



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“MEOX2 Modula el Posicionamiento de
SMARCB1 y EZH2 en Secuencias
Promotoras del Gen EGFR Afectando su
Código Histónico y Expresión Genética en
Cáncer Pulmonar”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A

Octavio Augusto Trejo Villegas

Director: Dr. Federico Ávila Moreno

Sinodales: Dra. Irlanda Peralta Arrieta.

Dr. Leonel Armas López.

Dr. Ignacio Peñalosa Castro.

Dr. Luis Arias Romero.



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, por apoyarme y su esfuerzo para que yo lograra mis metas. A mí mamá por el cariño siempre brindado. A mí papá por su incansable trabajo.

A mí hermana, por siempre estar conmigo y motivarme a siempre mejorar.

A Melina, por siempre estar cuando más la necesitaba y ser la luz que me ilumina en la oscuridad.

A Nacho y Gina, por las risas y la inquebrantable amistad.

A Frida, Isaac, Midori y Quique, por acompañarme en este camino y siempre sacarme una sonrisa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM" por la formación recibida durante mis estudios y por siempre brindarme las herramientas necesarias.

A mí Director de tesis, el Dr. Federico Ávila Moreno, por su paciencia, tolerancia y apoyarme en mí formación en la investigación.

A mis Sinodales Dra. Irlanda Peralta Arrieta, Dr. Leonel Armas López, Dr. Ignacio Peñalosa Castro, Dr. Luis Arias Romero; por el tiempo dedicado a la lectura de mí tesis, sus revisiones y correcciones.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	4
1.1 Genética en cáncer	4
1.2 Epigenética en cáncer	6
1.3 Cáncer pulmonar	8
1.3.1 Clasificación histopatológica del cáncer pulmonar	9
1.3.2 Clasificación molecular del cáncer pulmonar	10
1.3.3 Aberraciones epigenéticas en el cáncer pulmonar	12
1.4 Complejos remodeladores de la cromatina en cáncer	15
1.5 Participación epigenética de SMARCB1 en cáncer	18
1.6 Terapia contra aberraciones epigenéticas	20
1.7 Expresión genética del gen EGFR en cáncer pulmonar	21
1.8 Impacto de la metiltransferasa EZH2 en cáncer	26
1.9 Relevancia del factor transcripcional MEOX2 en cáncer pulmonar	28
2. Planteamiento del problema	30
3. Hipótesis	31
4. Objetivo general	32
4.1 Objetivos particulares	32
5. Materiales y métodos	33
6. Resultados	41
6.1 Análisis de la expresión basal del RNA mensajero y proteína de los genes SMARCB1 y EGFR en líneas celulares de cáncer pulmonar	41
6.2 Análisis del nivel basal de las proteínas MEOX2 y EZH2 en células de cáncer pulmonar	44
6.3 Análisis epigenético del código de histonas en las secuencias promotoras del gen EGFR	45
6.4 Análisis del posicionamiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR	47
6.5 El silenciamiento genético de MEOX2 demuestra que MEOX2 modula el posicionamiento y enriquecimiento de las proteínas EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR	49
6.6 MEOX2 modula la escritura o enriquecimiento del código de histonas sobre las secuencias promotoras del gen EGFR	51
6.7 Detección de alteraciones en los niveles de proteína de EGFR, SMARCB1 y EZH2 bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2	53

6.8 Modelo funcional que propone la interacción de MEOX2, EZH2 y SMARCB1 en la progresión tumoral del cáncer pulmonar	54
7. Discusión	57
8. Conclusiones	63
9. Perspectivas	64
10. Literatura citada	65

Índice de figuras

Figura 1. Subunidades del complejo SWI/SNF.....	17
Figura 2. Mutaciones en el gen de EGFR asociadas con resistencia a fármacos.....	24
Figura 3. Alteraciones genómicas en SMARCB1 y EGFR.....	26
Figura 4. Expresión basal del RNA mensajero de los genes SMARCB1 y EGFR en líneas celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma.	42
Figura 5. Niveles de proteína de los genes SMARCB1 y EGFR en diferentes células de cáncer pulmonar.....	43
Figura 6. Análisis del nivel de proteína de los genes MEOX2 y EZH2 en células de cáncer pulmonar.....	44
Figura 7. Análisis in silico de las secuencias genéticas 5'-upstream a 3'-downstream cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen EGFR, identifica marcas epigenéticas previamente identificadas en células de cáncer pulmonar.	46
Figura 8. Análisis del enriquecimiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias genéticas y promotoras del gen EGFR, en células de cáncer pulmonar A549.....	48
Figura 9. Posicionamiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias genéticas del gen EGFR, bajo condiciones de silenciamiento del factor MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549.....	50
Figura 10. Análisis del enriquecimiento del código histónico sobre secuencias genéticas del gen EGFR, bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549.....	52
Figura 11. Análisis de los niveles de proteína EZH2, SMARCB1 y EGFR bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549.....	53
Figura 12. Modelo funcional que propone la interacción entre MEOX2, SMARCB1 y EZH2 sobre el gen EGFR en células normales y progresión del cáncer pulmonar.	56

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión del RNA mensajero.	36
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las secuencias promotoras del gen EGFR.	37
Tabla 3. Condiciones experimentales del método ChIP-qPCR utilizadas en el equipo de PCR en tiempo real (Light Cycler 480) para el análisis del DNA-IPs de las secuencias promotoras del gen EGFR.	40

Lista de abreviaturas

AKT Cinasa de Serina/Treonina (del inglés Serine/Threonine Kinase)

ALK Linfoma Anaplásico Cinasa (del inglés Anaplastic Lymphoma Kinase)

APO-1 Antígeno de la apoptosis 1 (del inglés apoptosis antigen 1)

ARID1A Dominio de interacción 1A Enriquecido en AT (del inglés AT-Rich Interaction Domain 1A)

ATP Adenosín Trifosfato (del inglés Adenosine Triphosphate)

BAX Asociado a BCL2 X (del inglés BCL2 Associated X)

BCL2 Linfoma 2 de células B (del inglés B-Cell Lymphoma 2)

BM1 Linfoma B Inserción Mo-MLV Región 1 (del inglés B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1)

CASP8 Caspasa 8

CBP Proteína de Unión a CREB (del inglés CREB Binding Protein)

CBX Chromobox 1

CK5 Citoqueratina 5 (del inglés Cytokeratin 5)

DNA Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic acid)

DNMT DNA metiltransferasas

EED Desarrollo Embrionario del Ectodermo (del inglés Embryonic Ectoderm Development)

EGFR Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor)

EML4 Asociado al microtúbulo del equinodermo 4 (del inglés Echinoderm Microtubule Associated 4)

EZH2 Enhancer de Zeste Homólogo 2

GLI-1 Oncogen Homólogo Asociado a Glioma 1 (del inglés Glioma-Associated Oncogene Homolog 1)

HDAC Desacetilasa de Histonas (del inglés Histone Desacetylase)

HER2 Receptor Humano del Factor de Crecimiento Epidermal 2 (del inglés Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

IGV Navegador Integrador de Genómica (Integrative Genomics Browser)

JARID2 Jumonji Interactivo Rico en AT Dominio 2 (del inglés Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2)

LOX Lisil Oxidasa

MEOX2 Homeobox Mesenquimal-2 (del inglés Mesenchyme Homeobox-2)

miRNA microRNA

NCI Instituto Nacional de la Salud, USA (del inglés National Cancer Institute)

NSCLC Cáncer pulmonar de células no pequeñas (del inglés Non-Small Cell Lung Carcinoma)

OCT4 Proteína de Unión a Octámero 4 (del inglés Octamer-Binding Protein 4)

PHC3 Homólogo Polihomeótico 3 (del inglés Polyhomeotic Homolog 3)

PI3KCA Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato 3-Cinasa Subunidad Catalítica Alfa (del inglés Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha)

RAS Sarcoma de Rata (del inglés Rat Sarcoma)

RB Asociado a Retinoblastoma (del inglés Retinoblastoma Associated)

RING1 Proteína Ring Finger 1 (del inglés Ring Finger Protein 1)

RNA Ácido ribonucleico (del inglés ribonucleic acid)

SCLC Cáncer pulmonar de células pequeñas (del inglés Small Cell Lung Carcinoma)

SHH Vía de señalización Sonic Hedgehog

SMARCA4 Relacionado a SWI/SNF, Asociado a la Matriz, Dependiente de Actina, Regulador de Cromatina, Subfamilia A, Miembro 4 (del inglés SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4)

SMARCB1 Relacionado a SWI/SNF, Asociado a la Matriz, Dependiente de Actina, Regulador de Cromatina, Subfamilia B, Miembro 1 (del inglés SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1)

SNPs Polimorfismos de Nucleótido Único (del inglés Single Nucleotide Polymorphism)

SOX2 Determinante del sexo region Y-caja 2 (Sex determining Region Y-box 2)

SUZ12 Supresor de Zeste 12 (del inglés Suppressor Of Zeste 12)

SWI/SNF SWItch/Sacarosa No Fermentable (del inglés SWItch/Sucrose Non Fermentable)

TKIs Inhibidores de la Tirosina Cinasa (del inglés Tyrosine Kinase Inhibitors)

TNFRSF10A Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral Miembro 10a (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 10a)

TP53 Proteína Tumoral 53 (del inglés Tumor Protein 53)

TTF1 Factor de Terminación de la Transcripción 1 (del inglés Transcription Termination Factor 1)

Resumen

Introducción: El cáncer pulmonar constituye la enfermedad neoplásica maligna con mayor mortalidad a nivel mundial. La progresión de esta enfermedad se explica o se debe en parte a distintos factores, sobresaliendo las aberraciones epigenéticas, entre las que destacan las ocasionadas por los complejos remodeladores de la cromatina, entre los que destacan los complejos Polycomb y Trithorax. Al respecto, uno de los genes involucrado en la función de estos complejos es SMARCB1, el cual participa en la regulación epigenética de la transcripción, demostrándose su capacidad de regulación negativa sobre genes relacionados con la capacidad oncológica pulmonar como EZH2 y EGFR. En este sentido, se ha reportado en cáncer pulmonar como el gen EGFR se encuentra mutado en 62% de los casos, ya que la pérdida de la regulación de las secuencias de súper-enhancer de EGFR aumentan la capacidad de proliferación celular y progresión de la oncogénesis. Adicionalmente, se ha propuesto que la expresión del gen EGFR en cáncer pulmonar, es dependiente de la regulación transcripcional de MEOX2, cuya expresión está relacionada con pobre pronóstico clínico y enriquecimiento de histonas de activación en pacientes con cáncer pulmonar. Sin embargo, la influencia de MEOX2 sobre el posicionamiento de las proteínas SMARCB1 y EZH2 en la activación del gen EGFR, no se ha demostrado a la fecha. **Metodología:** Se realizaron ensayos de RT-qPCR y Western Blot en cuatro líneas celulares de cáncer pulmonar A549, NCI-H2347, NCI-H1975 y HCC827, siendo elegidas las células A549 para el silenciamiento genético de MEOX2 mediante vectores shorthairpin. Posteriormente se realizaron ensayos de ChIP-qPCR sobre las secuencias promotoras de EGFR, logrando demostrar la influencia de MEOX2 en el posicionamiento de EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias genéticas y promotora del gen EGFR. **Resultados:** Los principales hallazgos del presente trabajo fueron demostrar una relación inversamente proporcional entre la expresión de SMARCB1 con EGFR en células NSCLC. Adicionalmente, demostrar que MEOX2 influye en el posicionamiento de las proteínas EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias promotoras del gen EGFR. Sugiriendo adicionalmente, como MEOX2 promueve positivamente la expresión del gen blanco EGFR. **Conclusión:** El factor transcripcional MEOX2

influye en el posicionamiento de las proteínas con función epigenética EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias promotoras del gen EGFR, promoviendo la expresión de EGFR.

Abstract

Introduction: Lung cancer is the main cancer related cause of death worldwide. Its progression is due to different factors, mostly due to epigenetic aberrations, in which the ones caused by chromatin remodeling complexes (Trithorax and Polycomb), stand out. One of the genes involved in these complexes is SMARCB1, which participates in the epigenetic regulation of transcription, proving how it exerts a negative regulation in genes related to lung cancer such as EZH2 and EGFR. Therefore, it has been reported that EGFR is mutated in the 62% of lung cancer cases as deregulations in its super-enhancer increase cellular proliferation and progression of oncogenesis. Additionally, it has been suggested that EGFR expression in lung cancer is dependant of the transcriptional regulation from MEOX2, whose expression is related to poor overall survival and enrichment of activation histones in lung cancer patients. Nonetheless, the influence of MEOX2 over SMARCB1, EZH2 and EGFR activation, has not been proved. **Methodology:** RT-qPCR and Western Blot assays were performed in four NSCLC cell lines, A549, NCI-H2347, NCI-H1975 and HCC827, this allowed us to choose one cell line to perform the genetic silencing of MEOX2 by shorthairpin, afterwards ChIP-qPCR assays were performed over promoter sequences of EGFR to determine the influence of MEOX2 in the positioning of EZH2 and SMARCB1 over the genetic sequences and promoter region of EGFR. **Results:** The main findings were that an inversely proportional relation between the expression of SMARCB1 and EGFR is fulfilled in NSCLC cell lines, besides MEOX2 influences the positioning of the proteins EZH2 and SMARCB1 over the promoter sequences of EGFR, additionally it is suggested that MEOX2 influences EGFR expression. **Conclusion:** The transcription factor, MEOX2 influences the positioning of proteins with epigenetic function EZH2 and SMARCB1 in the promoter sequences of EGFR and in EGFR expression.

1. Introducción

1.1 Genética en cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, donde algunas células del cuerpo comienzan a dividirse con pérdida del control del ciclo celular, aumentando su proliferación, en parte promovido por cambios en los genes que controlan la estructura y función celular (NCI, 2015). Así mismo, el cáncer se caracteriza por distintos hallmarks o “marcas funcionales”, tales como angiogénesis, evasión de la apoptosis, proliferación sostenida, inmortalidad replicativa, metástasis, evasión de supresores de crecimiento, inflamación promotora de tumor, inestabilidad cromosómica y mutaciones (Hanahan y Weinberg, 2011).

Diversos factores pueden provocar mutaciones genéticas, entre los más comunes se encuentran los errores en la división celular ocasionados por la exposición a sustancias carcinogénicas que dañan el DNA, tales como compuestos químicos derivados de la combustión del cigarro (nicotina, formaldehído, acroleína, etc.), así como radiación por rayos UV. Existen distintos tipos de cambios en el DNA, algunos de estos cambios ocurren en solo un nucleótido, provocando polimorfismos de nucleótido único (SNPs), mientras que otro tipo de cambios afectan fragmentos más grandes del DNA, ocasionando deleciones o duplicaciones del material genético (Furrukh, 2013). Entre las principales alteraciones genéticas en cáncer se encuentran la variación en el número de copias de genes, pérdida de heterocigosidad, desbalance alélico e inestabilidad microsatelital (Du y Che, 2017). La mayoría de los cambios genéticos encontrados en diferentes tipos de cáncer en humanos se dividen en dos categorías, mutaciones de ganancia de función en

proto-oncogenes, que estimulan el crecimiento, división y supervivencia celular; mientras que las mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumor, en condiciones normales previenen el crecimiento celular desenfrenado, promueven la reparación del daño al DNA, así como la activación de los puntos de control del ciclo celular (Lee y Muller, 2010; American Cancer Society, 2014).

Distintos tipos de genes, entre otros que codifican para factores de transcripción, receptores celulares y enzimas, contribuyen en la progresión del cáncer, entre ellos, destacan los genes de la familia RAS con regiones moleculares altamente conservadas evolutivamente involucradas en controlar procesos como el crecimiento, diferenciación y apoptosis, así como la homeostasis celular (Saad *et al.*, 2014), ocurriendo ello, durante los procesos de mutación promoviendo aumento en los niveles de proliferación celular e inducción del silenciamiento transcripcional de los genes supresores de tumor, entre otros como APO-1 y LOX (Wajapeyee *et al.*, 2013), dificultando la eficacia de la terapia dirigida, lo cual se explica en buena parte debido a que el oncogen RAS se encuentra mutado en cerca del 30% de las neoplasias malignas en humanos, para lo cual no se ha desarrollado un fármaco específico efectivo en contra de RAS, destacando así su importancia (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, respecto a genes supresores de tumor de gran relevancia en cáncer, destaca TP53 cuyo factor de transcripción nuclear con función pro-apoptótica, pierde su capacidad funcional por mutación, disminuyendo su expresión y función, desencadenado por la falta de reparación de daño al DNA y pérdida del proceso de apoptosis en cáncer, cuyos estatus de mutación han sido detectados en cerca del 50% de las enfermedades malignas en humanos, impactando de manera

negativa en la progresión clínica oncológica al provocar resistencia a la quimioterapia, así como invasión y metástasis (propagación) de células cancerosas (Ozaki y Nakagawara, 2011). Adicional al proceso de mutación genética, los procesos aberrantes de regulación epigenética, se ha demostrado influyen en los procesos de la progresión del cáncer (Takeshima y Ushijima, 2019).

1.2 Epigenética en cáncer

La epigenética se define como el estudio de fenómenos y mecanismos que causan cambios heredables a la expresión del gen sin ser dependientes a cambios en la secuencia del DNA (Deans y Maggert, 2015), alteraciones en los procesos de regulación epigenética influyen en el control de la transcripción genética a través del intercambio histónico, alteraciones en la función de remodeladores de la cromatina, microRNAs (miRNAs), modificación covalente de las histonas y metilación del DNA, entre otras (Audia y Campbell, 2016). La adición covalente de un grupo metilo ocurre generalmente en las citosinas de las islas CpG, las cuáles son regiones en el genoma que contienen un gran número de repeticiones en dinucleótidos CpG y suelen extenderse de 300 a 3000 pares de bases, aproximadamente el 70% de los genes en mamíferos están asociados a islas CpG, en células normales esto asegura una correcta regulación de la expresión del gen y un silenciamiento estable de los genes (Blackledge y Klose, 2010). En cáncer la inactivación de ciertos supresores de tumor ocurre como consecuencia de la hipermetilación en sus secuencias promotoras, por otro lado, la hipometilación induce inestabilidad genómica y contribuye a la transformación celular, siendo las desregulaciones provocadas por

la metilación en el DNA de suma importancia para la oncogénesis (Kulis y Esteller, 2010).

Otro tipo de desregulaciones epigenéticas son las causadas en las histonas; estas son proteínas básicas altamente conservadas que pueden ser modificadas después de la traducción en los residuos de aminoácidos localizados en los extremos N- y C- terminal. Estos residuos se pueden modificar por fosforilación, ubiquitinación, metilación o acetilación (Berger, 2007). La acetilación de las marcas de histonas está asociada con la activación transcripcional de los genes, mientras que las consecuencias funcionales de la metilación dependen del número de grupos metilo, por ejemplo, la H3K4me2, H3K4me3 y H3K9me1 están asociadas con la eucromatina y la expresión activa del gen, mientras que la H3K9me3 y H3K27me3 están asociadas con la heterocromatina y la represión de la expresión (Schneider y Grosschedl, 2007). Adicionalmente, algunas marcas como la H3K4me1 y H3K27Ac se encuentran en elementos enhancer de los genes influyendo en la expresión aun encontrándose a largas distancias del sitio de inicio de la transcripción del gen. Los enhancers activos están enriquecidos con H3K27Ac, mientras que los enriquecidos con H3K4me1 están a la espera de un estímulo para activarse (Creighton *et al.*, 2010). Así mismo, se distingue a los enhancers por altos niveles de H3K27Ac y H3K4me1, reclutamiento de RNA polimerasa II y de p300, en contraste con los promotores, los enhancers muestran bajos niveles de H3K4me3 (Cheng *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado la influencia de los súper-enhancers en el mantenimiento de la identidad celular, estos son regiones genómicas densamente ocupadas por factores considerados maestros de la transcripción entre otros como,

OCT4 y SOX2, de un tamaño promedio a 8.7 kilobases (Kb), teniendo mayor tamaño y actividad transcripcional que los enhancers (Peng y Zhang, 2018). Todo este tipo de desregulaciones influyen en la progresión del cáncer, pudiendo suceder en casi cualquier órgano del cuerpo, siendo el cáncer colorrectal, de mama y el de pulmón los que poseen mayor incidencia a nivel mundial (World Health Organization, 2018).

1.3 Cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, representa un tercio de todas las muertes por cáncer en todo el mundo al tener una tasa de mortalidad mayor que la de los 3 tipos de cánceres más comunes combinados (colorrectal, mama y próstata). Más de la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón mueren a un año del diagnóstico y la supervivencia después de los 5 años es del 19% (Siegel *et al.*, 2020).

El origen del cáncer de pulmón está asociado a diversos factores ambientales y al estilo de vida del paciente, siendo el fumar la causa más importante de su origen ya que se asocia del 85 al 90% de todos los casos de cáncer de pulmón. Otros factores asociados al incremento en el riesgo de padecer este tipo de cáncer incluyen los asbestos, la radiación ionizante y toxinas en el ambiente, tales como el humo de segunda mano, radón y metales (arsénico, cromo y níquel) (Alberg *et al.*, 2013).

En México, el cáncer de pulmón es el sexto con mayor incidencia y el cuarto con mayor tasa de mortalidad (GLOBOCAN, 2018), pero es importante mencionar que en 2016 se reportaron 7044 muertes originadas por cáncer de pulmón,

ubicándola como la enfermedad neoplásica con mayor mortalidad en México (Arrieta *et al.*, 2019).

1.3.1 Clasificación histopatológica del cáncer pulmonar

Como la mayoría de los cánceres, el cáncer de pulmón es un conglomerado de enfermedades de etiología diversa, ampliamente dividido en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, que comprende 20% de los cánceres de pulmón) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, que comprende el 80% de los cánceres de pulmón), este último se subdivide en: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (Zappa y Mousa, 2016)

El adenocarcinoma es el tipo más común de cáncer de pulmón al abarcar un 40% de todos los casos, se origina en células epiteliales alveolares de tipo II, las cuáles secretan mucina y otras sustancias, se caracteriza al ser una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular o producción de mucina (Zappa y Mousa, 2016). Las células del adenocarcinoma tienen marcadores neuomocíticos característicos como TTF1 y NapsinA que se encuentran expresados en más del 85% de los casos de adenocarcinoma. Se encuentra en la periferia del pulmón y comparado con otros tipos de cáncer pulmonar, el adenocarcinoma tiende a tener un crecimiento lento. Se subdivide en adenocarcinoma lepidico, acinar, papilar, micropapilar, sólido, mínimamente invasivo e invasivo (Tacha *et al.*, 2012).

El carcinoma de células escamosas comprende entre el 25 y 30% de todos los casos de cáncer de pulmón, surge en células escamosas de los tubos bronquiales en el centro del pulmón, al observarse al microscopio muestra la característica de tener queratinización, puentes intracelulares y un patrón de

crecimiento anidado, suele tener núcleos hipercromáticos y puede haber queratinización individual en la célula o grupos de células escamosas formando perlas de queratina ubicadas en el centro de tumores sólidos (Brambilla *et al.*, 2014). Tiene distintos marcadores como p40, CK5 y p63, que son usados para demostrar la diferenciación de las células escamosas. Este subtipo de NSCLC está altamente correlacionado con fumar y su tasa de supervivencia es significativamente mayor a la del adenocarcinoma, se subdivide en queratinizante, no queratinizante y basaloide (Conde *et al.*, 2013; Gandara *et al.*, 2015).

El carcinoma de células grandes sucede en el 5 a 10% de casos de cáncer de pulmón, se ubica en la periferia presentando un aspecto voluminoso y necrótico, las células tumorales son grandes, poligonales con núcleos vesiculares o pleomórficos y no tienen un patrón definido (Travis *et al.*, 2013). Comienza en la parte central de los pulmones, tiene un rápido crecimiento tumoral y suele ser diagnosticado tras la exclusión de otras posibilidades (Rajdev *et al.*, 2018).

1.3.2 Clasificación molecular del cáncer pulmonar

Además de la clasificación histopatológica, el NSCLC se clasifica según sus alteraciones moleculares, entre las que destacan las mutaciones en: KRAS, ALK, HER2, PI3KCA y EGFR (Rodríguez-Canales *et al.*, 2016).

La proteína KRAS está involucrada en regular la división celular, presenta mutaciones que llevan a su activación en un 15 a 25% de los pacientes con adenocarcinoma, mientras que su mutación es poco común en pacientes con carcinoma de células escamosas. Las mutaciones en KRAS están asociadas a tumores en fumadores y en no fumadores (Tam *et al.*, 2006).

Se han identificado translocaciones en el receptor de tirosina cinasa ALK en 3 al 7% de los tumores en pulmón, en NSCLC, la fusión más común de ALK se da con variantes del gen EML4, la fusión EML4-ALK provoca actividad de cinasa con expresión constitutiva, esta fusión es más común encontrarla en pacientes jóvenes que nunca han fumado y en pacientes con adenocarcinoma de histología acinar. Se ha demostrado que el inhibidor selectivo de ALK (Crizotinib) reduce la proliferación en células con mutaciones en ALK, validándolo como un blanco de la terapia dirigida (Bang *et al.*, 2011).

El receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano HER2, participa en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, se han reportado mutaciones de activación en el dominio tirosina cinasa de HER2 en menos del 5% de casos de NSCLC, se asocia con el género femenino, no fumador y con adenocarcinoma. Las mutaciones en el exón 20 de HER2 son las más comunes en NSCLC, esta mutación aumenta la actividad de cinasa de HER2 aumentando la actividad de la vía de señalización PI3K/AKT, resultando en un incremento de la tumorigénesis (Wang *et al.*, 2006).

La señalización de PI3KCA es importante para distintas actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, migración y supervivencia. Mutaciones en PI3KCA ocurren en muchos cánceres de tipo epitelial, siendo junto a KRAS uno de los oncogenes con mayor tasa de mutación. Sin embargo, en NSCLC, PI3KCA se encuentra mutado en el 1 a 3% de los casos. Estas mutaciones son más comunes en carcinoma de células escamosas que en adenocarcinoma (Kawano *et al.*, 2006).

1.3.3 Aberraciones epigenéticas en el cáncer pulmonar

El cáncer de pulmón involucra una acumulación de eventos genéticos y epigenéticos en el epitelio respiratorio, siendo las desregulaciones epigenéticas más frecuentes que las mutaciones somáticas en cáncer de pulmón (Brzeziańska *et al.*, 2013).

Siendo un ejemplo de desregulación epigenética la hipermetilación que ocurre en los promotores de genes supresores de tumor, incrementando con la progresión neoplásica del aumento en tamaño del pulmón a adenocarcinoma, siendo P16 (INK4a) uno de los supresores de tumor más frecuentemente mutados, metilados o deletados en NSCLC con un porcentaje del 20 al 30%, estando asociada esta hipermetilación con una pobre prognosis en pacientes con resección quirúrgica en adenocarcinoma (Toyooka *et al.*, 2011). Por otro lado, un perfil de metilación de 766 genes de interés en la oncología pulmonar identificó 247 genes significativamente hipometilados con una alta expresión, destacando a los genes CASP8 y TNFRSF10A con altos niveles de hipometilación (Selamat *et al.*, 2012). La metilación de las islas CpG es regulada por las DNA metil-transferasas (DNMTs), llevando al silenciamiento de los genes. Clínicamente, existe evidencia que destaca como la sobre-expresión de DNMT1 está asociada con disminución en la supervivencia de las resecciones quirúrgicas en pacientes con cáncer pulmonar (Kim *et al.*, 2006). La sobre-expresión de DNMT1 y DNMT3a/b está implicada en la patogénesis del cáncer pulmonar, provocando sobre-expresión de activadores transcripcionales y pérdida de miRNAs (Damiani *et al.*, 2008).

Los miRNAs son RNAs no codificantes, endógenos, de una sola cadena que regulan la expresión de los genes. Más de 1000 miRNAs han sido identificados y se ha encontrado que regulan más de un tercio de los RNA mensajeros codificantes (MacFarlane y Murphy, 2010). Es por ello que el silenciamiento de genes de miRNAs por metilación puede modular el desarrollo y progresión tumoral, por ejemplo, el miR-487b se encuentra frecuentemente silenciado por metilación en tumores de pulmón y se encuentra reducido en células respiratorias epiteliales y en líneas celulares de cáncer de pulmón, además, el miR-9-3, miR-34b y miR-126 se encuentran metilados en NSCLC y están asociados con pobre prognosis (Xi *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha identificado la expresión aberrante de ciertos miRNAs como marcadores en el diagnóstico, en la respuesta a tratamiento y en la prognosis del cáncer pulmonar. Por ejemplo, en un grupo de 48 pacientes con adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas se encontró la sobre-expresión del miR-21 en 52% de los casos, además de correlacionar con la sobrevida del paciente, sugiriendo que la sobre-expresión del miR-21 podría ser un marcador de prognosis negativa en la sobrevida de pacientes con cáncer pulmonar (Markou *et al.*, 2008).

Además, se ha encontrado que las deacetilasas de histonas (HDACs) están sobre-expresadas en cáncer de pulmón, éstas tienen una función sinérgica para alterar la compactación de la cromatina y reprimir la transcripción con las DNMTs al catalizar la eliminación de grupos acetilo en las histonas resultando en un estado heterocromático. Se ha reportado que la expresión de mRNA y proteína de la HDAC1 correlaciona con la progresión en carcinomas de pulmón, indicando cómo

las HDACs están involucradas en la aparición, progresión y pronóstico del cáncer de pulmón, por lo que, distintos genes represores de las HDACs (SIN3A) se encuentran con disminución en tumores NSCLC (Esteller, 2008; Tiana *et al.*, 2018).

Uno de los modificadores post-transcripcionales que se encuentra sobre-expresado en cáncer de pulmón se encuentra representado por los genes del complejo Polycomb, al codificar para un conjunto de proteínas que logran reprimir de manera epigenética la transcripción. En este sentido, el complejo Polycomb participa en distintos procesos biológicos y celulares, que incluyen el mantenimiento de la identidad molecular y diferenciación celular, así como la proliferación. El complejo Polycomb se divide en dos grupos, PRC1 principalmente representado por los genes RING1, PHC3, CBX y BMI1, participando en la compactación de la cromatina, capaz entre otras funciones de catalizar la ubiquitinación de la histona H2A, mientras que el complejo PRC2 a través de los genes EZH2, EED, SUZ12 y JARID2 logra catalizar la trimetilación, reprimiendo la activación transcripcional de ciertos genes, cuya función es antagonizada por la función de las proteínas acetil-transferasas de histonas. Basado en todo ello, se ha demostrado que la sobre-expresión de genes del complejo represivo Polycomb se encuentra asociada con la proliferación, supervivencia y los mecanismos de la transición epitelio-mesénquima en cáncer pulmonar (Margueron y Reinberg, 2011; Xu *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a estas aberraciones epigenéticas en NSCLC, se encuentran las generadas por cambios en los complejos remodeladores de la estructura de la cromatina (Besaratina y Pfeifer, 2008).

1.4 Complejos remodeladores de la cromatina en cáncer

La cromatina es un agregado supramolecular el cual contiene DNA cargado negativamente, al que se asocian entre otras proteínas, las llamadas histonas “cargadas positivamente”. Cuyo proceso molecular resulta fundamental para todos los procesos que involucran la expresión genética del genoma de eucariotas, ya que, al modificarse la accesibilidad al DNA, por parte de proteínas reguladoras logran modificarse diferentes funciones en el genoma incluyendo los procesos de transcripción del RNA, así como los mecanismos de replicación del DNA, además de los procesos de reparación y recombinación (Maeshima *et al.*, 2019).

La remodelación de la cromatina resulta crítica para el mantenimiento de la expresión genética apropiada del gen, a través de reguladores epigenéticos se llevan a cabo roles importantes en el desarrollo de la fisiología celular y la oncogénesis en las enfermedades malignas. En este sentido mientras que gran número de loci genómicos se encuentran reprimidos en un estado de normalidad fisiológica estos podrían ser activados a través de la expresión aberrante o bien mediante la actividad de los remodeladores de la cromatina. Por lo que, mecanismos de desregulación en la cromatina conllevan a la activación aberrante de un gen o conjunto de genes, así como al silenciamiento inapropiado de los mismos, promoviendo el desarrollo del cáncer (Clapier y Cairns, 2009; Ellis *et al.*, 2009).

Como es sabido, las unidades fundamentales de la cromatina son los nucleosomas, estos compactan el DNA genómico permitiendo su inclusión en el volumen del núcleo celular, impidiendo esta compartimentalización el acceso de

algunas proteínas de unión al DNA, tales como activadores vs. represores de la transcripción, entre otros, moduladores epigenético-transcripcionales. Uno de los complejos más involucrados en los cambios en la estructura de la cromatina es el complejo Trithorax (Bracken *et al.*, 2019).

Los genes del complejo Trithorax participan en la activación transcripcional y como genes antagónicos con el complejo Polycomb, además se ha demostrado su gran importancia en la regulación de la estructura de la cromatina de genes implicados en el control del ciclo celular, en ello SMARCA4 promueve arresto del ciclo celular mediado por RB (Bartlett *et al.*, 2011), mientras que en procesos de señalización celular, ARID1A se encuentra asociado con la regulación del binomio PI3K/AKT (Hodges *et al.*, 2016), mientras que durante los procesos de muerte celular, la re-expresión de SS18 promueve el aumento en la apoptosis celular (Kadoch y Crabtree, 2013), influenciando en gran medida la progresión del cáncer (Schuettengruber *et al.*, 2011; Poynter y Kadoch, 2016). Adicional con lo anterior, el complejo Trithorax se ha clasificado en distintos factores que incluyen a proteínas de unión al DNA, modificadores de histonas, así como remodeladores de la cromatina (Geisler y Paro, 2015).

Uno de los complejos de remodelación de la cromatina más estudiados ha sido SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) el cual participa principalmente en la regulación epigenética de la transcripción, en mecanismos como el reposicionamiento del nucleosoma, además de mantener una participación importante en los mecanismos de replicación y reparación del DNA (Narlikar *et al.*, 2013).

Basado en lo anterior, el complejo SWI/SNF, resulta un complejo formado por múltiples subunidades proteicas conservado durante la evolución de organismos eucariotas. Las subunidades del complejo SWI/SNF pueden ser subclasificadas en tres categorías: (1) subunidad enzimática (ATPasa), (2) subunidades del core multi-proteico, y (3) subunidades accesorias (Weissman y Knudsen, 2009). Siendo la proteína SMARCB1 formadora de la subunidad core del complejo SWI/SNF (Roberts y Biegel, 2009).

	Subunit	Alias	Gene(s)
ATPase	BRG1		<i>SMARCA4</i>
	BRM	SNF2(a), BAF190, SWI2	<i>SMARCA2</i>
Core	SNF5	BAF47, INI1	<i>SMARCB1</i>
	BAF155	SWI3, SRG3	<i>SMARCC1</i>
	BAF170		<i>SMARCC2</i>
Accessory	Actin		<i>ACTB</i>
	BAF45 (a-d)		<i>PHF10, DPF1, DPF2, DPF3</i>
	BAF53 (a, b)		<i>ACTL6A, ACTL6B</i>
	BAF57		<i>SMARCE1</i>
	BAF60 (a-c)		<i>SMARCD1, SMARCD2, SMARCD3</i>
	BAF180		<i>PBRM1</i>

Figura 1. Subunidades del complejo SWI/SNF. El complejo SWI/SNF es clasificado en las subunidades proteicas tanto enzimática, core como accesorias. (Tomado y adaptado de Weissman y Knudsen, 2009).

1.5 Participación epigenética de SMARCB1 en cáncer

En *Homo sapiens*, el gen de SMARCB1 (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1), también conocido como SNF5/INI1, se localiza en el cromosoma 22, en la posición q11.2. El gen está formado por 9 exones y abarca aproximadamente 50 Kb. Un sitio de splicing alternativo en el exón 2, genera dos transcritos diferentes que constan de 1155 y 1128 nucleótidos. La proteína SMARCB1, está formada por un dominio de homología SNF5 que abarca 193 aminoácidos y dos secuencias repetidas altamente conservadas, Rpt1 y Rpt2, el cual tiene una señal de exportación nuclear. Un dominio coiled-coil en el extremo C-terminal posee un papel importante para llevar a cabo la unión con las proteínas de interacción (Kohashi y Oda, 2017).

SMARCB1 es requerido para la integridad del complejo SWI/SNF al permitir la unión de otros genes del complejo (SMARCA4) sobre secuencias enhancers, facilitando la realización de su función, la pérdida de SMARCB1 provoca una marcada reducción en la función SWI/SNF, ya que se presenta un deterioro en su capacidad de unión a secuencias genéticas enhancers en genes del complejo (Wang *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que SMARCB1 resulta esencial para el silenciamiento de súper-enhancers en células embrionarias humanas en condiciones de diferenciación neural, por lo que, se sugiere que SMARCB1 es necesario para el reclutamiento de factores de transcripción a secuencias promotoras en células embrionarias (Langer *et al.*, 2019). Así mismo, se ha demostrado que la pérdida de SMARCB1 conduce a la disminución de marcas

histónicas de H3K27Ac y H3K4me1, así como posicionamiento del factor CBP, promoviendo la formación de tumores rabdoides (Alver *et al.*, 2017).

Diversas evidencias han demostrado que SMARCB1 representa un auténtico gen supresor de tumor, por ejemplo: embriones de ratón que no expresan a SMARCB1 mueren entre los 3.5 y 5.5 días después de la implantación embrionaria, mientras que al analizar el locus de SMARCB1 se identificó pérdida de la heterocigosidad resultando en aumento de la formación de tumores rabdoides (Guidi *et al.*, 2001). Mientras que en fibroblastos embrionarios de ratón, la pérdida de SMARCB1 provoca la progresión del ciclo celular mientras que, consecuentemente, altera la expresión de varios genes de respuesta involucrados en el control del ciclo celular como RB-E2F. Sin embargo, la observación más relevante es que la inactivación condicional de SMARCB1 en ratones, resulta en el desarrollo de tumores rabdoides (Roberts *et al.*, 2002).

Mutaciones en el gen de SMARCB1 llevan a la pérdida de su función afectando múltiples vías que promueven la transformación celular, resultando en la adquisición simultánea de diversos hallmarks de las células cancerosas (Darr *et al.*, 2015; Kalimuthu y Chetty, 2016). Las mutaciones más comunes en SMARCB1 son: deleciones parciales o duplicaciones en los exones 1 al 5. Se ha encontrado que mutaciones en el exón 2 y del 4 al 7 son comunes en tumores rabdoides de riñón (Geller *et al.*, 2015). De manera muy particular, las mutaciones de inactivación de SMARCB1 se han encontrado en tumores rabdoides malignos y tumores teratoides rabdoides atípicos, dos formas de tumores muy agresivas de neoplasias pediátricas, ambos tumores presentaban deleciones homocigóticas en el exón 9 (Kim y Roberts,

2014; Le Loarer, 2014). Además, se ha reportado que la inactivación de SMARCB1 causa carcinoma medular renal, schwannomatosis y carcinoma escamoso de la pleura (Kalimuthu y Chetty, 2016; Yoshida *et al.*, 2018).

En cuanto al papel biológico de SMARCB1, se ha demostrado que influye en la vía de señalización de Sonic hedgehog (SHH), afectando negativamente la expresión del efector final de la vía, siendo este el factor de transcripción GLI-1 (Glioma-Associated Oncogene Homolog 1) como genes de respuesta a GLI-1 (Jagani *et al.*, 2010). En este sentido, se ha demostrado su participación en la inhibición de la Ciclina D1 y β -catenina, además la expresión de SMARCB1 se encuentra asociada con la inhibición de la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal en modelos celulares (Darr *et al.*, 2015; Kalimuthu y Chetty, 2016).

1.6 Terapia contra aberraciones epigenéticas

Al contrario de las mutaciones genéticas, las aberraciones epigenéticas son reversibles y pueden ser revocadas por distintos métodos farmacológicos (Ansari *et al.*, 2016).

Entre los métodos farmacológicos más recientes en neoplasias malignas del grupo NSCLC se encuentran los inhibidores de las HDAC debido a que inducen apoptosis, autofagia, necrosis celular, arresto del ciclo celular y supresión de la angiogénesis, además de inducir la expresión de genes pro-apoptóticos como BAX, y reprimir la expresión de genes que influyen en la supervivencia, como BCL2. En

este sentido, se estudió el efecto de la combinación de dos inhibidores de las HDAC (Tricostatina A y Vorinostat) en líneas celulares de NSCLC, encontrando actividad antitumoral en: RERF-LC-MS, PC14, PC9, A549, LK-2, EBC-1, RERF-LC-AI y PC1 (Miyanaga *et al.*, 2008). Por otro lado, en una cohorte de 45 pacientes con NSCLC metastásico se administró el inhibidor de las HDAC, Entinostat, combinado con el agente desmetilante del DNA, 5-Azacidina, reportando desmetilación de 4 genes silenciados epigenéticamente asociados al cáncer pulmonar, además, los pacientes resistían el tratamiento, teniendo una supervivencia media de 6.4 meses (Juergens *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio en una cohorte de 15 pacientes NSCLC en etapa avanzada, a quienes se administró el agente hipometilante Decitabina, observando que cuatro pacientes se mantenían estables por 6 meses, mientras que tres pacientes lograron una supervivencia de 15 meses, mientras que un paciente sobrevivió 81 meses, demostrando, así la importancia de la terapia dirigida en contra de aberraciones epigenéticas (Momparker y Ayoub, 2001). Así mismo, con respecto a diferentes biomarcadores de mayor importancia en NSCLC, destaca el receptor del factor de crecimiento epidermal al promover la quimioresistencia, ya que surgen mutaciones secundarias bajo el tratamiento farmacológico (Sigismund *et al.*, 2018).

1.7 Expresión genética del gen EGFR en cáncer pulmonar

El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), es un receptor tirosina cinasa que se ubica en la superficie de las células donde la unión de su ligando activa el dominio tirosina cinasa en la región intracelular del receptor, esta

tirosina cinasa fosforila varios sustratos intracelulares que activan vías que conducen al crecimiento celular, la síntesis de DNA y la expresión de oncogenes (Chang *et al.*, 2016). El gen de EGFR, se encuentra en el cromosoma 7p11.2, tiene 28 exones, de los cuales del 5 al 7 y del 13 al 16 codifican para el dominio de unión del ligando, mientras que del 18 al 24 codifican para el dominio de tirosina cinasa. La autofosforilación de EGFR, ocurre en la región codificada por los exones 25 al 28. Además, desregulaciones en su súper-enhancer están relacionados a la activación de diversas vías de señalización (Jiang *et al.*, 2018; Wee y Wang, 2017). La sobre-expresión del gen EGFR se ha observado en diversos tipos de cáncer humano como es, cabeza y cuello, ovario, cervix, vejiga, esófago, estómago, cerebro, mama, endometrio, colon y pulmón. Los análisis en retrospectiva han reportado que la sobre-expresión de EGFR ocurre en 62% de los casos de NSCLC, mientras que correlaciona con un pobre pronóstico, por lo que, EGFR se ha posicionado como un blanco terapéutico en la oncología pulmonar (Sigismund *et al.*, 2018).

En este sentido, la terapia dirigida hacia EGFR se enfoca en el desarrollo de inhibidores de tirosina cinasa (TKIs), los cuales tienen un bajo peso molecular, compitiendo con el ATP por la unión al dominio tirosina cinasa de EGFR, disminuyendo su activación (Martinez-Marti, 2019). Se han desarrollado varias generaciones de EGFR-TKIs, los de primera generación, Erlotinib y Gefitinib, previenen de forma reversible y selectiva la unión del ATP, inhibiendo la autofosforilación de EGFR, mejorando la sobrevida libre de progresión en comparación con la quimioterapia con base en derivados de platino (Lau *et al.*,

2019). Las generaciones subsecuentes de TKIs se diseñaron para combatir la resistencia al tratamiento, los TKIs de segunda generación, Afatinib y Dacotimib, tienen una mayor afinidad al dominio tirosina cinasa, inhibiendo irreversiblemente a EGFR, por lo que son inhibidores más potentes de EGFR, al costo de una toxicidad incrementada (Mok *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2015). Osimertinib, el único TKI de tercera generación disponible, se caracteriza por tener una actividad significativamente mayor en las células con mutación en EGFR respecto a células con expresión de EGFR wild type, además de generar menor toxicidad respecto a TKIs de primera y segunda generación, es por ello, que el entendimiento de las mutaciones en EGFR resultan de gran importancia para el desarrollo de la terapia dirigida (Wang *et al.*, 2016; Soria *et al.*, 2018).

Las mutaciones somáticas de activación en EGFR son prevalentes en pacientes con NSCLC. Existen dos tipos de mutaciones de activación en el gen de EGFR que constituyen el 90% de todas las mutaciones de activación de EGFR, siendo estas: micro-delecciones del exón 19 (delE746-A750), así como mutación en el exón 21 que sustituye Arginina por Leucina en el codón 858 (L858R). Tales mutaciones de activación conducen al equilibrio en el cambio de ATP que favorecen el estado activo llevando al incremento en la actividad cinasa y de esta manera, las células tumorales muestran ventaja en el crecimiento y supervivencia. Aun, cuando los pacientes con NSCLC, muestran respuesta positiva a TKIs, la resistencia adquirida a estos agentes finalmente conduce a la progresión de la enfermedad en un lapso de un año (Ray *et al.*, 2016). En aproximadamente la mitad de los casos, la resistencia adquirida es debido a la aparición de una mutación puntual en el exón

20 de EGFR, conocida como T790M. Al respecto, se ha demostrado que las mutaciones en EGFR generan sensibilidad a los TKIs, siendo las mutaciones en exones 19 y 21 las que responden mejor al tratamiento con Gefitinib y Lapatinib. Sin embargo, se ha detectado que la mutación T790M conduce a la resistencia de EGFR frente a Gefitinib y Lapatinib al incrementarse la afinidad por el ATP, desplazando la afinidad de los TKIs por su unión al dominio de la tirosina cinasa, no obstante, se ha demostrado que el Osimertinib es efectivo contra esta mutación en particular (Liam, 2019). Así mismo, se ha demostrado que 83.3% de pacientes expuestos al humo de madera, con mutación en EGFR responden positivamente a Erlotinib, alcanzado sobrevivida libre de progresión de 17.6 meses (Arrieta *et al.*, 2008).

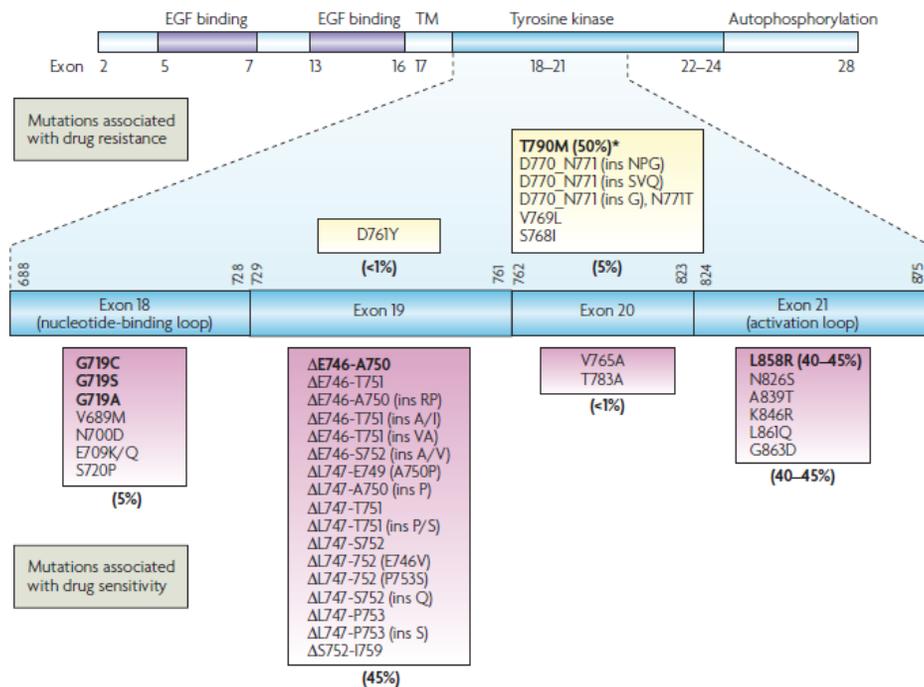


Figura 2. Mutaciones en el gen de EGFR asociadas con resistencia a fármacos. El dominio tirosina-cinasa posee el mayor número de mutaciones que promueven la resistencia a fármacos, siendo las más importantes las ubicadas en el exón 20 (T790M) y exón 21 (L858R). (Tomado y adaptado de Sharma *et al.*, 2007).

La relación entre la expresión de SMARCB1 y EGFR poco se ha estudiado, en este sentido, se ha demostrado que las líneas celulares de tumores rabdoideas 167 y 365 al re-expresar a SMARCB1 mediante un vector retroviral, muestran una disminución en la expresión del nivel total de EGFR. Por el contrario, en estas líneas celulares, al tener baja expresión de SMARCB1, la expresión de EGFR aumenta (Darr *et al.*, 2015). Además, en la línea celular de sarcoma epitelioides, VAESBJ, se ha demostrado que cuando SMARCB1 se encuentra inactivo, EGFR se encuentra sobre-expresado, por otro lado, la re-expresión ectópica de SMARCB1 provocó una reducción significativa en la migración y proliferación celular (Brenca *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha establecido si existe alguna relación entre las mutaciones de EGFR y la pérdida de expresión de SMARCB1. En este sentido, en una cohorte de 19 pacientes mestizos mexicanos con adenocarcinoma pulmonar provocado por la exposición al humo de madera, se presentan mutaciones tanto en EGFR como en SMARCB1. En este sentido, el 63.2% de los pacientes incluidos en dicho estudio, mostraba mutación sin sentido en el exón 7 de EGFR en la región G288V, que forma parte del dominio de unión del ligando, mientras que el 73.7% mostraba mutación en SMARCB1 en los aminoácidos T72 y G157, las cuales ocurren río arriba en la región conservada (Soca-Chafre *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de SMARCB1 y EGFR puede verse afectada por la función de la proteína EZH2 miembro del grupo PRC2 (Wilson *et al.*, 2010).

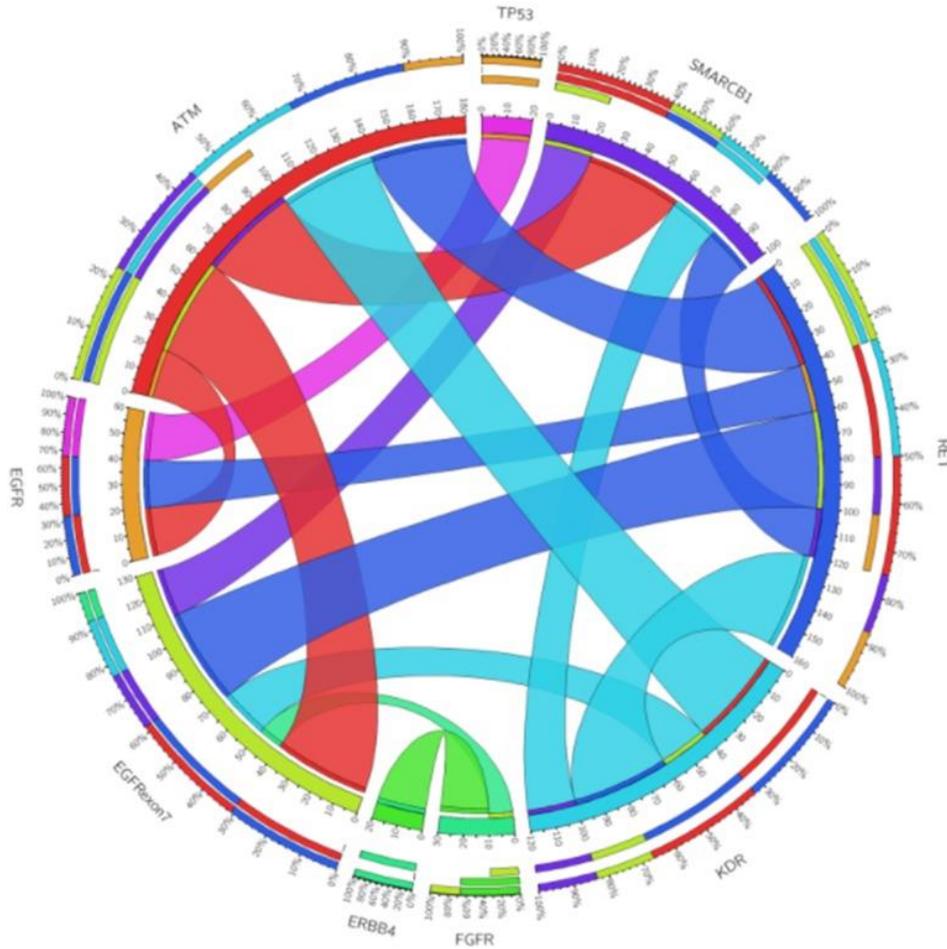


Figura 3. Alteraciones genómicas en SMARCB1 y EGFR. Análisis de secuenciación masiva en genes con interés oncológico en una cohorte de 19 pacientes con adenocarcinoma provocado por exposición al humo de madera. (Tomado y adaptado de Soca-Chafre et al., 2018).

1.8 Impacto de la metiltransferasa EZH2 en cáncer

La metiltransferasa de histona EZH2 (Enhancer de Zepte Homólogo 2) se localiza en el cromosoma 7 en la región q36.1, es parte del complejo Polycomb PRC2 y regula el silenciamiento de los genes al catalizar la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3) en los promotores de genes blanco, además, se sobre-expresa en varios tipos de cáncer, cómo, cáncer de próstata, cáncer de

mama, cáncer de ovario y cáncer de pulmón (Simon y Lange, 2008; Wang *et al.*, 2016).

Se ha encontrado relación entre la expresión de SMARCB1 y EZH2, ambos pertenecen a complejos antagonistas (Trithorax y Polycomb), mientras que el primero permite la activación de la transcripción en genes, el segundo promueve la represión en genes. Por otro lado, se ha demostrado que en líneas celulares de tumores rabdoides con deficiencia de SMARCB1 se eleva el enriquecimiento de la H3K27me3 y el reclutamiento de EZH2, además en fibroblastos de ratón con SMARCB1 activo, éste regula negativamente la función de EZH2 al modular su expresión, mostrando que son genes antagonistas (Wilson *et al.*, 2010). Así mismo, en las líneas celulares de tumores rabdoides deficientes de SMARCB1, G401 y G402, la administración del fármaco Tazemetostat, que es un inhibidor selectivo de EZH2, aumentó los niveles de apoptosis de estas líneas celulares, demostrando la dependencia entre ambos genes (Knutson *et al.*, 2013).

En cuanto a la relación entre la expresión de EZH2 y EGFR, se ha reportado que, en las líneas celulares de cáncer de colón, HT-29 y HCT-15, la co-inhibición de estos dos genes resulta en un descenso significativo de la proliferación celular y en un incremento en la apoptosis, mostrando sinergia entre estos dos genes (Katona *et al.*, 2014). Esta sinergia también se ha reportado en la línea celular de NSCLC, PC9, en donde al inhibir a EZH2 y EGFR se observa reducción en la migración celular, inhibición de la viabilidad celular e incremento en la apoptosis, demostrando que ambos genes se encuentran relacionados con el crecimiento tumoral (Gong *et al.*, 2019).

Adicionalmente, de manera reciente nuestro grupo de investigación ha demostrado la posible asociación en la expresión de genes tipo Homeobox como MEOX2, sobre la capacidad de respuesta al tratamiento oncológico en pacientes de cáncer pulmonar con estatus del gen EGFR wild type, como EGFR mutado (Armas-López *et al.*, 2017).

1.9 Relevancia del factor transcripcional MEOX2 en cáncer pulmonar

El factor de transcripción MEOX2 (Mesenchyme Homeobox 2) se localiza en el cromosoma 7 en la posición p21.2, codifica para un homeodominio que participa en la regulación de la miogénesis de las extremidades de vertebrados, se ha demostrado en ratones que mutaciones en MEOX2 provocan anomalías craneofaciales y esqueléticas, además de disfunción neurovascular en Alzheimer (Stamatakis *et al.*, 2001). Además, se ha reportado que MEOX2 regula la expresión de proteínas como NF- κ B, p21 y p16 (Douville *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2005)

En cuanto a la participación de MEOX2 en NSCLC, se ha reportado que en una cohorte de pacientes con NSCLC, aquellos con un bajo enriquecimiento de la histona de represión H3K27me3 en el promotor de MEOX2, tenían una supervivencia media de 6.2 meses y mostraban resistencia al tratamiento con cisplatino, contrario a los pacientes con mayor enriquecimiento de H3K27me3, en secuencias promotoras de MEOX2 quienes poseen supervivencia de 53.4 meses, así como mejor respuesta al tratamiento basado en cisplatino, sugiriendo como MEOX2 participa en promover la quimioresistencia, afectando el mal pronóstico clínico (Ávila-Moreno *et al.*, 2014). Así mismo, en una cohorte de 20 pacientes con NSCLC, MEOX2 posee una mayor expresión con respecto a pacientes sin cáncer (Cortese *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de GLI-1, ocurre dependiente de MEOX2, al ocupar MEOX2 secuencias del promotor del gen GLI-1, contribuyendo al enriquecimiento de las histonas de activación H3K27Ac y H3K4me3, promoviendo tanto la expresión como la participación de GLI-1 en líneas celulares *in vitro* como en pacientes NSCLC, demostrando como MEOX2 participa en la regulación de la vía de señalización de SHH en NSCLC. Así mismo, al silenciar genéticamente a MEOX2 en líneas celulares no mutadas en EGFR (A549 y NH2347), así como en células mutadas en EGFR “T790M” (células H1975), la proliferación celular disminuye significativamente. Mientras que por otro lado, pacientes con adenocarcinoma pulmonar que sobre-expresaban MEOX2 poseen menor supervivencia respecto a pacientes con baja expresión de MEOX2, tanto en ausencia, como en presencia del estatus mutacional para el gen EGFR, sugiriendo como la expresión de genes blanco en tumores NSCLC, es dependiente de la regulación transcripcional y/o epigenética de MEOX2 (Armas-López *et al.*, 2017), mientras que su potencial asociación funcional con la expresión del gen remodelador de la cromatina SMARCB1 en cáncer pulmonar, resulta desconocido por lo que, resulta el objeto de estudio del presente trabajo, como se describe a continuación.

2. Planteamiento del problema

Antecedentes directos señalan como el tratamiento oncológico modifica el paisaje epigenético en genes clave de la oncología pulmonar, entre otros como GLI-1 al influir en el posicionamiento epigenético de factores de transcripción y código de histonas, no obstante se desconocen posibles alteraciones en el posicionamiento de remodeladores de la cromatina y escritores del código de histonas afectando la expresión de genes blanco en cáncer pulmonar, como ha sido sugerido por otros autores, en otros tipos de cáncer, quienes destacan la participación del remodelador de la cromatina SMARCB1, así como el catalizador de la trimetilación EZH2 en los procesos epigenéticos que conducen al cáncer, resaltando la idea que los mecanismos de regulación epigenética representan importantes mecanismos moleculares responsables de la progresión del cáncer. Sin embargo, la modulación ejercida por MEOX2 hacia SMARCB1 y EZH2, y su probable capacidad de modulación sobre la expresión del gen EGFR se desconoce en la actualidad. Por lo que, el presente trabajo se propuso determinar si el posicionamiento de SMARCB1 y EZH2 sobre secuencias genéticas y promotoras del gen EGFR, es modulado por el factor MEOX2, empleando para ello, modelos celulares *in vitro* de cáncer pulmonar de humano, contribuyendo en el entendimiento de MEOX2 como un potencial modulador epigenético-transcripcional de genes blanco en el cáncer pulmonar.

3. Hipótesis

MEOX2 está asociado a la resistencia al tratamiento oncológico en pacientes con cáncer pulmonar, de forma independiente al estatus mutacional del gen EGFR, el estudio de la modulación de MEOX2 en el posicionamiento de los intermediarios epigenéticos SMARCB1 y EZH2 sobre las secuencias promotoras de EGFR, permitirá identificar posibles aberraciones epigenéticas que influyen en la Biología del cáncer pulmonar.

4. Objetivo general

Determinar la participación de MEOX2 en el posicionamiento de las proteínas SMARCB1, EZH2 y código de histonas sobre las secuencias promotoras del gen EGFR modulando su expresión genética en células de cáncer pulmonar.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar cambios en los niveles de expresión de RNA mensajero y proteína de SMARCB1 y EGFR en líneas celulares de NSCLC.
2. Determinar la abundancia relativa de las proteínas de MEOX2 y EZH2 en líneas celulares de cáncer pulmonar.
3. Determinar cambios en el posicionamiento de EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras de EGFR en células de cáncer pulmonar en presencia y ausencia del silenciamiento genético del factor transcripcional MEOX2, mediante análisis de datos ENCODE e inmunoprecipitación de la cromatina.
4. Determinar cambios en el posicionamiento del código de histonas H3K27me3/H3K27Ac versus H3K4me1/3 sobre las secuencias promotoras de EGFR, en presencia y ausencia del silenciamiento genético del factor transcripcional MEOX2.
5. Determinar cambios en la expresión de SMARCB1, EZH2 y EGFR en células de cáncer pulmonar en presencia y ausencia del silenciamiento genético del factor transcripcional MEOX2.

5. Materiales y métodos

Cultivo celular

Se utilizaron líneas celulares de NSCLC con mutaciones en EGFR. NCI-H2347 y A549, expresan la forma silvestre de EGFR, HCC827, con delección del exón 19 (E746-A750) y NCI-H1975 doble mutación (L858R/T790M). Las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest) y penicilina estreptomycin como antibiótico al 1% en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Transfección y silenciamiento genético por shRNAs

Se utilizaron short hairpins de RNAs (shRNAs) dirigidos contra MEOX2 en la línea celular A549. Se cultivaron 3×10^5 células con medio RPMI-1640 y 3% de SFB sin antibiótico, se incubaron en placas de 6 pozos durante 12 horas con un control negativo de transfección estable nombrado Scramble (Scr) y el shRNA-antiMEOX2 (shMx). El silenciamiento se evaluó a las 48 horas de la transfección.

Extracción de RNA total

La extracción del RNA total se realizó utilizando el método de TRIzol (Invitrogen, California, EE. UU.). Las células fueron cosechadas con 500µL de TRIzol, 80µL de cloroformo, 200µL de etanol absoluto, 200µL de etanol al 70% y finalmente el RNA

se resuspendió en 20µL de agua DEPC. La concentración de RNA y la calidad se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000 espectrofotómetro, Thermo Scientific). La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit SuperScript II (RNasa H) (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA total.

RT-qPCR

La retrotranscripción se realizó a partir de 20 ng de cDNA, la cuantificación relativa de SMARCB1, EGFR y GAPDH se realizó mediante SYBR Green (RealQ Plus Master Mix Green) en un volumen total de 15 µL. Además, se realizó un pool de los RNAs totales de las líneas celulares que se consideró como un comparador de expresión entre las líneas celulares. La RT-qPCR se realizó en el equipo LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Alemania). Para el análisis, se realizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, la expresión de los genes se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los ensayos se realizaron por triplicado y el análisis se realizó a partir de la suma de 3 ensayos biológicos independientes. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección de los mRNA de SMARCB1, EGFR y GAPDH se enlista en la tabla 1.

Extracción y cuantificación de proteínas

Se extrajeron las proteínas con 1 mL de PBS y se les agregaron 120 µL de buffer RIPA (Tris pH 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0.1%, EDTA 2 µM) más inhibidor de proteasas (mini complete, Roche, Indianapolis, EE. UU.). Para la

cuantificación de proteínas se utilizó el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) y se leyó a 750 nm en el equipo EPOCH (BioTek).

Western Blot

Se prepararon geles al 10% de poliacrilamida, se cargaron 30µg de proteína total en los pozos del gel, se añadió buffer de corrida y se realizó una electroforesis a 120 volts por 120 minutos. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF (Fluoruro de Polivinilideno) usando el método de transferencia en cámara húmeda a 300mAMP por 120 minutos. Se bloquearon las membranas con TBS 1x-Tween 20 al 0.1% (TBST) con leche (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad) al 2% por dos horas. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó toda la noche a 4°C empleando las siguientes diluciones: EGFR 1:1000 (#ab131498) (Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, R.U.), SMARCB1 1:750 (#GTX12167), EZH2 1:2000 (#GTX82503) (GeneTex, Irvine, California, EE. UU.), MEOX2 1:1500 (#sc-81971), y GAPDH 1:3000 (#sc-25778) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.). Se realizaron tres lavados con TBST por 10 minutos y se incubaron las membranas con TBST, leche al 2% y anticuerpo secundario por dos horas (anti mouse HRP/anti rabbit HRP) 1:10000, se volvieron a realizar tres lavados con TBST y se revelaron las membranas con el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad), los cambios de relación se calcularon utilizando el programa Image Studio.

Visualizador del Epigenoma en Cáncer (Integrative Genomics Viewer)

Se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa IGV para establecer los sitios de enriquecimiento de distintos dominios epigenéticos en EGFR sobre A549 en el genoma de referencia hg19, se seleccionaron 7 regiones (chr7:55035532 a chr7:55143652) para su revisión en genome browser y se utilizó su secuencia para la generación de oligonucleótidos.

Diseño oligonucleótidos

Después de obtener la secuencia del gen, se utilizó el programa Primer3Plus para obtener la secuencia sentido y antisentido de los oligonucleótidos, posteriormente, éstos se evaluaron en NetPrimer para elegir el oligonucleótido con la mayor eficiencia. La secuencia de los oligonucleótidos se enlista en la tabla 2.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión del RNA mensajero.

Gen	Secuencia del oligonucleótido	Producto de PCR en pares de bases (pb)
SMARCB1	Sentido 5'- ACAGTGGAGATTGCCATCCG-3'	129 pb
	Antisentido 5'- ACGCCTCATCCGCCTCGTGT-3'	
EGFR	Sentido 5'- GCGTCTCTTGCCGGAATGT-3'	70 pb
	Antisentido 5'-GGCTCACCTCCAGAAGGTT-3'	
GAPDH	Sentido 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTGAC-3'	119 pb
	Antisentido 5'-GCCCAATACGACCAAATCC -3'	

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las secuencias promotoras del gen EGFR.

Secuencia promotora de EGFR	Secuencia del oligonucleótido	Producto de PCR	Región en el genoma
3-Upstream	Sentido 5'-GCCAAGTTTCAGACAAGTGCC-3' Antisentido 5'-GTGAAACCCTCCTCCTCCAA-3'	126 pb	-51,774 a -51,648 pb
2-Upstream	Sentido 5'-CTGGGTTTGTATGTGGGCAA-3' Antisentido 5'-CGAAGATGAGAGTGGCTGCA-3'	132 pb	-33,573 a -33,441 pb
1-Upstream	Sentido 5'-TGGTAAGCTGAGCTGAAGCC-3' Antisentido 5'-ATTGGTTCTGGCCCACTGAG -3'	120 pb	-23,315 a -23,193 pb
TSS	Sentido 5'-CTCGACCTGGACATAGGCTG-3' Antisentido 5'-GGGTGCCCTGAGGAGTTAAT-3'	101 pb	-336 a -235 pb
1-Downstream	Sentido 5'-AACCGAACATGTGCGCATTTC-3' Antisentido 5'-TGGGCAATCAGTGTGAGTCA-3'	192 pb	36,426 a 36,618 pb
2-Downstream	Sentido 5'-GAGTTCAAGCGTCCCCAGAA-3' Antisentido 5'-TGCCATGCATGTCAAAGCA-3'	116 pb	46,635 a 46,751 pb
3-Downstream	Sentido 5'-ATGTGGGTTTACAGCTGGCC-3' Antisentido 5'-TCTGGAAAGACTTCGGTGGC-3'	119 pb	55,382 a 55,501 pb

Fragmentación de la cromatina

Se añadieron 10 mL de PBS 1X frío al cultivo celular, posteriormente, las células se incubaron con formaldehído al 1% 270 μ L, se añadió glicina al 0.125 M 10 mL y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS 1X frío, se agregaron 5 mL de PBS y se rasparon las células adherentes que fueron transferidas a tubos de 15 mL y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se utilizaron los reactivos del kit EZ-Magna ChIP G (#17-409) (Sigma-Aldrich) y se resuspendió la pastilla celular en 500 μ L de buffer de lisis con 2.5 μ L de inhibidores de proteasas, se incubó en hielo por 15 minutos, moviendo lentamente la muestra cada 5 minutos y se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 500 μ L de buffer de lisis nuclear con 2.5 μ L de inhibidores de proteasas, se incubó en hielo por 15 minutos, moviendo lentamente la muestra cada 5 minutos, se sonicaron (Amplitud 60, Watts 95-100, Número de pulsos 10, por 20 segundos) las muestras y se conservó el sobrenadante en alícuotas de 50 μ L. Se añadieron 5 μ L de proteinasa K (#19131) (Qiagen), se agregó un volumen de fenol:cloroformo, se tomó el sobrenadante y se le agregaron dos volúmenes de isopropanol frío dejando precipitar el DNA toda la noche a -80 °C. Al término de la precipitación, se centrifugó a 13000 rpm por 45 minutos a 4°C, se resuspendió la pastilla de DNA con 300 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, repitiendo este paso dos veces más, al término, se resuspendió la pastilla en 15 μ L de agua DEPC. La pastilla resuspendida sin anticuerpos se utilizó como Input.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se agregó 1 µg de los siguientes anticuerpos: MEOX2 (#ab124876), EZH2 (#ab186006), SMARCB1 (#ab72289), H3K27Ac (#ab4729), H3K4me1 (#ab8895), H3K4me3 (#ab8580) y H3K27me3 (#ab195477) (Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, R.U.), se añadieron 20 µL de perlas magnéticas (#16-662) (Sigma-Aldrich) acopladas a proteína G a 50 µL de cromatina y se incubó toda la noche a 4°C en un mezclador DYNAL a 20 rpm, después, se lavó con 500 µL de los siguientes buffers en orden a 4°C por 5 minutos: Buffer bajo en sales, Buffer alto en sales, Buffer cloruro de litio, Buffer TE. Al término, se agregaron 100 µL de buffer ChIP elución más 1 µL de proteinasa K y se incubó a 62°C por dos horas con movimiento constante, después, se incubó a 95°C por 10 minutos y se esperó a que las muestras estuvieran a temperatura ambiente. Se separaron las perlas magnéticas para utilizar el sobrenadante y se añadieron 500 µL de buffer de unión, se transfirió a una columna con tubo colector para centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto desechando el sobrenadante, posteriormente se añadieron 500 µL de buffer de lavado y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto desechando el sobrenadante, este paso se repitió dos veces más y se agregaron 30 µL de agua DEPC. El DNA inmunoprecipitado (DNA-IP; 20 ng) fue amplificado utilizando el kit Complete Whole Genome Amplification GenomePlex Kit (#WGA2) (Sigma-Aldrich), posteriormente, las muestras fueron cuantificadas en un NanoDrop y se realizó el ChIP-qPCR.

ChIP-qPCR

Los DNA-IPs fueron analizados mediante cuantificación absoluta en qPCR utilizando SYBR Green (RealQ Plus Master Mix Green), el equipo LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Alemania) y oligonucleótidos para las secuencias de interés de EGFR. Se utilizaron 20 ng de DNA-IP por reacción y se realizaron curvas de comparación a través de diluciones de DNA control diploide derivado de sangre periférica mononuclear de donantes sanos (100 ng, 10 ng, 1.0 ng, 0.1 ng y 0.01 ng).

Las condiciones de amplificación se enlistan a continuación:

Tabla 3. Condiciones experimentales del método ChIP-qPCR utilizadas en el equipo de PCR en tiempo real (Light Cycler 480) para el análisis del DNA-IPs de las secuencias promotoras del gen EGFR.

Programación	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	60
Alineamiento	55°C	30 segundos	1
Extensión	72°C	30 segundos	1

Análisis estadístico

Con el objetivo de determinar significancia estadística a nivel experimental fueron empleadas las siguientes pruebas estadísticas, como prueba de ANOVA unidireccional y la prueba t de *Student* para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales incluidos en el presente estudio, considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con $p \leq 0.05$.

6. Resultados

6.1 Análisis de la expresión basal del RNA mensajero y proteína de los genes SMARCB1 y EGFR en líneas celulares de cáncer pulmonar

Con el objetivo de establecer la posible relación en la expresión a nivel del mRNA entre SMARCB1 y EGFR, se llevó a cabo la extracción de RNA total de 4 líneas celulares de cáncer pulmonar (A549, NCI-H2347, NCI-H1975 y HCC827). Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del cDNA y ensayos de RT-qPCR. Así mismo, con el objeto de obtener un grupo control de expresión, se obtuvo una mezcla equimolar de RNA total de las 4 líneas celulares, el cual fue empleado para su análisis como grupo control (MIXCtrl) de expresión relativa entre los diferentes modelos celulares de cáncer pulmonar. En la figura 4, se muestra el nivel de expresión diferencial de los genes SMARCB1 y EGFR entre las diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón. En este sentido, células con mutación en EGFR, NCI-H1975 poseen expresión significativamente mayor de SMARCB1, mientras que en HCC827 los niveles de expresión son significativamente menores. Resultando interesante, como la NCI-H1975 muestra un nivel de expresión significativamente menor de EGFR, mientras que la HCC827 presenta una expresión significativamente mayor de EGFR. Por otro lado, células de cáncer pulmonar libres de mutación en EGFR (A549 y NCI-H2347) poseen expresión significativamente menor de EGFR, con variaciones no significativas en la expresión de SMARCB1.

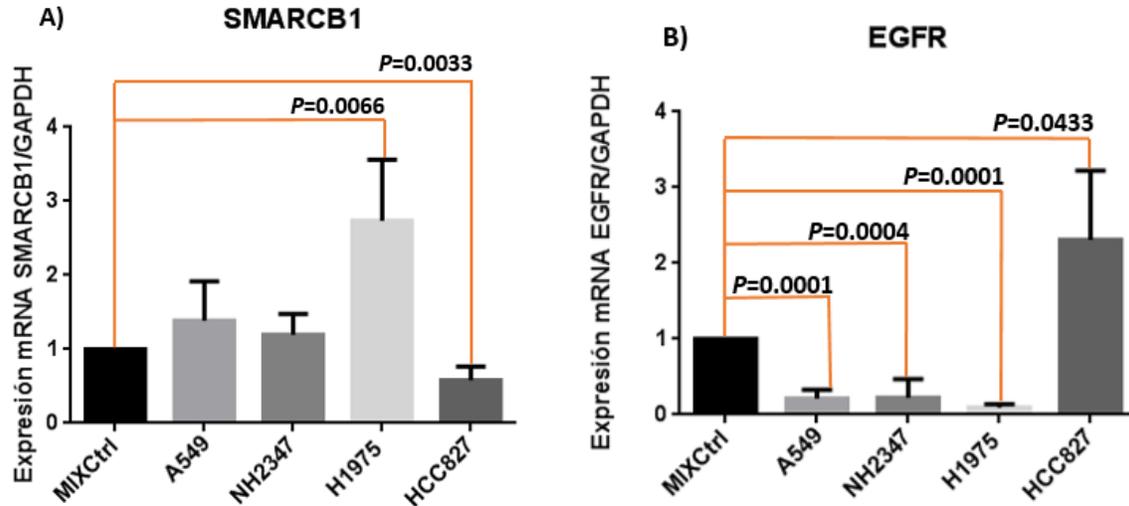


Figura 4. Expresión basal del RNA mensajero de los genes SMARCB1 y EGFR en líneas celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma. La expresión de SMARCB1 (A) y EGFR (B) fue analizada mediante ensayos de RT-qPCR, y normalizada con respecto a GAPDH. El análisis de expresión relativa de manera comparativa se llevó a cabo empleando como control de expresión relativa el pool del mRNA total de las 4 líneas celulares (MIXCtrl). Los niveles de expresión relativa son expresados como el valor de la media \pm D.E., de 3 ensayos biológicos independientes ($n=3$), por triplicado. Se realizó una prueba de t de *Student* para identificar diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las características de los modelos celulares de cáncer pulmonar son los siguientes: células A549 y NCI-H2347 no presentan mutación de EGFR, células NCI-H1975 poseen doble mutación en EGFR conocidas como L858R/T790M, mientras que células HCC827 posee delección en el exón 19 del gen EGFR.

Con el objetivo de determinar los niveles basales de proteína de los genes SMARCB1 y EGFR en células de cáncer pulmonar, se llevó a cabo la extracción y purificación de proteínas para posteriormente realizar ensayos de Western Blot. En la figura 5 se muestra que líneas celulares A549 y NCI-H2347 poseen baja expresión de la proteína SMARCB1 mientras que, muestran una alta expresión de la proteína de EGFR. Así mismo, la expresión de SMARCB1 es significativamente mayor en células NCI-H1975, con respecto a células HCC827. La expresión de EGFR detectada es significativamente menor en células NCI-H1975 con respecto al resto de los modelos celulares, confirmando que a mayor expresión de SMARCB1, los niveles de EGFR disminuyen. Por otro lado, en células HCC827 los niveles de expresión de SMARCB1 detectados son significativamente menores con respecto a NCI-H2347 y NCI-H1975 mientras que, el nivel de expresión de EGFR es significativamente mayor con respecto a células NCI-H1975, estos resultados apoyan la hipótesis donde SMARCB1 ejerce un mecanismo de regulación negativa sobre la expresión de EGFR.

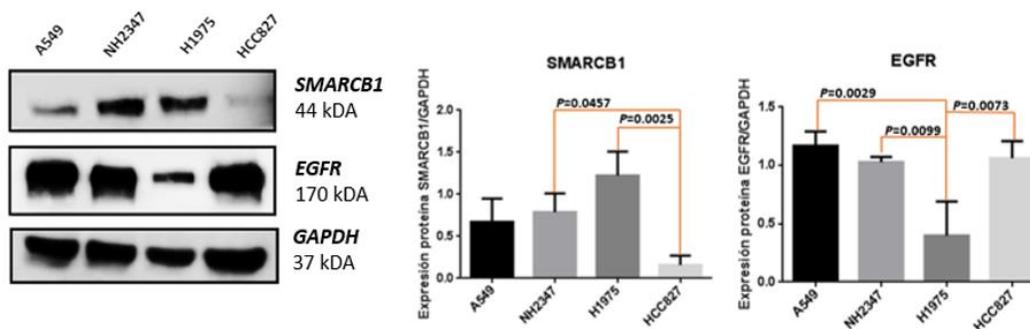


Figura 5. Niveles de proteína de los genes SMARCB1 y EGFR en diferentes células de cáncer pulmonar. Los niveles de proteína de SMARCB1 y EGFR fueron analizados mediante ensayos de Western Blot, y normalizados con respecto al nivel de expresión de GAPDH. Se realizó análisis estadístico mediante prueba de ANOVA unidireccional para encontrar diferencias significativas con ($p \leq 0.05$), entre líneas celulares. Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de 3 ensayos biológicos independientes ($n=3$), por triplicado.

6.2 Análisis del nivel basal de las proteínas MEOX2 y EZH2 en células de cáncer pulmonar

Adicionalmente, se cuantificaron los niveles basales de las proteínas MEOX2 y EZH2, identificando que MEOX2 se expresa en los cuatro modelos celulares con diferencias no significativas. Mientras que, los niveles de EZH2 son detectados en las 4 líneas celulares con bajo nivel estadísticamente significativo en células de cáncer pulmonar HCC827. Resultando importante mencionar la detección de proteína MEOX2 y EZH2 en células A549, identificando además asociación negativa entre SMARCB1 y EGFR, cuyo modelo celular resultó importante para demostrar la correlación funcional entre ambos genes, como hipótesis central del presente trabajo, por lo que, se emplearon células A549 para los diferentes ensayos de silenciamiento genético.

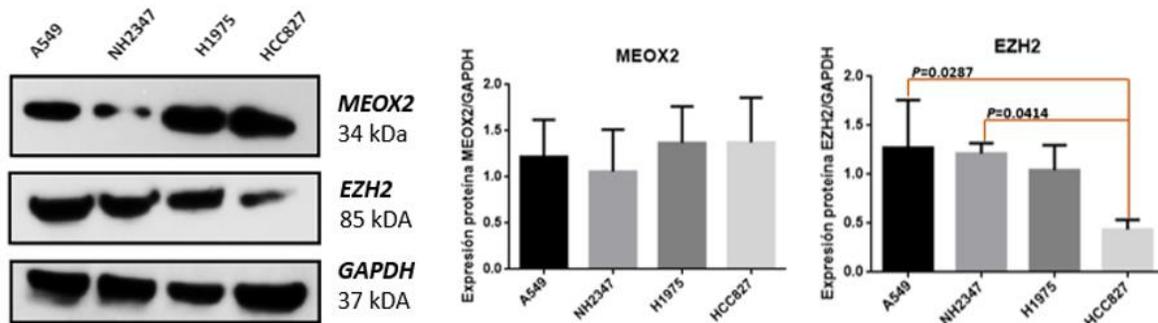


Figura 6. Análisis del nivel de proteína de los genes MEOX2 y EZH2 en células de cáncer pulmonar. Los niveles de proteína de MEOX2 y EZH2 fueron analizados mediante ensayos de Western Blot, y normalizados con respecto al nivel de expresión de GAPDH. Adicionalmente, se realizó análisis estadístico mediante prueba de ANOVA unidireccional identificando diferencias significativas con $p \leq 0.05$, entre líneas celulares. Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de 3 ensayos biológicos independientes ($n=3$), por triplicado.

6.3 Análisis epigenético del código de histonas en las secuencias promotoras del gen EGFR

Con el objetivo de determinar el posicionamiento de las proteínas SMARCB1 y EZH2 sobre la región promotora del gen EGFR, se llevó a cabo análisis *in silico* mediante el uso de programa IGV (ver materiales y métodos), seleccionando el estudio de los dominios epigenéticos en células de cáncer pulmonar A549, cuya información bioinformática se encuentra disponible en la plataforma del proyecto ENCODE y disponible en el programa IGV. Adicionalmente, decidimos analizar información sobre el posicionamiento de SMARCB1, en células HeLa, debido a la falta de información disponible en células A549. Fueron identificados y elegidos 7 regiones genéticas posibles de interacción, así como enriquecimiento de histonas de activación (verde) y marcas de represión (rojo). Así mismo, analizamos el enriquecimiento de marcas histónicas características de secuencias enhancers en preparación H3K4me1 (azul). Adicionalmente, identificamos la interacción de la proteína SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR, así como el posicionamiento de MEOX2 sobre el epigenoma de carcinomas pulmonares derivados de pacientes mestizos mexicanos AEE, GCH y GHM (datos descargados de Armas-López *et al.*, 2017; depositados en doi:10.5061/dryad.rm7dd). Los sitios identificados y elegidos en el genoma humano con potencial de unión y enriquecimiento de marcas de histonas, así como posicionamiento de las proteínas SMARCB1, EZH2 y factor de transcripción MEOX2 abarcaron las siguientes regiones genéticas como se mencionan y describen a continuación: región 3-Upstream localizada entre la posición -51,774 y la base -51,648; región 2-Upstream entre la posición -33,573 y la base -33,441; región 1-Upstream entre la posición -

23,315 y la base -23,193; región TSS entre la posición -336 y la base -235; región 1-Downstream entre la posición 36,426 y la base 36,618; región 2-Downstream entre la posición 46,635 y la base 46,751; por último la región 3-Downstream entre la posición 55,382 y la base 55,501. Con base en lo anterior, nuestro análisis identificó una secuencia de un tamaño total de 107,275 pb (107 Kb), cuya secuencia tan extensa podría participar en la regulación de la expresión del gen EGFR, probablemente bajo la influencia de secuencias de control lejanas al sitio de inicio de la transcripción, así mismo, nuestro análisis *in silico* confirma que las secuencias genéticas del gen EGFR poseen lo que parece ser un súper-enhancer, lo cual será posteriormente abordado en la sección de discusión (Figura 7).

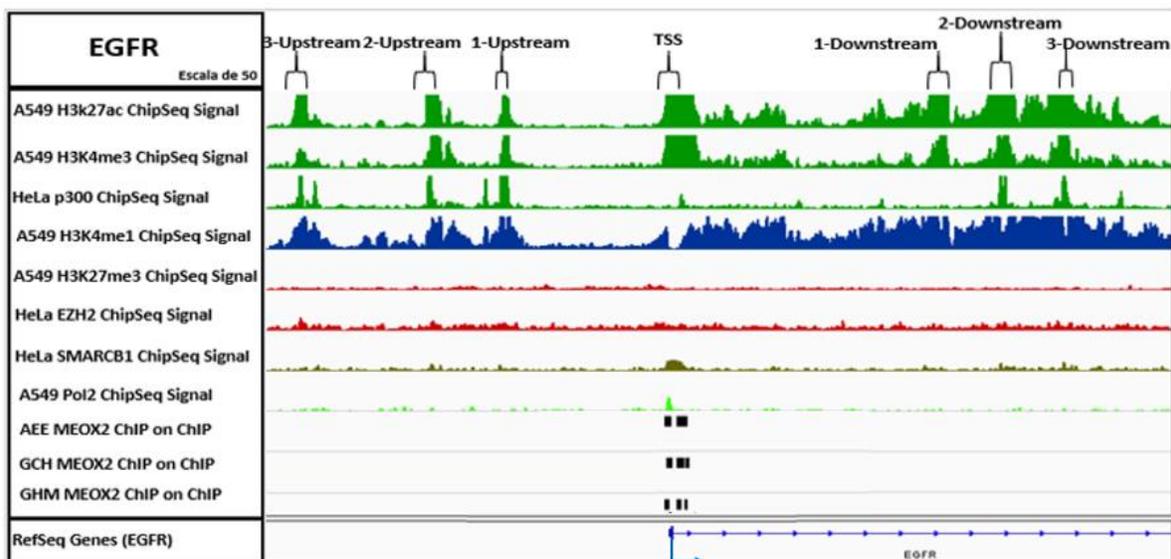
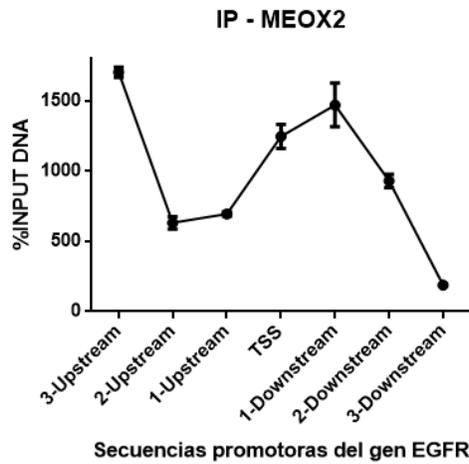


Figura 7. Análisis *in silico* de las secuencias genéticas 5'-upstream a 3'-downstream cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen EGFR, identifica marcas epigenéticas previamente identificadas en células de cáncer pulmonar. Se muestran Secuencias promotoras del gen EGFR que corresponden a células de cáncer pulmonar (A549), cérvico uterino (HeLa) y tumores pulmonares derivados de pacientes. Se muestra análisis y visualización de los dominios epigenéticos mediante el uso del programa o visualizador del genoma llamado Integrative Genomics Browser (IGV).

6.4 Análisis del posicionamiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR

Con el objetivo de identificar el posicionamiento de los factores MEOX2, SMARCB1 y EZH2 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR se realizó fragmentación de la cromatina sobre las células de cáncer pulmonar A549, cultivadas en el pasaje celular 8, a partir del cual se realizaron ensayos de ChIP-qPCR. En la figura 8A, se muestra la detección del factor transcripcional MEOX2 sobre las secuencias promotoras de EGFR, posicionándose con mayor enriquecimiento en las regiones llamadas 3-Upstream y 1-Downstream, así mismo en la figura 8B, se muestra la detección enriquecida de las proteínas EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras de EGFR, en las regiones 3-Upstream y 1-Downstream. Así mismo, la proteína SMARCB1 posee el mayor posicionamiento en todas las regiones genéticas estudiadas del gen EGFR.

A)



B)

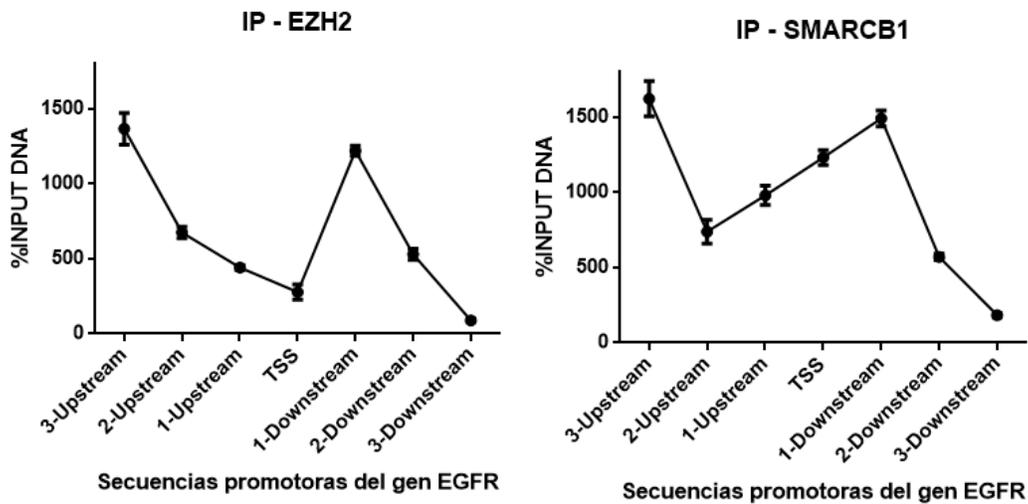


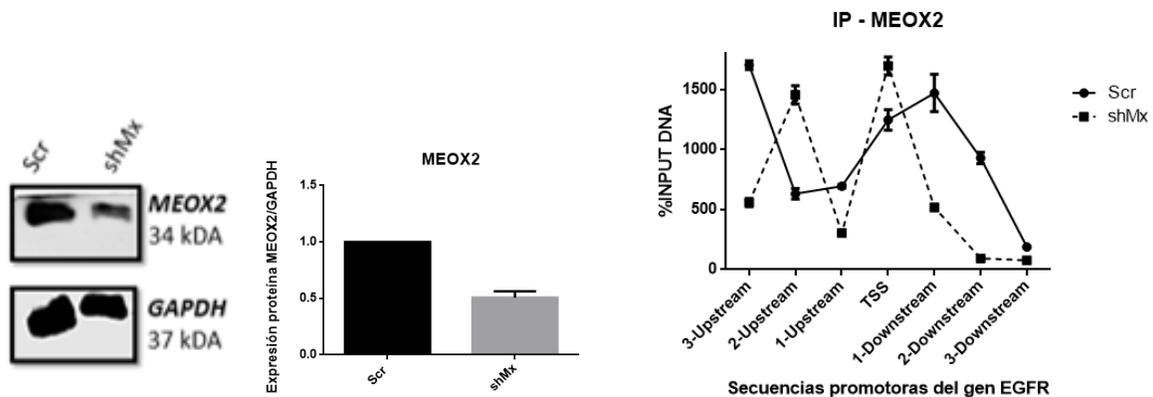
Figura 8. Análisis del enriquecimiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias genéticas y promotoras del gen EGFR, en células de cáncer pulmonar A549. El posicionamiento de MEOX2, EZH2 y SMARCB1 en las diferentes regiones o secuencias genéticas de EGFR fueron analizadas mediante ChIP-qPCR, cuyos valores fueron estimados a partir de su normalización con respecto al DNA-Input (ver materiales y métodos). Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de 3 ensayos biológicos (n=3), por triplicado cada uno.

6.5 El silenciamiento genético de MEOX2 demuestra que MEOX2 modula el posicionamiento y enriquecimiento de las proteínas EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR

Una vez identificado el posicionamiento y enriquecimiento de factores proteicos sobre secuencias genéticas del gen EGFR bajo condiciones basales, se llevaron a cabo ensayos de ChIP-qPCR bajo condiciones de silenciamiento del factor transcripcional MEOX2. Basado en ello, en figura 9A es posible detectar que durante el silenciamiento genético mediante transfección estable con shRNA-antiMEOX2 la disminución de 50% de la proteína MEOX2, cuyo cambio provoca también disminución en el posicionamiento y enriquecimiento del factor MEOX2 en las regiones genéticas de EGFR, exceptuando en las regiones 2-Upstream y TSS donde fue posible detectar aumento, tanto en el enriquecimiento como el posicionamiento de MEOX2. Por otro lado, en figura 9B fue posible detectar que posterior a silenciar MEOX2, el posicionamiento de la proteína EZH2 no adquiere cambios significativos, excepto en las regiones 1-Downstream y 2-Downstream, donde EZH2 disminuye su enriquecimiento. Adicionalmente, fue posible detectar que el silenciamiento de MEOX2, disminuye el enriquecimiento de SMARCB1 exceptuando en la región 2-Upstream. Con base en lo anterior, resulta interesante que bajo condiciones basales y de silenciamiento genético de MEOX2, las regiones 3-Upstream, 2-Upstream y 1-Upstream, las proteínas MEOX2 y SMARCB1 mantengan un patrón de enriquecimiento semejante entre ellos, sugiriendo un co-posicionamiento de ambas proteínas sobre las secuencias promotoras del gen EGFR, confirmando que el factor de transcripción MEOX2 logra afectar el

posicionamiento de EZH2 y SMARCB1 sobre las secuencias promotoras del gen EGFR.

A)



B)

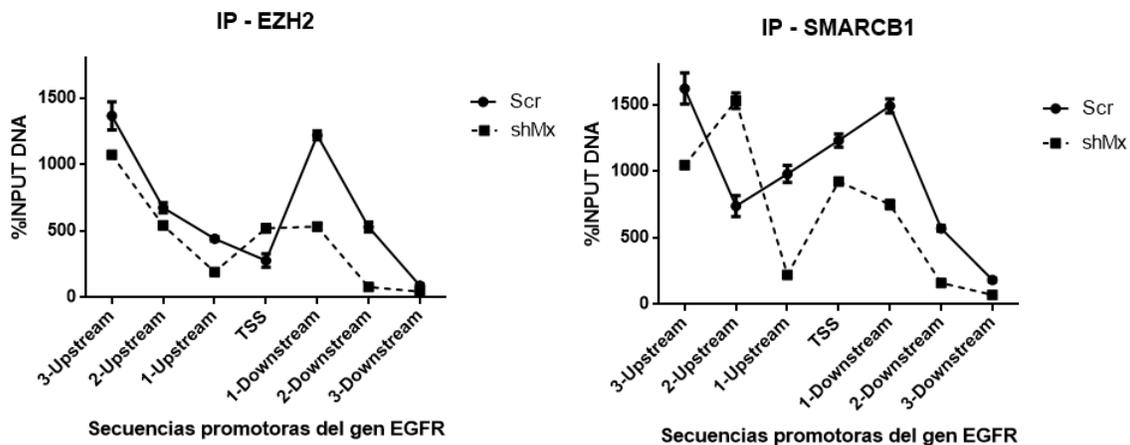
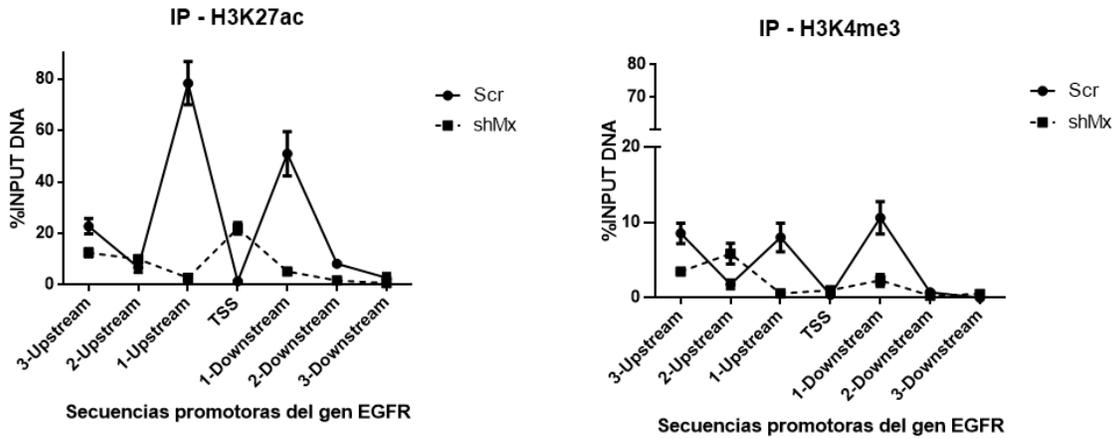


Figura 9. Posicionamiento de las proteínas MEOX2, EZH2 y SMARCB1 sobre secuencias genéticas del gen EGFR, bajo condiciones de silenciamiento del factor MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. El posicionamiento y enriquecimiento de MEOX2 (A), EZH2 y SMARCB1 (B) sobre secuencias genéticas del gen EGFR, analizando para ello, un control negativo de transfección estable nombrado Scramble (Scr), así como el grupo de silenciamiento genético de MEOX2 (shMx), el cual fue analizado mediante ensayos de ChIP-qPCR, y normalizado respecto al DNA-Input. Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de los valores promedio de 3 ensayos biológicos (n=3), por triplicado cada uno.

6.6 MEOX2 modula la escritura o enriquecimiento del código de histonas sobre las secuencias promotoras del gen EGFR

Con el propósito de describir el código de histonas en la región genética estudiada del gen EGFR, se llevaron a cabo ensayos de ChIP-qPCR a partir de inmunoprecipitación de 4 marcas de histonas. En figura 10A se muestran marcas epigenéticas de activación, mostrando que en condiciones basales control, las marcas histónicas H3K27Ac y H3K4me3 se encuentran enriquecidas en las regiones 3-Upstream, 1-Upstream y 1-Downstream; mientras que, como efecto del silenciamiento genético de MEOX2, disminuye el enriquecimiento de las marcas histónicas de activación H3K27Ac y H3K4me3. Cabe mencionar que en la región del TSS y 2-Upstream el enriquecimiento de las histonas de activación H3K27Ac y H3K4me3 aumenta, respectivamente. Por otro lado, en figura 10B es posible detectar que el enriquecimiento de las marcas epigenéticas relacionadas con la represión de la transcripción, como H3K27me3 aumenta posterior al silenciamiento de MEOX2. Adicionalmente, la marca histónica de represión H3K4me1 se encuentra enriquecida en las regiones 3-Upstream, 1-Upstream y 1-Downstream, no obstante, durante el silenciamiento de MEOX2, el enriquecimiento de esta marca de histonas en general disminuye.

A)



B)

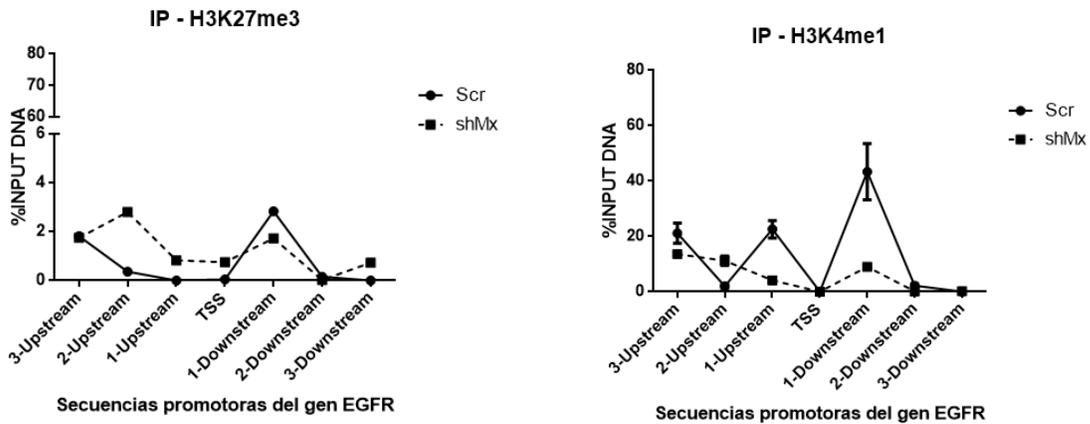


Figura 10. Análisis del enriquecimiento del código histónico sobre secuencias genéticas del gen EGFR, bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. Nuestro análisis del posicionamiento de las marcas H3K27Ac, H3K4me3 (A), H3K27me3 y H3K4me1 (B) sobre las secuencias genéticas del gen EGFR, se llevaron a cabo analizando tanto condiciones basales de control negativo de transfección (Scr), como bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 (shMx) mediante ensayos de ChIP-qPCR, mientras que normalizado con respecto al control de DNA-Input. Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de los valores promedio por triplicado de 3 ensayos biológicos (n=3).

6.7 Detección de alteraciones en los niveles de proteína de EGFR, SMARCB1 y EZH2 bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2

Para evaluar cambios en los niveles de expresión de proteína se llevó a cabo la extracción y purificación de proteínas para posteriormente realizar ensayos de Western Blot bajo la condición de silenciamiento de MEOX2. En figura 11, es posible detectar que el silenciamiento genético de MEOX2, afecta los niveles de expresión de los genes EGFR y SMARCB1 de manera significativa. Por otro lado, es posible detectar aumento no-significativo en la expresión de la proteína represora del complejo Polycomb, EZH2.

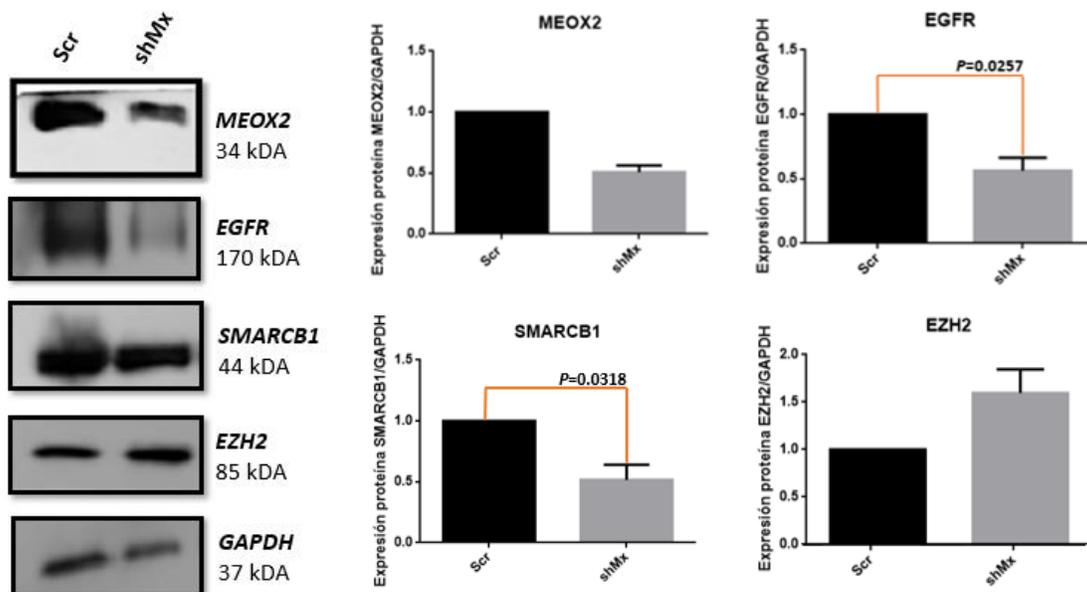
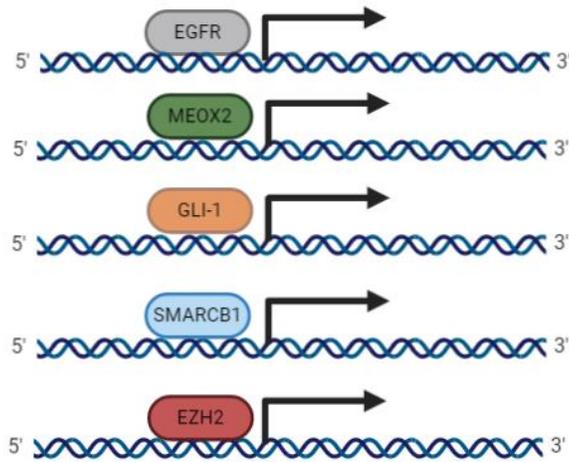


Figura 11. Análisis de los niveles de proteína EZH2, SMARCB1 y EGFR bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. Los niveles de expresión de EZH2, SMARCB1 y EGFR bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 fueron analizadas mediante ensayos de Western Blot, mientras que normalizadas con respecto al grupo control Scr, y gen endógeno de GAPDH. Se realizó una prueba de t de *Student* para encontrar diferencias significativas con $p \leq 0.05$. Los resultados son expresados como la media \pm D.E., de los valores promedio por duplicado de 2 ensayos biológicos independientes (n=2).

6.8 Modelo funcional que propone la interacción de MEOX2, EZH2 y SMARCB1 en la progresión tumoral del cáncer pulmonar

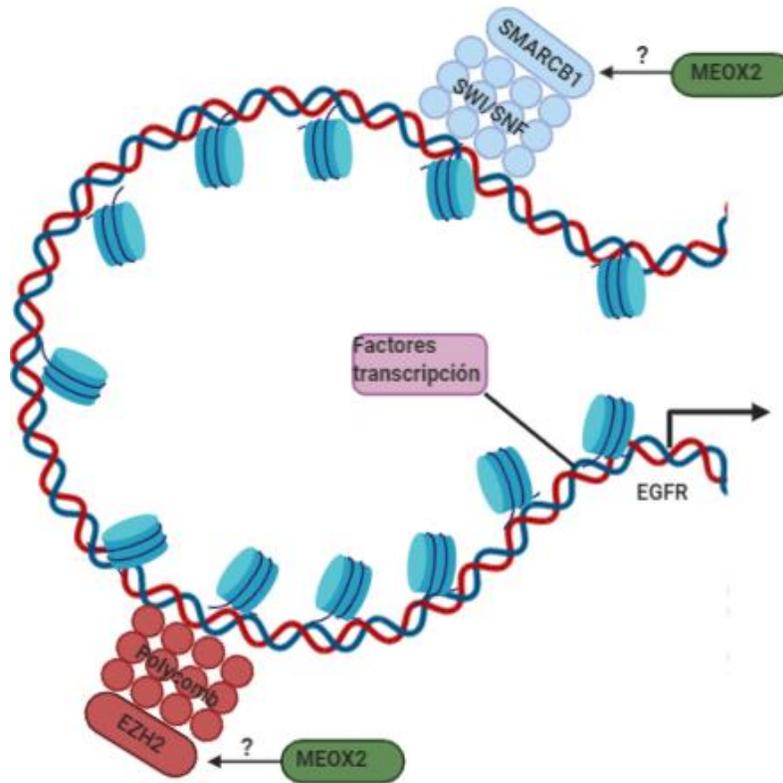
Con el trabajo aquí realizado se propone el siguiente modelo de interacción entre MEOX2, EZH2 y SMARCB1 encontrando que en la figura 11A, se observan de forma lineal genes de interés para la oncología pulmonar. En la figura 11B, se observa la posible interacción entre estos genes en células no tumorales, en donde posiblemente MEOX2 este influenciando la expresión de SMARCB1 y EZH2, SMARCB1 al expresarse de forma normal, facilita el reposicionamiento de los nucleosomas, impidiendo al acceso de factores de transcripción a los promotores de genes blanco, además, la expresión de SMARCB1 se encuentra en competencia con la expresión de EZH2, inhibiendo a este gen, reduciendo la represión de supresores de tumor. Por otro lado, en la figura 11C, se observa la posible interacción entre estos genes en células tumorales, en donde posiblemente MEOX2 este influenciando la expresión de SMARCB1, la disminución en la expresión de SMARCB1 provocaría un descenso en la densidad de los nucleosomas en los promotores de genes blanco, siendo altamente accesibles a factores de transcripción como MEOX2, además, el descenso de SMARCB1 provocaría un aumento en la expresión de EZH2, aumentando la represión de supresores de tumor. Todo esto provocaría un aumento en la activación de la transcripción de genes blanco de la oncología pulmonar, como EGFR.

A)



B)

Células no tumorales



C)

Células Tumorales

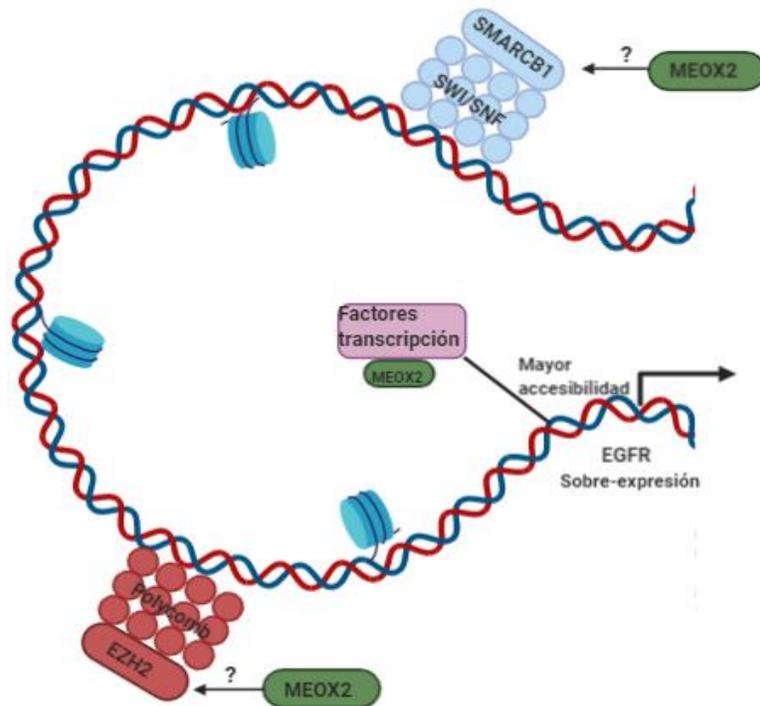


Figura 12. Modelo funcional que propone la interacción entre MEOX2, SMARCB1 y EZH2 sobre el gen EGFR en células normales y progresión del cáncer pulmonar. (A) Esquema lineal de genes blanco para la oncología pulmonar. (B) Esquema de interacción de genes blanco en células no tumorales. (C) Esquema de interacción de genes blanco en células tumorales.

7. Discusión

El cáncer de pulmón es considerado la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, concretamente el NSCLC representa el 80% de todos los casos, encontrándose asociado a mutaciones en supresores de tumor y oncogenes. Particularmente la mutación ocurrida en el gen EGFR se encuentra en el 62% de los casos de NSCLC. Es por ello que entender cómo se lleva a cabo el mecanismo de regulación transcripcional por mecanismos epigenéticos de este gen es de vital importancia para la oncología pulmonar (Zappa y Mousa 2016; Zhang *et al.*, 2018; Siegel *et al.*, 2020).

Se ha propuesto que uno de los reguladores epigenéticos asociados a la transcripción de EGFR, es el remodelador de la cromatina SMARCB1, encontrándose que a menor expresión de SMARCB1, la expresión de EGFR aumenta (Darr *et al.*, 2015). Por otro lado, en NSCLC se ha reportado que EZH2 y EGFR influyen en la oncogénesis (Gong *et al.*, 2019). Adicionalmente, el grupo de investigación ha descrito la posible asociación entre la expresión del factor de transcripción MEOX2 y la respuesta al tratamiento oncológico basado en mutaciones de EGFR en NSCLC (Armas-López *et al.*, 2017).

Con la finalidad de determinar la relación entre SMARCB1 y EGFR, en este trabajo se reportan los niveles de mensajero de ambos genes mediante ensayos de RT-qPCR sobre 4 líneas celulares de NSCLC. Los resultados muestran que la línea celular NCI-H1975 presenta una expresión significativamente mayor de SMARCB1 a nivel de mRNA, además de presentar una expresión significativamente menor de EGFR, en cambio, HCC827 muestra una expresión significativamente menor de SMARCB1 a nivel de mRNA, sin embargo es la que más expresa a EGFR,

concordando con Darr *et al.*, 2015 quienes proponen que en las líneas celulares de tumores rabdoides donde SMARCB1 está inactivo, la expresión de EGFR aumenta y las líneas celulares en donde se expresa a SMARCB1 se muestra disminución en la expresión de EGFR. Esta asociación también se observa en los ensayos de Western Blot, en donde A549 y NCI-H2347 tienen una menor expresión de SMARCB1 y una mayor expresión de EGFR, además, la NCI-H1975 tiene una expresión significativamente mayor de SMARCB1, teniendo a su vez, una expresión significativamente menor de EGFR, confirmando una posible regulación negativa de SMARCB1 en la expresión de EGFR, así mismo, HCC827 tiene una expresión significativamente menor de SMARCB1, mientras que sus niveles de EGFR son significativamente mayores, apoyando la asociación mostrada entre ambos genes (Darr *et al.*, 2015; Della *et al.*, 2017), demostrando por primera vez la regulación negativa que ejerce SMARCB1 sobre EGFR en cáncer de pulmón. Por otro lado describimos que MEOX2 se expresa en las cuatro líneas celulares sin diferencias significativas, semejante a los resultados obtenidos por Ávila-Moreno *et al.*, 2014, quienes reportan que MEOX2 se expresa en líneas celulares de NSCLC. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de proteína de EZH2 encontrando que en las líneas celulares sin mutación en EGFR (A549 y NCI-H2347) los niveles de expresión de EZH2 y EGFR son sinérgicos, concordando con Gong *et al.*, 2019, quienes mencionan que la expresión de ambas proteínas está relacionada con la progresión del cáncer. Por otro lado, HCC827 tiene una expresión significativamente menor de EZH2, siendo esta línea celular la que tiene menor expresión de SMARCB1, no se observa la asociación inversamente proporcional

entre EZH2 y SMARCB1 previamente reportada en tumores rabdoideos (Wilson *et al.*, 2010).

Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* para determinar las secuencias promotoras de EGFR en A549 por medio del programa IGV, encontrando que las marcas de activación se encuentran enriquecidas en zonas cercanas al sitio de inicio de la transcripción y en zonas lejanas al sitio de inicio de la transcripción. Las secuencias de control lejanas al sitio de inicio de la transcripción se encuentran con bajo enriquecimiento en las marcas de represión, evidenciando como EGFR es un gen cuya regulación ve afectada por un súper-enhancer, concordando con los resultados descritos por Yuan *et al.*, 2017, quienes reportaron que el súper-enhancer de EGFR se encuentra activo y con desregulaciones en la línea celular A549. Además, se evaluó el posicionamiento de MEOX2 en tres pacientes diagnosticados con NSCLC sobre las secuencias promotoras de EGFR, encontrando que MEOX2 se posiciona sobre EGFR en secuencias cercanas al sitio de inicio de la transcripción, semejante a lo reportado por Whyte *et al.*, 2013, quienes mencionan que el posicionamiento de factores de transcripción en súper-enhancers promueve la activación.

Posteriormente, se evaluó el posicionamiento de MEOX2, SMARCB1 y EZH2 en las secuencias promotoras de EGFR, en donde se observa que las tres proteínas se posicionan en las secuencias promotoras de EGFR. En este sentido, Armas-López *et al.*, 2017 reportaron que MEOX2 se posiciona en las secuencias promotoras del gen GLI-1 en células de pacientes con NSCLC mutado en EGFR, coincidiendo con el resultado en donde MEOX2 posee la capacidad de posicionarse en secuencias promotoras además de estar relacionado con la expresión epigenética de EGFR.

Por otro lado, se ha reportado que SMARCB1 participa en la unión de enhancers a genes del complejo SWI/SNF, además de estar relacionado con el silenciamiento de súper-enhancers, concordando con lo observado en donde SMARCB1 se posiciona en las secuencias promotoras de EGFR, además, en este trabajo se plantea la posibilidad de que SMARCB1 participe en el silenciamiento del súper-enhancer de EGFR provocando así la relación inversamente proporcional entre ambos genes previamente mencionada (Langer *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018). Así mismo, SMARCB1 se posiciona en secuencias promotoras de GLI-1, regulándolo negativamente, al contrario de MEOX2 que al posicionarse sobre el promotor de GLI-1 aumenta su expresión, haciendo una comparativa con los resultados aquí obtenidos, se plantea la posibilidad de que MEOX2 al posicionarse en EGFR aumente su expresión, mientras que SMARCB1 al posicionarse sobre EGFR disminuya su expresión (Jagani *et al.*, 2010; Armas-López *et al.*, 2017).

Basado en lo anterior, se realizó un ChIP-qPCR de MEOX2, SMARCB1 y EZH2 en condiciones de silenciamiento genético de MEOX2, encontrando reposicionamiento y disminución de las tres proteínas, demostrando como MEOX2 reposiciona a SMARCB1 y EZH2 en las secuencias promotoras de EGFR, sugiriendo una reprogramación epigenética, éstos son los primeros resultados obtenidos hasta el momento sobre la posible interacción de MEOX2 en el reposicionamiento de SMARCB1 y EZH2. Además, MEOX2 y SMARCB1 tienen un patrón similar de posicionamiento en las secuencias promotoras de EGFR en condiciones normales y de silenciamiento, sugiriendo por primera vez un co-posicionamiento de ambas

proteínas, concordando con lo reportado por Weissmiller *et al.*, 2019 quienes mencionan que SMARCB1 interactúa con factores de transcripción.

Por otra parte, se estudió el enriquecimiento de cuatro marcas de histonas en condiciones normales y de silenciamiento de MEOX2 en las secuencias promotoras de EGFR, encontrando que en condiciones normales las histonas de activación, H3K27Ac y H3K4me3 se encuentran enriquecidas en las secuencias promotoras de EGFR mientras que en las histonas de represión, H3K27me3 tiene un bajo enriquecimiento en todas las regiones y la H3K4me1 se enriquece en todas las regiones, por otro lado en condiciones de silenciamiento de MEOX2 el enriquecimiento de las marcas de activación baja, ya que MEOX2 está relacionado epigenéticamente con la escritura de H3K27Ac y H3K4me3, con lo que también disminuiría la expresión de EGFR, los resultados aquí obtenidos sugieren que el posicionamiento de MEOX2 es compatible con una modulación positiva de la transcripción de EGFR (Armas-López *et al.*, 2017), además al silenciar MEOX2, disminuye el posicionamiento de SMARCB1 lo cual también provocaría disminución de H3K27Ac, H3K4me1 y CBP (gen con actividad de acetiltransferasa) (Alver *et al.*, 2017; Fauquier *et al.*, 2018). Por otro lado, el enriquecimiento de la marca de represión H3K27me3 aumenta considerablemente, posiblemente por la disminución de H3K27Ac con lo que disminuiría la competencia por el enriquecimiento en las secuencias promotoras de EGFR, aumentando así la represión del gen (Pasini *et al.*, 2010).

Después de los análisis de ChIP-qPCR, se evaluó la expresión a nivel de proteína de EGFR, SMARCB1 y EZH2 en condiciones de silenciamiento de MEOX2, encontrando que los niveles de EZH2 aumentan mientras que los de SMARCB1 y

EGFR disminuyen significativamente, el aumento en EZH2 puede deberse a la disminución significativa de SMARCB1, al ser genes antagonistas, así mismo la expresión de CBP está relacionada con la expresión de SMARCB1, al disminuir los niveles de esta proteína, disminuirían los niveles de CBP, provocando un aumento en la expresión de EZH2 quién es uno de sus genes antagonistas (Lavarone *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2010). Mientras que la disminución significativa de EGFR, nos indica que la expresión de EGFR está influenciada por la regulación transcripcional y epigenética de MEOX2 en NSCLC.

8. Conclusiones

1. A nivel de expresión del RNA mensajero y proteína existe una relación negativa entre la expresión de SMARCB1 con EGFR en células A549, NCI-H1975 y HCC827 de cáncer pulmonar.
2. MEOX2 y EZH2 se expresan a nivel de proteína en 4 modelos celulares de cáncer pulmonar aquí estudiados, destacando la expresión significativamente menor de EZH2 en células HCC827.
3. Las proteínas de MEOX2, SMARCB1 y EZH2 se posicionan sobre las secuencias promotoras de EGFR en células A549, mientras que al silenciar en 50% a MEOX2, estas proteínas se repositionan y disminuyen su enriquecimiento en las secuencias promotoras de EGFR.
4. El enriquecimiento de las histonas de activación (H3K27Ac y H3K4me3) y de represión (H3K27me3 y H3K4me1) sobre las secuencias promotoras de EGFR, se detectó afectado bajo el silenciamiento genético de MEOX2 donde H3K27Ac, H3K4me3 y H3K4me1 disminuye, mientras que, H3K27me3 aumenta, demostrando como MEOX2 influye en los mecanismos de escritura del código de histonas y por tanto en la activación de la transcripción del gen EGFR.
5. A nivel de proteína, el silenciamiento de MEOX2 promueve aumento en la expresión de EZH2, mientras que disminuye significativamente la expresión de los genes SMARCB1 y EGFR en células de cáncer pulmonar.

9. Perspectivas

1. Demostrar cambios en el código histónico mediante un ChIP-qPCR de la proteína CBP en condiciones normales y de silenciamiento de MEOX2 sobre las secuencias promotoras de EGFR además de un Western Blot de CBP en ambas condiciones en A549.
2. Analizar el efecto del silenciamiento genético en A549 de SMARCB1 para observar cambios en la expresión de EGFR y en el enriquecimiento de histonas de activación y represión en secuencias promotoras de EGFR.
3. Analizar cambios en el epigenoma mediante ensayos de secuenciación masiva en modelos celulares silenciados genéticamente para MEOX2, GLI-1 y SMARCB1.
4. Analizar y/o confirmar el posible fenómeno de interacción proteica entre MEOX2-SMARCB1-EGFR en modelos de progresión tumoral *in vivo* mediante implantación de modelos celulares silenciados genéticamente.

10. Literatura citada

1. Alberg, A.J., Brock, M.V., Ford, J.G., Samet, J.M., Spivack, S.D., 2013. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 143, e1S-e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>
2. Alver, B.H., Kim, K.H., Lu, P., Wang, X., Manchester, H.E., Wang, W., Haswell, J.R., Park, P.J., Roberts, C.W.M., 2017. The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nature Communications* 8, 14648. <https://doi.org/10.1038/ncomms14648>
3. American Cancer Society. [WWW Document] 2014. Oncogenes and tumor suppressor genes. URL <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html> (accessed 15.02.20).
4. Ansari, J., Shackelford, R.E., El-Osta, H., 2016. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. *Transl Lung Cancer Res* 5, 155–171. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.02.02>
5. Armas-López, L., Piña-Sánchez, P., Arrieta, O., de Alba, E.G., Ortiz-Quintero, B., Santillán-Doherty, P., Christiani, D.C., Zúñiga, J., Ávila-Moreno, F., 2017. Epigenomic study identifies a novel mesenchyme homeobox2-GLI1 transcription axis involved in cancer drug resistance, overall survival and therapy prognosis in lung cancer patients. *Oncotarget* 8, 67056–67081. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17715>
6. Arrieta, O., Martínez-Barrera, L., Treviño, S., Guzman, E., Castillo-Gonzalez, P., Rios-Trejo, M.A., Flores-Estrada, D., Téllez, E., Gonzalez, C., de la Cruz Vargas, J., Gonzalez-De la Rosa, C.H., Hernandez-Pedro, N., Morales-Barrera, R., De la Garza, J., 2008. Wood-smoke exposure as a response and survival predictor in erlotinib-treated non-small cell lung cancer patients: an open label phase II study. *J Thorac Oncol* 3, 887–893. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31818026f6>
7. Arrieta, O., Zatarain, L., Aldaco, F., Barron, F., Báez-Saldaña, R., Campos-Gomez, S., Trejo, R., Garza, J., 2019. Lung Cancer in Mexico. *Journal of Thoracic Oncology* 14, 1695–1700. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.05.018>
8. Audia, J.E., Campbell, R.M., 2016. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
9. Ávila-Moreno, F., Armas-López, L., Álvarez-Moran, A.M., López-Bujanda, Z., Ortiz-Quintero, B., Hidalgo-Miranda, A., Urrea-Ramírez, F., Rivera-Rosales, R.M., Vázquez-Manríquez, E., Peña-Mirabal, E., Morales-Gómez, J., Vázquez-Minero, J.C., Téllez-Becerra, J.L., Ramírez-Mendoza, R., Ávalos-Bracho, A., de Alba, E.G., Vázquez-Santillán, K., Maldonado-Lagunas, V., Santillán-Doherty, P., Piña-Sánchez, P., Zúñiga-Ramos, J., 2014. Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis. *PLoS ONE* 9, e114104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114104>
10. Bang, Y.-J., 2011. The potential for crizotinib in non-small cell lung cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol* 3, 279–291. <https://doi.org/10.1177/1758834011419002>
11. Bartlett, C., Stammler, T., Rosson, G.S., Weissman, B.E., 2011. BRG1 Mutations Found in Human Cancer Cell Lines Inactivate Rb-mediated Cell Cycle Arrest. *J Cell Physiol* 226, 1989–1997. <https://doi.org/10.1002/jcp.22533>
12. Berger, S.L., 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412. <https://doi.org/10.1038/nature05915>
13. Besaratinia, A., Pfeifer, G.P., 2008. Second-hand smoke and human lung cancer. *Lancet Oncol.* 9, 657–666. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70172-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70172-4)
14. Blackledge, N.P., Klose, R., 2011. CpG island chromatin. *Epigenetics* 6, 147–152. <https://doi.org/10.4161/epi.6.2.13640>
15. Bracken, A.P., Brien, G.L., Verrijzer, C.P., 2019. Dangerous liaisons: interplay between SWI/SNF, NuRD, and Polycomb in chromatin regulation and cancer. *Genes Dev* 33, 936–959. <https://doi.org/10.1101/gad.326066.119>
16. Brambilla, C., Laffaire, J., Lantuejoul, S., Moro-Sibilot, D., Mignotte, H., Arbib, F., Toffart, A.-C., Petel, F., Hainaut, P., Rousseaux, S., Khochbin, S., de Reyniès, A., Brambilla, E., 2014. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. *Clin. Cancer Res.* 20, 5777–5786. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0459>

17. Brenca, M., Rossi, S., Lorenzetto, E., Piccinin, E., Piccinin, S., Rossi, F.M., Giuliano, A., Dei Tos, A.P., Maestro, R., Modena, P., 2013. SMARCB1/INI1 Genetic Inactivation Is Responsible for Tumorigenic Properties of Epithelioid Sarcoma Cell Line VAESBJ. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 1060–1072. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0005>
18. Brzezińska, E., Dutkowska, A., Antczak, A., 2013. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol. Biol. Rep.* 40, 309–325. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2063-4>
19. Chang, Y.S., Choi, C.-M., Lee, J.C., 2016. Mechanisms of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance and Strategies to Overcome Resistance in Lung Adenocarcinoma. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 79, 248–256. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.4.248>
20. Cheng, J., Blum, R., Bowman, C., Hu, D., Shilatifard, A., Shen, S., Dynlacht, B.D., 2014. A role for H3K4 mono-methylation in gene repression and partitioning of chromatin readers. *Mol Cell* 53, 979–992. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.032>
21. Clapier, C.R., Cairns, B.R., 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>
22. Conde, E., Angulo, B., Izquierdo, E., Paz-Ares, L., Belda-Iniesta, C., Hidalgo, M., López-Ríos, F., 2013. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol* 15, 503–508. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0983-z>
23. Creighton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A., Jaenisch, R., 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21931–21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>
24. Damiani, L.A., Yingling, C.M., Leng, S., Romo, P.E., Nakamura, J., Belinsky, S.A., 2008. Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* 68, 9005–9014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1276>
25. Darr, J., Klochendler, A., Isaac, S., Geiger, T., Eden, A., 2015. Phosphoproteomic analysis reveals Smarcb1 dependent EGFR signaling in Malignant Rhabdoid tumor cells. *Mol Cancer* 14. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0439-5>
26. Deans, C., Maggert, K.A., 2015. What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics* 199, 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
27. Della Corte, C.M., Malapelle, U., Vigliar, E., Pepe, F., Troncone, G., Ciaramella, V., Troiani, T., Martinelli, E., Belli, V., Ciardiello, F., Morgillo, F., 2017. Efficacy of continuous EGFR-inhibition and role of Hedgehog in EGFR acquired resistance in human lung cancer cells with activating mutation of EGFR. *Oncotarget* 8, 23020–23032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15479>
28. Douville, J.M., Cheung, D.Y.C., Herbert, K.L., Moffatt, T., Wigle, J.T., 2011. Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 regulation of the cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p16 in vascular endothelial cells. *PLoS ONE* 6, e29099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029099>
29. Du, H., Che, G., 2017. Genetic alterations and epigenetic alterations of cancer-associated fibroblasts. *Oncol Lett* 13, 3–12. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5451>
30. Ellis, L., Atadja, P.W., Johnstone, R.W., 2009. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1409–1420. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0860>
31. Esteller, M., 2008. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1148–1159. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067>
32. Fauquier, L., Azzag, K., Parra, M.A.M., Quillien, A., Boulet, M., Diouf, S., Carnac, G., Waltzer, L., Gronemeyer, H., Vandel, L., 2018. CBP and P300 regulate distinct gene networks required for human primary myoblast differentiation and muscle integrity. *Scientific Reports* 8, 12629. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31102-4>
33. Furrakh, M., 2013. Tobacco Smoking and Lung Cancer. *Sultan Qaboos Univ Med J* 13, 345–358.

34. Gandara, D.R., Hammerman, P.S., Sos, M.L., Lara, P.N., Hirsch, F.R., 2015. Squamous Cell Lung Cancer: From Tumor Genomics to Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 21, 2236–2243. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3039>
35. Geisler, S.J., Paro, R., 2015. Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development* 142, 2876–2887. <https://doi.org/10.1242/dev.120030>
36. Geller, J.I., Roth, J.J., Biegel, J.A., 2015. Biology and Treatment of Rhabdoid Tumor. *Crit Rev Oncog* 20, 199–216.
37. GLOBOCAN [WWW Document], 2018. Cancer in Mexico. URL <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis> (accessed 15.02.20).
38. Gong, H., Yuan, Y., Li, Yongwen, Zhang, H., Li, Ying, Li, W., Wang, P., Shi, R., Liu, C., Cui, L., Liu, H., Chen, J., 2019. [Role of EZH2 Inhibitor Combined with Gefitinib in EGFR-TKIs Resistant Lung Cancer Cells]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 22, 255–263. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2019.05.01>
39. Guidi, C.J., Sands, A.T., Zambrowicz, B.P., Turner, T.K., Demers, D.A., Webster, W., Smith, T.W., Imbalzano, A.N., Jones, S.N., 2001. Disruption of *Ini1* leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3598–3603. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3598-3603.2001>
40. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
41. Hodges, C., Kirkland, J.G., Crabtree, G.R., 2016. The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026930>
42. Jagani, Z., Mora-Blanco, E.L., Sansam, C.G., McKenna, E.S., Wilson, B., Chen, D., Klekota, J., Tamayo, P., Nguyen, P.T.L., Tolstorukov, M., Park, P.J., Cho, Y.-J., Hsiao, K., Buonamici, S., Pomeroy, S.L., Mesirov, J.P., Ruffner, H., Bouwmeester, T., Luchansky, S.J., Murtie, J., Kelleher, J.F., Warmuth, M., Sellers, W.R., Roberts, C.W.M., Dorsch, M., 2010. Loss of the tumor suppressor *Snf5* leads to aberrant activation of the Hedgehog-Gli pathway. *Nat. Med.* 16, 1429–1433. <https://doi.org/10.1038/nm.2251>
43. Jiang, Y., Jiang, Y.-Y., Xie, J.-J., Mayakonda, A., Hazawa, M., Chen, L., Xiao, J.-F., Li, C.-Q., Huang, M.-L., Ding, L.-W., Sun, Q.-Y., Xu, L., Kanojia, D., Jeitany, M., Deng, J.-W., Liao, L.-D., Soukiasian, H.J., Berman, B.P., Hao, J.-J., Xu, L.-Y., Li, E.-M., Wang, M.-R., Bi, X.-G., Lin, D.-C., Koeffler, H.P., 2018. Co-activation of super-enhancer-driven *CCAT1* by *TP63* and *SOX2* promotes squamous cancer progression. *Nat Commun* 9, 3619. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06081-9>
44. Kadoch, C., Crabtree, G.R., 2013. Reversible disruption of mSWI/SNF (BAF) complexes by the *SS18-SSX* oncogenic fusion in synovial sarcoma. *Cell* 153, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.036>
45. Kalimuthu, S.N., Chetty, R., 2016. Gene of the month: *SMARCB1*. *J Clin Pathol* 69, 484–489. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203650>
46. Katona, B.W., Liu, Y., Ma, A., Jin, J., Hua, X., 2014. EZH2 inhibition enhances the efficacy of an EGFR inhibitor in suppressing colon cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 15, 1677–1687. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.972776>
47. Kawano, O., Sasaki, H., Endo, K., Suzuki, E., Haneda, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Yano, M., Fujii, Y., 2006. *PIK3CA* mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 54, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.07.006>
48. Kim, H., Kwon, Y.M., Kim, J.S., Han, J., Shim, Y.M., Park, J., Kim, D.-H., 2006. Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 107, 1042–1049. <https://doi.org/10.1002/cncr.22087>
49. Kim, K.H., Roberts, C.W.M., 2014. Mechanisms by which *SMARCB1* loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genet* 207, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.04.004>
50. Knutson, S.K., Warholic, N.M., Wigle, T.J., Klaus, C.R., Allain, C.J., Raimondi, A., Porter Scott, M., Chesworth, R., Moyer, M.P., Copeland, R.A., Richon, V.M., Pollock, R.M., Kuntz, K.W., Keilhack, H., 2013. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7922–7927. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303800110>

51. Kohashi, K., Oda, Y., 2017. Oncogenic roles of SMARCB1/INI1 and its deficient tumors. *Cancer Sci* 108, 547–552. <https://doi.org/10.1111/cas.13173>
52. Kulis, M., Esteller, M., 2010. DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* 70, 27–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
53. Langer, L.F., Ward, J.M., Archer, T.K., n.d. Tumor suppressor SMARCB1 suppresses super-enhancers to govern hESC lineage determination. *eLife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.45672>
54. Lau, S.C., Chooback, N., Ho, C., Melosky, B., 2019. Outcome Differences Between First- and Second-generation EGFR Inhibitors in Advanced EGFR Mutated NSCLC in a Large Population-based Cohort. *Clin Lung Cancer* 20, e576–e583. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.05.003>
55. Lavarone, E., Barbieri, C.M., Pasini, D., 2019. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nature Communications* 10, 1679. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09624-w>
56. Le Loarer, F., Zhang, L., Fletcher, C.D., Ribeiro, A., Singer, S., Italiano, A., Neuville, A., Houlier, A., Chibon, F., Coindre, J.-M., Ribonescu, C.R., 2014. Consistent SMARCB1 homozygous deletions in epithelioid sarcoma and in a subset of myoepithelial carcinomas can be reliably detected by FISH in archival material. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 475–486. <https://doi.org/10.1002/gcc.22159>
57. Lee, E.Y.H.P., Muller, W.J., 2010. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>
58. Liam, C.-K., 2019. The role of osimertinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutant non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 11, S448–S452. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.11.45>
59. Liu, P., Wang, Y., Li, X., 2019. Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 9, 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>
60. MacFarlane, L.-A., Murphy, P.R., 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11, 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
61. Maeshima, K., Ide, S., Babokhov, M., 2019. Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Curr. Opin. Cell Biol.* 58, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.003>
62. Margueron, R., Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
63. Markou, A., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulas, V., Lianidou, E.S., 2008. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin. Chem.* 54, 1696–1704. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101741>
64. Martinez-Marti, A., Navarro, A., Felip, E., 2019. Epidermal growth factor receptor first generation tyrosine-kinase inhibitors. *Transl Lung Cancer Res* 8, S235–S246. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.04.20>
65. Miyanaga, A., Gemma, A., Noro, R., Kataoka, K., Matsuda, K., Nara, M., Okano, T., Seike, M., Yoshimura, A., Kawakami, A., Uesaka, H., Nakae, H., Kudoh, S., 2008. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1923–1930. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2140>
66. Mok, T.S., Cheng, Y., Zhou, X., Lee, K.H., Nakagawa, K., Niho, S., Lee, M., Linke, R., Rosell, R., Corral, J., Migliorino, M.R., Pluzanski, A., Sbar, E.I., Wang, T., White, J.L., Wu, Y.-L., 2018. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J. Clin. Oncol.* 36, 2244–2250. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.7994>
67. Momparler, R.L., Ayoub, J., 2001. Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34 Suppl 4, S111-115. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(01\)00397-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(01)00397-x)
68. Narlikar, G.J., Sundaramoorthy, R., Owen-Hughes, T., 2013. Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. *Cell* 154, 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.011>

69. National Cancer Institute (NCI) [WWW Document], 2015. National Institutes of Health (NIH). URL <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci> (accessed 15.02.20).
70. Ozaki, T., Nakagawara, A., 2011. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* 3, 994–1013. <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>
71. Patel, S., Leal, A.D., Gorski, D.H., 2005. The homeobox gene *Gax* inhibits angiogenesis through inhibition of nuclear factor-kappaB-dependent endothelial cell gene expression. *Cancer Res.* 65, 1414–1424. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3431>
72. Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H.R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O.N., Helin, K., 2010. Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res* 38, 4958–4969. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq244>
73. Peng, Y., Zhang, Y., 2018. Enhancer and super-enhancer: Positive regulators in gene transcription. *Animal Models and Experimental Medicine* 1, 169–179. <https://doi.org/10.1002/ame2.12032>
74. Poynter, S.T., Kadoch, C., 2016. Polycomb and trithorax opposition in development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 659–688. <https://doi.org/10.1002/wdev.244>
75. Rajdev, K., Siddiqui, A.H., Ibrahim, U., Patibandla, P., Khan, T., El-Sayegh, D., 2018. An Unusually Aggressive Large Cell Carcinoma of the Lung: Undiagnosed until Autopsy. *Cureus* 10, e2202. <https://doi.org/10.7759/cureus.2202>
76. Ray, P., Tan, Y.S., Somnay, V., Mehta, R., Sitto, M., Ahsan, A., Nyati, S., Naughton, J.P., Bridges, A., Zhao, L., Rehemtulla, A., Lawrence, T.S., Ray, D., Nyati, M.K., 2016. Differential protein stability of EGFR mutants determines responsiveness to tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget* 7, 68597–68613. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11860>
77. Roberts, C.W.M., Biegel, J.A., 2009. The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. *Cancer Biol Ther* 8, 412–416.
78. Roberts, C.W.M., Leroux, M.M., Fleming, M.D., Orkin, S.H., 2002. Highly penetrant, rapid tumorigenesis through conditional inversion of the tumor suppressor gene *Snf5*. *Cancer Cell* 2, 415–425. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00185-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00185-x)
79. Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., Wistuba, I.I., 2016. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat. Res.* 170, 25–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2
80. Saad, I.I., Saha, S.B., Thomas, G., 2014. The RAS subfamily Evolution – tracing evolution for its utmost exploitation. *Bioinformation* 10, 293–298. <https://doi.org/10.6026/97320630010293>
81. Schneider, R., Grosschedl, R., 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21, 3027–3043. <https://doi.org/10.1101/gad.1604607>
82. Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N., Cavalli, G., 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 799–814. <https://doi.org/10.1038/nrm3230>
83. Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., Haber, D.A., 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 169–181. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>
84. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
85. Sigismund, S., Avanzato, D., Lanzetti, L., 2018. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 12, 3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
86. Simon, J.A., Lange, C.A., 2008. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat. Res.* 647, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010>
87. Soca-Chafre, G., Hernández-Pedro, N., Aviles-Salas, A., Versón, C.A., Sánchez, K.C., Cardona, A.F., Avila-Moreno, F., Barrios-Bernal, P., Flores-Estrada, D., Arrieta, O., 2018. Targeted next generation sequencing identified a high frequency genetic mutated profile in wood smoke exposure-related lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget* 9, 30499–30512. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25369>

88. Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K.H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B.C., Cheng, Y., Cho, E.K., Voon, P.J., Planchard, D., Su, W.-C., Gray, J.E., Lee, S.-M., Hodge, R., Marotti, M., Rukazenkov, Y., Ramalingam, S.S., FLAURA Investigators, 2018. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 378, 113–125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>
89. Stamatakis, D., Kastrinaki, M.-C., Mankoo, B., Pachnis, V., Karagogeos, D., 2001. Homeodomain proteins Mox1 and Mox2 associate with Pax1 and Pax3 transcription factors. *FEBS letters* 499, 274–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02556-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02556-X)
90. Tacha, D., Yu, C., Bremer, R., Qi, W., Haas, T., 2012. A 6-Antibody Panel for the Classification of Lung Adenocarcinoma Versus Squamous Cell Carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology* : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry 20, 201–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31823d7f0e>
91. Takeshima, H., Ushijima, T., 2019. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *npj Precision Oncology* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0>
92. Tam, I.Y.S., Chung, L.P., Suen, W.S., Wang, E., Wong, M.C.M., Ho, K.K., Lam, W.K., Chiu, S.W., Girard, L., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Wong, M.P., 2006. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin. Cancer Res.* 12, 1647–1653. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1981>
93. Tiana, M., Acosta-Iborra, B., Puente-Santamaría, L., Hernansanz-Agustin, P., Worsley-Hunt, R., Masson, N., García-Rio, F., Mole, D., Ratcliffe, P., Wasserman, W.W., Jimenez, B., del Peso, L., 2018. The SIN3A histone deacetylase complex is required for a complete transcriptional response to hypoxia. *Nucleic Acids Res* 46, 120–133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx951>
94. Toyooka, S., Mitsudomi, T., Soh, J., Aokage, K., Yamane, M., Oto, T., Kiura, K., Miyoshi, S., 2011. Molecular oncology of lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 59, 527–537. <https://doi.org/10.1007/s11748-010-0743-3>
95. Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D.B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P.S., Henderson, D.W., Kerr, K.M., Nakatani, Y., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E., Tsao, M., 2013. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European respiratory society classification. *Archives of pathology & laboratory medicine* 137, 685–705. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0264-RA>
96. Wajapeyee, N., Malonia, S.K., Palakurthy, R.K., Green, M.R., 2013. Oncogenic RAS directs silencing of tumor suppressor genes through ordered recruitment of transcriptional repressors. *Genes Dev* 27, 2221–2226. <https://doi.org/10.1101/gad.227413.113>
97. Wang, S., Cang, S., Liu, D., 2016. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 9. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0268-z>
98. Wang, S.E., Narasanna, A., Perez-Torres, M., Xiang, B., Wu, F.Y., Yang, S., Carpenter, G., Gazdar, A.F., Muthuswamy, S.K., Arteaga, C.L., 2006. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* 10, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.023>
99. Wang, X., Lee, R.S., Alver, B.H., Haswell, J.R., Wang, S., Mieczkowski, J., Drier, Y., Gillespie, S.M., Archer, T.C., Wu, J.N., Tzvetkov, E.P., Troisi, E.C., Pomeroy, S.L., Biegel, J.A., Tolstorukov, M.Y., Bernstein, B.E., Park, P.J., Roberts, C.W.M., 2017a. SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat Genet* 49, 289–295. <https://doi.org/10.1038/ng.3746>
100. Wang, X., Lee, R.S., Alver, B.H., Haswell, J.R., Wang, S., Mieczkowski, J., Drier, Y., Gillespie, S.M., Archer, T.C., Wu, J.N., Tzvetkov, E.P., Troisi, E.C., Pomeroy, S.L., Biegel, J.A., Tolstorukov, M.Y., Bernstein, B.E., Park, P.J., Roberts, C.W.M., 2017b. SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat Genet* 49, 289–295. <https://doi.org/10.1038/ng.3746>

101. Wee, P., Wang, Z., 2017. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>
102. Weissman, B., Knudsen, K.E., 2009. Hijacking the chromatin remodeling machinery: impact of SWI/SNF perturbations in cancer. *Cancer Res.* 69, 8223–8230. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2166>
103. Weissmiller, A.M., Wang, J., Lorey, S.L., Howard, G.C., Martinez, E., Liu, Q., Tansey, W.P., 2019. Inhibition of MYC by the SMARCB1 tumor suppressor. *Nature Communications* 10, 2014. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10022-5>
104. Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., Young, R.A., 2013. Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes. *Cell* 153, 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
105. Wilson, B.G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E.S., Lemieux, M.E., Cho, Y.-J., Koellhoffer, E.C., Pomeroy, S.L., Orkin, S.H., Roberts, C.W.M., 2010. Epigenetic antagonism between Polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18, 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.006>
106. Xi, S., Xu, H., Shan, J., Tao, Y., Hong, J.A., Inchauste, S., Zhang, M., Kunst, T.F., Mercedes, L., Schrupp, D.S., 2013. Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 1241–1261. <https://doi.org/10.1172/JCI61271>
107. Xu, B., Konze, K.D., Jin, J., Wang, G.G., 2015. Targeting EZH2 and PRC2 dependence as novel anticancer therapy. *Exp. Hematol.* 43, 698–712. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.05.001>
108. Yang, J.C.-H., Wu, Y.-L., Schuler, M., Sebastian, M., Popat, S., Yamamoto, N., Zhou, C., Hu, C.-P., O'Byrne, K., Feng, J., Lu, S., Huang, Y., Geater, S.L., Lee, K.Y., Tsai, C.-M., Gorbunova, V., Hirsh, V., Bennouna, J., Orlov, S., Mok, T., Boyer, M., Su, W.-C., Lee, K.H., Kato, T., Massey, D., Shahidi, M., Zazulina, V., Sequist, L.V., 2015. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 16, 141–151. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71173-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71173-8)
109. Yoshida, K., Fujiwara, Y., Goto, Y., Kohno, T., Yoshida, A., Tsuta, K., Ohe, Y., 2018. The first case of SMARCB1 (INI1) - deficient squamous cell carcinoma of the pleura: a case report. *BMC Cancer* 18, 398. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4321-x>
110. Yuan, C., Hu, H., Kuang, M., Chen, Z., Tao, X., Fang, S., Sun, Y., Zhang, Y., Chen, H., 2017. Super enhancer associated RAI14 is a new potential biomarker in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 8, 105251–105261. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22165>
111. Zappa, C., Mousa, S.A., 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 5, 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
112. Zhang, S., Li, M., Ji, H., Fang, Z., 2018. Landscape of transcriptional deregulation in lung cancer. *BMC Genomics* 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4828-1>