



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE
RESISTENCIA A LAS TERAPIAS ANTI-EGFR
ASOCIADA AL FENOTIPO MESENQUIMAL
EN EL CÁNCER PULMONAR**

Programa de Doctorado en Fisiología

Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia

Tesis doctoral presentada por:
Miguel Aupí Ferrando

Dirigida por:
Julián Carretero Asunción

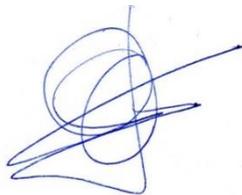
Junio de 2020

D. **Julian Carretero Asunción**, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada “MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE RESISTENCIA A LAS TERAPIAS ANTI-EGFR ASOCIADA AL FENOTIPO MESENQUIMAL EN EL CÁNCER PULMONAR”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Miguel Aupí Ferrando**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a 23 de junio de 2020.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Julian Carretero Asunción

Resumen

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en los países occidentales. Es resistente a la terapia convencional, metastásico y con una tasa de supervivencia a 5 años del 15%. Las mejoras del diagnóstico genético, junto con los últimos avances en el diseño de inhibidores (generalmente de proteínas quinasas), han proporcionado un beneficio clínico significativo para un subconjunto de pacientes de adenocarcinoma pulmonar (AC) cuyos tumores tienen mutaciones activadoras en genes que codifican proteínas críticas para la progresión tumoral como EGFR. Los inhibidores dirigidos contra el dominio tirosina quinasa (ITQs) de EGFR de 1ª generación erlotinib y gefitinib han demostrado una eficacia clínica sin precedentes para el tratamiento del AC pulmonar con *EGFR* mutado. Sin embargo, los pacientes inevitablemente sufren una recaída por la aparición de resistencia debida a múltiples mecanismos moleculares. Algunos tumores adquieren nuevas mutaciones en EGFR (T790M), pero el osimertinib, un ITQ de 3ª generación recientemente aprobado, supera esta resistencia, si bien estos pacientes también recaerán. Una fracción significativa de pacientes muestran signos de activación de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), un programa transcripcional caracterizado por la represión de la cadherina epitelial (CDH1) y la expresión de marcadores mesenquimales y factores de transcripción como ZEB1 y SNAI1. La EMT está involucrada en la metástasis de los carcinomas y la resistencia a los fármacos antitumorales. Por desgracia, no hay terapias efectivas disponibles para bloquear el fenotipo EMT.

La EMT media transiciones reversibles entre múltiples estados celulares a través de mecanismos epigenéticos complejos. Sin embargo, en el contexto del AC EGFR mutante con resistencia adquirida al osimertinib, no hay estudios sistemáticos dicha reprogramación epigenética en modelos celulares de AC pulmonar resistentes al osimertinib dirigidos por la EMT. El objetivo general de

la tesis es identificar los mecanismos epigenéticos que controlan el proceso EMT. Para generar modelos celulares de AC pulmonar resistentes al osimertinib utilizamos un amplio panel de líneas celulares EGFR mutantes que fueron expuestos a concentraciones crecientes del ITQ. Estos modelos mostraron evidencias moleculares de activación del fenotipo EMT. Paralelamente, un metanálisis de datos genómicos publicados identificó reguladores epigenéticos que podrían dirigir el fenotipo EMT en líneas celulares y pacientes con AC pulmonar resistente a los ITQs, como CRABP2 y KDM6B. Los estudios funcionales utilizando ARNi, la transducción lentiviral e inhibidores específicos permitieron caracterizar la contribución de estos factores epigenéticos al fenotipo resistente al osimertinib, dando lugar a nuevos biomarcadores de respuesta a los ITQs y a dianas moleculares que podrían servir para diseñar nuevas estrategias terapéuticas que retrasen la adquisición de la resistencia a los ITQs, aumentando su beneficio clínico en pacientes de AC pulmonar.

Índice

Lista de Figuras	8
Lista de tablas	13
Abreviaturas	14
Introducción.....	16
1. El cáncer es una enfermedad genética	16
1.1. Fisiopatología del cáncer.....	18
1.1.1 Epigenética del cáncer	25
1.2. Cáncer de pulmón.....	31
1.2.1 Clasificación histológica del cáncer de pulmón.....	32
1.2.2 Estadios y evolución clínica del cáncer de pulmón	35
1.2.3 Etiología del cáncer de pulmón	36
1.2.4 Genética del cáncer de pulmón no microcítico.....	38
1.2.5 Epigenética del cáncer de pulmón	48
1.2.6 Tratamientos farmacológicos para el CPNM.....	52
1.2.7 Mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR	64
2. Transición epitelio-mesenquimal	67
2.1 EMT y cáncer	70
2.1.1 Activación del programa EMT	72
2.1.2 Regulación transcripcional y plasticidad del programa EMT	74
2.1.3 Invasión-metástasis y fenotipo CSC inducido por EMT	80
2.1.1 Resistencia a fármacos y EMT	83
2.1.2 Resistencia a los ITQs de EGFR inducida por la EMT en el CPNM	84
Hipótesis y objetivos.....	89
Material y métodos.....	90
1. Modelos experimentales	90
2. Cultivos celulares.....	91
3. Estudios de proliferación y viabilidad celulares	92

4. Estudio de la citotoxicidad celular: Método de la sulforodamina B	93
5. Análisis de expresión proteica mediante <i>western blot</i>	94
5.1 Extracción de proteínas	94
5.2 Electroforesis y transferencia	95
5.3 Inmunodetección	96
6. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR	98
6.1. Extracción de ARN	99
6.2. Síntesis del ADNc	99
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa	100
7. Análisis de la regulación de la expresión génica mediante ChIP ..	102
7.1. Preparación de la muestra.....	102
7.2. ChIP.....	103
7.3. qPCR del ChIP	104
8. Ensayo de inmunoprecipitación (IP)	105
8.1. Preparación de la muestra.....	105
8.2. IP	106
9. Estudios de transducción génica con construcciones lentivirales ..	107
9.1 Producción de partículas virales.....	107
9.1.1 Obtención de los plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento	109
9.2 Transducción viral.....	109
10. Ensayos de formación de colonias	110
11. Silenciamiento génico mediante siRNA	110
12. Análisis estadístico	112
13. Análisis bioinformáticos	112
Resultados y Discusión	114
1. Desarrollo y caracterización de los modelos experimentales de AC pulmonar con EGFR mutado resistentes al osimertinib	114
2. Búsqueda de nuevos mecanismos epigenéticos de resistencia adquirida a los ITQs asociados a EMT	118
2.1 Integración de datos transcriptómicos y metilación global del ADN.	
118	

2.2 Validación de la proteína CRABP2 como potencial biomarcador y regulador del fenotipo mesenquimal ITQ-resistente.....	125
3. Relación funcional entre CRABP2, la EMT y la resistencia a ITQs	135
4. Validación funcional de la relación entre los receptores nucleares RAR, la EMT y la resistencia a ITQs.....	145
5. Modificaciones de histonas en la EMT asociada a la resistencia a ITQs	154
5.1 Identificación de moduladores epigenéticos asociados al fenotipo mesenquimal y resistente a los ITQs.....	154
5.2 Validación funcional de la relación entre KDM6A y B, la EMT y la resistencia a los ITQs	161
Conclusiones	181
Bibliografía	183

Lista de Figuras

Figura 1. Características funcionales del cáncer..	19
Figura 2. Esquema resumen de los distintos remodeladores de la cromatina.....	27
Figura 3. Esquema representativo de las distintas CpGs y su localización.....	29
Figura 4. Número de casos nuevos y de mortalidad por cáncer a nivel mundial. El cáncer pulmonar presenta la mayor incidencia y mortalidad a nivel global.	31
Figura 5. Estimación de la incidencia de cáncer de pulmón en ambos sexos a nivel mundial.....	32
Figura 6. Porcentaje de las distintas clases y subtipos histológicos de cáncer de pulmón.....	34
Figura 7. Porcentaje de las distintas mutaciones conductoras que puede atribuirse a la herencia genética, a errores en la replicación del ADN o a factores ambientales para cada tipo de cáncer.	37
Figura 8. Oncogenes frecuentemente mutados en el cáncer de pulmón no microcítico.....	41
Figura 9. Vías de señalización intracelular de los receptores con actividad tirosina quinasa.	43
Figura 10. Principales mecanismos de resistencia a los ITQs de EGFR descritos en el CPNM con EGFR mutado.	65
Figura 11. Esquema de las distintas fases de transición del programa EMT.....	69
Figura 12. Modelización de la plasticidad del programa EMT asociada a las modificaciones epigenéticas de genes epiteliales en modelos experimentales de carcinoma mamario.	72
Figura 13. Vía de señalización del TGF-beta.	73
Figura 14. Esquema resumen del programa EMT y su regulación transcripcional.	77
Figura 15. Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas.....	91

Figura 16. Curvas de citotoxicidad de las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib.	115
Figura 17. Expresión de marcadores EMT en las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib.	116
Figura 18. Efecto del TGFβ1 como inductor de EMT en líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado.	117
Figura 19. Integración de los datos de proteómica, transcriptómica y metilación del ADN.	120
Figura 20. Integración de los niveles de metilación de ADN con los genes sobreexpresados y reprimidos en los modelos mesenquimales resistentes a los ITQs.	121
Figura 21. Representación de los niveles de metilación del ADN en las distintas regiones del genoma y en las distintas CpGs en los modelos de resistencia a los ITQs.	123
Figura 22. Firmas de enriquecimiento funcional asociadas a los genes reprimidos-hipermetilados y sobreexpresados-hipometilados de los modelos resistentes a los ITQs.	125
Figura 23. Expresión de CRABP2 en líneas celulares con <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT.	127
Figura 24. Análisis de la correlación entre los niveles de expresión de CRABP2 y los genes epiteliales y mesenquimales en las líneas celulares (<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>) y pacientes (TCGA) de AC pulmonar.	129
Figura 25. Expresión de CRABP2 y de marcas EMT en líneas celulares de AC pulmonar.	130
Figura 26. Expresión de <i>CYP26A1</i> y <i>HOXA1</i> en líneas celulares <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT.	131
Figura 27. Imágenes de la morfología de las líneas celulares <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT con y sin adapaleno.	133
Figura 28. Efecto del adapaleno sobre la proliferación de células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT.	134

Figura 29. Expresión de marcadores EMT tras la sobreexpresión de CRABP2 en líneas mesenquimales resistentes al osimertinib.	135
Figura 30. Expresión de marcadores EMT tras la represión de CRABP2 en líneas parentales <i>EGFR</i> mutantes de AC pulmonar.	136
Figura 31. Modulación de los niveles de CRABP2 y sensibilidad al osimertinib en líneas celulares de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado ITQ-sensibles o resistentes.	138
Figura 32. Ensayo de proliferación y viabilidad celular en presencia de adapaleno en líneas celulares de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado y sobreexpresión o represión ectópicas de CRABP2.....	139
Figura 33. Expresión de los RARs en líneas celulares de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado y ITQ-sensibles o resistentes con fenotipo EMT.....	141
Figura 34. Expresión de los receptores nucleares RAR y genes diana de la vía del AR en las células H1975 ITQ-sensibles o resistentes con fenotipo EMT.	143
Figura 35. Represión de RARG mediante shRNAs en líneas parentales de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado.	145
Figura 36. Expresión de marcadores EMT tras la represión de RARG en líneas parentales AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado.....	146
Figura 37. Efecto de la represión de RARG sobre la sensibilidad al osimertinib en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado.	147
Figura 38. Efecto de la represión de RARG sobre la sensibilidad al adapaleno en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado.	148
Figura 39. Expresión de RARB tras su represión mediante shRNAs en líneas parentales <i>EGFR</i> mutantes de AC pulmonar ITQ-resistentes.	149
Figura 40. Expresión de marcadores EMT tras la represión de RARB en líneas parentales <i>EGFR</i> mutantes de AC pulmonar ITQ-resistentes.	149
Figura 41. Efecto de la represión de RARB sobre la sensibilidad al osimertinib en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado ITQ-resistentes.....	151
Figura 42. Efecto de la represión de RARB sobre la sensibilidad al adapaleno en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado ITQ-resistentes.....	151

Figura 43. Ensayo de proliferación y viabilidad celular tras la infección transitoria con lentivirus que incorporan shRNAs dirigidos contra los receptores nucleares de RARA, RARB y RARG.	153
Figura 44. Interacción entre los receptores nucleares RAR y las desmetilasas de histona KDM6A y KDM6B.	156
Figura 45. Perfil de metilación de histona H3 a nivel global en líneas de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib.	157
Figura 46. Analisis de CHIP de genes epiteliales y mesenquimales en líneas de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib.	158
Figura 47. Expresión de las enzimas moduladoras de la marca de metilación de H3K27 en líneas celulares <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib. .	160
Figura 48. Efecto citotóxico del inhibidor de KDM6 GSK-J4 en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib y con fenotipo EMT.....	162
Figura 49. Efecto del inhibidor de KDM6 sobre la expresión de marcadores y la marca de metilación de H3K27 en líneas celulares de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT.	163
Figura 50. Expresión de KDM6A y KDM6B tras su represión mediante shRNAs en células de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado H1975 resistentes al osimertinib.	165
Figura 51. Expresión de marcadores EMT tras la represión de KDM6B en varias líneas celulares de AC pulmonar con <i>EGFR</i> mutado y resistentes al osimertinib.	166
Figura 52. Sensibilidad al osimertinib de las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado y resistentes al osimertinib cuando se reprime KDM6B.	167
Figura 53. Ensayo de CHIP para KDM6A y KDM6B y análisis de su unión a las regiones promotoras de genes de la firma EMT en el modelo celular de AC pulmonar con EGFR mutado H1975.	169
Figura 54. Expresión de los marcadores EMT y de enzimas moduladoras de la metilación de H3K27 en células HCC827 parentales tratadas con GSK-J4.	171

Figura 55. Expresión de los marcadores EMT y la marca H3K27me3 en células HCC827 parentales tratadas con TGFβ1 en combinación con los inhibidores GSK-J4 y GSK-126.172

Figura 56. Expresión de los marcadores EMT en la línea celular de AC pulmonar con EGFR mutado HCC827 tratada con TGFβ1 en combinación con el GSK-J4.174

Figura 57. Sensibilidad al osimertinib de las células de AC pulmonar con EGFR mutado HCC827 tratadas con TGFβ1, GSK-J4 y GSK-126.175

Figura 58. Curvas de adquisición de resistencia al osimertinib en monoterapia o en combinación con el inhibidor de KDM6 GSK-J4 en líneas parentales de AC pulmonar con *EGFR* mutado.177

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación actual del cáncer de pulmón con los componentes TMN....	36
Tabla 2: Líneas celulares de CPNM empleadas como modelos de sensibilidad y resistencia a los ITQs de EGFR y su perfil mutacional.....	90
Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios empleados para <i>western blot</i>.	96
Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios empleados para <i>western blot</i>.	97
Tabla 5. Lista de reactivos para la formación de ADNc.	100
Tabla 6. Lista de reactivos para la PCR.....	100
Tabla 7. Lista primers empleada para ensayos de RT-PCR.....	101
Tabla 8. Lista primers empleada para ensayos de qPCR ChIP.	104
Tabla 9. Lista de reactivos para la formación de lentivirus.....	108
Tabla 10. Reactivos empleados para el silenciamiento transitorio de CRABP2. .	111

Abreviaturas

AC	Adenocarcinoma
AR	Ácido retinoico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina bovina sérica
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCG	Carcinoma de células grandes
CDH1	E-cadherina
CDH2	N-cadherina
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CpGs	Dinucleótidos de citosina y guanina unidos por un grupo fosfato
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
CRABP2	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2</i>
CSC	Célula madre tumoral
DNMT	ADN metiltransferasa
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
EPCAM	molécula de adhesión celular epitelial
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FT	Factor de transcripción
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona deacetilasa
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ITQ	Inhibidor de tirosina quinasa
KDM6A	<i>Lysine demethylase 6A</i>
KDM6B	<i>Lysine demethylase 6B</i>
LSD1	Demetilasa de lisina específica 1
MET	Transición mesenquimal-epitelial
miRNA	microARN

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PRC2	Complejo represor <i>Polycomb 2</i>
p/v	Peso/volumen
RAR	Receptor del ácido retinoico
RB1	Proteína del retinoblastoma 1
RXR	Receptor retionide X
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TTF-1	Factor de transcripción del tiroides
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIM	Vimentina
v/v	Volumen/volumen

Introducción

1. El cáncer es una enfermedad genética

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas con el crecimiento celular descontrolado, llegando a formar una masa anormal de tejido, denominada tumor o neoplasia, que en su expansión puede destruir y sustituir a los tejidos normales. Cuando adquieren la capacidad de diseminarse e invadir tejido circundante, alcanzar el torrente sanguíneo o linfático y metastatizar órganos distantes se denominan tumores malignos. (Wallace, 1995). El cáncer es capaz de aparecer prácticamente en cualquier lugar del organismo, y se origina a partir de la mayoría de tipos celulares, agrupando así a más de 100 enfermedades con diversos factores de riesgo y distintas características genéticas y fenotípicas (Sporn, 1991).

El principal criterio para clasificar el cáncer es en función del tipo celular a partir del cual se origina. El carcinoma es el tipo más frecuente y se origina a partir de células epiteliales. Estas son células que tapizan la superficie de glándulas y órganos. Los sarcomas son tumores que derivan de células de tejido conectivo o conjuntivo, del que derivan los huesos, los músculos, los cartílagos, etc. Leucemias, linfomas y mielomas se originan a partir de los precursores hematopoyéticos, y los neuroblastomas y gliomas de células del sistema nervioso.

Con el paso del tiempo la definición de cáncer se ha ido actualizando desde que Theodor Boveri propuso que la división celular descontrolada del cáncer estaba causada por alteraciones cromosómicas (Boveri 1902). De tal modo, actualmente definimos al cáncer como una enfermedad genética, en la que las células tumorales adquieren diversos cambios o mutaciones en su secuencia de ADN que son las responsables de una serie de propiedades y funciones, como aportar

un aumento de la capacidad de proliferación y de supervivencia, que suponen una ventaja frente a las células no tumorales vecinas, ya que permiten a las células tumorales la evasión de los mecanismos homeostáticos tisulares. No obstante, los agentes etiológicos que provocan estas mutaciones somáticas (es decir, la relación causal entre factores ambientales y las alteraciones genéticas producidas durante la replicación del ADN en las células somáticas) siguen siendo objeto de controversia (Garraway, Stratton, Campbell et al. 2009, Lander 2013).

Desde 1761 cuando John Hill demostró la correlación entre el cáncer nasal y el tabaco en polvo, junto a numerosos estudios epidemiológicos posteriores, el papel que juegan los factores ambientales en la carcinogénesis es bien conocido (Hill 1761, Pott 1775). La importancia de la herencia genética se ha confirmado en estudios con gemelos y mediante la identificación de distintos genes que predisponen a la aparición de ciertos síndromes que incrementan la predisposición al desarrollo de cánceres. Por otra parte, los estudios genómicos más recientes han demostrado que los errores en la replicación del ADN juegan un papel clave en la aparición de mutaciones oncogénicas, estimando que la media de las alteraciones genéticas causadas por factores ambientales ronda el 23% (siendo más del 60% en cáncer de pulmón, piel o esófago), mientras que solo un 5% es debida a la herencia genética y hasta un 66% a errores en la replicación del ADN (Tomasetti, Li et al. 2017).

Independientemente del tipo de mutación (cambios de bases, inserciones, deleciones, translocaciones), las mutaciones somáticas del genoma tumoral se pueden clasificar en función de cómo influyen sobre la carcinogénesis. Es decir, no todas las alteraciones genéticas presentes en el tumor afectan al desarrollo del cáncer; es más, hay algunas que no contribuyen. Por tanto, se pueden diferenciar en mutaciones pasajeras y mutaciones conductoras. Las primeras no aportan una

ventaja al crecimiento del tumor y por tanto no se seleccionan positivamente pues no tienen consecuencias funcionales para la célula. Sin embargo, las mutaciones conductoras sí que se seleccionan positivamente durante la evolución tumoral debido a que aportan una ventaja en el desarrollo del tumor, y cuando una célula adquiere una mutación conductora mantendrá las mutaciones pasajeras que presentaba en ese momento durante la expansión clonal (Stratton, Campbell et al. 2009). Aquellos genes implicados en la regulación del crecimiento, la diferenciación o la muerte celular, cuando se ven afectados por mutaciones conductoras y como consecuencia de estas, se activan constitutivamente (dando lugar a una ganancia de función), reciben el nombre de protooncogenes, y una vez mutados se les denomina oncogenes, ya que ejercen una función protumoral. Sin embargo, en aquellos genes que ejercen un papel regulador negativo de las funciones protumorales, las mutaciones son inactivadoras y por lo tanto producen una pérdida de la función antitumoral, recibiendo el nombre de genes supresores tumorales (Macleod 2000).

1.1. Fisiopatología del cáncer

Tal y como hemos introducido en la sección anterior, el cáncer es una consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas que conducen en última instancia a la desregulación de las rutas de transducción de señales y el ciclo celular, así como la activación o represión aberrante de diversos programas transcripcionales a través de complejos cambios epigenéticos. Estos aportan distintas características fenotípicas, necesarias para la transformación de una célula normal a una tumoral, generando estímulos que permitan su proliferación de forma descontrolada, y provocando que se vuelvan altamente dependientes o adictas a determinados reguladores de la expresión génica, que son los que mantienen el desarrollo del tumor y aportan las características funcionales del

cáncer. Las células evolucionan progresivamente a un estado neoplásico mediante distintos pasos, en los que van adquiriendo estas características funcionales que les permiten transformarse en tumorigénicas y en última instancia, en malignas y metastásicas.

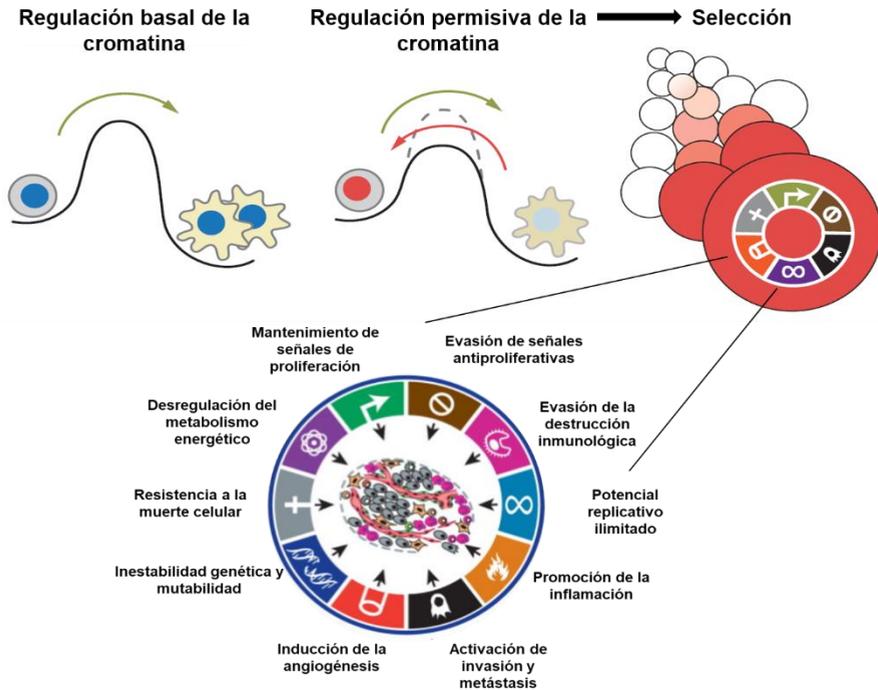


Figura 1. Características funcionales del cáncer. Adaptado de (Hanahan, Weinberg 2011; Flavahan 2017). Al diagrama resumen de las características funcionales del cáncer se ha añadido la dimensión epigenética (esto es, la remodelación de la cromatina) dada su importancia en esta tesis doctoral, como veremos más adelante.

Las características funcionales del cáncer que definen y explican su fisiopatología fueron clasificadas por Hanahan y Weinberg, a continuación, haremos una breve descripción de cada una de ellas (Hanahan, Weinberg 2011) (Figura 1):

- a) **Activación y mantenimiento de las señales de proliferación.** Podría decirse que es el rasgo fundamental de las células tumorales, permitiendo el

mantenimiento de la proliferación de forma crónica mediante distintas señales de proliferación. Las células normales presentan un control estricto de la producción y liberación de señales que promueven y regulan el crecimiento para asegurar la homeostasis celular, manteniendo la estructura normal del tejido y su función. En cambio, en las células tumorales este control de las señales de proliferación se ve alterado o incluso suprimido. De este modo, son capaces de mantener las señales de proliferación de varias formas: bien secretando los propios ligandos del factor de crecimiento de forma autocrina o de forma alternativa enviando señales para estimular las células normales presentes en el estroma tumoral que a su vez estimulan posteriormente a las células tumorales manteniendo las señales proliferativas en este caso de forma paracrina (Cheng 2008, Bhowmick 2004). Las células tumorales también son capaces de desregular las señales de los receptores de membrana implicados en las señales de proliferación, bien elevando los niveles de proteínas de los receptores, provocando que las células puedan dar una respuesta mayor ante cantidades limitantes del factor de crecimiento, o mediante alteraciones estructurales causadas por mutaciones activadoras provocando la activación de forma constitutiva de los receptores o de los diversos componentes que hay por debajo de estos en las rutas de señalización celular.

- b) **Evasión de las señales antiproliferativas.** Las células tumorales, además de mantener activas las señales de proliferación, también necesitan tener la capacidad de bloquear los programas y señales que regulan de forma negativa el crecimiento, que normalmente dependen de la acción de genes supresores de tumores. Existen numerosos genes supresores de tumores que se han descubierto y validado a lo largo del tiempo, demostrando su capacidad de inhibir y limitar la proliferación celular. Los dos supresores de tumores más conocidos y que más frecuente se encuentran inactivos en el

cáncer humano son: el gen *RBI* (proteína del retinoblastoma) (Burkhart, Sage 2008) y el gen *TP53* (Greenblatt, Bennet et al. 1994). La proteína RB integra las señales inhibitoras del crecimiento procedentes tanto de fuera como del interior de la célula, permitiendo así regular el ciclo celular y la proliferación. *TP53* se encarga de recibir señales de estrés y cualquier señal anormal dentro del interior de la célula, como puede ser el daño excesivo del genoma, o si los niveles de glucosa y señales promotoras del crecimiento están por debajo de los valores óptimos. En función de la gravedad de estas señales *TP53* puede detener la progresión del ciclo celular hasta que estas condiciones se normalicen o bien desencadenar la apoptosis celular en caso de que se genere un daño irreparable. (Sherr, and McCormick 2002).

- c) **Resistencia a la muerte celular.** La muerte celular programada por apoptosis se ha demostrado que sirve como una barrera natural frente al desarrollo del tumor. (Adams and Cory, 2007; Lowe et al., 2004; Evan and Littlewood, 1998). Distintas señales son capaces de inducir la apoptosis, como desequilibrios de señalización causados por oncogenes, el daño provocado en el ADN a causa de una hiperproliferación, la falta de nutrientes, etc. Las células tumorales desarrollan una gran variedad de estrategias para limitar o evadir la apoptosis. La más común es la pérdida de la función del gen supresor tumoral *TP53*, quitando así este sensor de daño crítico del circuito inductor de la apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares al aumentar la expresión de los reguladores antiapoptóticos (*BCL-2*, *BCL-XL*) y regular a la baja los factores proapoptóticos (*BAX*, *BIM*, *PUMA*) (Adams and Cory, 2007, Willis and Adams, 2005). Los múltiples mecanismos que tienen las células tumorales para evadir la apoptosis refleja la diversidad de señales pro y antiapoptóticas que son capaces de modular a lo largo de su evolución.

- d) **Inflamación que promueve el tumor.** La inflamación puede contribuir en el desarrollo del tumor mediante múltiples mecanismos al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluidos los factores de crecimiento que sostienen la señalización proliferativa, los factores de supervivencia que limitan la muerte celular, los factores proangiogénicos, las enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, y la inducción de señales que conducen a la activación de otros programas que favorecen el desarrollo tumoral. (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010; Karnoub and Weinberg, 2006–2007; Rajendra Karki 2019).
- e) **Potencial de replicación celular ilimitado.** La mayoría de las células del cuerpo solo pueden pasar a través de un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Esta limitación se ha asociado con la senescencia, un estado no proliferativo pero viable prácticamente irreversible y posteriormente por una fase de crisis que implica la muerte celular.

Múltiples trabajos evidencian que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas están involucrados en el control de la capacidad de proliferación ilimitada (Blasco, 2005; Shay y Wright, 2000). Los telómeros, se acortan progresivamente en las células no inmortalizadas, perdiendo finalmente la capacidad de proteger los extremos del ADN cromosómico de las fusiones de extremo a extremo, generando cromosomas dicéntricos inestables que amenazan la viabilidad celular.

La telomerasa, se encarga de agregar segmentos repetidos de telómero a los extremos del ADN telomérico, está casi ausente en las células no inmortalizadas, pero se expresa a niveles significativos en la gran mayoría (90%) de las células inmortalizadas como son las células tumorales. Al

extender el ADN telomérico, la telomerasa puede contrarrestar la erosión progresiva de los telómeros que de otro modo ocurriría en su ausencia. La presencia de actividad de la telomerasa, se correlaciona con una resistencia tanto a la inducción de senescencia como de crisis/ apoptosis confiriendo una capacidad de replicación ilimitada. (Raynaud, Hernandez et al. 2010).

- f) **Angiogénesis.** Al igual que un tejido normal, los tumores requieren aportes constantes de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar cualquier desecho metabólico y el dióxido de carbono para su adecuado mantenimiento. La neovascularización asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos como la curación de heridas y el ciclo endometrial, la angiogénesis se activa, pero solo de manera transitoria. Sin embargo, durante la progresión del tumor, un "interruptor angiogénico" casi siempre se activa y permanece encendido, lo que hace que de la vascularización normalmente inactiva broten continuamente nuevos vasos que ayudan a mantener y expandir el crecimiento del tumor (Hanahan and Folkman, 1996). El inductor de angiogénesis mejor conocido es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), involucrado en orquestar el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario y postnatal, y luego en la supervivencia homeostática de las células endoteliales, así como en situaciones fisiológicas y patológicas en el adulto. La expresión génica de VEGF está regulada positivamente en el microambiente tumoral tanto por hipoxia como por señalización de oncogenes (Ferrara, 2009; Mac Gabhann and Popel, 2008; Carmeliet, 2005).
- g) **Invasión y metástasis.** A medida que los carcinomas derivados de los tejidos epiteliales progresan a grados patológicos de mayor malignidad, las células tumorales asociadas generalmente desarrollan alteraciones en su

morfología, así como en su unión a otras células y a la matriz extracelular. De este modo, las células del tumor primario van adquiriendo la capacidad de propagarse y diseminar. El proceso de invasión y metástasis se ha esquematizado como una secuencia de pasos discretos, a menudo denominada la cascada de invasión-metástasis (Talmadge and Fidler, 2010; Fidler, 2003). Este modelo, prevé una sucesión de cambios biológicos en las células tumorales durante los distintos pasos, comenzando por una invasión local seguido de la intravasación en vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, a través de los que circulan para posteriormente anidar en el parénquima de tejidos distantes, para formar pequeños nódulos (micrometástasis) y proliferar generando tumores macroscópicos.

- h) **Inestabilidad genética y mutabilidad.** La adquisición de las múltiples características funcionales del cáncer depende en gran parte de una sucesión de alteraciones genómicas que dan un aumento de la tasa de mutaciones oncogénicas. (Negrini et al., 2010; Salk et al., 2010). Esta mutabilidad se debe a una mayor sensibilidad a los agentes mutagénicos, que provocan la descomposición de uno o varios componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico, siendo TP53 clave en la estabilidad del genoma. (Lane, 1992; Jackson and Bartek, 2009; Kastan, 2008; Sigal and Rotter, 2000). Además, la pérdida de ADN telomérico genera inestabilidad cariotípica en muchos tumores y la amplificación y eliminación de segmentos cromosómicos (Artandi y DePinho, 2010).
- i) **Evasión de la destrucción inmunológica.** En la mayoría de tumores es posible encontrar infiltraciones de células inmunitarias, en mayor o menor medida. El sistema inmunitario funciona como una barrera importante para la formación y progresión del tumor, al menos en algunos tipos de cáncer (Teng et al., 2008; Kim et al., 2007). Sin embargo, las células tumorales son

capaces de escapar de la acción del sistema inmunitario, bien evitando ser detectados o frenando la destrucción mediada por linfocitos T citotóxicos. Este último mecanismo de evasión inmunitaria es una diana terapéutica de las nuevas inmunoterapias basadas en la interacción PD1/PDL1 y que han logrado buenas respuestas terapéuticas en tumores de mal pronóstico, como el cáncer de pulmón y el melanoma avanzado (Vinay, Ryan et al. 2015).

- j) **Desregulación del metabolismo energético.** La proliferación celular descontrolada implica un aumento del metabolismo tumoral y de las necesidades energéticas que permitan mantener el crecimiento y la división celular. Otto Warburg observó por primera vez una característica anómala del metabolismo energético de las células tumorales en comparación con los tejidos normales (Warburg, 1930, 1956a, 1956b): incluso en presencia de oxígeno, las células tumorales pueden reprogramar el metabolismo de glucosa y, por lo tanto, su producción de energía, limitando en gran medida su metabolismo energético únicamente a la vía de la glucólisis, una ruta energéticamente poco eficiente comparada con la fosforilación oxidativa. El aumento de la glucólisis permite el desvío de metabolitos intermediarios hacia diversas vías biosintéticas, incluidas las que generan nucleótidos, lípidos y aminoácidos; esto facilita, a su vez, la biosíntesis de las macromoléculas y orgánulos necesarios para aumentar la masa celular y permitir la proliferación celular activa (Vander Heiden et al., 2009).

1.1.1 Epigenética del cáncer

Como hemos descrito en el apartado anterior, Hanahan y Weinberg determinaron de forma clara un conjunto de capacidades biológicas que deben adquirirse para el desarrollo de un cáncer humano. Estas características distintivas enmarcan los esfuerzos para definir los mecanismos por los cuales las células y los ecosistemas tumorales progresan a través de etapas malignas posteriores. En gran parte, estos

mecanismos están fundamentalmente dirigidos por alteraciones genéticas. Sin embargo, las alteraciones generalizadas en el estado de la cromatina, la metilación del ADN y la expresión génica sugieren que las alteraciones epigenéticas también juegan un papel esencial en la carcinogénesis, ya que muchos tumores exhiben programas transcripcionales aberrantes que son un indicativo del bloqueo de los patrones de diferenciación y la reprogramación epigenética (Baylin 2011; Suvà 2013; Timp 2013; Comet 2016). En los últimos años, Flavahan, Gaskell y Bernstein describieron la epigenética del cáncer como otra característica funcional del cáncer por su papel clave como regulador transcripcional, integrando estímulos genéticos, ambientales y metabólicos específicos que alteran el equilibrio homeostático de la cromatina, haciendo que se vuelva permisiva o restrictiva de forma aberrante (Flavahan 2017) (Figura 1).

La Epigenética es la disciplina que aborda los cambios de fenotipo que no son causados por cambios en el genotipo, es decir, estudia las modificaciones reversibles y hereditarias implicadas en la regulación de la expresión génica sin alteraciones de la secuencia del ADN, sino mediante modificaciones covalentes de la cromatina. Los mecanismos epigenéticos controlan la activación o la represión de los genes, realizando así la regulación transcripcional del genoma que determina la identidad o linaje de cada tipo celular (Berger 2009; Andreoli 2013; Allis 2016).

La metilación del ADN es la marca epigenética mejor conocida, ejerce un papel clave en la arquitectura de la cromatina y por tanto también en la regulación de la expresión génica. Las marcas de metilación del ADN afectan a las citosinas de los dinucleótidos (CpGs), y se localizan en regiones del ADN conocidas como islas CpG, enriquecidas especialmente en las regiones promotoras de los genes (Weber 2007) (Figura 2). Cuando las islas CpGs de un determinado promotor

están metiladas, el gen se encuentra reprimido, y cuando se desmetilan pasa a un estado activo y transcribible.

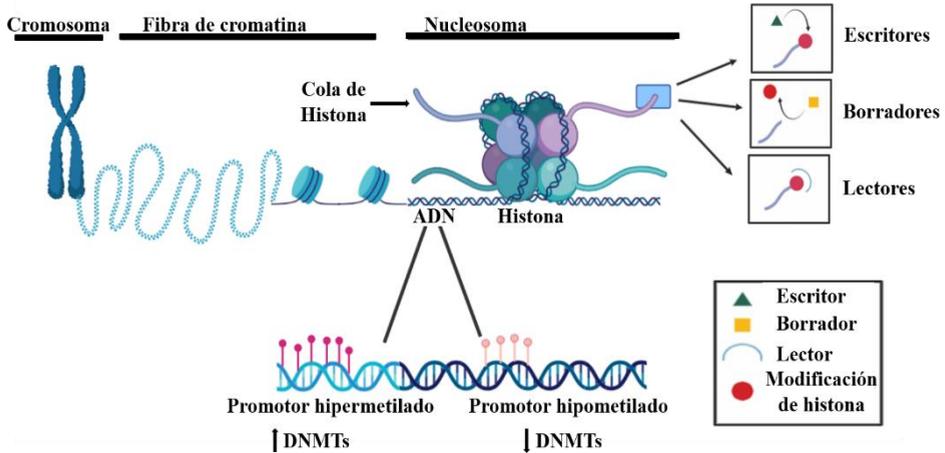


Figura 2. Esquema resumen de los distintos remodeladores de la cromatina. A los diferentes grados de organización y empaquetamiento de la cromatina se añaden las modificaciones covalentes de las histonas de los nucleosomas y que abren o cierran la cromatina, así como la desmetilación o metilación de las islas CpG de las regiones promotoras, permitiendo el acceso a la maquinaria transcripcional y la expresión o represión génica. Adaptada de (Keating ST, 2016) y elaborada mediante BioRender (BioRender, <https://biorender.com/>).

Los tumores se caracterizan por presentar un estado de hipometilación global del ADN comparándolo con el tejido normal del que derivan (Feinberg 1983). Esta hipometilación afecta tanto a secuencias repetitivas de ADN como a exones e intrones. Conforme evoluciona y se desarrolla el tumor, se produce un aumento del nivel de hipometilación del ADN desde una proliferación controlada hasta un cáncer invasivo (Fraga 2004). La hipometilación global favorece el desarrollo del tumor mediante la activación de genes reguladores del crecimiento y el desarrollo celular (Weber et al., 2007). Además, también contribuye a la inestabilidad cromosómica y a la pérdida de la impronta genómica, favoreciendo la recombinación mitótica que produce translocaciones y deleciones, además de reorganizaciones cromosómicas (Eden 2003; Holm 2005).

Paradójicamente, pese al estado de hipometilación global del ADN tumoral, existen regiones del ADN hipermetiladas que corresponden principalmente a islas CpGs de las secuencias promotoras de genes supresores de tumores como *VHL*, *BRCA1* y *RBI* (Sakai 1991; Herman 1994). La hipermetilación también puede afectar a genes relacionados con diversos procesos del desarrollo del cáncer que codifican proteínas implicadas en la maquinaria de reparación del ADN, el ciclo celular, la detoxificación de compuestos carcinógenos, la interacción entre células, la apoptosis, o la angiogénesis (Esteller 2007; Herman 2003; Baylin 2011). Los tumores presentan además patrones de marcas de metilación del ADN característicos según su fenotipo y el tipo de tumor, este hecho es de gran interés ya que permite identificar alteraciones comunes en varios tumores, lo que facilita su clasificación, así como establecer el pronóstico, predecir la respuesta a un tratamiento o identificar el tejido de origen del tumor (Esteller 2001; Esteller 2007; Figueroa 2010; Martínez 2009; Moran 2016).

Por todos estos motivos, podemos concluir que las alteraciones en la metilación del ADN son una de las características clave en el desarrollo tumoral. El papel de las islas CpG de las regiones promotoras en la regulación transcripcional es bien conocido, pero la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva nos ha permitido topografiar no solo el estado de metilación de las islas CpGs de las regiones promotoras, sino también las que se localizan en el cuerpo del gen, los exones e intrones, las regiones 3'UTR, las regiones intergénicas y a secuencias repetitivas de ADN, que también están relacionadas, en mayor o menor medida, con la regulación de la expresión génica. De hecho, gran parte de los cambios que se observan a nivel de la metilación global ADN afectan a islas CpGs del cuerpo del gen, con una aparente correlación positiva entre la metilación y la expresión génica. Esta contradicción sobre los efectos de metilación del ADN en las islas CpGs del promotor versus las localizadas en el cuerpo del gen sigue siendo poco conocida y objeto de controversia (Jones 2012).

Con todo, podemos clasificar a las islas CpGs en cuatro tipos: 1) islas CpGs ya descritas anteriormente; 2) CpGs *shores*, regiones que rodean inmediatamente las islas CpGs hasta una distancia de 2 kb (kilobases); 3) CpGs *shelf*, que se encuentran después de las CpG *shores* rodeando las islas CpGs a una distancia entre 2-4 kb; y 4) CpGs *open sea*, que son las CpGs aisladas a lo largo de todo el genoma. Además, las CpGs *shores* y *shelf* se pueden subclasificar en dos tipos en función de si se localizan en la región previa a la isla CpG (denominándose *N-shore* y *N-shelf*) o en la región posterior a la isla CpG (*S-shore* y *S-shelf*) (figura 19) (Irizarry 2009; Sandoval 2011; Flam 2019).

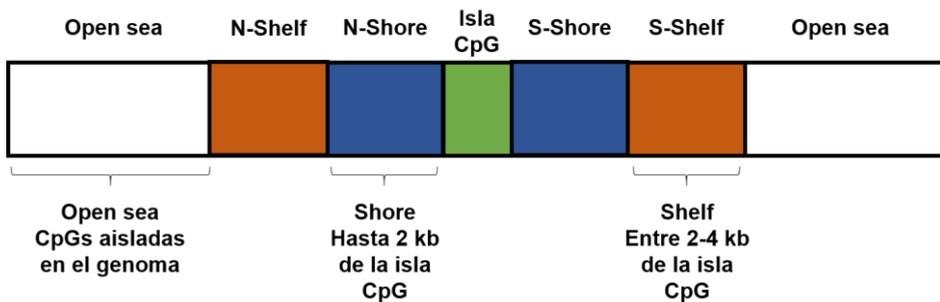


Figura 3. Esquema representativo de las distintas CpGs y su localización.

La metilación del ADN se produce de forma coordinada con otros procesos de remodelación de la cromatina, como son las modificaciones químicas de histonas, que constituyen otro importante mecanismo de regulación epigenética. Las histonas son proteínas básicas que participan en el empaquetamiento del ADN formando los nucleosomas, pero además también actúan como reguladores de la expresión génica (Esteller 2005; Kouzarides 2007). Almacenan la información epigenética mediante modificaciones post-traduccionales como la metilación de lisinas o argininas, la acetilación de las cadenas de lisinas y la fosforilación de serinas (Bernstein 2007). Las distintas modificaciones forman lo que algunos autores denominan el código de histonas, que determina si un gen

está activo o reprimido (Jenuwein 2001). De este modo, la acetilación de lisinas de las histonas está asociado con la activación transcripcional de las regiones de la cromatina afectadas. Por otro lado, en la metilación de histonas influyen distintos factores que determinan la activación o represión transcripcional, dependiendo principalmente del grado de metilación (mono, di y trimetilación) del aminoácido que metila (arginina o lisina (K)), y de la posición de ese aminoácido que se metila. Por ejemplo, la metilación de la histona H3 en la posición K9 o en la K27 y de la H4 en la K20 provoca un aumento de la represión transcripcional, mientras que la marca de metilación en H3K4 y H3K79 provoca la activación transcripcional (Karpf 2005; Barski 2007). La metilación de islas CpG tiene lugar por la interacción con una combinación de marcas de histonas, que se caracteriza por la ausencia de marcas de activación transcripcional como la acetilación en histonas H3 y H4 junto con la pérdida de metilación en H3K4 y la presencia de marcas de represión, principalmente la trimetilación de H3K27 y H3K9 (Jones 2007). Para llevar a cabo estas modificaciones químicas de la cromatina, existen distintas familias de enzimas implicadas en los diversos procesos de la remodelación de la cromatina que podemos clasificar en tres grupos: escritores (del inglés *writers*), borradores (o *erasers*) y lectores (o *readers*) de marcas de la cromatina (ver Figura 2).

Los escritores son enzimas específicas que modifican residuos de las colas de histonas, introduciendo marcas de metilación, acetilación y fosforilación, entre otras, generando así la designación de ciertas regiones para su regulación transcripcional. Otras enzimas, los llamados borradores, se encargan de eliminar estas modificaciones. Mientras que, el tercer grupo de proteínas, los lectores, reconoce y se asocia con las marcas de histonas, permitiendo el ensamblaje de la maquinaria transcripcional para que se induzca la expresión génica. Una descripción más detallada de estos editores de la cromatina será llevada a cabo

en secciones posteriores, donde explicaremos su contribución específica en el cáncer de pulmón.

1.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es un problema de salud pública de primera magnitud a nivel global. Los datos mundiales más recientes disponibles (2018) indican que en términos de incidencia es el cáncer más frecuente, seguido por el cáncer de mama y el colorrectal. Además, el cáncer de pulmón también se encuentra en el primer puesto en los índices de mortalidad, seguido por el colorrectal, el de hígado, el de estómago y el de mama (Figura 4).

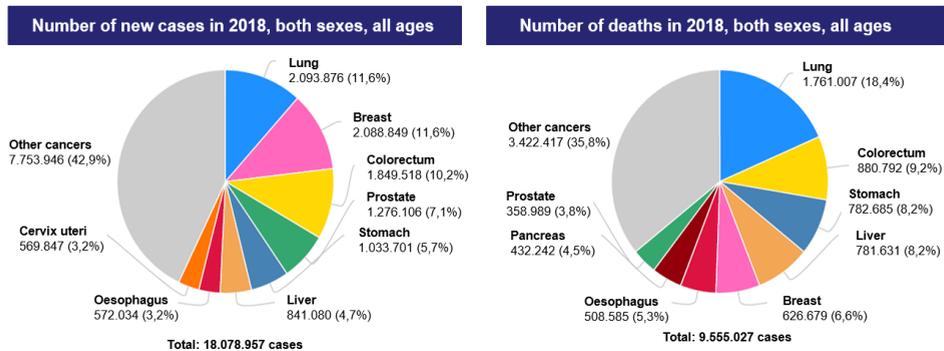


Figura 4. Número de casos nuevos y de mortalidad por cáncer a nivel mundial. El cáncer pulmonar presenta la mayor incidencia y mortalidad a nivel global. Fuente: GLOBOCAN 2018, (Globocan, <http://gco.iarc.fr/today>).

En España, en el último año se diagnosticaron más de 27.000 casos nuevos de cáncer de pulmón, siendo el cuarto tipo de cáncer más frecuente, por detrás del colorrectal y el cáncer de mama; y el de mayor mortalidad seguido por el colorrectal y el de mama. Una de las principales causas de esta elevada mortalidad es la detección tardía de la enfermedad, cuando se encuentra ya en un estado avanzado. Normalmente una neoplasia pulmonar puede generarse y proliferar durante un largo tiempo e incluso metastatizar antes de generar una sintomatología. Debido a esto, son difíciles de detectar en primeras fases del

tumor y tan solo el 20% de los casos son candidatos para realizar la extirpación quirúrgica del tumor, que aún se considera en la práctica médica el tratamiento más eficaz para este tipo de tumores.

En cuanto a la distribución geográfica, el número de casos nuevos es más frecuente en los países desarrollados (principalmente Europa, Estados Unidos y en China). En los países menos desarrollados pese a que la incidencia es menor sí que se observa como las tasas de incidencia se van elevando en los países que están en vías de desarrollo (Figura 5).

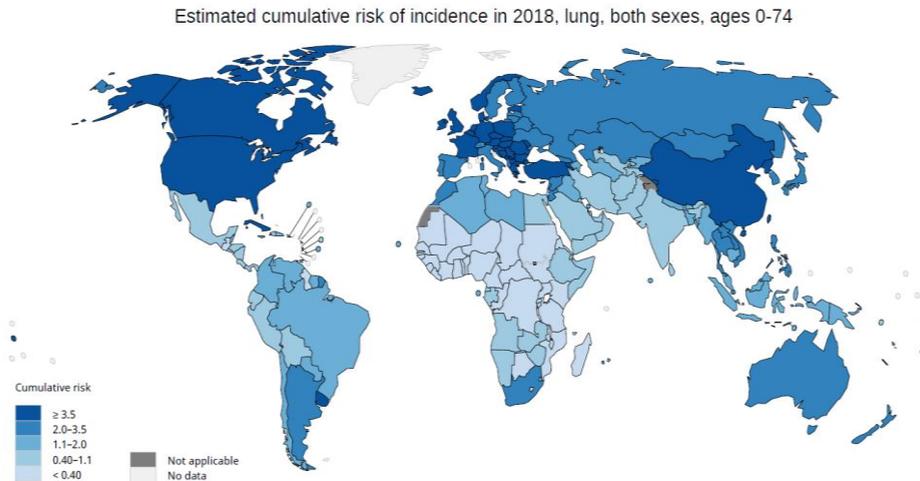


Figura 5. Estimación de la incidencia de cáncer de pulmón en ambos sexos a nivel mundial.
Fuente: GLOBOCAN 2018, (Globocan, <http://gco.iarc.fr/today>).

1.2.1 Clasificación histológica del cáncer de pulmón

Existe una elevada heterogeneidad entre las distintas neoplasias que se engloban en el cáncer de pulmón. La clasificación más reciente fue elaborada en 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y se basa en criterios histológicos, separándola en dos grandes subtipos. Estas diferencias histológicas son de gran interés, ya que permiten establecer relaciones con la evolución clínica y con las

características moleculares distintivas del tumor (Travis WD, 2011; Travis WD, 2015) (Figura 6).

- 1) **Cáncer de pulmón microcítico (CPM)**: representa aproximadamente el 20% de los cánceres de pulmón, histológicamente derivan de células neuroendocrinas del epitelio bronquial. Esta clase de neoplasias presentan tendencia a diseminarse con gran rapidez, aunque suelen responder mejor a la quimioterapia que otros subtipos. Se desarrollan en el peribronquio y posteriormente se infiltran en la submucosa.
- 2) **Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)**: histológicamente es el tipo de neoplasia más frecuente (80% de los casos) y a su vez se puede dividir en tres subtipos (Minn, Roth, et al, 2002):
 - a) **Carcinoma de células escamosas (CCE)**: se caracterizan por la capacidad de sus células tumorales de producir queratinas 5 y 6 (KRT5, KRT6), al igual que las células escamosas normales (Rekhtman, Ang et al. 2011). Este subtipo es el que más correlaciona con el tabaco y es más frecuente en el sexo masculino. Generalmente estos tumores afectan a los bronquios de mayor tamaño, ya que crecen en la parte central del pulmón.
 - b) **Adenocarcinoma (AC)**: se trata del subtipo más común en el cáncer de pulmón, además de ser el más frecuente en mujeres jóvenes y no fumadoras, pese a que la mayoría de los casos se asocian al hábito tabáquico. Histológicamente es un tumor de tipo epitelial con una diferenciación glandular, dado que sus células son capaces de producir mucina.
 - c) **Carcinoma de células grandes (CCG)**: el menos frecuente de los subtipos. Formado por células grandes y sin una diferenciación especial.

Presentan una localización periférica y generalmente se originan en fumadores.

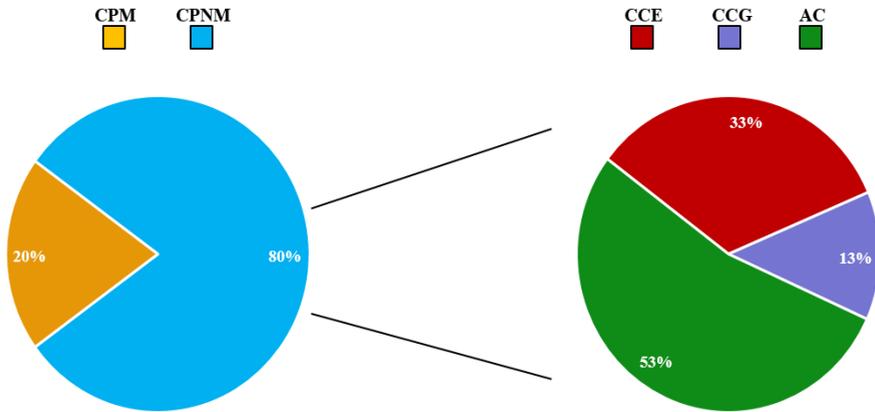


Figura 6. Porcentaje de las distintas clases y subtipos histológicos de cáncer de pulmón. (Travis WD, 2011; Travis WD, 2015).

En muchas ocasiones, la morfología no siempre permite la correcta identificación y clasificación de un tumor. En estos casos, para facilitar el diagnóstico se emplean marcadores inmunohistoquímicos como son algunas de las citoqueratinas ya mencionadas anteriormente (KRT5 y KRT6, KRT7), el factor de transcripción tiroideo (TTF1 o NKX2-1), la apoproteína A del surfactante pulmonar (SFTPA1) y la napsina A (NAPSA), que presentan una expresión diferencial en cada tipo de cáncer pulmonar (Rekhtman, Ang et al. 2011; Travis WD, 2015). Así, los tumores muy indiferenciados no expresan las queratinas, y la mitad de los AC expresan SFTPA1. El marcador NKX2-1 es muy específico en los AC, lo que permite el diagnóstico diferencial entre el AC y el CCE (que además expresa el marcador TP63, siendo de gran utilidad para la caracterización de sus metástasis (Rekhtman, Ang et al. 2011; Ye, Findeis-Hosey et al. 2011; Travis WD, 2015).

1.2.2 Estadios y evolución clínica del cáncer de pulmón

La clasificación del estadio del cáncer se realiza mediante un sistema universal basado en varias características del tumor (el tamaño del tumor primario, la afectación ganglionar y si ha diseminado a otros tejidos) para describir la gravedad de la enfermedad, determinar el pronóstico y elaborar un plan que permita el tratamiento específico. La estratificación clínica está codificada en el sistema TNM (Tabla 1) recogido por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (International Association for the Study of Lung Cancer IASLC) en colaboración con el American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Goldstraw, 2016), donde el componente T indica el tamaño y la extensión del tumor primario, el N la afectación de ganglios linfáticos regionales, y la M metástasis a distancia.

Tabla 1. Clasificación actual del cáncer de pulmón con los componentes TMN.

T (tumor primario)	
TX	Tumor primario que no se visualiza, pero se sospecha su presencia por la existencia de células malignas en el esputo.
T0	No existe evidencia de un tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por tejido pulmonar o pleural. No hay evidencia de invasión en el bronquio principal.
T1a (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su diámetro mayor.
T1b	Tumor >1 cm pero ≤ 2 cm en su diámetro mayor.
T1c	Tumor >2 cm pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
T2	Tumor >3 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor o con una de estas características: 1- Invasión del bronquio principal. 2- Invasión de la pleura visceral. 3- Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva.
T2a	Tumor >3 cm pero ≤ 4 cm en su diámetro mayor.
T2b	Tumor >4 cm pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor >5 cm pero ≤ 7 cm en su diámetro mayor o asociado a nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo que el tumor primario
T4	Tumor >7 cm en su diámetro mayor o asociado a nódulos tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor
N (ganglio linfáticos regionales)	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar.
N0	Los ganglios linfáticos regionales no presentan metástasis.
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y ganglios intrapulmonares.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, en los escalenos ipsilaterales o contralaterales o ganglios linfáticos supraclaviculares.
M (metástasis a distancia)	
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Presencia de metástasis a distancia.
M1a	Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral, tumor con nódulos pleurales
M1b	Presencia de metástasis extratorácica única.
M1c	Presencia de múltiples metástasis extratorácicas en uno o varios órganos.

1.2.3 Etiología del cáncer de pulmón

Existen varios agentes etiológicos en el cáncer de pulmón, como el radón, cromo, níquel, arsénico o la exposición a asbestos, pero el principal factor de riesgo es el tabaco, con una alta correlación totalmente demostrada en todos los subtipos histológicos. El humo del tabaco presenta más de 5000 compuestos, de entre ellos se consideran 73 como carcinogénicos y más de 20 se relacionan de forma directa con el cáncer de pulmón (Hecht 2003, Hecht 2012) como, por ejemplo,

los hidrocarburos policíclicos aromáticos. El mecanismo por el que inducen la carcinogénesis reside en su capacidad de provocar mutaciones a través de aductos (uniones covalentes entre el compuesto y las bases nitrogenadas) en el ADN. El citocromo P450 activa metabólicamente estos carcinógenos, provocando bien su secreción o su unión al ADN. Por otro lado, enzimas como la glutatión S-transferasa (GST) protegen la integridad del ADN eliminando los intermediarios de estos carcinógenos, permitiendo en muchos casos que se reparen los aductos (Perera, Mooney et al. 2002, Tang, Phillips et al. 2001).

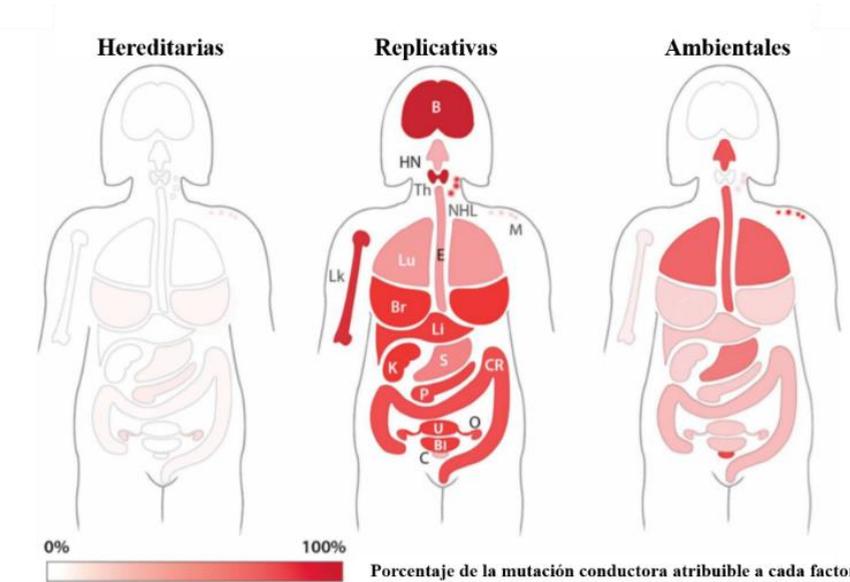


Figura 7. Porcentaje de las distintas mutaciones conductoras que puede atribuirse a la herencia genética, a errores en la replicación del ADN o a factores ambientales para cada tipo de cáncer. B, cerebro; Bl, vejiga; Br, mama; C, cervical; CR, colorrectal; E, esófago; HN, cabeza y cuello; K, riñón; Li, hígado; Lk, leucemia; Lu, pulmón; M, melanoma; NHL, linfoma no-Hodgkin; O, ovario; P, páncreas; S, estómago; Th, tiroides; U, útero. Adaptado de (Tomasetti 2017).

Los estudios epidemiológicos demuestran que hay una probabilidad 14 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón si la persona es fumadora comparándola con una persona no fumadora, aunque solo un 11% de fumadores desarrollan la

enfermedad (Amos, Xu et al. 1999). Otros estudios han mostrado que existe un riesgo 2,5 veces mayor de padecer cáncer de pulmón asociado a la historia familiar, incluso cuando se controla el consumo del tabaco. Estos datos indican que, además del papel clave de los factores ambientales, y tal y como hemos mencionado al comienzo de la introducción, también juegan un papel importante en la susceptibilidad a sufrir cáncer de pulmón los factores hereditarios (Tomasetti 2017) (Figura 7) que condicionan el metabolismo de los compuestos carcinogénicos del humo del tabaco (Sato, Shames et al. 2007). Algunos estudios indican la región cromosómica 6q23-25 como de susceptibilidad autosómica, en la que se encuentran presentes genes de un elevado interés como *IGF2R*, *LATS1* o *PARK2*; así, la presencia de polimorfismos genéticos en alguno de estos genes se ha postulado como un método para la identificación de personas con riesgo de padecer cáncer de pulmón. (Aksoy-Sagirli, Erdenay et al. 2017, Bailey-Wilson, Amos et al. 2004).

1.2.4 Genética del cáncer de pulmón no microcítico

Centenares de mutaciones genéticas somáticas han sido identificadas en el CPNM, incluyendo desde mutaciones puntuales en el ADN, hasta modificaciones en el número de copias de genes y grandes reordenamientos cromosómicos (Sato, Shames et al. 2007). Una gran cantidad de estos cambios están presentes en el epitelio normal, esto sugiere que es a partir del tejido normal donde se desarrolla el CPNM, mediante la acumulación de sucesivos cambios genéticos junto con alteraciones epigenéticas, como es la hipermetilación de islas CpG de las secuencias promotoras de genes supresores de tumores (Swanton 2016).

Los avances en la secuenciación del genoma humano y la disponibilidad de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento del ADN (es decir, secuenciación de próxima generación) han permitido desarrollar y establecer con

una resolución sin precedentes las bases de la genómica del cáncer (*Cancer Genome Atlas Research Network* 2014; Lawrence 2014). Cabe destacar a dos plataformas públicas que han contribuido en gran medida al avance de esta disciplina: el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y el Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (ICGC). El TCGA es un proyecto liderado por los institutos nacionales de salud estadounidenses que pretende elaborar un mapa de los cambios genéticos en 30 tipos diferentes de tumores (*Cancer Genome Atlas Research Network* 2014; Lawrence 2014). Por otro lado, el ICGC ha analizado 50 tipos diferentes de tumores, entre los que se encuentran aquellos de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial (*The International Cancer Genome Consortium* 2010).

Estos proyectos han permitido determinar la frecuencia mutacional de los genes supresores de tumores y de oncogenes en los distintos tipos de cáncer, destacando en el caso del CPNM los genes *TP53*, *CDKN2A*, *KRAS*, *NRAS*, *EGFR*, *STK11*, *SMARCA4*, *NF1*, *BRAF*, *MET*, *PIK3CA*, *RBI*, *ERBB2*, *PTEN* y *ATM*, entre otros. Además, han permitido encontrar mutaciones recurrentes por lo menos en 350 genes de los aproximadamente 22.000 que codifican proteínas, y que contribuyen en el desarrollo del tumor (Futreal, Coin et al. 2004, Kandoth, McLellan et al. 2013). Existe una gran variabilidad entre los genomas tumorales individuales, pudiendo encontrarse desde menos de 1.000 mutaciones puntuales hasta más de 100.000. Parte de esta gran variabilidad se debe en gran medida a la exposición a distintos agentes mutagénicos o a defectos presentes en la maquinaria de replicación y reparación del ADN; por ejemplo, en CPNM aquellas personas que han sido fumadoras presentan un mayor número de mutaciones en comparación con aquellos que no eran fumadores (Sjoblom, Jones et al. 2006; Imielinski 2012). El desarrollo de nuevas tecnologías, como las técnicas de microdissección o las plataformas de *single cell analysis*, han elevado la precisión de la genómica del cáncer a un nivel mayor, permitiendo estudiar y

demostrar de forma palpable la heterogeneidad genética intratumoral, un factor clave que provoca el fracaso terapéutico, la resistencia y por tanto la letalidad en esta enfermedad, como consecuencia de la evolución de los distintos subclones genéticos a través de distintos procesos mutacionales dentro de un mismo tumor (Greaves 2015; Jamal-Hanjani, Wilson et al. 2017; McGranahan 2017).

Parte de los genes identificados por estas tecnologías codifican proteínas que juegan un papel clave en el control del ciclo celular y en las vías de señalización intracelular. No obstante, otros genes no están involucrados de forma directa con los procesos que se han asociado tradicionalmente con la carcinogénesis, como son la regulación epigenética (Morin, Johnson et al. 2010; Fernandez-Cuesta 2014), el metabolismo (Yan, Parsons et al. 2009), la diferenciación celular (Agrawal, Frederick et al. 2011) y la homeostasis proteica (Chapman, Lawrence et al. 2011). La integración de los datos de secuenciación del ADN con las nuevas tecnologías como la metabolómica y la epigenómica es por tanto necesaria para poder establecer correlaciones entre metabolitos, alteraciones genéticas y procesos epigenéticos que permitan encontrar nuevas dependencias y vulnerabilidades (Li H, 2019; Ghandi M 2019).

1.2.4.1 Oncogenes mutados frecuentemente en CPNM

Como hemos visto, existe una gran heterogeneidad en el CPNM desde el punto de vista genético. En los últimos años, además del concepto de oncogén y de gen supresor de tumor, se han ido incorporando al estudio de la genómica del cáncer términos nuevos como, por ejemplo, el de mutaciones conductoras y pasajeras mencionados anteriormente para distinguir las mutaciones que juegan un papel clave en el desarrollo y crecimiento del tumor (conductoras), de aquellas que no (pasajeras) (Lawrence, Stojanov 2014). Excepto un grupo pequeño de genes supresores de tumores y oncogenes, la mayoría de mutaciones genéticas

aparecen con una frecuencia muy baja, además todavía se desconoce si son eventos pasajeros o conductores. Con respecto a los genes supresores de tumores, los mutados e inactivados más frecuentemente son *TP53* y *STK11* (aproximadamente un 37,4% y un 26 % respectivamente) (Sanchez-Cespedes M, 2002; Ding L, 2008).

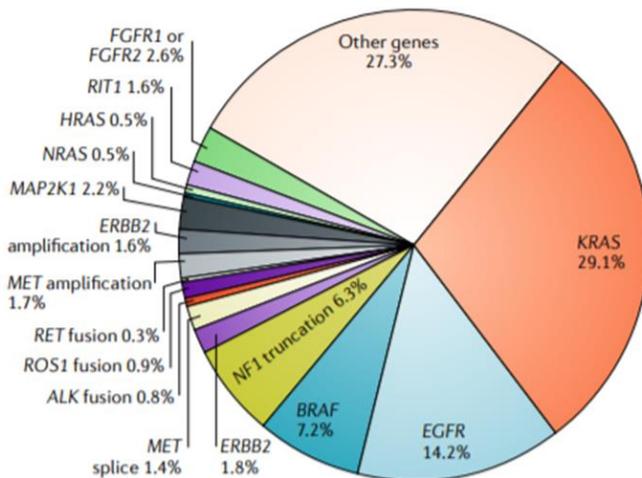


Figura 8. Oncogenes frecuentemente mutados en el cáncer de pulmón no microcítico. Adaptado de (Skoulidis y Heymach 2019).

Debido a su evidente interés terapéutico, nos centraremos en el estudio de los oncogenes más frecuentemente mutados en el CPNM, ya que algunos constituyen las dianas moleculares directas de las nuevas terapias dirigidas (Figura 8). Los oncogenes favorecen el crecimiento y supervivencia de las células tumorales mediante la activación constitutiva de la proteína mutada, provocando la dependencia o “adicción oncogénica” a estas, dado que la ausencia de actividad acaba provocando la muerte de la célula tumoral. Varios oncogenes tienen mutaciones conductoras en el AC pulmonar, entre ellas, las más frecuentes afectan a *KRAS* y al receptor del factor de crecimiento epitelial (*EGFR*) que en su conjunto corresponden cerca del 45% de los AC de pulmón.

Con menor frecuencia aparecen mutaciones en *ALK*, *ERBB2*, *BRAF*, *PI3CA*, *MET* o *MAP2K1 (MEK)*. Sin embargo, en un porcentaje importante de los AC pulmonares, se desconoce todavía qué oncogenes pueden estar dirigiendo el desarrollo tumoral. A continuación describiremos algunas de las características más relevantes de estos oncogenes.

- a) **KRAS**: forma parte de la familia *RAS*, que da lugar a proteínas G con actividad GTPasa. Las proteínas *RAS* se unen al GTP activando efectores que promueven distintas rutas de proliferación celular, diferenciación y apoptosis, mediante la activación de la vía de las MAP quinasas (*Mitogen-activated protein*) (Pylayeva-Gupta, Grabocka et al. 2011, Simanshu, Nissley et al. 2017). *KRAS* se encuentra mutado aproximadamente en el 25-30% de los casos de CPNM, sobre todo en el subtipo AC. También se encuentra mutado frecuentemente en otros tipos de cáncer como el pancreático y el de colon. Además, también existen mutaciones en los otros miembros de la familia *RAS* (*HRAS* y *NRAS*) presentes en varios tipos de tumores (Karnoub, Weinberg 2008). Las alteraciones presentes en *KRAS* asociado al AC de pulmón, se producen más frecuentemente en los codones 12 y 13 y en menor proporción en el 61. El cambio G12C es la mutación más frecuente (40% de los casos) y está asociado con la exposición al tabaco; con menor frecuencia aparecen las mutaciones G12V (22%) y la G12D (16%) (Marabese, Ganzinelli et al. 2015). Es importante destacar que existe una exclusividad mutua entre las mutaciones de los oncogenes *KRAS* y *EGFR*. Sea cual sea la mutación en *KRAS*, todas evitan la hidrólisis del GTP, permitiendo que *KRAS* permanezca activo de forma constitutiva y así promover las vías de señalización que hay por debajo de los receptores de crecimiento (como *EGFR*) *RAS/RAF/MEK/ERK* y *AKT/PI3K/mTOR* (Figura 9).

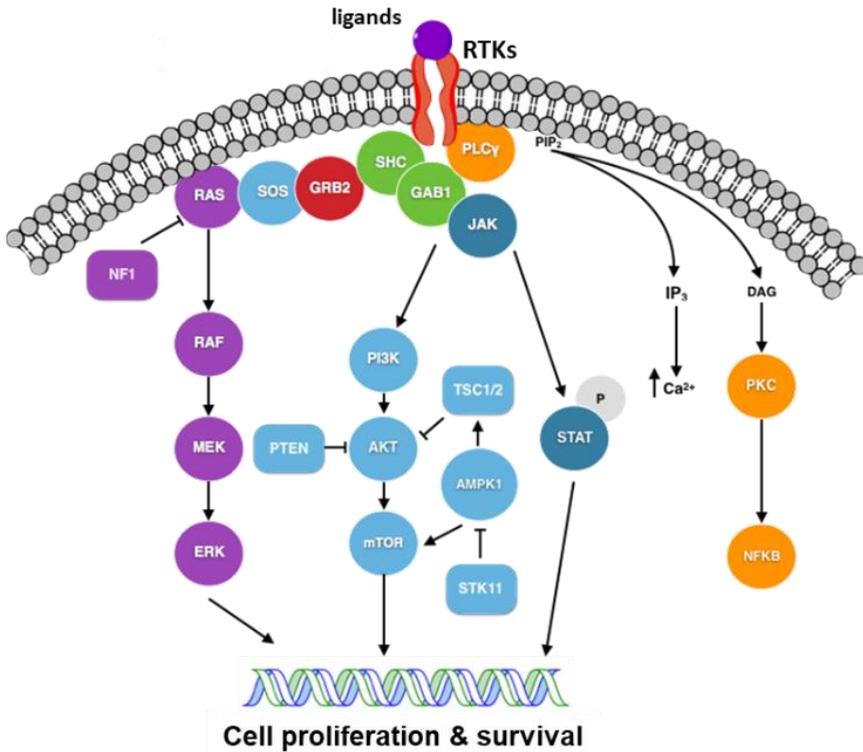


Figura 9. Vías de señalización intracelular de los receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs).

Se han realizado grandes esfuerzos con el fin de diseñar terapias dirigidas a inactivar la forma mutada de KRAS. A día de hoy, pese al gran número de fracasos, existen ya algunos fármacos en fase preclínica con resultados prometedores. Los principales métodos para bloquear la señalización de RAS se pueden agrupar en 4 categorías generales:

- 1- Disminuir la proporción de RAS unido a GTP mediante moléculas que permitan estabilizar el complejo inactivo RAS-GDP (Nishimura 2010).
- 2- Interrumpir las interacciones del complejo RAS-GTP con los efectores, como por ejemplo el rigosertib que bloquea la interacción

entre RAS-GTP y RAF, evitando su activación y bloqueando la vía RAS/RAF/MEK/ERK (Athuluri-Divakar SK 2016).

- 3- Estabilizar la proteína RAS con complejos no efectores (Peyroche 1999).
- 4- Disminuir la localización de RAS en la membrana (Liu M 2010; Zimmermann, Papke et al. 2013; Ostrem JM 2016).

b) **EGFR**: se trata de un receptor de membrana que presenta una región transmembrana, 3 dominios intracelulares y 4 dominios extracelulares. En los dominios extracelulares es donde se realiza la unión al ligando (EGF, TGF α , anfiregulina) provocando la dimerización del receptor. La región intracelular está constituida por un dominio yuxtamembrana, otro con actividad tirosina quinasa y un dominio C terminal. Cuando EGFR dimeriza por la unión al ligando, se produce un aumento de la actividad tirosina quinasa y tiene lugar la autofosforilación del receptor. Estos cambios dan lugar a la interacción con GRB2, seguidamente de las proteínas SOS, provocando posteriormente la activación de RAS. De este modo, se produce una cascada activadora de quinasas en las que se encuentran BRAF y MEK1, que finalmente fosforilan y activan ERK1/2. A su vez, EGFR transduce la señal por la vía de PI3K, provocando un aumento de la actividad de la serín-treonín quinasa AKT, que posteriormente activa entre otros efectores a la proteína quinasa mTOR, que juega un papel clave en la regulación de la síntesis de proteínas. La activación de todas estas vías secundarias tiene efectos positivos sobre la proliferación y la supervivencia celulares (Jorissen, Walker et al. 2003). Las mutaciones presentes en *EGFR* pueden afectar al dominio catalítico tirosina quinasa, provocando su activación constitutiva de forma independiente a si el ligando está unido al receptor o no. Estas mutaciones son de gran interés desde el punto de vista terapéutico, ya que provocan la adicción oncogénica de esta vía de proliferación, y que los

tumores mutantes sean sensibles a los inhibidores de la tirosina quinasa (ITQ) como el erlotinib, gefitinib, afatinib u osimertinib (Paez, Jänne et al. 2004, Cross, Ashton et al. 2014). No solo existen mutaciones puntuales o pequeñas deleciones del gen *EGFR*, otras alteraciones son el cambio del número de copias, pudiendo coexistir con el resto de mutaciones del mismo alelo. De hecho, algunos estudios sugieren un peor pronóstico cuando se da la amplificación de *EGFR* (Sholl, Yeap et al. 2009), sin embargo en otros estudios no hay diferencias (Hirsch, Varella-Garcia et al. 2008).

Al igual que *EGFR*, *HER2* (conocida también como *EGFR2* o *ERBB2*) forma parte de la familia *HER* de los receptores de tirosina quinasa. Esta proteína es capaz de formar tanto homo como heterodímeros junto a otros miembros de la familia *HER* (Coussens, Yang-Feng et al. 1985). Se encuentra sobreexpresado en el 20% de los casos de CPNM, aunque la amplificación ocurre sólo en un pequeño porcentaje (Hirsch, Langer 2004).

- c) **ALK:** Se trata de un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa, normalmente no se expresa en tejido pulmonar, solo en ciertos casos (2-7% de los tumores de CPNM), cuando se produce una fusión entre el gen de la quinasa *ALK* junto con los genes *EML4* como consecuencia de una inversión en el cromosoma 2p. Esta alteración se encuentra en alrededor del 8% de los casos de CPNM, al ser una quinasa, presenta interés como diana terapéutica mediante ITQs como el crizotinib, el alectinib y el ceritinib (Soda, Choi 2007; Koivunen 2008; Rodig 2009; Lin 2017, Shaw 2014 Shaw 2016).
- d) **ROS1:** esta proteína se trata de un receptor que posee actividad tirosina quinasa. Se han descrito diversas mutaciones en *ROS1* que dan lugar a proteínas de fusión con activación constitutiva del dominio tirosina quinasa (Rikova Guo 2007), provocando el aumento de la actividad de diversas rutas de señalización como PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y MAPK/ERK

(Davies, Le et al. 2012). Los ITQs como el crizotinib son tanto o más efectivos frente a tumores con la proteína de fusión ROS1 como en aquellos con ALK (Bergethon 2012).

- e) **BRAF**: se trata de una proteína que pertenece a la familia RAF de serín-treonín quinzas, al igual que ARAF y CRAF, que juegan un papel clave como intermediarios en la vía de señalización de las MAPK, produciendo la fosforilación y posterior activación de MEK. *BRAF* se encuentra mutado entre un 1-4% de los casos de CPNM, principalmente en AC (Brose 2002; Marchetti 2011; Cardarella 2013). Las mutaciones en el CPNM afectan a varias posiciones del domino quinasa de BRAF, siendo la más conocida y frecuente la mutación V600E (cerca del 50%), esta mutación es muy común y bien estudiada en el melanoma, donde se ha empleado como diana terapéutica para inhibidores específicos de BRAF como el dabrafenib y el vemurafenib con buena eficacia terapéutica. Sin embargo, en CPNM debido a que un 50 % de las mutaciones en *BRAF* son diferentes a la sustitución V600E, existen diferencias en la respuesta frente a los inhibidores de BRAF (Marchetti 2011; Cardarella 2013).
- f) **PI3KCA y AKT1**: las fostatidil inositol 3-quinzas (PI3Ks) son una familia de quinzas implicadas en numerosos procesos como la proliferación y la supervivencia celulares, el metabolismo, la diferenciación y la motilidad. Existen distintas mutaciones que afectan a la subunidad catalítica de PI3K (PI3KCA) provocando la activación constitutiva, es por esto que podría ser una diana terapéutica en aquellos tumores en los que estas mutaciones dirigen su desarrollo (Samuels 2004). En el CPNM, las mutaciones de *PI3KCA* ocurren en menos de un 5% de los casos, y pueden coexistir con otras mutaciones oncogénicas que afectan a *EGFR*, *KRAS* o *ALK* (Chaft 2012; Oxnard 2013). Las mutaciones en *PI3KCA* dan lugar a la activación

de la serin-treonin quinasa AKT (Kawano, Sasaki et al. 2006), Pese a que en CPNM la mutación de *AKT1* es muy poco frecuente, la mutación E17K ha sido identificada en distintos tipos de tumores sólidos, alterando el lugar de unión del fosfoinositol, provocando así la activación constitutiva de la vía PI3K (Carpten 2007).

- g) **MET:** el oncogén *MET* codifica el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa; al unirse con su ligando HGF, MET activa múltiples vías de señalización implicadas con el crecimiento, la supervivencia, la motilidad y la invasión (Birchmeier 2003). La alteración más frecuente en CPNM es la amplificación, y suele estar asociada como mecanismo de resistencia secundaria a los ITQs de EGFR a través del “interruptor oncogénico” (Bean 2007; Engelman 2007a). Las mutaciones primarias en el dominio quinasa de MET no son comunes en CPNM, al contrario que en otros tipos como el gástrico o el renal. Además, son excluyentes a la amplificación de *EGFR* y a las mutaciones de *KRAS* (Cappuzzo 2009; Onozato 2009).
- h) **MAP2K1:** se trata de una serín-treonín quinasa, conocido también como MEK1, que activa MAPK2 y MAPK3 (ERK1 y 2, respectivamente) cuando es fosforilada y activada por BRAF, que en la ruta de señalización se localiza justo por encima de MEK1. Las mutaciones de *MEK1* en CPNM son poco frecuentes, se producen por cambios de aminoácidos que afectan a regiones distintas del dominio quinasa (Marks 2008), y además son mutaciones excluyentes con las mutaciones de *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *PIK3CA* y *HER2*.

1.2.5 Epigenética del cáncer de pulmón

1.2.5.1 Alteraciones epigenéticas en la carcinogénesis del CPNM

La hipótesis actual que explica la carcinogénesis pulmonar postula que el desarrollo del tumor se produce de manera gradual en varias etapas que conducen a una acumulación secuencial de anomalías genéticas y epigenéticas (Lantuéjoul 2009). Así pues, las alteraciones epigenéticas ejercen un papel fundamental en este proceso, ya que promueven la adquisición de un fenotipo maligno, así como las resistencias primarias o adquiridas a los tratamientos antitumorales. Debido a esto, los biomarcadores epigenómicos detectados en los tejidos o fluidos corporales son de gran interés para mejorar el rendimiento de los métodos de detección o diagnóstico, además de ofrecer nuevas vías para la terapia epigenética del cáncer.

El estudio de las anomalías epigenéticas proporciona datos clave para la comprensión de las distintas etapas del proceso de carcinogénesis pulmonar (Belinsky 2005). La metilación aberrante del ADN es un sello distintivo en el cáncer de pulmón y se trata de un evento temprano que promueve la carcinogénesis a través de la metilación de los promotores de genes supresores de tumores, silenciando su expresión (Esteller 2008; Heyn 2012; Belinsky 2004). Existen tres enzimas ADN metiltransferasas, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, que catalizan la metilación del ADN en la citosina 5' de las CpGs. DNMT1 participa en el mantenimiento de patrones establecidos de metilación del ADN en células en división, mientras que DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas *de novo* que establecen nuevos patrones de metilación al dirigirse a sitios CpG normalmente no metilados (Okano 1999). La expresión de DNMT1 aumenta en fases tempranas en el cáncer de pulmón induciendo el silenciamiento de múltiples genes implicados en la patogénesis del cáncer de pulmón como

RASSF1A y *CDKN2A* (Belinsky 1996; Suzuki 2004; Lin 2007). Además, DNMT1 y DNMT3B cooperan para inducir la metilación aberrante del ADN y establecer los complejos de remodelación de la cromatina que reprimen a genes supresores de tumores (Rhee 2002). La sobreexpresión de DNMT3B acelera la transformación inducida por carcinógenos en líneas celulares, se observa con frecuencia en el cáncer de pulmón y está asociado con un mal pronóstico (Teneng 2015; Kim 2006). Además, un polimorfismo genético en el promotor DNMT3B que confiere una mayor actividad transcripcional se asocia con un mayor riesgo de cáncer de pulmón (Shen 2002; Lee 2005). Numerosos estudios han demostrado un aumento en la frecuencia y en el nivel de hipermetilación del promotor de varios genes involucrados en una gran variedad de funciones celulares a lo largo del proceso de carcinogénesis que dirige la transición desde el tejido normal pulmonar hacia el adenocarcinoma, como *DAPK* (alteración de la apoptosis), *MGMT* (gen de reparación del ADN), *RARB* (señalización de ácido retinoico), *TERT* (actividad telomerasa) y algunos mencionados anteriormente como *RASSF1A* y *CDKN2A* (implicados en la señalización de RAS y el arresto celular, respectivamente) (Yim 2007; Tsou 2007; Licchesi 2008; Selamat 2011; Selamat 2012; Zhang 2016).

1.2.5.2 Alteraciones epigenéticas en la progresión del CPNM y la metástasis

El desarrollo de fenotipos pro-metastásicos en el CPNM se asocia con cambios en la metilación del ADN (Hascher 2014). El análisis integrado de los perfiles de metilación del ADN y los datos de expresión de ARN a escala *ómica* en pacientes de CPNM así lo demuestra (Robles 2015). Selamat y colaboradores mostraron que la expresión de 164 genes está regulada de forma negativa por el silenciamiento inducido por la metilación del ADN y 57 genes hipometilados que muestran una mayor expresión en el AC pulmonar (Selamat 2012).

Estos genes desregulados epigenéticamente están involucrados en distintos procesos como la diferenciación celular, la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la regulación del ciclo celular. Esto ha sido confirmado en otros estudios que mostraron también una desregulación significativa de la metilación del Complejo Represor *Polycomb 2* (PRC2) involucrado en la proliferación y crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y la invasión en el CPNM (Hascher 2014).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas, el otro gran mecanismo de regulación epigenética, también están implicadas en la carcinogénesis y en el desarrollo del CPNM. La acetilación de histonas es una marca de activación transcripcional y está regulada por las histonas acetiltransferasas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs). Las HDACs, como la HDAC1 y HDAC3, se encuentran frecuentemente sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer como el CPNM y se correlacionan con la carcinogénesis y la progresión tumoral mediante el silenciamiento de genes supresores de tumores dando un mal pronóstico de la enfermedad (Sasaki 2004; Minamiya 2010; Minamiya 2011). En algunos casos, otro tipo de remodeladores como SETDB1, la metiltransferasa de la histona H3 en la lisina K9, sufre una sobreactivación causada por una amplificación génica que se asocia con la carcinogénesis pulmonar, promoviendo a su vez el crecimiento celular a través de la regulación epigenética de genes implicados en la proliferación e invasión celular mediante la activación de la vía WNT- β -catenina (Rodríguez-Paredes 2014; Sun 2015). Otro ejemplo es la sobreexpresión de EZH2, la subunidad catalítica del complejo PRC2 (mencionado anteriormente) que cataliza la metilación de la histona H3 en la lisina K27 generando una marca represora. La sobreexpresión de EZH2 se asocia con un aumento global de la trimetilación de H3K27, que silencia genes supresores de tumores y reguladores de la diferenciación celular, favoreciendo así la proliferación y el desarrollo tumorales, la invasión y la metástasis.

Además, existe una buena correlación entre la sobreexpresión de EZH2 y el mal pronóstico en pacientes de CPNM. Por todas estas evidencias actualmente EZH2 se postula como una posible diana terapéutica en algunos casos de cáncer de pulmón (Behrens 2013; Zhang 2016; Frankel 2016). Otro tipo de remodeladores que ejercen el efecto contrario que EZH2 son las desmetilasas KDM6A y KDM6B. Distintos estudios han demostrado el papel de cada una de estas desmetilasas como genes supresores de tumores que al mutar son inactivados favoreciendo el desarrollo y la progresión tumoral en varios tipos de tumores incluidos el CPNM (Liu 2012; Ler 2017; Chang 2019). Sin embargo, KDM6B también ha sido descrito en algunos casos con funciones que favorecen el desarrollo tumoral y el desarrollo del fenotipo mesenquimal (Ramadoss 2012; Park 2016; Li 2015; Chang 2019). Muy recientemente se han desarrollado inhibidores específicos contra KDM6A y KDM6B los cuales muestran actividad antitumoral *in vitro* en distintos modelos de cáncer de ovario y de mama (Sakaki 2015; Yan 2017). En el CPNM, el papel de KDM6A (también conocido como UTX) como gen supresor de tumores sí que es bien conocido. No obstante, se desconoce el papel que ejerce KDM6B y si actúa como un gen supresor o como oncogén, y si estos inhibidores pueden aportar algún beneficio clínico.

La perturbación de la remodelación de la cromatina es un tema emergente en la progresión del cáncer de pulmón, como lo demuestra el descubrimiento de mutaciones en múltiples miembros del complejo SWI/SNF y específicamente en BRG1, codificada por *SMARCA4*, que ejerce la actividad ATPasa del complejo permitiendo así la remodelación de la cromatina (Medina 2004; Imielinski 2012). La alteración más común en CPNM es la mutación inactivadora de *SMARCA4* (cerca de un 10% de los casos). La pérdida de esta proteína provoca cambios dramáticos en la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, la diferenciación, la muerte celular, la reparación del ADN y la inestabilidad

genómica, favoreciendo así el desarrollo y la progresión tumorales (Glaros 2008; Orvis 2014).

Tal y como hemos desarrollado en esta sección, el papel principal de las modificaciones epigenéticas en la carcinogénesis y la progresión del cáncer de pulmón es un hecho aceptado por la comunidad científica, y de ahí el gran interés en la identificación de biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico temprano, la predicción de la respuesta a los tratamientos y la monitorización y seguimiento de los pacientes (Heyn 2013). La integración sistemática de datos de genómica, transcriptómica y epigenómica ha dado lugar a modelos predictivos reproducibles y la identificación de dianas terapéuticas epigenéticas relevantes. Por este motivo, el desarrollo de compuestos dirigidos contra los reguladores del epigenoma constituye un enfoque novedoso para el tratamiento del cáncer de pulmón, si bien necesitamos aumentar nuestra comprensión sobre las complejas relaciones entre las alteraciones genéticas, los remodeladores de la cromatina y el fenotipo tumoral, y así definir de manera más precisa las vulnerabilidades epigenéticas del cáncer pulmonar susceptibles de ser moduladas farmacológicamente.

1.2.6 Tratamientos farmacológicos para el CPNM

El tratamiento del CPNM depende del estadio clínico en el que se encuentre la enfermedad. En los estadios iniciales el tratamiento principal ha sido, y todavía lo sigue siendo, la resección quirúrgica completa. Sin embargo, en la mayoría de los casos la enfermedad es diagnosticada cuando ya está en estadios avanzados que no son operables. En estos casos, quedan como únicas opciones la quimioterapia convencional y la radioterapia, que han resultado ineficaces pese a los grandes esfuerzos invertidos por los oncólogos clínicos durante décadas.

El desarrollo y la aplicación de las distintas técnicas genéticas en el diagnóstico del cáncer han permitido caracterizar a nivel molecular el tumor de cada paciente con una precisión sin precedentes. Así, conocer qué mutaciones dirigen el desarrollo y evolución del tumor, junto con el desarrollo de nuevos fármacos que actúan frente a estas dianas moleculares, han permitido un gran avance en el tratamiento de los pacientes, implantando las bases de la medicina personalizada (Lindeman 2013; Kerr 2014; Lindeman 2018; Kalemkerian 2018).

1.2.6.1 Breve historia de la quimioterapia

El siglo pasado, antes de los años 50, el tratamiento principal en la mayoría de tumores era la cirugía o la radioterapia. Posteriormente la aparición de agentes químicos como el **metotrexato** provocaron un cambio del paradigma en la terapia del cáncer. Este fármaco inhibe la dihidrofolato reductasa y bloquea así la síntesis del folato, y como consecuencia, se inhibe la síntesis de las purinas y pirimidinas provocando la detención del ciclo celular en la fase G1. Otro compuesto con un mecanismo similar es el **pemetrexed**, que se emplea en el CPNM como primera línea de tratamiento combinado con el cisplatino o en segunda línea después de la quimioterapia, en tumores no escamosos (Scagliotti 2009). Por otra parte, el metotrexato se emplea principalmente en CCE y CPM.

Los **derivados del platino** son una de las familias más antiguas de quimioterápicos. Su mecanismo de acción se basa en el entrecruzamiento con las bases de purinas, provocando interferencias en los mecanismos de reparación del ADN y así dar lugar a una acumulación de daños en el ADN que desencadenen la apoptosis. Uno de los más empleados y conocidos es el cisplatino, este compuesto se lleva empleando desde los años 70 y ha supuesto uno de los descubrimientos más relevantes contra el cáncer, ya que es el compuesto más empleado en combinación con otros compuestos, sobre todo en el CPNM, donde mejoró la supervivencia de pacientes resecaos (Arriagada, Bergman et al.

2004). Sin embargo, este tipo de terapias solas o en combinación han llegado a sus límites en cuanto a eficacia y mejora de supervivencia. El cisplatino presenta graves efectos adversos como la neurotoxicidad y la nefrotoxicidad (Dasari 2014), debido a esto surgió la necesidad de descubrir compuestos análogos que presentaran menor toxicidad como el carboplatino, que se aprobó en 1989. Otros problemas asociados son la aparición de numerosos mecanismos de adquisición de resistencia a estos compuestos quimioterápicos, como por ejemplo la alteración de micro-ARNs (Cao, He et al. 2015).

Posteriormente, la FDA aprobó los fármacos que inhiben la **formación de los microtúbulos**. El primero fue la vinorelbina, un alcaloide que bloquea la polimerización de los microtúbulos durante la mitosis celular al unirse los monómeros de β -tubulina, de este modo se produce la muerte celular al bloquear la mitosis (Farhat 2015). Normalmente se emplea como monoterapia o combinado con cisplatino en el CPNM en estadio III (Neal 2015).

El paclitaxel y el docetaxel, de la familia de los **taxanos**, presentan el mismo mecanismo de acción bloqueando la polimerización de los microtúbulos (Yuan 2016; Neal 2015). El docetaxel es un tratamiento de segunda línea después de los derivados del platino, tanto en monoterapia como combinado con cisplatino. Sin embargo, el paclitaxel está indicado como tratamiento de primera línea en el CCE de estadios avanzados, combinado con bevacizumab y carboplatino produce una mejora del tiempo libre de enfermedad (Sandler 2006).

La **gemcitabina** es un compuesto que inhibe distintos procesos esenciales para la síntesis del ADN. Cuando es incorporado mientras tiene lugar la replicación celular, provocando la muerte de la célula como consecuencia de impedir que la ADN-polimerasa realice sus funciones de forma fisiológica causando la parada del ciclo celular. La combinación con cisplatino como un tratamiento de primera

línea en CPNM avanzado y metastásico ya que mejora los resultados del tiempo de respuesta, el tiempo libre de enfermedad y de la supervivencia (Sandler 2000).

1.2.6.2 Terapias dirigidas contra el CPNM

Hasta ahora, únicamente hemos hecho un breve resumen de los principales quimioterápicos que se han empleado (y siguen usándose) para el tratamiento del CPNM. Como hemos mencionado anteriormente, la caracterización genómica de los tumores, junto con el desarrollo de nuevos fármacos específicos contra aquellas dianas moleculares mutadas que dirigen el desarrollo del tumor y que causan adicción oncogénica (y constituyen una vulnerabilidad), han dado lugar a la aplicación práctica de la medicina personalizada.

a) Inhibidores de EGFR

En el CPNM, la búsqueda de fármacos capaces de inhibir de forma específica el dominio tirosina quinasa de la forma mutante de EGFR dio como resultado el desarrollo de los ITQs de primera generación erlotinib y gefitinib. Los ITQs son moléculas anilinoquinazolina, cuyo mecanismo de acción es la inhibición reversible de la catálisis bloqueando la región de unión del ATP, formando enlaces con los hidrógenos de un residuo de metionina (M769) y de cisteína (C751), a su vez, el anillo anilino se encuentra próximo a los residuos de metionina (M742), lisina (K721) y de leucina (L764).

Los primeros ensayos clínicos de estos inhibidores, mostraron resultados muy positivos en los pacientes con AC de pulmón con mutaciones en *EGFR*, ya que respondían mejor al tratamiento comparados con los no mutantes. De este modo, se estableció un nuevo paradigma en el tratamiento de los tumores sólidos, abriendo paso a la medicina personalizada al establecer la primera terapia dirigida en el cáncer de pulmón (Paez, Janne 2004; Lynch 2004; Mok 2009). Actualmente gefitinib y erlotinib son fármacos aprobados para el tratamiento de

primera línea del CPNM avanzado con mutaciones en *EGFR*, son el, ya que producen una respuesta mejor que la quimioterapia estándar. Sin embargo, no todas las mutaciones de *EGFR* se asocian a una misma respuesta a los ITQs. Las mutaciones más frecuentes en *EGFR* son la delección del exón 19 y la sustitución L858R, para las que está indicado el tratamiento con los ITQs, mientras que para otras mutaciones menos frecuentes está contraindicado ya que son resistentes (Paez, Janne 2004; Lynch 2004; Mok 2009).

Prácticamente todos los pacientes desarrollan con el tiempo mecanismos de resistencia a los ITQs de primera generación, a pesar de la buena respuesta inicial. El mecanismo de resistencia más frecuente es la aparición de una segunda mutación de *EGFR*, la sustitución T790M, que tiene lugar en el aproximadamente un 60% de los pacientes. La mutación produce un aumento de la afinidad por el ATP, provocando que los ITQs reversibles pierdan su eficacia (Sequist 2011; Yu 2013).

La aparición de resistencias a los ITQs de primera generación mediada por T790M dio lugar al desarrollo de ITQs de segunda generación (afatinib, neratinib y dacomitinib) capaces de unirse por enlaces covalente de forma irreversible a *EGFR*. Los estudios *in vitro* demostraron su eficacia para bloquear la activación de *EGFR* en líneas tumorales de AC pulmonar *EGFR* mutantes con la sustitución T790M, disminuyendo su proliferación (Engelman, Zejnullahu et al. 2007b, Li, Ambrogio et al. 2008). Pese a los buenos resultados obtenidos *in vitro*, los ensayos clínicos de estos ITQs de segunda generación mostraron una eficacia clínica baja, con una respuesta por debajo del 10% en los pacientes con CPNM que habían desarrollado resistencia a los ITQs de primera generación durante el tratamiento.

Debido a esto, se han ido desarrollando inhibidores irreversibles más selectivos con el fin de mejorar la eficacia clínica cuando se produce la mutación T790M.

Surgen así los ITQs de tercera generación como el WZ4002, el rociletinib (CO-1686) y el osimertinib (AZD9291). Estos inhibidores tienen una estructura de pirimidina, y poseen un grupo aceptor que se une de forma covalente con la cisteína 797, que corresponde con el extremo del bolsillo de unión con el ATP. Esta unión covalente es la que da lugar a una inhibición irreversible, superando así la mayor afinidad inducida por la mutación T790M (Ward 2013; Cross 2014). El osimertinib fue aprobado en 2015 por la FDA para el tratamiento del CPNM con la mutación T790M en *EGFR*. En un primer lugar se aprobó para el uso en pacientes en los que la enfermedad ha progresado tras el tratamiento con ITQs de primera generación (Mok, Wu, et al 2017a; Mok, Ahn, et al 2017b). Sin embargo, a día de hoy distintos estudios recomiendan emplear osimertinib como primera línea de tratamiento en cualquier CPNM *EGFR* mutante, este presente o no la mutación T790M ya que los datos de supervivencia y eficacia clínica no presentan diferencias significativas al comparar el tratamiento secuencial con un ITQ de primera generación seguido de osimertinib cuando se diagnostica la mutación T790M (Ramalingam 2018; Soria 2018).

A pesar de su eficacia clínica, con el tiempo estos tumores también desarrollan resistencia contra el osimertinib. Uno de los mecanismos más comunes, demostrado por estudios *in vitro* y a partir de rebiopsias de tejido de pacientes tras la recaída en la enfermedad, es la aparición de una tercera mutación en *EGFR*, la sustitución C797S, que impide que el osimertinib se una de forma covalente (Jia 2016). No obstante, posteriores estudios han mostrado que el brigatinib, puede unirse a la región de unión al ATP con la triple mutación *EGFR* (deleción del exón 19 o sustitución L858R/T790M/C797S) sorteando de este modo la resistencia al osimertinib al bloquear la actividad del receptor tanto *in vitro* como *in vivo*. La combinación del brigatinib junto con anticuerpos monoclonales anti-EGFR mejora además la inhibición de EGFR al reducir la expresión total de EGFR mediante los anticuerpos monoclonales (Uchibori

2017). Dado que es el objeto de estudio de esta tesis doctoral, más adelante procederemos a una descripción más detallada de los distintos mecanismos de resistencia asociados a los inhibidores de EGFR.

b) Anticuerpos monoclonales contra EGFR

Otro abordaje diferente que permite el bloqueo de EGFR es el uso de anticuerpos monoclonales. Por un lado, son inhibidores competitivos que bloquean la unión de los ligandos a la región extracelular del receptor. Además, son capaces de formar complejos anticuerpo-receptor que posteriormente se interiorizan por endocitosis para ser degradados. Para el CPNM se ha ensayado el necitumumab, un anticuerpo monoclonal anti-EGFR de segunda generación (Li 2008). Más recientemente, en el ensayo clínico FLEX se combinó, en pacientes de CPNM escamoso la quimioterapia estándar (cisplatino y gemcitabina) junto con otro anticuerpo monoclonal, el cetuximab, mejorando la supervivencia comparado con los que solo recibían quimioterapia (Thatcher 2015).

c) Anticuerpos monoclonales contra VEGFR

La angiogénesis es un proceso esencial en la carcinogénesis, por este motivo postuló que su bloqueo podría ser una diana terapéutica contra el cáncer. El ramucirumab y el bevacizumab son dos anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGFR). El bevacizumab, comenzó empleándose en el cáncer colorrectal metastásico. Sin embargo, posteriormente se aprobó para otros tumores como el de mama o pulmón. El bevacizumab bloquea tanto el receptor 1 como el 2 (VEGFR1 y VEGFR2), mientras que el ramucirumab solo inhibe el receptor 2. Ambos, al evitar la formación de nuevos vasos sanguíneos, dan lugar a un estado hipóxico intratumoral con pocos nutrientes dando lugar a la muerte celular (Willett 2004; Xu 2012). Este tipo de terapias tienen una buena respuesta en combinación con cisplatino (cuando se emplea bevacizumab) y con docetaxel (con el

ramucirumab) (Kurzrock 2017). Sin embargo, no pueden emplearse en el CPNM con histología escamosa, ya que existe un mayor riesgo de sangrado al administrarse el bevacizumab (Johnson 2004). Además, existen mecanismos de resistencia que provocan que estas terapias no tengan el éxito esperado, uno de ellos es la capacidad de las células tumorales de imitar a las endoteliales, formando así vasos sanguíneos insensibles a la inhibición de VEGF.

d) Inhibidores de ALK y ROS1

Los tumores con la proteína de fusión EML4-ALK, al igual que los *EGFR* mutados, desarrollan dependencia oncogénica asociada a la señalización inducida por la activación constitutiva del dominio tirosina quinasa de ALK. Esta dependencia ha permitido el desarrollo de ITQs específicos como el crizotinib, inicialmente descrito como un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de MET pero que también ha demostrado su eficacia en el tratamiento del CPNM con mutaciones en ALK (Gelsomino 2014), el alectinib y el ceritinib, todos ellos aprobados por la FDA (Lin 2017, Shaw 2014, Shaw 2016).

Pese a las buenas respuestas iniciales, también acaban desarrollándose mecanismos de resistencia, al igual que con los ITQs de EGFR. En el caso del crizotinib, se destacan la amplificación de *ALK*, la amplificación de *KIT*, la sobreexpresión de otras tirosinas quinasas como EGFR, HER2 y HER3 y varias mutaciones secundarias en el gen *ALK* como la L1196M (que es análoga a la T790M de *EGFR*) (Tang 2014). Los ITQ de segunda generación contra ALK como el ceretininib y el alectininib presentan mayor potencia que el crizotinib a la hora de bloquear ALK, incluso bloqueando la mutación L1196M y en otros mecanismos de resistencia, por este motivo estos ITQ se emplean como segunda línea de tratamiento cuando surgen resistencias al crizotinib (Kort 2015; Kodama 2014).

El oncogén *ROS1* presenta alteraciones entre el 1 y el 2% de los casos de CPNM. Aproximadamente existe un 50% de similitud entre ALK y ROS1, por este motivo los ITQs contra ALK también son eficaces bloqueando ROS1 (Bergethon 2012; Ou 2012). Sin embargo, a largo plazo la eficacia se encuentra limitada, de nuevo, por la aparición de mecanismos de resistencia.

e) **Inmunoterapia**

Una de las terapias antitumorales más recientes e innovadoras es el bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario. Las células tumorales son capaces de incorporar mecanismos de evasión para modular estos puntos de control que inhiben el sistema inmune, regulando su mantenimiento, la duración y la intensidad de la respuesta inmunitaria, sobre todo en la actividad de los linfocitos T (Pardoll 2012). Actualmente las terapias inmunitarias están dirigidas contra PD1 y su ligando PDL1, donde hay aprobados para su uso 4 anticuerpos monoclonales. En pacientes con cáncer, se ha detectado niveles elevados de PD1 en los linfocitos T, y aquellos tumores que expresan su ligando PDL1 se asociaban con un mal pronóstico, pero actualmente se correlaciona con una buena respuesta a los anticuerpos monoclonales contra PD1/PDL1.

Los anticuerpos monoclonales aprobados son el nivolumab, el pembrolizumab, el atezolizumab y el durvalumab. Los dos primeros actúan contra PD-1, impidiendo la unión con PDL1 y bloqueando así las señales inhibitorias inducidas por el receptor unido a su ligando en los linfocitos T (Brahmer 2015; Garon 2015). Mientras que el atezolizumab y el durvalumab actúan contra PDL1 (Fehrenbacher 2016; Antonia 2017). La terapia inmunitaria ya se está empleando en ensayos clínicos para evaluar su eficacia en monoterapia y como tratamiento de primera línea (Gettinger 2016), o en combinación con quimioterapias (Hall 2016) incluso como terapia neoadyuvante (Forde 2016). Actualmente los 4

anticuerpos están aprobados para casos de CPNM metastásico en el ya que ha habido una recaída.

f) Terapias epigenéticas

Los cambios epigenéticos como la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas son reversibles. Esto permite a las células tumorales adaptarse de forma rápida a cambios del microambiente tumoral, permitiendo activar o reprimir ciertos genes que dirijan un fenotipo que favorezca su desarrollo y progresión incluso en presencia de quimioterapia o terapias dirigidas. El desarrollo de inhibidores que bloqueen estos moduladores epigenéticos ha buscado en todo momento solucionar estos problemas para dirigir las células a un fenotipo que favorezca la regresión del tumor, por ejemplo, reactivando genes supresores de tumores que epigenéticamente estaban reprimidos.

Los primeros ensayos clínicos que probaron las terapias epigenéticas (epifármacos) tuvieron unos resultados decepcionantes. Los inhibidores de la ADN-metiltransferasa (DNMTi), como la decitabina en monoterapia mostraron baja actividad y toxicidad (Williamson 1995; Schrump 2006; Cowan 2010). Los ensayos clínicos con inhibidores de la desacetilación de histonas (HDACi) como el pivaloiloximetil butirato, la romidepsina, el vorinostat o el entinostat no mostraron ninguna respuesta objetiva en monoterapia para el CPNM (Schrump 2008; Vansteenkiste 2008; Traynor 2009; Reid 2004). Igualmente, la combinación de estos dos grupos de inhibidores con cisplatino o con terapias dirigidas como los inhibidores de EGFR no aportaron ningún beneficio ni resultados prometedores (Schwartzmann 2000; Ramalingam 2010; Dasari 2013; Reguart 2014; Witta 2012).

La combinación de los DNMTi y los HDACi actúa sinérgicamente en modelos preclínicos (Belinsky 2003; Cameron 1999), lo que llevó al diseño de ensayos

clínicos siguiendo esta estrategia. Algunos ensayos clínicos han empezado a mostrar una primera señal del potencial de las epifármacos en el tratamiento del CPNM en un ensayo clínico de fase I/II que combina dosis bajas de azacitidina (DNMTi) y entinostat (HDACi) en pacientes de CPNM avanzado tratado previamente con quimioterapia (Juergens 2011). Principalmente el éxito de este ensayo se asoció al uso de dosis bajas de DNMTi que anteriormente había generado diversos efectos adversos, demostrando de este modo que la concentración necesaria para revertir la metilación del ADN tumoral es mucho más baja que la dosis citotóxica utilizada previamente (Azad 2013). Además, en el ensayo clínico fase I/II de Juergens y colaboradores se consiguió una respuesta completa, otra respuesta parcial, y una supervivencia libre de progresión de 7,4 semanas (Juergens 2011). Es importante destacar que se observó una mediana de supervivencia global inesperada de 8,6 meses en los 34 pacientes que completaron al menos un ciclo de tratamiento. Entre ellos, cuatro recibieron quimioterapia posterior que resultó en respuestas significativas importantes, incluidos dos pacientes que sobrevivieron 44 y 52 meses después de la terapia epigenética. En otro ensayo reseñable, un paciente tratado con inmunoterapia anti-PD1 inmediatamente después del fracaso de la combinación de los epifármacos experimentó una supervivencia extraordinaria de más de seis años después del inicio de tratamiento epigenético (Brahmer 2017).

Otros estudios han examinado el estado de metilación en el ADN circulante (ADNc) de cuatro genes supresores de tumores *APC*, *RASSF1A*, *CDH13* y *CDKN2A* (Brock 2008) y demostraron que la presencia de niveles elevados de metilación correlacionaba con una mayor recurrencia en pacientes tratados mediante resección quirúrgica. Además, la disminución de la metilación entre el día 0 y el día 29 del tratamiento con DNMTi correlaciona con un buen pronóstico. Estos datos integrados sugieren que los epifármacos pueden mejorar el pronóstico y la respuesta al tratamiento en combinación con otras terapias

(Azad 2013). Además, datos preclínicos sugieren que DNMTi y HDAC mejoran la inmunogenicidad del tumor y promueven la respuesta inmune (Kim 2014; Peng 2015; Zheng 2016). Por este motivo, varios ensayos actualmente prueban el uso secuencial de las terapias epigenéticas y la quimioterapia convencional o inmunoterapia (Forde 2014).

El análisis mutacional de genes implicados en la regulación epigenética es también una forma atractiva de comprender el impacto de las alteraciones epigenéticas y definir nuevas dianas terapéuticas. Las mutaciones inactivadoras en la proteína BRG1/SMARCA4, como hemos mencionado en apartados anteriores, ocurren entorno al 10% de los casos de CPNM. Así, la presencia de estas mutaciones identificaría un patrón de remodelación de la cromatina aberrante que dirige funcionalidades oncogénicas (Medina 2004; Imielinski 2012; Orvis 2014; Song 2014). En este sentido, El CPNM con *SMARCA4* mutado depende de la actividad de la aurora kinasa A (AURKA) y el uso de inhibidores de AURKA puede representar una estrategia terapéutica dirigida efectiva (Tagal 2017). Además, las mutaciones de *SMARCA4* en modelos preclínicos de CPNM predicen una mayor sensibilidad a inhibidores de la topoisomerasa II en combinación con la inhibición de EZH2 (Fillmore 2015).

Las terapias epigenéticas también se han empleado en algunos estudios para revertir los mecanismos de resistencia adquiridas a la quimioterapia convencional en el contexto del CPNM. El análisis integrado de la metilación del ADN y el perfil de la expresión génica mostraron que los genes candidatos implicados en la resistencia al cisplatino están regulados epigenéticamente, como por ejemplo la represión de *IGFBP3* mediada por la hipermetilación de su promotor (Ibanez de Caceres 2010; Walter 2012; Chang 2010; Zhang 2014). De este modo, la combinación de dosis bajas de los DNMTi y HDACi como azacitidina y tricostatina A, respectivamente, pueden revertir la resistencia al

cisplatino a través de la desmetilación y la reexpresión de estos genes implicados en la resistencia a cisplatino (Zhang 2014).

1.2.7 Mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR

Los avances terapéuticos en el desarrollo de las terapias dirigidas han supuesto una mejora de la supervivencia en el CPNM. Sin embargo, el pronóstico sigue siendo malo, debido principalmente a la detección tardía del tumor, que se detecta en estadios avanzados, cuando la sintomatología ya es evidente y donde más de un 75 % de los casos presentan metástasis (Minna 2002). Además, otra complicación que surge es la aparición de resistencias al tratamiento con ITQs del CPNM con EGFR mutado. En algunos casos el tumor no presenta respuesta alguna desde el inicio del tratamiento, presentando resistencia innata. En otros, pese a las buenas respuestas iniciales se produce una recaída mediante una resistencia adquirida, que se ha intentado paliar con aumentos de dosis. Normalmente esta sobredosificación provoca la aparición de efectos adversos con mayor frecuencia y, además, no ha demostrado efectos positivos ni mejora el pronóstico.

a) Resistencia asociada a mecanismos genéticos

Como ya hemos explicado en apartados anteriores, el principal mecanismo de resistencia implica la reactivación de EGFR aun en presencia del inhibidor, normalmente por nuevas mutaciones en el propio gen *EGFR*. De este modo, cerca del 50 % de los casos tratados con ITQs de primera y segunda generación desarrollan la mutación T790M como principal mecanismo de resistencia, que en la mayoría de los casos aparece durante el tratamiento con los ITQs (Figura 10). No obstante, aunque con menos frecuencia, puede encontrarse en muestras de CPNM previo al inicio tratamiento, aportando una resistencia innata a los ITQs de primera y segunda generación. Normalmente, cuando la mutación

T790M se detecta antes del tratamiento suele asociarse con otra mutación de *EGFR* como la delección del exón 19 o la sustitución L858R. Además, aunque el 90% de las mutaciones secundarias de *EGFR* corresponden a esta mutación T790M, existen otras mutaciones de *EGFR* asociadas con la resistencia adquirida a los ITQs, como la L747S, D761Y y la T854A, poco frecuentes y actualmente sin relevancia clínica (Costa 2007; Bean 2007; Balak 2006). En el caso de los ITQs de tercera generación, como el osimertinib, indicados para el tratamiento de la mutación T790M, el principal mecanismo de resistencia genético es el desarrollo de una tercera mutación en *EGFR*, la sustitución C797S (Jia 2016).

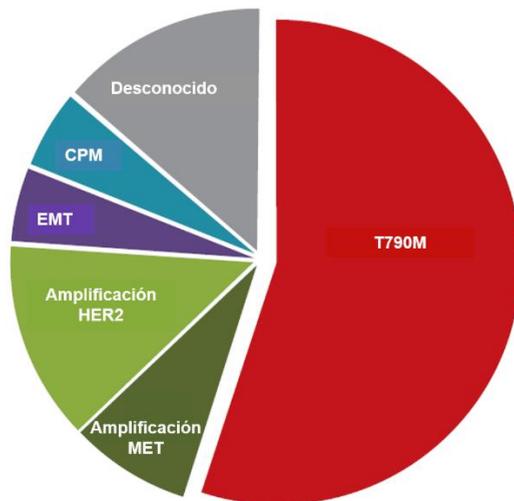


Figura 10. Principales mecanismos de resistencia a los ITQs de primera generación de EGFR descritos en el CPNM con EGFR mutado. Adaptado de (Cortot 2014).

Otros mecanismos de resistencia están asociados a alteraciones genéticas que dan lugar a la activación de otras rutas de proliferación y supervivencia celulares, como la amplificación de *MET*, el segundo mecanismo de resistencia más común, incluyendo a los ITQs de tercera generación (Ou 2017; Le 2018). La amplificación de *MET* aumenta la fosforilación de HER2, que produce la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR aunque esté presente el ITQ de EGFR (Engelman 2007 a). Para conseguir frenar la progresión del tumor, en estos casos

no basta con emplear inhibidores de MET, sino que es necesario hacer el tratamiento en combinación con los ITQs de EGFR. Otro ejemplo es la amplificación de *HER2* en el AC de pulmón *EGFR* mutante, que confiere resistencia al afatinib, un ITQ que bloquea EGFR y HER2, mientras que en los casos de silenciamiento de *HER2* confiere un aumento de sensibilidad al afatinib (Takezawa 2012). Algunos mecanismos de resistencia novedosos han sido descubiertos recientemente en pacientes tratados con osimertinib, donde un porcentaje alto de pacientes pierde la mutación T790M y desarrolla otras mutaciones que dirigen el tumor, algunas ya conocidas por las resistencias adquiridas por ITQs de primera generación como la amplificación de *MET*, mutaciones de *PIK3CA* y *BRAF*, y otras mutaciones que no se habían descrito hasta ahora, que afectan a *RET*, *FGFR* y *KRAS* (Oxnard 2018).

b) Resistencia asociada a mecanismos epigenéticos

Tal y como señalábamos en la Figura 10, existen distintos mecanismos capaces de inducir resistencia a los ITQs de EGFR en ausencia de nuevas modificaciones genéticas, se tratan de transformaciones fenotípicas reguladas por mecanismos epigenéticos. A grandes rasgos, podemos clasificar en dos clases diferentes el cambio de fenotipo asociado a resistencia a ITQ: la transición a CPM y la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Sequist 2011).

La transición del CPNM *EGFR* mutante a CPM tiene lugar entre un 2 y un 14% de los casos de resistencia adquirida a los ITQs de *EGFR* (Sequist 2011). Además, estos tumores mantienen la mutación *EGFR* original en la transición a CPM, lo cual sugiere que este proceso es una evolución del tumor inicial. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta transición de fenotipo no son bien conocidos. Algunos de los casos no están mediados por mecanismos epigenéticos, sino por la pérdida del gen supresor de tumores *RBI*, generando la

transición a CPM y la resistencia adquirida a los ITQs en algunos AC EGFR mutantes (Niederst 2015).

La transición epitelio-mesenquimal es un proceso asociado a la capacidad invasiva, las metástasis, la resistencia a los tratamientos y en definitiva a la agresividad tumoral. A nivel molecular, es un complejo programa transcripcional en el que las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal y pierden distintas proteínas de unión intercelular entre las que cabe destacar la E-cadherina (CDH1) y la molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM). Dada su relevancia para esta tesis doctoral, en el siguiente apartado procederemos a desarrollar de forma más detallada algunas de sus características más importantes, sobre todo a aquellas que se asocian a la resistencia a los ITQs de EGFR, así como su relación con los mecanismos de remodelación de la cromatina y el control de la expresión génica.

2. Transición epitelio-mesenquimal

La transición epitelial-mesenquimal (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*), es un programa transcripcional de transdiferenciación que transforma las células con fenotipo epitelial en células mesenquimales. El proceso inverso se conoce como transición mesenquimal-epitelial o MET (del inglés *mesenchymal-epithelial transition*). La EMT es un proceso que en condiciones fisiológicas tiene lugar durante el desarrollo embrionario, cuando las células pueden hacer la transición entre los estados epiteliales y mesenquimales de una manera altamente plástica y dinámica. De esta manera, las células de la cresta neural localizadas en el tubo neural dorsal migran a diferentes zonas durante el desarrollo embrionario y se diferencian a distintos tipos celulares para producir tejidos y órganos (Thiery 2009).

La EMT se ejecuta en respuesta a factores de señalización pleiotrópicos que inducen la expresión de factores de transcripción específicos (*transcription factors*, TFs) que denominaremos EMT-TF (como por ejemplo, SNAI1, SLUG, ZEB1/2, TWIST1/2, entre otros) y micro-ARNs (miRNAs), junto a otros reguladores epigenéticos y modificaciones postraduccionales formando una compleja red de interacciones moleculares que todavía no ha sido diseccionada en su totalidad.

En función del contexto temporal y tisular, podemos describir tres tipos diferentes de EMT: la tipo 1 tiene lugar durante el desarrollo embrionario; la 2 durante la cicatrización de heridas, la regeneración de órganos y en la fibrosis; por último, la de tipo 3 se trata de una forma aberrante asociada a la progresión y el desarrollo tumoral y que se asocia con la adquisición de características de células madre tumorales (*cancer stem cells* o CSC). De hecho, los evidentes paralelismos entre la plasticidad celular durante el desarrollo embrionario y la progresión de los carcinomas son los que llevaron a la proposición de que la EMT es un motor central de las neoplasias tumorales derivadas de los epitelios (Cano et al., 2000; Thiery, 2002). Desde entonces, se ha demostrado que la EMT desencadena la disociación de las células tumorales de los carcinomas primarios, que posteriormente migran y se diseminan a sitios distantes. Significativamente, se cree que el MET provoca el cese de la migración, induciendo a las mismas células a proliferar y desarrollar el nuevo foco metastásico (Nieto 2016).

En todos estos procesos en los que se activa el programa EMT, se inducen cambios en múltiples aspectos fundamentales de la morfología y fisiología celulares, que incluyen alteraciones en la organización del citoesqueleto y la morfología celular, de formas escamosas, cuboidales o columnares a formas alargadas; la disolución de las uniones intercelulares epiteliales, incluidas las uniones estrechas (TJPs, *tight junction proteins*), adherentes (CDH1) e

integrinas; la pérdida de polaridad apical-basal y ganancia concomitante de polaridad frontal-posterior; la adquisición de motilidad, así como la capacidad de degradar y reorganizar la matriz extracelular (ECM), lo que permite la invasión celular; y la reconfiguración de los patrones de expresión génica de centenares de genes (Figura 11) (Thiery 2009; Taube 2010; Ye 2015).

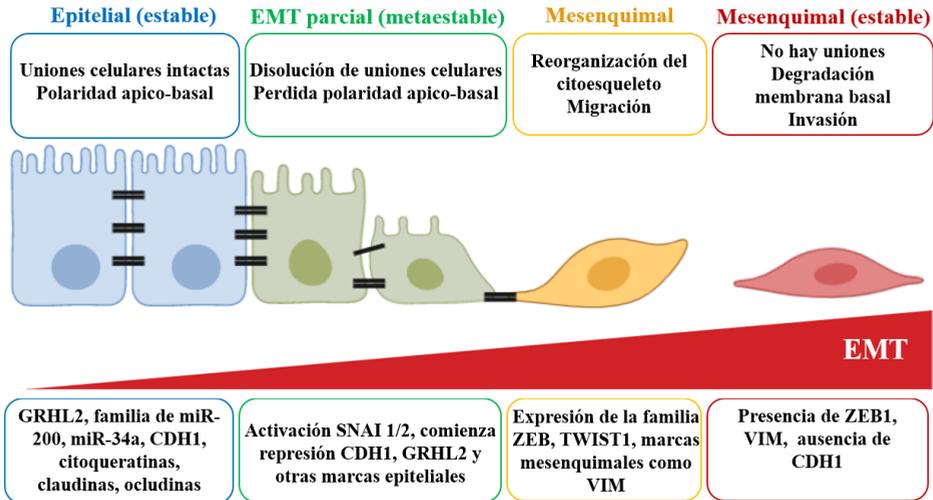


Figura 11. Esquema de las distintas fases de transición del programa EMT. Adaptado de (Nieto 2016). Figura elaborada mediante BioRender (BioRender, <https://biorender.com/>).

Las células epiteliales presentan distintos tipos de citoqueratinas que dan lugar a los filamentos intermedios, mientras que las mesenquimales, expresan el filamento intermedio vimentina (VIM) que es un marcador canónico del fenotipo mesenquimal. Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, en el EMT se produce la represión de distintas proteínas de adhesión y unión intercelular y de los complejos de polarización. Por este motivo, una de las características más comunes en la activación del fenotipo mesenquimal durante la EMT es la represión de CDH1, esta pérdida de proteína se asocia con un mal pronóstico y metástasis en pacientes, junto con la aparición de la N-cadherina (CDH2),

disminuyendo la adhesión entre las células (Mareel 1992; Birchmeier 1994; Thiery 2009; Gravdal 2007; Zeisberg 2009).

Varios estímulos extracelulares junto con sus correspondientes vías de señalización intracelular están implicados en la inducción de EMT. El papel central de la señalización de TGF β -SMAD en múltiples modelos diferentes de EMT ha sido bien establecido y será detallado en la sección 2.1.1 (Zavadil 2005; Xu 2009). Además, otras vías de señalización, incluida la vía canónica o no canónica de WNT, receptores con actividad tirosina quinasa y las vías de señalización de integrina-ECM, también pueden contribuir de forma crítica a la inducción de EMT en una gran variedad de contextos tisulares de forma fisiológica, como por ejemplo la cicatrización de las heridas (Lamouille 2014). Es importante destacar que el proceso EMT que opera en las células de carcinoma *in vivo* a menudo, se desencadena por señales específicas liberadas por las células del estroma en el microambiente del tumor, algunas de las cuales también están involucradas en diversas respuestas inflamatorias e hipóxicas (Quail 2013). Además, tanto las células epiteliales no neoplásicas como las neoplásicas pueden activar el programa EMT en diferentes grados, a menudo adquiriendo muchos, pero no todos, de los rasgos asociados con el programa canónico.

2.1 EMT y cáncer

En el contexto del cáncer, la EMT se ha tendido a simplificar en exceso, al considerarla como una ganancia de marcadores mesenquimales asociada a la pérdida completa de las características epiteliales, generando así la falsa percepción de que se trata de una transición entre dos estados alternativos, de manera absoluta y excluyente (Hay 1995). Sin embargo, la EMT aberrante asociada a la progresión tumoral presenta una complejidad mucho mayor, y la realidad es que generalmente produce células que se encuentran en un amplio

espectro de metaestados fenotípicos intermedios y reversibles, hecho que les confiere una gran plasticidad. Dicho de otra manera, las células que activan el programa EMT pueden adquirir de manera progresiva y dinámica, diferentes grados de carácter mesenquimal, y de hecho rara vez eliminan todas y cada una de sus características epiteliales preexistentes. En consecuencia, las células neoplásicas se encuentran en un estado en el que coexpresan marcadores mesenquimales recién adquiridos junto con marcadores epiteliales, a menudo denominado "EMT parcial" (Micalizzi 2010; Bednarz-Knoll 2012). Las células normales y neoplásicas pueden residir solo de manera metaestable en estos estados intermedios, y así pueden emprender la transición rápida a fenotipos totalmente epiteliales o mesenquimales. Así, las células de carcinoma son capaces de retroceder a través del programa MET para regresar a metaestados epiteliales durante la progresión tumoral. En muchos tipos diferentes de carcinomas, pese a que la mayoría de células expresan características epiteliales, las células tumorales localizadas en el frente invasivo del tumor primario con frecuencia presentan signos de activación de EMT, incluida la represión de CDH1, mientras que las células de áreas centrales generalmente muestran muchos rasgos epiteliales y mantienen las uniones intercelulares (Weinstein 1976; Gabbert 1985). Esta observación, junto con las interconversiones dinámicas entre las células tumorales "líderes" y los "seguidores" que se ha demostrado que ocurren durante el proceso de invasión del carcinoma (Cheung 2013), demuestran la existencia de una plasticidad de los fenotipos celulares y, por lo tanto, una reversibilidad de los programas de EMT. En resumen, las células tumorales son capaces de activar de manera flexible los programas EMT y MET a lo largo del proceso de metástasis con el fin de lograr la colonización en sitios distantes. En los carcinomas, todos estos cambios son a menudo instigados por señales contextuales que se originan en el microambiente tumoral (Figura 12).

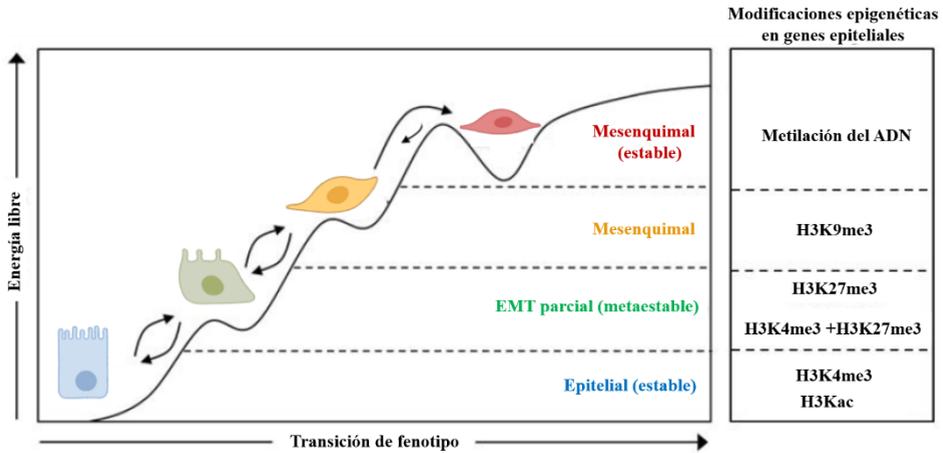


Figura 12. Modelización de la plasticidad del programa EMT asociada a las modificaciones epigenéticas de genes epiteliales en modelos experimentales de carcinoma mamario. Adaptado de (Tam 2013). Figura elaborada mediante BioRender (BioRender, <https://biorender.com/>).

2.1.1 Activación del programa EMT

Existen numerosos estímulos extracelulares capaces de activar y mantener el EMT, actuando de forma autocrina o paracrina (Acloque 2009; Thiery 2002; Moustakas 2007). El principal inductor de EMT es el factor de crecimiento transformante 1 o TGF β 1, tanto en el desarrollo embrionario como en la progresión tumoral (Zavadil 2005; Taylor 2010). El TGF β 1 es secretado por las células tumorales o bien por los miofibroblastos presentes en el microambiente tumoral. Al liberarse al exterior, puede interactuar con dos receptores distintos (TGFBR1 y TGFBR2), ambos presentan un dominio serín-treonín quinasa que al unirse con su ligando fosforilan y activan las proteínas SMAD2 y SMAD3. Después, estas proteínas forman complejos con SMAD4 permitiendo su translocación al núcleo y la regulación de la expresión de distintos genes implicados en la diferenciación celular. En un gran número de carcinomas se encuentra sobreactivada esta vía de inducción del programa EMT que promueve la invasión y la metástasis (Figura 13) (Han 2005; Massagué 2012).

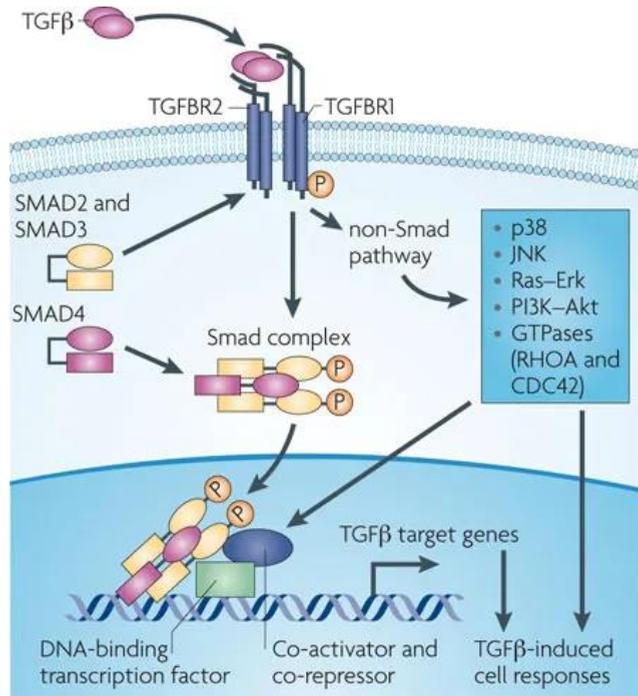


Figura 13. Vía de señalización del TGF-beta. Adaptado de (Ikushima 2010).

Además, las proteínas SMAD, al ser fosforiladas, activan la expresión de genes mesenquimales de forma directa, como la vimentina, la fibronectina y el colágeno alfa tipo I (Kaimori 2007). El TGFβ1 también es capaz de inducir EMT a través de otras vías de transducción de señales, como la activación de GTPasas similares a RHO, y activando las rutas de MAPK y PI3K. La activación de PI3K mediante el TGFβ1 produce la activación de AKT (Derynck 2003) y posteriormente la de mTOR en células epiteliales, provocando un aumento de la síntesis de proteínas y del tamaño celular, además de incrementar la motilidad y su capacidad de invasión (Lamouille 2011).

Por otra parte, existen otras vías secundarias que participan en la inducción del programa EMT, algunas de estas vías son WNT y NOTCH, citoquinas como la IL-6, la prostaglandina E2 (PGE2), y factores de crecimiento como EGF, HGF,

FGF, VEGF o PDGF (Reya 2005; Vermeulen 2010; Brabletz 2011; Hardy 2010). Normalmente, el programa EMT es capaz de activarse mediante una gran variedad de estímulos paracrinos que se combinan entre sí, por lo que solo es posible su activación completa cuando numerosos prerequisites tienen lugar en la misma célula, lo que eleva la complejidad de su estudio sistemático (Thiery 2009).

2.1.2 Regulación transcripcional y plasticidad del programa EMT

El programa EMT se modula a diferentes niveles integrando modificaciones epigenéticas que regulan la actividad transcripcional, el *splicing* alternativo, la estabilidad de proteínas y la localización subcelular de éstas. Por lo tanto, los mecanismos que gobiernan las fases intermedias de EMT no son lineales. A pesar de los esfuerzos para identificar redes reguladoras comunes en el desarrollo normal y en la enfermedad, está claro que algunas vías pueden ser únicas para dar un evento EMT de manera específica en un tejido o tumor en particular. Gran parte del conocimiento sobre la regulación transcripcional de la EMT se ha centrado durante años en el estudio de la represión de la molécula de adhesión prototípica, la E-cadherina o CDH1 en los carcinomas mamarios (Thiery, 2009; Lamouille, 2014).

Tanto en las células normales como en las neoplásicas, las diversas vías de transducción de señales pro-EMT convergen en la activación de un grupo relativamente pequeño de factores de transcripción (TFs) que orquestan los cambios de expresión génica (De Craene 2013). Estos EMT-TFs, generalmente se pueden clasificar en una de estas tres familias de proteínas que interaccionan con el ADN: las SNAIL (incluidos SNAIL/SNAI1 y SLUG/SNAI2); las ZEB (ZEB1 y ZEB2); y las proteínas básicas hélice-bucle-hélice (TWIST1, TWIST2 y TCF3) (De Craene 2013). Sin embargo, en ciertos contextos, otros factores de

transcripción, como PRRX1, YAP1/TAZ y SOX4, también tienen roles críticos en la EMT. Estos reguladores maestros de los programas de EMT gobiernan la transcripción génica mediante la activación o represión del promotor y la modificación de la estructura de la cromatina (De Craene 2013). Los resultados finales son la supresión, en diversos grados, de genes asociados con el fenotipo epitelial, como los que codifican CDH1 y citoqueratinas, claudinas, desmoplaquinas, ocludinas y placofilinas, favoreciendo la pérdida de uniones adherentes y uniones estrechas apicales (Huang 2012), y la sobreexpresión de genes asociados con el fenotipo mesenquimal, incluidos los que codifican N-cadherina (CDH2), fibronectina (FN1) y vimentina (VIM) (De Craene 2013).

Los EMT-TFs a menudo actúan cooperativamente para regular la expresión de genes diana comunes y, además, con frecuencia controlan la expresión de los demás EMT-TFs (De Craene 2013; Nieto 2016). Por ejemplo, SNAI1 es un regulador ascendente que induce la expresión de muchos otros EMT-TFs, incluidos SLUG, ZEB1 y TWIST1. Por otro lado, TCF3 parece funcionar como un efector situado varios eslabones por debajo del resto, cuya expresión es inducida por otros EMT-TFs, como SNAI1, SLUG y ZEB1 (Taube 2010; Hugo 2011). Debido a estas interacciones recíprocas, la expresión experimental de un EMT-TF generalmente da como resultado una regulación positiva de otros EMT-TFs, lo que finalmente induce, en muchos casos, el espectro completo de los cambios asociados a la EMT. Tales cambios coordinados y multifacéticos en el fenotipo celular pueden ocultar las diferencias funcionales específicas de cada EMT-TF, ya que parecen estar especializados para orquestrar distintos subprogramas del extenso programa canónico de la EMT.

Además de las vías de señalización intracelulares, los EMT-TFs también son regulados por otros mecanismos. En particular, diversos estudios han resaltado las importantes funciones de los microARNs (miRNA), pequeños ARNs no

codificantes que suprimen la expresión de proteínas específicas a través de una combinación de desestabilización de ARN mensajero (ARNm) y represión traduccional (Díaz-Lopez 2014). Entre los ejemplos mejor caracterizados de miRNAs que controlan el programa EMT están los miembros de la familia miR-200, que regulan negativamente la expresión de las proteínas ZEB1 y ZEB2; Curiosamente, la expresión de miR-200 es reprimida, recíprocamente, por ZEB1 y ZEB2, estableciendo un circuito de retroalimentación doble negativo (Burk 2008; Gregory 2008). Del mismo modo, la expresión de SNAI1 es atenuada por miembros de la familia miR-34, que, a su vez, es suprimida por SNAI1, formando otro ciclo de retroalimentación reguladora doble negativo entre EMT-TFs y miRNAs (Kim 2011; Siemens 2011). La expresión de todos estos reguladores del programa EMT se activan de manera secuencial en función de los estímulos extracelulares que inducen la activación del programa EMT (Barrallo 2005).

Como ya hemos reiterado varias veces, una de las características más comunes en el programa EMT es la represión de CDH1. Esta proteína se considera una piedra angular del fenotipo epitelial y, por este motivo, su represión representa un sello distintivo de la firma EMT. Varios estudios han demostrado que distintos EMT-TFs son reclutados en el promotor de *CDH1* uniéndose normalmente a regiones *enhancer-box* (*E-box*) tras la activación de un programa EMT, reprimiendo así su transcripción mediante el reclutamiento de distintos reguladores epigenéticos (Peinado 2007) (Figura 14). Sin embargo, el papel preciso de estos complejos reguladores epigenéticos para facilitar y estabilizar estos cambios es menos conocido. Estudios más recientes han revelado que el silenciamiento epigenético de *CDH1* es altamente complejo y orquestado por una variedad de enzimas modificadoras de histonas que interaccionan junto con los EMT-TFs para conferir diversos grados de represión del gen *CDH1*.

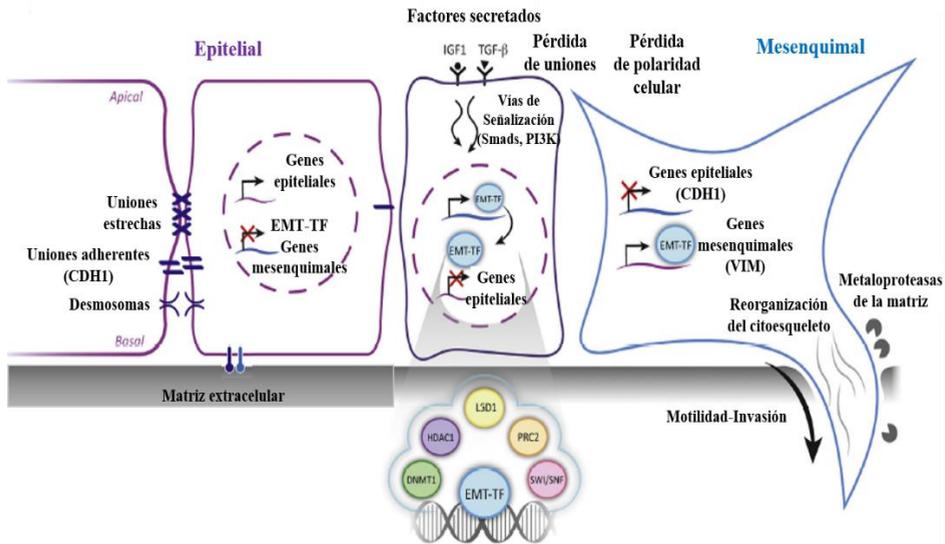


Figura 14. Esquema resumen del programa EMT y su regulación transcripcional. Adaptado de (Skrypek 2017).

Debido a que la unión de los EMT-TF a los genes es transitoria, la reprogramación epigenética proporciona una regulación a largo plazo, mientras que a su vez es un proceso reversible, lo que es críticamente importante en el contexto de la plasticidad celular. Se han descrito varias capas de regulación epigenética orquestadas por los EMT-TFs en modelos celulares de carcinoma mamario (Liu 2013). De este modo, la cromatina se remodela durante la EMT, donde los genes epiteliales cambian de un estado activo, definidos por la acetilación y metilación diferencial de histonas generando estados intermedios de activación determinados por la presencia de marcas de activación H3K4me3 y de represión H3K27me3 introducidas mediante el reclutamiento del PRC2, para finalmente cerrar y reprimir su transcripción mediante las marcas de represión H3K27me3, H3K9me3 y finalmente la metilación del promotor. Por otro lado, en los genes mesenquimales ocurre el proceso contrario, pasando de marcas de represión (H3K27me3 y H3K9me3) a estados de la cromatina cada vez más abiertos que permiten la activación y expresión del gen. Esta sucesión

de modificaciones epigenéticas dirigidas por los EMT-TFs contribuyen a la estabilidad y mantenimiento de la represión de los genes epiteliales y a la activación de genes mesenquimales, favoreciendo así la transición EMT (Tam 2013).

SNAI1 y SLUG pueden unirse directamente a las regiones *E-box* del promotor de *CDH1*, activando así el programa EMT. La unión al ADN de estos EMT-TFs permite el reclutamiento del complejo represor PRC2 cuya subunidad catalítica es la metiltransferasa de H3K27 EZH2, las HDAC1, 2 y 3, la desmetilasa lisina-específica 1 de histonas (LSD1), que desmetila la H3K4 y la H3K9, las metiltransferasas de H3K9 G9A y SUV39H1 (Herranz 2008; Tong 2012; Ferrari-Amorotti 2013; Dong 2012; Dong 2013). Las modificaciones de las histonas favorecen posteriormente el reclutamiento de las DNMTs para metilar el promotor de *CDH1*, de este modo cada modificación permite la represión gradual de *CDH1*. Gran parte de las vías de activación del programa EMT (como la vía del TGF β 1, WNT, NOTCH y otros factores de crecimiento) cooperan entre ellas para iniciar la transición activando la expresión de SNAI1 como el primer EMT-TF que dispara este programa, favoreciendo la posterior expresión de genes mesenquimales (*CDH2*, *VIM*) y del resto de EMT-TFs *TWIST*, *ZEB1* y *ZEB2*, por este motivo se considera SNAI1 como un factor necesario para el inicio del EMT, mientras otros factores que se expresan de forma más tardía como *ZEB1* son esenciales para el mantenimiento del fenotipo mesenquimal (Peinado 2007; Lamouille 2014). Además, SNAI1 también es capaz de reprimir *CDH1* cooperando con el complejo SMAD3-SMAD4 mediado por TGF β 1.

Los homo o heterodímeros básicos hélice–bucle–hélice *TWIST1* y *2* son capaces de reprimir genes epiteliales y activar genes mesenquimales como *CDH2* y *VIM* al igual que SNAI1, pero mediante mecanismos indirectos, ya que no son capaces de unirse de forma directa al ADN (Xu 2009). A través de la asociación

con el complejo desacetilasa remodelador del nucleosoma (NuRD) reprimen la expresión de *CDH1* de forma independiente a *SNAI1* (Yang 2008; Fu 2011). Distintas vías de señalización inducen la expresión de los TWISTs en procesos como el desarrollo embrionario y en la carcinogénesis, siendo uno de los más destacados es el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1A), promoviendo la EMT y la diseminación e invasión de las células tumorales (Yang 2008; Liu 2015).

Por último, los EMT-TFs ZEB1 y 2 reconocen secuencias de ADN en las *E-box* de promotores con el fin de regular la transcripción génica. ZEB1 es capaz de unirse al promotor de *CDH1* y reclutar a la proteína represora CTBP1 (*C-Terminal Binding Protein 1*), que a su vez recluta al PRC2 de forma indirecta para bloquear la expresión de *CDH1* (Liu 2014). Además, estos EMT-TFs reclutan otros remodeladores como la desmetilasa LSD1, las HDAC1 y 2, el complejo NuRD y la DNMT1 (Wang 2007; Aghdassi 2012; Goossens 2017; Fukagawa 2015). Por otro lado, ZEB1 interacciona con *BRG1/SMARCA4* que forma parte del complejo SWI/SNF, facilitando el acceso de ZEB1 al promotor de *CDH1* y permitiendo así su represión (Sánchez-Tilló 2010). Por último, es bien conocido que la expresión de ZEB1 en ocasiones tiene lugar tras la activación de *SNAI1*, ya que se encuentra entre sus dianas transcripcionales. Además, TWIST1 también coopera junto a *SNAI1* en la activación transcripcional de ZEB1 (Dave 2011).

Tal y como hemos citado en varias ocasiones a lo largo de esta Introducción, el complejo PRC2 es un regulador epigenético reclutado por numerosos EMT-TF con el fin de reprimir genes epiteliales como *CDH1* mediante la trimetilación de la marca H3K27 a través de la metiltransferasa de histonas EZH2 (Cao 2008; Herranz 2008; Tiwari 2013). Sin embargo, pese a que su papel como regulador positivo en el programa EMT es bien conocido, en ciertos tumores este puede

ejercer el efecto contrario, lo que sugiere que según el contexto y el tipo de tejido tumoral el PRC2 puede ejercer un efecto pro o anti-EMT (Cardenas 2016; Serresi 2016). El estado de metilación de H3K27 está regulado también por otros modificadores (borradores; sección 1.1.1) que se encargan de desmetilarla, como son KDM6A y la KDM6B. Estas dos desmetilasas permiten la activación transcripcional de genes eliminando la marca de represión H3K27me3 y ejerciendo por tanto una actividad opuesta a la de EZH2. Recientemente se han realizado distintos estudios que las relacionan con los programas EMT, actuando KDM6B como un promotor y KDM6A como un inhibidor de EMT en modelos de cáncer de mama y de cáncer de pulmón (Ramados 2012; Choi 2015; Taube 2017; Terashima 2017) En otros modelos como el carcinoma hepatocelular y de glioma KDM6B también promueve EMT (Tang 2016; Sui 2019). Todas estas observaciones, realizadas en diferentes modelos celulares, sugieren que los moduladores de la marca H3K27me3 (PRC2, KDM6A y KDM6B) tienen un papel dual en la inducción del programa EMT en función del tipo celular. Sin embargo, existen muy pocos estudios que aborden estas interacciones en la inducción del programa EMT y que permitan conocer de forma precisa qué papel que juegan estos tres elementos en el cáncer según el contexto y el tipo de tumor. Uno de los objetivos de esta tesis doctoral es caracterizar su contribución al fenotipo EMT asociado a la resistencia a ITQs en el contexto del AC pulmonar.

2.1.3 Invasión-metástasis y fenotipo CSC inducido por EMT

La diseminación de las células tumorales procedentes del tumor primario y la posterior formación de nuevas colonias tumorales en localizaciones distantes es un proceso de varios pasos conocido como la cascada de invasión y metástasis. (Fidler 2003; Gupta 2006; Talmadge 2010). Las etapas iniciales de invasión y diseminación permiten que las células tumorales malignas adquieran rasgos que

las capacitan para abandonar el tumor primario y viajar a tejidos distantes. La activación de la EMT es esencial en este proceso y no requiere de mutaciones adicionales (Thiery 2002; Morel 2012). Actualmente la definición de EMT está siendo reevaluada como un proceso de alta plasticidad necesario para la diseminación metastática. Por lo tanto, los programas EMT se ven cada vez más como células que residen en un espectro de múltiples estados intermedios que se encuentran entre los polos epiteliales y mesenquimales (Bednarz-Knoll 2012; Grosse-Wilde 2015; Li 2016; Nieto 2016). Es probable que, en algunos casos, los carcinomas metastáticos puedan exhibir propiedades mesenquimales plásticas que ayudan a su diseminación (Bonnomet 2012; Trimboli 2008), pero no hay un patrón general que se cumpla en todos ellos (Celià -Terrassa 2012).

De hecho, ya hemos señalado la gran cantidad de trabajos que inciden en la importancia de la "EMT parcial" y su papel en la progresión tumoral y la metástasis (Lundgren 2009; Jordan 2011; Bednarz-Knoll 2012; Sampson 2014; Grosse-Wilde 2015; Hong 2015; Schliekelman 2015). Por el contrario, la inducción de un estado completamente mesenquimal, como el que se logra experimentalmente a través de la sobreexpresión ectópica de los EMT-TFs produce células que han perdido la capacidad proliferativa y, por lo tanto, el poder formar colonias metastáticas (Ocaña 2012; Tsai 2012). Dicho de otra manera, la plasticidad fenotípica asociada a la malignidad reside en expresar metaestados intermedios dentro del espectro epitelial-mesenquimal que permiten transiciones reversibles (EMT y MET) y resulta crítica para la formación de colonias metastáticas y su subsiguiente crecimiento.

Muy relacionado con todo lo descrito anteriormente es el papel de la EMT en la formación de células madre cancerosas (CSC) o células iniciadoras de tumores, que son subpoblaciones celulares minoritarias capaces de generar nuevos tumores. Este concepto ha proporcionado un nuevo escenario sobre cómo los

mecanismos reguladores epigenéticos pueden contribuir a la diversidad fenotípica de distintas subpoblaciones de células cancerosas dentro de un tumor (Reya 2001; Bjerkvig 2005).

El concepto CSC intenta explicar la gran heterogeneidad intratumoral, y se basa en la noción de que existen diferentes subpoblaciones celulares fenotípicamente distintas que residen dentro de la misma masa tumoral organizadas en una jerarquía, de manera análoga a las células madre del tejido normal y con algunas características funcionales similares. De tal modo, las CSC presentan una plasticidad celular que les permite dirigir el fenotipo CSC mediante modificaciones epigenéticas con el fin de que las células tumorales se renueven por sí mismas y generar una nueva masa tumoral heterogénea con nuevas CSC y una población de células tumorales menos tumorigénicas (Avgustinova 2016). Otras características como el crecimiento continuo del tumor, la formación de metástasis y la recurrencia después de la terapia pueden atribuirse en gran medida a las subpoblaciones relativamente raras de CSC dentro de los tumores individuales (Brabletz 2005; Wicha 2006). La evidencia acumulada ha demostrado que las CSC son más resistentes que las no CSC a varios tipos de terapias convencionales, provocando la recaída clínica a causa de su capacidad de iniciación tumoral que permite la generación de nuevas masas tumorales (Bao 2006; Li 2008; Diehn 2009).

Los cambios epigenéticos que explican las diferencias fenotípicas entre CSC y no CSC apenas comienzan a descubrirse. En el caso de los carcinomas, es probable que la diferencia entre CSC y no CSC sea atribuible en gran medida al programa EMT (Polyak 2009; Medema 2013), ya que en varios carcinomas, como el de mama, donde son mejor conocidos y estudiados estos mecanismos, solo las células neoplásicas dentro de la subpoblación enriquecida con CSC exhiben aspectos de la activación del programa EMT (Mani 2008; Chen 2009;

Pang 2010; Mulholland 2012). La inducción forzada de un programa EMT, ya sea a través de la sobreexpresión de TWIST1 o SNAI1, o con el tratamiento con TGF β 1, confiere muchas propiedades de las CSC en las células tumorales epiteliales como un aumento sustancial su capacidad de iniciación tumoral (Mani 2008; Wellner 2009). Además, la activación del programa EMT confiere a estas células tumorales resistencia a muchos tipos de agentes terapéuticos, otro atributo importante de las CSC (Singh 2010; Holohan 2013). Otra propiedad inducida con el programa EMT es la expresión de marcadores de superficie celular específica de CSC, es decir, la expresión elevada y reducida de las glucoproteínas CD44 y CD24, respectivamente y una mayor capacidad para formar esferas en un cultivo en suspensión (Mani 2008). Estas observaciones, junto con las de una serie de estudios de seguimiento, han demostrado que la activación del programa EMT en células neoplásicas está estrechamente relacionada con la entrada en el estado CSC, en una amplia variedad de tipos de carcinoma humano, revelando efectos multifacéticos del programa EMT para impulsar el fenotipo maligno de las células de carcinoma (Scheel 2012).

2.1.1 Resistencia a fármacos y EMT

El programa EMT confiere resistencia a la muerte celular inducida por fármacos citotóxicos mediante distintos mecanismos, tanto en embriones como en células tumorales (Vega 2004; Thiery 2009), incluida la quimioterapia (Singh 2010). Incluso en estudios que encuentran una contribución limitada de la EMT a la hora de inducir metástasis, su papel como factor de quimiorresistencia es evidente (Fischer 2015; Zheng 2015). Los análisis de expresión génica de muestras tumorales procedentes de pacientes y las respuestas clínicas han demostrado una correlación muy significativa la firma transcripcional EMT y la resistencia al tratamiento. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de mama existe una estrecha asociación entre la resistencia a la quimioterapia una elevada

expresión de genes propios del estroma. Esta regulación positiva de la transcripción parece ser causada, en parte, por la activación del programa EMT en las células de carcinoma (Farmer 2009). En otro estudio con pacientes de carcinoma mamario basal la elevada expresión de genes mesenquimales se asoció a un peor pronóstico y al desarrollo de resistencias (Yauch 2005; Liedtke 2008). Sin embargo, los mecanismos implicados en la resistencia a la quimioterapia convencional inducida por EMT todavía no están bien definidos. Existe la posibilidad de que la quimioterapia genere un enriquecimiento de las células mesenquimales con características CSC, minoritarias antes de que la quimioterapia elimine el grueso del tumor formado por células epiteliales, o incluso que los agentes quimioterápicos activen directamente al programa EMT, como por ejemplo la adriamicina en modelos celulares de carcinoma mamario (Li 2011).

2.1.2 Resistencia a los ITQs de EGFR inducida por la EMT en el CPNM

Los primeros estudios que describían la teoría de la evolución clonal de los tumores fueron realizadas hace décadas (Nowell 1976). Durante el proceso de la carcinogénesis, las células tumorales adquieren distintas alteraciones tanto genéticas como epigenéticas. Las diferentes subpoblaciones celulares capaces de adaptarse a un microambiente tumoral adverso (y a la presión farmacológica) serán seleccionadas y expandidas, mientras que las subpoblaciones con menor capacidad de adaptación (o sensibles al tratamiento antitumoral) reducirán su número e incluso serán eliminadas (Solit 2010; Sharma 2010).

El desarrollo de ITQs de EGFR para el tratamiento de CPNM con mutaciones en *EGFR* y el desarrollo de resistencias que dan lugar a las recaídas clínicas son un buen ejemplo que demuestra esta hipótesis de la evolución clonal en el escenario heterogéneo del microambiente tumoral. Como ya mencionamos anteriormente,

los pacientes desarrollan resistencias a los ITQs de primera generación erlotinib y gefitinib mediante la adquisición de nuevas mutaciones en *EGFR* como la T790M (Sequist 2011); en ciertos casos pueden encontrarse subpoblaciones minoritarias con esta mutación ya presentes antes del tratamiento con ITQs de primera generación (Jonsson 2017; Soucheray 2015), que favorece su expansión y selección clonal. El osimertinib, indicado para el tratamiento de la mutación T790M de *EGFR*, acaba generando también resistencias como una tercera mutación de *EGFR* C797S (Jia 2016). En los últimos años el brigatinib ha demostrado ser capaz de superar este mecanismo de resistencia y actuar en pacientes con esta tercera mutación (Uchibori 2017; Thress 2015). Para añadir más complejidad, además de los mecanismos de resistencia genéticos tenemos que añadir a los epigenéticos, siendo los más frecuentes tras el tratamiento con ITQs la transición a CPM y la activación de EMT descritos en la sección 1.2.7 b (Sequist 2011).

La relación entre la EMT y la resistencia a ITQs es bien conocida desde hace algunos años. La represión de CDH1 se asocia con la resistencia adquirida al erlotinib en estudios *in vitro* de líneas celulares de CPNM (Suda 2011), y la resistencia al afatinib se asoció a su vez con la activación de la EMT con características de CSC (Hashida 2015). La sobreexpresión del miR-200, que es capaz de bloquear la expresión de ZEB1, ejerce un efecto antitumoral en las células con fenotipo EMT resistentes a ITQs (Sato 2017). En muestras de rebiopsias de pacientes que han desarrollado resistencias a los ITQs se puede detectar la sobreexpresión de ZEB1 (Yoshida 2016). Además, los resultados de un estudio diseñado para interrelacionar los perfiles de expresión génica y las respuestas a los inhibidores de EGFR o PI3K en muestras clínicas y en varias líneas celulares derivadas de pacientes con CPNM, se ha identificado una firma EMT compuesta por 76 genes con capacidad predictiva de resistencia clínica a los ITQs, destacando además la activación de vías de señalización

independientes de EGFR como el receptor AXL (Byers 2013). Otro estudio demostró que la reactivación de la de ERK1/2 promueve también el desarrollo del programa EMT y la supervivencia a los inhibidores de ITQs contra EGFR (Buonato 2014). También cabe destacar que otros compartimentos celulares del complejo microambiente tumoral, como son los fibroblastos asociados al tumor (*cancer associated fibroblasts*, CAFs) pueden actuar como promotores de la resistencia a los ITQs, liberando citoquinas y factores de crecimiento inductoras de la EMT, como el propio TGF β 1 (Crawford 2009).

De una manera u otra, todos estos estudios demuestran el importante papel del programa EMT en el desarrollo de resistencias a los ITQs de EGFR. Dado que existen múltiples mecanismos moleculares involucrados, tanto genéticos como epigenéticos, ya sean generados por la propia célula tumoral o por el microambiente que la rodea, y que algunos de ellos podrían ser accionables y modulables farmacológicamente, resulta muy atractiva la posibilidad de diseñar tratamientos que pudieran frenar o incluso revertir el fenómeno de la resistencia a los ITQs dirigida por la EMT, aumentando así su eficacia terapéutica. De la misma manera, las combinaciones que *a priori* pudieran resultar razonables en base a evidencias preclínicas en modelos celulares concretos, podrían promover ciertos mecanismos de adquisición de resistencia a los ITQs en los pacientes de CPNM. Por ejemplo, la combinación de pemetrexed con el gefitinib evita la aparición de resistencias asociadas al programa EMT en algunos modelos celulares (La Monica 2016). En modelos celulares de CPNM *EGFR* mutante, aparece la resistencia a los inhibidores de EGFR asociada al fenotipo mesenquimal mediante la activación de la vía AXL, y la combinación de inhibidores de AXL junto con los ITQs de EGFR fueron capaces de revertir la resistencia a los ITQs (Byers 2013). Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el tratamiento con gefitinib combinado con un inhibidor de TGF β 1R en modelos celulares de CPNM con EGFR mutado logra bloquear este

mecanismo de resistencia EMT-dependiente, pero favorece la expansión de la subpoblación T790M preexistente, sensible al osimertinib (Soucheray 2015). Más recientemente, y analizando los mismos modelos celulares con diferentes tecnologías *ómicas*, hemos identificado nuevos mecanismos de resistencia a los ITQs dirigido por la sobreexpresión del receptor de quimioquinas asociado a proteínas G CXCR7, que permite la reactivación de ERK1/2 asociada al programa EMT; el bloqueo de este receptor con inhibidores específicos podría ser de gran interés para prevenir el programa EMT en pacientes de CPNM tratados con ITQs de EGFR (Becker 2019).

Pese a todos estos esfuerzos, en la actualidad no disponemos de estrategias clínicamente viables que hayan conseguido retrasar o revertir de forma eficaz la resistencia a los ITQs, salvando el caso del osimertinib, activo frente a T790M, pero que también acaba desarrollando resistencias. Dado que el programa EMT es un proceso de reprogramación epigenética que confiere a las células tumorales una gran plasticidad y capacidad adaptativa, los moduladores epigenéticos suponen una opción terapéutica muy atractiva para mantener el fenotipo epitelial y la sensibilidad a los ITQs de EGFR. En este sentido, algunos estudios recientes en CPNM han explorado el uso de inhibidores de HDACs para revertir el fenotipo EMT en modelos celulares de CPNM *EGFR* mutante con resistencia a los ITQs (Weng 2019), y en combinación con ITQs en ensayos preclínicos cuando la resistencia a los ITQs ya se ha establecido (Yu 2017). Otro estudio demostró en modelos celulares de CPNM *EGFR* mutante resistente a los ITQs que la inhibición de la metiltransferasa de histonas G9a era capaz de resensibilizar las células a los ITQs mediante la reversión del fenotipo EMT (Wang 2018). Sin embargo, estos estudios son muy preliminares, utilizan pocos modelos celulares que no representan la heterogeneidad del CPNM dirigido por EGFR, y no permiten establecer conclusiones claras sobre la viabilidad de las terapias epigenéticas. Por tanto, sigue abierto un amplio campo de acción donde

son necesarios abordajes integrativos en paneles amplios líneas celulares, modelos animales y muestras de pacientes, para, por un lado, definir los determinantes epigenéticos que subyacen en la EMT y la resistencia adquirida a los ITQs, y personalizar combinaciones farmacológicas que pudieran prevenir o revertir el proceso.

Hipótesis y objetivos

La resistencia adquirida a las terapias dirigidas contra EGFR durante el tratamiento de los pacientes de AC pulmonar con EGFR mutado es un problema clínico grave. La enorme heterogeneidad genética y epigenética de los tumores es la responsable del desarrollo de múltiples y complejos mecanismos de resistencia.

En esta tesis doctoral planteamos el estudio de los mecanismos epigenéticos que subyacen a este fenómeno de una manera sistemática en un amplio panel de modelos celulares de AC pulmonar dirigidos por mutaciones activadoras de EGFR. Para ello, proponemos los siguientes objetivos:

1. Desarrollar nuevos modelos de resistencia adquirida al inhibidor irreversible de EGFR de 3ª generación osimertinib, activo frente a la mutación de resistencia a los inhibidores de 1ª generación erlotinib y gefitinib.
2. Realizar un metaanálisis de los datos transcriptómicos y epigenómicos de modelos de resistencia a inhibidores de 1ª generación disponibles para identificar potenciales reguladores epigenómicos.
3. Estudiar la contribución específica de estos reguladores epigenéticos en los modelos celulares de resistencia adquirida al osimertinib mediante herramientas de transducción génica y ensayos de biología celular y molecular.
4. Proponer nuevos tratamientos basados en fármacos epigenéticos capaces de prevenir o revertir la resistencia adquirida al osimertinib.

Material y métodos

1. Modelos experimentales

Para este trabajo se han empleado las líneas celulares tumorales de AC de pulmón con *EGFR* mutado: HCC827, HCC4006 y H1975 que proceden de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y las PC9 que proceden de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC). Además, a partir de ellas se desarrollaron líneas resistentes al ITQ de tercera generación osimertinib, empleando concentraciones crecientes desde el rango nanomolar hasta que eran capaces de crecer normalmente a concentraciones de 10 μM .

Tabla 2: Líneas celulares de CPNM empleadas como modelos de sensibilidad y resistencia a los ITQs de EGFR y su perfil mutacional.

Línea celular	Mutación	Línea resistente
HCC4006	Deleción del exón 19 (E747-A749), A750P	HCC4006-AZDR (osimertinib)
PC9	Deleción del exón 19 (E746-A750)	PC9-AZDR (osimertinib)
H1975	L858R/T790M	H1975-AZDR (osimertinib)
HCC827	Deleción del exón 19 (E746-A750)	HCC827-AZDR (osimertinib)

También, se utilizó la línea celular HEK 293 LTV, Que es una línea embrionaria de riñón que se emplea para el empaquetamiento de partículas lentivirales.

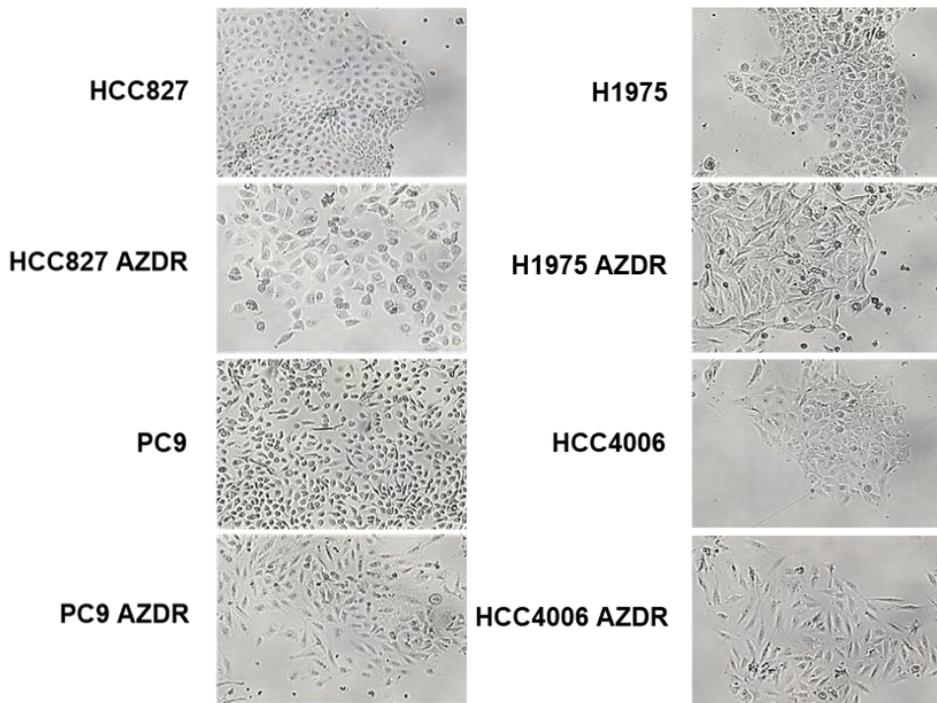


Figura 15. Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas. Las imágenes fueron tomadas con una confluencia similar entre cada pareja ITQ sensible-resistente, siendo la confluencia alrededor de un 70%.

2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de AC pulmonar se cultivaron en medio completo compuesto por:

- 90% RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco®, Life Technologies)
- 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco®, Life Technologies)
- 100 U/ml de penicilina (Gibco®, Life Technologies)
- 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco®, Life Technologies)
- 0.25 µg/ml de fungizona (Gibco®, Life Technologies)

La línea HEK 293 LTV se cultivó en medio completo compuesto por:

- 90% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con GlutaMAX™ y 4.5g/l de glucosa (Gibco®, Life Technologies).
- 10% de SBF (Gibco®, Life Technologies)
- 100 U/ml de penicilina (Gibco®, Life Technologies)
- 0.25 µg/ml de fungizona (Gibco®, Life Technologies)

3. Estudios de proliferación y viabilidad celulares

La viabilidad y el número de células de los cultivos celulares se determinó mediante el contador automático *Countess® II* (Invitrogen). Este aparato realiza la técnica de contaje mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán.

El azul tripán se trata de colorante vital capaz de introducirse en el interior de las células que presentan cualquier rotura en la membrana. De este modo, las células con la membrana celular íntegra no permiten la entrada del colorante, presentando un aspecto redondeado y transparente. Mientras que las células alteradas o muertas adquieren un tono azul, aunque conservan una morfología similar a las células viables.

Para realizar el contaje celular, después de la tripsinización y la resuspensión en medio completo, se mezcló una alícuota de la suspensión celular obtenida con el mismo volumen de una solución de azul tripán al 0.4% (Invitrogen) haciendo así una dilución 1/2 y se cargó en las cámaras de contaje específicas para el aparato (*Countess® cell counting chamber slides*; Invitrogen).

4. Estudio de la citotoxicidad celular: Método de la sulforodamina B

El método de la sulforodamina B se emplea para la determinación de forma indirecta del número de células. Se trata de un método colorimétrico que está basado en la cuantificación de la tinción de las proteínas celulares con el colorante sulforodamina B. Siendo esta medida de la masa proteica directamente proporcional al número de células (Skehan, Storeng et al. 1990, Voigt 2005). Este método tiene la ventaja de que permite realizar ensayos de citotoxicidad a gran escala en placas de 96 pocillos (Vichai, Kirtikara 2006).

El protocolo empleado fue el implantado por el Instituto Nacional del Cáncer Americano (NCI) (www.cancer.gov). En primer lugar, se sembraron $7,5 \times 10^3$ células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen 100 μ l de medio completo. A las 24 horas tras la siembra, se añadieron los fármacos disueltos en medio RPMI. Se emplearon 6 réplicas por condición, realizando diluciones seriadas 1:3 a partir de 10 μ M. En función del fármaco, se utilizó el correspondiente control con el vehículo en el que éste se disolvía (DMSO o etanol).

Una vez pasadas 72 horas después del tratamiento, las células se fijaron mediante la adición de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 50% de manera que se quedase a la concentración final del 10% (p/v) en el pocillo, y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas cinco veces con agua y se dejaron secar.

Las placas fijadas fueron teñidas con 100 μ l de una solución de sulforodamina B (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1%, durante 20 minutos. Tras este tiempo las placas se lavaron con ácido acético al 1%, para eliminar cualquier

exceso de tinción y se dejaron secar. Después, el colorante unido a las proteínas se solubilizó con 200 µl de tampón Trizma® Base (Sigma-Aldrich) a 10mM.

Finalmente, se midió en el espectrofotómetro la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Multiskan spectrum; Thermo Scientific) y se le restó el ruido de fondo medido a 620 nm para cada pocillo. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular que se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\% \textit{Viabilidad celular} = 100 \times \frac{\textit{Absorbancia condición}}{\textit{Absorbancia control}}$$

5. Análisis de expresión proteica mediante *western blot*

El *western blot* se trata de una técnica que permite medir la cantidad de una proteína específica en un extracto de proteínas y comparar así sus niveles con respecto a los niveles de esa proteína en otras muestras. Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

5.1 Extracción de proteínas

Para la obtención de las muestras de proteínas de los cultivos celulares en monocapa, en primer lugar, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS frío. Después, tras eliminar el PBS, las células se rascaron en hielo en presencia de un tampón de lisis RIPA compuesto por 10mM de Tris pH 8, 140 mM de NaCl, 1mM de Na₂EDTA, 1% (v/v) de Triton™ X-100, 0,1% (p/v) de deoxicolato sódico, 0,1% (p/v) SDS y suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher Scientific). Una vez recogido el lisado celular, se sometió cada muestra a la sonicación aplicando tres ciclos de 5 segundos de ultrasonidos intercalados por 15 segundos de parada empleando un sonicador Branson SLPe. A continuación, la muestra se centrifugó a 15000 R.P.M., 15

minutos a 4°C y posteriormente se recogió el sobrenadante y se desechó el pellet de restos celulares. La concentración de proteínas se determinó mediante el método descrito por Bradford, usando el reactivo *Coomassie Blue G-250* (Thermo Scientific) y midiendo la absorbancia de las muestras a 595 nm. Los valores obtenidos se interpolaron mediante una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA; Roche) con un rango de concentraciones entre 0.01 mg/ml-2 mg/ml.

5.2 Electroforesis y transferencia

La separación de las proteínas se realizó en función de su peso molecular mediante la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Para ello, se mezclaron 35 µg de proteína con el volumen adecuado de tampón de carga (Tris 50mM pH6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 0.005% azul de bromofenol (p/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v)) y se incubaron durante 5 minutos a 98°C para desnaturalizar las proteínas.

Tras la desnaturalización de las proteínas, las muestras se cargaron en geles con gradiente de poliacrilamida del 4-15% comerciales (*Criterion™ XT precast gel, Bio-Rad*) y se sometieron a electroforesis utilizando el sistema *Criterion Precast Gel System* (Bio-Rad) en un tampón compuesto por Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0.1% (p/v) con pH 8,3. Junto a las muestras de proteínas, se utilizó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad*).

Una vez realizada la electroforesis, con las proteínas bien separadas según su peso molecular, las proteínas del gel se transfirieron en húmedo a membranas de nitrocelulosa utilizando el mismo sistema de electroforesis *Criterion Precast Gel System* (Bio-Rad) durante 60 minutos a 100 V en un tampón de transferencia con Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS al 0,1 % (p/V) y Metanol al 20% (v/v).

5.3 Inmunodetección

Para el paso de la inmunodetección, en primer lugar, se bloquearon las uniones inespecíficas de la membrana con una solución de bloqueo de compuesta con leche desnatada al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5) durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Después, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween, para incubar posteriormente la membrana con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 5% en TBS-Tween. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas especificadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios empleados para *western blot*.

Anticuerpos primarios				
Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial
ACTB	45	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
CDH1	135	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
CDH2	140	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
CRABP2	15	Policlonal de conejo	1:1000	Sigma Aldrich
EZH2	98	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
GRHL2	71	Policlonal de conejo	1:1000	Sigma Aldrich
KDM6A	180	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology

KDM6B	185	Monoclonal de conejo	1:1000	Abcam
H3	17	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
H3K4me3	17	Policlonal de conejo	1:1000	Diagenode
H3K9me3	17	Policlonal de conejo	1:1000	Diagenode
H3K27me3	17	Policlonal de conejo	1:1000	Diagenode
SNAI1	29	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
RARA	57	Monoclonal de ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
RARB	55	Monoclonal de ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
RARG	55	Monoclonal de ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
VIM	57	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
ZEB1	200	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology

Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios empleados para *western blot*.

Anticuerpos secundarios			
Diana	Conjugado	Dilución	Casa comercial
Anti Conejo IgG	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology

Anti Ratón IgG	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology
----------------	-----	--------	------------------------------

Después de la incubación del anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la membrana. Posteriormente, para detectar la proteína, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (mostrados en la Tabla 4) conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP).

Finalmente, tras lavar 3 veces durante 5 minutos en agitación con TBS-Tween para quitar cualquier el exceso de anticuerpo secundario que no se haya unido a la membrana, las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección mediante una reacción de quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidasa. El luminol presente en el ECL, en presencia de peróxido de hidrógeno, se transforma por la HRP (conjugada en el anticuerpo secundario) a un dianión excitado, capaz de emitir luz al regresar a su estado fundamental. Esta luz fue captada por una cámara de quimioluminiscencia mediante el sistema ChemiDoc™ XRS+ de BioRad. La señal obtenida se analizó mediante densitometría utilizando el software *Image Lab 2.0.1* (BioRad).

6. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

La RT-PCR cuantitativa (transcriptasa reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que monitoriza y cuantifica la amplificación de una secuencia específica de ADN complementario (ADNc) a lo largo de la reacción. Este ADNc es obtenido a partir del ARNm extraído de las muestras mediante la reacción de transcripción inversa. Para la PCR cuantitativa (qPCR) se requiere un molde de ADN, un par de cebadores (primers) específicos, un

tampón de reacción adecuado y la enzima ADN polimerasa termoestable. Esta técnica permite estudiar la expresión génica permitiendo ver los niveles de ARNm de un gen concreto y compararlos con respecto a otras muestras para ver si ese gen está activo o reprimido. Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

6.1.Extracción de ARN

Para la obtención del ARN total de los cultivos celulares en monocapa se empleó el kit de extracción *E.Z.N.A.® Total RNA kit I* (Omega). El protocolo empleado fue el establecido por el kit, en primer lugar, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS frío. Después, tras eliminar el PBS, las células se rascaron en hielo en presencia de 350 µl de tampón de lisis TRK suplementado con β-mercaptoetanol 0,02% (v/v). Las muestras se homogeneizaron y posteriormente se añadió el mismo volumen de etanol al 70% (Fisher-scientific). Una vez añadido el etanol se mezclaron bien por vortex y se transfirió la muestra a columnas *HiBind® RNA Mini Column* del kit de extracción. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g 1 minuto y se desechó el filtrado quedando el ARN retenido en la columna. Posteriormente se realizaron varios lavados y centrifugaciones con tampones de lavado del kit para purificar las muestras y se desecharon los líquidos filtrados. Se hizo secar bien la columna para eliminar restos de etanol de los tampones de lavado y se añadió agua libre de RNAsas para disolver el ARN de la columna. La columna se centrifugo a máxima velocidad durante dos minutos. Una vez extraído el ARN total, se cuantificó su concentración mediante el espectrofotómetro *Nano Drop lite* (Thermo Scientific).

6.2. Síntesis del ADNc

Una vez cuantificadas las muestras se procedió a obtener el ADNc mediante la reacción con la transcriptasa reversa. Para la transcripción reversa utilizamos el

kit *PrimeScriptTM Reverse Transcriptase* (Takara) y 500 ng de ARN total por muestra junto con los siguientes componentes:

Tabla 5. Lista de reactivos para la formación de ADNc.

Reactivo	Cantidad
5x PrimeScript buffer	2 μ l
Oligo dT primer 50 μ M	0.5 μ l
Random 6 mers 100 μ M	0.5 μ l
PrimeScript Enzyme mix I	0.5 μ l
ARN	500 ng
Agua libre de RNasas	Hasta 10 μ l

Una vez mezclados todos los reactivos, se llevaron las muestras al termociclador *Life Eco* (Bioer) y se cargó el programa indicado para la retrotranscripción: 15 minutos a 37°, 5 segundos a 85° y posteriormente a 4° recoger las muestras y se diluyeron con agua libre de RNasas a una concentración de 5 ng/ μ l de ADNc.

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez obtenido el ADNc, se procedió a realizar la qPCR para amplificar las secuencias de ADN de los genes que se deseaban estudiar. Para ello, se emplearon placas de PCR de 96 pocillos (Bio-rad) en las que se cargaron triplicados de las muestras para cada pareja de primers del gen correspondiente. De tal modo, en cada pocillo se mezclaron los siguientes reactivos (tabla 6):

Tabla 6. Lista de reactivos para la PCR.

Reactivo	Cantidad
ADNc muestra	2 μ l (10ng)
Mix Primers (Forward y reverse) 10 μ M	1 μ l

TB Grenn Premix Ex Taq 2x (Takara)	6 μ l
Agua libre de RNAsas	3 μ l

Una vez cargada toda la placa, se centrifugó para eliminar cualquier burbuja y se introdujo en el termociclador iQ5 (Bio-Rad) donde se realizó la PCR. Finalmente, los datos y resultados adquiridos fueron extraídos y analizados por el software iQ5 Optical System software 2.1 (Bio-Rad) y por Excel.

Tabla 7. Lista primers empleada para ensayos de RT-PCR.

Gen	Secuencia
ACTB	F: GACCCAGATCATGTTTGAGACC R: AGGGCATACCCCTCGTAGAT
CDH1	F: GGCCTCCGTTTCTGGAAT R: TGGCCAGTGATGCTGTAGAA
CYP26A1	F: GTCCGCAGTCTTACGAGGAG R: CCAGCTTGAGGGTCTGAATC
CRABP2	F: CCCTGTAAGAGCCTGGTGAA R: TGGTGCACACAACGTCATC
EZH2	F: GGGAGTGTTTCGGTGACCA R: CCCGTGTACTTTCCCATCAT
HOXA1	F: GGATGGTCTTACCTTCCCAGA R: GAGCCCAGGCTAGAAGATGA
KDM6A	F: CTGGAAGAATGCTGCCTTTTTAT R: TGGACAAAGTGCAGGGATTA
KDM6B	F: GCTACACCTTGAGCACAACG R: GTAATGGTGGTGGAGGCAGT
RARA	F: CCAGCCACCATTGAGACC

	R: CGGGTCACCTTGTTGATGAT
RARB	F: CAGCAGCCCCCAGATTAAC GTTTGCCTGAGCTTCTGTCC
RARG	F: GCCTCTCTGTTCGGTGGAG R: CGATTCTGGTACCTTGTT

7. Análisis de la regulación de la expresión génica mediante ChIP

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) es una técnica que permite analizar la regulación de la expresión de los genes mediante el estudio de las interacciones entre las proteínas y regiones específicas de ADN (normalmente las secuencias promotoras) de genes concretos para establecer vínculos sobre si esas proteínas, factores de transcripción o marcas de histonas permiten la activación o represión del gen. Para ello, se realizaron los siguientes pasos de acuerdo al protocolo del kit empleado (*Low cell ChIP kit*, Diagenode).

7.1.Preparación de la muestra

En primer lugar, las células se tripsinizaron, se recogieron en PBS, después se centrifugaron y se contaron para pasar 1×10^6 células a un tubo eppendorf. Después, se centrifugaron a 14.000 R.P.M., se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 μ l de PBS con inhibidor de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher Scientific). Una vez resuspendidas se procedió a fijar la muestra para que las interacciones proteína-cromatina permanecieran estables. Para ello, se añadieron 13,5 μ l de paraformaldehído al 36,5%, se agitó bien la muestra y se dejó incubando a temperatura ambiente 8 minutos. Después, se añadieron 57 μ l de glicina 1,25 M a la muestra para detener el proceso de fijación. Se agitó la muestra y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A partir de

ahí, se empezó a trabajar a 4°C, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 470 g, después se retiró el sobrenadante y se resuspendió la muestra en otros 500 µl de PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Este paso de centrifugación y resuspensión del pellet con PBS más los inhibidores se repitió otra vez. Finalmente, la muestra se volvió a centrifugar 10 minutos a 470 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 130 µl de tampón B con inhibidor de proteasas. La muestra se incubó 30 minutos a 8°C en agitación media. Después, se sonicaron las muestras en el sonicador *Diagenode Bioruptor® Plus sonication device UCD-200* con ciclos de intensidad alta de 30 segundos de ultrasonidos y 30 segundos de parada durante 15 minutos (15 ciclos) a 4°C para asegurar que los fragmentos de ADN se quedaran en un tamaño óptimo para el ensayo, entre 250 y 500 pares de bases. Una vez sonicada la muestra, se añadieron 870 µl de tampón A con inhibidores de proteasas y se congelaron las muestras a -80°C.

7.2.ChIP

Para realizar la inmunoprecipitación, en primer lugar se mezclaron 22 µl de tampón A con 11 µl de las bolas magnéticas por cada muestra de ChIP. Después se centrifugaron 5 minutos a 1300 R.P.M., se retiró el sobrenadante y se repitió el mismo proceso para hacer un segundo lavado. Después de centrifugar y retirar el sobrenadante, se resuspendieron las bolas magnéticas en 11 µl de tampón A. Por cada reacción de ChIP se mezclaron 90 µl de tampón A a cada tubo de ChIP y 10 µl de las bolas magnéticas del paso anterior. A continuación, se añadieron a cada tubo 2 µg de anticuerpo específico (ver anticuerpos empleados en la tabla 3) y se incubaron en rotación durante 4 horas a 4°C para asegurar la unión entre el anticuerpo y las bolas magnéticas.

Tras la incubación del anticuerpo, se centrifugaron los tubos y se colocaron en una gradilla magnética que permite la retención de las bolas magnéticas mientras se retira el sobrenadante. Una vez retirado el sobrenadante, se añadieron 100 µl

de las muestras sonicadas a cada tubo de ChIP junto con las bolas magnéticas unidas al anticuerpo y se retiraron de la muestra sonicada además 10 μl como *input*. Las muestras se incubaron con el anticuerpo unido a las bolas magnéticas durante toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente se retiró el sobrenadante dejando las bolas magnéticas unidas al anticuerpo y a la proteína que interacciona con el anticuerpo, se realizaron tres lavados de 100 μl con tampón A para eliminar cualquier el resto de proteína que no se haya unido al anticuerpo y después un lavado de 100 μl con tampón C. Finalmente, a cada reacción se añadieron 100 μl de tampón de aislamiento de ADN junto con proteinasa K, y a por 1 μl del input de cada muestra se añadieron 99 μl del tampón. Una vez añadido el tampón, las muestras se incubaron a 55°C durante 15 minutos y después a 100°C durante otros 15 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14.000 R.P.M. durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo descartando las bolas magnéticas, se cuantificó su concentración mediante el espectrofotómetro Nano Drop lite (Thermo Scientific) y se ajustó la concentración de cada muestra a 10 ng/ μl .

7.3.qPCR del ChIP

Tras obtener las muestras del ChIP se procedió a realizar la qPCR para amplificar las secuencias de ADN del promotor de los genes de interés siguiendo los mismos pasos que en el apartado 6.3.

Tabla 8. Lista primers empleada para ensayos de qPCR ChIP.

Gen	Secuencia
CDH1	F: CCCTTTCTGATCCCAGGTCT R: GCCTGGAGTTGCTAGGGTCT
EPCAM	F: CCTCCACGTTCTCTATCCA R: CCTCCGAGGAGGTTTGAAG
GRHL2	F: AGCTCCCCAGCCAATCAT R: GCGGCCACAGGTAACCTTC

SNAI1	F: GGGCCTTTTCCCTTGATAAT R: AAGGGAAGTGTGCTTTGGTG
TGFβ1	F: TCTCATCCCCGGATTAAG R: AAGCGGGTGATCCAGATG
VIM	F: AAGAGCGAGAGGAGACCAGA R: AAACCTTCTGCAGCCTTTGGA
ZEB1	F: TATAATAATGGGCGGCAACG R: AATAACGCAGGAACCAAAGC

8. Ensayo de inmunoprecipitación (IP)

La inmunoprecipitación es una técnica que permite analizar la interacción directa entre proteínas, en nuestro casos factores de transcripción y remodeladores de la cromatina. Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

8.1.Preparación de la muestra

En primer lugar, las células se tripsinizaron, se recogieron en PBS, después se centrifugaron y se contaron para pasar $1 \cdot 10^6$ células a un tubo eppendorf. Después, se centrifugaron a 14.000 R.P.M., se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µl de PBS + inhibidor de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher Scientific). Una vez resuspendidas se resuspendieron en lisis tampón NP40 (1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, e inhibidor de proteasas y fosfatasas). Después, se sonicaron las muestras en el sonicador *Diagenode Bioruptor® Plus sonication device UCD-200* con ciclos de intensidad alta de 30 segundos de ultrasonidos y 30 segundos de parada durante 15 minutos (15 ciclos) a 4°C para asegurar la lisis celular. Una vez sonicada la muestra, se centrifugaron en frío a 5000 R.P.M. durante 10 minutos y se cuantificaron las proteínas mediante el método Bradford descrito anteriormente y se congelaron las muestras a -80°C.

8.2.IP

En primer lugar se mezclaron 100 μ l de PBS con BSA (5 mg/ml) con 50 μ l de las bolas magnéticas (Invitrogen) por cada muestra de IP para lavarlas. Después se centrifugaron 5 minutos a 1300 R.P.M., se retiró el sobrenadante y se repitió el mismo proceso para hacer un segundo lavado. Finalmente, después de centrifugar y retirar el sobrenadante se resuspendieron las bolas magnéticas en 101 μ l de PBS+BSA por cada muestra de IP. Una vez preparadas las bolas magnéticas, se añadieron 400 μ l de PBS+BSA a cada tubo de IP y 100 μ l de las bolas magnéticas ya limpias. A continuación, se añadieron a cada tubo 2 μ g de anticuerpo específico para el ensayo de cada IP (los anticuerpos empleados proceden de la tabla 3) y se incubaron en rotación durante 4 horas a 4°C para asegurar la unión entre el anticuerpo y las bolas magnéticas.

Tras la incubación del anticuerpo, se centrifugaron los tubos y se colocaron en una gradilla magnética que permite la retención de las bolas magnéticas mientras se retira el sobrenadante. Una vez retirado el sobrenadante, se hicieron dos lavados con 500 μ l de PBS+BSA y se procedió a hacer el *crosslinking* entre las bolas magnéticas y el anticuerpo con el fin de disminuir las uniones inespecíficas mediante la adición de 500 μ l de una solución 20 mM DMP en Borato sódico pH 9.0. Las bolas magnéticas se incubaron en rotación durante 30 minutos y posteriormente se detuvo la reacción tras añadir 500 μ l de 50 mM de etanolamina en PBS e incubar durante 2 horas, finalmente se hicieron tres lavados con PBS+BSA y se añadieron 400 μ g de proteína para cada IP (un 10% de la muestra se guardó como *Input*) y se incubó toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente se retiró el sobrenadante, se realizaron varios lavados con PBS+BSA y se realizó la elución mediante incubación a 75°C con tampón de lisis más 20 mM de DTT y SDS 0,1% una vez extraída la proteína de las bolas magnéticas el protocolo que se siguió para la determinación de las distintas proteínas fue el de *western blot*.

9. Estudios de transducción génica con construcciones lentivirales

Los vectores lentivirales son sistemas que permiten introducir genes o ARN de interferencia (ARNi), en las líneas celulares con una gran eficiencia. Los vectores lentivirales en primer lugar se unen a las células diana mediante proteínas de la envuelta que favorecen la liberación del ARN que contiene la construcción lentiviral. Posteriormente, a través de una transcriptasa reversa este ARN se retro-transcribe a ADN complementario. El complejo se introduce en el núcleo y el ADN complementario es integrado en el genoma de la célula diana; generando una integración estable, que es capaz de pasar a las células descendientes durante la división celular. En nuestro caso, utilizamos estos vehículos para inducir la expresión de las proteínas CRABP2, y reprimir mediante secuencias de shRNA la expresión de CRABP2, RARA, RARB, RARG, KDM6A y KDM6B, todos los vectores fueron diseñados y construidos a través de VectorBuilder.

El protocolo de producción de lentivirus consta de varios pasos divididos en dos fases, la primera de producción de las partículas virales y la segunda de transducción viral.

9.1 Producción de partículas virales

Se empleó un sistema de construcciones lentivirales de tercera generación. En primer lugar, el gen de la envoltura (*env*) viene codificado en un plásmido VSV-G y, además, en el plásmido de empaquetamiento psPAX2, para evitar la generación de virus competentes, se eliminan genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) reduciendo sólo a los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev* del VIH-1. En este sistema las partículas virales son producidas por la co-transfección de tres plásmidos (el

de envoltura, empaquetamiento y el plásmido del gen diana) en las células productoras HEK 293 LTV.

Para ello los reactivos de la Tabla 9 se combinaron en un microtubo estéril de polipropileno y se incubaron durante 20-30 minutos:

Tabla 9. Lista de reactivos para la formación de lentivirus.

	Para petri 6 cm ²
Optimem	Hasta 200 µl
Plásmido	4 µg
Plásmido psPAX2	4 µg
Plásmido VSV-G	0.5 µg
TransIT-LT1	24 µl

Durante la incubación de los reactivos, se tripsinizaron las células HEK 2973 LTV y se resuspendieron un medio de transfección (DMEM +10% SBF sin antibióticos) y se sembró $1,5 \times 10^6$ células con 2,3 ml de medio de transfección en placas de alta adherencia tratadas con colágeno I BIOCOAT Cell Environments (Beckton and Dickinson). Al terminar la incubación, se añadió la mezcla de reactivos gota a gota sobre las células sembradas y se movió ligeramente para una correcta distribución.

Tras 24 horas post-transfección se retiró el medio y se sustituyó por un medio de producción viral (DMEM, 10% SBF y BSA al 1%). Tras 72 horas de incubación con este medio se recogieron las partículas virales. El sobrenadante se centrifugó 3 minutos a 400g y se filtró con un filtro de 0.45 µm para eliminar restos de células productoras.

9.1.1 Obtención de los plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento

Tanto los vectores de sobreexpresión como de silenciamiento fueron diseñados a través de la empresa Vectorbuilder. Una vez diseñados y encargados, la empresa se encarga de realizar todo el proceso de clonación enviando finalmente el plásmido de interés incorporado en bacterias *E. coli* a través de un stock de glicerol. A partir de aquí lo primero que se realiza coger una parte de esas bacterias e introducirlas en 5 ml de medio LB (Sigma Aldrich) junto con antibiótico de selección para que únicamente crezcan las bacterias que tienen incorporado el plásmido, y se incuban las bacterias a 37°C en agitación 24 horas. Al día siguiente, se realizó la extracción del plásmido de las bacterias mediante el kit Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Quiagen) siguiendo el protocolo propuesto por el kit. Una vez obtenido el plásmido, se cuantificó su concentración mediante el espectrofotómetro Nano Drop lite (Thermo Scientific).

9.2 Transducción viral

Para la transducción viral, las células en las que se deseaba sobreexpresar o silenciar un gen, fueron sometidas a dos series consecutivas de infección viral. Para ello, se añadió en primer lugar al medio con las partículas virales polibreno, a una concentración de 10 µg/ml, para favorecer la infección, dicha mezcla se añadió al medio de cultivo de las células. Tras 24 horas, se retiró este medio y se añadió de nuevo medio fresco con las partículas virales. Al día siguiente, se reemplazó este medio por medio completo junto con el antibiótico de selección correspondiente. La selección se considera completa cuando las células control (células sin infectar y por tanto no han incorporado el gen de resistencia al antibiótico) mueren totalmente mientras que las células infectadas crecen de forma normal. Para controlar que la infección se produjo de forma correcta, se

extrajeron muestras de proteínas para la confirmación por *western blot* de que los niveles de proteínas son los esperados.

10. Ensayos de formación de colonias

Los ensayos de la formación de colonias son un método común para evaluar el efecto citostático o citotóxico de compuestos antitumorales. Se trata de ensayos *in vitro* basados en la capacidad que tienen las células aisladas de proliferar formando una colonia, entendiendo como tal un grupo de al menos 50 células. De este modo, se evalúa la capacidad proliferativa de cada célula en el seno de un cultivo celular (Franken, Rodermond et al. 2006).

Para ello, las células se siembran a baja densidad (5.000 células por pocillo) en placas de 6 pocillos y 24 horas después de la siembra se cambia el medio del pocillo con los fármacos a evaluar, bien en monoterapia o en combinación para evaluar efectos sinérgicos o antagónicos. Cada 3 días se cambia el medio para renovar el fármaco que se haya podido degradar en ese tiempo. El ensayo dura entre 7-10 días, dependiendo del tiempo que tarda cada línea celular en formar en su control colonias de un tamaño adecuado. Pasado este tiempo, las células se fijan con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se tiñen posteriormente con cristal violeta al 0,4% (v/v) durante 30 minutos, cuando ya adquieren un color intenso. Finalmente, las placas se lavan con agua corriente y una vez secas se digitalizan.

11. Silenciamiento génico mediante siRNA

Los siRNAs (ARNs pequeños de interferencia) son secuencias de ARN de doble cadena formados por alrededor de 19-21 nucleótidos. Se unen por complementariedad de bases al ARN mensajero correspondiente provocando su degradación.

Las secuencias de siCRABP2 y el siControl fueron obtenidas de Santa Cruz Technologies y el protocolo de silenciamiento que se empleó fue el propuesto para el transfectante TransIT-siQuest (Mirus).

Los experimentos se realizaron en formato de placa de 6 pocillos para poder extraer proteína y ARN y así valorar el grado de silenciamiento, procediendo de la siguiente manera: El día antes de realizar la transfección, se hizo la siembra de las células en medio con SBF al 10% pero en ausencia de antibióticos poniendo por pocillo 0.2×10^6 células para que las células se encontraran en crecimiento exponencial y a una confluencia cercana al 70%. La mezcla de reactivos para la transfección consistía en medio sin suero Optimem I (ThermoFisher Scientific), los siRNAs de las dianas de interés a una concentración final de 25 nM y el transfectante TransIT-siQuest. Las proporciones utilizadas fueron:

Tabla 10. Reactivos empleados para el silenciamiento transitorio de CRABP2.

Placa	6 pocillos
Área (cm ²)	9.6
Medio completo (ml)	2.5
Medio sin SBF (Optimem) (μl)	250
Reactivo TransIT-siQuest (μl)	7.5
siRNA (stock 10 μM) (μl)	6.8

Después de 72 horas tras la adición de la mezcla de silenciamiento, se procedió a evaluar el nivel de represión mediante *western blot* y RT-PCR.

12. Análisis estadístico

Todos los experimentos han sido realizados por lo menos tres veces. Los datos se han expresado como la media \pm DS calculados con Excel. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism.

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante un análisis de la varianza *one-way* ANOVA y la homogeneidad de las varianzas se analizó mediante el test de Tukey.

13. Análisis bioinformáticos

Los datos de proteómica (*SWATH-MS*), transcriptómica (*Affymetrix U133 2.0 array*) y epigenómica (*Infinium HumanMethylation 450K BeadChip*) generados en nuestro laboratorio fueron procesados y analizados con las herramientas *Comparative Marker Selection* y *Gene-E* del paquete analítico *Genepattern* (disponible en <http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern>) mediante los test estadísticos *signal2noise*, t-test y corrección de *multiple testing* mediante FDR según el método de Bonferroni (Benjamini 1995).

Los datos de metilación del ADN se calcularon como valores *beta* (β -score) y con el mismo software se calculó la significancia estadística de las comparaciones (*DiffScore*) y la diferencia media de metilación (*Delta beta*) entre los grupos mediante t-test y corrección de *multiple testing* mediante FDR según el método de Bonferroni. El análisis de enriquecimiento funcional de las firmas relacionadas con reguladores epigenómicos se llevó a cabo con la herramienta EnrichR (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) (Kuleshov 2016).

Los datos genómicos, transcriptómicos y epigenómicos de las líneas celulares de CPNM del proyecto *Cancer Cell Line Encyclopedia* (Broad Institute) y pacientes de CPNM (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA, NCI-NIH) fueron obtenidos a

partir del CBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) y analizados mediante una correlación de Pearson y corrección de *multiple testing* mediante FDR, y representados con el paquete analítico *Genepattern*.

Resultados y Discusión

1. Desarrollo y caracterización de los modelos experimentales de AC pulmonar con EGFR mutado resistentes al osimertinib

Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR, la primera línea de tratamiento para los pacientes de CPNM diagnosticados con mutaciones activadoras de EGFR e identificar nuevos métodos para resolver este problema clínico, hemos desarrollado varios modelos *in vitro* de resistencia adquirida al osimertinib, un inhibidor irreversible de 3ª generación que se utiliza como 2ª línea de tratamiento tras el fallo terapéutico de los inhibidores de 1ª generación cuando aparece la mutación secundaria de EGFR T790M, pero que también ha demostrado su eficacia como 1ª línea en pacientes de CPNM con mutaciones activadoras de EGFR, esté presente o no la mutación de resistencia T790M (Ramalingam 2019).

Para ello hemos utilizado modelos celulares de CPNM humano con mutaciones activadoras en *EGFR* y por tanto presentan sensibilidad innata a este inhibidor a causa de su potente adicción oncogénica. Las líneas celulares HCC827 (delección del exón 19), PC9 (delección del exón 19), HCC4006 (delección del exón 19) y H1975 (doble mutación L858R/T790M) se cultivaron en concentraciones crecientes de osimertinib (AZD9291), empezando el tratamiento con concentraciones subletales de 50 nM, por encima de su IC₅₀. Una vez las células se adaptaban y eran capaces de crecer con normalidad se les duplicaba la concentración de osimertinib hasta que se alcanzó 10 µM, considerándolas a esa concentración como modelos celulares resistentes y anotados como HCC827 AZDR, PC9 AZDR, HCC4006 AZDR, H1975 AZDR (Figura 16).

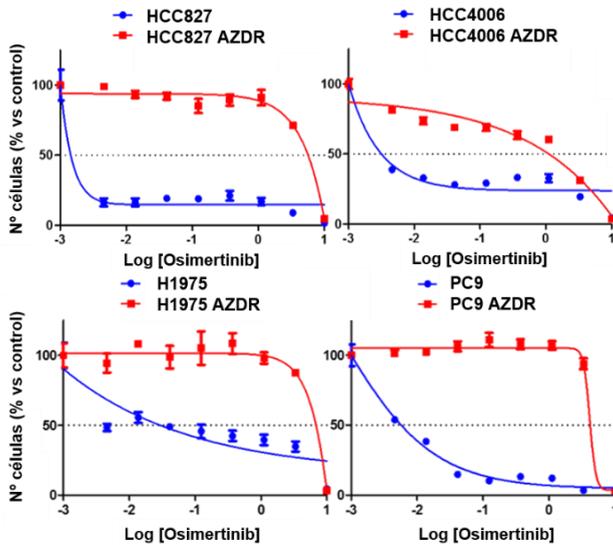


Figura 16. Curvas de citotoxicidad de las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib. Cada línea celular se sembró en placas de 96 pocillos con una densidad de 7500 células por pocillo y se trataron 24 horas post-siembra con las concentraciones indicadas de osimertinib o del vehículo DMSO. El número de células se determinó por el método de la sulforodamina B después de 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6).

La adquisición de resistencia por el tratamiento a los ITQs puede deberse a varias causas, como ya se describió anteriormente en la Introducción. En el caso de los ITQs de primera y segunda generación estos mecanismos están bien descritos e incluyen la activación aberrante del programa EMT (Sequist 2011, Suda 2011, Byers 2013, Soucheray 2015). En el caso del osimertinib, al ser un ITQ relativamente reciente se están empezando a esbozar, e incluyen la activación del programa EMT (Weng 2019, Namba 2019, Wang 2019). De hecho, en nuestros 4 modelos celulares, el desarrollo de la resistencia al osimertinib fue causada por la activación del programa EMT. En las imágenes de la Figura 15 se pueden observar los cambios morfológicos que presentan las células resistentes al osimertinib, con características claramente asociadas al fenotipo EMT. Además, en la Figura 17 encontramos como las células parentales

presentan niveles elevados de la proteína epitelial CDH1, y niveles bajos de los marcadores mesenquimales como N-cadherina (CDH2), VIM y los EMT-TFs SNAI1 y ZEB1. Sin embargo, en las células resistentes a osimertinib ocurre todo lo contrario, ya que pierden CDH1 y presentan un aumento de marcas mesenquimales CDH2, VIM y de los EMT-TFs ZEB1 y SNAI1, en distintos grados dependiendo de la línea celular.

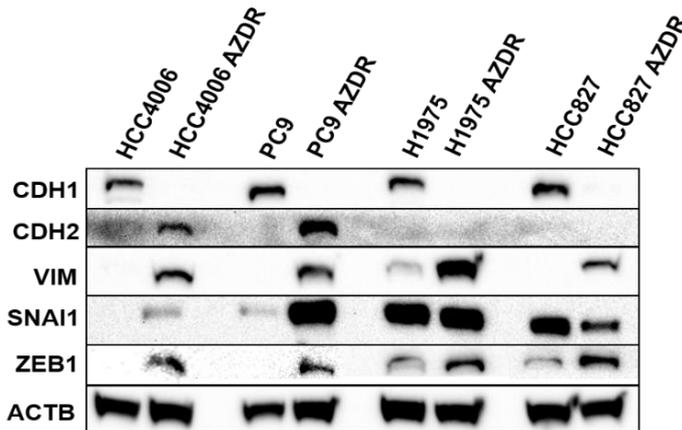


Figura 17. Expresión de marcadores EMT en las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib. Se prepararon extractos de proteínas de las líneas celulares indicadas, y mediante *western blot* se determinaron las proteínas CDH1, CDH2, VIM, SNAI1, ZEB1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Para demostrar que la activación del programa EMT era el causante de la resistencia al osimertinib, incubamos las líneas celulares parentales sensibles a osimertinib con un inductor de EMT bien conocido, el TGF β 1. En la Figura 18 se puede observar como el TGF β 1 es capaz de inducir el fenotipo mesenquimal al disminuir los niveles de proteína de CDH1 y el aumento de marcas mesenquimales como VIM y de EMT-TF como SNAI1 y ZEB1. Además, en las líneas en las que se ha inducido el fenotipo mesenquimal con TGF β 1 el efecto citotóxico del osimertinib fue mucho menor que en las parentales, tal y como indica el desplazamiento de las curvas de citotoxicidad se desplazan hacia la derecha. Así, el fenotipo mesenquimal induce resistencia al osimertinib, unos

resultados consistentes con los publicados recientemente en la literatura (Weng 2019, Namba 2019, Wang 2019). Todos estos modelos celulares con fenotipo EMT inducido por TGF β 1, junto con las de resistencia adquirida al osimertinib constituyen los modelos experimentales de este trabajo.

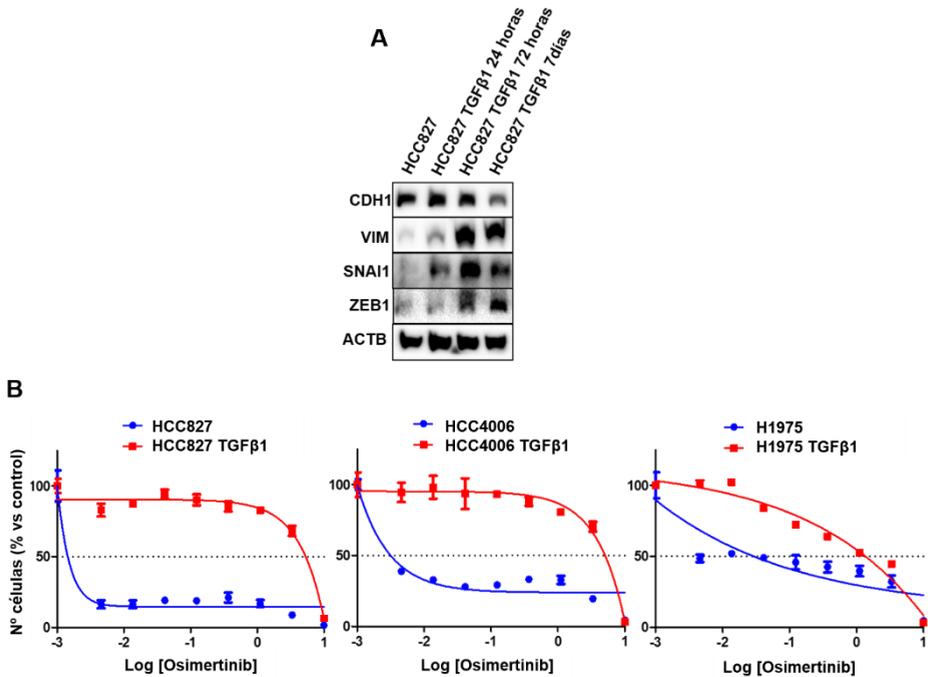


Figura 18. Efecto del TGF β 1 como inductor de EMT en líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado. **A.** Las células HCC827 parentales se incubaron durante los tiempos indicados con TGF β 1 10 ng/mL, se prepararon los extractos de proteínas, y mediante *western blot* se determinaron las proteínas CDH1, VIM, SNAI1, ZEB1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3. **B.** Cada línea celular se sembró en placas de 96 pocillos con una densidad de 7500 células por pocillo y se trataron 24 horas post-siembrá con las concentraciones indicadas de osimertinib o del vehículo DMSO. El número de células se determinó por el método de la sulforodamina B después de 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6).

2. Búsqueda de nuevos mecanismos epigenéticos de resistencia adquirida a los ITQs asociados a EMT.

2.1 Integración de datos transcriptómicos y metilación global del ADN.

En nuestro laboratorio se han desarrollado varios modelos de resistencia a los inhibidores de EGFR de 1ª generación erlotinib y gefitinib que se caracterizaron molecularmente mediante diferentes herramientas de transcriptómica, epigenómica y proteómica con el fin de estudiar de manera sistemática los mecanismos de resistencia a los ITQs (Soucheray 2015, Becker 2019, Pulido 2019). En el último trabajo identificamos vulnerabilidades metabólicas del fenotipo EMT asociado a la resistencia a los inhibidores de EGFR cuya inhibición podría aumentar la eficacia de estos inhibidores y, además, dar lugar a nuevos biomarcadores de respuesta. Para ello se realizó un análisis integrado de datos transcriptómicos (*microarrays* de expresión *Affymetrix*), proteómica (espectrometría de masas) y de metilación de promotores (*microarrays* de metilación del ADN *Illumina 450K*) obtenidos a partir de los modelos de resistencia a los ITQs que desarrollan el fenotipo EMT (HCC827 al erlotinib, HCC4006, al gefitinib, y H1975 al CL387785, un inhibidor irreversible de EGFR similar al osimertinib). Este análisis se realizó con el fin de abordar la heterogeneidad genética y epigenética inherente al programa EMT e identificar proteínas que pudieran dirigir el fenotipo EMT ITQ-resistente.

En la Figura 19 (tomada de la tesis doctoral de Pulido, 2017), reproducimos el análisis integrativo de los datos de las tres ómicas en los tres modelos de resistencia. Los niveles de ARNm y de proteína se representan en los ejes de abscisas y ordenadas, respectivamente, expresados como el \log_2 del cociente entre las medias de los modelos ITQ-sensibles e ITQ-resistentes). El cambio de metilación (diferencia media de valores) aparece como una escala de colores en

el eje de ordenadas secundario. Por tanto, en el cuadrante superior se encuentran aquellas proteínas asociadas con el fenotipo mesenquimal y resistente a ITQs con niveles elevados de ARNm y de proteína (VIM, NNMT, BST2, BASP1, LEPRE1 y BLMH) (media de ratio >2 , $FDR < 0.05$, t-test comparando cada una de las parejas), y además algunos de ellos están hipometilados (NNMT, VIM). Por otro lado, en el cuadrante inferior izquierdo, se localizan las proteínas características del fenotipo epitelial e ITQ-sensible (CDH1, KRT19, ITGA2, LCN2, TACSTD2, CLDN4, y CRABP2, mediana de ratio < 0.5 , $FDR < 0.05$), estando algunos de estos genes hipermetilados. Mención especial merece EPCAM, que pese a no haber pasado el filtro de niveles de proteína, (aun estando disminuidos), es un importante marcador del linaje epitelial (Hyun, Koo et al. 2016).

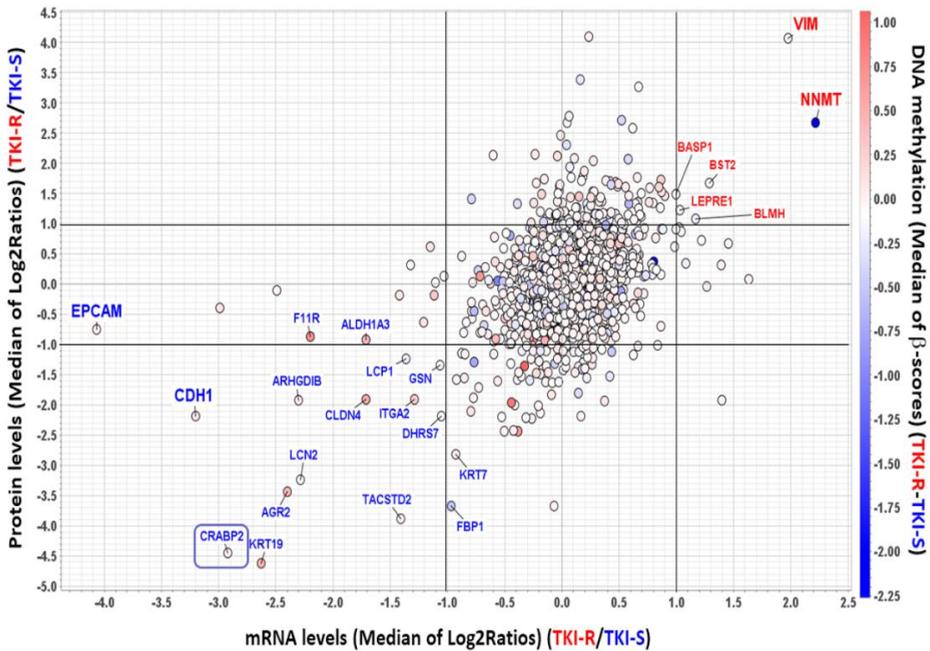


Figura 19. Integración de los datos de proteómica, transcriptómica y metilación del ADN. Se muestran los niveles de proteína, ARNm y metilación del promotor de 1482 proteínas únicas, los datos están expresados como la mediana de la ratio entre ITQ-resistente/ITQ-sensible, en escala log₂ calculadas de cada uno de los modelos celulares empleados en este análisis. En el eje de la X se observan los niveles de ARNm y en el de las Y los niveles de proteína, mientras que los datos de metilación se representan en escala de colores dentro de cada proteína. Las líneas horizontales y verticales marcan el punto de corte para el filtrado ($\log_2\text{ratio} > 1$ o < -1 ; > 2 o < 0.5 en escala natural) (Tesis Doctoral Inés Pulido 2017).

El análisis integrativo anterior estaba limitado a aquellos genes representados en el análisis proteómico (1482 genes); además, la capa epigenómica estaba colapsada a nivel de la isla CpG individual localizada en la región promotora que presentara una mayor variación. Dado que existen múltiples CpGs no sólo en cada región promotora, sino también en el cuerpo del gen o incluso en otras regiones genómicas (tal y como se describió en la Introducción), nos propusimos diseccionar con más detalle el escenario epigenómico global en nuestros modelos experimentales, y determinar cómo se ven modificadas las marcas de metilación en todas las islas CpGs contenidas en el *microarray* (unas 450.000

sitios de metilación), su localización genómica, así como la correlación con los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero.

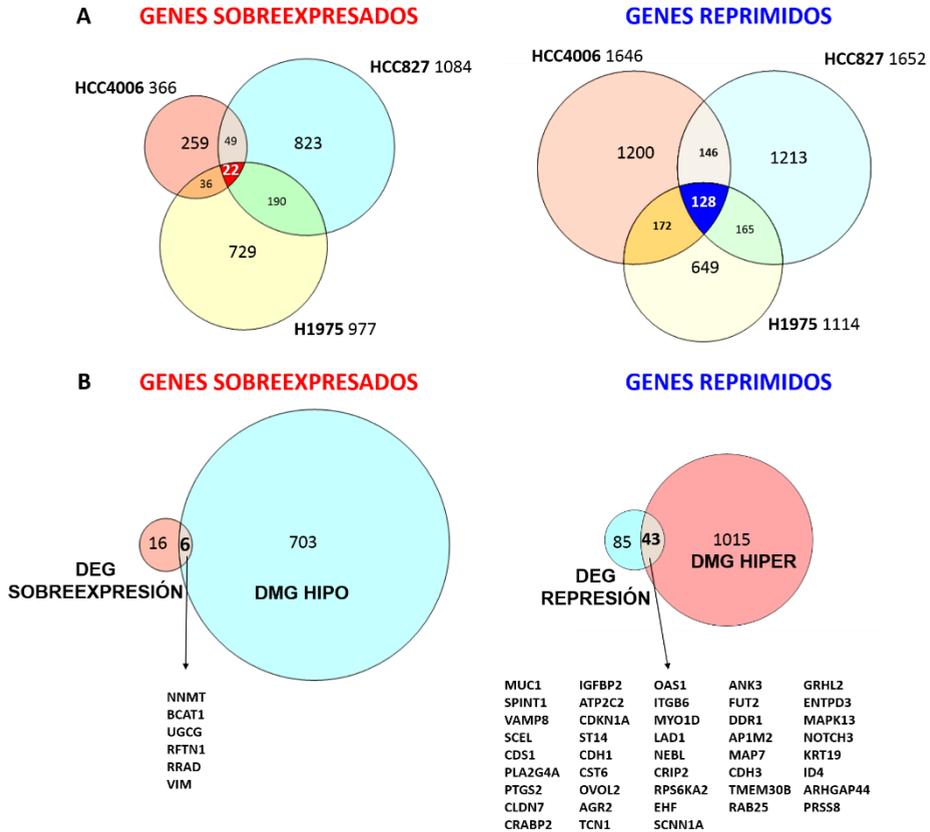


Figura 20. Integración de los niveles de metilación de ADN con los genes sobreexpresados y reprimidos en los modelos mesenquimales resistentes a los ITQs. **A.** Número de genes sobreexpresados y reprimidos significativamente (t -test, $FDR < 0.05$) en los modelos resistentes a los ITQs, tanto individualmente como en común entre los modelos. **B.** Solapamiento entre el número de genes sobreexpresados o reprimidos (DEG , *differentially expressed genes*, t -test, $FDR < 0.05$) y los genes que se encuentran hipo o hipermetilados (DMG , *differentially methylated genes*, t -test, $FDR < 0.05$), respectivamente, en los tres modelos resistentes a los ITQs.

En la figura 20 podemos observar que los modelos mesenquimales ITQ-resistentes tienen en común la sobreexpresión de 22 genes y la represión de otros 128 (t -test, $Fold\ Change > 2$, $FDR < 0.05$). Si solapamos estas listas de genes diferencialmente expresados con los resultados del análisis de metilación

diferencial del ADN, utilizando los mismos parámetros estadísticos, encontramos que los modelos mesenquimales tienen hipometiladas una o varias islas CpGs localizadas en 703 genes, de los cuales solo 6 (NNMT, BCAT1, UGCG, RFTN1, RRAD y el gen mesenquimal VIM) presentan sobreexpresión, lo que representa un 0,7% de genes hipometilados y a la vez transcripcionalmente activos. En cuanto a los genes diferencialmente reprimidos a nivel transcripcional, 43 de los 128 genes se encuentran hipermetilados, lo cual indica que aproximadamente un tercio de los genes inactivados presentan una hipermetilación significativa de una o varias islas CpGs. Por tanto, y tal y como era de esperar, en nuestros modelos encontramos una clara correlación entre hipermetilación y represión de la expresión génica, que afecta importantes genes de linaje epitelial, como CDH1 o GHRL2.

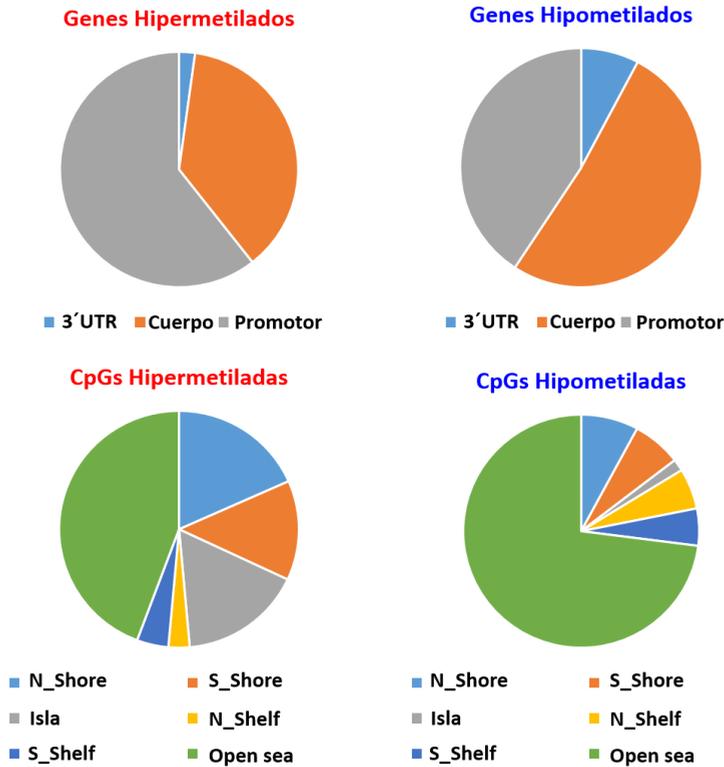


Figura 21. Representación de los niveles de metilación del ADN global en las distintas regiones del genoma en los modelos de resistencia a los ITQs. Las islas CpGs diferencialmente metiladas en las líneas resistentes y mesenquimales comparadas con sus correspondientes líneas parentales sensibles a ITQs (t -test, $FDR < 0.05$) se clasificaron en función de su posición con respecto al gen (arriba) o la localización genómica (abajo) como porcentajes sobre el total de CpGs hiper ($n=1058$) o hipometiladas ($n=709$).

En cuanto a la relevancia funcional de la metilación diferencial asociada al fenotipo mesenquimal ITQ-resistente en función de la localización genómica encontramos que la hipermetilación de CpGs tiene lugar mayoritariamente en las regiones promotoras mientras que la hipometilación es más frecuente en el cuerpo del gen (Figura 21). La hipermetilación afecta en un alto porcentaje a las islas CpGs y sus regiones periféricas (*N-shore*, *S-shore* y en menor medida *N-shelf* y *S-shelf*) con respecto al *open sea*. En el caso de la hipometilación, estas CpGs corresponden a un porcentaje muy pequeño, dando un gran peso en la

hipometilación a las CpGs del *open sea* (figura 21). Estas diferencias cualitativas (en cuanto a localización) explican, al menos en parte, porque hay genes hipermetilados que no se reprimen y genes hipometilados que no se sobreexpresan (Jones 2012), aunque un estudio más detallado nos permitirá validar en un futuro el impacto funcional de estas modificaciones, sobre todo en lo que se refiere a la hipometilación de CpGs localizadas en los cuerpos de los genes y su relación con la activación transcripcional de genes asociados al fenotipo mesenquimal ITQ-resistente.

Por último, y dado que los genes reprimidos significativamente en el fenotipo EMT presenta una alta correlación con la hipermetilación de CpGs de promotores, nos planteamos estudiar qué reguladores epigenómicos podrían estar enriquecidos significativamente en esta firma compuesta por 128 genes hipermetilados y reprimidos que se muestran en la figura 20. Para ello, utilizamos la herramienta de análisis de enriquecimiento funcional de genesets Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) y su colección de firmas asociadas a regulación epigenómica, centrándonos en las firmas de genes que son dianas transcripcionales directas de factores de transcripción, obtenidas a partir de los datos de ChiP-Seq de más de 200 remodeladores de la cromatina y factores de transcripción del proyecto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*, <https://www.encodeproject.org>) y las firmas transcripcionales asociadas a factores de transcripción extraídas del *Gene Expression Omnibus* (GEO, NCBI) y anotadas en la herramienta CREEDS (*Crowd Extracted Expression of Differential Signatures*, <https://amp.pharm.mssm.edu/CREEDS>) (Dunham 2012; Wang 2016).

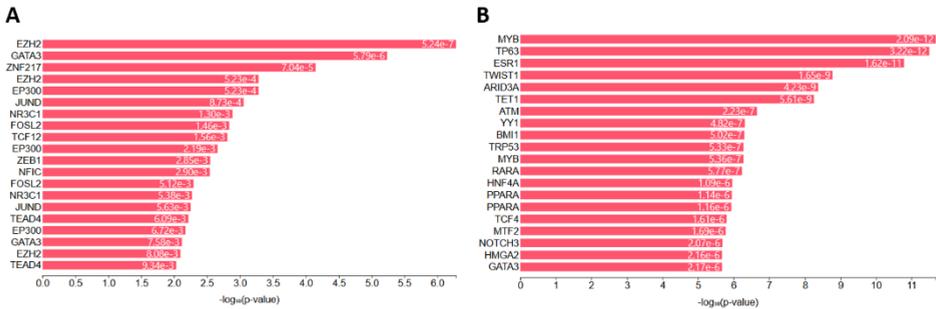


Figura 22. Firmas de enriquecimiento funcional asociadas a los genes reprimidos-hipermetilados y sobreexpresados-hipometilados de los modelos resistentes a los ITQs. Genesets experimentales asociados a factores de transcripción y remodeladores de la cromatina de significativamente enriquecidos (FDR<0.05) utilizando la colección ENCODE (A) y CREEDS (B).

En la figura 22 resumimos los resultados más relevantes del análisis de enriquecimiento funcional de la firma de represión e hipermetilación de nuestros modelos mesenquimales ITQ-resistentes. Como era de esperar, nos encontramos con que los genes de nuestra firma interactúan con importantes represores transcripcionales, como la histona metiltransferasa del complejo represor PRC2 (EZH2), el factor de transcripción represor de genes epiteliales ZEB1, y los factores pro-EMT TWIST y HNF4A, entre otros. Por otro lado, también encontramos importantes reguladores de la transcripción génica como PPARA y los receptores del ácido retinoico, como RARA.

2.2 Validación de la proteína CRABP2 como potencial biomarcador y regulador del fenotipo mesenquimal ITQ-resistente.

Como ya hemos mencionado, la mayor parte de las proteínas reprimidas en el estudio multiómico anterior ejercen funciones de adhesión o interacción con la matriz extracelular. Sin embargo, una de las excepciones es CRABP2 (*Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2*), que tiene una funcionalidad muy distinta. Se trata de una proteína citoplasmática que se encarga de transportar el ácido

retinoico (AR) del citoplasma al núcleo para que interaccione específicamente con receptores nucleares del ácido retinoico de la subfamilia RAR (RARA, RARB y RARG) que a su vez forman heterodímeros con los receptores retinoides X (RXRs). Los complejos AR/receptores nucleares se unen a distintas regiones específicas del ADN, conocidas como elementos de respuesta al AR, que son regiones reguladoras de genes diana concretos (Chambon 1996; Mangelsdorf 1994; Dong 1999; Laudet 2002). El AR regula múltiples procesos biológicos y juega un papel clave en el desarrollo embrionario y la remodelación de tejidos en el adulto. La activación transcripcional por RAR puede desencadenar la diferenciación (Park 1999; Rochette-Egly 2001), detención del ciclo celular (Donato et al., 2007) y apoptosis (Altucci 2001; Kitareewan 2002; Donato 2005), y por lo tanto a menudo conduce a la inhibición de la proliferación celular. En consecuencia, el AR y sus derivados tienen actividad antitumoral y se han utilizado como agentes terapéuticos en varios tipos de cáncer humano, sobre todo en tumores hematológicos (Soprano 2004).

Numerosas evidencias experimentales relacionan la actividad de CRABP2 con un aumento de la sensibilidad al AR (Budhu 2002; Schug 2007). Recientemente se ha demostrado que CRABP2 puede promover la metástasis en el cáncer de pulmón, aunque en otros tipos de tumores como el cáncer de esófago genera el efecto contrario, pudiendo actuar como un gen supresor de tumores (Yang 2016). Además, en el carcinoma mamario se ha demostrado que CRABP2 es capaz de regular la capacidad de invasión y metástasis en función del estatus ER positivo o negativo (Feng 2019). Todas estas evidencias sugieren que en función del tipo de tumor y de los factores genéticos y el contexto tisular CRABP2 puede ejercer un efecto protumoral o antitumoral cuyos mecanismos aun no son bien conocidos. Además, no hay publicaciones sobre su papel en el cáncer de pulmón con mutaciones en EGFR ni en el desarrollo de resistencias a los ITQs. La represión de esta proteína asociada a nuestro fenotipo mesenquimal ITQ-

resistente señala a la vía del AR como un posible reprogramador epigenético importante en la EMT. Además, hemos de considerar el hecho de que nuestra firma de represión e hipermetilación asociada con el fenotipo mesenquimal ITQ-resistente está enriquecida (Figura 22) en firmas transcripcionales asociadas al receptor del AR RARA (y también a remodeladores de la cromatina asociados a los RARs como EZH2, relación que describiremos más adelante). Por todo ello, se procedió a la validación de los niveles de CRABP2 y su correlación con el fenotipo epitelial en nuestros modelos celulares de resistencia adquirida al osimertinib por *western blot* y por RT-PCR.

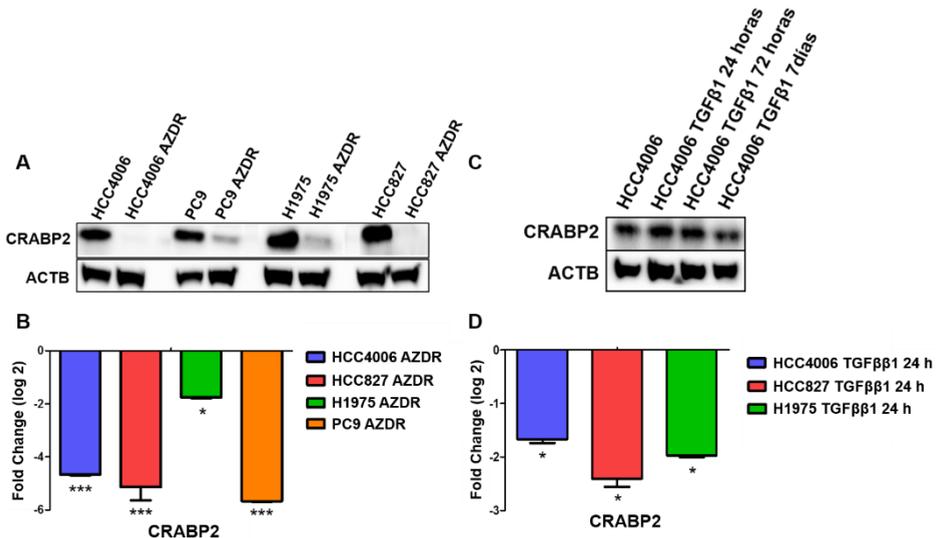


Figura 23. Expresión de CRABP2 en líneas celulares con *EGFR* mutado sensible y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT. A. Niveles de las proteínas CRABP2 y ACTB como control de carga determinados mediante *western blot*. Imagen representativa de una n=3. **B.** Expresión de CRABP2 a nivel de ARNm. Se emplearon extractos de ARNt que se retrotranscribieron a ADNc y por qPCR se determinaron los niveles de CRABP2 y ACTB como control de carga en las líneas sensibles y resistentes al osimertinib, los datos están expresados en log₂ del 2^{-ΔΔCt} de la línea resistente comparada con la sensible (n=3). **C.** Los extractos de proteínas de la línea HCC4006 tratada con TGFβ1 10 ng/mL a distintos tiempos. Imagen representativa de una n=3. **D.** Niveles de expresión de CRABP2 a nivel de ARNm tras el tratamiento con TGFβ1 10 ng/mL tras 24 horas de incubación. Se utilizó ACTB como control de carga, los datos están expresados en log₂ del 2^{-ΔΔCt} de la línea tratada con TGFβ1 comparada con la no tratada. (n=3). Los datos en B y D fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde * p<0,05 ***p<0,001 con respecto a sus respectivos controles.

La expresión de CRABP2 es muy elevada tanto a nivel de ARNm como de proteína en las líneas parentales ITQ-sensibles y epiteliales comparada con las líneas resistentes (Figura 23A y 23B). Por otro lado, podemos observar como un inductor del programa EMT (el TGF β 1) disminuye la expresión de CRABP2 (Figura 23C). Esta disminución es un fenómeno temprano (24h) en todos los modelos ensayados, y posteriormente los niveles de proteína disminuyen tras 7 días de tratamiento con la citoquina (Figura 23C y 23D). Con todo, podemos afirmar que CRABP2 se reprime en el fenotipo mesenquimal, ya sea asociado a la resistencia a los ITQs o inducido por un inductor de EMT como el TGF β 1.

A continuación, nos preguntamos si la expresión de CRABP2 correlacionaba de con los genes de la firma canónica EMT, de manera general en el AC pulmonar. Para ello, en primer lugar, se extrajeron los datos genómicos y transcriptómicos de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (un proyecto que analizó a nivel mutacional y transcriptómico cerca de 1000 líneas celulares de cáncer humano, incluyendo 88 de AC pulmonar) (Barretina 2012), y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre la expresión de CRABP2 y la de marcadores canónicos del fenotipo epitelial (CDH1, EPCAM), mesenquimal (CDH2, VIM, ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2). La Figura 24 muestra la correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de CRABP2 y los genes epiteliales CDH1 y EPCAM, y negativa con respecto a algunos de los genes mesenquimales (ZEB1 y TWIST1), correlación que se repite en los pacientes de AC pulmonar analizados en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) (Lawrence 2014). Así, líneas celulares con un fenotipo marcadamente mesenquimal como la A549, que se caracteriza por tener niveles altos de ZEB1 y bajos de CDH1, presentan niveles bajos de CRABP2, mientras que líneas celulares con el fenotipo epitelial como las HCC827 y las HCC4006 poseen niveles de expresión

elevados de CRABP2 junto con marcas epiteliales como CDH1 y niveles bajos de marcas mesenquimales.

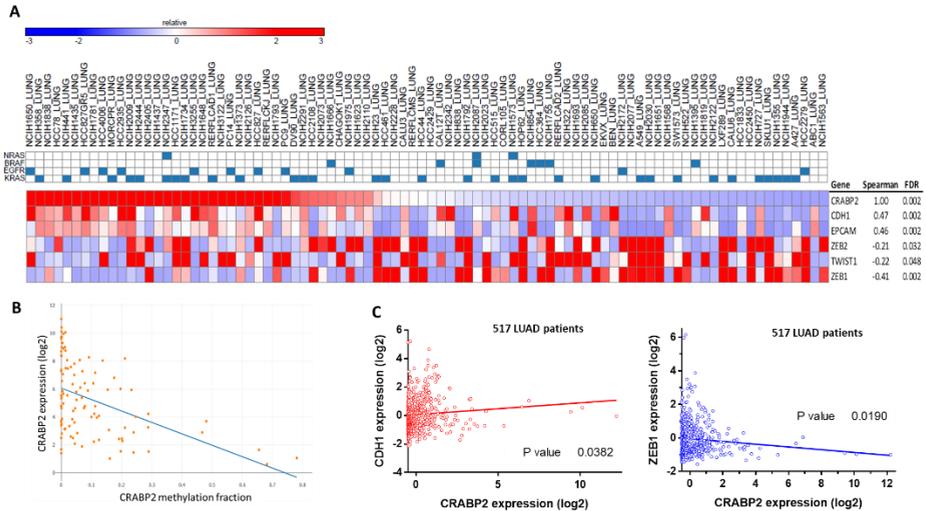


Figura 24. Análisis de la correlación entre los niveles de expresión de CRABP2 y los genes epiteliales y mesenquimales en las líneas celulares (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) y pacientes (TCGA) de AC pulmonar. A. El heatmap muestra las correlaciones de Spearman significativas entre la expresión de CRABP2 y genes epiteliales y mesenquimales en 88 líneas celulares anotadas como AC pulmonar en la CCLE; los colores representan niveles elevados (en rojo) y bajos (en azul) de expresión a nivel de ARNm. En el recuadro superior se indica el estatus mutacional de los oncogenes más frecuentemente mutados en el AC pulmonar. El coeficiente de correlación de Spearman y su p-valor fue ajustado mediante *False Discovery Rate* (FDR). **B.** Correlación de Pearson ($R=0.32$, $p<0.05$) significativa entre los niveles de expresión de CRABP2 y el grado de metilación de su promotor. **C.** Correlaciones significativas entre CRABP2 y genes epiteliales y mesenquimales en la colección de AC pulmonares de pacientes del TCGA.

Con el fin de validar esta correlación entre la expresión de CRABP2 y los marcadores de EMT en el AC pulmonar, analizamos los niveles de proteínas epiteliales y mesenquimales en un panel de líneas celulares disponibles en nuestro laboratorio mediante *western blot*. En la Figura 25 observamos que, en líneas generales, existe una correlación positiva entre CRABP2 y las marcas epiteliales como CDH1 y GRHL2. Además, los niveles de CRABP2 correlacionan de forma negativa con el EMT-TF ZEB1, mientras que para otros

marcadores mesenquimales como VIM y SNAI1 no hay ninguna correlación. Con todo, podemos afirmar que CRABP2 es un marcador de linaje epitelial en el AC pulmonar.

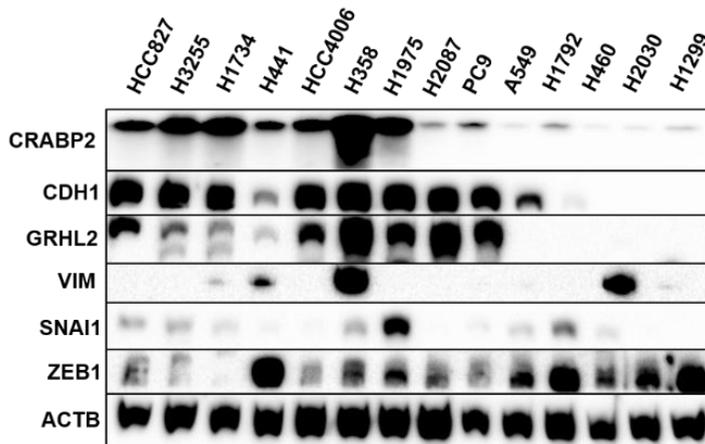


Figura 25. Expresión de CRABP2 y de marcas EMT en líneas celulares de AC pulmonar. Los extractos de proteínas de las líneas celulares parentales indicadas se analizaron mediante *western blot* para determinar los niveles de las proteínas CRABP2, CDH1, GRHL2, VIM, SNAI1, ZEB1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Dado que la función de CRABP2 es permitir la llegada del AR a núcleo y su unión con los RARs, decidimos estudiar el grado de activación de esta vía en las células parentales y resistentes a osimertinib. Para ello, determinamos por RT-PCR los niveles de expresión de dos genes que son regulados directamente por el AR, los genes *CYP26A1* y *HOXA1* (Gillespie 2007).

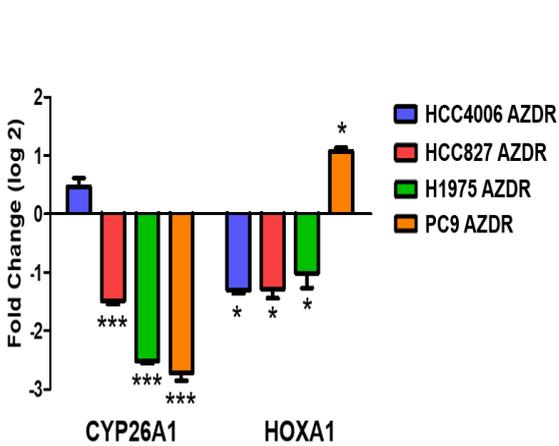


Figura 26. Expresión de *CYP26A1* y *HOXA1* en líneas celulares *EGFR* mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT. Se emplearon extractos de ARN que se retrotranscribieron a ADNc para después determinar por qPCR los niveles de *CYP26A1*, *HOXA1* y *ACTB* como control de carga, los datos están expresados en \log_2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea resistente comparada con su línea sensible. (n=3). Los resultados fueron analizados mediante análisis one way ANOVA y test de Tukey donde * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto a sus controles.

En la Figura 26, podemos observar como las líneas mesenquimales, en comparación con las líneas parentales con fenotipo epitelial y niveles altos de CRABP2, muestran una baja expresión de *CYP26A1* y/o *HOXA1*. Caso especial es el de las células HCC4006 AZDR, que presentan niveles similares de *CYP26A1* pero más bajos de *HOXA1*, o el de las PC9 AZDR, que muestran niveles altos de *HOXA1*, pero más bajos de *CYP26A1*. Estos resultados sugieren que aquellas líneas que presentan niveles bajos de CRABP2 y fenotipo mesenquimal tienen una menor actividad de la vía del AR en condiciones basales.

El AR, como hemos descrito anteriormente, es un inductor de la diferenciación celular, el arresto del ciclo celular y la apoptosis en diferentes contextos tisulares, y por tanto inhibe la proliferación celular (Altucci 2001; Kitareewan 2002; Donato 2005; Donato 2007). Por este motivo, nos preguntamos si los retinoides, moléculas que mimetizan el AR, podrían inducir estos efectos en nuestros modelos celulares. Para ello, se realizó un ensayo de formación de colonias con las células parentales y resistentes al osimertinib en presencia de adapaleno, un retinoide de tercera generación que presenta un efecto más potente que el AR en

la modulación de la diferenciación celular, y que en células de carcinoma mamario se ha comprobado que es capaz de revertir el fenotipo mesenquimal, induciendo una potente reexpresión del gen epitelial *CDHI* (Pattabiraman 2016). En la Figura 27 observamos el cambio de morfología que presentan las líneas epiteliales cuando son tratadas con el retinoide, que induce una expansión del citoplasma, mientras que las mesenquimales permanecen con una morfología muy similar, lo que sugiere que el adapaleno podría inducir la diferenciación celular en las células epiteliales con niveles elevados de CRABP2 en nuestros modelos de AC pulmonar.

Además de este efecto sobre la diferenciación celular, en la Figura 28 estudiamos el efecto citostático del adapaleno en estas mismas líneas celulares. En las líneas epiteliales y sensibles al osimertinib HCC827 y PC9, el adapaleno posee un claro efecto antiproliferativo comparado con sus equivalentes mesenquimales; en los modelos H1975/AZDR y HCC4006/AZDR no se observan diferencias, si bien sí que se apreciaban cambios morfológicos. Estas observaciones sugieren que las células epiteliales sensibles a los ITQs con niveles de CRABP2 elevados podrían tener una mayor sensibilidad al efecto antiproliferativo y sobre la diferenciación celular del adapaleno.

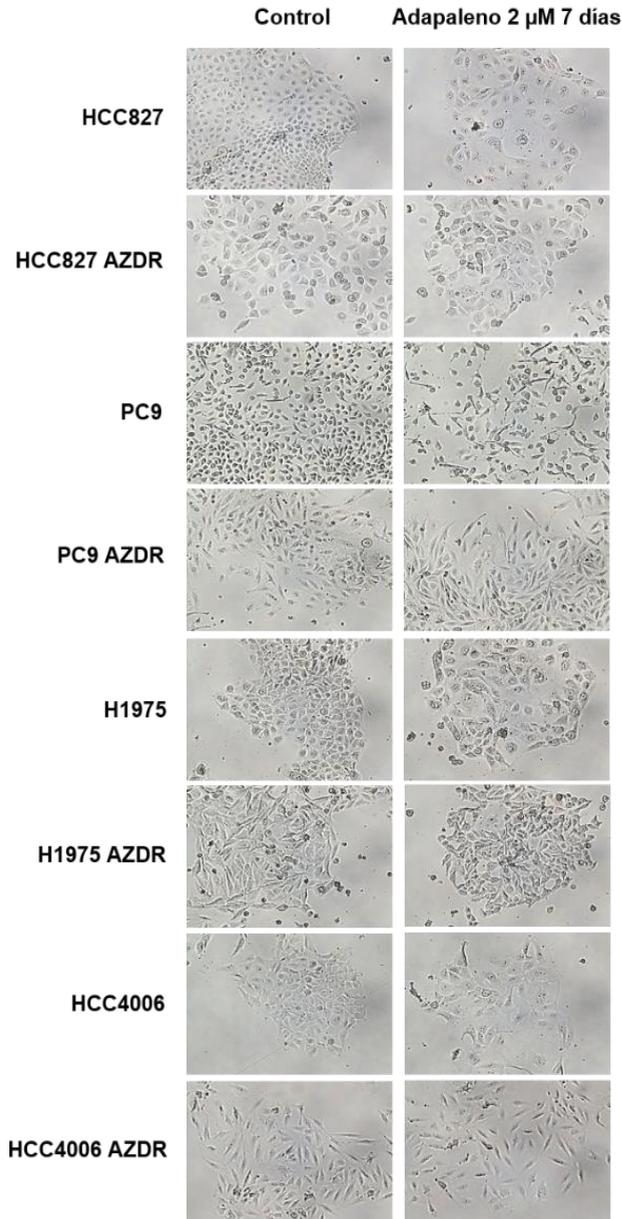


Figura 27. Imágenes de la morfología de las líneas celulares *EGFR* mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT con y sin adapaleno. Las imágenes fueron tomadas tras 7 días de tratamiento con adapaleno durante el ensayo de formación de colonias en las distintas líneas celulares.

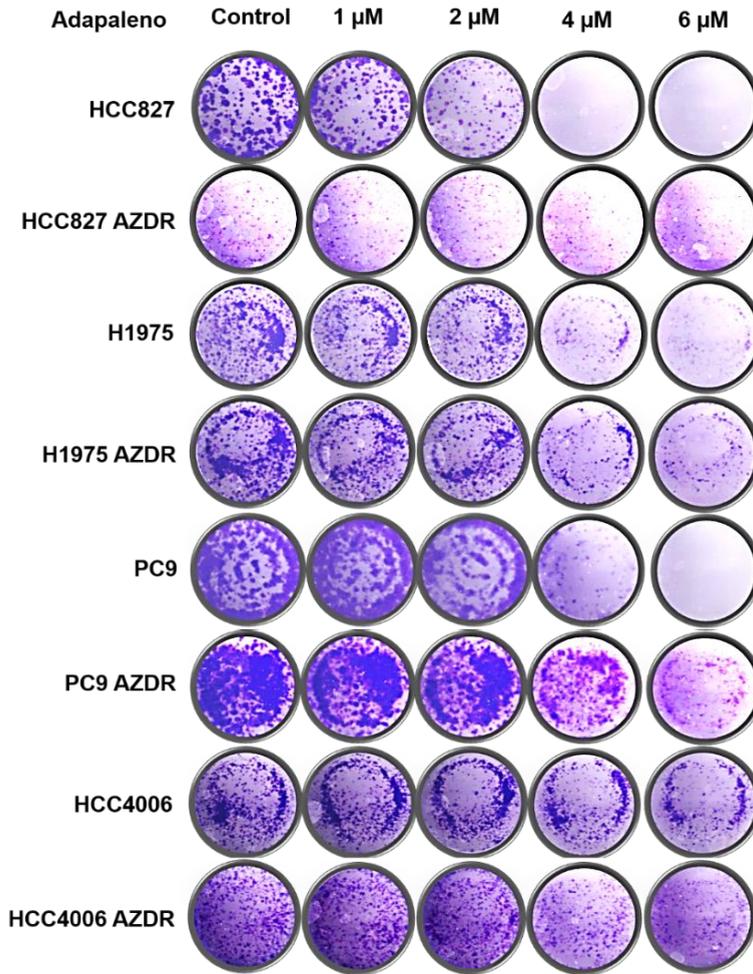


Figura 28. Efecto del adapaleno sobre la proliferación de células de AC pulmonar con *EGFR* mutado sensibles y resistentes a osimertinib con fenotipo EMT. Imagen de un ensayo de formación de colonias tras 8 días de incubación con distintas concentraciones de adapaleno. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio se cambió cada 2 días; al finalizar el tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

3. Relación funcional entre CRABP2, la EMT y la resistencia a ITQs

Dado que mediante distintas aproximaciones hemos demostrado que CRABP2 es un marcador asociado al fenotipo epitelial, nos planteamos si podría actuar como un agente causal que contribuya al fenotipo mesenquimal y al desarrollo de la resistencia a los ITQs. Para ello, se generaron varias líneas estables en las que se sobreexpresó de forma ectópica la proteína CRABP2 infectando las líneas resistentes al osimertinib con lentivirus donde estaba clonada la región codificante de *CRABP2* o el gen que codifica la proteína fluorescente *mCherry* como control. Por otro lado, se reprimió la proteína CRABP2 endógena en las líneas parentales sensibles a osimertinib mediante siRNA de efecto transitorio, y también mediante infección lentiviral con secuencias de silenciamiento de shRNA.

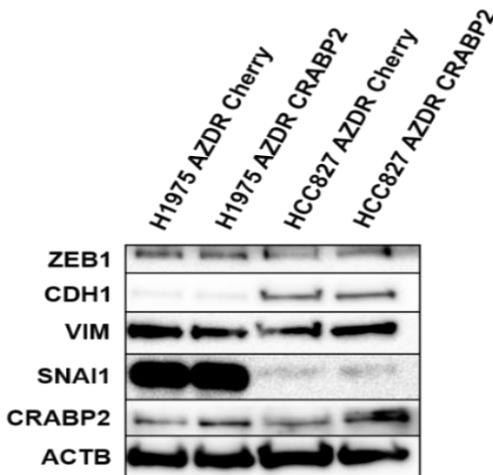


Figura 29. Expresión de marcadores EMT tras la sobreexpresión de CRABP2 en líneas mesenquimales resistentes al osimertinib. Se emplearon extractos de proteínas de líneas infectadas con lentivirus con un vector control y un vector de sobreexpresión de CRABP2 y mediante *western blot* se determinaron las proteínas ZEB1, CDH1, VIM, SNAI1, CRABP2, y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Como podemos comprobar en la Figura 29, la reexpresión de CRABP2 en los modelos mesenquimales resistentes a osimertinib no fue capaz de revertir el

fenotipo mesenquimal, ya que las células AZDR siguen reprimiendo CDH1 y muestran niveles elevados de VIM, SNAI1 y ZEB1.

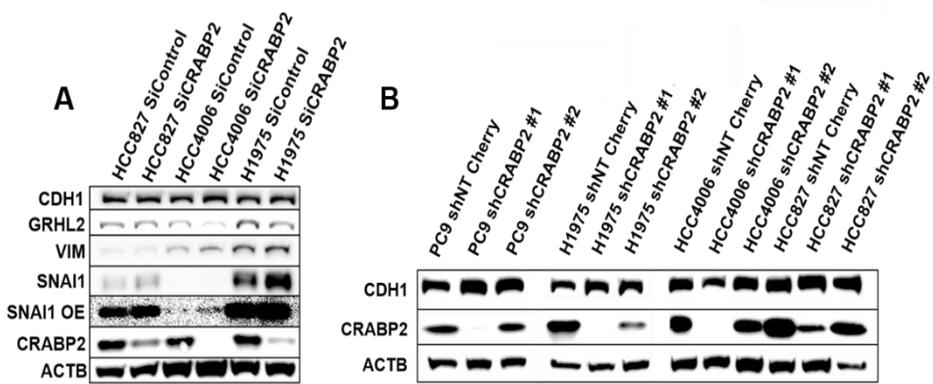


Figura 30. Expresión de marcadores EMT tras la represión de CRABP2 en líneas parentales EGFR mutantes de AC pulmonar. A. Los extractos de proteínas se prepararon tras 72 horas de incubación con los siRNAs indicados, y mediante *western blot* se determinaron las proteínas CRABP2, CDH1, GRHL2, VIM, SNAI1, ZEB1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una $n=3$. **B.** Tras la infección lentiviral con los shRNAs dirigidos contra NT (*non target*, control) y CRABP2, y la selección y estabilización de las líneas con el antibiótico puromicina, se prepararon extractos de proteína y se determinaron los niveles de CRABP2, CDH1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una $n=3$.

Por otra parte, cuando se indujo el silenciamiento de CRABP2 mediante siRNA (Figura 30A), 72 horas tras la transfección encontramos que la represión transitoria de CRABP2 en las líneas parentales HCC827, HCC4006 y H1975 provocó un aumento de los niveles de SNAI1, uno de los primeros eventos inductores del fenotipo mesenquimal y que favorece posteriormente la expresión de otros EMT-TF como ZEB1 y la sobreexpresión de marcadores EMT. Además, acompañado de este aumento de expresión de SNAI1, pudimos observar en cierto grado de represión del factor de transcripción epitelial GRHL2.

Aunque la represión transitoria con siRNA indicaba que CRABP2 podría jugar un papel importante en el mantenimiento del fenotipo epitelial, el silenciamiento estable de CRABP2 mediante shRNAs descartó esta posibilidad. Comprobada la

represión eficaz de CRABP2 (Figura 30B), las células seguían presentando un claro fenotipo epitelial, con niveles altos de CDH1 (a excepción de las HCC4006 infectadas con la secuencia de shRNA #1) y ausencia de marcas mesenquimales; de hecho, los niveles de VIM, SNAI1 y ZEB1 fueron indetectables.

Estos resultados sugieren que CRABP2 no es responsable *per se* del mantenimiento del fenotipo epitelial; la sobreexpresión ectópica de CRABP2 no revierte el fenotipo mesenquimal, y pese a que su represión transitoria es capaz de iniciar el programa EMT activando SNAI1, este estímulo no es suficiente para permitir la progresión hacia el fenotipo mesenquimal, tal y como hemos podido observar en la represión estable de CRABP2 con shRNA. Estas evidencias indican la posible existencia de mecanismos de compensación de la vía del AR por debajo de CRABP2, que explicarían cómo la represión inicial CRABP2 activa el programa EMT, pero no es suficiente para sostener un cambio fenotípico estable.

A continuación quisimos comprobar si esta modulación de los niveles de CRABP2 afectaba de algún modo la sensibilidad a los ITQs. Para ello, se realizaron ensayos de colonias con osimertinib en las líneas resistentes que sobreexpresaban de manera ectópica CRABP2, y en las parentales en las que se reprimía con shRNAs (Figura 31). Como era de esperar, los resultados indican que la sobreexpresión (Figura 31A) o el silenciamiento de CRABP2 (Figura 31B) no modifica la respuesta al ITQ: las células AZDR que sobreexpresan CRABP2 siguen siendo resistentes comparadas con las infectadas con el vector *Cherry* control (con la posible excepción de las células HCC827 AZDR), y las líneas sensibles tienen la misma respuesta aun reprimiendo CRABP2, en comparación con las infectadas con el vector control. Por tanto, podemos concluir que pese a ser un marcador epitelial, CRABP2 no ejerce ningún papel en la sensibilidad a los ITQs de EGFR.

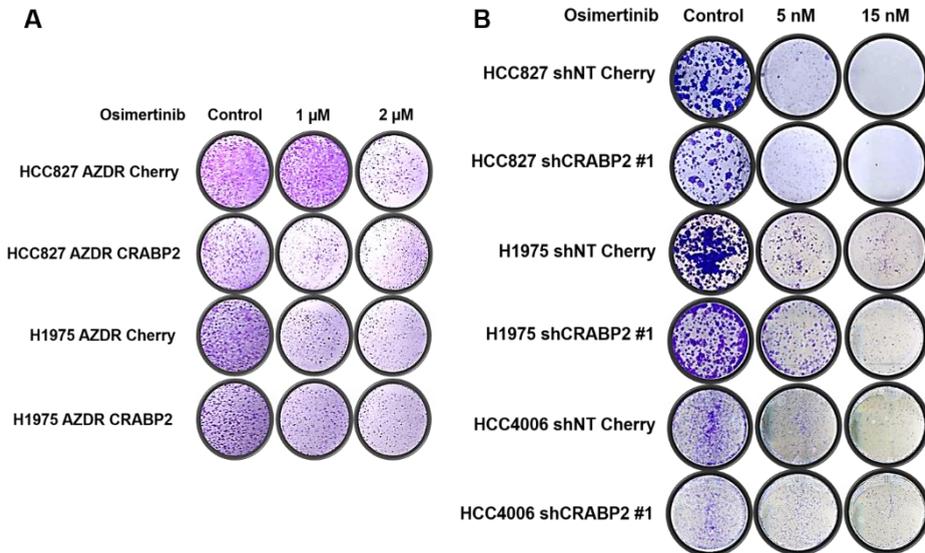


Figura 31. Modulación de los niveles de CRABP2 y sensibilidad al osimertinib en líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado ITQ-sensibles o resistentes. A. Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las líneas celulares indicadas se incubaron durante 8 días con distintas concentraciones de osimertinib. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio de cultivo se cambió cada 2 días, al finalizar el tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

Por último, nos preguntamos si la modulación de los niveles de CRABP2 era capaz de condicionar el efecto antiproliferativo del adapaleno, al ser una proteína que permite la translocación tanto del AR como de sus derivados al núcleo celular para que interaccionen con sus receptores. Para ello, realizamos varios ensayos proliferación y viabilidad celulares en presencia de adapaleno en los mismos modelos en los que se sobreexpresó o se reprimió mediante shRNA.

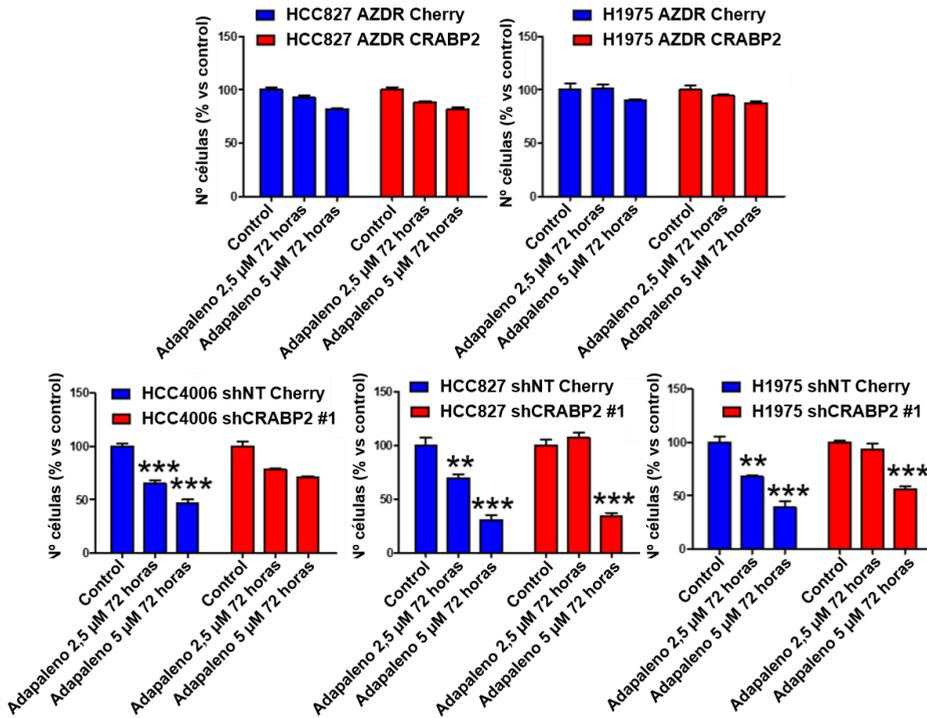


Figura 32. Ensayo de proliferación y viabilidad celular en presencia de adapaleno en líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado y sobreexpresión o represión ectópicas de CRABP2. Para este ensayo las líneas celulares indicadas fueron sembradas en placas de 6 pocillos con 200.000 células por pocillo, y a las 24 horas se añadió el medio de cultivo con adapaleno. Tras 48 horas se contaron las células mediante el método de exclusión del azul tripán. Los datos están expresados como el número de células vivas de las líneas modificadas respecto a su control \pm desviación estándar (n=6). Los resultados fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto a sus respectivos controles.

En la parte superior de la Figura 32, podemos observar como la sobreexpresión de CRABP2 en las líneas celulares resistentes al osimertinib con fenotipo mesenquimal no modifica la respuesta al adapaleno, mientras que su represión en las líneas epiteliales sí que rescata, al menos parcialmente, el efecto antiproliferativo. No obstante, en los ensayos de formación colonias no obtuvimos diferencias significativas ni con la sobreexpresión ectópica ni con la represión de CRABP2 (resultados no mostrados). Por tanto, podemos concluir que, en el largo plazo, la modulación de los niveles de CRABP2 en las líneas

epiteliales o mesenquimales no condiciona el efecto antitumoral del retinoide adapaleno, y que por lo tanto deben existir otros factores que modulan esta respuesta diferencial.

Descartado el papel de CRABP2 como un posible factor responsable del mantenimiento del fenotipo epitelial y de la sensibilidad a los ITQs, pero dado que su represión transitoria sí que es capaz de iniciar la activación del programa EMT, nos planteamos estudiar aquellos elementos que están por debajo de CRABP2 en la vía del AR. Puesto que CRABP2 media el transporte del AR al núcleo y permite su interacción específica con los receptores RAR, decidimos evaluar los niveles de ARNm y de proteína de los miembros de esta subfamilia (RARA, RARB y RARG) en nuestro panel de líneas parentales y resistentes al osimertinib. Los complejos AR/RARs son importantes moduladores epigenéticos de los programas de diferenciación celular (Gudas 2013), y por lo tanto podrían estar relacionados con la reprogramación epigenética que regula la transición del fenotipo epitelial hacia el mesenquimal y por extensión, la resistencia adquirida a los ITQs en el AC pulmonar.

En la Figura 33 se muestra cómo todas las líneas mesenquimales ITQ-resistentes reprimen muy significativamente RARG y sobreexpresan RARB, tanto a nivel de ARNm como de proteína. El caso de RARA resulta paradójico, dado que a nivel de ARNm su expresión apenas cambia en las líneas mesenquimales, mientras que a nivel de proteína observamos una clara sobreexpresión. Este patrón de expresión diferencial sugiere que en las células mesenquimales ITQ-resistentes se podrían estar formando unos complejos AR/RARs diferentes capaces de dirigir los cambios transcripcionales asociados al fenotipo EMT.

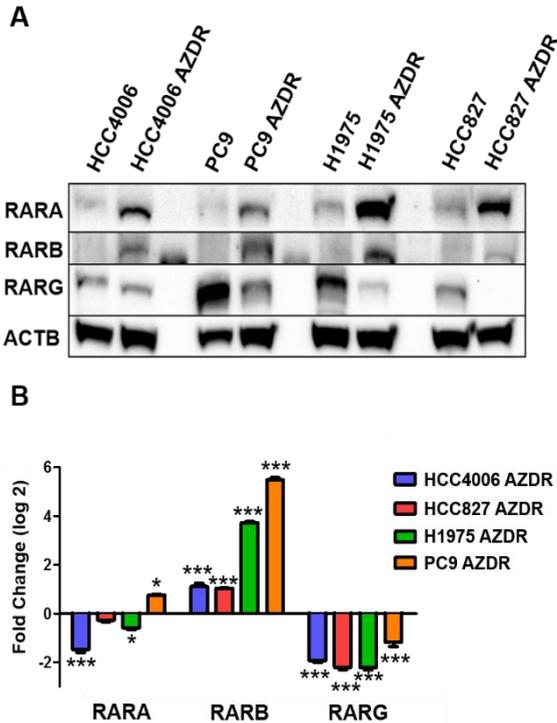


Figura 33. Expresión de los RARs en líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado y ITQ-sensibles o resistentes con fenotipo EMT. A. Los extractos de proteínas se analizaron mediante *western blot* para determinar las proteínas RARA, RARB, RARG y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3. **B.** Niveles de expresión de ARNm de los mismos. Los extractos de ARNt se retrotranscribieron a ADNc y por qPCR se determinaron los niveles de RARA, RARB, RARG relativizados a la expresión de ACTB, en las líneas sensibles y resistentes al osimertinib. Los resultados se expresan como log2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea resistente comparada con su línea sensible. Imagen representativa de una n=3. Los resultados B fueron analizados mediante análisis *one way ANOVA* y test de Tukey donde * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto a sus controles.

El perfil de expresión de los distintos RARs es bien conocido en el cáncer de pulmón. La expresión de RARA no se ve alterada con respecto al tejido pulmonar normal, RARG se encuentra reprimido en algunos estudios, y RARB presenta niveles bajos o ausentes en un porcentaje significativo de pacientes con cáncer pulmonar (Gebert 1991; Xu 1997; Picard 1999). De hecho, RARB es considerado como un gen supresor de tumores que se inactiva durante el proceso de carcinogénesis mediante la metilación de su promotor (Virmani 2000; Licchesi 2008). El efecto sobre la transcripción génica del AR, como ya hemos mencionado anteriormente, esta mediado por los receptores nucleares RARs y RXRs, que heterodimerizan y se unen a distintas regiones del ADN regulando así la expresión de distintos genes relacionados con la diferenciación. Uno de estos genes diana que regulan estos RARs es el propio RARB, que ve aumentar

sus niveles de expresión de forma considerable con el tratamiento con AR y se postuló como un posible predictor de respuesta antitumoral (de Thé 1990; Hoffmann 1990). Sin embargo, en el caso particular del cáncer de pulmón, esta sobreexpresión de RARB no siempre se produce dado que el promotor se encuentra metilado, y este hecho se asocia con la resistencia al efecto antiproliferativo del AR. No obstante, también existen estudios donde aunque RARB es capaz de expresarse en respuesta al AR, no se observa efecto antitumoral (Geradts 1993; Zhang 1994; Kim 1995).

En nuestros modelos experimentales, los niveles de RARB son muy bajos en las líneas parentales epiteliales, tal y como ocurre en un alto porcentaje de los casos de cáncer de pulmón, mientras que, de manera contradictoria con su posible papel supresor tumoral, está claramente sobreexpresado en las líneas resistentes a osimertinib con fenotipo mesenquimal. Ante este hecho, quisimos comprobar si el tratamiento con AR era capaz de inducir la activación de distintos genes canónicos de la vía del retinoico, incluido RARB, en las líneas parentales epiteliales y en las resistentes mesenquimales.

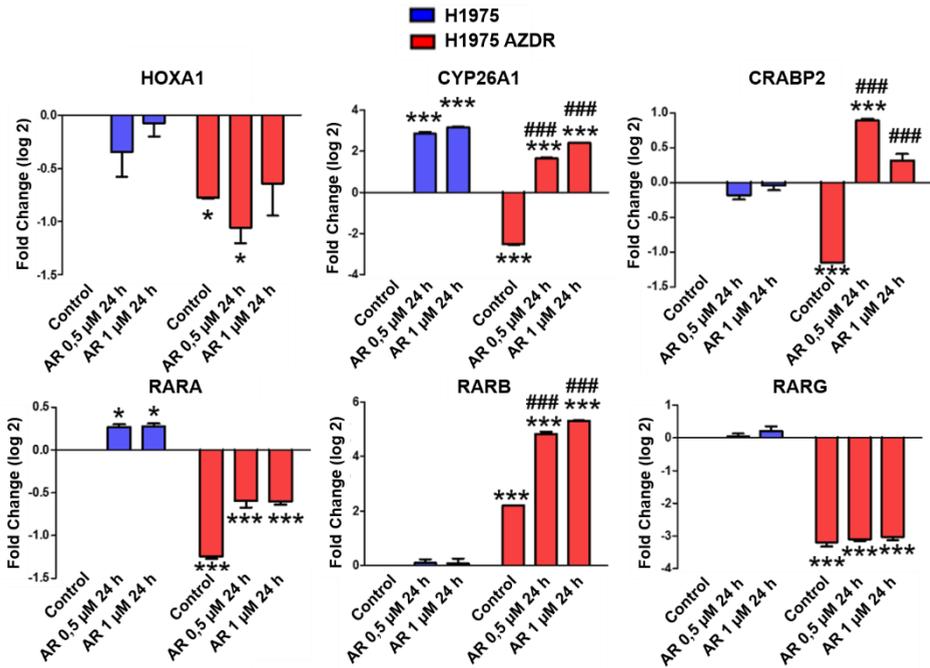


Figura 34. Expresión de los receptores nucleares RAR y genes diana de la vía del AR en las células H1975 ITQ-sensibles o resistentes con fenotipo EMT. Niveles de expresión a nivel de ARNm en las líneas H1975 parental y resistente al osimertinib cultivadas en suero deslipidado con carbón activado y tratadas con varias concentraciones de AR durante 24 horas. Los extractos de ARNt se retrotranscribieron a ADNc y por qPCR se determinaron los niveles de RARA, RARB, RARG, CRABP2, HOXA1, CYP26A1, que se relativizaron con respecto a la expresión de ACTB como gen de expresión constitutiva. Los resultados están expresados en log₂ del 2^{-ΔΔCt} de cada condición comparada con la línea parental H1975 sin tratar (cuyo valor se representa como 0 en la gráfica). Los datos (n=3) fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde * p<0,05 ***p<0,001 con respecto al control de H1975, ### p<0,001 con respecto al control H1975 AZDR.

Como podemos observar en la Figura 34, la línea parental H1975 responde al AR sobreexpresando de manera significativa CYP26A1, pero no el resto de genes analizados, incluido RARB. Sin embargo, en la línea mesenquimal ITQ-resistente, pese a que en condiciones basales presenta niveles más bajos de HOXA1 y CYP26A1, el tratamiento con AR es induce una respuesta mucho mayor, provocando la sobreexpresión de CYP26A1, RARB y CRABP2. Por tanto, las líneas mesenquimales tienen una mayor respuesta al AR en comparación con la línea parental epitelial.

Estos resultados sugieren que el programa transcripcional EMT podría depender, al menos en parte, de un cambio en el balance entre RARG, RARB y RARA. De tal modo RARG, elevado en el fenotipo epitelial podría favorecer la expresión de genes epiteliales o reprimir los genes mesenquimales. Existen muy pocas evidencias que relacionen los RARs con el programa EMT, pero las disponibles podrían apuntar a esta hipótesis. Así, el tratamiento con agonistas de RARG ha demostrado que puede atenuar el proceso EMT en la fibrosis subretinal (Kimura 2015), mientras que se ha demostrado que la inactivación de RARB es capaz de bloquear la vía WNT y el programa EMT en tumores mamarios (Liu 2014). Por otro lado, se ha descrito que RARB es capaz de inducir una mayor respuesta al AR que el RARG (Hoffman 1990). Este hecho podría explicar por qué una línea epitelial ITQ-sensible presenta una menor respuesta al AR por ser RARG el receptor preferente, comparado con su equivalente mesenquimal que muestra niveles elevados de RARA y RARB.

Como postulado general, se ha considerado que la expresión de genes diana en respuesta al AR, como los que hemos analizado, es capaz de predecir su efecto antiproliferativo. No obstante, en nuestros modelos ocurre lo contrario, y es precisamente en las células epiteliales, que muestran una menor respuesta transcripcional al AR, donde encontramos un mayor efecto antiproliferativo de los retinoides (Figura 28). Por tanto, un posible mecanismo de resistencia al tratamiento con AR y sus derivados podría estar dirigido por la represión de RARG aunque se expresen RARA y RARB. Todas estas evidencias nos llevaron a evaluar el papel funcional que juegan los distintos RARs en la inducción o mantenimiento del programa EMT, la sensibilidad a los ITQs y el efecto antiproliferativo inducido por el AR y sus derivados.

4. Validación funcional de la relación entre los receptores nucleares RAR, la EMT y la resistencia a ITQs

En primer lugar, estudiamos el impacto funcional de RARG en las líneas parentales sensibles al osimertinib. Para ello, se reprimió de forma estable la proteína mediante la infección lentiviral con varias secuencias de shRNAs, y se procedió a evaluar los niveles de represión de la proteína (Figura 35).

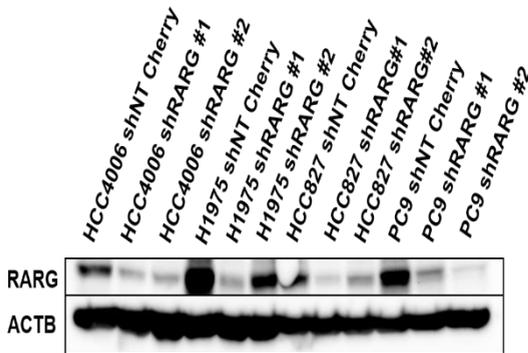


Figura 35. Represión de RARG mediante shRNAs en líneas parentales de AC pulmonar con *EGFR* mutado. Tras la infección lentiviral con los shRNAs contra RARG (y *non target* como control), y la selección y estabilización con el antibiótico puromicina, los extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* para determinar las proteínas RARG y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Una vez determinada la eficacia de la represión, seleccionamos la secuencia de represión #1 para los experimentos posteriores. Con el fin de estudiar el posible papel de RARG en el programa EMT, procedimos a medir los niveles de proteínas de distintos marcadores epiteliales y mesenquimales mediante *western blot*. La represión de RARG (Figura 36), fue capaz de inducir la expresión de varias marcas mesenquimales como son VIM y SNAI1 en todas las líneas parentales, a excepción de la PC9. Sin embargo, el otro EMT-TF esencial (ZEB1) no pudo detectarse en este ensayo, y la expresión del marcador epitelial CDH1 no se vio afectada, lo cual sugiere que RARG podría estar de alguna manera involucrado directamente en la regulación de la expresión de marcadores mesenquimales pero no en la de los epiteliales.

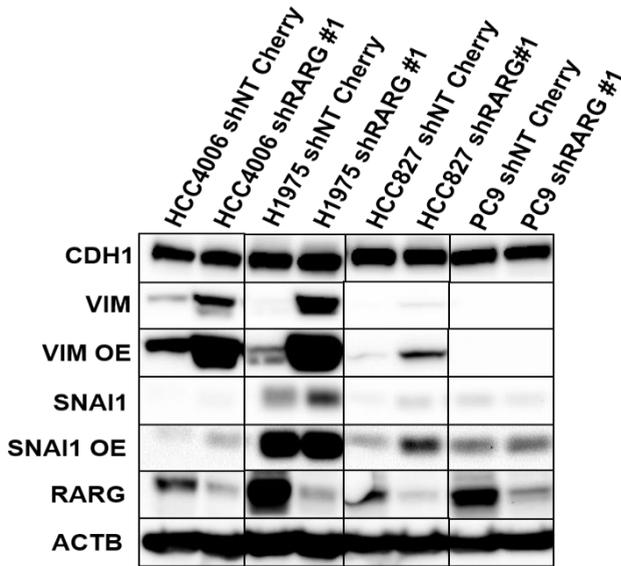


Figura 36. Expresión de marcadores EMT tras la represión de RARG en líneas parentales AC pulmonar con *EGFR* mutado. Tras la infección lentiviral con los shRNAs contra RARG (y *non target* como control), y la selección y estabilización con el antibiótico puromicina, los extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* para determinar las proteínas RARG, CDH1, VIM, SNAI1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Otra consecuencia de estos resultados es que RARG podría favorecer el inicio del programa EMT, pero dejaría a las células en un metaestado intermedio y parcial que requiere de algún estímulo o factor adicional para una reprogramación total. Además, estos datos explicarían por qué la represión estable de CRABP2 no permitía la progresión del programa EMT una vez iniciado por la expresión de SNAI1 que sí inducía la represión transitoria con el siRNA. En un escenario de represión estable, la disminución aguda de la actividad RARG asociada a la pérdida de su activador CRABP2, podría superarse gracias al restablecimiento de su expresión y el mantenimiento de la represión de los marcadores mesenquimales.

Una vez demostrada su relación con el programa EMT, nos planteamos estudiar si la represión de RARG era capaz de inducir la resistencia a los ITQs. Para ello, se realizaron ensayos de formación de colonias en presencia de diferentes

concentraciones osimertinib con las líneas celulares infectadas con las secuencias de shRNA control (NT) y RARG.

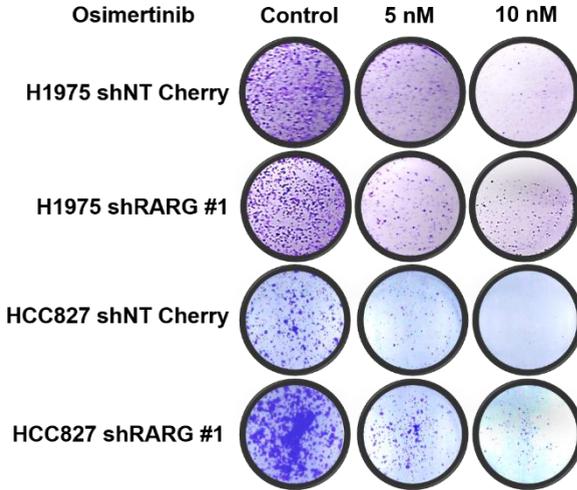


Figura 37. Efecto de la represión de RARG sobre la sensibilidad al osimertinib en células de AC pulmonar con EGFR mutado. Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las líneas celulares indicadas crecieron durante 8 días en medio de cultivo con distintas concentraciones de osimertinib. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio se cambió cada 2 días. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

La represión de RARG no cambió la sensibilidad al osimertinib en las curvas de citotoxicidad a corto plazo (72 horas) realizadas con el ensayo de la sulforrodamina B (resultados no mostrados). Sin embargo, a largo plazo, y tal y como muestra el ensayo de formación de colonias de la Figura 37, si aumentó ligeramente la resistencia al osimertinib en el modelo HCC827 a las dos concentraciones de ITQ ensayadas, y discretamente en el modelo H1975, resultados que correlacionan con la mayor expresión de los marcadores mesenquimales SNAI1 y VIM de la Figura 36. Dado que las células mantienen su carácter epitelial, y no activan ZEB1, concluimos que la represión de RARG genera un metaestado de EMT parcial que no es suficiente para conferir una resistencia plena al osimertinib.

Anteriormente demostramos que el retinoide adapaleno tiene efecto citostático y antiproliferativo sobre las líneas celulares con fenotipo epitelial. Por este motivo, quisimos comprobar si este efecto era dependiente de los niveles de RARG. En

la Figura 38 podemos apreciar como el efecto antitumoral del adapaleno es significativamente menor en las células infectadas con el shRNA contra RARG en comparación con las shRNA control, lo cual sugiere que el efecto sobre la diferenciación, proliferación y muerte celulares de los retinoides depende de la expresión de RARG en las células con fenotipo epitelial, y que las células mesenquimales son resistentes precisamente por presentar una baja expresión de este receptor nuclear.

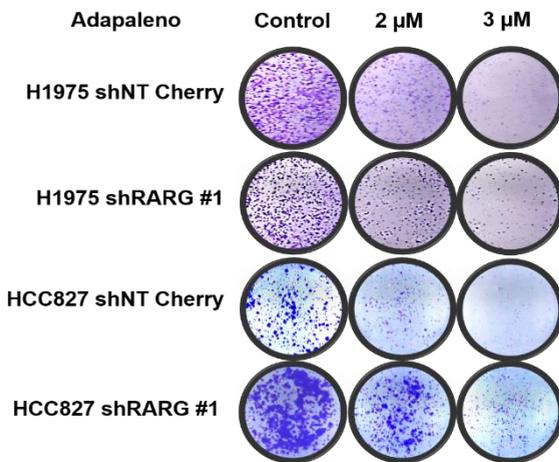


Figura 38. Efecto de la represión de RARG sobre la sensibilidad al adapaleno en células de AC pulmonar con *EGFR* mutado. Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las líneas celulares indicadas crecieron durante 8 días en medio de cultivo con distintas concentraciones de osimertinib. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio se cambió cada 2 días. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

A continuación, nos propusimos evaluar el papel funcional de los otros receptores nucleares de la subfamilia RAR cuya expresión está elevada en el fenotipo mesenquimal, (*RARA* y *RARB*) mediante su represión con shRNAs específicos en las líneas celulares con resistencia adquirida al osimertinib. Como podemos observar en la Figura 39, la secuencia de shRNA #1 es la que mejor reprime la expresión de *RARB* en las distintas líneas celulares, y por este motivo fue la utilizada en experimentos posteriores. En primer lugar, determinamos la expresión de los marcadores EMT a nivel de proteína en los cuatro modelos celulares donde conseguimos estabilizar esta construcción de shRNA, si bien la represión alcanzada en la línea celular HCC4006 fue mínima.

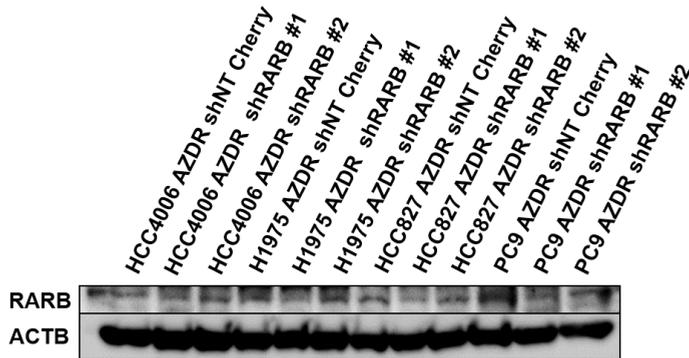


Figura 39. Expresión de RARB tras su represión mediante shRNAs en líneas parentales *EGFR* mutantes de AC pulmonar ITQ-resistentes. Tras la infección lentiviral con shRNAs contra RARB (y *non target* control) y la selección y estabilización con el antibiótico puomicina, se obtuvieron los extractos de proteínas que se analizaron mediante *western blot* para determinar las proteínas RARB y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

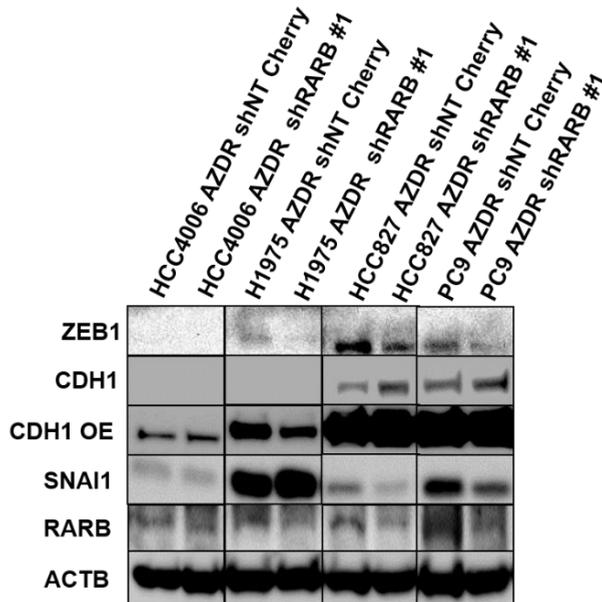
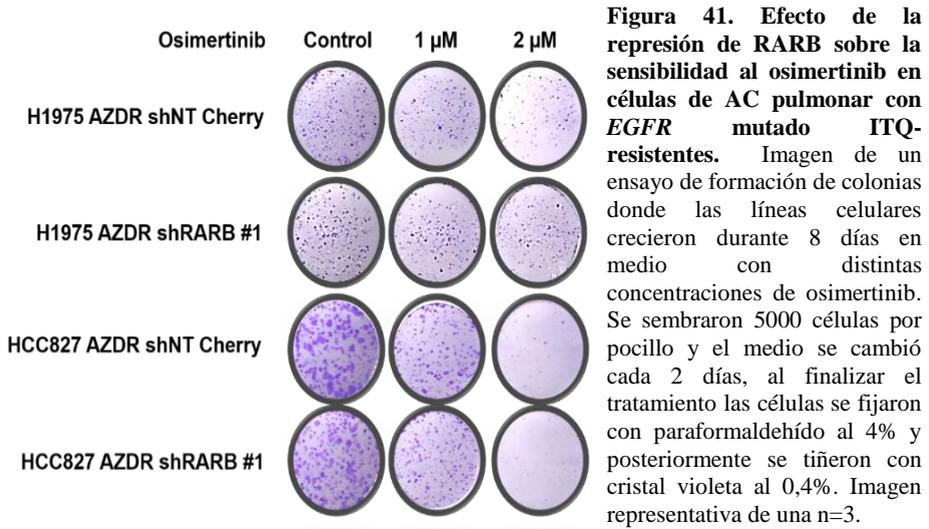


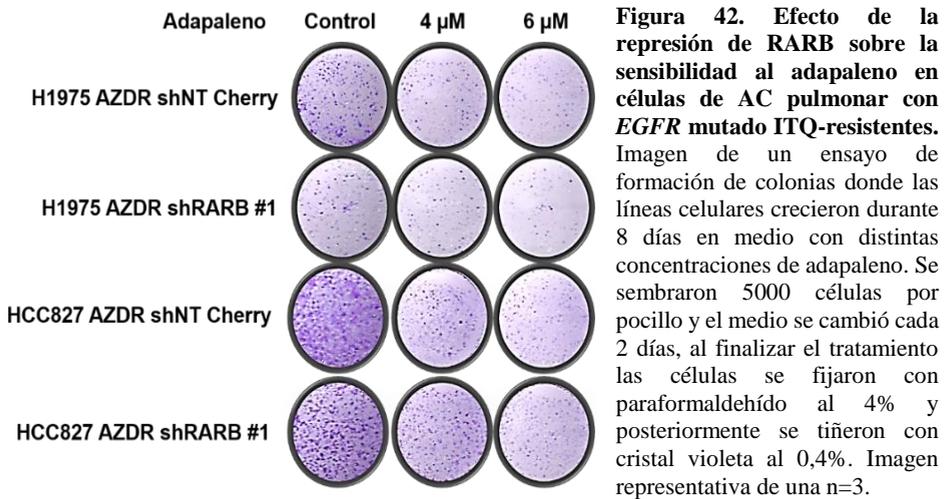
Figura 40. Expresión de marcadores EMT tras la represión de RARB en líneas parentales *EGFR* mutantes de AC pulmonar ITQ-resistentes. Se emplearon extractos de proteínas tras la infección lentiviral con shRNAs contra RARB y tras la estabilización de las líneas con el antibiótico de selección y mediante *western blot* se determinaron las proteínas ZEB1, CDH1, SNAI1, RARB y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Como podemos observar en la Figura 40, La represión de RARB tiene un efecto dependiente de la línea celular: en las células HCC827 y PC9 AZDR, precisamente donde los niveles de RARB eran más bajos, se produjo una reexpresión del marcador epitelial CDH1 y un descenso de los EMT-TF SNAI1 y ZEB1. En las células H1975 AZDR, donde la represión de RARB fue más discreta, solo detectamos un descenso del EMT-TF ZEB1, mientras que el marcador epitelial CDH1 se mantenía reprimido. Estos resultados indican que RARB también juega un papel en el programa EMT, aunque menor, favoreciendo la expresión de los EMT-TF, dado que su represión disminuye los EMT-TF y la reexpresión parcial de CDH1 en algunos modelos celulares. No obstante, el hecho de que las marcas mesenquimales sigan siendo detectables y que la reexpresión de CDH1 no sea completa, sugiere que la represión de RARB induce un metaestado EMT parcial y que por tanto la represión de RARB no es suficiente para revertir completamente el programa EMT. Teniendo en cuenta los resultados anteriores con la represión de RARG, es posible que su reexpresión se necesaria, junto con la represión de RARB, o que también se requiera de la modulación de RARA para revertir el programa EMT.

Dado que la represión de RARB modula la expresión de distintos marcadores de EMT, lo siguiente que quisimos comprobar fue si ésta era capaz de resensibilizar al osimertinib en las líneas mesenquimales ITQ-resistentes. En la Figura 41 podemos observar que la disminución de los niveles de RARB no aumentó el efecto antitumoral del osimertinib en los modelos H1975 y HCC827 AZDR. De tal modo, podemos concluir que la represión de RARB modula parcialmente el programa EMT favoreciendo la represión de EMT-TFs como SNAI1 y ZEB1 que lleva a una cierta reexpresión de CDH1. Sin embargo, esta reversión parcial del fenotipo mesenquimal no es suficiente para lograr revertir la resistencia al osimertinib.



Finalmente, se realizó un ensayo de colonias para evaluar el efecto citostático del retinoide adapaleno en función de la presencia o ausencia de RARB y poder determinar si efectivamente este efecto depende únicamente de RARG o también de RARB.



Como podemos apreciar en la Figura 42, la represión de RARB no provoca ningún cambio en el perfil de sensibilidad al adapaleno, al contrario de lo que ocurría con la represión de RARG, donde disminuía el efecto antitumoral del retinoide. Por tanto, podemos concluir que RARB no parece condicionar el efecto citostático del adapaleno en los modelos celulares estudiados.

Para terminar esta sección del estudio, procedimos a reprimir RARA, que recordemos que al igual que RARB, se encuentra sobreexpresado en los modelos celulares mesenquimales resistentes al osimertinib. Al realizar la infección lentiviral encontramos que la secuencia shRARA #1 inducía la muerte celular a corto plazo en todas las líneas AZDR ensayadas, comparada con la secuencia shNT control y la shRARA #2. Al determinar los niveles de proteína de RARA tras una infección transitoria pudimos comprobar que la secuencia #2 no era capaz de provocar ninguna represión de los niveles de RARA (resultados no mostrados). Por ello, podríamos deducir que la secuencia #1 reprime eficazmente RARA y que esta represión tiene un impacto dramático sobre la muerte y proliferación celulares, algo que no ocurre al reprimir la expresión de los otros receptores nucleares de la familia RARB (en las líneas ITQ-resistentes) y RARG (en las líneas parentales ITQ sensibles) (Figura 43). Cabe resaltar que en este experimento utilizamos construcciones lentivirales que incorporaban un marcador fluorescente (*Cherry*). Las células estabilizadas con las construcciones shRARB y shRARG presentaban la marca fluorescente, mientras las pocas células supervivientes a la infección con el shRARA no presentaban ninguna marca de fluorescencia.

Por tanto, podemos concluir que RARA, que no se expresa en las células epiteliales, podría ser una proteína esencial para la supervivencia de las células mesenquimales ITQ-resistentes. Más experimentos serán necesarios para validar

su papel como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de las líneas resistentes al osimertinib asociado con el fenotipo mesenquimal.

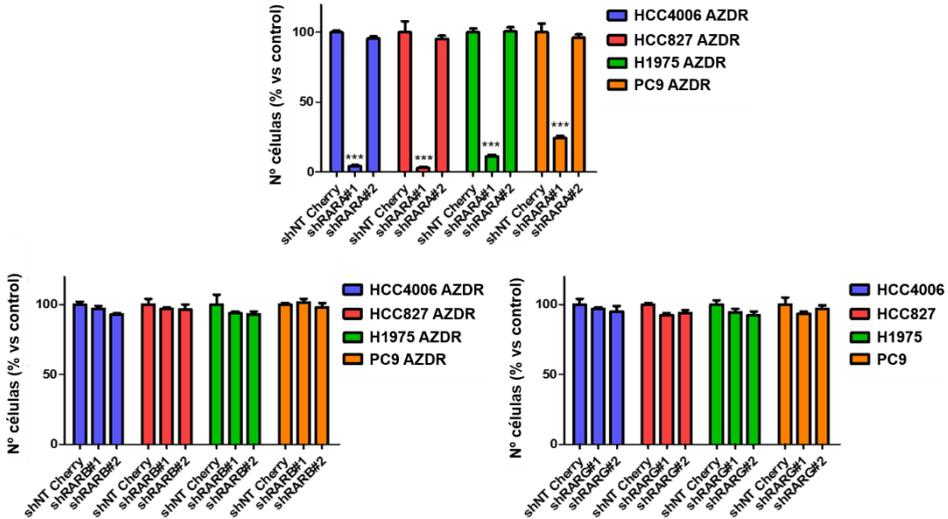


Figura 43. Ensayo de proliferación y viabilidad celular tras la infección transitoria con lentivirus que incorporan shRNAs dirigidos contra los receptores nucleares de RARA, RARB y RARG. Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos con 200.000 células por pocillo, a las 24 horas tras la siembra se añadió el medio con los lentivirus y tras 72 horas se contaron las células mediante el método de exclusión del azul tripán. Los datos están expresados como el número de células vivas de las líneas modificadas respecto a su control (shNT *Cherry*) ± desviación estándar (n=6). Los resultados fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde ***p<0,001 con respecto al control shNT de cada línea.

5. Modificaciones de histonas en la EMT asociada a la resistencia a ITQs

5.1 Identificación de moduladores epigenéticos asociados al fenotipo mesenquimal y resistente a los ITQs

En la sección anterior hemos recopilado varias evidencias experimentales que subrayan el posible papel de los receptores nucleares RAR en la regulación de los mecanismos epigenéticos que controlan el programa transcripcional EMT. El siguiente objetivo que nos propusimos fue determinar cuál o cuáles son los eventos epigenéticos necesarios y en qué secuencia se producen para regular la expresión de los genes diana epiteliales o mesenquimales. Más concretamente, y dado el papel que juegan en el programa EMT en diferentes modelos experimentales, quisimos identificar qué posibles remodeladores epigenéticos son reclutados y cómo podrían reprogramar o evitar la adquisición del fenotipo mesenquimal asociado a la resistencia a los ITQs como el osimertinib y su posible relación con los RARs.

Es bien conocido que la activación de los receptores nucleares RAR, al unirse al AR, induce la transcripción de genes siendo requisito imprescindible la disminución de marcas represivas como la H3K27me₃ y el aumento de marcas de activación como H3K4me₃ y H3K27ac en células madre embrionarias (Kashyap 2011). También se ha descrito que los complejos AR/RARs, pueden inducir un aumento tanto de las marcas de represión como de activación en ciertas regiones de la cromatina, generando un estado de bivalencia en la que los genes afectados se encuentran en un estado de equilibrio capaz de responder rápida y dinámicamente a los cambios en el ratio H3K4me₃/H3K27me₃ para encender o apagar la transcripción génica. En este modelo de células madre embrionarias, la ratio de transcripción aumenta en presencia de AR, pues aumentan las marcas de activación y descienden las de represión. Cuando los

niveles de AR se reducen, se genera el efecto contrario, induciéndose el silenciamiento del gen merced a la bajada de las marcas de activación y un aumento de las de represión (Bersntein 2006; Laursen 2013).

Como ya se describió en la Introducción, los niveles de la marca represiva H3K27me3 están regulados por distintas proteínas con actividad metiltransferasa o desmetilasa. Por un lado, las que favorecen su metilación forman el PRC2, cuya subunidad catalítica es la enzima EZH2 (Cao 2002; Kuzmichev 2002). Algunos estudios han demostrado que la activación de los RARs por el AR provoca la disociación de la proteína SUZ12, otro componente del PRC2, con regiones específicas a las que se unen los RARs evitando así su represión, mientras que la degradación o ausencia de AR permite que SUZ12 vuelva a unirse a esas regiones revirtiendo el proceso (Gillespie 2007; Laursen 2013). En cuanto a las enzimas encargadas de desmetilar la marca H3K27me3, encontramos a KDM6A y KDM6B, que reducen la marca represora en distintos genes diana de la vía del AR como *HOX* (Agger 2007; Lee 2007). KDM6A forma parte del complejo MLL4, el cual presenta actividad metiltransferasa, favoreciendo por un lado la desmetilación de la marca represora H3K27me3 y la metilación de la marca de activación H3K4; además, se ha demostrado que KDM6A favorece el reclutamiento del resto del complejo (Wang 2017). Por otra parte, el PRC2 induce la represión génica incrementando no solo la marca H3K27me3, sino también disminuyendo los niveles de H3K4 al reclutar y activar a la desmetilasa KDM5B (Zhou 2009).

Las investigaciones previas en células madre embrionarias reconocen por tanto el papel remodelador del AR, que en primer lugar induce una disminución de la marca H3K27me3 para posteriormente aumentar la marca de activación H3K4me3. Por todo ello decidimos comprobar, en una primera aproximación, el grado de interacción existente entre los receptores nucleares RAR y las

desmetilasas KDM6A y B. Para ello, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de KDM6A y KDM6B seguida de *western blot* con anticuerpos específicos contra las RARs.

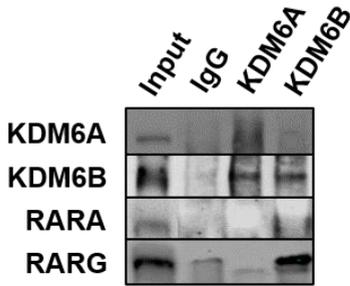


Figura 44. Interacción entre los receptores nucleares RAR y las desmetilasas de histona KDM6A y KDM6B. Niveles de proteína medidos por *western blot* de KDM6A, KDM6B, RARA y RARG tras inmunoprecipitar con los anticuerpos contra IgG, KDM6A y KDM6B en extractos de cromatina obtenidos de la línea H1975. Imagen representativa de una n=3.

La Figura 44 demuestra que se producen interacciones directas y específicas entre KDM6B y los RARs. RARA se detecta débilmente en el inmunoprecipitado, pero RARG aparece de manera abundante. Por otro lado, en el inmunoprecipitado de KDM6A no se detecta ninguna interacción con los RARs. Como hemos demostrado anteriormente, existe un patrón de expresión diferencial de los distintos RARs entre las líneas parentales y mesenquimales, así que las interacciones entre cada complejo RA/RAR y la KDM6B podrían generar la marca de represión H3K27me3 y permitir la represión o expresión específica de genes particulares.

Por ello, en el siguiente paso decidimos evaluar los niveles de las marcas de metilación de la histona H3 a nivel global, y su enriquecimiento en regiones promotoras de una firma de genes canónicos epiteliales y mesenquimales, y así comprobar si pudieran existir patrones epigenéticos consistentes en nuestros modelos celulares de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib.

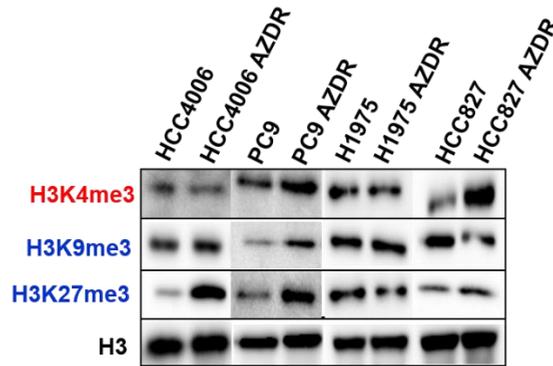


Figura 45. Perfil de metilación de histona H3 a nivel global en líneas de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib. Los extractos de proteínas se analizaron por *western blot* para determinar las marcas H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 y H3 total como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Los resultados de la Figura 45, revelan una gran heterogeneidad en cuanto a los niveles globales de las marcas de metilación de la histona H3 H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 en los cuatro modelos de resistencia a ITQs asociados al fenotipo EMT analizados. Al analizar cada marca de forma aislada observamos que la marca de activación H3K4me3 aparece aumentada en dos de los modelos (PC9 y HCC827) y disminuida en los otros dos (HCC4006 y H1975). La marca de represión H3K9me3 presenta una mayor heterogeneidad en dos modelos no se producen apenas cambios (HCC4006 y H1975), mientras que en uno de ellos aumenta (PC9) y en otro disminuye (HCC827). Finalmente, la marca de represión H3K27me3 aumenta en tres de los cuatro modelos. Por tanto, no hay un patrón único de marcas de metilación de histona H3 asociado al fenotipo mesenquimal ITQ-resistente, aunque es de destacar que la acumulación de la marca H3K27me3 podría ser un evento general asociado a la baja actividad de las desmetilasas KDM6A y B y/o alta actividad de la metiltransferasa del complejo represor PRC2 (EZH2). Dado que las células mesenquimales ITQ-resistentes presentan diferencias en la conformación y actividad de los complejos AR/RARs, y que esta vía afecta al desplazamiento de EZH2 y al reclutamiento de las desmetilasas que disminuyen la marca H3K27me3 para activar la

transcripción de los genes diana, los niveles globales elevados de la marca H3K27me3 podrían deberse a un descenso de la actividad basal de la vía del AR asociado al fenotipo mesenquimal ITQ-resistente.

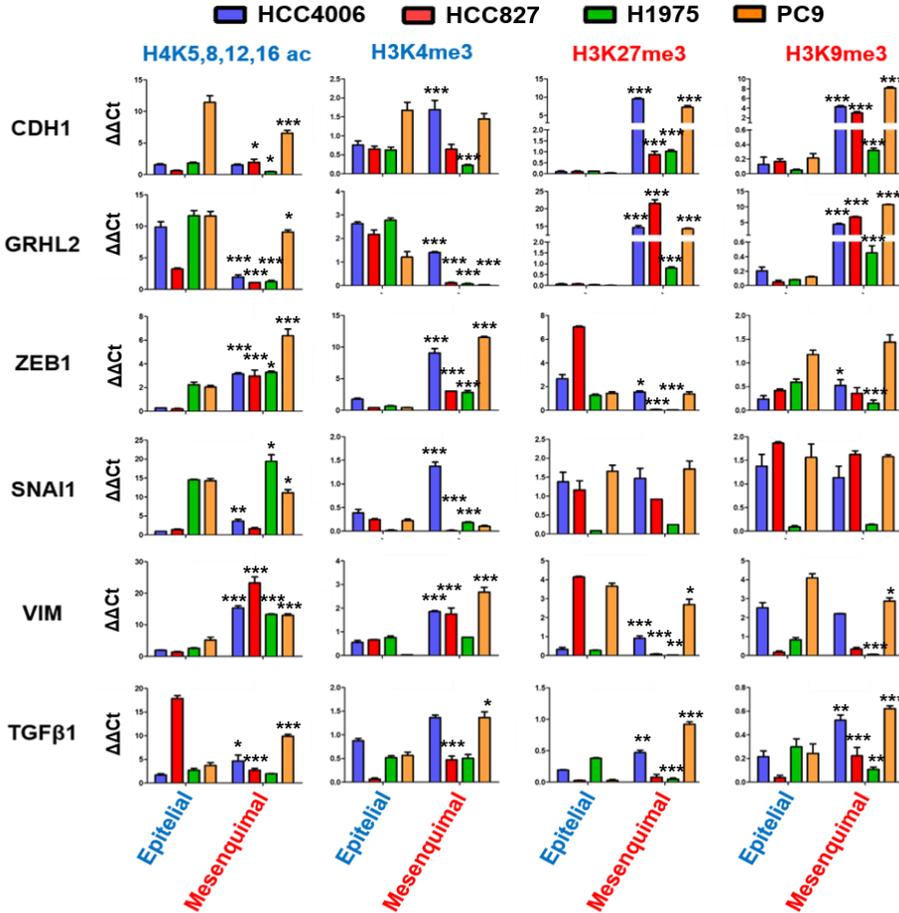


Figura 46. Análisis de ChIP de genes epiteliales y mesenquimales en líneas de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib. La cromatina aislada de las células ITQ-sensibles y resistentes se incubó con anticuerpos contra H4K5,8,12,16 ac, H3K4me3, H3K27me3, H3K9me3 e IgG como control para determinar el porcentaje de unión de cada una de estas marcas a los promotores de genes epiteliales (CDH1, GRHL2) y mesenquimales (ZEB1, SNAI1, VIM y TGFβ1). Los resultados (Cts) se normalizaron a partir de los Cts de sus respectivos *Inputs* y se representaron los $\Delta\Delta\text{ct}$ como % de unión a la región promotora de cada gen. Los $\Delta\Delta\text{ct}$ representados se normalizaron con los $\Delta\Delta\text{ct}$ del IgG con el fin de eliminar cualquier señal inespecífica asociada. Los resultados (n=3) fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto a la pareja epitelial de cada línea celular.

Los resultados de ChIP de la Figura 46 representan el grado de ocupación de los promotores de genes epiteliales y mesenquimales por las mismas marcas de metilación de histona H3 analizadas en el panel A. Como era de esperar, en el fenotipo mesenquimal las marcas represivas como H3K27me3 y H3K9me3 se enriquecen en los promotores de genes epiteliales (CDH1, GRHL2), mientras que disminuyen en algunos de los promotores de genes mesenquimales (VIM, ZEB1), que se enriquecen en la marca de activación H3K4me3 y H4K5,8,12,16 ac. Otros promotores de genes mesenquimales como SNAI1 y TGFβ1, sin embargo, muestran una mayor heterogeneidad entre las distintas líneas celulares, no advirtiéndose un patrón claro de modificaciones de la cromatina que pudiera indicar un estado de la cromatina más abierto o cerrado, abriendo la posibilidad de que se encuentren en un estado intermedio que confiera una mayor plasticidad celular, dada la importancia de estas dos proteínas en la inducción del programa EMT (Zavadil 2005; Xu 2009; De Craene 2013; Nieto 2016).

Una vez establecidos los patrones de metilación de histona H3, procedimos a determinar los niveles de expresión de los remodeladores de la cromatina que modifican la metilación específica de la marca H3K27. Evaluamos en primer lugar los niveles de expresión de los modificadores de la histona H3K27 (KDM6A, KDM6B y EZH2) ya que son los primeros remodeladores de la cromatina reclutados para la regulación transcripcional inducida por el AR en las líneas celulares parentales con fenotipo epitelial y sensibles al osimertinib y sus correspondientes versiones mesenquimales resistentes a ITQs.

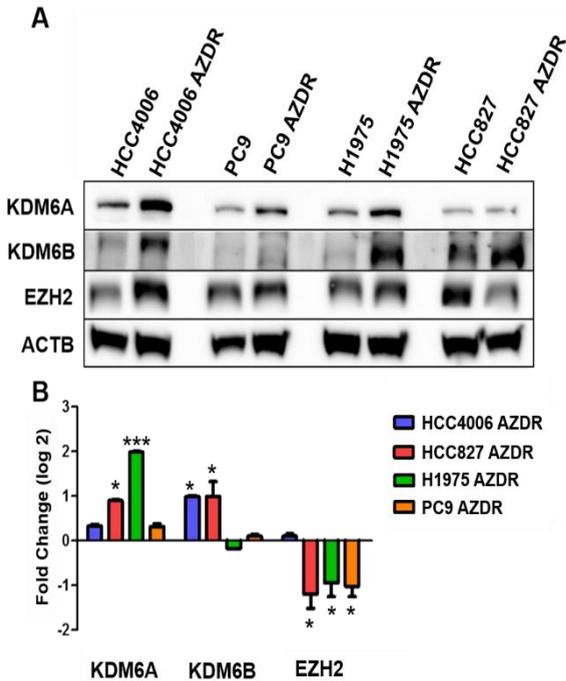


Figura 47. Expresión de las enzimas moduladoras de la marca de metilación de H3K27 en líneas celulares EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib. **A.** Se emplearon extractos de proteínas y mediante *western blot* se determinaron las proteínas KDM6A, KDM6B, EZH2 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3. **B.** Niveles de ARNm en las líneas mesenquimales. Se emplearon extractos de ARN que se pasaron a ADNc y por PCR se determinaron los niveles de KDM6A, KDM6B, EZH2 y ACTB como control de carga en las líneas sensibles y resistentes al osimertinib, los datos están expresados en log2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea resistente comparada con su línea sensible. Imagen representativa de una n=3. Los resultados fueron analizados mediante análisis *one way ANOVA* y test de Tukey donde * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto a sus controles.

Los resultados de la Figura 47A muestran que los niveles de expresión a nivel de proteína de las desmetilasas KDM6A y B están aumentados en las células ITQ-resistentes con fenotipo mesenquimal (aunque no correlacionan exactamente con los niveles de expresión a nivel de ARNm de la Figura 47B), mientras que no hay un patrón común en cuanto a los niveles de EZH2. En función de estos resultados, podemos hipotetizar que a nivel global la marca H3K27me3 debería estar disminuida en las líneas mesenquimales debido a una mayor expresión de las desmetilasas KDM6A y KDM6B. No obstante, como hemos podido observar en la Figura 45, en 3 de estos modelos ocurre precisamente lo contrario, estando aumentada la marca H3K27me3. Estos resultados sugieren que el balance final podría depender de más factores, como la actividad metiltransferasa de EZH2, y las diferencias que se puedan establecer

a nivel local en los promotores de los genes epiteliales y mesenquimales. Por tanto, es necesario un abordaje global mediante secuenciación masiva de los ChIPs de todas las marcas estudiadas, que será llevado a cabo en futuros estudios, así como un estudio funcional modulando la actividad de las histona desmetilasas de H3K27 KDM6A y KDM6B, cuya descripción emprendemos a continuación.

5.2 Validación funcional de la relación entre KDM6A y B, la EMT y la resistencia a los ITQs

Dado el patrón de expresión diferencial de KDM6A y KDM6B en los modelos de resistencia al osimertinib, decidimos comprobar si podría determinar una sensibilidad selectiva a los inhibidores de la actividad desmetilasa como el GSK-J4 desarrollados recientemente (Yan 2017), e identificar así una vulnerabilidad epigenética del fenotipo mesenquimal ITQ-resistente de esta e identificar una nueva enzimas con un inhibidor específico el GSK-J4.

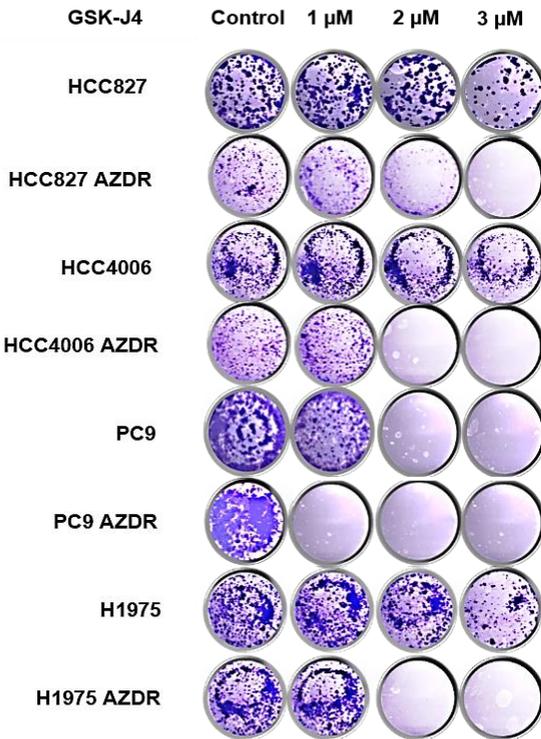


Figura 48. Efecto citotóxico del inhibidor de KDM6 GSK-J4 en células de AC pulmonar con *EGFR* mutado sensibles y resistentes a osimertinib y con fenotipo EMT. Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las 8 líneas celulares crecieron durante 8 días en medio con distintas concentraciones de GSK-J4. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio se cambió cada 2 días, al finalizar el tratamiento las células se fijaron con para-formaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

En la figura 48 podemos observar como las líneas parentales epiteliales y sensibles a los ITQs no responden al inhibidor GSK-J4, a excepción de las PC9 que presenta una cierta sensibilidad. Sin embargo, todos los modelos resistentes al ITQ respondieron al GSK-J4 en mayor medida que las líneas parentales. Este mismo ensayo se realizó en combinación con osimertinib para estudiar el posible sinergismo entre ambos inhibidores, pero el efecto citotóxico del ITQ sobre las líneas sensibles no aumentó (datos no mostrados).

Una vez identificada la actividad desmetilasa de H3K27me3 como una posible vulnerabilidad epigenética del fenotipo mesenquimal ITQ-resistente, lo siguiente que quisimos estudiar fueron los cambios transcripcionales inducidos por el tratamiento con el GSK-J4. Para ello tratamos distintas líneas parentales y

resistentes al osimertinib con el inhibidor a distintos tiempos y medimos por *western blot* los niveles de marcadores epiteliales y mesenquimales, así como la marca H3K27me3.

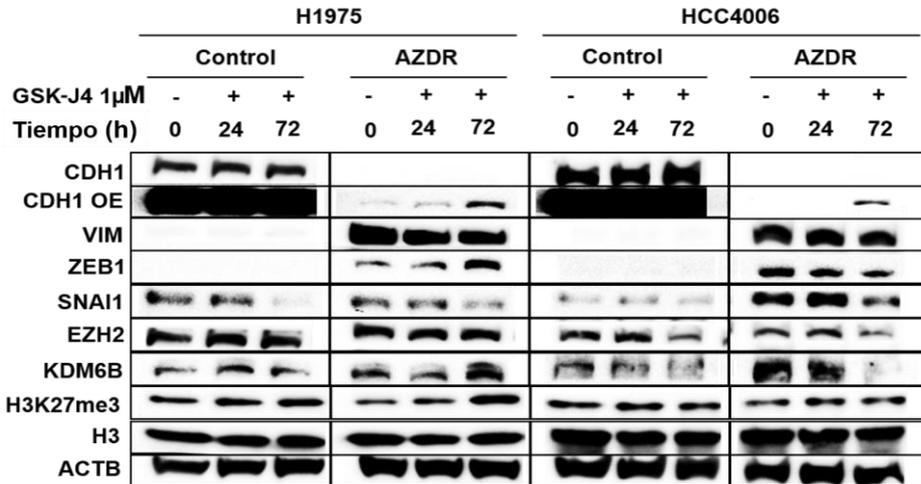


Figura 49. Efecto del inhibidor de KDM6 sobre la expresión de marcadores y la marca de metilación de H3K27 en líneas celulares de AC pulmonar con *EGFR* mutado sensible y resistente a osimertinib con fenotipo EMT. Las líneas ITQ-sensibles y resistentes indicadas se trataron GSK-J4 1μM durante 24 y 72 horas, y mediante *western blot* se determinaron los niveles de las proteínas CDH1, VIM, ZEB1, SNAI1, KDM6B, EZH2 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

En la Figura 49 podemos ver como en el modelo H1975 el GSK-J4 provoca un aumento de la marca H3K27me3, más acusado en la versión mesenquimal ITQ-resistente. Los resultados de este marcador de actividad desmetilasa no son concluyentes en el modelo HCC4006. Por otra parte, observamos como el GSK-J4 induce una reprogramación parcial de las células mesenquimales, destacando principalmente la represión de SNAI1 en todos los modelos (acompañada de un ligero descenso en VIM), y la reexpresión del marcador epitelial CDH1. Estos resultados son consistentes con algunos estudios ya mencionados en la Introducción, y que postulan a KDM6B como un regulador positivo de la EMT

al aumentar la expresión de SNAI1 mediante la desmetilación de la marca de represión H3K27me3 asociada a su promotor (Ramadoss 2012).

Nuestros resultados, aunque parciales y en un contexto muy complejo, abren un nuevo (y original) escenario de regulación epigenética del fenotipo mesenquimal ITQ-resistente en el cáncer pulmonar, donde la actividad KDM6 podría estar desmetilando la marca represiva H3K27me3 de EMT-TFs como SNAI1 permitiendo su expresión, factor que a su vez mediaría la represión de factores epiteliales (como CDH1) y la activación transcripcional de otros genes mesenquimales. En resumen, el GSK-J4 induce un aumento de la marca de represión H3K27me3, la represión de EMT-TF SNAI1, y la reexpresión del marcador epitelial CDH1.

La siguiente tarea que nos propusimos fue decidir cuál de las dos desmetilasas (KDM6A o KDM6B) era más importante en la reprogramación de la EMT, dado que el GSK-J4 es un inhibidor de ambas actividades enzimáticas. Por ello procedimos a reprimir de forma estable tanto la KDM6A como de la KDM6B mediante varias secuencias de shRNAs específicas utilizando como modelo experimental las células mesenquimales H1975 AZDR, que mostraron en el experimento previo un mejor perfil farmacodinámico en respuesta al GSK-J4.

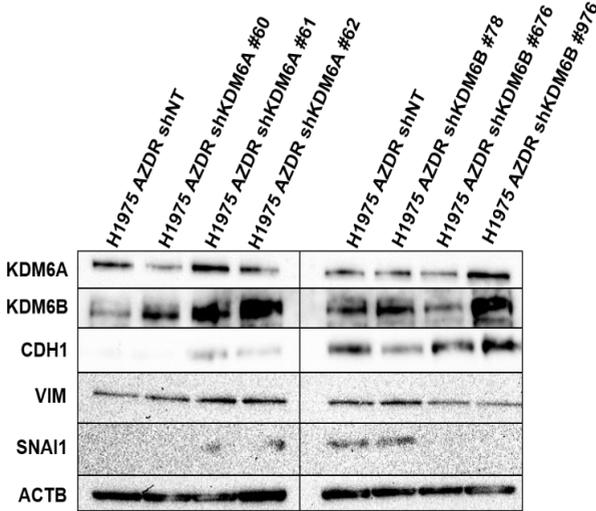


Figura 50. Expresión de KDM6A y KDM6B tras su represión mediante shRNAs en células de AC pulmonar con *EGFR* mutado H1975 resistentes al osimertinib. Tras la infección lentiviral con shRNAs contra KDM6A y KDM6B (y shNT, *non target*, como control negativo) y la selección y estabilización de las líneas celulares con el antibiótico puromicina, analizamos mediante *western blot* los niveles de las proteínas KDM6A, KDM6B, CDH1, VIM, SNAI1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

A la vista de los resultados de la Figura 50, podemos concluir, en primer lugar, que la represión de KDM6A no parece jugar ningún papel en la regulación de la expresión del marcador epitelial CDH1 o de los marcadores mesenquimales VIM y SNAI1, a pesar de que la secuencia #60 es capaz de reprimir eficientemente su expresión. Como hemos mencionado en la Introducción, KDM6A se ha descrito en varios estudios como un represor del programa EMT en algunos modelos celulares de cáncer de mama y cáncer de pulmón (Choi 2015; Taube 2017; Terashima 2017). Sin embargo, en nuestros resultados el bloqueo de KDM6A no provoca ninguna modificación en el fenotipo mesenquimal de la línea H1975 AZDR. Por otra parte, la represión de KDM6B por la secuencia #676 disminuye de forma eficaz los niveles de KDM6B, y esta represión viene acompañada de cambios en la expresión de factores del programa EMT que mimetizan el tratamiento con el GSK-J4, como la represión de SNAI1 y de VIM, y la reexpresión del marcador epitelial CDH1; estos resultados coinciden con los estudios realizados en otros modelos celulares en los que se ha descrito KDM6B

como un inductor del programa EMT (Ramadoss 2012; Tang 2016; Sui 2019). Por este motivo, descartamos KDM6A como candidato a modular el programa EMT en nuestros modelos de resistencia a ITQs, y procedimos a estudiar el papel funcional de KDM6B en el resto de modelos celulares con la secuencia shKDM6B #676, ya que nuestros resultados muestran que KDM6A en nuestros modelos no es capaz de activar ni reprimir el programa EMT pese a que en otros modelos si se haya descrito su papel en el programa EMT (Choi 2015; Taube 2017; Terashima 2017).

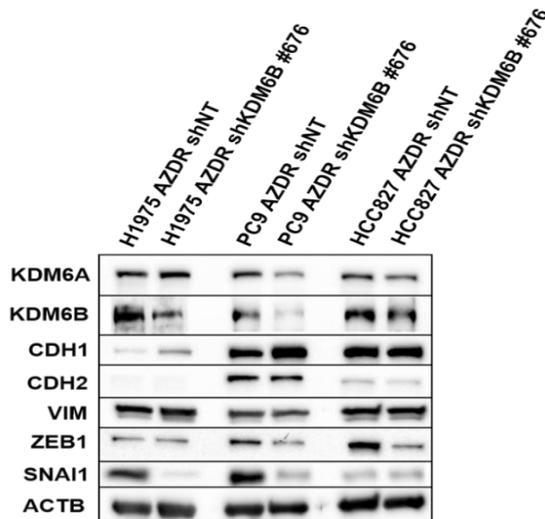


Figura 51. Expresión de marcadores EMT tras la represión de KDM6B en varias líneas celulares de AC pulmonar con *EGFR* mutado y resistentes al osimertinib. Tras la infección con los lentivirus portadores de shRNAs contra KDM6B (y shNT, *non target*, como control negativo), y la selección y estabilización de las líneas celulares con el antibiótico de selección puromicina, analizamos mediante *western blot* los niveles de las proteínas KDM6A, KDM6B, CDH1, CDH2, VIM, ZEB1, SNAI1 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una $n=3$.

Como podemos apreciar en la Figura 51, el silenciamiento de forma estable de KDM6B es capaz de reprimir la expresión de los EMT-TF SNAI1 y /o ZEB1 en varios de los modelos de resistencia a los ITQs, concomitante a la reexpresión parcial de CDH1, y una ligera disminución de otras marcas mesenquimales como CDH2. No obstante, estos efectos inducidos por la represión de KDM6B de

forma crónica y estable no son mayores que los efectos inducidos por el inhibidor GSK-J4 a tiempos más cortos, lo cual sugiere que KDM6B participa en el proceso EMT y regula la expresión de ciertos genes, pero no es capaz de revertir por sí mismo y de manera completa la EMT. Esta reprogramación parcial quedó corroborada al ensayar el efecto citotóxico del osimertinib, tal y como queda reflejado en los resultados de la Figura 52.

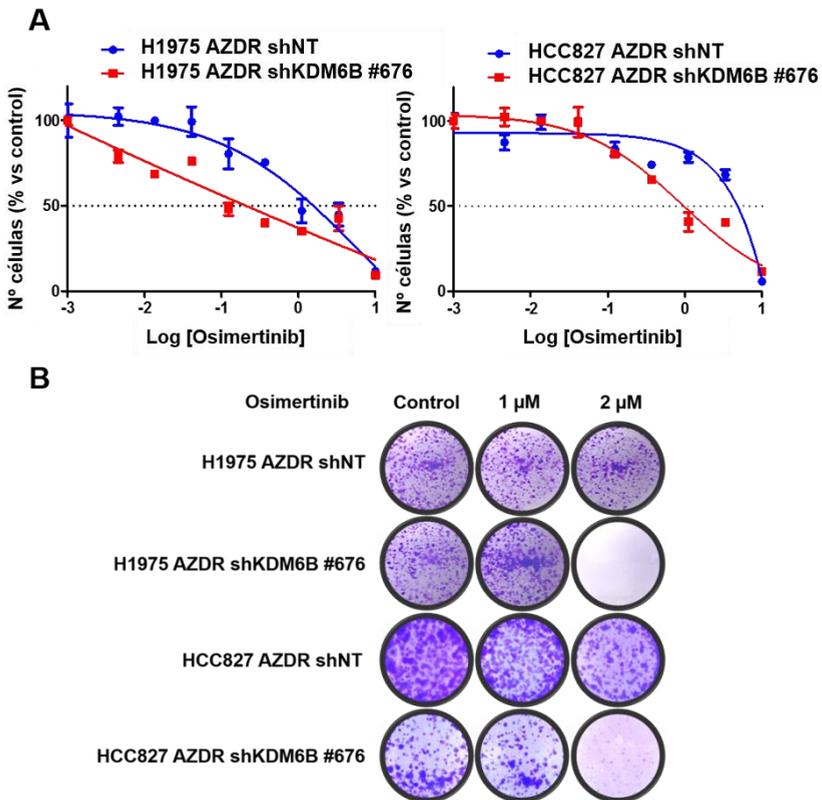


Figura 52. Sensibilidad al osimertinib de las líneas celulares de AC pulmonar con EGFR mutado y resistentes al osimertinib cuando se reprime KDM6B. **A.** Cada línea celular se sembró en placas de 96 pocillos con una densidad de 7500 células por pocillo y se trataron 24 horas post-siembra con las concentraciones indicadas de osimertinib o del vehículo DMSO. El número de células se determinó por el método de la sulfurodamina B después de 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=6$). **B.** Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las líneas celulares crecieron durante 8 días en medio con distintas concentraciones de osimertinib. Se sembraron 5000 células por pocillo y el medio se cambió cada 2 días, al finalizar el tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una $n=3$.

Las líneas mesenquimales ITQ-resistentes HCC827 y H1975 AZDR recuperaron una cierta sensibilidad al osimertinib al reprimir de manera específica KDM6B mediante el shRNA #676 a corto (Figura 52A) y medio plazo (Figura 52B), pero muy lejos del rango nanomolar que caracteriza a las líneas celulares parentales sensibles de manera innata a los ITQs. Por tanto, podemos concluir que la represión de KDM6B es capaz de revertir de forma parcial el programa EMT cuando ya se ha adquirido la resistencia al osimertinib, y que la reversión de EMT a su vez es capaz de inducir una discreta resensibilización a los ITQs de EGFR.

Con el fin de establecer una relación más directa entre KDM6B y la regulación transcripcional de los genes epiteliales y mesenquimales cuya expresión se ve alterada al reprimir esta enzima, ejecutamos un ensayo de ChIP con anticuerpos específicos contra KDM6A y KDM6B y posterior qPCR de las regiones promotoras de algunos de los genes de la firma EMT.

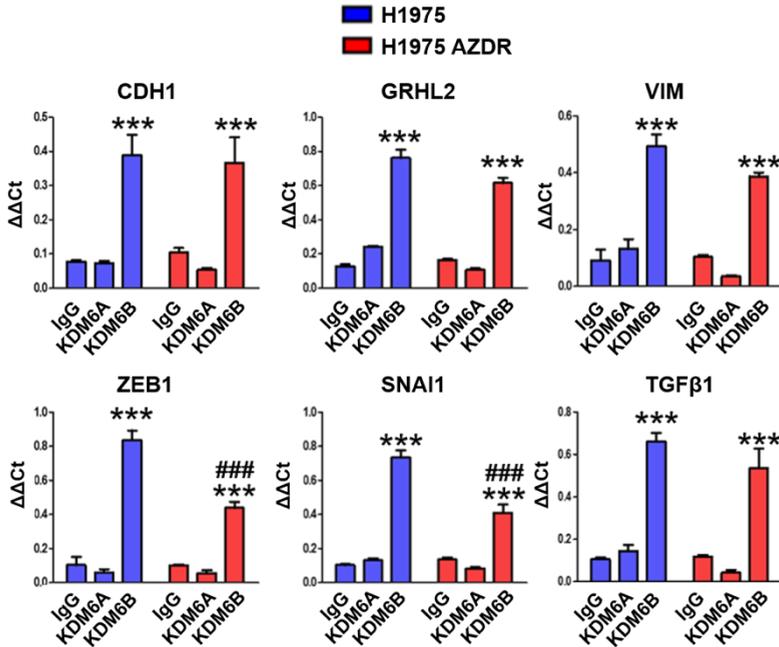


Figura 53. Ensayo de ChIP para KDM6A y KDM6B y análisis de su unión a las regiones promotoras de genes de la firma EMT en el modelo celular de AC pulmonar con EGFR mutado H1975. La cromatina aislada de las células ITQ-sensibles y resistentes se incubó con anticuerpos contra KDM6A, KDM6B e IgG como control para determinar el porcentaje de unión de cada una de estas tres proteínas a los promotores de genes epiteliales (CDH1, GRHL2) y mesenquimales (VIM, ZEB1, SNAI1 y TGFβ1). Los resultados (Cts) se normalizaron a partir de los Cts de sus respectivos *Inputs* y se representaron los $\Delta\Delta\text{Ct}$ como % de unión a la región promotora de cada gen. Los resultados (n=3) fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde ***p<0,001 con respecto a sus respectivos control-IgG de H1975 y H1975 AZDR, ### p<0,001 con respecto al ChIP de KDM6B entre H1975 y H1975 AZDR.

A partir de los resultados obtenidos en ensayo de ChIP resumido en la Figura 53, la primera conclusión que podemos obtener es que KDM6B forma parte de los complejos de remodelación de la cromatina reclutados en las regiones promotoras de los genes EMT, mientras que KDM6A no lo hace. Por tanto, estos resultados siguen la línea de nuestras observaciones previas con el GSK-J4 y con los shRNAs de KDM6A y KDM6B, y podemos afirmar que KDM6A no tiene un papel relevante en la regulación del programa EMT. KDM6B emerge como un regulador de los EMT-TFs SNAI1 y ZEB1 y en menor grado del inductor de

EMT TGF β 1 y el marcador VIM, aunque paradójicamente también aparece en los promotores de genes epiteliales como GRHL2 y CDH1, tanto en las células epiteliales ITQ-sensibles como en las mesenquimales ITQ-resistentes. En un análisis más detallado de los porcentajes de unión a cada promotor en unas células y otras, observamos una clara disminución del porcentaje de KDM6B que se une a los promotores de los genes mesenquimales SNAI1 y ZEB1, lo cual sugiere que una vez la célula alcanza el estado mesenquimal estable, KDM6B ya no sería tan importante como en las fases iniciales de la inducción del programa EMT, cuando las regiones de la cromatina donde se encuentran EMT-TFs se encuentran en un estado más cerrado y reprimido, y se requiere de una intensa activación que desencadene todo el programa transcripcional necesario para que la célula llegue al fenotipo mesenquimal.

Con el fin de evaluar esta hipótesis, decidimos estudiar las fases iniciales del programa EMT mediante el tratamiento a corto plazo con un inductor como el TGF β 1. Una de las líneas celulares con un fenotipo marcadamente epitelial que responde de forma eficaz al TGF β 1 es el modelo HCC827, en comparación con otras células epiteliales (HCC4006 y la PC9) que tardan más en desarrollar una respuesta completa al TGF β 1. La línea H1975 presenta un fenotipo intermedio entre epitelial y mesenquimal (expresa CDH1 pero también VIM y SNAI1) lo que podría dificultar el estudio de las primeras fases de la inducción del programa EMT. Por todo ello, utilizamos el modelo HCC827 parental en los siguientes experimentos. En primer lugar, sometimos a la línea parental al tratamiento con GSK-J4 con el fin de observar que los efectos que se producían en la línea parental eran similares a los inducidos en el resto de líneas ya probadas como la H1975 y la HCC4006.

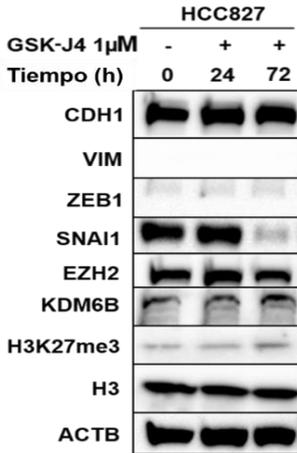


Figura 54. Expresión de los marcadores EMT y de enzimas moduladoras de la metilación de H3K27 en células HCC827 parentales tratadas con GSK-J4. Los extractos de proteína obtenidos de células HCC827 control y tratadas con GSK-J4 1 μ M durante 24 y 72 horas se analizaron mediante *western blot* para determinar los niveles de las proteínas CDH1, VIM, ZEB1, SNAI1, KDM6B, EZH2 y ACTB como control de carga. Imagen representativa de una n=3.

Como podemos observar en la Figura 54, las células HCC827 parentales responden al GSK-J4 incrementando ligeramente los niveles de H3K27me3 a las 72 horas después del tratamiento y una intensa represión del EMT-TF SNAI1 al igual que ocurría en las otras líneas celulares parentales, mientras que la expresión del resto de marcadores no se ve alterada, lo cual es consistente con el hecho de ser células con fenotipo epitelial y niveles elevados de CDH1. Estos resultados sugieren que la inhibición de KDM6B con el GSK-J4 podría reprimir de forma eficaz SNAI1 en las etapas iniciales de la EMT (Cuando SNAI1 juega un papel esencial), y en el contexto de la presión farmacológica inducida por los ITQs, al principio de la adquisición de la resistencia epigenética. Para evaluar esta posibilidad, estudiamos el efecto del TGF β 1 en las células HCC827 parentales en combinación con el GSK-J4, añadiendo además el inhibidor de EZH2 GSK-126 (Huang 2018), con el fin de observar que ocurre cuando las células son sometidas al efecto contrario que el inducido por el GSK-J4.

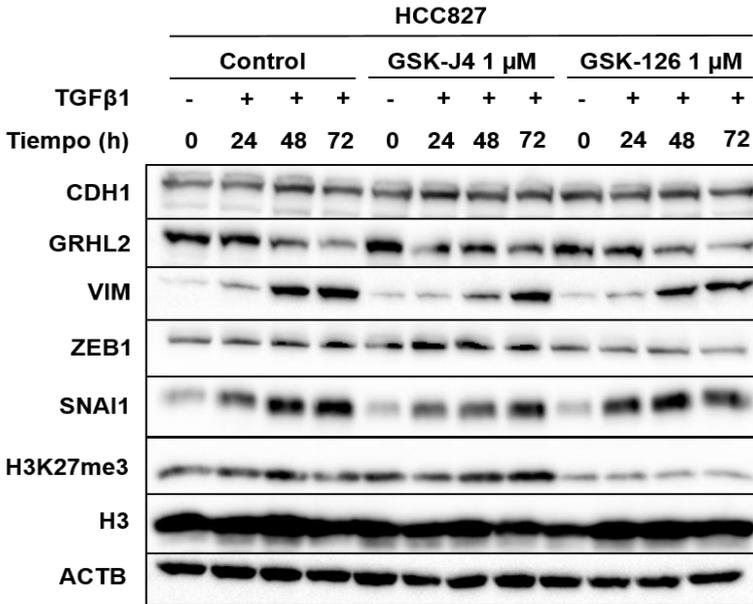


Figura 55. Expresión de los marcadores EMT y la marca H3K27me3 en células HCC827 parentales tratadas con TGF β 1 en combinación con los inhibidores GSK-J4 y GSK-126. Las células HCC827 fueron pretratadas con GSK-J4 y GSK-126 durante 72 horas (1 μ M en ambos casos), y posteriormente se añadió el TGF β 1 a 10 ng/ml, durante 24, 48 y 72 horas junto con GSK-J4 y GSK-126, los extractos de proteína se recogieron tras 24, 48 y 72 horas y analizaron mediante *western blot* y anticuerpos contra las proteínas CDH1, GRHL2, VIM, ZEB1, SNAI1, H3K27me3 y H3, y ACTB como controles de carga. Imagen representativa de una n=3.

Como muestra la Figura 55, el TGF β 1 es capaz de iniciar el programa EMT en el modelo celular HCC827 a las 24 horas de tratamiento provocando el incremento de expresión del EMT-TF SNAI1, que sigue aumentando transcurridas 48 y 72 horas, del marcador mesenquimal VIM, y la represión parcial de los marcadores epiteliales GRHL2 y CDH1, este último de manera discreta. Por otro lado, el tratamiento conjunto del TGF β 1 con el inhibidor de EZH2 GSK-126 potencia el aumento de SNAI1 inducido por el propio TGF β 1 por si solo a las 24 horas, y una bajada drástica de la marca H3K27me3, lo cual sugiere que la inhibición de EZH2 podría acelerar la inducción del programa EMT. Finalmente, destacaremos que el GSK-J4 es capaz de provocar un aumento de la marca H3K27me3, y lo que es más importante, contrarrestar la

inducción del programa EMT provocado por el TGF β 1, ya que disminuye los niveles de SNAI1, que necesitan 72 horas de tratamiento con la citoquina para igualar los niveles alcanzados a las 24 horas en ausencia del inhibidor de KDM6B. Como consecuencia de la represión de SNAI1, el TGF β 1 tarda más tiempo en inducir la expresión de VIM. Además, el GSK-J4 amortigua significativamente la represión del factor de transcripción epitelial GRHL2. Por tanto, podemos concluir que el GSK-J4 previene la inducción del programa EMT mediante el aumento de la marca de represión H3K27me3, disminuyendo los niveles del EMT-TF SNAI1, reduciendo así el efecto del TGF β 1. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor de EZH2 GSK-126 provoca el efecto contrario en la marca H3K27me3 y parece activar la EMT aumentando los niveles de SNAI1. Estos resultados dan lugar a distintas interpretaciones, ya que como describimos en la introducción, EZH2 ha sido bien descrito en diversos modelos celulares como un inductor del programa EMT, encargado de reprimir marcas epiteliales como CDH1 (Cao 2008; Herranz 2008; Tiwari 2013). Sin embargo, en otros modelos se ha descrito un efecto opuesto, lo que sugiere que según el contexto y tipo de tejido tumoral EZH2 puede ejercer un efecto pro o anti-EMT (Cardenas 2016; Serresi 2016). De este modo, podemos deducir que en nuestros modelos celulares de cáncer de pulmón dirigidos por EGFR, y en el contexto de la resistencia a los ITQs, la desmetilación de H3K27me3 favorece la inducción del programa EMT como observamos mediante el bloqueo de EZH2 y el bloqueo de la desmetilación frena el desarrollo del programa EMT.

Con el fin de caracterizar mejor el efecto del GSK-J4 y si es dosis-dependiente, incubamos las células HCC827 parentales con TGF β 1 y GSK-J4 a concentraciones crecientes durante un tiempo fijo. Como podemos apreciar en el análisis de expresión a nivel de ARNm de la Figura 56, efectivamente el efecto del GSK-J4 depende de la dosis dependiente. Cabe destacar que por sí solo el inhibidor provoca un aumento en la expresión génica de *CDH1* y una

disminución de *VIM*, previsiblemente consecuencia de la represión de *SNAI1* y de *ZEB1*. El tratamiento con el TGF β 1, como era de esperar, provoca la represión de *CDH1* junto con un aumento de la expresión de *VIM*, *SNAI1* y *ZEB1*, y al combinarlo con el GSK-J4 estos cambios se revierten. Con todo, podemos deducir que la inhibición de KDM6B es capaz de frenar la EMT inducida por el TGF β 1 y que además es un efecto dosis-dependiente.

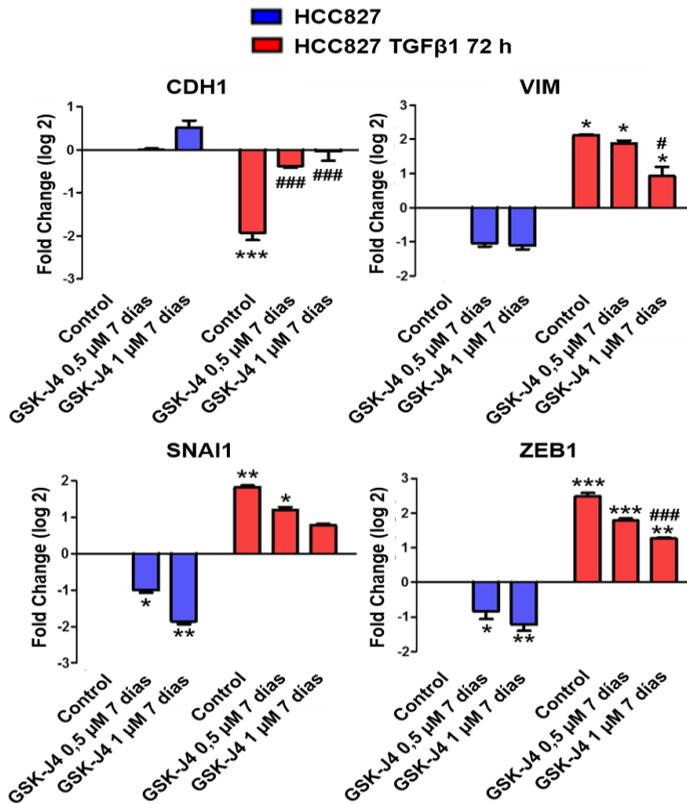


Figura 56. Expresión de los marcadores EMT en la línea celular de AC pulmonar con EGFR mutado HCC827 tratada con TGF β 1 en combinación con el GSK-J4. Niveles de ARNm en la línea HCC827 parental tratadas con las concentraciones de GSK-J4 indicadas durante 7 días y en combinación con TGF β 1 a 10 ng/ml durante 72 horas. Se emplearon extractos de ARNt que se retrotranscribieron a ADNc, y por qPCR se determinaron los niveles de expresión de *CDH1*, *VIM*, *SNAI1*, *ZEB1* y *ACTB* como normalizador. Los datos están expresados en log₂ del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada condición comparada con la línea parental HCC827 sin tratamiento (cuyo valor se representa como 0 en la gráfica). Los resultados (n=3) fueron analizados mediante análisis *one way* ANOVA y test de Tukey donde *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 con respecto al control de HCC827, # p<0,05, ### p<0,001 con respecto al control de HCC827+TGF β 1.

Una vez demostrado el efecto del GSK-J4 como un regulador negativo eficaz del programa EMT nos fijamos como objetivo comprobar si el inhibidor era también capaz de prevenir a corto/medio plazo la adquisición de resistencia a los ITQs. Para ello las células parentales HCC827 fueron pretratadas con GSK-J4 (y también con el inhibidor de EZH2 GSK-126), y posteriormente se trataron con TGF β 1 durante 7 días para garantizar que se desarrollara el fenotipo mesenquimal y resistente a los ITQs, para después ensayar el efecto antitumoral del osimertinib.

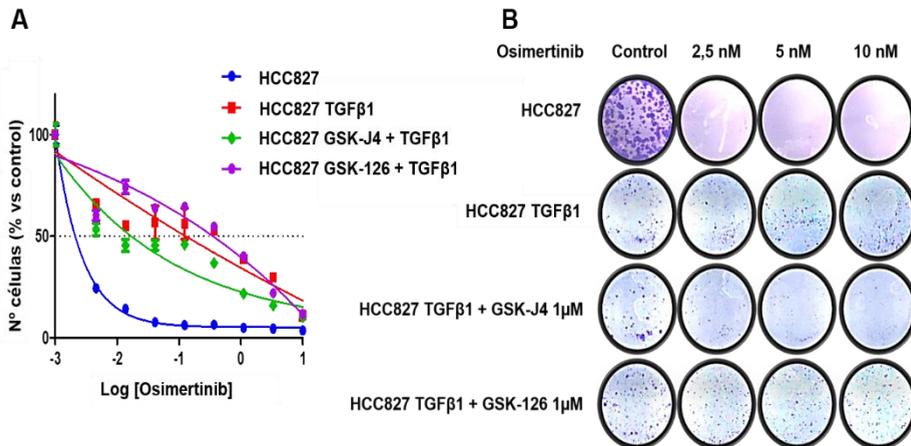


Figura 57. Sensibilidad al osimertinib de las células de AC pulmonar con EGFR mutado HCC827 tratadas con TGF β 1, GSK-J4 y GSK-126. **A.** Las células HCC827 se pretrataron con GSK-J4 o GSK-126 (1 μ M en ambos casos) durante 72 horas, después se añadió el TGF β 1 a 10 ng/ml, y tras 7 días de incubación se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7500 células por pocillo. Transcurridas 24 horas post-siembr, se añadieron las concentraciones indicadas de osimertinib o del vehículo DMSO. El número de células se determinó por el método de la sulforodamina B tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6). **B.** Imagen de un ensayo de formación de colonias donde las líneas celulares crecieron durante 8 días en medio con distintas concentraciones de osimertinib. Las células HCC827 pretratadas como en A se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 5000 células por pocillo y 24h post-siembr se añadieron las concentraciones indicadas de osimertinib, al finalizar el tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 0,4%. Imagen representativa de una n=3.

En la Figura 57 podemos observar como el GSK-J4 es capaz de evitar la adquisición de resistencia al osimertinib asociada a la inducción del fenotipo mesenquimal por el TGF β 1. El osimertinib resulta citotóxico para las células HCC827 parentales tanto en el corto (Figura 57A) como en el medio plazo (Figura 57B). El tratamiento con TGF β 1 induce una clara resistencia al osimertinib, y lo que es más importante, cuando se combina con el GSK-J4 esa resistencia disminuye drásticamente, sobre todo en el medio plazo. Por otro lado, la adición del inhibidor de EZH2 no condicionó significativamente la respuesta al osimertinib en presencia del TGF β 1.

Con todo, resulta evidente que el GSK-J4 bloquea la inducción del fenotipo mesenquimal, y que podría prevenir la adquisición de resistencia a los ITQs. Para validar esta hipótesis, diseñamos un experimento para explorar el efecto de la doble inhibición KDM6B/EGFR en el largo plazo, imitando una escala temporal que pretende ajustarse, con sus evidentes limitaciones, a una situación terapéutica real. Diversos estudios han tratado de evaluar a largo plazo la adquisición de resistencias a los ITQs mediante distintas metodologías, desde la evolución de clones únicos evaluando la resistencia a corto y largo plazo (Hata 2016) a la evolución de pequeñas colonias hasta que son capaces de proliferar en presencia del ITQ (La Monica 2017). En ambas metodologías existen diversas limitaciones, por un lado, al estudiar clones únicos no permites evaluar el efecto farmacológico en un *pool* heterogéneo de células tumorales, mientras que el estudio de pequeñas colonias no te permite determinar de forma clara la heterogeneidad de los distintos clones existentes en esa línea celular además de que este modelo solo abarca un plazo de tiempo limitado que no permite evaluar todo el proceso de adquisición de resistencia sino solo unos puntos concretos de la evolución. En nuestro caso, establecimos un modelo de resistencia elaborado a partir de un *pool* de células sembradas a baja densidad celular que nos permitiera ver los efectos de los distintos tratamientos en un cultivo celular

heterogéneo, pero diseñamos el experimento de modo que se pudiera evaluar durante todo el proceso de resistencia al ITQ hasta llegar a concentraciones de osimertinib en el rango micromolar, de manera individual o en combinación de GSK-J4.

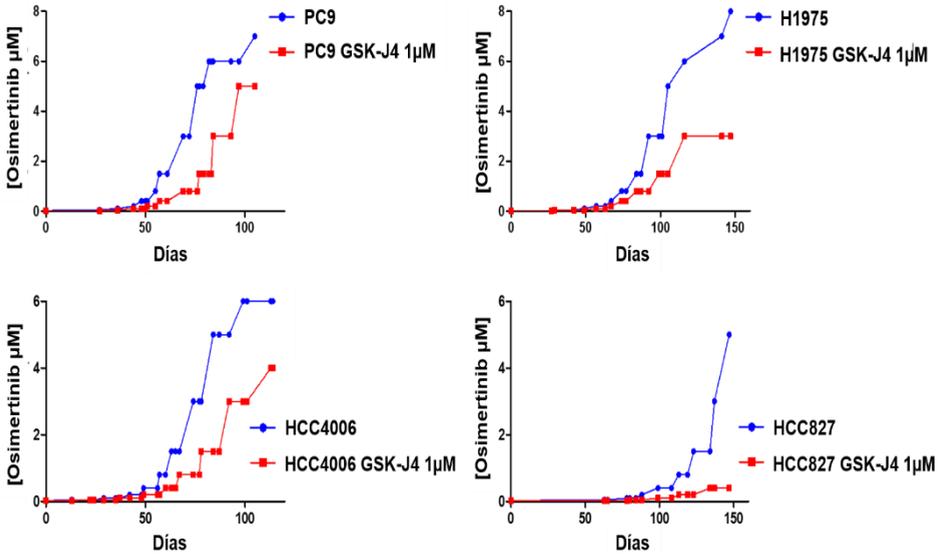


Figura 58. Curvas de adquisición de resistencia al osimertinib en monoterapia o en combinación con el inhibidor de KDM6 GSK-J4 en líneas parentales de AC pulmonar con *EGFR* mutado. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo, y se empezaron a tratar con concentraciones subletales (25 nM) de osimertinib en monoterapia o en combinación con el GSK-J4 a 1 μM; el medio de cultivo con los fármacos se reemplazó cada 2 días, y cada vez que se alcanzó la confluencia, las células se resembraron a la misma densidad, doblando la concentración de osimertinib (la de GSK-J4 permaneció fija durante todo el experimento). Este procedimiento se repitió hasta que se alcanzaron concentraciones de osimertinib en el rango micromolar.

El estudio temporal de la Figura 58 indica que la inhibición de la actividad desmetilasa de H3K27 con el GSK-J4 retrasa la adquisición de resistencia al ITQ osimertinib en los cuatro modelos ensayados. Aunque en las fases iniciales (rango nanomolar) apenas se pueden observar diferencias entre el tratamiento con osimertinib en monoterapia o en combinación con el GSK-J4, conforme avanza el tiempo y las células se adaptan a los concentraciones crecientes del ITQ, las curvas de adquisición de resistencia comienzan a separarse cada vez

más, alargando la duración de la respuesta, o dicho de otra manera, alargando los intervalos entre incrementos de concentración. De hecho, el tiempo necesario para alcanzar una concentración concreta de osimertinib, como puede ser 3 μM , requiere de aproximadamente 25 días más de tratamiento cuando se combina con GSK-J4 en tres de los modelos empleados, ya que actualmente el cuarto modelo todavía no ha llegado a adaptarse a esa concentración de osimertinib. Por tanto, todas estas evidencias indican que el bloqueo de KDM6B mediante el inhibidor GSK-J4 es capaz de frenar la adquisición de resistencia al osimertinib en líneas celulares de AC pulmonar dirigidas por mutaciones activadoras de EGFR y que muestran sensibilidad innata al osimertinib, permitiendo alargar y optimizar el tratamiento al prolongar la duración de cada concentración de osimertinib.

En resumen, esta tesis doctoral sienta las bases de una línea de investigación basada en el estudio sistemático de las adaptaciones epigenéticas que ocurren durante el proceso de adquisición de la resistencia a los ITQ de 3ª generación (osimertinib) y que constituirán en breve la 1ª línea de tratamiento para el AC pulmonar dirigido por EGFR (Soria 2018). Las implicaciones clínicas de este estudio son evidentes. La expresión de CRABP2 o de los receptores nucleares del ácido retinoico (AR) podrían servir como marcadores de respuesta a los ITQs, y los derivados farmacológicos del AR herramientas útiles para retrasar o revertir el fenotipo mesenquimal asociado a la resistencia. La expresión diferencial de los RARs en nuestros modelos mesenquimales nos llevó a profundizar en los mecanismos implicados en la resistencia al efecto del AR en el AC pulmonar. La resistencia se ha asociado en diversos estudios a la represión de RARB como consecuencia de su hipermetilación (Virmani 2000; Licchesi 2008). Estos datos concuerdan con nuestros modelos mesenquimales, que al expresar RARB y RARA respondían más al AR que los modelos epiteliales que solo presentaban niveles elevados de RARG. A pesar de esta mayor respuesta, el AR no era capaz de inducir un efecto antitumoral como ocurre en otros

modelos donde sí se ha descrito RARB como un predictor de la respuesta antitumoral al AR (de Thé 1990; Hoffmann 1990). No obstante, en ciertos estudios pese a expresarse RARB y responder al AR, no se observa ningún efecto antitumoral (Geradts 1993; Zhang 1994; Kim 1995). La ausencia de efecto antitumoral asociado al AR podría asociarse a la expresión de RARG. De este modo, la expresión de RARG podría ser un marcador clave en el efecto antiproliferativo asociado a los derivados farmacológicos del AR, tal y como sugieren nuestras evidencias experimentales. Además, la represión de RARA también podría ser otro candidato con efecto antiproliferativo en determinados modelos como las células con fenotipo mesenquimal. No obstante, será necesario un abordaje farmacológico más profundo mediante el uso de distintos moduladores específicos de los distintos RARs para evaluar que papel juega cada uno de estos receptores en cada modelo y su papel como reguladores epigenéticos.

Una de las limitaciones de este trabajo es la falta de pruebas concluyentes que establezcan los mecanismos epigenéticos directos por los cuales se regulan de manera diferencial la expresión de los genes epiteliales y mesenquimales de una manera global y coordinada, para lo que harán falta experimentos de CHIP de varios modificadores de la cromatina y marcas de histonas, acoplados a la secuenciación masiva y el análisis transcriptómico. Desde un punto de vista mecanístico, nuestros resultados indican que la expresión de SNAI1, el factor de transcripción responsable de orquestar los primeros cambios transcripcionales que aparecen durante la inducción del fenotipo mesenquimal, depende de la vía del AR y, lo que es más importante, de la actividad desmetilasa de KDM6B, un editor epigenético que disminuye la marca represiva H3K27me3. La disponibilidad de nuevos inhibidores de esta actividad, como el GSK-J4, y su eficacia *in vitro* tanto como agente citotóxico en los modelos mesenquimales como a la hora de retrasar el fenómeno de adquisición de la resistencia a los

ITQs, abre la posibilidad de diseñar nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes en tratamiento con los ITQs que tengan en cuenta esta combinación farmacológica.

Conclusiones

1. Los nuevos modelos de resistencia adquirida al inhibidor de EGFR de 3ª generación osimertinib desarrollan un fenotipo mesenquimal.
2. La validación de marcadores epigenéticos previamente identificados en el metaanálisis de datos ómicos señala a la vía del AR, y a la proteína que lo transloca al núcleo CRABP2 como potenciales marcadores epigenéticos de respuesta al osimertinib.
3. Los patrones de expresión diferencial de los receptores nucleares del AR podrían dirigir la profunda reprogramación epigenética que subyace en la EMT asociada a la resistencia adquirida a ITQs.
4. Concretamente, el receptor nuclear del AR RARG podría ser un importante factor epigenético en la regulación del programa EMT.
5. La actividad desmetilasa de KDM6B es esencial para la iniciación de la EMT mediada por el factor de transcripción SNAIL y, por ende, la adquisición de la resistencia a los ITQs.

6. La combinación de los ITQs con inhibidores de la actividad desmetilasa de KDM6B podrían constituir una nueva estrategia terapéutica para prevenir o retrasar la resistencia a los ITQs y aumentar su eficacia clínica.

Bibliografía

- A.B. SANDLER, J. NEMUNAITIS, C. DENHAM, J. VON PAWEL, Y. CORMIER, U. GATZEMEIER, K. MATTSON, CH. MANEGOLD, M.C. PALMER, A. GREGOR, B. NGUYEN, C. NIYIKIZA and L.H. EINHORN, 2000. Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Locally Advanced or Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **18**(1), pp. 122.
- ACLOQUE, H., ADAMS, M.S., FISHWICK, K., BRONNER-FRASER, M. and NIETO, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*, **119**(6), pp. 1438-1449.
- ADAMS, J.M. and CORY, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**(9), pp. 1324-1337.
- AGGER, K., CLOOS, P.A.C., CHRISTENSEN, J., PASINI, D., ROSE, S., RAPPSILBER, J., ISSAEVA, I., CANAANI, E., SALCINI, A.E. and HELIN, K., 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, **449**(7163), pp. 731-734.
- AGHDASSI, A., SENDLER, M., GUENTHER, A., MAYERLE, J., BEHN, C., HEIDECKE, C., FRIESS, H., BÜCHLER, M., EVERT, M., LERCH, M.M. and WEISS, F.U., 2012. Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut*, **61**(3), pp. 439-448.
- AKIYUKI NISHIMURA, KEN KITANO, JUN TAKASAKI, MASATOSHI TANIGUCHI, NORIKAZU MIZUNO, KENJI TAGO, TOSHIO HAKOSHIMA and HIROSHI ITOH, 2010. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(31), pp. 13666-13671.
- AKSOY-SAGIRLI, P., ERDENAY, A., KAYTAN-SAGLAM, E. and KIZIR, A., 2017. Association of Three Single Nucleotide Polymorphisms in MTR and MTRR Genes with Lung Cancer in a Turkish Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **21**(7), pp. 428-432.

ALEJANDRO BARRALLO-GIMENO and M. ANGELA NIETO, 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, **132**(14), pp. 3151-3161.

ALLIS, C.D. and JENUWEIN, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature reviews. Genetics*, **17**(8), pp. 487-500.

ALTUCCI, L., ROSSIN, A., RAFFELSBERGER, W., REITMAIR, A., CHOMIENNE, C. and GRONEMEYER, H., 2001. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine*, **7**(6), pp. 680-686.

AMIR EDEN, FRANÇOIS GAUDET, ALPANA WAGHMARE and RUDOLF JAENISCH, 2003. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science*, **300**(5618), pp. 455.

AMOS, C.I., XU, W. and SPITZ, M.R., 1999. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, **151**, pp. 3.

ANTONIA, S.J., VILLEGAS, A., DANIEL, D., VICENTE, D., MURAKAMI, S., HUI, R., YOKOI, T., CHIAPPORI, A., LEE, K.H., DE WIT, M., CHO, B.C., BOURHABA, M., QUANTIN, X., TOKITO, T., MEKHAIL, T., PLANCHARD, D., KIM, Y., KARAPETIS, C.S., HIRET, S., OSTOROS, G., KUBOTA, K., GRAY, J.E., PAZ-ARES, L., DE CASTRO CARPEÑO, J., WADSWORTH, C., MELILLO, G., JIANG, H., HUANG, Y., DENNIS, P.A. and ÖZGÜROĞLU, M., 2017. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **377**(20), pp. 1919-1929.

ANTONIO MARCHETTI, LARA FELICIONI, SARA MALATESTA, MARIA GRAZIA SCIARROTTA, LUIGI GUETTI, ANTONIO CHELLA, PATRIZIA VIOLA, CARMELA PULLARA, FELICE MUCILLI and FIAMMA BUTTITTA, 2011. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, **29**(26), pp. 3574-3579.

ARRIAGADA, R., BERGMAN, B., DUNANT, A., LE CHEVALIER, T., PIGNON, J. and VANSTEENKISTE, J., 2004. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, **350**(4), pp. 351-360.

ARTANDI, S.E. and DEPINHO, R.A., 2000. Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Medicine*, **6**(8), pp. 852-855.

ATHULURI-DIVAKAR, S., VASQUEZ-DEL CARPIO, R., DUTTA, K., BAKER, S., COSENZA, S., BASU, I., GUPTA, Y., REDDY, E. ., REDDY, M.V. ., UENO, L., HART, J., VOGT, P., MULHOLLAND, D., GUHA, C. and AGGARWAL, A., 2016. A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. *Cell*, **165**(3), pp. 643-655.

AVGUSTINOVA, A. and BENITAH, S.A., 2016. Epigenetic control of adult stem cell function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **17**(10), pp. 643-658.

AZAD, N., ZAHNOW, C.A., RUDIN, C.M. and BAYLIN, S.B., 2013. The future of epigenetic therapy in solid tumours—lessons from the past. *Nature reviews. Clinical oncology*, **10**(5), pp. 256-266.

BAILEY-WILSON, J.E., AMOS, C.I., PINNEY, S.M., PETERSEN, G.M., DE ANDRADE, M., WIEST, J.S., FAIN, P., SCHWARTZ, A.G., YOU, M., FRANKLIN, W., KLEIN, C., GAZDAR, A., ROTHSCHILD, H., MANDAL, D., COONS, T., SLUSSER, J., LEE, J., GABA, C., KUPERT, E., PEREZ, A., ZHOU, X., ZENG, D., LIU, Q., ZHANG, Q., SEMINARA, D., MINNA, J. and ANDERSON, M.W., 2004. A Major Lung Cancer Susceptibility Locus Maps to Chromosome 6q23–25. *The American Journal of Human Genetics*, **75**(3), pp. 460-474.

BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R.E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A.B., DEWHIRST, M.W., BIGNER, D.D. and RICH, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**(7120), pp. 756-760.

BARRETINA, J., CAPONIGRO, G., STRANSKY, N., VENKATESAN, K., MARGOLIN, A.A., KIM, S., J.WILSON, C., LEHÁR, J., KRYUKOV, G.V., SONKIN, D., REDDY, A., LIU, M., MURRAY, L., BERGER, M.F., MONAHAN, J.E., MORAIS, P., MELTZER, J., KOREJWA, A., JANÉ-VALBUENA, J., MAPA, F.A., THIBAUT, J., BRIC-FURLONG, E., RAMAN, P., SHIPWAY, A., ENGELS, I.H., CHENG, J., YU, G.K., YU, J., ASPESI, P., DE SILVA, M., JAGTAP, K., JONES, M.D., WANG, L., HATTON, C., PALESCANDOLO, E., GUPTA, S., MAHAN, S., SOUGNEZ, C., ONOFRIO, R.C., LIEFELD, T., MACCONAILL, L., WINCKLER, W., REICH, M., LI, N., MESIROV, J.P., GABRIEL, S.B., GETZ, G., ARDLIE, K., CHAN, V., MYER, V.E., WEBER, B.L., PORTER, J., WARMUTH, M., FINAN, P., HARRIS, J.L., MEYERSON, M., GOLUB, T.R., MORRISSEY, M.P., SELLERS, W.R., SCHLEGEL, R. and GARRAWAY, L.A., 2012. Addendum: The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, **492**(7428), pp. 290.

BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T., SCHONES, D.E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. and ZHAO, K., 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, **129**(4), pp. 823-837.

BASS, A.J., THORSSON, V., SHMULEVICH, I., REYNOLDS, S.M., MILLER, M., BERNARD, B., HINOUE, T., LAIRD, P.W., CURTIS, C., SHEN, H., WEISENBERGER, D.J., SCHULTZ, N., SHEN, R., WEINHOLD, N., KELSEN, D.P., BOWLBY, R., CHU, A., KASAIAN, K., MUNGALL, A.J., ROBERTSON, A.G., SIPAHIMALANI, P., CHERNIACK, A., GETZ, G., LIU, Y., NOBLE, M.S., PEDAMALLU, C., SOUGNEZ, C., TAYLOR-WEINER, A., AKBANI, R., LEE, J., LIU, W., MILLS, G.B., YANG, D., ZHANG, W., PANTAZI, A., PARFENOV, M., GULLEY, M., PIAZUELO, M.B., SCHNEIDER, B.G., KIM, J., BOUSSIOUTAS, A., SHETH, M., DEMCHOK, J.A., RABKIN, C.S., WILLIS, J.E., NG, S., GARMAN, K., BEER, D.G., PENNATHUR, A., RAPHAEL, B.J., WU, H., ODZE, R., KIM, H.K., BOWEN, J., LERAAS, K.M., LICHTENBERG, T.M., WEAVER, S., MCLELLAN, M., WIZNEROWICZ, M., SAKAI, R., LAWRENCE, M.S., CIBULSKIS, K., LICHTENSTEIN, L., FISHER, S., GABRIEL, S.B., LANDER, E.S., DING, L., NIU, B., ALLY, A., BALASUNDARAM, M., BIROL, I., BROOKS, D., BUTTERFIELD, Y.S.N., CARLSEN, R., CHU, J., CHUAH, E., CHUN, H.E., CLARKE, A., DHALLA, N., GUIN, R., HOLT, R.A., JONES, S.J.M., LEE, D., LI, H.A., LIM, E., MA, Y., MARRA, M.A., MAYO, M., MOORE, R.A., MUNGALL, K.L., NIP, K.M., SCHEIN, J.E., TAM, A., THIESSEN, N., BEROUKHIM, R., CARTER, S.L., CHERNIACK, A.D., CHO, J., DICARA, D., FRAZER, S. and ..., 2014. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, **513**(7517), pp. 202-209.

BAYLIN, S.B. and JONES, P.A., 2011. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, **11**(10), pp. 726-734.

BECKER, J.H., GAO, Y., SOUCHERAY, M., PULIDO, I., KIKUCHI, E., RODRÍGUEZ, M.L., GANDHI, R., LAFUENTE-SANCHIS, A., AUPÍ, M., ALCÁ CER FERNÁNDEZ-CORONADO, J., MARTÍN-MARTORELL, P., CREMADES, A., GALBIS-CARAVAJAL, J.M., ALCÁ CER, J., CHRISTENSEN, C.L., SIMMS, P., HESS, A., ASAHINA, H., KAHLE, M.P., AL-SHAHROUR, F., BORGIA, J.A., LAHOZ, A., INSA, A., JUAN, O., JANNE, P.A., WONG, K., CARRETERO, J. and SHIMAMURA, T., 2019. CXCR7 reactivates ERK signaling to promote resistance to EGFR kinase inhibitors in NSCLC. *Cancer research*, **79**(17), pp. 4439-4452.

BEDNARZ-KNOLL, N., ALIX-PANABIÈRES, C. and PANTEL, K., 2012. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer and Metastasis Reviews*, **31**(3), pp. 673-687.

BEHRENS, C., SOLIS, L.M., LIN, H., YUAN, P., TANG, X., KADARA, H., RIQUELME, E., GALINDO, H., MORAN, C.A., KALHOR, N., SWISHER, S.G., SIMON, G.R., STEWART, D.J., LEE, J.J. and WISTUBA, I.I., 2013. EZH2 Protein Expression Associates with the Early Pathogenesis, Tumor Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **19**(23), pp. 6556-6565.

BELINSKY, S.A., 2005. Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**(9), pp. 1481-1487.

BELINSKY, S.A., 2004. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, **4**(9), pp. 707-717.

BELINSKY, S.A., KLINGE, D.M., STIDLEY, C.A., ISSA, J., HERMAN, J.G., MARCH, T.H. and BAYLIN, S.B., 2003. Inhibition of DNA Methylation and Histone Deacetylation Prevents Murine Lung Cancer. *Cancer Research*, **63**(21), pp. 7089.

BENJAMINI, Y. and HOCHBERG, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B, Methodological*, **57**(1), pp. 289.

BERGER, S.L., KOUZARIDES, T., SHIEKHATTAR, R. and SHILATIFARD, A., 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, **23**(7), pp. 781-783.

BERNSTEIN, B.E., MEISSNER, A. and LANDER, E.S., 2007. The Mammalian Epigenome. *Cell*, **128**(4), pp. 669-681.

BERNSTEIN, B.E., MIKKELSEN, T.S., XIE, X., KAMAL, M., HUEBERT, D.J., CUFF, J., FRY, B., MEISSNER, A., WERNIG, M., PLATH, K., JAENISCH, R., WAGSCHAL, A., FEIL, R., SCHREIBER, S.L. and LANDER, E.S., 2006. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, **125**(2), pp. 315-326.

BHOWMICK, N.A., NEILSON, E.G. and MOSES, H.L., 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, **432**(7015), pp. 332-337.

BIRCHMEIER, C., BIRCHMEIER, W., GHERARDI, E. and VANDE WOUDE, G.F., 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**(12), pp. 915-925.

BIRCHMEIER, W. and BEHRENS, J., 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *BBA - Reviews on Cancer*, **1198**(1), pp. 11-26.

BLASCO, M.A., 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, **6**(8), pp. 611-622.

BONNOMET, A., SYNE, L., BRYSSSE, A., FEYEREISEN, E., THOMPSON, E.W., NOËL, A., FOIDART, J., BIREMBAUT, P., POLETTE, M. and GILLES, C., 2012. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene*, **31**(33), pp. 3741-3753.

BOVERI, T., 1902. *Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns [Concerning multipolar mitoses as a means of analysing the cell nucleus]*. Würzburg: Stuber.

BRABLETZ, S., MEIDHOF, S., FALLER, G., DIMMLER, A., SCHUBERT, J., BRABLETZ, T., BAJDAK, K., BURK, U., NIEDERMANN, G., FIRAT, E. and WELLNER, U., 2011. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *The EMBO Journal*, **30**(4), pp. 770-782.

BRABLETZ, T., JUNG, A., SPADERNA, S., HLUBEK, F. and KIRCHNER, T., 2005. Migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, **5**(9), pp. 744-749.

BRADNER, J.E., HNISZ, D. and YOUNG, R.A., 2017. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell*, **168**(4), pp. 629-643.

BRAHMER, J., HORN, L., JACKMAN, D., SPIGEL, D., ANTONIA, S., HELLMANN, M., POWDERLY, J., HEIST, R., SEQUIST, L., SMITH, D.C., LEMING, P., GEESE, W.J., YOON, D., LI, A. and GETTINGER, S., 2017. Abstract CT077: Five-year follow-up from the CA209-003 study of nivolumab in previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical characteristics of long-term survivors. *Cancer Research*, **77**(13 Supplement), pp. CT077.

BRAHMER, J., RECKAMP, K.L., BAAS, P., CRINÒ, L., EBERHARDT, W.E.E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E.E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., ARÉN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M.C., AERTS, J.G.,

DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C.T., LESTINI, B. and SPIGEL, D.R., 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **373**(2), pp. 123-135.

BROCK, M.V., HOOKER, C.M., OTA-MACHIDA, E., HAN, Y., GUO, M., AMES, S., GLOCKNER, S., PIANTADOSI, S., GABRIELSON, E., PRIDHAM, G., PELOSKY, K., BELINSKY, S.A., YANG, S.C., BAYLIN, S.B. and HERMAN, J.G., 2008. DNA Methylation Markers and Early Recurrence in Stage I Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **358**(11), pp. 1118-1128.

BROSE, M.S., VOLPE, P., FELDMAN, M., KUMAR, M., RISHI, I., GERRERO, R., EINHORN, E., HERLYN, M., MINNA, J., NICHOLSON, A., ROTH, J.A., ALBELDA, S.M., DAVIES, H., COX, C., BRIGNELL, G., STEPHENS, P., FUTREAL, P.A., WOOSTER, R., STRATTON, M.R. and WEBER, B.L., 2002. BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. *Cancer Research*, **62**(23), pp. 6997.

BUDHU ANURADHA, S. and NOY NOA, 2002. Direct Channeling of Retinoic Acid between Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II and Retinoic Acid Receptor Sensitizes Mammary Carcinoma Cells to Retinoic Acid-Induced Growth Arrest. *Molecular and Cellular Biology*, **22**(8), pp. 2632-2641.

BUONATO, J.M. and LAZZARA, M.J., 2014. ERK1/2 Blockade Prevents Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells and Promotes Their Sensitivity to EGFR Inhibition. *Cancer research*, **74**(1), pp. 309-319.

BURK, U., SCHUBERT, J., WELLNER, U., SCHMALHOFER, O., VINCAN, E., SPADERNA, S. and BRABLETZ, T., 2008. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports*, **9**(6), pp. 582-589.

BURKHART, D.L. and SAGE, J., 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, **8**(9), pp. 671-682.

BYERS, L.A., DIAO, L., WANG, J., SAINTIGNY, P., GIRARD, L., PEYTON, M., SHEN, L., FAN, Y., GIRI, U., TUMULA, P.K., NILSSON, M.B., GUDIKOTE, J., TRAN, H., CARDNELL, R.J.G., BEARSS, D.J., WARNER, S.L., FOULKES, J.M., KANNER, S.B., GANDHI, V., KRETT, N., ROSEN, S.T., KIM, E.S., HERBST, R.S., BLUMENSCHNEN, G.R., LEE, J.J., LIPPMAN, S.M., ANG, K.K., MILLS, G.B., HONG, W.K., WEINSTEIN, J.N., WISTUBA, I.I., COOMBES, K.R., MINNA, J.D. and HEYMACH, J.V., 2013. An

Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **19**(1), pp. 279-290.

CAMERON, E.E., BACHMAN, K.E., MYÖHÄNEN, S., HERMAN, J.G. and BAYLIN, S.B., 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics*, **21**(1), pp. 103-107.

CANO, A., PÉREZ-MORENO, M.A., RODRIGO CASTRO, M.I., LOCASCIO, A., BLANCO FERNÁNDEZ DE VALDERRAMA, MARÍA JOSÉ, BARRIO, M.G.D., PORTILLO, F. and NIETO, M.Á., The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.

CAO, J., HE, Y., LIU, H., WANG, S., ZHAO, B. and CHENG, Y., 2015. MicroRNA 192 regulates chemo-resistance of lung adenocarcinoma for gemcitabine and cisplatin combined therapy by targeting Bcl-2. *International journal of clinical and experimental medicine*, **8**(8), pp. 12397-12403.

CAO, Q., YU, J., DHANASEKARAN, S.M., KIM, J.H., MANI, R., TOMLINS, S.A., MEHRA, R., LAXMAN, B., CAO, X., KLEER, C.G., VARAMBALLY, S. and CHINNAIYAN, A.M., 2008. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*, **27**(58), pp. 7274-7284.

CAO, R., WANG, L., WANG, H., XIA, L., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., JONES, R.S. and ZHANG, Y., 2002. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science*, **298**(5595), pp. 1039-1043.

CAPPUZZO, F., JÄNNE, P.A., SKOKAN, M., FINOCCHIARO, G., ROSSI, E., LIGORIO, C., ZUCALI, P.A., TERRACCIANO, L., TOSCHI, L., RONCALLI, M., DESTRO, A., INCARBONE, M., ALLOISIO, M., SANTORO, A. and VARELLA-GARCIA, M., 2009. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Annals of Oncology*, **20**(2), pp. 298-304.

CARDARELLA, S., OGINO, A., NISHINO, M., BUTANEY, M., SHEN, J., LYDON, C., YEAP, B.Y., SHOLL, L.M., JOHNSON, B.E. and JÄNNE, P.A., 2013. Clinical, Pathologic, and Biologic Features Associated with BRAF Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **19**(16), pp. 4532-4540.

CARDENAS, H., ZHAO, J., VIETH, E., NEPHEW, K.P. and MATEI, D., 2016. EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget*, **7**(51), pp. 84453-84467.

CARMELIET, P., 2005. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, **69**(3), pp. 4-10.

CARPTEN, J.D., FABER, A.L., HORN, C., DONOHO, G.P., BRIGGS, S.L., ROBBINS, C.M., HOSTETTER, G., BOGUSLAWSKI, S., MOSES, T.Y., SAVAGE, S., UHLIK, M., LIN, A., DU, J., QIAN, Y., ZECKNER, D.J., TUCKER-KELLOGG, G., TOUCHMAN, J., PATEL, K., MOUSSES, S., BITTNER, M., SCHEVITZ, R., LAI, M.T., BLANCHARD, K.L. and THOMAS, J.E., 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, **448**(7152), pp. 439-444.

CELIÀ-TERRASSA, T., MECA-CORTÉS, O., MATEO, F., MARTÍNEZ DE PAZ, A., RUBIO, N., ARNAL-ESTAPÉ, A., ELL, B.J., BERMUDO, R., DÍAZ, A., GUERRA-REBOLLO, M., LOZANO, J.J., ESTARÁS, C., ULLOA, C., ÁLVAREZ-SIMÓN, D., MILÀ, J., VILELLA, R., PACIUCCI, R., MARTÍNEZ-BALBÁS, M., DE HERREROS, A.G., GOMIS, R.R., KANG, Y., BLANCO, J., FERNÁNDEZ, P.L. and THOMSON, T.M., 2012. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *The Journal of clinical investigation*, **122**(5), pp. 1849-1868.

CHAFT, J.E., ARCILA, M.E., PAIK, P.K., LAU, C., RIELY, G.J., PIETANZA, M.C., ZAKOWSKI, M.F., RUSCH, V., SIMA, C.S., LADANYI, M. and KRIS, M.G., 2012. Coexistence of PIK3CA and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma-Rationale for Comprehensive Mutation Profiling. *Molecular cancer therapeutics*, **11**(2), pp. 485-491.

CHAMBON, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *The FASEB Journal*, **10**(9), pp. 940-954.

CHANG, S., YIM, S. and PARK, H., 2019. The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism. *Experimental & molecular medicine*, **51**(6), pp. 66-17.

CHANG, X., MONITTO, C.L., DEMOKAN, S., KIM, M.S., CHANG, S.S., ZHONG, X., CALIFANO, J.A. and SIDRANSKY, D., 2010. Identification of Hypermethylated Genes Associated with Cisplatin Resistance in Human Cancers. *Cancer research*, **70**(7), pp. 2870-2879.

CHAPMAN, M.A., LAWRENCE, M.S., KEATS, J.J., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., SCHINZEL, A.C., HARVIEW, C.L., BRUNET, J., AHMANN,

G.J., ADLI, M., ANDERSON, K.C., ARDLIE, K.G., AUCLAIR, D., BAKER, A., BERGSAGEL, P.L., BERNSTEIN, B.E., DRIER, Y., FONSECA, R., GABRIEL, S.B., HOFMEISTER, C.C., JAGANNATH, S., JAKUBOWIAK, A.J., KRISHNAN, A., LEVY, J., LIEFELD, T., LONIAL, S., MAHAN, S., MFUKO, B., MONTI, S., PERKINS, L.M., ONOFRIO, R., PUGH, T.J., RAJKUMAR, S.V., RAMOS, A.H., SIEGEL, D.S., SIVACHENKO, A., STEWART, A.K., TRUDEL, S., VIJ, R., VOET, D., WINCKLER, W., ZIMMERMAN, T., CARPTEN, J., TRENT, J., HAHN, W.C., GARRAWAY, L.A., MEYERSON, M., LANDER, E.S., GETZ, G. and GOLUB, T.R., 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, **471**(7339), pp. 467-472.

CHEN, Y., CHEN, Y., CHEN, D., HSU, H., TSENG, L., HUANG, P., LU, K., TAI, L., YUNG, M., CHANG, S., KU, H., CHIOU, S. and LO, W., 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **385**(3), pp. 307-313.

CHEUNG, K., GABRIELSON, E., WERB, Z. and EWALD, A., 2013. Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program. *Cell*, **155**(7), pp. 1639-1651.

CHOI, H., PARK, J., PARK, M., WON, H., JOO, H., LEE, C.H., LEE, J. and KONG, G., 2015. UTX inhibits EMT-induced breast CSC properties by epigenetic repression of EMT genes in cooperation with LSD1 and HDAC1. *EMBO reports*, **16**(10), pp. 1288-1298.

CLARK, W.H., 1995. The Nature of Cancer: Morphogenesis and Progressive (Self)-Disorganization in Neoplastic Development and Progression. *Acta Oncologica*, **34**(1), pp. 3-21.

COMET, I., RIISING, E.M., LEBLANC, B. and HELIN, K., 2016. Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer. *Nature reviews. Cancer*, **16**(12), pp. 803-810.

CORNELIA LIEDTKE, CHAFIKA MAZOUNI, KENNETH R. HESS, FABRICE ANDRÉ, ATTILA TORDAI, JAIME A. MEJIA, W. FRASER SYMMANS, ANA M. GONZALEZ-ANGULO, BRYAN HENNESSY, MARJORIE GREEN, MASSIMO CRISTOFANILLI, GABRIEL N. HORTOBAGYI and LAJOS PUSZTAI, 2008. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **26**(8), pp. 1275-1281.

CORTOT, A.B. and JÄNNE, P.A., 2014. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, **23**(133), pp. 356-366.

COSTA, D.B., HALMOS, B., KUMAR, A., SCHUMER, S.T., HUBERMAN, M.S., BOGGON, T.J., TENEN, D.G. and KOBAYASHI, S., 2007. BIM Mediates EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Apoptosis in Lung Cancers with Oncogenic EGFR Mutations. *PLoS medicine*, **4**(10), pp. 1669-79; discussion 1680.

COUSSENS, L., YANG-FENG, T.L., LIAO, Y.C., CHEN, E., GRAY, A., MCGRATH, J., SEEBURG, P.H., LIBERMANN, T.A., SCHLESSINGER, J. and FRANCKE, U., 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**(4730), pp. 1132-1139.

COWAN, L.A., TALWAR, S. and YANG, A.S., 2010. Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics*, **2**(1), pp. 71-86.

CRAWFORD, Y., KASMAN, I., YU, L., ZHONG, C., WU, X., MODRUSAN, Z., KAMINKER, J. and FERRARA, N., 2009. PDGF-C Mediates the Angiogenic and Tumorigenic Properties of Fibroblasts Associated with Tumors Refractory to Anti-VEGF Treatment. *Cancer Cell*, **15**(1), pp. 21-34.

CROSS, D.A.E., ASHTON, S.E., GHIORGHIU, S., EBERLEIN, C., NEBHAN, C.A., SPITZLER, P.J., ORME, J.P., FINLAY, M.R.V., WARD, R.A., MELLOR, M.J., HUGHES, G., RAHI, A., JACOBS, V.N., RED BREWER, M., ICHIHARA, E., SUN, J., JIN, H., BALLARD, P., AL-KADHIMI, K., ROWLINSON, R., KLINOWSKA, T., RICHMOND, G.H.P., CANTARINI, M., KIM, D., RANSON, M.R. and PAO, W., 2014. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer discovery*, **4**(9), pp. 1046-1061.

DASARI, A., GORE, L., MESSERSMITH, W.A., DIAB, S., JIMENO, A., WEEKES, C.D., LEWIS, K.D., DRABKIN, H.A., FLAIG, T.W. and CAMIDGE, D.R., 2010. A phase I safety and tolerability study of vorinostat (V) in combination with sorafenib (S) in patients with advanced solid tumors, with exploration of two tumor-type specific expanded cohorts at the recommended phase II dose (renal and non-small cell lung carcinoma). *Journal of Clinical Oncology*, **28**(15_suppl), pp. 2562.

DASARI, S. and BERNARD TCHOUNWOU, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, **740**, pp. 364-378.

DAVE, N., GUAITA-ESTERUELAS, S., GUTARRA, S., FRIAS, À, BELTRAN, M., PEIRÓ, S. and DE HERREROS, A.G., 2011. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry*, **286**(14), pp. 12024-12032.

DAVID H. JOHNSON, LOUIS FEHRENBACHER, WILLIAM F. NOVOTNY, ROY S. HERBST, JOHN J. NEMUNAITIS, DAVID M. JABLONS, COREY J. LANGER, RUSSELL F. DEVORE III, JACQUES GAUDREAU, LISA A. DAMICO, ERIC HOLMGREN and FAIROOZ KABBINAVAR, 2004. Randomized Phase II Trial Comparing Bevacizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel With Carboplatin and Paclitaxel Alone in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **22**(11), pp. 2184-2191.

DAVID S. SCHRUMP, MARIA R. FISCHETTE, DAO M. NGUYEN, MING ZHAO, XINMIN LI, TRICIA F. KUNST, ANA HANCOX, JULIE A. HONG, G. AARON CHEN, EVGENY KRUCHIN, JOHN J. WRIGHT, DOUGLAS R. ROSING, ALEX SPARREBOOM, WILLIAM D. FIGG and SETH M. STEINBERG, 2008. Clinical and Molecular Responses in Lung Cancer Patients Receiving Romidepsin. *Clinical Cancer Research*, **14**(1), pp. 188-198.

DAVID S. SCHRUMP, MARIA R. FISCHETTE, DAO M. NGUYEN, MING ZHAO, XINMIN LI, TRICIA F. KUNST, ANA HANCOX, JULIE A. HONG, G. AARON CHEN, VITALIY PISHCHIK, WILLIAM D. FIGG, ANTHONY J. MURGO and SETH M. STEINBERG, 2006. Phase I Study of Decitabine-Mediated Gene Expression in Patients with Cancers Involving the Lungs, Esophagus, or Pleura. *Clinical Cancer Research*, **12**(19), pp. 5777-5785.

DAVIES, K.D., LE, A.T., THEODORO, M.F., SKOKAN, M.C., AISNER, D.L., BERGE, E.M., TERRACCIANO, L.M., CAPPUZZO, F., INCARBONE, M., RONCALLI, M., ALLOISIO, M., SANTORO, A., CAMIDGE, D.R., VARELLA-GARCIA, M. and DOEBELE, R.C., 2012. Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **18**(17), pp. 4570-4579.

DE CRAENE, B. and BERX, G., 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews. Cancer*, **13**(2), pp. 97-110.

DE THE, H., STUNNENBERG, H., DEL MAR VIVANCO-RUIZ, M., TIOLLAIS, P. and DEJEAN, A., 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor & beta;gene. *Nature*, **343**(6254), pp. 177-180.

DENARDO, D.G., ANDREU, P. and COUSSENS, L.M., 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews*, **29**(2), pp. 309-316.

DERYNCK, R. and ZHANG, Y.E., 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, **425**(6958), pp. 577-584.

DIANE DONG, SARAH E. RUUSKA, DAVID J. LEVINTHAL and NOA NOY, 1999. Distinct Roles for Cellular Retinoic Acid-binding Proteins I and II in Regulating Signaling by Retinoic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(34), pp. 23695-23698.

DÍAZ-LÓPEZ, A., MORENO-BUENO, G. and CANO, A., 2014. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Management and Research*, **2014**(default), pp. 205-216.

DIEHN, M., CHO, R.W., LOBO, N.A., KALISKY, T., DORIE, M.J., KULP, A.N., QIAN, D., LAM, J.S., AILLES, L.E., WONG, M., JOSHUA, B., KAPLAN, M.J., WAPNIR, I., DIRBAS, F.M., SOMLO, G., GARBEROGLIO, C., PAZ, B., SHEN, J., LAU, S.K., QUAKE, S.R., BROWN, J.M., WEISSMAN, I.L. and CLARKE, M.F., 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, **458**(7239), pp. 780-783.

DING, L., GETZ, G., WHEELER, D.A., MARDIS, E.R., MCLELLAN, M.D., CIBULSKIS, K., SOUGNEZ, C., GREULICH, H., MUZNY, D.M., MORGAN, M.B., FULTON, L., FULTON, R.S., ZHANG, Q., WENDL, M.C., LAWRENCE, M.S., LARSON, D.E., CHEN, K., DOOLING, D.J., SABO, A., HAWES, A.C., SHEN, H., JHANGIANI, S.N., LEWIS, L.R., HALL, O., ZHU, Y., MATHEW, T., REN, Y., YAO, J., SCHERER, S.E., CLERC, K., METCALF, G.A., NG, B., MILOSAVLJEVIC, A., GONZALEZ-GARAY, M.L., OSBORNE, J.R., MEYER, R., SHI, X., TANG, Y., KOBOLDT, D.C., LIN, L., ABBOTT, R., MINER, T.L., POHL, C., FEWELL, G., HAIPEK, C., SCHMIDT, H., DUNFORD-SHORE, B.H., KRAJA, A., CROSBY, S.D., SAWYER, C.S., VICKERY, T., SANDER, S., ROBINSON, J., WINCKLER, W., BALDWIN, J., CHIRIEAC, L.R., DUTT, A., FENNELL, T., HANNA, M., JOHNSON, B.E., ONOFRIO, R.C., THOMAS, R.K., TONON, G., WEIR, B.A., ZHAO, X., ZIAUGRA, L., ZODY, M.C., GIORDANO, T., ORRINGER, M.B., ROTH, J.A., SPITZ, M.R., WISTUBA, I.I., OZENBERGER, B., GOOD, P.J.,

CHANG, A.C., BEER, D.G., WATSON, M.A., LADANYI, M., BRODERICK, S., YOSHIZAWA, A., TRAVIS, W.D., PAO, W., PROVINCE, M.A., WEINSTOCK, G.M., VARMUS, H.E., GABRIEL, S.B., LANDER, E.S., GIBBS, R.A., MEYERSON, M. and WILSON, R.K., 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma.

DONATO, L.J. and NOY, N., 2005. Suppression of Mammary Carcinoma Growth by Retinoic Acid: Proapoptotic Genes Are Targets for Retinoic Acid Receptor and Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II Signaling. *Cancer Research*, **65**(18), pp. 8193-8199.

DONATO, L.J., SUH, J.H. and NOY, N., 2007. Suppression of Mammary Carcinoma Cell Growth by Retinoic Acid: the Cell Cycle Control Gene Btg2 Is a Direct Target for Retinoic Acid Receptor Signaling. *Cancer Research*, **67**(2), pp. 609-615.

DONG, C., WU, Y., WANG, Y., WANG, C., KANG, T., RYCHAHOU, P.G., CHI, Y., EVERS, B.M. and ZHOU, B.P., 2013. Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene*, **32**(11), pp. 1351-1362.

DONG, C., WU, Y., YAO, J., WANG, Y., YU, Y., RYCHAHOU, P.G., EVERS, B.M. and ZHOU, B.P., 2012. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, **122**(4), pp. 1469-1486.

DUNHAM, I., KUNDAJE, A., ALDRED, S.F., COLLINS, P.J., DAVIS, C.A., DOYLE, F., EPSTEIN, C.B., FRIETZE, S., HARROW, J., KAUL, R., KHATUN, J., LAJOIE, B.R., LANDT, S.G., LEE, B., PAULI, F., ROSENBLOOM, K.R., SABO, P., SAFI, A., SANYAL, A., SHORESH, N., SIMON, J.M., SONG, L., TRINKLEIN, N.D., ALTSHULER, R.C., BIRNEY, E., BROWN, J.B., CHENG, C., DJEBALI, S., DONG, X., ERNST, J., FUREY, T.S., GERSTEIN, M., GIARDINE, B., GREVEN, M., HARDISON, R.C., HARRIS, R.S., HERRERO, J., HOFFMAN, M.M., IYER, S., KELLIS, M., KHERADPOUR, P., LASSMANN, T., LI, Q., LIN, X., MARINOV, G.K., MERKEL, A., MORTAZAVI, A., PARKER, S.C.J., REDDY, T.E., ROZOWSKY, J., SCHLESINGER, F., THURMAN, R.E., WANG, J., WARD, L.D., WHITFIELD, T.W., WILDER, S.P., WU, W., XI, H.S., YIP, K.Y., ZHUANG, J., BERNSTEIN, B.E., GREEN, E.D., GUNTER, C., SNYDER, M., PAZIN, M.J., LOWDON, R.F., DILLON, L.A.L., ADAMS, L.B., KELLY, C.J., ZHANG, J., WEXLER, J.R., GOOD, P.J., FEINGOLD, E.A., CRAWFORD, G.E., DEKKER, J., ELNITSKI, L., FARNHAM, P.J., GIDDINGS, M.C., GINGERAS, T.R., GUIGO, R., HUBBARD, T.J., KENT, W.J., LIEB, J.D., MARGULIES, E.H., MYERS, R.M., STAMATOYANNOPOULOS, J.A.,

TENENBAUM, S.A., WENG, Z., WHITE, K.P., WOLD, B., YU, Y., WROBEL, J., RISK, B.A., GUNAWARDENA, H.P., KUIPER, H.C., MAIER, C.W., XIE, L., CHEN, X., MIKKELSEN, T.S., GILLESPIE, S. and ..., 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, **489**(7414), pp. 57-74.

ENE, C.I., EDWARDS, L., RIDDICK, G., BAYSAN, M., WOOLARD, K., KOTLIAROVA, S., LAI, C., BELOVA, G., CAM, M., WALLING, J., ZHOU, M., STEVENSON, H., KIM, H.S., KILLIAN, K., VEENSTRA, T., BAILEY, R., SONG, H., ZHANG, W. and FINE, H.A., 2012. Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. *PloS one*, **7**(12), pp. e51407.

ENGELMAN, J.A., ZEJNULLAHU, K., GALE, C., LIFSHITS, E., GONZALES, A.J., SHIMAMURA, T., ZHAO, F., VINCENT, P.W., NAUMOV, G.N., BRADNER, J.E., ALTHAUS, I.W., GANDHI, L., SHAPIRO, G.I., NELSON, J.M., HEYMACH, J.V., MEYERSON, M., WONG, K. and JANNE, P.A., 2007. PF00299804, an Irreversible Pan-ERBB Inhibitor, Is Effective in Lung Cancer Models with EGFR and ERBB2 Mutations that Are Resistant to Gefitinib. *Cancer Research*, **67**(24), pp. 11924-11932.

ENGELMAN, J.A., ZEJNULLAHU, K., MITSUDOMI, T., SONG, Y., HYLAND, C., PARK, J.O., LINDEMAN, N., GALE, C., ZHAO, X., CHRISTENSEN, J., KOSAKA, T., HOLMES, A.J., ROGERS, A.M., CAPPUZZO, F., MOK, T., LEE, C., JOHNSON, B.E., CANTLEY, L.C. and JANNE, P.A., 2007. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science*, **316**(5827), pp. 1039-1043.

ESTELLER MANEL, 2008. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, **358**(11), pp. 1148-1159.

ESTELLER, M., 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, **8**(4), pp. 286-298.

ESTELLER, M. and ALMOUZNI, G., 2005. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. *EMBO reports*, **6**(7), pp. 624.

ESTELLER, M., CORN, P.G., BAYLIN, S.B. and HERMAN, J.G., 2001. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Research*, **61**(8), pp. 3225.

EVAN, G. and LITTLEWOOD, T., 1998. A Matter of Life and Cell Death. *Science*, **281**(5381), pp. 1317-1322.

FARHAT, F., GHOSN, M. and KATTAN, J., 2015. Oral vinorelbine plus cisplatin followed by maintenance oral vinorelbine as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **76**(2), pp. 235-242.

FARMER, P., BONNEFOI, H., ANDERLE, P., CAMERON, D., WIRAPATI, P., BECETTE, V., ANDRE, S., PICCART, M., CAMPONE, M., BRAIN, E., MACGROGAN, G., PETIT, T., JASSEM, J., BIBEAU, F., BLOT, E., BOGAERTS, J., AGUET, M., BERGH, J., IGGO, R. and DELORENZI, M., 2009. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature Medicine*, **15**(2), pp. 68-74.

FEDERICO ANDREOLI, ARMENIO JORGE MOURA BARBOSA, MARCO DANIELE PARENTI and ALBERTO DEL RIO, 2013. Modulation of Epigenetic Targets for Anticancer Therapy: Clinicopathological Relevance, Structural Data and Drug Discovery Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, **19**(4), pp. 578-613.

FEHRENBACHER, L., Dr, SPIRA, A., MD, BALLINGER, M., PhD, KOWANETZ, M., PhD, VANSTEENKISTE, J., Prof, MAZIERES, J., Prof, PARK, K., Prof, SMITH, D., MD, ARTAL-CORTES, A., MD, LEWANSKI, C., MD, BRAITEH, F., MD, WATERKAMP, D., MD, HE, P., PhD, ZOU, W., PhD, CHEN, D.S., MD, YI, J., PhD, SANDLER, A., MD and RITTMAYER, A., MD, 2016. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet, The*, **387**(10030), pp. 1837-1846.

FEINBERG, A.P. and VOGELSTEIN, B., 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**(5895), pp. 89-92.

FENG, X., ZHANG, M., WANG, B., ZHOU, C., MU, Y., LI, J., LIU, X., WANG, Y., SONG, Z. and LIU, P., 2019. CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **38**(1), pp. 361.

FERNANDEZ-CUESTA, L., PEIFER, M., LU, X., SUN, R., OZRETIĆ, L., SEIDAL, D., ZANDER, T., LEENDERS, F., GEORGE, J., MÜLLER, C., DAHMEN, I., PINTHER, B., BOSCO, G., KONRAD, K., ALTMÜLLER, J., NÜRNBERG, P., ACHTER, V., LANG, U., SCHNEIDER, P.M., BOGUS, M., SOLTERMANN, A., BRUSTUGUN, O.T., HELLAND, Å, SOLBERG, S., LUND-IVERSEN, M., ANSÉN, S., STOELBEN, E., WRIGHT, G.M., RUSSELL, P., WAINER, Z., SOLOMON, B., FIELD, J.K., HYDE, R., DAVIES, M.P., HEUKAMP, L.C., PETERSEN, I., PERNER, S., LOVLY, C.,

CAPPUZZO, F., TRAVIS, W.D., WOLF, J., VINGRON, M., BRAMBILLA, E., HAAS, S.A., BUETTNER, R. and THOMAS, R.K., 2014. Frequent mutations in chromatin-remodelling genes in pulmonary carcinoids. *Nature communications*, **5**(1), pp. 3518.

FERRARA, N., 2009. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **29**(6), pp. 789-791.

FERRARI-AMOROTTI, G., FRAGLIASSO, V., ESTEKI, R., PRUDENTE, Z., SOLIERA, A.R., CATTELANI, S., MANZOTTI, G., GRISENDI, G., DOMINICI, M., PIERACCIOLI, M., RASCHELLÀ, G., CHIODONI, C., COLOMBO, M.P. and CALABRETTA, B., 2013. Inhibiting Interactions of Lysine Demethylase LSD1 with Snail/Slug Blocks Cancer Cell Invasion. *Cancer research*, **73**(1), pp. 235-245.

FIDLER, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, **3**(6), pp. 453-458.

FIGUEROA, M.E., LUGTHART, S., LI, Y., ERPELINCK-VERSCHUEREN, C., DENG, X., CHRISTOS, P.J., SCHIFANO, E., BOOTH, J., VAN PUTTEN, W., SKRABANEK, L., CAMPAGNE, F., MAZUMDAR, M., GREALLY, J.M., VALK, P.J.M., LÖWENBERG, B., DELWEL, R. and MELNICK, A., 2010. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, **17**(1), pp. 13-27.

FILLMORE, C.M., XU, C., DESAI, P.T., BERRY, J.M., ROWBOTHAM, S.P., LIN, Y., ZHANG, H., MARQUEZ, V.E., HAMMERMAN, P.S., WONG, K. and KIM, C.F., 2015. EZH2 inhibition sensitizes BRG1 and EGFR mutant lung tumours to TopoII inhibitors. *Nature*, **520**(7546), pp. 239-242.

FISCHER, K.R., DURRANS, A., LEE, S., SHENG, J., LI, F., WONG, S.T.C., CHOI, H., EL RAYES, T., RYU, S., TROEGER, J., SCHWABE, R.F., VAHDAT, L.T., ALTORKI, N.K., MITTAL, V. and GAO, D., 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, **527**(7579), pp. 472-476.

FLAM, E.L., DANILOVA, L., KELLEY, D.Z., STAVROVSKAYA, E., GUO, T., CONSIDINE, M., QIAN, J., CALIFANO, J.A., FAVOROV, A., FERTIG, E.J. and GAYKALOVA, D.A., 2019. Differentially Methylated Super-Enhancers Regulate Target Gene Expression in Human Cancer. *Scientific reports*, **9**(1), pp. 15034-11.

FLAVAHAN, W.A., GASKELL, E. and BERNSTEIN, B.E., 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, **357**(6348), pp. 2380.

FORDE, P.M., SMITH, K.N., CHAFT, J.E., HELLMANN, M., MERGHOUB, T., WOLCHOK, J.D., YANG, S.C., BATTAFARANO, R.J., GABRIELSON, E., GEORGIADES, C.S., VERDE, F., ROSNER, G.L., NAIDOO, J., COTTRELL, T.R., TAUBE, J.M., ANAGNOSTOU, V., VELCULESCU, V.E., TOPALIAN, S.L., PARDOLL, D.M. and BRAHMER, J.R., 2016. Neoadjuvant anti-PD1, nivolumab, in early stage resectable non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, **27**(suppl_6),.

FORDE, P.M., BRAHMER, J.R. and KELLY, R.J., 2014. New Strategies in Lung Cancer: Epigenetic Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **20**(9), pp. 2244-2248.

FRAGA, M.F., HERRANZ, M., ESPADA, J., BALLESTAR, E., PAZ, M.F., ROPERO, S., ERKEK, E., BOZDOGAN, O., PEINADO, H., NIVELEAU, A., MAO, J., BALMAIN, A., CANO, A. and ESTELLER, M., 2004. A Mouse Skin Multistage Carcinogenesis Model Reflects the Aberrant DNA Methylation Patterns of Human Tumors. *Cancer Research*, **64**(16), pp. 5527-5534.

FRANKEL, A.E., LIU, X. and MINNA, J.D., 2016. Developing EZH2-Targeted Therapy for Lung Cancer. *Cancer discovery*, **6**(9), pp. 949-952.

FRED R. HIRSCH, MARILEILA VARELLA-GARCIA, RAFAL DZIADZIUSZKO, YUN XIAO, SUJATHA GAJAPATHY, MARGARET SKOKAN, MING LIN, VINCENT O'NEILL and PAUL A. BUNN, J., 2008. Fluorescence In situ Hybridization Subgroup Analysis of TRIBUTE, a Phase III Trial of Erlotinib Plus Carboplatin and Paclitaxel in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **14**(19), pp. 6317-6323.

FU, J., QIN, L., HE, T., QIN, J., HONG, J., WONG, J., LIAO, L. and XU, J., 2011. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Research*, **21**(2), pp. 275-289.

FUKAGAWA, A., ISHII, H., MIYAZAWA, K. and SAITOH, M., 2015. δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Medicine*, **4**(1), pp. 125-135.

FUTREAL, P.A., COIN, L., MARSHALL, M., DOWN, T., HUBBARD, T., WOOSTER, R., RAHMAN, N. and STRATTON, M.R., 2004. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer*, **4**(3), pp. 177-183.

GABBERT, H., WAGNER, R., MOLL, R. and GERHARZ, C.D., 1985. Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clinical & experimental metastasis*, **3**(4), pp. 257-279.

- GABHANN, F.M. and POPEL, A.S., 2008. Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirculation*, **15**(8), pp. 715-738.
- GARON, E.B., RIZVI, N.A., HUI, R., LEIGHL, N., BALMANOUKIAN, A.S., EDER, J.P., PATNAIK, A., AGGARWAL, C., GUBENS, M., HORN, L., CARCERENY, E., AHN, M., FELIP, E., LEE, J., HELLMANN, M.D., HAMID, O., GOLDMAN, J.W., SORIA, J., DOLLED-FILHART, M., RUTLEDGE, R.Z., ZHANG, J., LUNCEFORD, J.K., RANGWALA, R., LUBINIECKI, G.M., ROACH, C., EMANCIPATOR, K. and GANDHI, L., 2015. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **372**(21), pp. 2018-2028.
- GARRAWAY, L. and LANDER, E., 2013. Lessons from the Cancer Genome. *Cell*, **153**(1), pp. 17-37.
- GEBERT, J.F., MOGHAL, N., FRANGIONI, J.V., SUGARBAKER, D.J. and NEEL, B.G., 1991. High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*, **6**(10), pp. 1859.
- GELSOMINO, F., FACCHINETTI, F., HASPINGER, E.R., GARASSINO, M.C., TRUSOLINO, L., DE BRAUD, F. and TISEO, M., 2013. Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, **89**(2), pp. 284-299.
- GEOFFREY R. OXNARD, ADAM BINDER and PASI A. JÄNNE, 2013. New Targetable Oncogenes in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **31**(8), pp. 1097-1104.
- GERADTS, J., CHEN, J.Y., RUSSELL, E.K., YANKASKAS, J.R., NIEVES, L. and MINNA, J.D., 1993. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, **4**(10), pp. 799.
- GETTINGER, S., RIZVI, N.A., CHOW, L.Q., BORGHAEI, H., BRAHMER, J., READY, N., GERBER, D.E., SHEPHERD, F.A., ANTONIA, S., GOLDMAN, J.W., JUERGENS, R.A., LAURIE, S.A., NATHAN, F.E., SHEN, Y., HARBISON, C.T. and HELLMANN, M.D., 2016. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **34**(25), pp. 2980-2987.
- GHANDI, M., HUANG, F.W., JANÉ-VALBUENA, J., KRYUKOV, G.V., LO, C.C., MCDONALD, 3., E Robert, BARRETINA, J., GELFAND, E.T., BIELSKI, C.M., LI, H., HU, K., ANDREEV-DRAKHLIN, A.Y., KIM, J., HESS, J.M., HAAS, B.J., AGUET, F., WEIR, B.A., ROTHBERG, M.V.,

PAOLELLA, B.R., LAWRENCE, M.S., AKBANI, R., LU, Y., TIV, H.L., GOKHALE, P.C., DE WECK, A., MANSOUR, A.A., OH, C., SHIH, J., HADI, K., ROSEN, Y., BISTLINE, J., VENKATESAN, K., REDDY, A., SONKIN, D., LIU, M., LEHAR, J., KORN, J.M., PORTER, D.A., JONES, M.D., GOLJI, J., CAPONIGRO, G., TAYLOR, J.E., DUNNING, C.M., CREECH, A.L., WARREN, A.C., MCFARLAND, J.M., ZAMANIGHOMI, M., KAUFFMANN, A., STRANSKY, N., IMIELINSKI, M., MARUVKA, Y.E., CHERNIACK, A.D., TSHERNIAK, A., VAZQUEZ, F., JAFFE, J.D., LANE, A.A., WEINSTOCK, D.M., JOHANNESSEN, C.M., MORRISSEY, M.P., STEGMEIER, F., SCHLEGEL, R., HAHN, W.C., GETZ, G., MILLS, G.B., BOEHM, J.S., GOLUB, T.R., GARRAWAY, L.A. and SELLERS, W.R., 2019. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*, **569**(7757), pp. 503-508.

GILLESPIE, R.F. and GUDAS, L.J., 2007. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *Journal of molecular biology*, **372**(2), pp. 298.

GLAROS, S., CIRRINCIONE, G.M., PALANCA, A., METZGER, D. and REISMAN, D., 2008. Targeted Knockout of BRG1 Potentiates Lung Cancer Development. *Cancer Research*, **68**(10), pp. 3689-3696.

GOLDSTRAW, P., CHANSKY, K., CROWLEY, J., RAMI-PORTA, R., RAMI-PORTA, R., ASAMURA, H., EBERHARDT, W.E.E., NICHOLSON, A.G., GROOME, P., MITCHELL, A., BOLEJACK, V., BALL, D., BALL, D., BEER, D.G., BEYRUTI, R., DETTERBECK, F., ERICH EBERHARDT, W.E., EDWARDS, J., GALATEAU-SALLÉ, F., GIROUX, D., GLEESON, F., HUANG, J., KENNEDY, C., KENNEDY, C., KIM, J., KIM, Y.T., KINGSBURY, L., KONDO, H., KONDO, K., KRASNIK, M., KUBOTA, K., LERUT, A., LYONS, G., LYONS, G., MARINO, M., MAROM, E.M., VAN MEERBEECK, J., NAKANO, T., NOWAK, A., PEAKE, M., RICE, D., RICE, T., ROSENZWEIG, K., RUFFINI, E., RUFFINI, E., RUSCH, V., RUSCH, V., SAIJO, N., VAN SCHIL, P., VAN SCHIL, P., SCULIER, J., SHEMANSKI, L., STRATTON, K., SUZUKI, K., TACHIMORI, Y., THOMAS, C.F., THOMAS, C., TRAVIS, W., TSAO, M.S., TURRISI, A., VANSTEENKISTE, J., WATANABE, H., WU, Y., WU, Y.L., BAAS, P., ERASMUS, J., HASEGAWA, S., INAI, K., KERNSTINE, K., KINDLER, H., KRUG, L., NACKAERTS, K., PASS, H., PASS, H., FALKSON, C., FILOSSO, P.L., GIACCONE, G., LUCCHI, M., OKUMURA, M., BLACKSTONE, E., ABAD CAVACO, F., ANSÓTEGUI BARRERA, E., ABAL ARCA, J., PARENTE LAMELAS, I., ARNAU OBRER, A., GUIJARRO JORGE, R., BASCOM, G.K., BLANCO OROZCO, A.I., GONZÁLEZ CASTRO, M.A., BLUM, M.G.,

CHIMONDEGUY, D., CVIJANOVIC, V., DEFRANCHI, S., DE OLAIZ NAVARRO, B., ESCOBAR CAMPUZANO, I., MACÍA VIDUEIRA, I., FERNÁNDEZ ARAUJO, E., ANDREO GARCÍA, F., FONG, K.M., FRANCISCO CORRAL, G. and ..., 2016. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, **11**(1), pp. 39-51.

GOOSSENS, S., PEIRS, S., VAN LOOCKE, W., WANG, J., TAKAWY, M., MATTHIJSSSENS, F., SONDEREGGER, S.E., HAIGH, K., NGUYEN, T., VANDAMME, N., COSTA, M., CARMICHAEL, C., VAN NIEUWERBURGH, F., DEFORCE, D., KLEIFELD, O., CURTIS, D.J., BERX, G., VAN VLIERBERGHE, P. and HAIGH, J.J., 2017. Oncogenic ZEB2 activation drives sensitivity toward KDM1A inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **129**(8), pp. 981-990.

GRAVDAL, K., HALVORSEN, O.J., HAUKAAS, S.A. and AKSLEN, L.A., 2007. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, **13**(23), pp. 7003-7011.

GREAVES, M., 2015. Evolutionary Determinants of Cancer. *Cancer discovery*, **5**(8), pp. 806-820.

GREENBLATT, M.S., BENNETT, W.P., HOLLSTEIN, M. and HARRIS, C.C., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research*, **54**(18), pp. 4855.

GREGORY P. KALEMKERIAN, NAVNEET NARULA, ERIN B. KENNEDY, WILLIAM A. BIERMANN, JESSICA DONINGTON, NATASHA B. LEIGHL, MADELYN LEW, JAMES PANTELAS, SURESH S. RAMALINGAM, MARTIN RECK, ANJALI SAQI, MICHAEL SIMOFF, NAVNEET SINGH and BASKARAN SUNDARAM, 2018. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, **36**(9), pp. 911-919.

GREGORY, P.A., BERT, A.G., PATERSON, E.L., BARRY, S.C., TSYKIN, A., FARSHID, G., VADAS, M.A., KHEW-GOODALL, Y. and GOODALL,

G.J., 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, **10**(5), pp. 593-601.

GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F.R. and KARIN, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, **140**(6), pp. 883-899.

GROSSE-WILDE, A., FOUQUIER D'HÉROUËL, A., MCINTOSH, E., ERTAYLAN, G., SKUPIN, A., KUESTNER, R.E., DEL SOL, A., WALTERS, K. and HUANG, S., 2015. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. *PLOS ONE*, **10**(5), pp. e0126522.

GUDAS, L.J., 2013. Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **24**(10-12), pp. 701-705.

GUNTHER ZIMMERMANN, BJÖRN PAPKE, SHEHAB ISMAIL, NACHIKET VARTAK, ANCHAL CHANDRA, MAIKE HOFFMANN, STEPHAN A. HAHN, GEMMA TRIOLA, ALFRED WITTINGHOFER, PHILIPPE I. H. BASTIAENS and HERBERT WALDMANN, 2013. *Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling.*

GUPTA, G.P. and MASSAGUÉ, J., 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, **127**(4), pp. 679-695.

HALL, R.D., GADGEEL, S.M., GARON, E.B., BRIA, E., RECK, M., VIDA, J., ZHOU, H., RAFTOPOULOS, H. and GANDHI, L., 2016. Phase 3 study of platinum-based chemotherapy with or without pembrolizumab for first-line metastatic, nonsquamous non-small cell lung carcinoma (NSCLC): KEYNOTE-189. *Journal of Clinical Oncology*, **34**(15_suppl), pp. TPS9104.

HAN, G., LU, S., LI, A.G., HE, W., CORLESS, C.L., KULESZ-MARTIN, M. and WANG, X., 2005. *Distinct mechanisms of TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis.* American Society for Clinical Investigation.

HANAHAH, D. and FOLKMAN, J., 1996. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, **86**(3), pp. 353-364.

HANAHAH, D. and WEINBERG, R., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**(5), pp. 646-674.

HARDY, K., BOOTH, B., HENDRIX, M., SALOMON, D. and STRIZZI, L., 2010. ErbB/EGF Signaling and EMT in Mammary Development and Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **15**(2), pp. 191-199.

HASCHER, A., HAASE, A., HEBESTREIT, K., ROHDE, C., KLEIN, H., RIUS, M., JUNGEN, D., WITTEN, A., STOLL, M., SCHULZE, I., OGAWA, S., WIEWRODT, R., TICKENBROCK, L., BERDEL, W.E., DUGAS, M., THOENNISSSEN, N.H. and MÜLLER-TIDOW, C., 2014. DNA Methyltransferase Inhibition Reverses Epigenetically Embedded Phenotypes in Lung Cancer Preferentially Affecting Polycomb Target Genes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **20**(4), pp. 814-826.

HASHIDA, S., YAMAMOTO, H., SHIEN, K., MIYOSHI, Y., OHTSUKA, T., SUZAWA, K., WATANABE, M., MAKI, Y., SOH, J., ASANO, H., TSUKUDA, K., MIYOSHI, S. and TOYOOKA, S., 2015. Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Science*, **106**(10), pp. 1377-1384.

HATA, A.N., NIEDERST, M.J., ARCHIBALD, H.L., GOMEZ-CARABALLO, M., SIDDIQUI, F.M., MULVEY, H.E., MARUVKA, Y.E., JI, F., BHANG, H.C., KRISHNAMURTHY RADHAKRISHNA, V., SIRAVEGNA, G., HU, H., RAOOF, S., LOCKERMAN, E., KALSY, A., LEE, D., KEATING, C.L., RUDDY, D.A., DAMON, L.J., CRYSTAL, A.S., COSTA, C., PIOTROWSKA, Z., BARDELLI, A., IAFRATE, A.J., SADREYEV, R.I., STEGMEIER, F., GETZ, G., SEQUIST, L.V., FABER, A.C. and ENGELMAN, J.A., 2016. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature medicine*, **22**(3), pp. 262-269.

HAY, E.D., 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*, **154**(1), pp. 8.

HECHT, S.S., 2012. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, **131**(12), pp. 2724-2732.

HECHT, S.S., 2003. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*, **3**(10), pp. 733-744.

HERMAN, J.G. and BAYLIN, S.B., 2003. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, **349**(21), pp. 2042-2054.

HERR, H.W., 2011. PERCIVALL POTT, THE ENVIRONMENT AND CANCER. *BJU International*, **108**(4), pp. 479-481.

HEYN, H. and ESTELLER, M., 2012. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature reviews. Genetics*, **13**(10), pp. 679-692.

- HEYN, H., MÉNDEZ-GONZÁLEZ, J. and ESTELLER, M., 2013. Epigenetic profiling joins personalized cancer medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **13**(5), pp. 473-479.
- HIRSCH, F.R. and LANGER, C.J., 2004. The role of HER2/ neu expression and trastuzumab in non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology*, **31**(1 Suppl 1), pp. 75-82.
- HOFFMANN, B., LEHMANN, J.M., ZHANG, X.K., HERMANN, T., HUSMANN, M., GRAUPNER, G. and PFAHL, M., 1990. A Retinoic Acid Receptor-Specific Element Controls the Retinoic Acid Receptor- β Promoter. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **4**(11), pp. 1727-1736.
- HOLM, T.M., JACKSON-GRUSBY, L., BRAMBRINK, T., YAMADA, Y., RIDEOUT, W.M. and JAENISCH, R., 2005. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell*, **8**(4), pp. 275-285.
- HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D.B. and JOHNSTON, P.G., 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer*, **13**(10), pp. 714-726.
- HONG, T., WATANABE, K., TA, C.H., VILLARREAL-PONCE, A., NIE, Q. and DAI, X., 2015. An *Ovol2-Zeb1* Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-step Transition between Epithelial and Mesenchymal States. *PLoS computational biology*, **11**(11), pp. e1004569.
- HUANG, R.Y., GUILFORD, P. and THIERY, J.P., 2012. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of cell science*, **125**(Pt 19), pp. 4417-4422.
- HUANG, X., YAN, J., ZHANG, M., WANG, Y., CHEN, Y., FU, X., WEI, R., ZHENG, X., LIU, Z., ZHANG, X., YANG, H., HAO, B., SHEN, Y., SU, Y., CONG, X., HUANG, M., TAN, M., DING, J. and GENG, M., 2018. Targeting Epigenetic Crosstalk as a Therapeutic Strategy for EZH2-Aberrant Solid Tumors. *Cell*, **175**(1), pp. 186-199.e19.
- HUGO, H.J., KOKKINOS, M.I., BLICK, T., ACKLAND, M.L., THOMPSON, E.W. and NEWGREEN, D.F., 2011. Defining the E-Cadherin Repressor Interactome in Epithelial-Mesenchymal Transition: The PMC42 Model as a Case Study. *Cells Tissues Organs*, **193**(1-2), pp. 23-40.
- HYUN, K., KOO, G., HAN, H., SOHN, J., CHOI, W., KIM, S., JUNG, H. and KIM, Y., 2016. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget*, **7**(17), pp. 24677-24687.

IBANEZ DE CACERES, I., CORTES-SEMPERE, M., MORATILLA, C., MACHADO-PINILLA, R., RODRIGUEZ-FANJUL, V., MANGUÁN-GARCÍA, C., CEJAS, P., LÓPEZ-RÍOS, F., PAZ-ARES, L., DE CASTROCARPEÑO, J., NISTAL, M., BELDA-INIESTA, C. and PERONA, R., 2010. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, **29**(11), pp. 1681-1690.

IMIELINSKI, M., BERGER, A., HAMMERMAN, P., HERNANDEZ, B., PUGH, T., HODIS, E., CHO, J., SUH, J., CAPELLETTI, M., SIVACHENKO, A., SOUGNEZ, C., AUCLAIR, D., LAWRENCE, M., STOJANOV, P., CIBULSKIS, K., CHOI, K., DE WAAL, L., SHARIFNIA, T., BROOKS, A., GREULICH, H., BANERJI, S., ZANDER, T., SEIDEL, D., LEENDERS, F., ANSÉN, S., LUDWIG, C., ENGEL-RIEDEL, W., STOELBEN, E., WOLF, J., GOPARJU, C., THOMPSON, K., WINCKLER, W., KWIATKOWSKI, D., JOHNSON, B., JÄNNE, P., MILLER, V., PAO, W., TRAVIS, W., PASS, H., GABRIEL, S., LANDER, E., THOMAS, R., GARRAWAY, L., GETZ, G. and MEYERSON, M., 2012. Mapping the Hallmarks of Lung Adenocarcinoma with Massively Parallel Sequencing. *Cell*, **150**(6), pp. 1107-1120.

IRIZARRY, R.A., LADD-ACOSTA, C., WEN, B., WU, Z., MONTANO, C., ONYANGO, P., CUI, H., GABO, K., RONGIONE, M., WEBSTER, M., JI, H., POTASH, J., SABUNCIYAN, S. and FEINBERG, A.P., 2009. Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, **41**(2), pp. 178-186.

JACKSON, S.P. and BARTEK, J., 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**(7267), pp. 1071-1078.

JAMAL-HANJANI, M., WILSON, G.A., MCGRANAHAN, N., BIRKBAK, N.J., WATKINS, T.B.K., VEERIAH, S., SHAFI, S., JOHNSON, D.H., MITTER, R., ROSENTHAL, R., SALM, M., HORSWELL, S., ESCUDERO, M., MATTHEWS, N., ROWAN, A., CHAMBERS, T., MOORE, D.A., TURAJLIC, S., XU, H., LEE, S., FORSTER, M.D., AHMAD, T., HILEY, C.T., ABBOSH, C., FALZON, M., BORG, E., MARAFIOTI, T., LAWRENCE, D., HAYWARD, M., KOLVEKAR, S., PANAGIOTOPOULOS, N., JANES, S.M., THAKRAR, R., AHMED, A., BLACKHALL, F., SUMMERS, Y., SHAH, R., JOSEPH, L., QUINN, A.M., CROSBIE, P.A., NAIDU, B., MIDDLETON, G., LANGMAN, G., TROTTER, S., NICOLSON, M., REMMEN, H., KERR, K., CHETTY, M., GOMERSALL, L., FENNELL, D.A., NAKAS, A., RATHINAM, S., ANAND, G., KHAN, S., RUSSELL, P., EZHIL, V., ISMAIL, B., IRVIN-SELLERS, M., PRAKASH, V., LESTER, J.F., KORNASZEWSKA, M., ATTANOOS, R., ADAMS, H., DAVIES, H., DENTRO, S., TANIÈRE, P.,

O’SULLIVAN, B., LOWE, H.L., HARTLEY, J.A., ILES, N., BELL, H., NGAI, Y., SHAW, J.A., HERRERO, J., SZALLASI, Z., SCHWARZ, R.F., STEWART, A., QUEZADA, S.A., LE QUESNE, J., VAN LOO, P., DIVE, C., HACKSHAW, A. and SWANTON, C., 2017. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **376**(22), pp. 2109-2121.

JAMES BEAN, CAMERON BRENNAN, JIN-YUAN SHIH, GREGORY RIELY, AGNES VIALE, LU WANG, DHANANJAY CHITALE, NORIKO MOTOI, JANOS SZOKE, STEPHEN BRODERICK, MARISSA BALAK, WEN-CHENG CHANG, CHONG-JEN YU, ADI GAZDAR, HARVEY PASS, VALERIE RUSCH, WILLIAM GERALD, SHIU-FENG HUANG, PAN-CHYR YANG, VINCENT MILLER, MARC LADANYI, CHIH-HSIN YANG and WILLIAM PAO, 2007. MET Amplification Occurs with or without T790M Mutations in EGFR Mutant Lung Tumors with Acquired Resistance to Gefitinib or Erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(52), pp. 20932-20937.

JAMES G. HERMAN, FARIDA LATIF, YONGKAI WENG, MICHAEL I. LERMAN, BERTON ZBAR, SUE LIU, DVORIT SAMID, DAH-SHUHN R. DUAN, JAMES R. GNARRA, W. MARSTON LINEHAN and STEPHEN B. BAYLIN, 1994. Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(21), pp. 9700-9704.

JENUWEIN, T. and ALLIS, C.D., 2001. Translating the Histone Code. *Science*, **293**(5532), pp. 1074-1080.

JIA, Y., YUN, C., PARK, E., ERCAN, D., MANUIA, M., JUAREZ, J., XU, C., RHEE, K., CHEN, T., ZHANG, H., PALAKURTHI, S., JANG, J., LELAIS, G., DIDONATO, M., BURSULAYA, B., MICHELLYS, P., EPPLE, R., MARSILJE, T.H., MCNEILL, M., LU, W., HARRIS, J., BENDER, S., WONG, K., JÄNNE, P.A. and ECK, M.J., 2016. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature*, **534**(7605), pp. 129-132.

JOHN D MINNA, JACK A ROTH and ADI F GAZDAR, 2002. Focus on lung cancer. *Cancer cell*, **1**(1), pp. 49-52.

JONES, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews. Genetics*, **13**(7), pp. 484-492.

JONES, P.A. and BAYLIN, S.B., 2007. The Epigenomics of Cancer. *Cell*, **128**(4), pp. 683-692.

JONSSON, V.D., BLAKELY, C.M., LIN, L., ASTHANA, S., MATNI, N., OLIVAS, V., PAZARENTZOS, E., GUBENS, M.A., BASTIAN, B.C., TAYLOR, B.S., DOYLE, J.C. and BIVONA, T.G., 2017. Novel computational method for predicting polytherapy switching strategies to overcome tumor heterogeneity and evolution. *Scientific reports*, **7**(1), pp. 44206.

JORDAN, N.V., JOHNSON, G.L. and ABELL, A.N., 2011. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle*, **10**(17), pp. 2865-2873.

JORISSEN, R.N., WALKER, F., POULIOT, N., GARRETT, T.P.J., WARD, C.W. and BURGESS, A.W., 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, **284**(1), pp. 31-53.

JOSEPH H. TAUBE, JASON I. HERSCHKOWITZ, KAKAJAN KOMUROV, ALICIA Y. ZHOU, SUPRIYA GUPTA, JING YANG, KIMBERLY HARTWELL, TAMER T. ONDER, PIYUSH B. GUPTA, KURT W. EVANS, BRETT G. HOLLIER, PRAHLAD T. RAM, ERIC S. LANDER, JEFFREY M. ROSEN, ROBERT A. WEINBERG and SENDURAI A. MANI, 2010. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(35), pp. 15449-15454.

JUERGENS, R.A., WRANGLE, J., VENDETTI, F.P., MURPHY, S.C., ZHAO, M., COLEMAN, B., SEBREE, R., RODGERS, K., HOOKER, C.M., FRANCO, N., LEE, B., TSAI, S., DELGADO, I.E., RUDEK, M.A., BELINSKY, S.A., HERMAN, J.G., BAYLIN, S.B., BROCK, M.V. and RUDIN, C.M., 2011. Combination Epigenetic Therapy Has Efficacy in Patients with Refractory Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer discovery*, **1**(7), pp. 598-607.

JULIEN D.F. LICCHESI, WILLIAM H. WESTRA, CRAIG M. HOOKER and JAMES G. HERMAN, 2008. Promoter Hypermethylation of Hallmark Cancer Genes in Atypical Adenomatous Hyperplasia of the Lung. *Clinical Cancer Research*, **14**(9), pp. 2570-2578.

JUSSI P. KOIVUNEN, CRAIG MERMEL, KRESHNIK ZEJNULLAHU, CARLY MURPHY, EUGENE LIFSHITS, ALISON J. HOLMES, HWAN GEUN CHOI, JHINGOOK KIM, DEREK CHIANG, ROMAN THOMAS, JINSEON LEE, WILLIAM G. RICHARDS, DAVID J. SUGARBAKER, CHRISTOPHER DUCKO, NEAL LINDEMAN, J. PAUL MARCOUX, JEFFREY A. ENGELMAN, NATHANAEL S. GRAY, CHARLES LEE, MATTHEW MEYERSON and PASI A. JÄNNE, 2008. EML4-ALK Fusion

Gene and Efficacy of an ALK Kinase Inhibitor in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, **14**(13), pp. 4275-4283.

KAIMORI, A., POTTER, J., KAIMORI, J., WANG, C., MEZEY, E. and KOTEISH, A., 2007. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *The Journal of biological chemistry*, **282**(30), pp. 22089.

KANDOTH, C., MCLELLAN, M.D., VANDIN, F., YE, K., NIU, B., LU, C., XIE, M., ZHANG, Q., MCMICHAEL, J.F., WYCZALKOWSKI, M.A., LEISERSON, M.D.M., MILLER, C.A., WELCH, J.S., WALTER, M.J., WENDL, M.C., LEY, T.J., WILSON, R.K., RAPHAEL, B.J. and DING, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, **502**(7471), pp. 333-339.

KARKI, R. and KANNEGANTI, T., 2019. Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nature reviews. Cancer*, **19**(4), pp. 197-214.

KARNOUB, A.E. and WEINBERG, R.A., 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**(7), pp. 517-531.

KARNOUB, A.E. and WEINBERG, R.A., 2006. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast disease*, **26**, pp. 75.

KARPF, A.R. and MATSUI, S., 2005. Genetic Disruption of Cytosine DNA Methyltransferase Enzymes Induces Chromosomal Instability in Human Cancer Cells. *Cancer Research*, **65**(19), pp. 8635-8639.

KASHYAP, V., GUDAS, L.J., BRENET, F., FUNK, P., VIALE, A. and SCANDURA, J.M., 2011. Epigenomic Reorganization of the Clustered Hox Genes in Embryonic Stem Cells Induced by Retinoic Acid. *The Journal of biological chemistry*, **286**(5), pp. 3250-3260.

KAWANO, O., SASAKI, H., ENDO, K., SUZUKI, E., HANEDA, H., YUKIUE, H., KOBAYASHI, Y., YANO, M. and FUJII, Y., 2006. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*, **54**(2), pp. 209-215.

KEATING, S., PLUTZKY, J. and EL-OSTA, A., 2016. Epigenetic Changes in Diabetes and Cardiovascular Risk. *Circulation Research*, **118**(11), pp. 1706-1722.

KERR, K.M., BUBENDORF, L., EDELMAN, M.J., MARCHETTI, A., MOK, T., NOVELLO, S., O'BYRNE, K., STAHEL, R., PETERS, S., FELIP, E.,

BESSE, B., VANSTEENKISTE, J., EBERHARDT, W., BAAS, P., RECK, M., SYRIGOS, K., PAZ-ARES, L., SMIT, E.F., MELDGAARD, P., ADJEI, A., NICOLSON, M., CRINÒ, L., SCHIL, P.V., SENAN, S., FAIVRE-FINN, C., ROCCO, G., VERONESI, G., DOUILLARD, J.Y., LIM, E., DOOMS, C., WEDER, W., DE RUYSSCHER, D., LE PECHOUX, C., DE LEYN, P. and WESTEEL, V., 2014. Second ESMO consensus conference on lung cancer: Pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, **25**(9), pp. 1681-1690.

KIBEM KIM, ANDREW D. SKORA, ZHAOBO LI, QIANG LIU, ADA J. TAM, RICHARD L. BLOSSER, LUIS A. DIAZ, NICKOLAS PAPAPOPOULOS, KENNETH W. KINZLER, BERT VOGELSTEIN and SHIBIN ZHOU, 2014. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(32), pp. 11774-11779.

KIM, H., KWON, Y.M., KIM, J.S., HAN, J., SHIM, Y.M., PARK, J. and KIM, D., 2006. Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, **107**(5), pp. 1042-1049.

KIM, N.H., KIM, H.S., LI, X., LEE, I., CHOI, H., KANG, S.E., CHA, S.Y., RYU, J.K., YOON, D., FEARON, E.R., ROWE, R.G., LEE, S., MAHER, C.A., WEISS, S.J. and YOOK, J.I., 2011. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial–mesenchymal transition. *The Journal of cell biology*, **195**(3), pp. 417-433.

KIM, R., EMI, M. and TANABE, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, **121**(1), pp. 1-14.

KIM, Y.H., DOHI, D.F., HAN, G.R., ZOU, C.P., ORIDATE, N., WALSH, G.L., NESBITT, J.C., XU, X.C., HONG, W.K. and LOTAN, R., 1995. Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. *Cancer research*, **55**(23), pp. 5603-378.

KIMURA, K., ORITA, T., LIU, Y., YANG, Y., TOKUDA, K., KURAKAZU, T., NODA, T., YANAI, R., MORISHIGE, N., TAKEDA, A., ISHIBASHI, T. and SONODA, K., 2015. Attenuation of EMT in RPE cells and subretinal fibrosis by an RAR- γ agonist. *Journal of Molecular Medicine*, **93**(7), pp. 749-758.

KITAREEWAN, S., PITHA-ROWE, I., SEKULA, D., LOWREY, C.H., NEMETH, M.J., GOLUB, T.R., FREEMANTLE, S.J. and DMITROVSKY, E.,

2002. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(6), pp. 3806.

KODAMA, T., HASEGAWA, M., TAKANASHI, K., SAKURAI, Y., KONDOH, O. and SAKAMOTO, H., 2014. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastases. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **74**(5), pp. 1023-1028.

KORT, A., SPARIDANS, R.W., WAGENAAR, E., BEIJNEN, J.H. and SCHINKEL, A.H., 2015. Brain accumulation of the EML4-ALK inhibitor ceritinib is restricted by P-glycoprotein (P-GP/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Pharmacological Research*, **102**, pp. 200-207.

KOUZARIDES, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, **128**(4), pp. 693-705.

KRISTIN BERGETHON, ALICE T. SHAW, SAI-HONG IGNATIUS OU, RYOHEI KATAYAMA, CHRISTINE M. LOVLY, NERINA T. MCDONALD, PIERRE P. MASSION, CHRISTINA SIWAK-TAPP, ADRIANA GONZALEZ, RONG FANG, EUGENE J. MARK, JULIE M. BATTEN, HAIQUAN CHEN, KEITH D. WILNER, EUNICE L. KWAK, JEFFREY W. CLARK, DAVID P. CARBONE, HONGBIN JI, JEFFREY A. ENGELMAN, MARI MINO-KENUDSON, WILLIAM PAO and A. JOHN IAFRATE, 2012. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, **30**(8), pp. 863-870.

KULESHOV, M.V., JONES, M.R., ROUILLARD, A.D., FERNANDEZ, N.F., DUAN, Q., WANG, Z., KOPLEV, S., JENKINS, S.L., JAGODNIK, K.M., LACHMANN, A., MCDERMOTT, M.G., MONTEIRO, C.D., GUNDERSEN, G.W. and MA'AYAN, A., 2016. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, **44**(W1), pp. W90-W97.

KURZROCK, R. and STEWART, D.J., 2017. Exploring the Benefit/Risk Associated with Antiangiogenic Agents for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **23**(5), pp. 1137-1148.

KUZMICHEV, A., NISHIOKA, K., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. and REINBERG, D., 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & development*, **16**(22), pp. 2893-2905.

LA MONICA, S., CRETELLA, D., BONELLI, M., FUMAROLA, C., CAVAZZONI, A., DIGIACOMO, G., FLAMMINI, L., BAROCELLI, E., MINARI, R., NALDI, N., PETRONINI, P.G., TISEO, M. and ALFIERI, R., 2017. Trastuzumab emtansine delays and overcomes resistance to the third-generation EGFR-TKI osimertinib in NSCLC EGFR mutated cell lines. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **36**(1),.

LA MONICA, S., MADEDDU, D., TISEO, M., VIVO, V., GALETTI, M., CRETELLA, D., BONELLI, M., FUMAROLA, C., CAVAZZONI, A., FALCO, A., GERVASI, A., LAGRASTA, C.A., NALDI, N., BAROCELLI, E., ARDIZZONI, A., QUAINI, F., PETRONINI, P.G. and ALFIERI, R., 2016. Combination of Gefitinib and Pemetrexed Prevents the Acquisition of TKI Resistance in NSCLC Cell Lines Carrying EGFR-Activating Mutation. *Journal of Thoracic Oncology*, **11**(7), pp. 1051-1063.

LAMOUILLE, S. and DERYNCK, R., 2010. Emergence of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt- Mammalian Target of Rapamycin Axis in Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells Tissues Organs*, **193**(1-2), pp. 8-22.

LAMOUILLE, S., XU, J. and DERYNCK, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15**(3), pp. 178-196.

LANE, D.P., 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**(6381), pp. 15-16.

LANTUÉJOUL, S., SALAMEIRE, D., SALON, C. and BRAMBILLA, E., 2009. Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology*, **54**(1), pp. 43-54.

LAUDET, V. and GRONEMEYER, H., 2002. *The Nuclear Receptor Facts-Book*. London: Academic Press: .

LAURSEN, K.B., MONGAN, N.P., ZHUANG, Y., NG, M.M., BENOIT, Y.D. and GUDAS, L.J., 2013. Polycomb recruitment attenuates retinoic acid–induced transcription of the bivalent NR2F1 gene. *Nucleic acids research*, **41**(13), pp. 6430-6443.

LAWRENCE, M.S., STOJANOV, P., MERMEL, C.H., ROBINSON, J.T., GARRAWAY, L.A., GOLUB, T.R., MEYERSON, M., GABRIEL, S.B., LANDER, E.S. and GETZ, G., 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, **505**(7484), pp. 495-501.

LE, X., PURI, S., NEGRAO, M.V., NILSSON, M.B., ROBICHAUX, J.P., BOYLE, T.A., HICKS, J.K., ROARTY, E., RINSURONGKAWONG, W.,

GLISSON, B.S., ZHANG, J., PAPADIMITRAKOPOULOU, V., GRAY, J.E. and HEYMACH, J., 2018. Landscape of EGFR-dependent and independent mechanisms of osimertinib resistance in EGFR-mutant NSCLC patients. *Journal of Clinical Oncology*, **36**(15_suppl), pp. 9087.

LEE, M.G., VILLA, R., TROJER, P., NORMAN, J., YAN, K., REINBERG, D., DI CROCE, L. and SHIEKHATTAR, R., 2007. Demethylation of H3K27 Regulates Polycomb Recruitment and H2A Ubiquitination. *Science*, **318**(5849), pp. 447-450.

LER, L.D., GHOSH, S., CHAI, X., THIKE, A.A., HENG, H.L., SIEW, E.Y., DEY, S., KOH, L.K., LIM, J.Q., LIM, W.K., MYINT, S.S., LOH, J.L., ONG, P., SAM, X.X., HUANG, D., LIM, T., TAN, P.H., NAGARAJAN, S., CHENG, C.W.S., HO, H., NG, L.G., YUEN, J., LIN, P., CHUANG, C., CHANG, Y., WENG, W., ROZEN, S.G., TAN, P., CREASY, C.L., PANG, S., MCCABE, M.T., POON, S.L. and TEH, B.T., 2017. Loss of tumor suppressor KDM6A amplifies PRC2-regulated transcriptional repression in bladder cancer and can be targeted through inhibition of EZH2. *Science translational medicine*, **9**(378), pp. eaai8312.

LI, D., AMBROGIO, L., SHIMAMURA, T., KUBO, S., TAKAHASHI, M., CHIRIEAC, L.R., PADERA, R.F., SHAPIRO, G.I., BAUM, A., HIMMELSBACH, F., RETTIG, W.J., MEYERSON, M., SOLCA, F., GREULICH, H. and WONG, K., 2008. BIBW2992, an irreversible EGFR HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, **27**(34), pp. 4702-4711.

LI, H., NING, S., GHANDI, M., KRYUKOV, G.V., GOPAL, S., DEIK, A., SOUZA, A., PIERCE, K., KESKULA, P., HERNANDEZ, D., ANN, J., SHKOZA, D., APFEL, V., ZOU, Y., VAZQUEZ, F., BARRETINA, J., PAGLIARINI, R.A., GALLI, G.G., ROOT, D.E., HAHN, W.C., TSHERNIAK, A., GIANNAKIS, M., SCHREIBER, S.L., CLISH, C.B., GARRAWAY, L.A. and SELLERS, W.R., 2019. The landscape of cancer cell line metabolism. *Nature medicine*, **25**(5), pp. 850-860.

LI, Q., HOU, L., DING, G., LI, Y., WANG, J., QIAN, B., SUN, J. and WANG, Q., 2015. KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *International journal of clinical and experimental pathology*, **8**(6), pp. 6334-6344.

LI, Q., CHEN, Z., CAO, X., XU, J., XU, J., CHEN, Y., WANG, W., CHEN, Q., TANG, F., LIU, X. and XU, Z., 2011. Involvement of NF- κ B/miR-448

regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells. *Cell death and differentiation*, **18**(1), pp. 16-25.

LI, S., KUSSIE, P. and FERGUSON, K.M., 2008. Structural Basis for EGF Receptor Inhibition by the Therapeutic Antibody IMC-11F8. *Structure*, **16**(2), pp. 216-227.

LI, W. and KANG, Y., 2016. Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis. *Trends in Cancer*, **2**(2), pp. 65-67.

LI, X., LEWIS, M.T., HUANG, J., GUTIERREZ, C., OSBORNE, C.K., WU, M., HILSENBECK, S.G., PAVLICK, A., ZHANG, X., CHAMNESS, G.C., WONG, H., ROSEN, J. and CHANG, J.C., 2008. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **100**(9), pp. 672-679.

LIN, J.J., RIELY, G.J. and SHAW, A.T., 2017. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer discovery*, **7**(2), pp. 137-155.

LIN, R., HSU, H., CHANG, J., CHEN, C., CHEN, J. and WANG, Y., 2007. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, **55**(2), pp. 205.

LINDEMAN, N.I., CAGLE, P.T., AISNER, D.L., ARCILA, M.E., BEASLEY, M.B., BERNICKER, E.H., COLASACCO, C., DACIC, S., HIRSCH, F.R., KERR, K., KWIATKOWSKI, D.J., LADANYI, M., NOWAK, J.A., SHOLL, L., TEMPLE-SMOLKIN, R., SOLOMON, B., SOUTER, L.H., THUNNISSEN, E., TSAO, M.S., VENTURA, C.B., WYNES, M.W. and YATABE, Y., 2018. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors. *Journal of Thoracic Oncology*, **13**(3), pp. 323-358.

LINDEMAN, N.I., CAGLE, P.T., BEASLEY, M.B., CHITALE, D.A., DACIC, S., GIACCONE, G., JENKINS, R.B., KWIATKOWSKI, D.J., SALDIVAR, J., SQUIRE, J., THUNNISSEN, E. and LADANYI, M., 2013. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Journal of Thoracic Oncology*, **8**(7), pp. 823-859.

LIU, J., LEE, W., JIANG, Z., CHEN, Z., JHUNJHUNWALA, S., HAVERTY, P.M., GNAD, F., GUAN, Y., GILBERT, H.N., STINSON, J., KLIJN, C., GUILLORY, J., BHATT, D., VARTANIAN, S., WALTER, K., CHAN, J., HOLCOMB, T., DIJKGRAAF, P., JOHNSON, S., KOEMAN, J., MINNA, J.D.,

GAZDAR, A.F., STERN, H.M., HOEFLICH, K.P., WU, T.D., SETTLEMAN, J., DE SAUVAGE, F.J., GENTLEMAN, R.C., NEVE, R.M., STOKOE, D., MODRUSAN, Z., SESHAGIRI, S., SHAMES, D.S. and ZHANG, Z., 2012. Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events. *Genome research*, **22**(12), pp. 2315-2327.

LIU, K., SUN, B., ZHAO, X., WANG, X., LI, Y., QIU, Z., LIU, T., GU, Q., DONG, X., ZHANG, Y., WANG, Y. and ZHAO, N., 2015. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by the Twist1-Bmi1 connection in hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular medicine*, **36**(3), pp. 783.

LIU, X., SUN, H., QI, J., WANG, L., HE, S., LIU, J., FENG, C., CHEN, C., LI, W., GUO, Y., QIN, D., PAN, G., CHEN, J., PEI, D. and ZHENG, H., 2013. Sequential introduction of reprogramming factors reveals a time-sensitive requirement for individual factors and a sequential EMT–MET mechanism for optimal reprogramming. *Nature cell biology*, **15**(7), pp. 829-838.

LIU, X. and GIGUÈRE, V., 2014. Inactivation of RAR β inhibits Wnt1-induced mammary tumorigenesis by suppressing epithelial-mesenchymal transitions. *Nuclear receptor signaling*, **12**(1), pp. e004.

LIU, Y., SÁNCHEZ-TILLÓ, E., LU, X., HUANG, L., CLEM, B., TELANG, S., JENSON, A.B., CUATRECASAS, M., CHESNEY, J., POSTIGO, A. and DEAN, D.C., 2014. The ZEB1 Transcription Factor Acts in a Negative Feedback Loop with miR200 Downstream of Ras and Rb1 to Regulate Bmi1 Expression. *The Journal of biological chemistry*, **289**(7), pp. 4116-4125.

LOWE, S.W., EVAN, G. and CEPERO, E., 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, **432**(7015), pp. 307-315.

LUNDGREN, K., NORDENSKJÖLD, B. and LANDBERG, G., 2009. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *British Journal of Cancer*, **101**(10), pp. 1769-1781.

LYNCH, T.J., BELL, D.W., SORDELLA, R., GURUBHAGAVATULA, S., OKIMOTO, R.A., BRANNIGAN, B.W., HARRIS, P.L., HASERLAT, S.M., SUPKO, J.G., HALUSKA, F.G., LOUIS, D.N., CHRISTIANI, D.C., SETTLEMAN, J. and HABER, D.A., 2004. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, **350**(21), pp. 2129-2139.

MACLEOD KAY, 2000. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**(1), pp. 81-93.

MANGELSDORF, D., UMESONO, K. and EVANS, R.M., 1994. *The retinoid receptors. In: The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine, M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman, eds.* New York: Raven Press: .

MANI, S.A., GUO, W., LIAO, M., EATON, E.N., AYYANAN, A., ZHOU, A.Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C.C., SHIPITSIN, M., CAMPBELL, L.L., POLYAK, K., BRISKEN, C., YANG, J. and WEINBERG, R.A., 2008. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, **133**(4), pp. 704-715.

MARABESE, M., GANZINELLI, M., GARASSINO, M.C., SHEPHERD, F.A., PIVA, S., CAIOLA, E., MACERELLI, M., BETTINI, A., LAURICELLA, C., FLORIANI, I., FARINA, G., LONGO, F., BONOMI, L., FABBRI, M.A., VERONESE, S., MARSONI, S., BROGGINI, M. and RULLI, E., 2015. KRAS mutations affect prognosis of non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum containing chemotherapy. *Oncotarget*, **6**(32), pp. 34014-34022.

MAREEL, M., VLEMINCKX, K., VERMEULEN, S., BRACKE, M. and VAN ROY, F., 1992. E-cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion. *Bulletin du cancer*, **79**(4), pp. 347.

MARIO L. SUVÀ, NICOLO RIGGI and BRADLEY E. BERNSTEIN, 2013. Epigenetic Reprogramming in Cancer. *Science*, **339**(6127), pp. 1567-1570.

MARISSA N. BALAK, YIXUAN GONG, GREGORY J. RIELY, ROMEL SOMWAR, ALLAN R. LI, MAUREEN F. ZAKOWSKI, ANNE CHIANG, GUANGLI YANG, OUATHEK OUERFELLI, MARK G. KRIS, MARC LADANYI, VINCENT A. MILLER and WILLIAM PAO, 2006. Novel D761Y and Common Secondary T790M Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor–Mutant Lung Adenocarcinomas with Acquired Resistance to Kinase Inhibitors. *Clinical Cancer Research*, **12**(21), pp. 6494-6501.

MARKS, J.L., GONG, Y., CHITALE, D., GOLAS, B., MCLELLAN, M.D., KASAI, Y., DING, L., MARDIS, E.R., WILSON, R.K., SOLIT, D., LEVINE, R., MICHEL, K., THOMAS, R.K., RUSCH, V.W., LADANYI, M. and PAO, W., 2008. Novel MEK1 Mutation Identified by Mutational Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway Genes in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research*, **68**(14), pp. 5524-5528.

MARTINEZ, R., MARTIN-SUBERO, J.I., ROHDE, V., KIRSCH, M., ALAMINOS, M., FERNÁNDEZ, A.F., ROPERO, S., SCHACKERT, G. and ESTELLER, M., 2009. A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics*, **4**(4), pp. 255-264.

MASSAGUÉ, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **13**(10), pp. 616-630.

MCGRANAHAN, N. and SWANTON, C., 2017. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, **168**(4), pp. 613-628.

MEDEMA, J.P., 2013. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nature cell biology*, **15**(4), pp. 338-344.

MEDINA, P.P., CARRETERO, J., FRAGA, M.F., ESTELLER, M., SIDRANSKY, D. and SANCHEZ-CESPEDES, M., 2004. Genetic and Epigenetic screening for gene alterations of the chromatin-remodeling factor, SMARCA4/BRG1, in lung tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **41**(2), pp. 170-177.

MENG LIU, ANNA-KARIN M SJOGREN, CHRISTIN KARLSSON, MOHAMED X IBRAHIM, KARIN M E ANDERSSON, FRIDA J OLOFSSON, ANNIKA M WAHLSTROM, MARTIN DALIN, HUIMING YU, ZHENGANG CHEN, SHAO H YANG, STEPHEN G YOUNG and MARTIN O BERGO, 2010. Targeting the protein prenyltransferases efficiently reduces tumor development in mice with K-RAS-induced lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(14), pp. 6471.

MICALIZZI, D., FARABAUGH, S. and FORD, H., 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **15**(2), pp. 117-134.

MICHAEL B. KASTAN, 2008. DNA Damage Responses: Mechanisms and Roles in Human Disease. *Molecular Cancer Research*, **6**(4), pp. 517.

MICHELE W. L. TENG, JEREMY B. SWANN, CATHERINE M. KOEBEL, ROBERT D. SCHREIBER and MARK J. SMYTH, 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, **84**(4), pp. 988-993.

MINAMIYA, Y., ONO, T., SAITO, H., TAKAHASHI, N., ITO, M., MITSUI, M., MOTOYAMA, S. and OGAWA, J., 2011. Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, **74**(2), pp. 300-304.

MINAMIYA, Y., ONO, T., SAITO, H., TAKAHASHI, N., ITO, M., MOTOYAMA, S. and OGAWA, J., 2010. Strong expression of HDAC3 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the

lung. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **31**(5), pp. 533-539.

MOK, T.S., WU, Y., AHN, M., GARASSINO, M.C., KIM, H.R., RAMALINGAM, S.S., SHEPHERD, F.A., HE, Y., AKAMATSU, H., THEELEN, WILLEMIJN S. M. E, LEE, C.K., SEBASTIAN, M., TEMPLETON, A., MANN, H., MAROTTI, M., GHIORGHIU, S. and PAPADIMITRAKOPOULOU, V.A., 2017. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **376**(7), pp. 629-640.

MOK, T.S., WU, Y., THONGPRASERT, S., YANG, C., CHU, D., SAIJO, N., SUNPAWERAVONG, P., HAN, B., MARGONO, B., ICHINOSE, Y., NISHIWAKI, Y., OHE, Y., YANG, J., CHEWASKULYONG, B., JIANG, H., DUFFIELD, E.L., WATKINS, C.L., ARMOUR, A.A. and FUKUOKA, M., 2009. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, **361**(10), pp. 947-957.

MOK, T., AHN, M., HAN, J., KANG, J.H., KATAKAMI, N., KIM, H., HODGE, R., GHIORGHIU, D.C., CANTARINI, M., WU, Y., PAPADIMITRAKOPOULOU, V. and GARASSINO, M.C., 2017. CNS response to osimertinib in patients (pts) with T790M-positive advanced NSCLC: Data from a randomized phase III trial (AURA3). *Journal of Clinical Oncology*, **35**(15_suppl), pp. 9005.

MORAN, S., MSc, MARTÍNEZ-CARDÚS, A., PhD, SAYOLS, S., MSc, MUSULÉN, E., MD, BALAÑÁ, C., MD, ESTIVAL-GONZALEZ, A., MD, MOUTINHO, C., PhD, HEYN, H., PhD, DIAZ-LAGARES, A., PhD, DE MOURA, MANUEL CASTRO, MSc, STELLA, G.M., MD, COMOGLIO, P.M., Prof, RUIZ-MIRÓ, M., PhD, MATIAS-GUIU, X., MD, PAZO-CID, R., MD, ANTÓN, A., MD, LOPEZ-LOPEZ, R., MD, SOLER, G., MD, LONGO, F., MD, GUERRA, I., MD, FERNANDEZ, S., MD, ASSENOV, Y., PhD, PLASS, C., Prof, MORALES, R., MD, CARLES, J., MD, BOWTELL, D., Prof, MILESHKIN, L., MD, SIA, D., PhD, TOTHILL, R., PhD, TABERNERO, J., MD, LLOVET, J.M., Prof and ESTELLER, M., Prof, 2016. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncology, The*, **17**(10), pp. 1386-1395.

MOREL, A., HINKAL, G.W., THOMAS, C., FAUVET, F., COURTOIS-COX, S., WIERINCKX, A., DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M., TREILLEUX, I., TISSIER, A., GRAS, B., POURCHET, J., PUISIEUX, I., BROWNE, G.J., SPICER, D.B., LACHUER, J., ANSIEAU, S. and PUISIEUX, A., 2012. EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and

Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS genetics*, **8**(5), pp. e1002723.

MOUSTAKAS, A. and HELDIN, C., 2007. Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science*, **98**(10), pp. 1512-1520.

MULHOLLAND, D.J., KOBAYASHI, N., RUSCETTI, M., ZHI, A., TRAN, L.M., HUANG, J., GLEAVE, M. and WU, H., 2012. Pten Loss and RAS/MAPK Activation Cooperate to Promote EMT and Metastasis Initiated from Prostate Cancer Stem/Progenitor Cells. *Cancer research*, **72**(7), pp. 1878-1889.

NAMBA, K., SHIEN, K., TAKAHASHI, Y., TORIGOE, H., SATO, H., YOSHIOKA, T., TAKEDA, T., KURIHARA, E., OGOSHI, Y., YAMAMOTO, H., SOH, J., TOMIDA, S. and TOYOOKA, S., 2019. Activation of AXL as a Preclinical Acquired Resistance Mechanism Against Osimertinib Treatment in EGFR -Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular cancer research : MCR*, **17**(2), pp. 499-507.

NEAL, J.W., GAINOR, J.F. and SHAW, A.T., 2015. Developing biomarker-specific end points in lung cancer clinical trials. *Nature reviews. Clinical oncology*, **12**(3), pp. 135-146.

NEGRINI, S., GORGOULIS, V.G. and HALAZONETIS, T.D., 2010. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**(3), pp. 220-228.

NICOLÁS HERRANZ, DIEGO PASINI, VÍCTOR M. DÍAZ, CLARA FRANCÍ, ARANTXA GUTIERREZ, NATÀLIA DAVE, MARIA ESCRIVÀ, INMA HERNANDEZ-MUÑOZ, LUCIANO DI CROCE, KRISTIAN HELIN, ANTONIO GARCÍA DE HERREROS and SANDRA PEIRÓ, 2008. Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology*, **28**(15), pp. 4772-4781.

NIEDERST, M.J., SEQUIST, L.V., POIRIER, J.T., MERMEL, C.H., LOCKERMAN, E.L., GARCIA, A.R., KATAYAMA, R., COSTA, C., ROSS, K.N., MORAN, T., HOWE, E., FULTON, L.E., MULVEY, H.E., BERNARDO, L.A., MOHAMOUD, F., MIYOSHI, N., VANDERLAAN, P.A., COSTA, D.B., JÄNNE, P.A., BORGER, D.R., RAMASWAMY, S., SHIODA, T., IAFRATE, A.J., GETZ, G., RUDIN, C.M., MINO-KENUDSON, M. and ENGELMAN, J.A., 2015. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nature communications*, **6**(1), pp. 6377.

NIETO, M., HUANG, R., JACKSON, R. and THIERY, J., 2016. EMT: 2016. *Cell*, **166**(1), pp. 21-45.

NIKKI CHENG, ANNA CHYTIL, YU SHYR, ALISON JOLY and HAROLD L. MOSES, 2008. Transforming Growth Factor- β Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, **6**(10), pp. 1521-1533.

NISHANT AGRAWAL, MITCHELL J. FREDERICK, CURTIS R. PICKERING, CHETAN BETTEGOWDA, KYLE CHANG, RYAN J. LI, CAROLE FAKHRY, TONG-XIN XIE, JIEXIN ZHANG, JING WANG, NIANXIANG ZHANG, ADEL K. EL-NAGGAR, SAMAR A. JASSER, JOHN N. WEINSTEIN, LISA TREVIÑO, JENNIFER A. DRUMMOND, DONNA M. MUZNY, YUANQING WU, LAURA D. WOOD, RALPH H. HRUBAN, WILLIAM H. WESTRA, WAYNE M. KOCH, JOSEPH A. CALIFANO, RICHARD A. GIBBS, DAVID SIDRANSKY, BERT VOGELSTEIN, VICTOR E. VELCULESCU, NICKOLAS PAPADOPOULOS, DAVID A. WHEELER, KENNETH W. KINZLER and JEFFREY N. MYERS, 2011. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science*, **333**(6046), pp. 1154-1157.

NOWELL, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**(4260), pp. 23-28.

OCAÑA, O., CÓRCOLES, R., FABRA, Á, MORENO-BUENO, G., ACLOQUE, H., VEGA, S., BARRALLO-GIMENO, A., CANO, A. and NIETO, M. ., 2012. Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*, **22**(6), pp. 709-724.

OKANO, M., BELL, D.W., HABER, D.A. and LI, E., 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, **99**(3), pp. 247-257.

ONozATO, R., KOSAKA, T., KUWANO, H., SEKIDO, Y., YATABE, Y. and MITSUDOMI, T., 2009. Activation of MET by Gene Amplification or by Splice Mutations Deleting the Juxtamembrane Domain in Primary Resected Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, **4**(1), pp. 5-11.

ORVIS, T., HEPPELRA, A., WALTER, V., SONG, S., SIMON, J., PARKER, J., WILKERSON, M.D., DESAI, N., MAJOR, M.B., HAYES, D.N., DAVIS, I.J. and WEISSMAN, B., 2014. BRG1/SMARCA4 Inactivation Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Aggressiveness by Altering Chromatin Organization. *Cancer research*, **74**(22), pp. 6486-6498.

OSTREM, J.M.L. and SHOKAT, K.M., 2016. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nature reviews. Drug discovery*, **15**(11), pp. 771-785.

OU, S.I., CUI, J., SCHROCK, A.B., GOLDBERG, M.E., ZHU, V.W., ALBACKER, L., STEPHENS, P.J., MILLER, V.A. and ALI, S.M., 2017. Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, **108**, pp. 228-231.

OU, S.I., TAN, J., YEN, Y. and SOO, R.A., 2012. ROS1 as a 'druggable receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **12**(4), pp. 447-456.

OXNARD, G.R., HU, Y., MILEHAM, K.F., HUSAIN, H., COSTA, D.B., TRACY, P., FEENEY, N., SHOLL, L.M., DAHLBERG, S.E., REDIG, A.J., KWIATKOWSKI, D.J., RABIN, M.S., PAWELETZ, C.P., THRESS, K.S. and JÄNNE, P.A., 2018. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA oncology*, **4**(11), pp. 1527-1534.

PAEZ, J.G., JANNE, P.A., LEE, J.C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F.J., LINDEMAN, N., BOGGON, T.J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M.J., SELLERS, W.R., JOHNSON, B.E. and MEYERSON, M., 2004. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, **304**(5676), pp. 1497-1500.

PANG, R., LAW, W.L., CHU, A.C.Y., POON, J.T., POON, R.T., LAM, C.S.C., CHOW, A.K.M., NG, L., CHEUNG, L.W.H., LAN, H.Y., LAN, X.R., TAN, V.P.Y., YAU, T.C. and WONG, B.C.Y., 2010. A Subpopulation of CD26 + Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell*, **6**(6), pp. 603-615.

PARDOLL, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, **12**(4), pp. 252-264.

PARK, D.J., CHUMAKOV, A.M., VUONG, P.T., CHIH, D.Y., GOMBART, A.F., MILLER, W.H. and KOEFFLER, H.P., 1999. CCAAT/enhancer binding protein ϵ is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *Journal of Clinical Investigation*, **103**(10), pp. 1399-1408.

PARK, W., HONG, B., LEE, J., CHOI, C. and KIM, M., 2016. H3K27 Demethylase JMJD3 Employs the NF- κ B and BMP Signaling Pathways to

Modulate the Tumor Microenvironment and Promote Melanoma Progression and Metastasis. *Cancer research*, **76**(1), pp. 161-170.

PATTABIRAMAN, D.R., BIERIE, B., KOBER, K.I., THIRU, P., KRALL, J.A., ZILL, C., REINHARDT, F., TAM, W.L. and WEINBERG, R.A., 2016. Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science (New York, N.Y.)*, **351**(6277), pp. aad3680.

PEINADO, H., OLMEDA, D. and CANO, A., 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, **7**(6), pp. 415-428.

PENG, D., KRYCZEK, I., NAGARSHETH, N., ZHAO, L., WEI, S., WANG, W., SUN, Y., ZHAO, E., VATAN, L., SZELIGA, W., KOTARSKI, J., TARKOWSKI, R., DOU, Y., CHO, K., HENSLEY-ALFORD, S., MUNKARAH, A., LIU, R. and ZOU, W., 2015. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature*, **527**(7577), pp. 249-253.

PERERA, F.P., MOONEY, L.A., STAMPFER, M., PHILLIPS, D.H., BELL, D.A., RUNDLE, A., CHO, S., TSAI, W., MA, J., BLACKWOOD, A. and TANG, D., 2002. Associations between carcinogen-DNA damage, glutathione S-transferase genotypes, and risk of lung cancer in the prospective Physicians' Health Cohort Study. *Carcinogenesis*, **23**(10), pp. 1641-1646.

PEYROCHE, A., ANTONNY, B., ROBINEAU, S., ACKER, J., CHERFILS, J. and JACKSON, C.L., 1999. Brefeldin A Acts to Stabilize an Abortive ARF–GDP–Sec7 Domain Protein Complex: Involvement of Specific Residues of the Sec7 Domain. *Molecular Cell*, **3**(3), pp. 275-285.

PICARD, E., SEGUIN, C., MONHOVEN, N., ROCHETTE-EGLY, C., SIAT, J., BORRELLY, J., MARTINET, Y., MARTINET, N. and VIGNAUD, J.M., 1999. Expression of Retinoid Receptor Genes and Proteins in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **91**(12), pp. 1059-1066.

POLYAK, K. and WEINBERG, R.A., 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, **9**(4), pp. 265-273.

PRAKASH, V., CARSON, B.B., FEENSTRA, J.M., DASS, R.A., SEKYROVA, P., HOSHINO, A., PETERSEN, J., GUO, Y., PARKS, M.M., KURYLO, C.M., BATCHELDER, J.E., HALLER, K., HASHIMOTO, A., RUNDQIVST, H., CONDEELIS, J.S., ALLIS, C.D., DRYGIN, D., NIETO, M.A., ANDÄNG, M., PERCIPALLE, P., BERGH, J., ADAMEYKO, I., FARRANTS, A.Ö, HARTMAN, J., LYDEN, D., PIETRAS, K.,

BLANCHARD, S.C. and VINCENT, C.T., 2019. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nature communications*, **10**(1), pp. 2110-16.

PULIDO INES and CARRETERO JULIAN, 2017. *Análisis genómico funcional de la resistencia a las terapias anti-EGFR asociada al fenotipo mesenquimal en el cáncer pulmonar*, Universidad de Valencia.

PULIDO, I., AUPÍ, M., GARCÍA-CAÑEVERAS, J.C., BECKER, J.H., RODRIGUEZ, M.L., ALCACER FERNANDEZ-CORONADO, J., APARISI, S., CHULIA, L., PERALES, J., MANCHEÑO, N., CREMADES, A., GALBIS-CARAVAJAL, J.M., MENA, S., SANDOVAL, J., PEREDA, J., MARTIN-MARTORELL, P., INSA, A., JUAN, O., AL-SHAROUR, F., SANCHEZ DEL PINO, M., WONG, K.K., LAHOZ, A., SHIMAMURA, T. and CARRETERO, J., Enviado a publicar. NNMT drives mesenchymal-like phenotype and generates metabolic vulnerabilities in EGFR-mutant NSCLC with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Research*, .

PYLAYEVA-GUPTA, Y., GRABOCKA, E. and BAR-SAGI, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, **11**(11), pp. 761-774.

QIAN, B. and POLLARD, J.W., 2010. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, **141**(1), pp. 39-51.

QUAIL, D.F. and JOYCE, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, **19**(11), pp. 1423-1437.

RAMADOSS, S., CHEN, X. and WANG, C., 2012. Histone Demethylase KDM6B Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition. *The Journal of biological chemistry*, **287**(53), pp. 44508-44517.

RAMALINGAM, S.S., VANSTEENKISTE, J., PLANCHARD, D., CHO, B.C., GRAY, J.E., OHE, Y., ZHOU, C., REUNGWETWATTANA, T., CHENG, Y., CHEWASKULYONG, B., SHAH, R., COBO, M., LEE, K.H., CHEEMA, P., TISEO, M., JOHN, T., LIN, M., IMAMURA, F., KURATA, T., TODD, A., HODGE, R., SAGGESE, M., RUKAZENKOV, Y. and SORIA, J., 2019. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *The New England Journal of Medicine*, .

RAMALINGAM, S.S., YANG, J.C., LEE, C.K., KURATA, T., KIM, D., JOHN, T., NOGAMI, N., OHE, Y., MANN, H., RUKAZENKOV, Y., GHIORGHIU, S., STETSON, D., MARKOVETS, A., BARRETT, J.C., THRESS, K.S. and JÄNNE, P.A., 2018. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology* :

official journal of the American Society of Clinical Oncology, **36**(9), pp. 841-849.

RAYNAUD, C.M., HERNANDEZ, J., LLORCA, F.P., NUCIFORO, P., MATHIEU, M., COMMO, F., DELALOGUE, S., SABATIER, L., ANDRÉ, F. and SORIA, J., 2010. DNA Damage Repair and Telomere Length in Normal Breast, Preneoplastic Lesions, and Invasive Cancer. *American journal of clinical oncology*, **33**(4), pp. 341-345.

REDMOND, D.E., 1970. Tobacco and Cancer: The First Clinical Report, 1761. *The New England Journal of Medicine*, **282**(1), pp. 18-23.

REGUART, N., ROSELL, R., CARDENAL, F., CARDONA, A.F., ISLA, D., PALMERO, R., MORAN, T., ROLFO, C., PALLARÈS, M.C., INSA, A., CARCERENY, E., MAJEM, M., DE CASTRO, J., QUERALT, C., MOLINA, M.A. and TARON, M., 2014. Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer*, **84**(2), pp. 161-167.

REID, T., VALONE, F., LIPERA, W., IRWIN, D., PAROLY, W., NATALE, R., SREEDHARAN, S., KEER, H., LUM, B., SCAPPATICCI, F. and BHATNAGAR, A., 2004. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **45**(3), pp. 381-386.

REKHTMAN, N., ANG, D.C., SIMA, C.S., TRAVIS, W.D. and MOREIRA, A.L., 2011. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology*, **24**(10), pp. 1348-1359.

REYA, T. and CLEVERS, J.C., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**(7035), pp. 843-850.

RHEE, I., BACHMAN, K.E., PARK, B.H., JAIR, K., YEN, R., SCHUEBEL, K.E., CUI, H., FEINBERG, A.P., LENGAUER, C., KINZLER, K.W., BAYLIN, S.B. and VOGELSTEIN, B., 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, **416**(6880), pp. 552-556.

RIKOVA, K., GUO, A., ZENG, Q., POSSEMATO, A., YU, J., HAACK, H., NARDONE, J., LEE, K., REEVES, C., LI, Y., LI, D., HU, Y., TAN, Z., STOKES, M., SULLIVAN, L., MITCHELL, J., WETZEL, R., MACNEILL, J., REN, J.M., YUAN, J., BAKALARSKI, C.E., VILLEN, J., KORNHAUSER, J.M., SMITH, B., ZHOU, X., GYGI, S.P., GU, T., POLAKIEWICZ, R.D.,

RUSH, J. and COMB, M.J., 2007. Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. *Cell*, **131**(6), pp. 1190-1203.

ROBERT L. YAUCH, THOMAS JANUARIO, DAVID A. EBERHARD, GUY CAVET, WENJING ZHU, LING FU, THINH Q. PHAM, ROBERT SORIANO, JEREMY STINSON, SOMASEKAR SESHAGIRI, ZORA MODRUSAN, CHIN-YU LIN, VINCENT O'NEILL and LUKAS C. AMLER, 2005. Epithelial versus Mesenchymal Phenotype Determines In vitro Sensitivity and Predicts Clinical Activity of Erlotinib in Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, **11**(24), pp. 8686-8698.

ROBLES, A.I., ARAI, E., MATHÉ, E.A., OKAYAMA, H., SCHETTER, A.J., BROWN, D., PETERSEN, D., BOWMAN, E.D., NORO, R., WELSH, J.A., EDELMAN, D.C., STEVENSON, H.S., WANG, Y., TSUCHIYA, N., KOHNO, T., SKAUG, V., MOLLERUP, S., HAUGEN, A., MELTZER, P.S., YOKOTA, J., KANAI, Y. and HARRIS, C.C., 2015. An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. *Journal of Thoracic Oncology*, **10**(7), pp. 1037-1048.

ROCHETTE-EGLY, C. and CHAMBON, P., 2001. F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histology and histopathology*, **16**(3), pp. 909-922.

RODRIGUEZ-PAREDES, M., MARTINEZ DE PAZ, A., SIMÓ-RIUDALBAS, L., SAYOLS, S., MOUTINHO, C., MORAN, S., VILLANUEVA, A., VÁZQUEZ-CEDEIRA, M., LAZO, P.A., CARNEIRO, F., MOURA, C.S., VIEIRA, J., TEIXEIRA, M.R. and ESTELLER, M., 2014. Gene amplification of the histone methyltransferase SETDB1 contributes to human lung tumorigenesis. *Oncogene*, **33**(21), pp. 2807-2813.

RYAN D MORIN, NATHALIE A JOHNSON, TESA M SEVERSON, ANDREW J MUNGALL, JIANGHONG AN, RODRIGO GOYA, JESSICA E PAUL, MERRILL BOYLE, BRUCE W WOOLCOCK, FLORIAN KUCHENBAUER, DAMIAN YAP, R KEITH HUMPHRIES, OBI L GRIFFITH, SOHRAB SHAH, HENRY ZHU, MICHELLE KIMBARA, PAVEL SHASHKIN, JEAN F CHARLOT, MARIANNA TCHERPAKOV, RICHARD CORBETT, ANGELA TAM, RICHARD VARHOL, DUANE SMAILUS, MICHELLE MOKSA, YONGJUN ZHAO, ALLEN DELANEY, HONG QIAN, INANC BIROL, JACQUELINE SCHEIN, RICHARD MOORE, ROBERT HOLT, DOUG E HORSMAN, JOSEPH M CONNORS, STEVEN JONES, SAMUEL APARICIO, MARTIN HIRST, RANDY D GASCOYNE and MARCO A MARRA, 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics*, **42**(2), pp. 181-185.

SAKAI, T., TOGUCHIDA, J., OHTANI, N., YANDELL, D.W., RAPAPORT, J.M. and DRYJA, T.P., 1991. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American journal of human genetics*, **48**(5), pp. 880-888.

SAKAKI, H., OKADA, M., KURAMOTO, K., TAKEDA, H., WATARAI, H., SUZUKI, S., SEINO, S., SEINO, M., OHTA, T., NAGASE, S., KURACHI, H. and KITANAKA, C., 2015. GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer research*, **35**(12), pp. 6607.

SALK, J.J., FOX, E.J. and LOEB, L.A., 2010. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annual review of pathology*, **5**(1), pp. 51-75.

SAMIR E. WITTA, ROBERT M. JOTTE, KATRIK KONDURI, MARCUS A. NEUBAUER, ALEXANDER I. SPIRA, ROBERT L. RUXER, MARILEILA VARELLA-GARCIA, PAUL A. BUNN JR and FRED R. HIRSCH, 2012. Randomized Phase II Trial of Erlotinib With and Without Entinostat in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Who Progressed on Prior Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, **30**(18), pp. 2248-2255.

SAMPSON, V.B., DAVID, J.M., PUIG, I., PATIL, P.U., DE HERREROS, A.G., THOMAS, G.V. and RAJASEKARAN, A.K., 2014. Wilms' Tumor Protein Induces an Epithelial-Mesenchymal Hybrid Differentiation State in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PloS one*, **9**(7), pp. e102041.

SANCHEZ-CESPEDES, M., PARRELLA, P., ESTELLER, M., NOMOTO, S., TRINK, B., ENGLER, J.M., WESTRA, W.H., HERMAN, J.G. and SIDRANSKY, D., 2002. Inactivation of LKB1/STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung. *Cancer Research*, **62**(13), pp. 3659.

SÁNCHEZ-TILLÓ, E., LÁZARO, A., TORRENT, R., CUATRECASAS, M., VAQUERO, E.C., CASTELLS, A., ENGEL, P. and POSTIGO, A., 2010. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene*, **29**(24), pp. 3490-3500.

SANDLER, A., GRAY, R., PERRY, M.C., BRAHMER, J., SCHILLER, J.H., DOWLATI, A., LILENBAUM, R. and JOHNSON, D.H., 2006. Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **355**(24), pp. 2542-2550.

SANDOVAL, J., HEYN, H., MORAN, S., SERRA-MUSACH, J., PUJANA, M.A., BIBIKOVA, M. and ESTELLER, M., 2011. Validation of a DNA

methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, **6**(6), pp. 692-702.

SASAKI, H., MORIYAMA, S., NAKASHIMA, Y., KOBAYASHI, Y., KIRIYAMA, M., FUKAI, I., YAMAKAWA, Y. and FUJII, Y., 2004. Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer. *Lung Cancer*, **46**(2), pp. 171-178.

SATO, H., SHIEN, K., TOMIDA, S., OKAYASU, K., SUZAWA, K., HASHIDA, S., TORIGOE, H., WATANABE, M., YAMAMOTO, H., SOH, J., ASANO, H., TSUKUDA, K., MIYOSHI, S. and TOYOOKA, S., 2017. Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features. *Scientific reports*, **7**(1), pp. 40847.

SATO, M., SHAMES, D.S., GAZDAR, A.F. and MINNA, J.D., 2007. A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, **2**(4), pp. 327-343.

SCAGLIOTTI, G., HANNA, N., FOSSELLA, F., SUGARMAN, K., BLATTER, J., PETERSON, P., SIMMS, L. and SHEPHERD, F.A., 2009. The Differential Efficacy of Pemetrexed According to NSCLC Histology: A Review of Two Phase III Studies. *The Oncologist*, **14**(3), pp. 253-263.

SCHEEL, C. and WEINBERG, R.A., 2012. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology*, **22**(5), pp. 396-403.

SCHLIEKELMAN, M.J., TAGUCHI, A., ZHU, J., DAI, X., RODRIGUEZ, J., CELIKTAS, M., ZHANG, Q., CHIN, A., WONG, C., WANG, H., MCFERRIN, L., SELAMAT, S.A., YANG, C., KROH, E.M., GARG, K.S., BEHRENS, C., GAZDAR, A.F., LAIRD-OFFRINGA, I.A., TEWARI, M., WISTUBA, I.I., THIERY, J.P. and HANASH, S.M., 2015. Molecular Portraits of Epithelial, Mesenchymal, and Hybrid States in Lung Adenocarcinoma and Their Relevance to Survival. *Cancer research*, **75**(9), pp. 1789-1800.

SCHUG, T.T., BERRY, D.C., SHAW, N.S., TRAVIS, S.N. and NOY, N., 2007. Opposing Effects of Retinoic Acid on Cell Growth Result from Alternate Activation of Two Different Nuclear Receptors. *Cell*, **129**(4), pp. 723-733.

SCHWARTSMANN, G., SCHUNEMANN, H., GORINI, C.N.F., FERREIRA FILHO, A.F., GARBINO, C., SABINI, G., MUSE, I., DILEONE, L. and MANS, D.R., 2000. A Phase I Trial of Cisplatin Plus Decitabine, a New DNA-Hypomethylating Agent, in Patients with Advanced Solid Tumors and a Follow-

Up Early Phase II Evaluation in Patients with Inoperable Non-Small Cell Lung Cancer. *Investigational New Drugs*, **18**(1), pp. 83-91.

SCOTT J. RODIG, MARI MINO-KENUDSON, SANJA DACIC, BEOW Y. YEAP, ALICE SHAW, JUSTINE A. BARLETTA, HANNAH STUBBS, KENNY LAW, NEAL LINDEMAN, EUGENE MARK, PASI A. JANNE, THOMAS LYNCH, BRUCE E. JOHNSON, A. JOHN IAFRATE and LUCIAN R. CHIRIEAC, 2009. Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-Rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population. *Clinical Cancer Research*, **15**(16), pp. 5216-5223.

SELAMAT, S.A., CHUNG, B.S., GIRARD, L., ZHANG, W., ZHANG, Y., CAMPAN, M., SIEGMUND, K.D., KOSS, M.N., HAGEN, J.A., LAM, W.L., LAM, S., GAZDAR, A.F. and LAIRD-OFFRINGA, I.A., 2012. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome research*, **22**(7), pp. 1197-1211.

SELAMAT, S.A., GALLER, J.S., JOSHI, A.D., FYFE, M.N., CAMPAN, M., SIEGMUND, K.D., KERR, K.M. and LAIRD-OFFRINGA, I.A., 2011. DNA Methylation Changes in Atypical Adenomatous Hyperplasia, Adenocarcinoma In Situ, and Lung Adenocarcinoma. *PLoS one*, **6**(6), pp. e21443.

SEQUIST, L.V., WALTMAN, B.A., DIAS-SANTAGATA, D., DIGUMARTHY, S., TURKE, A.B., FIDIAS, P., BERGETHON, K., SHAW, A.T., GETTINGER, S., COSPER, A.K., AKHAVANFARD, S., HEIST, R.S., TEMEL, J., CHRISTENSEN, J.G., WAIN, J.C., LYNCH, T.J., VERNOVSKY, K., MARK, E.J., LANUTI, M., IAFRATE, A.J., MINO-KENUDSON, M. and ENGELMAN, J.A., 2011. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science translational medicine*, **3**(75), pp. 75ra26.

SERRESI, M., GARGIULO, G., PROOST, N., SITEUR, B., CESARONI, M., KOPPENS, M., XIE, H., SUTHERLAND, K.D., HULSMAN, D., CITTERIO, E., ORKIN, S., BERNS, A. and VAN LOHUIZEN, M., 2016. Polycomb Repressive Complex 2 Is a Barrier to KRAS-Driven Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*, **29**(1), pp. 17-31.

SHARMA, S.V., LEE, D.Y., LI, B., QUINLAN, M.P., TAKAHASHI, F., MAHESWARAN, S., MCDERMOTT, U., AZIZIAN, N., ZOU, L., FISCHBACH, M.A., WONG, K., BRANDSTETTER, K., WITTNER, B., RAMASWAMY, S., CLASSON, M. and SETTLEMAN, J., 2010. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*, **141**(1), pp. 69-80.

SHAW, A.T., Dr, GANDHI, L., MD, GADGEEL, S., Prof, RIELY, G.J., MD, CETNAR, J., MD, WEST, H., MD, CAMIDGE, D.R., MD, SOCINSKI, M.A., Prof, CHIAPPORI, A., MD, MEKHAIL, T., MD, CHAO, B.H., MD, BORGHAELI, H., DO, GOLD, K.A., MD, ZEAITER, A., MD, BORDOGNA, W., PhD, BALAS, B., MD, PUIG, O., PhD, HENSCHHEL, V., PhD and OU, S.I., Prof, 2016. Alectinib in ALK -positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncology, The*, **17**(2), pp. 234-242.

SHAW, A.T., KIM, D., MEHRA, R., TAN, D.S.W., FELIP, E., CHOW, L.Q.M., CAMIDGE, D.R., VANSTEENKISTE, J., SHARMA, S., DE PAS, T., RIELY, G.J., SOLOMON, B.J., WOLF, J., THOMAS, M., SCHULER, M., LIU, G., SANTORO, A., LAU, Y.Y., GOLDWASSER, M., BORAL, A.L. and ENGELMAN, J.A., 2014. Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **370**(13), pp. 1189-1197.

SHAY, J.W. and WRIGHT, W.E., 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**(1), pp. 72-76.

SHEN, H., WANG, L., SPITZ, M.R., HONG, W.K., MAO, L. and WEI, Q., 2002. A Novel Polymorphism in Human Cytosine DNA-Methyltransferase-3B Promoter Is Associated with an Increased Risk of Lung Cancer. *Cancer Research*, **62**(17), pp. 4992.

SHERR, C.J. and MCCORMICK, F., 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, **2**(2), pp. 103-112.

SHOLL, L.M., YEAP, B.Y., IAFRATE, A.J., HOLMES-TISCH, A.J., CHOU, Y., WU, M., GOAN, Y., SU, L., BENEDETTINI, E., YU, J., LODA, M., JANNE, P.A., CHRISTIANI, D.C. and CHIRIEAC, L.R., 2009. Lung Adenocarcinoma with EGFR Amplification Has Distinct Clinicopathologic and Molecular Features in Never-Smokers. *Cancer Research*, **69**(21), pp. 8341-8348.

SIEMENS, H., JACKSTADT, R., HÜNTEN, S., KALLER, M., MENSSEN, A., GÖTZ, U. and HERMEKING, H., 2011. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*, **10**(24), pp. 4256-4271.

SIGAL, A. and ROTTER, V., 2000. Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Research*, **60**(24), pp. 6788.

SIMANSHU, D.K., NISSLEY, D.V. and MCCORMICK, F., 2017. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, **170**(1), pp. 17-33.

SINGH, A. and SETTLEMAN, J., 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, **29**(34), pp. 4741-4751.

SJOBLOM, T., JONES, S., WOOD, L.D., PARSONS, D.W., LIN, J., BARBER, T.D., MANDELKER, D., LEARY, R.J., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., BUCKHAULTS, P., FARRELL, C., MEEH, P., MARKOWITZ, S.D., WILLIS, J., DAWSON, D., WILLSON, J.K.V., GAZDAR, A.F., HARTIGAN, J., WU, L., LIU, C., PARMIGIANI, G., PARK, B.H., BACHMAN, K.E., PAPAPOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W. and VELCULESCU, V.E., 2006. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*, **314**(5797), pp. 268-274.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S. and BOYD, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**(13), pp. 1107-1112.

SKRYPEK, N., GOOSSENS, S., DE SMEDT, E., VANDAMME, N. and BERX, G., 2017. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics*, **33**(12), pp. 943-959.

SODA, M., CHOI, Y.L., ENOMOTO, M., TAKADA, S., YAMASHITA, Y., ISHIKAWA, S., FUJIWARA, S., WATANABE, H., KURASHINA, K., HATANAKA, H., BANDO, M., OHNO, S., ISHIKAWA, Y., ABURATANI, H., NIKI, T., SOHARA, Y., SUGIYAMA, Y. and MANO, H., 2007. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, **448**(7153), pp. 561-566.

SOLIT, D. and SAWYERS, C.L., 2010. Drug discovery How melanomas bypass new therapy. *Nature*, **468**(7326), pp. 902-903.

SONG, S., WALTER, V., KARACA, M., LI, Y., BARTLETT, C.S., SMIRAGLIA, D.J., SERBER, D., SPROUL, C.D., PLASS, C., ZHANG, J., HAYES, D.N., ZHENG, Y. and WEISSMAN, B.E., 2014. Gene Silencing Associated with SWI/SNF Complex Loss during NSCLC Development. *Molecular cancer research : MCR*, **12**(4), pp. 560-570.

SOPRANO, D.R., QIN, P. and SOPRANO, K.J., 2004. RETINOIC ACID RECEPTORS AND CANCERS. *Annual review of nutrition*, **24**(1), pp. 201-221.

SORIA, J., OHE, Y., VANSTEENKISTE, J., REUNGWETWATTANA, T., CHEWASKULYONG, B., LEE, S., LEE, K.H., DECHAPHUNKUL, A., IMAMURA, F., NOGAMI, N., KURATA, T., OKAMOTO, I., ZHOU, C.,

CHO, B.C., CHO, E.K., CHENG, Y., VOON, P.J., PLANCHARD, D., SU, W., GRAY, J.E., HODGE, R., MAROTTI, M., RUKAZENKOV, Y. and RAMALINGAM, S.S., 2018. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **378**(2), pp. 113-125.

SOUCHERAY, M., CAPELLETTI, M., PULIDO, I., KUANG, Y., PAWELETZ, C.P., BECKER, J.H., KIKUCHI, E., XU, C., PATEL, T.B., AL-SHAHROUR, F., CARRETERO, J., WONG, K., JÄNNE, P.A., SHAPIRO, G.I. and SHIMAMURA, T., 2015. Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer research*, **75**(20), pp. 4372-4383.

SPORN, M.B., 1991. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer research*, **51**(23 Pt 1), pp. 6215-6218.

STEVEN A. BELINSKY, KRISTEN J. NIKULA, STEPHEN B. BAYLIN and JEAN-PIERRE J. ISSA, 1996. Increased Cytosine DNA-Methyltransferase Activity is Target-Cell-Specific and an Early Event in Lung Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(9), pp. 4045-4050.

STRATTON, M.R., CAMPBELL, P.J. and FUTREAL, P.A., 2009. The cancer genome. *Nature*, **458**(7239), pp. 719-724.

SU JEONG LEE, HYO-SUNG JEON, JIN-SUNG JANG, SUN HA PARK, GA YOUNG LEE, BYUNG-HEON LEE, CHANG HO KIM, YOUNG MO KANG, WON KEE LEE, SIN KAM, RANG WOON PARK, IN-SAN KIM, YOUNG LAE CHO, TAE HOON JUNG and JAE YONG PARK, 2005. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis*, **26**(2), pp. 403.

SUDA, K., TOMIZAWA, K., FUJII, M., MURAKAMI, H., OSADA, H., MAEHARA, Y., YATABE, Y., SEKIDO, Y. and MITSUDOMI, T., 2011. Epithelial to Mesenchymal Transition in an Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Cancer Cell Line with Acquired Resistance to Erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, **6**(7), pp. 1152-1161.

SUI, A., XU, Y., YANG, J., PAN, B., WU, J., GUO, X., GUO, T. and SHEN, Y., 2019. The histone H3 Lys 27 demethylase KDM6B promotes migration and invasion of glioma cells partly by regulating the expression of SNAI1. *Neurochemistry International*, **124**, pp. 123-129.

SUN, Q., DING, L., XIAO, J., CHIEN, W., LIM, S., HATTORI, N., GOODGLICK, L., CHIA, D., MAH, V., ALAVI, M., KIM, S.R., DOAN, N.B., SAID, J.W., LOH, X., XU, L., LIU, L., YANG, H., HAYANO, T., SHI, S., XIE,

D., LIN, D. and KOEFFLER, H.P., 2015. SETDB1 accelerates tumourigenesis by regulating the WNT signalling pathway. *The Journal of Pathology*, **235**(4), pp. 559-570.

SURESH S. RAMALINGAM, MICHAEL L. MAITLAND, PAUL FRANKEL, ATHANASSIOS E. ARGIRIS, MARIANNA KOCZYWAS, BARBARA GITLITZ, SACHDEV THOMAS, IGOR ESPINOZA-DELGADO, EVERETT E. VOKES, DAVID R. GANDARA and CHANDRA P. BELANI, 2010. Carboplatin and Paclitaxel in Combination With Either Vorinostat or Placebo for First-Line Therapy of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **28**(1), pp. 56-62.

SUZUKI, M., SUNAGA, N., SHAMES, D.S., TOYOOKA, S., GAZDAR, A.F. and MINNA, J.D., 2004. RNA Interference-Mediated Knockdown of DNA Methyltransferase 1 Leads to Promoter Demethylation and Gene Re-Expression in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, **64**(9), pp. 3137-3143.

SWANTON, C. and GOVINDAN, R., 2016. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **374**(19), pp. 1864-1873.

TAGAL, V., WEI, S., ZHANG, W., BREKKEN, R.A., POSNER, B.A., PEYTON, M., GIRARD, L., HWANG, T., WHEELER, D.A., MINNA, J.D., WHITE, M.A., GAZDAR, A.F. and ROTH, M.G., 2017. SMARCA4-inactivating mutations increase sensitivity to Aurora kinase A inhibitor VX-680 in non-small cell lung cancers. *Nature communications*, **8**(1), pp. 14098.

TAKEZAWA, K., PIRAZZOLI, V., ARCILA, M.E., NEBHAN, C.A., SONG, X., DE STANCHINA, E., OHASHI, K., JANJIGIAN, Y.Y., SPITZLER, P.J., MELNICK, M.A., RIELY, G.J., KRIS, M.G., MILLER, V.A., LADANYI, M., POLITI, K. and PAO, W., 2012. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer discovery*, **2**(10), pp. 922.

TALMADGE, J.E. and FIDLER, I.J., 2010. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer research*, **70**(14), pp. 5649-5669.

TAM, W.L. and WEINBERG, R.A., 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, **19**(11), pp. 1438-1449.

TANG, B., QI, G., TANG, F., YUAN, S., WANG, Z., LIANG, X., LI, B., YU, S., LIU, J., HUANG, Q., WEI, Y., ZHAI, R., LEI, B., YU, H., TOMLINSON, S. and HE, S., 2016. Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote

Migration, Invasion, and Stem Cell–Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer research*, **76**(22), pp. 6520-6532.

TANG, D., PHILLIPS, D.H., STAMPFER, M., MOONEY, L.A., HSU, Y., CHO, S., TSAI, W., MA, J., COLE, K.J., SHE, M.N. and PERERA, F.P., 2001. Association between Carcinogen-DNA Adducts in White Blood Cells and Lung Cancer Risk in the Physicians Health Study. *Cancer Research*, **61**(18), pp. 6708.

TANG, S.C., NGUYEN, L.N., SPARIDANS, R.W., WAGENAAR, E., BEIJNEN, J.H. and SCHINKEL, A.H., 2014. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *International Journal of Cancer*, **134**(6), pp. 1484-1494.

TAUBE, J.H., SPHYRIS, N., JOHNSON, K.S., REISENAUER, K.N., NESBIT, T.A., JOSEPH, R., VIJAY, G.V., SARKAR, T.R., BHANGRE, N.A., SONG, J.J., CHANG, J.T., LEE, M.G., SOUNDARARAJAN, R. and MANI, S.A., 2017. The H3K27me3-demethylase KDM6A is suppressed in breast cancer stem-like cells, and enables the resolution of bivalency during the mesenchymal-epithelial transition. *Oncotarget*, **8**(39), pp. 65548-65565.

TAYLOR, M., PARVANI, J. and SCHIEMANN, W., 2010. The Pathophysiology of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- β in Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **15**(2), pp. 169-190.

TENENG, I., TELLEZ, C.S., PICCHI, M.A., KLINGE, D.M., YINGLING, C.M., SNIDER, A.M., LIU, Y. and BELINSKY, S.A., 2015. Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene*, **34**(5), pp. 621-630.

TERASHIMA, M., ISHIMURA, A., WANNA-UDOM, S. and SUZUKI, T., 2017. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by KDM6A histone demethylase in lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **490**(4), pp. 1407-1413.

THATCHER, N., Prof, HIRSCH, F.R., Prof, LUFT, A.V., MD, SZCZESNA, A., MD, CIULEANU, T.E., Prof, DEDIU, M., MD, RAMLAU, R., Prof, GALIULIN, R.K., MD, BÁLINT, B., MD, LOSONCZY, G., Prof, KAZARNOWICZ, A., MD, PARK, K., MD, SCHUMANN, C., Prof, RECK, M., MD, DEPENBROCK, H., MD, NANDA, S., MS, KRULJAC-LETUNIC, A., PhD, KUREK, R., MD, PAZ-ARES, L., MD and SOCINSKI, M.A., Prof, 2015. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-

small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncology, The*, **16**(7), pp. 763-774.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, **514**(7521), pp. 262.

THIERY, J.P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, **2**(6), pp. 442-454.

THIERY, J.P., ACLOQUE, H., HUANG, R.Y.J. and NIETO, M.A., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, **139**(5), pp. 871-890.

THRESS, K.S., PAWELETZ, C.P., FELIP, E., CHO, B.C., STETSON, D., DOUGHERTY, B., LAI, Z., MARKOVETS, A., VIVANCOS, A., KUANG, Y., ERCAN, D., MATTHEWS, S.E., CANTARINI, M., BARRETT, J.C., JÄNNE, P.A. and OXNARD, G.R., 2015. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature medicine*, **21**(6), pp. 560-562.

TIMP, W. and FEINBERG, A.P., 2013. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature reviews. Cancer*, **13**(7), pp. 497-510.

TIWARI, N., TIWARI, V., WALDMEIER, L., BALWIERZ, P., ARNOLD, P., PACHKOV, M., MEYER-SCHALLER, N., SCHÜBELER, D., VAN NIMWEGEN, E. and CHRISTOFORI, G., 2013. Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell*, **23**(6), pp. 768-783.

TOMASETTI, C., LI, L. and VOGELSTEIN, B., 2017. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science (New York, N.Y.)*, **355**(6331), pp. 1330-1334.

TONG, Z., CAI, M., WANG, X., KONG, L., MAI, S., LIU, Y., ZHANG, H., LIAO, Y., ZHENG, F., ZHU, W., LIU, T., BIAN, X., GUAN, X., LIN, M.C., ZENG, M., ZENG, Y., KUNG, H. and XIE, D., 2012. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1 HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene*, **31**(5), pp. 583-594.

TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., BRAMBILLA, C., NOGUCHI, M., NICHOLSON, A.G., GEISINGER, K.R., YATABE, Y., BEER, D.G., POWELL, C.A., RIELY, G.J., VAN SCHIL, P.E., GARG, K., AUSTIN, J.H.M.,

ASAMURA, H., RUSCH, V.W., HIRSCH, F.R., SCAGLIOTTI, G., MITSUDOMI, T., HUBER, R.M., ISHIKAWA, Y., JETT, J., SANCHEZ-CESPEDES, M., SCULIER, J., TAKAHASHI, T., TSUBOI, M., VANSTEENKISTE, J., WISTUBA, I., YANG, P., ABERLE, D., FLIEDER, D., FRANKLIN, W., GAZDAR, A., GOULD, M., HASLETON, P., HENDERSON, D., JOHNSON, D., JOHNSON, B., KERR, K., KURIYAMA, K., LEE, J.S., MILLER, V.A., PETERSEN, I., ROGGLI, V., ROSELL, R., SAIJO, N., THUNNISSEN, E., TSAO, M. and YANKELEWITZ, D., 2011. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, **6**(2), pp. 244-285.

TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., NICHOLSON, A.G., YATABE, Y., AUSTIN, J.H.M., BEASLEY, M.B., CHIRIEAC, L.R., DACIC, S., DUHIG, E., FLIEDER, D.B., GEISINGER, K., HIRSCH, F.R., ISHIKAWA, Y., KERR, K.M., NOGUCHI, M., PELOSI, G., POWELL, C.A., TSAO, M.S. and WISTUBA, I., 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, **10**(9), pp. 1243-1260.

TRAYNOR, A.M., DUBEY, S., EICKHOFF, J.C., KOLESAR, J.M., SCHELL, K., HUIE, M.S., GROTELUSCHEN, D.L., MARCOTTE, S.M., HALLAHAN, C.M., WEEKS, H.R., WILDING, G., ESPINOZA-DELGADO, I. and SCHILLER, J.H., 2009. Vorinostat (NSC# 701852) in Patients with Relapsed Non-small Cell Lung Cancer: A Wisconsin Oncology Network Phase II Study. *Journal of Thoracic Oncology*, **4**(4), pp. 522-526.

TRIMBOLI, A.J., FUKINO, K., DE BRUIN, A., WEI, G., SHEN, L., TANNER, S.M., CREASAP, N., ROSOL, T.J., ROBINSON, M.L., ENG, C., OSTROWSKI, M.C. and LEONE, G., 2008. Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer. *Cancer Research*, **68**(3), pp. 937-945.

TSAI, J., DONAHER, J., MURPHY, D., CHAU, S. and YANG, J., 2012. Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell*, **22**(6), pp. 725-736.

TSOU, J.A., GALLER, J.S., SIEGMUND, K.D., LAIRD, P.W., TURLA, S., COZEN, W., HAGEN, J.A., KOSS, M.N. and LAIRD-OFFRINGA, I.A., 2007. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Molecular cancer*, **6**(1), pp. 70.

UCHIBORI, K., INASE, N., ARAKI, M., KAMADA, M., SATO, S., OKUNO, Y., FUJITA, N. and KATAYAMA, R., 2017. Brigatinib combined with anti-

EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature communications*, **8**(1), pp. 14768.

VANDER HEIDEN, M.G., CANTLEY, L.C. and THOMPSON, C.B., 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, **324**(5930), pp. 1029-1033.

VANSTEENKISTE, J., VAN CUTSEM, E., DUMEZ, H., CHEN, C., RICKER, J., RANDOLPH, S. and SCHÖFFSKI, P., 2008. Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. *Investigational New Drugs*, **26**(5), pp. 483-488.

VEGA, S., MORALES, A.V., OCAÑA, O.H., VALDÉS, F., FABREGAT, I. and NIETO, M.A., 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development*, **18**(10), pp. 1131-1143.

VERMEULEN, L., DE SOUSA E MELO, FELIPE, VAN DER HEIJDEN, M., CAMERON, K., DE JONG, J.H., BOROVSKI, T., TUYNMAN, J.B., TODARO, M., MERZ, C., RODERMOND, H., SPRICK, M.R., KEMPER, K., RICHEL, D.J., STASSI, G. and MEDEMA, J.P., 2010. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology*, **12**(5), pp. 468-U121.

VICHAI, V. and KIRTIKARA, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, **1**(3), pp. 1112-1116.

VIRMANI, A.K., RATHI, A., ZÖCHBAUER-MÜLLER, S., SACCHI, N., FUKUYAMA, Y., BRYANT, D., MAITRA, A., HEDA, S., FONG, K.M., THUNNISSEN, F., MINNA, J.D. and GAZDAR, A.F., 2000. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**(16), pp. 1303.

VOIGT, W., 2005. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in molecular medicine*, **110**, pp. 39.

WALTER, K., HOLCOMB, T., JANUARIO, T., DU, P., EVANGELISTA, M., KARTHA, N., INIGUEZ, L., SORIANO, R., HUW, L., STERN, H., MODRUSAN, Z., SESHAGIRI, S., HAMPTON, G.M., AMLER, L.C., BOURGON, R., YAUCH, R.L. and SHAMES, D.S., 2012. DNA Methylation Profiling Defines Clinically Relevant Biological Subsets of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **18**(8), pp. 2360-2373.

WANG, C., WANG, T., LV, D., LI, L., YUE, J., CHEN, H. and XU, L., 2019. Acquired Resistance to EGFR TKIs Mediated by TGFβ1/Integrin β3 Signaling

in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **18**(12), pp. 2357-2367.

WANG, J., SCULLY, K., ZHU, X., CAI, L., ZHANG, J., PREFONTAINE, G.G., KRONES, A., OHGI, K.A., ZHU, P., GARCIA-BASSETS, I., LIU, F., TAYLOR, H., LOZACH, J., JAYES, F.L., KORACH, K.S., GLASS, C.K., FU, X. and ROSENFELD, M.G., 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*, **446**(7138), pp. 882-887.

WANG, L., WANG, S., TANG, Z., CHEN, C., SHIMADA, M., KOEHE, R.P., NAKADAI, T., CHRAMIEC, A., KRIVTSOV, A.V., ARMSTRONG, S.A. and ROEDER, R.G., 2017. A UTX-MLL4-p300 Transcriptional Regulatory Network Coordinately Shapes Active Enhancer Landscapes for Eliciting Transcription. *Molecular Cell*, **67**(2), pp. 308-321.e6.

WANG, L., DONG, X., REN, Y., LUO, J., LIU, P., SU, D. and YANG, X., 2018. Targeting EHMT2 reverses EGFR-TKI resistance in NSCLC by epigenetically regulating the PTEN/AKT signaling pathway. *Cell death & disease*, **9**(2), pp. 129-13.

WANG, Z., MONTEIRO, C.D., JAGODNIK, K.M., FERNANDEZ, N.F., GUNDERSEN, G.W., ROUILLARD, A.D., JENKINS, S.L., FELDMANN, A.S., HU, K.S., MCDERMOTT, M.G., DUAN, Q., CLARK, N.R., JONES, M.R., KOU, Y., GOFF, T., WOODLAND, H., AMARAL, F.M.R., SZETO, G.L., FUCHS, O., SCHÜSSLER-FIORENZA ROSE, S.M., SHARMA, S., SCHWARTZ, U., BAUSELA, X.B., SZYMKIEWICZ, M., MAROULIS, V., SALYKIN, A., BARRA, C.M., KRUTH, C.D., BONGIO, N.J., MATHUR, V., TODORIC, R.D., RUBIN, U.E., MALATRAS, A., FULP, C.T., GALINDO, J.A., MOTIEJUNAITE, R., JÜSCHKE, C., DISHUCK, P.C., LAHL, K., JAFARI, M., AIBAR, S., ZARAVINOS, A., STEENHUIZEN, L.H., ALLISON, L.R., GAMALLO, P., DE ANDRES SEGURA, F., DAE DEVLIN, T., PÉREZ-GARCÍA, V. and MA'AYAN, A., 2016. Extraction and analysis of signatures from the Gene Expression Omnibus by the crowd. *Nature communications*, **7**(1), pp. 12846.

WARBURG OTTO, 1956a. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, **124**(3215), pp. 269.

WARBURG OTTO, 1956b. On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, pp. 309-314.

WARBURG, O.H., 1930. *The metabolism of tumours; investigations from the Kaiser Wilhelm institute for biology, Berlin-Dahlem.*

WARD, R.A., ANDERTON, M.J., ASHTON, S., BETHEL, P.A., BOX, M., BUTTERWORTH, S., COLCLOUGH, N., CHORLEY, C.G., CHUAQUI, C., CROSS, D.A.E., DAKIN, L.A., DEBRECZENI, J.E., EBERLEIN, C., FINLAY, M.R.V., HILL, G.B., GRIST, M., KLINOWSKA, T.C.M., LANE, C., MARTIN, S., ORME, J.P., SMITH, P., WANG, F. and WARING, M.J., 2013. Structure- and Reactivity-Based Development of Covalent Inhibitors of the Activating and Gatekeeper Mutant Forms of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**(17), pp. 7025-7048.

WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M.B., RAMOS, L., PAABO, S., REBHAN, M. and SCHUBELER, D., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, **39**(4), pp. 457-466.

WEINSTEIN, R.S., MERK, F.B. and ALROY, J., 1976. The Structure and Function of Intercellular Junctions in Cancer. *Advances in Cancer Research*. United States: Elsevier Science & Technology, pp. 23-89.

WELLNER, U., SCHUBERT, J., BURK, U.C., SCHMALHOFER, O., ZHU, F., SONNTAG, A., WALDVOGEL, B., VANNIER, C., DARLING, D., ZUR HAUSEN, A., BRUNTON, V.G., MORTON, J., SANSOM, O., SCHÜLER, J., STEMMLER, M.P., HERZBERGER, C., HOPT, U., KECK, T., BRABLETZ, S. and BRABLETZ, T., 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology*, **11**(12), pp. 1487-1495.

WENG, C., CHEN, L., LIN, Y., SHIH, J., LIN, Y., TSENG, R., CHIU, A., YEH, Y., LIU, C., LIN, Y., FANG, J. and CHEN, C., 2019. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*, **38**(4), pp. 455-468.

WICHA, M.S., LIU, S. and DONTU, G., 2006. Cancer Stem Cells: An Old Idea-A Paradigm Shift. *Cancer Research*, **66**(4), pp. 1883-1890.

WILLETT, C.G., BOUCHER, Y., DI TOMASO, E., DUDA, D.G., MUNN, L.L., TONG, R.T., CHUNG, D.C., SAHANI, D.V., KALVA, S.P., KOZIN, S.V., MINO, M., COHEN, K.S., SCADDEN, D.T., HARTFORD, A.C., FISCHMAN, A.J., CLARK, J.W., RYAN, D.P., ZHU, A.X., BLASZKOWSKY, L.S., CHEN, H.X., SHELLITO, P.C., LAUWERS, G.Y. and JAIN, R.K., 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine*, **10**(2), pp. 145-147.

WILLIAMSON, S.K., CROWLEY, J.J., LIVINGSTON, R.B., PANELLA, T.J. and GOODWIN, J.W., 1995. Phase II trial and cost analysis of fazarabine in

advanced non-small cell carcinoma of the lung: A southwest oncology group study. *Investigational new drugs*, **13**(1), pp. 67-71.

WILLIS, S.N. and ADAMS, J.M., 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**(6), pp. 617-625.

XU XIAO-CHUN, SOZZI GABRIELLA, LEE JIN, S. and LEE J JACK, 1997. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: Implications for lung cancer development. *Journal of the National Cancer Institute*, **89**(9), pp. 624.

XU, J., LAMOUILLE, S. and DERYNCK, R., 2009. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, **19**(2), pp. 156-172.

XU, Y., LI, Q., LI, X., YANG, Q., XU, W. and LIU, G., 2012. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, **31**(1), pp. 16.

YAN, H., PARSONS, D.W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B.A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S., RIGGINS, G.J., FRIEDMAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J., KINZLER, K.W., VELCULESCU, V.E., VOGELSTEIN, B. and BIGNER, D.D., 2009. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine*, **360**(8), pp. 765-773.

YAN, N., XU, L., WU, X., ZHANG, L., ZHANG, F., FEI, X. and CAO, Y., 2017. GSKJ4, an H3K27me3 demethylase inhibitor, effectively suppresses the breast cancer stem cells. *Experimental Cell Research*, **359**(2), pp. 405-414.

YANG, M., WU, M., CHIOU, S., CHEN, P., CHANG, S., LIU, C., TENG, S. and WU, K., 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature cell biology*, **10**(3), pp. 295.

YANG, Q., WANG, R., XIAO, W., SUN, F., YUAN, H. and PAN, Q., 2016. Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 Is Strikingly Downregulated in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Functions as a Tumor Suppressor. *PloS one*, **11**(2), pp. e0148381.

YARDENA SAMUELS, ZHENGHE WANG, ALBERTO BARDELLI, NATALIE SILLIMAN, JANINE PTAK, STEVE SZABO, HAI YAN, ADI GAZDAR, STEVEN M. POWELL, GREGORY J. RIGGINS, JAMES K. V. WILLSON, SANFORD MARKOWITZ, KENNETH W. KINZLER, BERT VOGELSTEIN and VICTOR E. VELCULESCU, 2004. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*, **304**(5670), pp. 554.

YE, J., FINDEIS-HOSEY, J.J., YANG, Q., MCMAHON, L.A., YAO, J.L., LI, F. and XU, H., 2011. Combination of Napsin A and TTF-1 Immunohistochemistry Helps in Differentiating Primary Lung Adenocarcinoma From Metastatic Carcinoma in the Lung. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, **19**(4), pp. 313-317.

YE, X. and WEINBERG, R.A., 2015. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*, **25**(11), pp. 675-686.

YIM, H.W., SLEBOS, R.J.C., RANDELL, S.H., UMBACH, D.M., PARSONS, A.M., RIVERA, M.P., DETTERBECK, F.C. and TAYLOR, J.A., 2007. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Letters*, **246**(1), pp. 24-33.

YOSHIDA, T., SONG, L., BAI, Y., KINOSE, F., LI, J., OHAEGBULAM, K.C., MUÑOZ-ANTONIA, T., QU, X., ESCHRICH, S., URAMOTO, H., TANAKA, F., NASARRE, P., GEMMILL, R.M., ROCHE, J., DRABKIN, H.A. and HAURA, E.B., 2016. ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one*, **11**(1), pp. e0147344.

YU, H.A., ARCILA, M.E., REKHTMAN, N., SIMA, C.S., ZAKOWSKI, M.F., PAO, W., KRIS, M.G., MILLER, V.A., LADANYI, M. and RIELY, G.J., 2013. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **19**(8), pp. 2240-2247.

YU, W., LU, W., CHEN, G., CHENG, F., SU, H., CHEN, Y., LIU, M. and PANG, X., 2017. Inhibition of histone deacetylases sensitizes EGF receptor-TK inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer cells to erlotinib in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, **174**(20), pp. 3608-3622.

YUAN, X., JI, W., CHEN, S., BAO, Y., TAN, S., LU, S., WU, K. and CHU, Q., 2016. A novel paclitaxel-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide)-Tween 80 copolymer nanoparticle overcoming multidrug resistance for lung cancer treatment. *International journal of nanomedicine*, **11**(default), pp. 2119-2131.

ZAVADIL, J. and BÖTTINGER, E.P., 2005. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, **24**(37), pp. 5764-5774.

ZEISBERG, M. and NEILSON, E.G., 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, **119**(6), pp. 1429-1437.

ZHANG, H., QI, J., REYES, J.M., LI, L., RAO, P.K., LI, F., LIN, C.Y., PERRY, J.A., LAWLOR, M.A., FEDERATION, A., DE RAEDT, T., LI, Y.Y., LIU, Y., DUARTE, M.A., ZHANG, Y., HERTER-SPRIE, G.S., KIKUCHI, E., CARRETERO, J., PEROU, C.M., REIBEL, J.B., PAULK, J., BRONSON, R.T., WATANABE, H., BRAINSON, C.F., KIM, C.F., HAMMERMAN, P.S., BROWN, M., CICHOWSKI, K., LONG, H., BRADNER, J.E. and WONG, K., 2016. Oncogenic Deregulation of EZH2 as an Opportunity for Targeted Therapy in Lung Cancer. *Cancer discovery*, **6**(9), pp. 1006-1021.

ZHANG, M.Q., ZHANG, Y., MA, X., SATHE, A., FUJIMOTO, J., WISTUBA, I.I., LAM, S., YATABE, Y., WANG, Y., STASTNY, V., GAO, B., LARSEN, J.E., GIRARD, L., LIU, X., SONG, K., BEHRENS, C., KALHOR, N., XIE, Y., MINNA, J.D. and GAZDAR, A.F., 2016. Validation of SCT Methylation as a Hallmark Biomarker for Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, **11**(3), pp. 346-360.

ZHANG, X., LIU, Y., LEE, M. and PFAHL, M., 1994. A Specific Defect in the Retinoic Acid Response Associated with Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, **54**(21), pp. 5663.

ZHANG, Y., ZHENG, Y., WANG, J., LU, X., WANG, Z., CHEN, L., GUAN, X. and TONG, J., 2014. Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Epigenetics*, **9**(6), pp. 896-909.

ZHENG, H., ZHAO, W., YAN, C., WATSON, C.C., MASSENGILL, M., XIE, M., MASSENGILL, C., NOYES, D.R., MARTINEZ, G.V., AFZAL, R., CHEN, Z., REN, X., ANTONIA, S.J., HAURA, E.B., RUFFELL, B. and BEG, A.A., 2016. HDAC Inhibitors Enhance T-Cell Chemokine Expression and Augment Response to PD-1 Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **22**(16), pp. 4119-4132.

ZHENG, X., CARSTENS, J.L., KIM, J., SCHEIBLE, M., KAYE, J., SUGIMOTO, H., WU, C., LEBLEU, V.S. and KALLURI, R., 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, **527**(7579), pp. 525-530.

ZHOU, W., CHEN, H. and ZHANG, L., 2009. The PcG protein hPc2 interacts with the N-terminus of histone demethylase JARID1B and acts as a transcriptional co-repressor. *BMB reports*, **42**(3), pp. 154-159.