molt valuosos en estudis de tumorigenicitat i assajos preclínics, així com també, en estudis de síndromes d'immunodeficiències humanes.

Per tant, es van injectar cèl·lules A549 infectades amb el vector buit (control) o amb la construcció que sobreexpressa CNTD2 als ratolins Nude. Com es pot veure a la figura 21a, els ratolins injectats amb les cèl·lules A549 que sobreexpressen CNTD2, formen tumors que creixen molt més ràpid que els formats per les cèl·lules control. El dia 62, els ratolins van ser sacrificats i els tumors extrets i pesats. D'aquesta manera, confirmem les mesures realitzades durant el procés. Com esperàvem, els tumors provinents de cèl·lules A549 infectades amb CNTD2 són més grans que els generats per les cèl·lules control (Figura 21b i c).

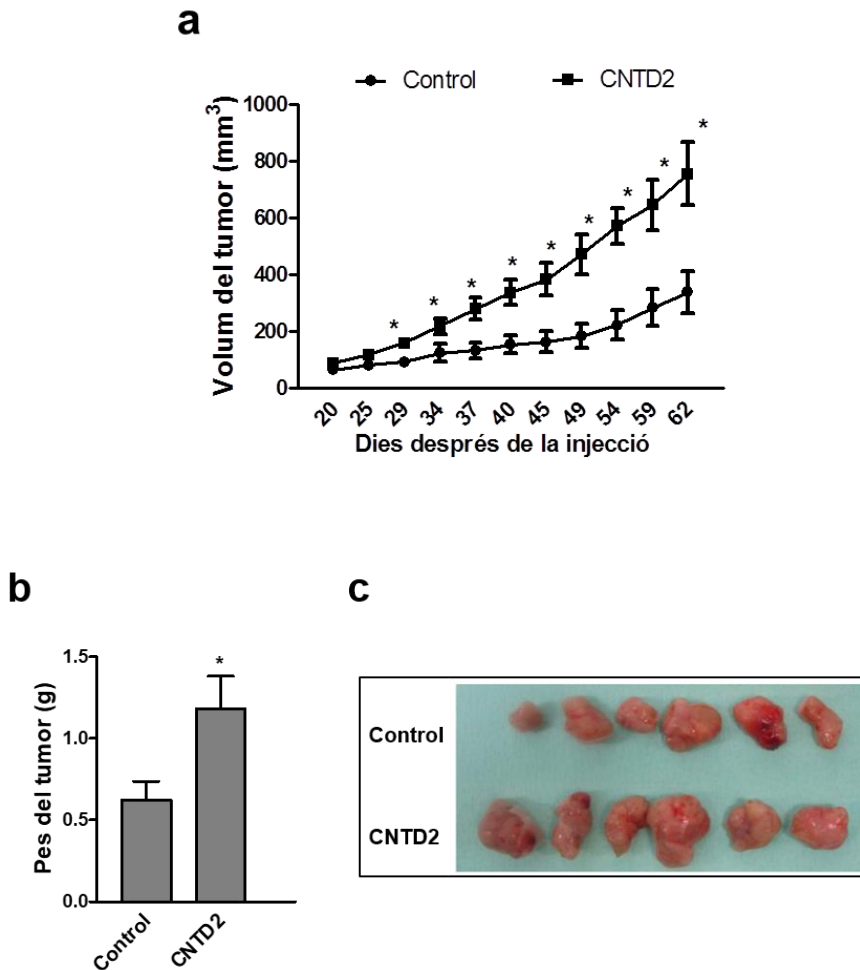


Figura 21. La sobreexpressió de CNTD2 augmenta significativament el creixement tumoral *in vivo*. (a) Mesura del volum tumoral als dies indicats després de que els ratolins fossin injectats amb cèl·lules A549-vector buit (control) i A549-CNTD2 (n=7). (b) Pes dels tumors extrets dels ratolins a dia 62. (c) Imatges representatives dels tumors extrets obtinguts tant de les cèl·lules A549-vector buit (control) com de les A549-CNTD2. *P < 0.05, vs control, test de Mann-Whitney.

6. L'increment de l'expressió de CNTD2 és un indicador de mal pronòstic en pacients amb adenocarcinoma de pulmó.

Els resultats anteriors ens mostren CNTD2 com un nou “gen conductor” per al càncer de pulmó. De ser veritat tots els efectes observats en el laboratori, hauríem de veure un impacte d'aquest gen en els pacients.

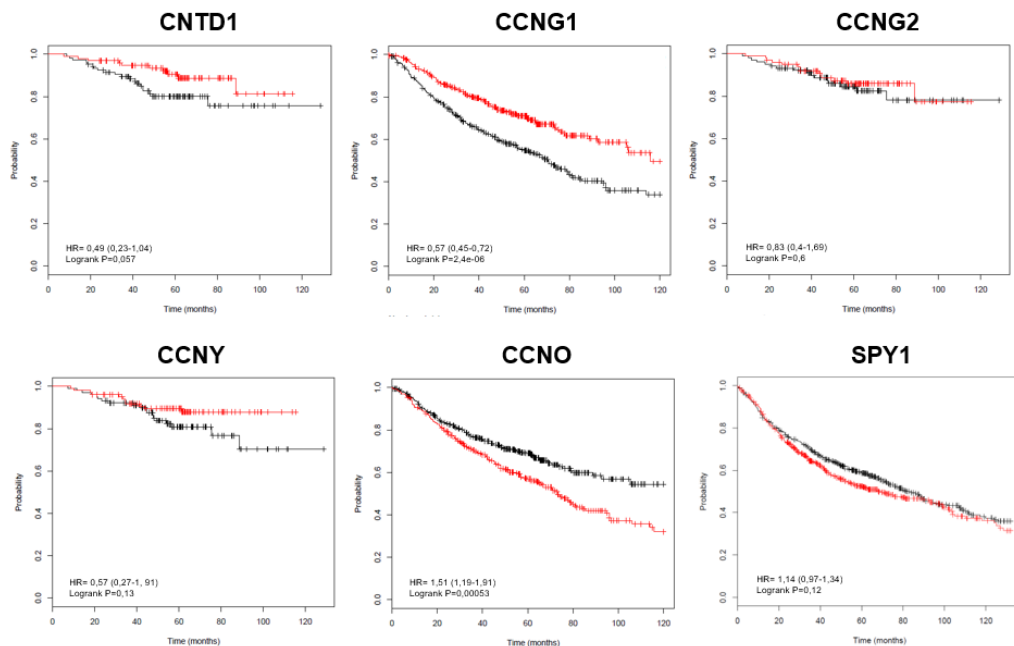
Per estudiar-ho, vam recórrer al software *Kaplan-Meier Plotter*, web permet estudiar l'efecte de diferents gens sobre la supervivència global, utilitzant mostres de pacients amb càncer, que en el cas de pulmó són més de 2400 i amb un seguiment mitjà de 49 mesos. El software permet restringir l'anàlisi segons diferents paràmetres com el tipus histològic, el grau, l'estadi, etc. En el nostre cas, vam realitzar les corbes de supervivència dels gens inclosos a l'estudi CNTD1, CNTD2, CCNG1, CCNG2, CCNI, CCNY i SPY1, restringint l'anàlisi a aquells pacients que després de l'operació tenien els marges del tumor negatius, per tant, que s'havia pogut extreure amb èxit tot el tumor del pacient, situació desitjada i que es dona en la gran majoria de casos.

Els resultats obtinguts (Figura 22) mostren que la sobreexpressió dels gens CCNG2, CCNY, CCNI, SPY1 i CNTD1 no estan associats amb la supervivència dels pacients amb tumors al pulmó. En canvi, si que observem diferències estadísticament significatives entre els diferents nivells d'expressió de les ciclins CCNO i CCNG1. Mentre que l'expressió de CCNO correlaciona negativament amb la supervivència dels pacients, CCNG1, sembla estar actuant completament al contrari, apareixent correlacionada amb un augment de la supervivència dels pacients diagnosticats amb càncer de pulmó.

De totes maneres, l'impacte més gran sobre la supervivència dels pacients amb càncer de pulmó l'observem amb CNTD2, és a dir que aquells pacients amb uns nivells d'expressió de CNTD2 més elevada tenen una supervivència significativament reduïda en comparació amb aquells pacients que tenen uns nivells d'expressió més baixos d'aquest

gen (Figura 23a). Podem concloure que CNTD2 té una important rellevància clínica.

a



b

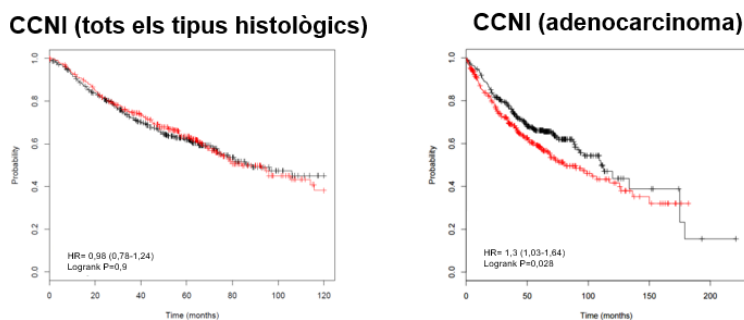


Figura 22. Valor pronòstic de les noves ciclines sobre la supervivència total en pacients de càncer de pulmó. (a) Corbes de supervivència que expressen diferents nivells de la ciclina indicada, en pacients amb càncer de pulmó de tots els tipus histològics (n=726). (b) Corbes de supervivència que expressen la correlació entre els nivells d'expressió de CCNI i la supervivència dels pacients de càncer de pulmó en tots els tipus histològics (panell esquerre, n=1926) i adenocarcinoma (panel dret, n=867). Les línies vermelles representen els pacients amb una elevada expressió gènica i les negres aquells pacients que expressen poc el gen en qüestió. Mostrem la Hazard ràtio (HR) amb intervals de confiança del 95%, així com els p-valors logarítmics ordinals.

Per tal de veure si CNTD2 juga el mateix rol en altres contextos, vam realitzar la mateixa prova en tres tumors més, el d'ovari, el de mama i el gàstric. En aquest últim, CNTD2 es comporta de manera similar al cas de pulmó, on tenir-lo sobreexpressat perjudica significativament a la supervivència dels pacients (Figura 23b).

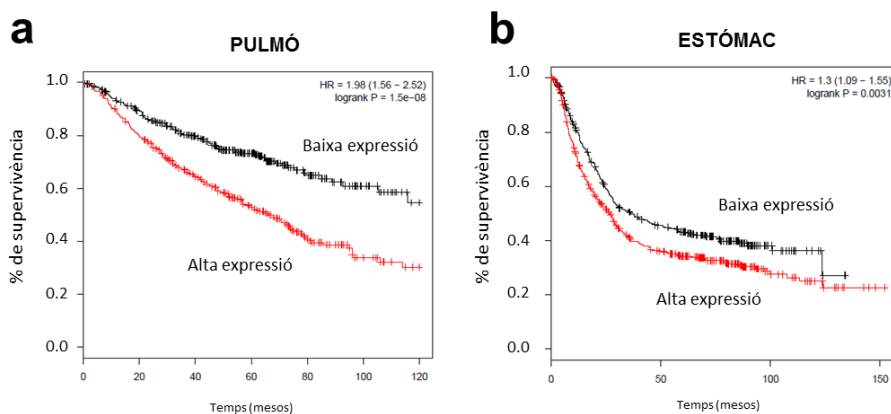


Figura 23. Efecte de CNTD2 sobre la supervivència del càncer de pulmó. Utilitzant el software *Kaplan-Meier plotter* (<http://kmplot.com/lung/>), realitzem les corbes de supervivència. La supervivència total (a) en pacients de càncer de pulmó (n=726) i (b) en pacients de càncer gàstric (n=867) de tots els subtipus que expressen diferents nivells de CNTD2. Les línies vermelles representen els pacients amb una elevada expressió del gen, mentre que les línies negres representen aquells pacients que tenen uns nivells baixos de CNTD2. Mostrem la Hazard ràtio (HR) amb intervals de confiança del 95%, així com els p-valors logarítmics ordinals.

DISCUSSIÓ

PAPER DE LES NOVES CICLINES AL CPCNP

En aquest estudi s'ha realitzat la detecció de proteïna de vuit noves ciclines en teixits del carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites per tal d'aportar informació de la funció que hi desenvolupen. L'objectiu d'aquest treball no era fer un anàlisi massiu de l'estat d'aquests gens al càncer de pulmó, sinó aportar una informació més concreta i fiable sobre la biologia d'aquestes proteïnes al tumor. És per això que, d'acord amb l'extensa bibliografia que recull la importància dels nombrosos mecanismes postranscripcionals que regulen les ciclines canòniques (Schwanhüusser et al. 2011), s'ha realitzat l'estudi a nivell de proteïna, les últimes responsables dels processos cel·lulars.

La recent aparició de les noves ciclines fa que els últims anys hagin anat apareixent treballs posant-les com a protagonistes, tot i això, mancava un treball sistemàtic que les analitzés a la vegada per tal de posar en evidència les seves funcions en condicions patològiques com en el càncer.

1. CNTD1, CCNG2 i SPY1, no són rellevants pel càncer de pulmó.

CNTD1 és un gen que la seva funció sembla estar estretament relacionada amb la correcta segregació dels cromosomes homòlegs durant la meiosi (Holloway et al. 2014). Aquesta dada, junt amb el fet que en aquest treball no s'hagi pogut trobar sobreexpressat als pacients, i sabent que, a més, tampoc es troba sobreexpressat en cap base de dades de tumors (Gao et al. 2013; Gyorffy et al. 2013) fa que puguem concloure que CNTD1 no deu jugar un paper important en el desenvolupament de la malaltia.

Per contra, la ciclina CCNG2, apareix com a supressora tumoral en diferents estudis i es coneguda per induir la parada del cicle cel·lular en càncers com el gàstric (Yin et al. 2016), el colorectal (Sun, Zhang, and Hu 2014; Wang et al. 2015), el de tiroide (W. J. Li et al. 2013), el de pàncrees (Hasegawa et al. 2015), i el de mama (Zimmermann et al. 2016), entre d'altres. Tot són treballs molt recents, fet que indica

l'interès en aquest camp de la recerca. En pulmó, hauríem d'indicar l'estudi realitzat amb la línia A549, que relaciona la caiguda de l'expressió del miR-135, provocada pel flavonoide morina, amb uns augments de CCNG2 i la conseqüent caiguda dels nivells de proliferació i migració en aquesta línia tumoral (Yao et al. 2017). Tot i aquesta dada, i apart del treball exposat en aquest manuscrit, la no existència d'estudis amb pacients amb càncer de pulmó fa que el rol de CCNG2 en aquest tumor encara no estigui del tot establert.

D'altra banda, Spy1 apareix relacionada amb un augment de la proliferació tumoral en dos tumors molt agressius com són el neuroblastoma (Lubanska and Porter 2014) o el càncer d'ovari (Lu et al. 2016). Sembla ser que aquesta funció proliferativa de Spy1 va relacionada amb una activació inadequada de les CDKs (McGrath et al. 2017). No hi ha cap altra dada però, que indiqui la seva intervenció en altres tipus de tumors, tampoc en aquest treball, on no s'ha pogut veure incrementada l'expressió de Spy1 al teixit tumoral.

En resum, el paper d'aquestes tres proteïnes al càncer de pulmó queda en entredit degut a la seva poca expressió a les mostres de teixits FFPE de pacients diagnosticats amb CPCNP (Figura 11), així com també, degut a que la seva expressió no determina el pronòstic de la malaltia (Figura 22a).

2. CCNG1, possible gen supressor al càncer de pulmó?

No s'ha arribat a un consens sobre el paper de CCNG1 en càncer, ja que, a diferència d'altres ciclins, hi ha estudis que mostren per aquesta ciclina, efectes oposats segons el context cel·lular en que ens trobem. D'aquesta manera, CCNG1 apareix associada amb activitats inhibidores del creixement en per exemple, cèl·lules d'endometri (Liu et al. 2013) i se la relaciona amb les vies supressores tumorals ARF-Mdm2-p53 i pRb (Okamoto et al. 2002; L. Zhao et al. 2003).

D'altra banda, en tumors com per exemple l'hepàtic (Jensen et al. 2003), es proposa un rol proliferatiu de CCNG1, on la seva sobreexpressió promou el creixement tumoral, proposant mecanismes

de proliferació basats en la inducció dels processos EMT i posicionant aquesta ciclina com un factor de mal pronòstic pels pacients amb aquests tumors (Wen et al. 2012). En línia amb el comentat anteriorment, semblaria que CCNG1 té un rol similar al càncer de pulmó, ja que demostren que l'activitat antitumoral establerta de l'àcid oleanòlic, actua en cèl·lules tumorals de pulmó disminuint CCNG1 a través de l'augment del miR-122, *miRNA* comunament estudiat al camp del càncer pel seu paper com a inhibidor de la progressió tumoral en diferents tipus de tumors (X. Zhao, Liu, and Li 2014). Aquestes observacions però, anirien en contra amb els resultats de la *web Kaplan Meier plotter* obtinguts en aquest treball, on la sobreexpressió d'aquesta ciclina sembla tenir un paper rellevant a la supervivència dels pacients, apuntant als alts nivells de CCNG1 com a un bon factor pronòstic d'aquesta malaltia (Figura 22a).

En aquest estudi però, no s'ha pogut detectar l'expressió de CCNG1 en cap mostra de la nostra cohort de tumors. Si tenim en compte la prova realitzada per validar els anticossos (Figura 4), CCNG1 és un anticòs molt sensible. El fet que no veiem aquesta ciclina a les mostres analitzades només pot ser doncs, perquè els seus nivells als pacients analitzats són suficientment baixos com perquè no pugui ser immunodetectat.

Aquestes informacions fan palès la necessitat de més estudis per tal de veure la funció i mecanismes d'actuació d'aquesta ciclina en un context tumoral.

3. CCNY i la importància de la proteïna.

CCNY és coneguda per participar fisiològicament en processos d'adipogènesi i producció de lípids (An et al. 2015). Formant complexos amb la CDK16, se la troba participant també, en processos d'espermatogènesi (P. Mikolcevic et al. 2012). En un context patològic, l'activitat de la parella de CCNY, la CDK16, està relacionada amb augments de la proliferació en diferents línies cel·lulars (Yanagi et al. 2014), així com també involucrada en processos tumorals de càncers com el d'ovari (Zhou and Yu 2015) o el de pulmó (Xie et al. 2018).

Gràcies a aquestes observacions, podríem pensar que CCNY hauria d'estar involucrada en processos similars. Tot i que en aquest treball, no trobem diferències entre l'expressió de CCNY en teixits sans i tumorals dels pacients CPCNP (Figura 11), la seva desregulació es troba establerta en tumors com el glioma (Xu et al. 2009), el d'ovari (H. Liu et al. 2016) i també, el de pulmó (Yue et al. 2011).

Cal tenir en compte, que tots els treballs esmentats anteriorment obtenen les seves conclusions basant-se amb resultats d'expressió de *mRNA*. Com s'ha comentat ja en aquest treball, en el cas concret de càncer de pulmó és ben conegut que la quantitat de proteïna dels adenocarcinomes pulmonars no sempre es correlaciona amb l'expressió a nivell de *mRNA* (Chen et al. 2002), fent indispensable treballar amb la proteïna per poder treure unes bones conclusions.

A més a més, si mirem l'interès clínic d'aquesta ciclina, veiem que l'expressió de CCNY, no es troba correlacionada amb la supervivència global dels pacients de càncer de pulmó (Figura 22a), suggerint que, a diferència del que diu la bibliografia i d'acord amb els resultats obtinguts en aquest estudi, CCNY no té un paper clau en aquest tipus de tumors.

4. CCNO, ciclina important per la progressió tumoral.

Els pacients utilitzats en aquest estudi no sobreexpressen CCNO (Figura 11). De fer-ho, tindrien un mal pronòstic, ja que la seva sobreexpressió es troba associada amb els nivells augmentats de la mortalitat en els pacients de càncer de pulmó (Figura 22a), suggerint que podria ser una nova ciclina relacionada amb la malignitat d'aquesta malaltia. De fet, si ens fixem amb els resultats de les correlacions estadístiques entre els nivells de CCNO i l'historial clínic dels pacients, trobem que aquesta ciclina es troba relacionada, encara que no de manera estadísticament significativa, amb el marcador de metàstasi (Figura 17). Potser si tinguéssim una mostra més gran de pacients, aquesta relació quedaria establerta significativament.

El mecanisme d'acció de la ciclina O encara és una incògnita. Veient les tendències augmentades dels nivells de migració en cèl·lules que sobreexpressen CCNO (Figura 18), es proposa per aquesta ciclina un mecanisme basat en aquelles vies involucrades en els processos de mobilitat cel·lular. D'acord amb aquesta observació, hi ha diferents articles que relacionen CCNO amb la formació del deuteriosoma requerit per la formació dels centríols que permeten la síntesi dels cilis de les cèl·lules multiciliades (Funk et al., 2015; 2017; Wallmeier et al., 2014), caracteritzades per la presència dels microtúbuls, estructures íntimament relacionades amb el citoesquelet cel·lular i doncs, amb els processos de migració (Leduc and Etienne-Manneville 2017; Xiang et al. 2016).

D'altra banda, podríem trobar CCNO implicat en processos alternatius als presentats anteriorment. Hi ha diferents treballs que senyalen CCNO com a un gen important també pels processos d'apoptosi, fins al punt que aquelles cèl·lules que tenen menys quantitat d'aquesta ciclina fracassen en l'activació de l'apoptosi per defectes en la via de transducció de les senyals que detecten les lesions al *DNA* (Núñez-Ollé et al. 2017; Roig et al. 2009). Tot i que les dianes moleculars de CCNO per desenvolupar aquesta funció encara no estan del tot establertes, el mecanisme pel qual actuaria CCNO per regular l'apoptosi semblaria ser activant les caspases en resposta al dany del *DNA* gràcies a la seva unió amb CDK2 (Roig et al. 2009).

Aquests resultats obtinguts en models fisiològics senyalen la necessitat de fer més estudis per aclarir el rol de CCNO en un context totalment diferent com són els processos tumorals.

5. CCNI, oncogen i marcador pronòstic dels pacients amb càncer de pulmó.

Els resultats obtinguts de les corbes de supervivència són de gran importància ja que ens donen una idea de l'efecte que tenen els gens estudiats als pacients que pateixen aquestes malalties. CCNI és un factor de mal pronòstic en determinats contextos de diferents càncers, sent important només, en algunes varietats de cada tumor, com per

exemple el triple negatiu al càncer de mama i el p53 mutat pel càncer d'ovari (Gyorffy et al. 2013). Aquest rol diferencial segons la biologia concreta del tumor, queda reflectit a les correlacions entre els nivells de ciclina i l'historial dels pacients utilitzats en aquest estudi (Taula 6), on es veu que hi ha diferències significatives de la quantitat de CCNI en els dos tipus histològics de càncer de pulmó utilitzats, suggerint que el paper que desenvolupa en cada un d'ells és diferent.

D'igual manera, si tenim en compte tots els tipus histològics que formen el càncer de pulmó i analitzem el paper de CCNI sobre la supervivència dels seus pacients, no hi trobem cap relació. Ara bé, si tenim en compte només el subgrup majoritari d'aquesta malaltia, l'adenocarcinoma, que alhora correspon amb les característiques de la nostra cohort de pacients, alts nivells de CCNI apareixen significativament correlacionats amb una disminució de la supervivència global (Figura 22b).

Segons els resultats presentats en aquest estudi, el paper molecular de CCNI podria anar a través dels processos de proliferació, on la seva sobreexpressió en cèl·lules A549 hi té un paper destacat (Figura 14). En línia amb aquesta observació, hi ha altres treballs que associen CCNI amb la progressió del cicle cel·lular, descrivint-la com una proteïna cíclica que assoleix els seus nivells màxims al voltant de la fase G2/M, on podria interaccionar amb CDK5 per poder desenvolupar les seves funcions proliferatives (Nagano et al. 2013).

D'altra banda, el mal pronòstic de CCNI als càncers més agressius podria estar relacionat amb la seva implicació als processos d'angiogènesi, on se l'ha trobat implicada en càncers com el d'ovari (Cybulski et al. 2015) i el de de mama (Landberg et al. 2005). Aquest fet però, no s'ha pogut comprovar en aquest treball. L'angiogènesi és un problema sistèmic del conjunt del tumor i no de les cèl·lules tumorals en si, per tant, necessitaríem treballar amb models més complexos que els cultius cel·lulars. Reforçant aquesta observació, hi ha l'estudi que descriu que el *mRNA* de CCNI apareix en exosomes (van Balkom et al. 2015), vesícules que medien la comunicació cèl·lula-cèl·lula sent particularment importants pel microambient del tumor

tant en els processos metastàsics com en els angiogènics (Salem et al. 2016).

Un altre dels rols que se li atribueixen a CCNI és la resistència a fàrmacs, concretament a la cisplatina, funció, observada en diferents línies cel·lulars al nostre grup (Gasa et al. 2017) així com també en altres treballs amb pacients amb càncer de cèrvix (R. Li et al. 2015).

Amb totes aquestes observacions, hi ha qui descriu CCNI com un potencial biomarcador del càncer de pulmó, i l'utilitza de manera efectiva per detectar aquests tipus de tumors en una mostra fàcilment accessible i zero invasiva com és la saliva (Zhang et al. 2012).

Per tant, d'acord amb les nostres observacions, situem CCNI com a element clau per la malignitat dels tumors, podent ser un oncogen potencial amb un valor important com a marcador pronòstic i inclús una bona diana terapèutica pels pacients amb càncer de pulmó.

6. CNTD2, nou oncogen i innovadora diana terapèutica.

Els resultats obtinguts en aquest treball situen a CNTD2 com a un element molt important per la progressió tumoral. S'ha trobat sobreexpressat en tumors de pacients amb CPCNP (Figura 11) i apareix com a peça clau en la proliferació (Figura 14) i migració (Figura 18) de les cèl·lules A549, aportant informació d'un gen que era molt desconegut i que ha passat desapercebut en els anàlisis genòmics a gran escala.

La prova està en que la base de dades de *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>) descriu una baixa freqüència d'alteracions de CNTD2 en càncer (Gao et al. 2013), fet similar que passa a la base de dades de la web *Kaplan-Meier Plotter* (<http://kmplot.com/lung/>), on s'indiquen uns nivells similars de *mRNA* de CNTD2 tant en teixits normals com tumorals de pulmó (Gyorffy et al. 2013).

CNTD2 és una de les noves ciclines menys caracteritzada de totes. Aquest tret, pot ser degut perquè fins fa poc temps apareixia mal anotada a les bases de dades, és a dir, amb una seqüència incorrecta a la que coneixem actualment (Figura 24a).

A

Seqüència de CNTD2 abans del 2012 (Murray et al)

```
MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAVPDGFPAGPTVSPRRLARPPGLEEALSALGQGEREYAGDIFAEV
MEYLAGDITLYLAVHLLDSYLSAGRVRHLRQLLGVACLVACKMEECVLPEPAFLCLLSADSFRAELRAERRILSRDLFRLHHPGPLL
CLGLLAALAGSSPQVMLLATYFLELSLEAEAGWEPGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYSPEELGTLEPCMARAAALRGPAPGRA
AVFLKYARPQRQGTSLAAACLRLRLQSEPP
```

Seqüència de CNTD2 canònica actual (Uniprot)

```
MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAVPDGFPAGPTVSPRRLARPPGLEEALSALGQGEREYAGDIFAEV
MVCRVPLRALPRAVTPEMRALVVDWLQVHEYLAGDITLYLAVHLLDSYLSAGRVRHLRQLLGVACLVACKMEECVLPEPAFLCLL
LSADSFRAELRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMLLATYFLELSLEAEAGWEPGRRAAAALSLAHRLLDGAGS
RLQPELYRCSLGGGSVWGHRSFRDLPSWSFLRS RMRMDNY
```

B

Murray CNTD2actual	MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAVPDGFPAGPTVSPRRLAR MLVRGRDQGGSGSRLGPIVRRWAPRPSPLQSLAASLDAEPSSAAVPDGFPAGPTVSPRRLAR *****
Murray CNTD2actual	RPPGLEEALSALGQGEREYAGDIFAEVM-----E RPPGLEEALSALGQGEREYAGDIFAEVMVCRVPLRALPRAVTPEMRALVVDWLQVHE ***** *
Murray CNTD2actual	YGLAGDITLYLAVHLLDSYLSAGRVRHLRQLLGVACLVACKMEECVLPEPAFLCLLSA YGLAGDITLYLAVHLLDSYLSAGRVRHLRQLLGVACLVACKMEECVLPEPAFLCLLSA *****
Murray CNTD2actual	DSFSRAELRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMLLATYFLELSLEA DSFSRAELRAERRILSRDLFRLHHPGPLLCLGLLAALAGSSPQVMLLATYFLELSLEA *****
Murray CNTD2actual	EAGWEPGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYSPEELGTLEPCMARAAALRGPAPGRAA EAGWEPGRRAAAALSLAHRLLDGAGSRLQPELYRCSLGGGSV-----WGHRFRDL ***** * * *
Murray CNTD2actual	VFLKYARPQRQGTSLAAACLRLRLQSEPP PSWSFLRSRMRMDNY-----

Figura 24. Errors d' anotació de CNTD2. (A) Seqüències de CNTD2 abans i després del projecte del Genoma Humà. (B) Alineament de les dues seqüències per tal de veure les diferències entre elles.

Si estudiem les seqüències de CNTD2 d'abans i després del projecte del genoma humà, i fem un alineament entre elles veiem algunes diferències importants. La primera és a la regió caixa de ciclina, on la seqüència de CNTD2 actual és més llarga, tenint 18 aminoàcids més a la part inicial. La segona, a la regió c-terminal, on les dues seqüències

de CNTD2 són completament diferents (Figura 24b). Aquest error d'anotació molt probablement va ser degut a la gran quantitat de regions riques amb G/C que conté al seu DNA la ciclina CNTD2, fet que dificulta molt els processos de seqüenciació.

Si fem un estudi de la seva evolució, el gen CNTD2 apareix majoritàriament conservat en els grups de mamífers, rèptils, peixos i amfibis. Sorprenentment però, el gen de CNTD2 i els seus nivells de proteïna falten en algunes espècies com per exemple el ratolí (*mus musculus*) i la rata (*rattus*) (Taula 7). Aquestes diferències de la conservació durant l'evolució, ens porten a pensar que, igual que va passar amb el genoma d'*Homo sapiens*, en algunes espècies encara ara, hi podria haver errors d'anotació d'aquest gen, fet que dificultaria encara més el seu estudi (Gasa et al. resultats no publicats).

Tot i que podem trobar CNTD2 als genomes d'espècies tant diferents com per exemple, els humans (*Homo sapiens*) i el salmó platejat (*Oncorhynchus kisutch*), la seva seqüència difereix bastant entre espècies, inclús al domini caixa ciclina.

ESPÈCIES AMB CNTD2	ESPÈCIES SENSE CNTD2
<i>Homo sapiens</i> (Humà)	<i>Mus musculus</i> (Ratolí)
<i>Pan troglodytes</i> (Ximpanzé)	<i>Trochilidae</i> (Colibrí)
<i>Canis Lupus familiaris</i> (Gos)	<i>Spheriscidae</i> (Pingüí)
<i>Mustela putorius furo</i> (Fura)	<i>Brachyura</i> (Cranc)
<i>Heterocephalus glaber</i> (Farumfer)	<i>Danio rerio</i> (Peix zebra)
<i>Xenopus tropicalis</i> (Granota)	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Cuc nematode)
<i>Pogona vitticeps</i> (Dragó barbut)	<i>Rattus</i> (Rata)
<i>Coho salmon</i> (Salmó platejat)	<i>Drosophila Melanogaster</i> (Mosca del vinagre)

Taula 7. Exemples d'individus amb i sense CNTD2 anotat al seu genoma. S'il·lustra alguns exemples d'espècies sense CNTD2 que podrien tenir problemes d'anotació.

Aquestes observacions podrien suggerir que l'anticòs no funciona correctament, hipòtesi que descartem veient la figura 4. Tot i això, el de CNTD2 però, no és un anticòs molt sensible, necessitant una certa quantitat de proteïna d'aquesta ciclina per poder-la detectar. Per tant està clar és que en línies cel·lulars la quantitat de CNTD2 és molt baixa, en canvi, és en la complexitat dels teixits quan apareix (Figura 11). Tots els esforços per intentar veure CNTD2 en línies tumorals provant diferents anticossos (Figura 8) o bé canviant els tampons i protocols d'extracció (Figura 9) han estat en va, no millorant de manera significativa els resultats negatius de CNTD2 en línies tumorals.

L'associació entre l'expressió de CNTD2 i els fenotips més agressius va ser corroborada tant pels resultats obtinguts *in vivo* en ratolins Nude (Figura 21), on CNTD2 augmenta significativament el creixement tumoral, com per la dramàtica correlació entre els alts nivells de CNTD2 i la disminució de la supervivència global dels pacients amb càncer de pulmó (Figura 23).

Si a totes aquestes observacions hi sumem el fet que al nostre laboratori s'han obtingut els mateixos resultats que en aquest estudi amb pacients diagnosticats amb càncer de còlon, on apart de veure CNTD2 augmentat en teixit tumoral, apareix estadísticament relacionat amb la metàstasi a nòduls limfàtics, produeix creixement tumoral *in vivo* en ratolins Nude i, igual que en pulmó, els nivells de CNTD2 augmentats afecten dramàticament a la supervivència dels seus pacients (Sánchez-Botet et al., treball en revisió), concloem que CNTD2 podria ser un gen important pel desenvolupament de tumors diferents al de pulmó.

Agafant conjuntament tots aquests resultats, i veient que en altres tipus de tumors com per exemple el d'estómac, els efectes de CNTD2 sobre els seus pacients són igual d'importants (Figura 23) fan pensar que potser podríem estar davant d'un nou oncogen.

CNTD2, acrònim de *Cyclin N-terminal domain-containing protein 2*, representa la proteïna 2 que conté el domini N-terminal de les ciclines, fent èmfasi al domini caixa de ciclina necessari per interactuar amb una CDK. Malgrat posseir aquesta caixa, a hores d'ara no es coneix cap CDK candidata a parella de CNTD2. De fet, al nostre laboratori, s'han

intentat identificar les parelles de CNTD2 mitjançant diferents estratègies (Quandt et al. resultats no publicats) i fins a dia d'avui, no s'ha aconseguit trobar encara cap CDK associada a aquesta ciclina. Per tant, no podem concloure si CNTD2 funciona de manera independent o bé associada amb una CDK.

Tot i que es coneix molt poc sobre la seva funció, la seva localització subcel·lular nuclear (Figura 12) podria apuntar a CNTD2 en processos de regulació transcripcional, funció ja descrita per altres ciclins conegudes com a ciclins de transcripció. Aquestes, com CNTD2, tenen una regió caixa ciclina, es mantenen constants al llarg de tot el cicle cel·lular i la majoria, no totes, actuen amb diferents CDKs per desenvolupar les seves funcions, que sobretot són de transcripció, però també, de resposta al dany del *DNA* (Lim and Kaldis 2013).

En aquesta línia, anàlisis recents realitzats al nostre grup estableixen una interacció entre CNTD2 i la subunitat MED23 del Complex Mediator (Quandt et al. resultats no publicats). Aquestes dades esdevenen especialment interessants en veure que MED23 presenta les mateixes característiques que es descriuen en aquest manuscrit per CNTD2, és a dir, expressió augmentada en mostres de pacients amb CPCNP i nivells de proliferació i migració augmentats en cèl·lules tumorals de pulmó (Shi et al. 2014). Caldria doncs, més experiments per tal de saber si els dos gens actuen en la mateixa via. En qualsevol cas, sembla que totes les informacions apuntarien a CNTD2 com una nova proteïna que afectaria els processos de transcripció.

D'altra banda, resultats independents de dos grups diferents suggeririen una relació entre CNTD2 i la via NF- κ B (Gewurz et al. 2012; van der Sanden et al. 2015). Els dos anàlisis eren *unbiased* (imparcials) de manera que, sense buscar-ho en ambdós treballs els ha aparegut CNTD2 relacionada amb aquesta via, fet que li dona un valor especial. En un treball, tenen com a objectiu trobar elements que intervien amb la via de NF- κ B. Per fer-ho, silencien de manera massiva diferents gens i miren activació de la via per cada un d'ells. En silenciar CNTD2 observen una caiguda de l'activació de NF- κ B demostrant que és una peça clau per la seva activació (Gewurz et al. 2012). En l'altre, busquen

la manera de millorar la producció de vacunes identificant aquells gens que en eliminar-los, augmenten la titulació vírica. CNTD2 apareix com a gen important per aquest propòsit (van der Sanden et al. 2015). Aquesta funció de CNTD2, és podria relacionar amb la via de NF- κ B reconciliant-se amb el fet que amb menys CNTD2 es generen més virus gràcies al fet de tenir la via de NF- κ B menys activa. Tenim doncs dues dades disponibles a la literatura que ens aporten un possible mecanisme molecular pel qual podria estar actuant CNTD2.

La família NF- κ B/Rel està formada per un conjunt de factors de transcripció que participen en processos d'inflamació, resposta immunitària, regulació del cicle cel·lular, diferenciació i apoptosis (Baeuerle and Baltimore 1996; Ghosh, May, and Kopp 1998). La seva activació en cèl·lules tumorals, es produeix durant la transformació cel·lular induïda per un conjunt d'oncogens coneguts com per exemple Ras i Rac, Bcr-Abl i proteïnes virals transformades com v-Rel. El fet que CCND1 estigui activada per Ras (Albanese et al. 1995) i que aquesta interacció sigui necessària per la transformació cel·lular induïda per aquest oncogen (J. J. Liu et al. 1995; Robles et al. 1998), estableix un vincle entre la via de NF- κ B i la progressió del cicle cel·lular a través de CCND1. A més a més, les accions estimuladores del creixement pels factors de NF- κ B en alguns casos, van acompanyats de la parada de la diferenciació cel·lular i caiguda de la mort cel·lular programada, fet que contribueix a l'augment dels teixits indiferenciats (Joyce et al. 2001), i doncs, més agressius.

Aquest fet quadra molt bé amb resultats obtinguts al nostre laboratori. Per una banda, perquè CNTD2 apareix relacionada amb els processos metastàsics (Figura 17, Taula 6), per l'altra, perquè observem un augment de l'expressió de CNTD2 en aquelles cèl·lules que es troben en un estat més desdiferenciat i s'obté un augment de marcadors de cèl·lules pluripotents, com el SOX2 i OCT4, a les cèl·lules que tenen aquesta ciclina sobreexpressada (Sánchez-Botet et al. resultats no publicats).

Aquestes observacions ens porten a especular que CNTD2 podria desenvolupar les seves funcions proliferatives i de progressió tumoral possiblement ajudant a la transcripció mediada per la via de NF- κ B (Figura 26).

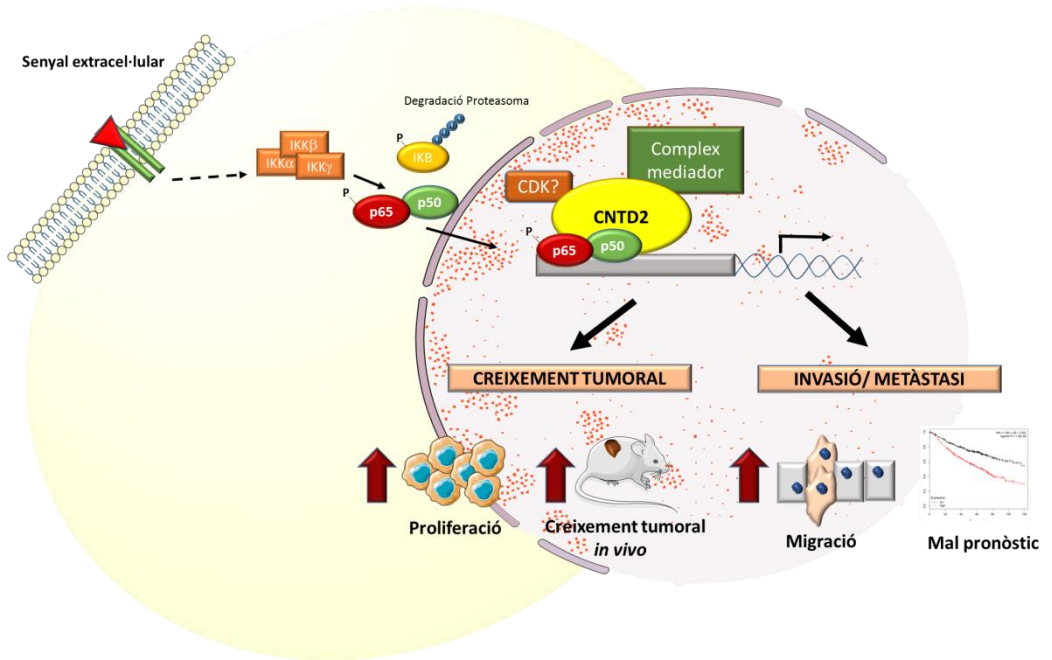


Figura 26. Hipòtesi del mecanisme d'acció de CNTD2. Una senyal extracel·lular permet l'activació de la via de NF- κ B, que després de la fosforilació de IKB, es degradada pel proteasoma i permet l'alliberació del complex p-65/p-50, que viatja al nucli i entre altres funcions, s'uniria a CNTD2 per promoure la transcripció de diferents gens involucrats en la proliferació i invasió tumoral.

CONCLUSIONS

- Les ciclines CCNG2, CNTD1, CCNY i SPY 1 no es troben sobreexpressades al càncer de pulmó.
- Nivells augmentats de CCNG1 s'associen amb un bon pronòstic de la malaltia en pacients de CPCNP.
- CCNO no es troba sobreexpressada en pacients amb càncer de pulmó. En cas de ser-ho és un factor de mal pronòstic per aquest tipus de pacients.
- CCNI augmenta la proliferació de les cèl·lules A549.
- Les mostres tumorals de pacients amb CPCNP tenen CCNI augmentada comparant-ho amb el teixit normal adjacent, sent un mal factor pronòstic pels pacients diagnosticats amb adenocarcinoma.
- CNTD2 augmenta la proliferació, migració i capacitat de formar colònies de manera dependent i independent d'ancoratge de les cèl·lules A549.
- CNTD2 es troba augmentada als teixits tumorals de pacients amb CPCNP.
- Els nivells augmentats de CNTD2 s'associen amb el creixement tumoral *in vivo*.
- CNTD2 es troba relacionada amb el marcador de metàstasi distant (M) esdevenint un mal pronòstic pels pacients amb càncer de pulmó.
- CNTD2 no s'expressa en gairebé cap teixit de manera fisiològica, representant una bona diana terapèutica per a futures teràpies.

REFERÈNCIES

- Addis, MF. et al. 2009. "Generation of High-Quality Protein Extracts from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues." *Proteomics* 9(15): 3815–23.
- Albanese, C. et al. 1995. "Transforming p21(ras) Mutants and c-Ets-2 Activate the Cyclin D1 Promoter through Distinguishable Regions." *Journal of Biological Chemistry* 270(40): 23589–97.
- An, W. et al. 2015. "Cyclin Y Is Involved in the Regulation of Adipogenesis and Lipid Production." *PLoS ONE* 10(7).
- Asghar, U. et al. 2015. "The History and Future of Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Cancer Therapy." *Nature Reviews Drug Discovery* 14(2): 130–46.
- Baeuerle, Patrick A., and David Baltimore. 1996. "Nf- κ B: Ten Years after." In *Cell*, , 13–20.
- van Balkom, WM. et al. 2015. "Quantitative and Qualitative Analysis of Small RNAs in Human Endothelial Cells and Exosomes Provides Insights into Localized RNA Processing, Degradation and Sorting." *Journal of extracellular vesicles* 4: 26760.
- Brabletz, T. 2012. "EMT and MET in Metastasis: Where Are the Cancer Stem Cells?" *Cancer Cell* 22(6): 699–701.
- Chen, G. et al. 2002. "Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas." *Molecular & Cellular Proteomics* 1(4): 304–13.
- Cooper, WA. et al. 2009. "Expression and Prognostic Significance of Cyclin B1 and Cyclin A in Non-Small Cell Lung Cancer." *Histopathology* 55(1): 28–36.
- Cybulski, M. et al. 2015. "Cyclin I mRNA Expression Correlates with Kinase Insert Domain Receptor Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer." *Anticancer Research* 35(2): 1115–19.
- Detterbeck, FC. et al. 2017. "The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification." *Chest* 151(1): 193–203.
- Elledge, S J, and J W Harper. 1998. "The Role of Protein Stability in the Cell Cycle and Cancer." *Biochimica et biophysica acta* 1377(2): M61–70.

- Funk, MC. et al. 2015. "Cyclin O (Ccn0) Functions during Deuterosome-Mediated Centriole Amplification of Multiciliated Cells." *The EMBO Journal* 34(8): 1078–89.
- Furrukh, M. 2013. "Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception- Changing Facts." *Sultan Qaboos University Medical Journal* 13(3): 345–58.
- Gao, J. et al. 2013. "Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the {cBioPortal.}" *Sci Signal* 6(269): p11.
- Gasa, L. et al. 2017. "A Systematic Analysis of Orphan Cyclins Reveals CNTD2 as a New Oncogenic Driver in Lung Cancer." *Scientific Reports* 7(1): 1–12.
- Gewurz, BE. et al. 2012. "Genome-Wide siRNA Screen for Mediators of NF- B Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7): 2467–72.
- Ghosh, S. et al. 1998. "NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 16(1): 225–60.
- Goldstraw, P. et al. 2011. "Non-Small-Cell Lung Cancer." *The Lancet* 378(9804): 1727–40.
- Graña, X. and E P Reddy. 1995. "Cell Cycle Control in Mammalian Cells: Role of Cyclins, Cyclin Dependent Kinases (CDKs), Growth Suppressor Genes and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors (CKIs)." *Oncogene* 11(2): 211–19.
- Gridelli, C. et al. 2015. "Non-Small-Cell Lung Cancer." *Nature Reviews Disease Primers* 1.
- Guo, H. et al. 2012. "An Efficient Procedure for Protein Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues for Reverse Phase Protein Arrays." *Proteome Science* 10 (1) (no(56): 1–12.
- Gyorffy, B. et al. 2013. "Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer." *PLoS ONE* 8(12).
- Hansen, MS. et al. 2017. "Sex Differences in Risk of Smoking-Associated Lung Cancer: Results From a Cohort of 600,000 Norwegians." *American journal of epidemiology* 187(5):971-981.

- Hartwell, L. H, and M. B Kastan. 1994. "Cell Cycle Control and Cancer." *Science* 266(5192): 1821–8.
- Hartwell, L., and T. Weinert. 1989. "Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events." *Science* 246(4930): 629–34.
- Hasegawa, S. et al. 2015. "Cyclin G2: A Novel Independent Prognostic Marker in Pancreatic Cancer." *Oncology Letters* 10(5): 2986–90.
- Holloway, JK. et al. 2014. "Mammalian CNTD1 Is Critical for Meiotic Crossover Maturation and Deselection of Excess Precrossover Sites." *Journal of Cell Biology* 205(5): 633–41.
- Hydbring, Per, Marcos Malumbres, and Piotr Sicinski. 2016. "Non-Canonical Functions of Cell Cycle Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(5): 280–92.
- Inamura, K. 2018. "Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer." *Cancers* 10(3): 72.
- Jensen, MR. et al. 2003. "Reduced Hepatic Tumor Incidence in Cyclin G1-Deficient Mice." *Hepatology* 37(4): 862–70.
- Joyce, D. et al. 2001. "NF- κ B and Cell-Cycle Regulation: The Cyclin Connection." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12(1): 73–90.
- Kobayashi, S. et al. 2006. "Transcriptional Profiling Identifies Cyclin D1 as a Critical Downstream Effector of Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Signaling." *Cancer Research* 66(23): 11389–98.
- Korpanty, GJ. et al. 2014. "Biomarkers That Currently Affect Clinical Practice in Lung Cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS." *Frontiers in Oncology* 4(8): 1–8.
- Landberg, G. et al. 2005. "Cyclin I Is Expressed in Human Breast Cancer and Closely Associated with VEGF and KDR Expression." *Breast Cancer Research and Treatment* 89(3): 313–16.
- Leduc, Cécile, and Sandrine Etienne-Manneville. 2017. "Regulation of Microtubule-Associated Motors Drives Intermediate Filament Network Polarization." *Journal of Cell Biology* 216(6): 1689–1703.
- Lemjabbar-Alaoui, H. et al. 2015. "Lung Cancer: Biology and Treatment Options." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1856(2): 189–210.

- Li, R. et al. 2015. "Cyclin I Promotes Cisplatin Resistance via Cdk5 Activation in Cervical Cancer." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19(23): 4533–41.
- Li, WJ. et al. 2013. "CCNG2 Suppressor Biological Effects on Thyroid Cancer Cell through Promotion of CDK2 Degradation." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14(10): 6165–71.
- Lim, S., and P. Kaldis. 2013. "Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation." *Development* 140(15): 3079–93.
- Liu, H. et al. 2016. "Cyclin Y Regulates the Proliferation, Migration, and Invasion of Ovarian Cancer Cells via Wnt Signaling Pathway." *Tumor Biology* 37(8): 10161–75.
- Liu, JJ. et al. 1995. "Ras Transformation Results in an Elevated Level of Cyclin D1 and Acceleration of G1 Progression in NIH 3T3 Cells." *Molecular and cellular biology* 15(7): 3654–63.
- Lo, HW. et al. 2007. "Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via up-Regulation of TWIST Gene Expression." *Cancer research* 67(19): 9066–76.
- Lu, S. et al. 2016. "Spy1 Participates in the Proliferation and Apoptosis of Epithelial Ovarian Cancer." *Journal of Molecular Histology* 47(1): 47–57.
- Lubanska, Dorota, and Lisa A. Porter. 2014. "The Atypical Cell Cycle Regulator Spy1 Suppresses Differentiation of the Neuroblastoma Stem Cell Population." *Oncoscience* 1(5): 336.
- Malumbres, Marcos. 2014. "Cyclin-Dependent Kinases." *Genome Biology* 15(6): 1–10.
- Malumbres, Marcos, and Mariano Barbacid. 2001. "Milestones in Cell Division: To Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 1(3): 222–31.
- Malumbres, Marcos and Mariano Barbacid. 2005. "Mammalian Cyclin-Dependent Kinases." *Trends in Biochemical Sciences* 30(11): 630–41.

- Malumbres, Marcos and Mariano Barbacid. 2009. "Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm." *Nature Reviews Cancer* 9(3): 153–66.
- Malumbres, Marcos, Paolo Pevarello, Mariano Barbacid, and James R. Bischoff. 2008. "CDK Inhibitors in Cancer Therapy: What Is Next?" *Trends in Pharmacological Sciences* 29(1): 16–21.
- Malvezzi, M. et al. 2017. "European Cancer Mortality Predictions for the Year 2017, with Focus on Lung Cancer." *Annals of Oncology* 28(5): 1117–23.
- Martín-Sánchez, J.C. et al. 2016. "Differences between Men and Women in Time Trends in Lung Cancer Mortality in Spain (1980-2013)." *Archivos de Bronconeumologia* 52(6):316-20.
- McGrath, DA. et al. 2017. "Structural Basis of Divergent Cyclin-dependent Kinase Activation by Spy1/RINGO Proteins." *The EMBO Journal* 36(15): 2251–62.
- Mikolcevic, P. et al. 2012. "Cyclin-Dependent Kinase 16/PCTAIRE Kinase 1 Is Activated by Cyclin Y and Is Essential for Spermatogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 32(4): 868–79.
- Mikolcevic, P., Johannes R., and Stephan G. 2012. "Orphan Kinases Turn Eccentric: A New Class of Cyclin Y-Activated, Membrane-Targeted CDKs." *Cell Cycle* 11(20): 3758–68.
- Murray, AW., and D. Marks. 2001. "Can Sequencing Shed Light on Cell Cycling?" *Nature* 409(6822): 844–46.
- Nagano, T. et al. 2013. "Cyclin I Is Involved in the Regulation of Cell Cycle Progression." *Cell cycle* 12(16): 2617–24.
- Núñez-Ollé, M. et al. 2017. "Constitutive Cyclin O Deficiency Results in Penetrant Hydrocephalus, Impaired Growth and Infertility." *Oncotarget* 8(59): 99261–73.
- Okamoto, Koji et al. 2002. "Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2." *Molecular Cell* 9(4): 761–71.
- Olaussen, KA., and S. Postel-Vinay. 2016. "Predictors of Chemotherapy Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Challenging Landscape." *Annals of Oncology* 27(11): 2004–16.

- Pascual, G. et al. 2017. "Targeting Metastasis-Initiating Cells through the Fatty Acid Receptor CD36." *Nature* 541(7635): 41–45.
- Petryszak, Robert et al. 2016. "Expression Atlas Update - An Integrated Database of Gene and Protein Expression in Humans, Animals and Plants." *Nucleic Acids Research* 44(D1): D746–52.
- Rahal, Z. et al. 2017. "Smoking and Lung Cancer: A Geo-Regional Perspective." *Frontiers in Oncology* 7:194.
- Robles, AI. et al. 1998. "Reduced Skin Tumor Development in Cyclin D1-Deficient Mice Highlights the Oncogenic Ras Pathway in Vivo." *Genes and Development* 12(16): 2469–74.
- Roig, MB. et al. 2009. "Identification of a Novel Cyclin Required for the Intrinsic Apoptosis Pathway in Lymphoid Cells." *Cell Death and Differentiation* 16(2): 230–43.
- Salem, KZ. et al. 2016. "Exosomes in Tumor Angiogenesis." In *Methods in Molecular Biology*, 1464: 25–34.
- van der Sanden, SM. et al. 2015. "Engineering Enhanced Vaccine Cell Lines to Eradicate Vaccine-Preventable Diseases: The Polio Endgame." *Journal of virology* 90(4): 1694–1704.
- Schwanhüusser, B. et al. 2011. "Global Quantification of Mammalian Gene Expression Control." *Nature* 473(7347): 337–42.
- Schwartz, GK., and Manish AS. 2005. "Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy." *Journal of Clinical Oncology* 23(36): 9408–21.
- Shi, J. et al. 2014. "Upregulation of Mediator MED23 in Non-Small-Cell Lung Cancer Promotes the Growth, Migration, and Metastasis of Cancer Cells." *Tumor Biology* 35(12): 12005–13.
- Sterlacci, W. et al. 2010. "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." *Journal of Thoracic Oncology* 5(9): 1325–36.
- Sun, GG., J. Zhang, and WN. Hu. 2014. "CCNG2 Expression Is Downregulated in Colorectal Carcinoma and Its Clinical Significance." *Tumor Biology* 35(4): 3339–46.

- Valiente, M. et al. 2014. "Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Co-Option in Brain Metastasis." *Cell* 156(5): 1002–16.
- Wallmeier, J. et al. 2014. "Mutations in CCNO Result in Congenital Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia." *Nature Genetics* 46(6): 646–51.
- Wang, S. et al. 2015. "MicroRNA-1246 Promotes Growth and Metastasis of Colorectal Cancer Cells Involving CCNG2 Reduction." *Molecular Medicine Reports*: 273–80.
- Wen, W. et al. 2012. "Cyclin G1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition via Phosphoinositide 3-kinase/Akt Signaling Facilitates Liver Cancer Progression." *Hepatology* 55(6): 1787–98.
- Xiang, T. et al. 2016. "DACT2 Silencing by Promoter CpG Methylation Disrupts Its Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cytoskeleton Reorganization in Breast Cancer Cells." *Oncotarget* 7(43): 70924-70935.
- Xie, J. et al. 2018. "CDK16 Phosphorylates and Degrades p53 to Promote Radioresistance and Predicts Prognosis in Lung Cancer." *Theranostics* 8(3): 650–62.
- Xu, YG. et al. 2009. "Lentivirus-Mediated Knockdown of Cyclin Y (CCNY) Inhibits Glioma Cell Proliferation." *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 18(8): 359–64.
- Yanagi, T. et al. 2014. "PCTAIRE1 Phosphorylates p27 and Regulates Mitosis in Cancer Cells." *Cancer Research* 74(20): 5795–5807.
- Yao, D. et al. 2017. "Morin Inhibited Lung Cancer Cells Viability, Growth, and Migration by Suppressing miR-135b and Inducing Its Target CCNG2." *Tumor Biology* 39(10): 1–9.
- Yin, G. et al. 2016. "MicroRNA-340 Promotes the Tumor Growth of Human Gastric Cancer by Inhibiting Cyclin G2." *Oncology Reports* 36(2): 1111–18.
- Yuan, J. et al. 2004. "Cyclin B1 Depletion Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Tumor Cells." *Oncogene* 23(34): 5843–52.

- Yue, W. et al. 2011. "Cell Cycle Protein Cyclin Y Is Associated with Human Non-Small-Cell Lung Cancer Proliferation and Tumorigenesis." *Clinical Lung Cancer* 12(1): 43–50.
- Zhang, L. et al. 2012. "Development of Transcriptomic Biomarker Signature in Human Saliva to Detect Lung Cancer." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(19): 3341–50.
- Zhao, L. et al. 2003. "Cyclin G1 Has Growth Inhibitory Activity Linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb Tumor Suppressor Pathways." *Molecular cancer research : MCR* 1(3): 195–206.
- Zhao, X., Ming L., and Daotang L. 2014. "Oleanolic Acid Suppresses the Proliferation of Lung Carcinoma Cells by miR-122/Cyclin G1/MEF2D Axis." *Molecular and Cellular Biochemistry* 400(1–2): 1–7.
- Zhou, Q., and Yanni Y. 2015. "Upregulated CDK16 Expression in Serous Epithelial Ovarian Cancer Cells." *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 21: 3409–14.
- Zimmermann, M. et al. 2016. "Cyclin G2 Promotes Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells Responding to Fulvestrant and Metformin and Correlates with Patient Survival." *Cell Cycle* 15(23): 3278–95.

ANNEXES

ANNEX I: Protocol d'extracció de proteïna de teixits parafinats (FFPE)

La fixació amb formaldehid i inclusió en parafina (FFPE) és una tècnica àmpliament utilitzada a la rutina dels hospitals per tal de fer diagnòstics histopatològics de diferents malalties, ja que permet conservar l'estructura histològica i morfològica dels teixits durant molt temps a temperatura ambient. Com a conseqüència, s'han generat grans repositoris de mostres normals i patològiques a tot el món, amb informació associada a diagnòstic, tractaments i resultats (Addis et al. 2009).

No és d'estranyar que, degut a la facilitat de fer estudis retrospectius orientats a la descoberta i validació de nous marcadors biològics, aquesta font d'informació sigui un recurs cada cop més utilitzat en investigacions biomèdiques.

La majoria dels treballs realitzats amb aquestes mostres són treballs d'IHQ. El motiu, la reticulació bastant extensa del teixit producte de la fixació amb formaldehid que fa disminuir l'eficàcia de l'extracció de proteïnes.

Encara que els treballs amb mostres parafinades i proteïna no és massa comú, hi ha algun estudi que estableix tampons d'extracció òptims per aquest propòsit, entre ells un de comercial (Guo et al. 2012).

Vam decidir fer una comparació dels tres tampons descrits per tal d'escollir el que millor ens permetria fer el nostre estudi (Figura 28).

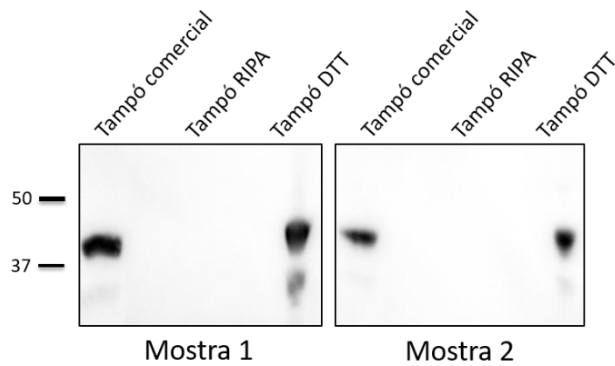


Figura 28. Anàlisi de la capacitat d'extracció de proteïna amb diferents solucions. Imatge representativa de la detecció de l'actina de dues mostres parafinades utilitzant diferents tampons d'extracció.

Sembla que obtenim el mateix rendiment tant amb el tampó comercial com amb el tampó DTT . Per aquest fet, i sumat a l'article que el compara amb teixit fresc i obté resultats similars, és doncs, el tampó escollit (Addis et al. 2009).

El protocol d'extracció detallat és el següent:

- Desparafinització:
 - 1) Tallar fins a 3 seccions de 10-15 μm de gruix del mateix bloc.
 - 2) Col·locar les seccions en un tub de recollida de 1,5 ml. Les mostres són estables a temperatura ambient.
 - 3) A la campana de gasos, pipetejar 1 ml de xilè al tub. Vortejar vigorosament la mostra durant 10 segons i incubar durant 10 min a 40°C.
 - 4) Centrifugar el tub a màxima velocitat durant 2 min. Treure i descartar amb cura el sobrenedant.
 - 5) Repetir els passos 3 i 4 dues vegades més.

- 6) Pipetejar 1 ml d'etanol al 100% al tub que contingui el pellet i vortejar-lo vigorosament. Incubar durant 10 min a 40°C.
- 7) Centrifugar el tub a màxima velocitat durant 2 min.
- 8) Treure i descartar amb cura el sobrenedant evitant tocar el pellet.
- 9) Repetir els passos 6 i 7 un cop més.
- 10) Afegir 1 ml d'etanol al 96% al tub que conté el pellet i vortejar-lo vigorosament. Incubar durant 10 min a 40°C.
- 11) Centrifugar el tub a màxima velocitat durant 2 min.
- 12) Retirar i descartar amb cura el sobrenedant.
- 13) Repetiu els passos 10 i 11 un cop més.
- 14) Afegir 1 ml d'etanol al 70% al pellet i vortejar-lo vigorosament. Incubar durant 10 min a 40°C.
- 15) Centrifugar el tub a màxima velocitat durant 2 min.
- 16) Retirar i descartar amb cura el sobrenedant evitant emportar-nos el pellet.
- 17) Repetir els passos 14 i 15 un cop més.

- Extracció de proteïna:

- 1) Pipetejar 100µl del tampó d'extracció (20mM Tris-HCl pH=8'8, 200mM DTT i 2% SDS) al tub que conté el pellet i vortejar.

*El tampó estoc es prepara amb tots els components menys el DTT, que s'hi afegeix el dia de fer l'extracció.

- 2) Tancar bé el tub *ependorf* amb els clips de segellat.
- 3) Incubar en gel durant 5 min i vortejar altre cop.
- 4) Incubar el tub en un *thermoblock* a 100°C durant 20 min.

- 5) Canviar la temperatura a 80°C. Ho deixem incubant durant 2 hores amb agitació a 750 rpm.
- 6) Després de la incubació, col·loqueu els tubs a 4°C durant 1 minut i retireu el clip de segellat del tub *eppendorf*.
- 7) Centrifugar el tub durant 15 minuts a 14.000 x g a 4°C. Transferir el sobrenadant que conté les proteïnes extretes a un nou tub de recollida de 1,5 ml.

ANNEX II: Codis SPSS utilitzats pels anàlisis estadístics amb pacients.

Recull dels codis utilitzats amb el programa estadístic per les ciències socials (SPSS) 21.

- Ràtio entre el teixit tumoral i normal (T/N ratio) de cada pacient. Test de Wilcoxon.

NPART TESTS

```
/WILCOXON= CCNON CNTD2N CCNIN CCNYN WITH CCNOT CNTD2T CCNIT
CCNYT (PAIRED)
/MISSING ANALYSIS.
```

- Correlacions entre les ràtios T/N de cada pacient i les següents informacions de l'historial clínic:

*Tipus histològic. Test utilitzat Mann-Whitney.

NPART TESTS

```
/M-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY
Tipushistològic (0 1)
/MISSING ANALYSIS.
```

*Marcador mida tumor primari (T). Test utilitzat Krüskal-Wallis.

NPART TESTS

```
/K-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY T (1 4)
/MISSING ANALYSIS.
```

*Nòduls limfàtics regionals (N). Test utilitzat Krüskal-Wallis.

NPART TESTS

```
/K-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY N (0 2)
/MISSING ANALYSIS.
```

*Metàstasi distant (M). Test utilitzat Mann-Whitney.

NPART TESTS

```
/M-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY M (0 1)  
/MISSING ANALYSIS.
```

*Sexe. Test utilitzat Mann-Whitney.

NPART TESTS

```
/M-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY sexe (0 1)  
/MISSING ANALYSIS.
```

*Edat. Test utilitzat correlació de Spearman.

NONPAR CORR

```
/VARIABLES= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI EDAT  
/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG  
/MISSING=PAIRWISE.
```

*Historial fumador. Test utilitzat Mann-Whitney.

NPART TESTS

```
/M-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY Histfumador  
(0 1)  
/MISSING ANALYSIS.
```


*Historial d'altres tumors. Test utilitzat Mann-Whitney.

NPART TESTS

```
/M-W= RATIOCCNO RATIOCNTD2 RATIOCCNY RATIOCCNI BY altrestumors  
(0 1)  
/MISSING ANALYSIS.
```

PUBLICACIÓ

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

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

L. Gasa¹, A. Sanchez-Botet¹, E. Quandt¹, S. Hernández-Ortega¹, J. Jiménez¹, M. A. Carrasco-García^{1,2}, S. Simonetti^{1,2}, S. J. Kron³, M. P. Ribeiro¹, E. Nadal⁴, A. Villanueva⁵ & J. Clotet¹

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 mortality¹. 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 KRAS². While surgery or radiotherapy can cure early stage, localized tumors, high rates of local and distant relapse still occur³. Even then, the majority of NSCLC patients are not candidates for surgery due to their advanced or metastatic disease at diagnosis⁴. 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 immunotherapies⁵. 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 substrates⁶. 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

¹Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain. ²Pathology Department, Hospital Universitari General de Catalunya, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain. ³Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Chicago, USA. ⁴Department 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. ⁵Chemoresistance 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) or J.C. (email: jclotet@uic.es)

mitosis, was linked to a poor prognosis in NSCLC⁷. Likewise, decreased overall survival was observed in tumors overexpressing cyclin D1 which activates CDKs 4 and 6 in G1 phase⁸. In turn, EGFR inhibition downregulates cyclin D1, suggesting loss of cyclin-CDK activity may mediate effects of EGFR inhibitors⁹. 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^{10,11}.

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^{12,13}. While some of these “new” candidate cyclins are now known to bind the non-cell cycle CDKs that control transcription¹⁴, others remain “orphans”, where their CDK partner(s) remain to be identified¹⁵. 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 cancer¹⁶. The discordance likely reflects the importance of post-transcriptional control in determining cellular protein levels^{17,18}. 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

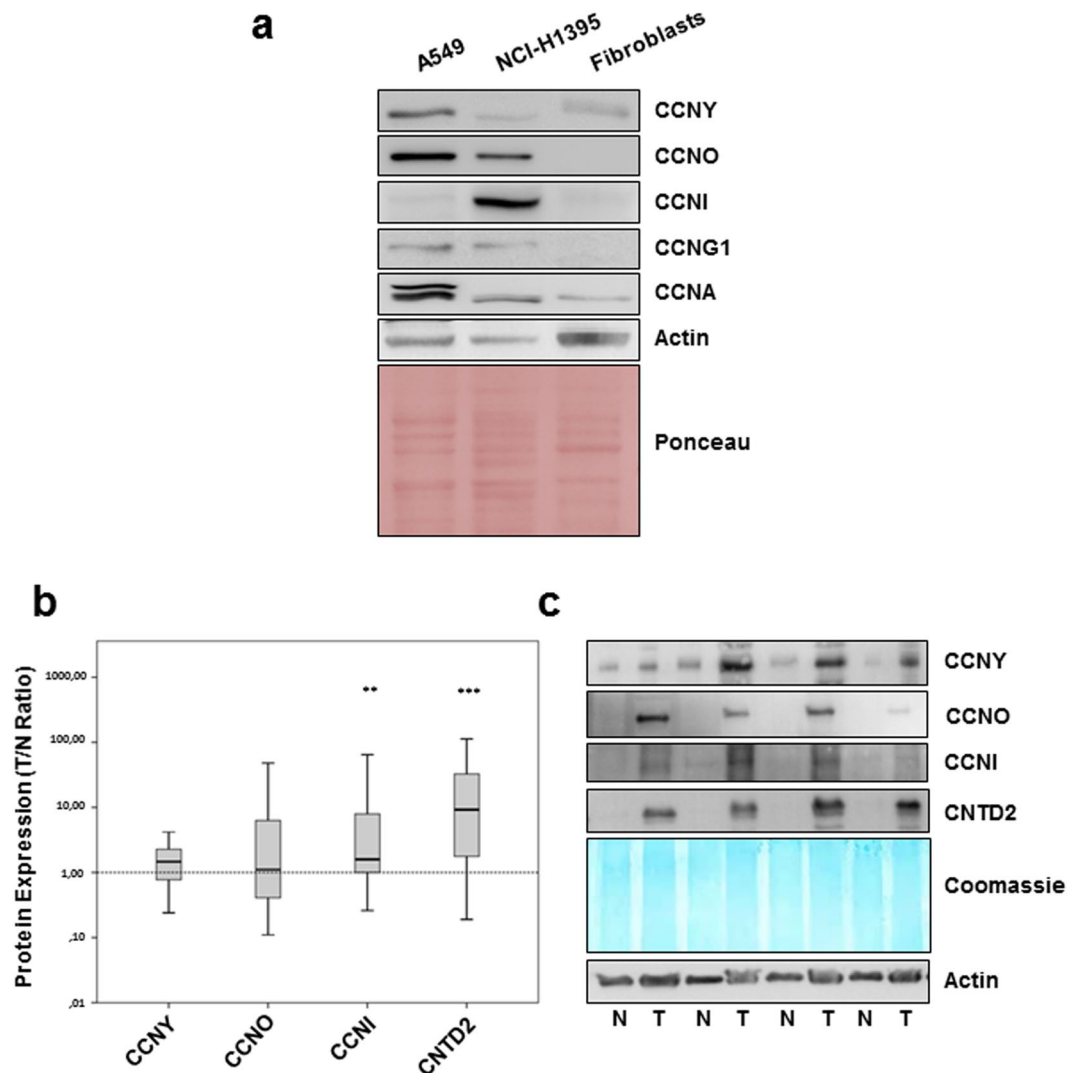


Figure 1. CNTD2 and CCNI are overexpressed in human lung cancer tissues. The expression of orphan cyclins was evaluated by western blot analysis. (a) Representative images of the expression of orphan cyclins in human lung adenocarcinoma cell lines, A549 and NCI-H1395, and in normal fibroblasts. (b) The 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

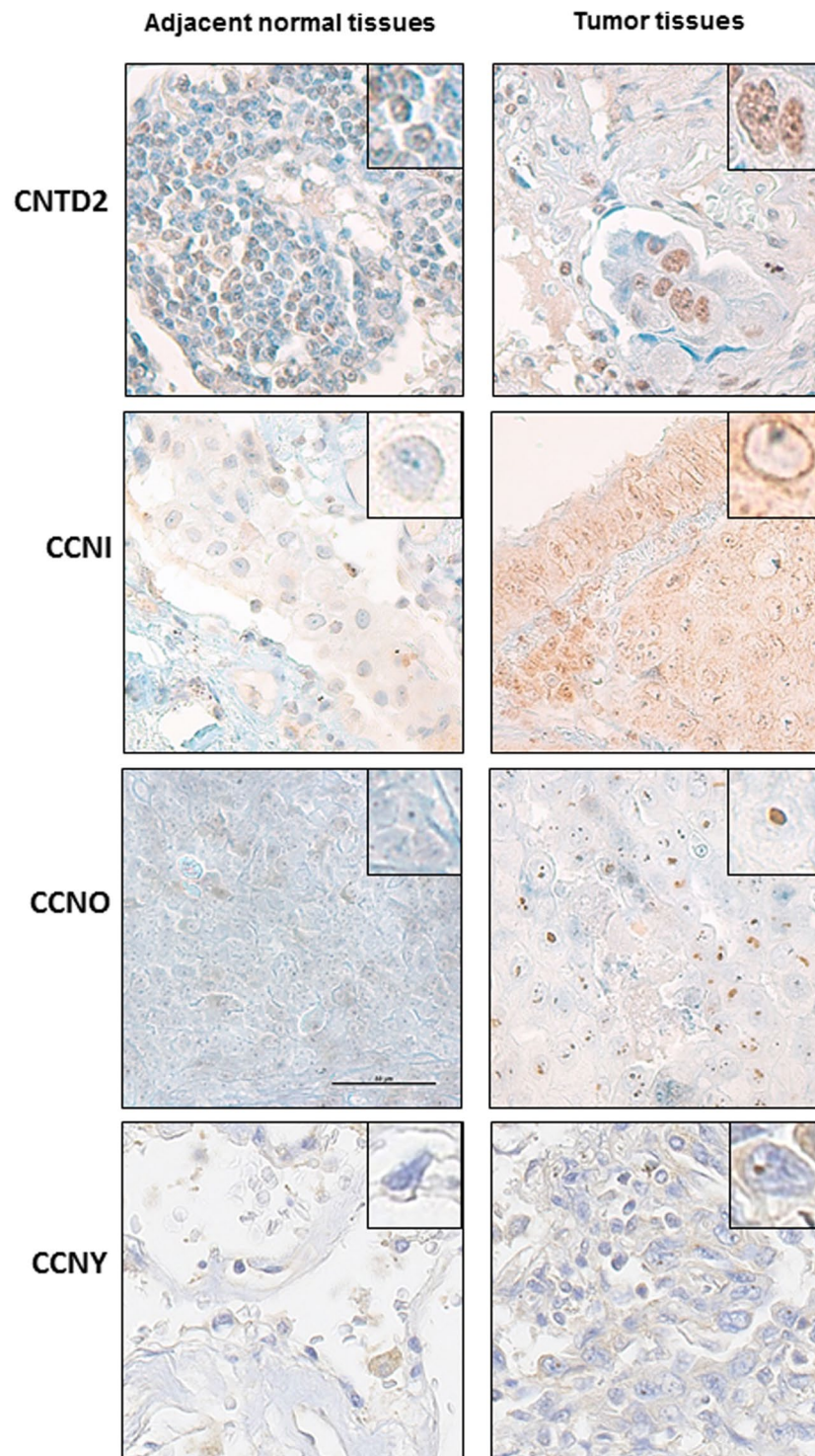


Figure 2. Cellular location of overexpressed orphan cyclins in human lung tissues. Representative images of the immunohistochemical staining of human lung adenocarcinoma samples with CNTD2, CCNI, CCNY and CCNO antibodies. Adjacent normal tissues were used as a control. Magnification 60x. The square reveals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

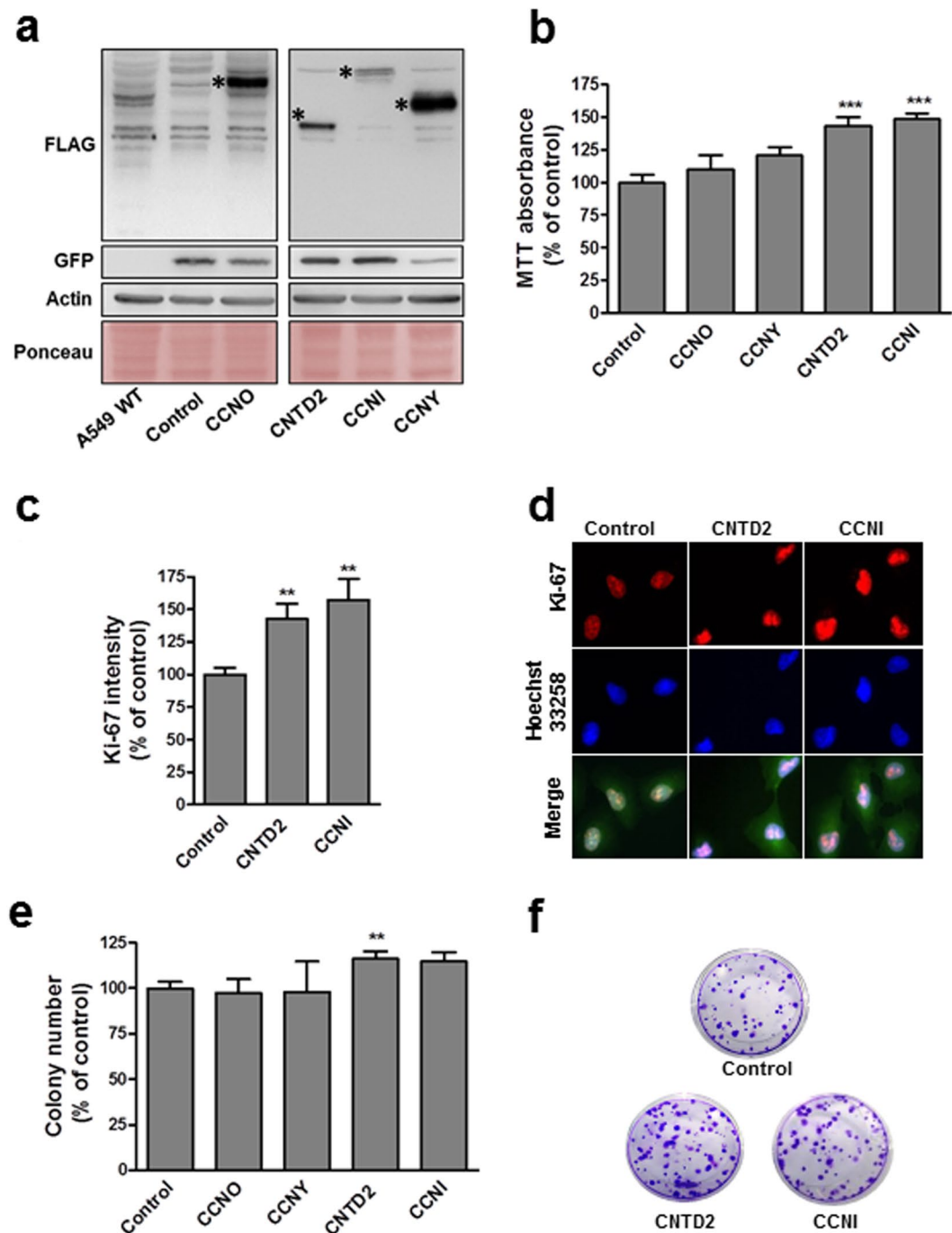


Figure 3. Overexpression of CCNI and CNTD2 increases the proliferation of A549 cells. A549 cells were infected with empty lentiviral vector (control) or with the indicated cyclin-overexpressing construct. **(a)** Western blot analysis confirmed cell infection (the asterisks show the expected band size). 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.

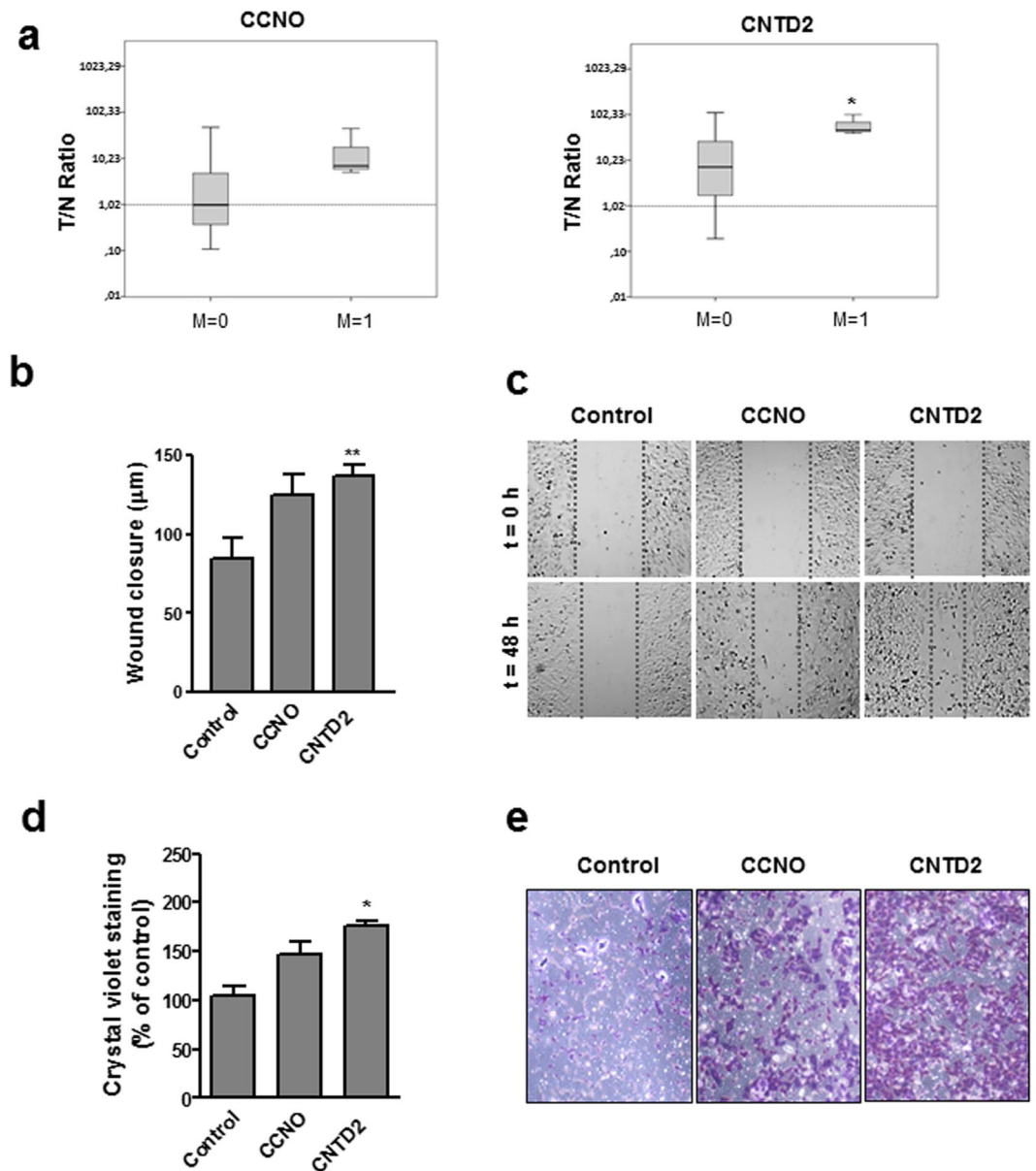


Figure 4. Overexpression of CNTD2 enhances the migration of A549 cells. **(a)** The T/N ratio of CCNO and CNTD2 was evaluated in FFPE lung tissue samples obtained from patients with (M1, $n = 3$) and without metastasis (M0, $n = 40$) and is represented as box plots. $*P < 0.05$, when compared to normal 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 μm . 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 outcomes⁵. In the present study, we conducted an unbiased screening of the protein

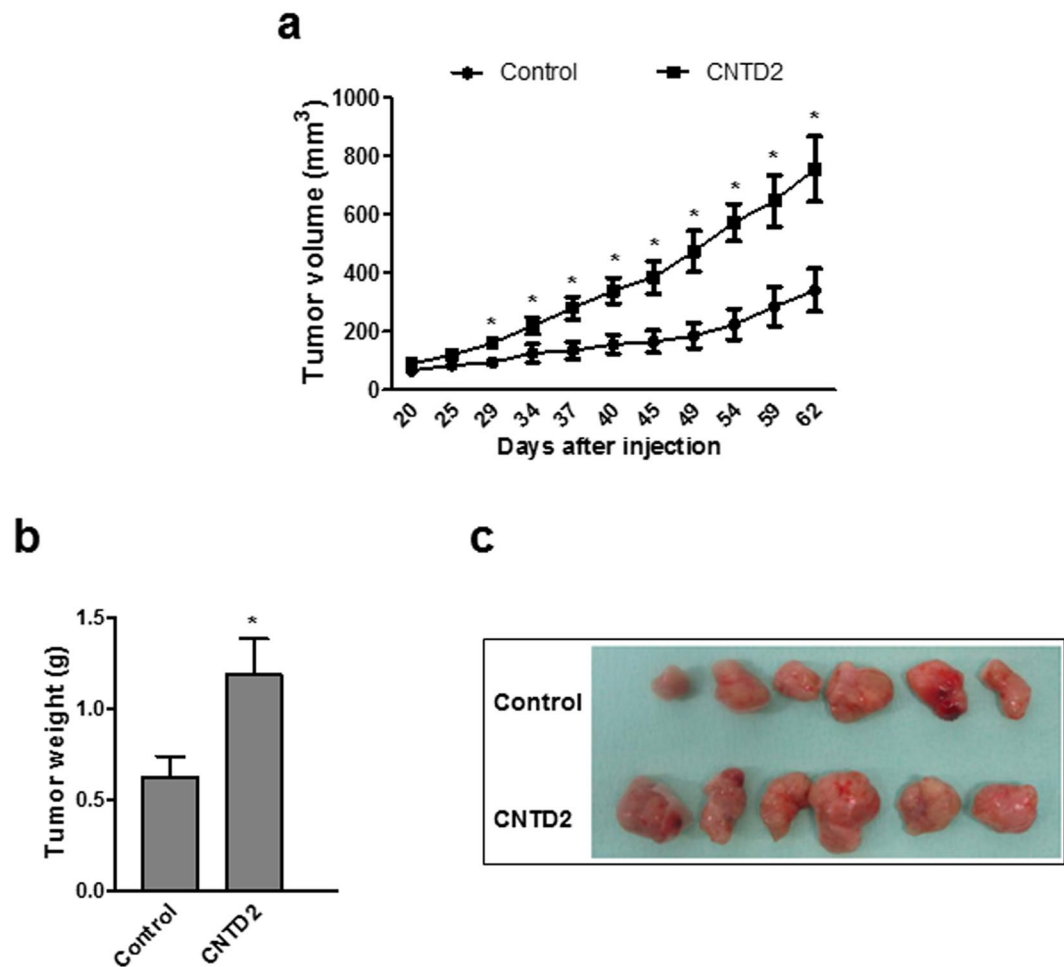


Figure 5. CNTD2 overexpression significantly enhances tumor growth *in vivo*. **(a)** The tumor volumes were measured at the indicated number of days after mice were transplanted with A549-empty vector (control) and A549-CNTD2 ($n = 7$). * $P < 0.05$, vs control, Mann-Whitney test. **(b)** At day 62, 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 cells¹⁹.

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 glioma²⁰ and ovarian cancer²¹ indicating that its role in tumorigenesis might be tissue-specific. While previous reports have shown that CCNY is overexpressed in samples obtained from NSCLC patients²², we were unable to detect overexpression of CCNY in our samples (Fig. 1b and c). Since the work conducted by Yue *et al.*²² determined the

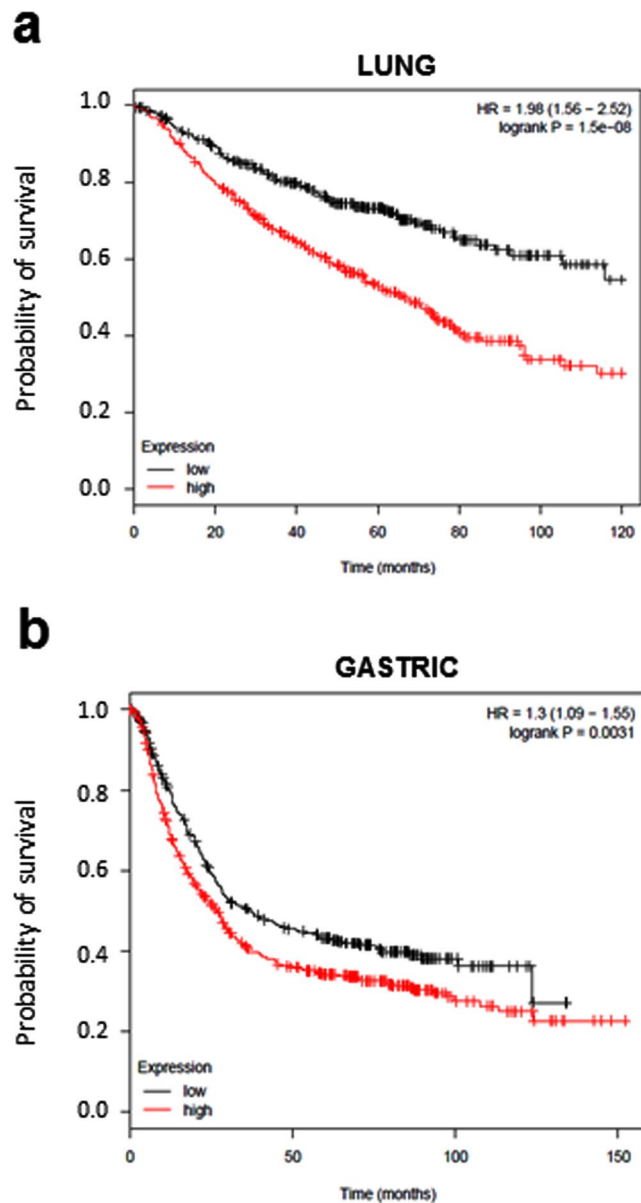


Figure 6. Prognostic value of CNTD2 on lung cancer survival. Kaplan-Meier plots were built using the Kaplan-Meier plotter software (<http://kmplot.com/lung/>). The overall survival of (a) lung cancer (n = 726) and (b) gastric cancer patients (n = 867) of all subtypes expressing different levels of CNTD2 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 mRNA¹⁶, 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 cancer²³. 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 ovarian²⁴ and breast cancers²⁵, 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>²⁶), which reported a low frequency of CNTD2 alterations in cancer. Likewise, the website-based software Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/lung/>²⁷) 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 tissues²⁸, 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% CO₂. 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^{29, 30}, 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 2.5×10^5 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 5×10^4 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 3×10^6 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^3) 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 test²⁷.

Statistical analysis. Unless otherwise stated, data are represented as the mean \pm 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).
- Mikolcovic, 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