



UNIVERSITAT DE BARCELONA

EPHA2 com a diana terapèutica pel sarcoma d'Ewing

Silvia Garcia Monclús

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**EPHA2 COM A DIANA
TERAPÈUTICA PEL
SARCOMA D'EWING**

**Silvia Garcia Monclús
TESI DOCTORAL**

Programa de Doctorat en Biomedicina
Universitat de Barcelona, Facultat de Biologia

**EPHA2 com a diana terapèutica
pel sarcoma d'Ewing
(EXEMPLAR XIFRAT)**

Memòria presentada per Silvia Garcia Monclús per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona.

Tesi realitzada al Grup de Recerca en Sarcomes de l'Institut
d'Investigació Biomèdica de Bellvitge sota la direcció del Dr. Òscar
Martínez Tirado i la tutoria de la Dra. Gemma Marfany Nadal.

Silvia Garcia Monclús

Dr. Òscar Martínez Tirado

Dra. Gemma Marfany Nadal

Barcelona, 2017

Aquesta tesi ha estat possible gràcies al finançament de la Fundación Alba Pérez i d'un projecte EuroNanoMed2 gestionat a través del *Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII).



Taula de continguts

| | |
|--|----|
| LLISTAT D'ABREVIATURES | 13 |
| INTRODUCCIÓ | 15 |
| 1. Sarcomes..... | 17 |
| 2. Sarcoma d'Ewing..... | 18 |
| 2.1. Aspectes històrics | 18 |
| 2.2. Epidemiologia i pronòstic..... | 19 |
| 2.3. Manifestació clínica | 20 |
| 2.4. Cèl·lula d'origen | 22 |
| 2.5. Translocacions cromosòmiques: <i>EWS-FLI1</i> | 23 |
| 2.6. Altres alteracions genètiques..... | 28 |
| 2.7. Diagnòstic | 30 |
| 2.8. Tractament | 32 |
| 2.9. Noves aproximacions terapèutiques..... | 34 |
| 3. Receptors tirosina quinasa..... | 38 |
| 3.1. Subfamília Eph | 41 |
| 3.1.1. Estratègies per inhibir la senyalització efrina-receptor..... | 45 |
| 3.1.2. El receptor EPHA2..... | 48 |
| 3.1.2.1. Senyalització d'EPHA2 independent de lligand | 51 |
| 3.1.2.2. Funció oncogènica o supressora d'EPHA2 en càncer..... | 52 |
| 3.1.2.3. Inhibició terapèutica d'EPHA2 | 55 |

| | |
|--|-----------|
| HIPÒTESI I OBJECTIUS | 57 |
| 1. Hipòtesi..... | 59 |
| 2. Objectius | 59 |
| | |
| MATERIALS I MÈTODES | 61 |
| 1. Línies cel·lulars | 63 |
| 1.1. Condicions de cultiu..... | 63 |
| 1.2. Recompte cel·lular | 63 |
| 1.3. Criopreservació de línies cel·lulars..... | 66 |
| 1.4. Obtenció de pèl·lets cel·lulars..... | 66 |
| 2. Tractaments amb compostos químics | 66 |
| 2.1. Inhibidors de la via d'ERK1/2 | 67 |
| 2.2. Inhibidors de la via d'AKT..... | 67 |
| 2.3. (Contingut xifrat)..... | 67 |
| 3. Amplificació de plasmidis..... | 68 |
| 3.1. Transformació bacteriana | 68 |
| 3.2. Cultiu de bacteris | 68 |
| 3.3. Digestió amb enzims de restricció | 69 |
| 3.4. Electroforesi d'àcids nucleics | 70 |
| 4. Mutagènesi dirigida | 70 |
| 5. Transfeccions estables i selecció de clons..... | 70 |
| 6. Transfeccions transitòries | 72 |
| 7. Anàlisi de l'expressió gènica..... | 73 |
| 7.1. Extracció d'ARNm | 73 |

| | |
|--|----|
| 7.2. Obtenció d'ADN complementari per retrotranscripció..... | 73 |
| 7.3. PCR quantitativa a temps real..... | 74 |
| 8. Anàlisi de l'expressió proteica per <i>western blot</i> | 75 |
| 8.1. Extracció de proteïna | 75 |
| 8.2. Quantificació de proteïna | 75 |
| 8.3. Western blot..... | 76 |
| 9. Anàlisi de l'expressió proteica per immunohistoquímica..... | 78 |
| 9.1. Preparació i tall de blocs de parafina | 78 |
| 9.2. Immunohistoquímica | 78 |
| 10. Anàlisi d'interacció proteica per immunoprecipitació | 79 |
| 10.1. Extracció de proteïna | 79 |
| 10.2. Immunoprecipitació..... | 80 |
| 11. Immunofluorescència | 80 |
| 12. Assaig clonogènic | 81 |
| 13. Assaig de proliferació cel·lular | 82 |
| 14. Assaig de migració cel·lular | 82 |
| 15. Assaig d'invasió cel·lular..... | 84 |
| 15.1. Càmera de Boyden..... | 84 |
| 15.2. RTCA xCELLigence | 84 |
| 16. Zimograma | 85 |
| 17. Anàlisi d'expressió gènica – <i>microarray</i> | 86 |
| 18. Assajos <i>in vivo</i> amb ratolins immunodeprimits..... | 87 |
| 18.1. Manteniment dels animals | 87 |

| | |
|--|-----------|
| 18.2. Creixement tumoral mitjançant inducció de tumors subcutanis | 87 |
| 18.3. Assaig de metàstasi experimental intravenós..... | 88 |
| 18.4. Assaig de metàstasi ortotòpic..... | 89 |
| 19. Anàlisi estadística..... | 90 |
| 20. Equips, material fungible i reactius..... | 90 |
| 20.1. Equipament..... | 91 |
| 20.2. Material fungible..... | 91 |
| 20.3. Reactius | 92 |
| RESULTATS | 97 |
| 1. Àmplia expressió d'EPHA2 en línies de SE..... | 99 |
| 2. Correlació positiva entre EPHA2 i el fenotip neoplàsic en línies de SE | 100 |
| 3. La via de senyalització d'ERK1/2 és responsable de la fosforilació d'EPHA2 en el residu S897 i existeix una retroalimentació positiva entre les dues proteïnes..... | 102 |
| 4. CAV1 i IQGAP1 regulen la fosforilació del residu S897 d'EPHA2 | 105 |
| 5. Efectes de la sobreexpressió d'EPHA2 en línies de SE. Paper clau del residu S897 | 108 |
| 7. El silenciament d'EPHA2 en línies de SE inhibeix el creixement tumoral <i>in vivo</i> | 116 |
| 8. Desenvolupament d'un model de metàstasi ortotòpic..... | 118 |
| 9. El silenciament d'EPHA2 en línies de SE disminueix la incidència de metàstasis <i>in vivo</i> | 120 |

| | |
|--|------------|
| 10. El silenciament d' <i>EPHA2</i> en línies de SE altera l'expressió d'un grup de gens implicats en senyalització, moviment i supervivència cel·lular | 123 |
| 11. La proteïna ADAM19 està implicada en la capacitat migratòria de les cèl·lules de SE..... | 133 |
| 12. Àmplia expressió d' <i>EPHA2</i> en línies de rabdomiosarcoma | 134 |
| 13. ERK1/2 és responsable de la fosforilació del residu S897 d' <i>EPHA2</i> en línies de RMS..... | 135 |
| 14. <i>EPHA2</i> també promou el fenotip neoplàsic en línies de RMS..... | 137 |
| DISCUSSIÓ | 141 |
| 1. Connexió entre <i>EPHA2</i> , la fosforilació del residu S897 i el fenotip agressiu de les cèl·lules de SE | 143 |
| 2. Senyalització d' <i>EPHA2</i> en SE: rellevància d'ERK1/2, CAV1 i IQGAP1. | 146 |
| 3. El silenciament d' <i>EPHA2</i> reverteix el fenotip neoplàsic i el potencial metastàtic de les cèl·lules de SE i regula l'expressió d'un grup de gens implicats en senyalització, moviment i supervivència cel·lular | 151 |
| 4. <i>EPHA2</i> també juga un paper oncogènic en un altre tipus de sarcoma pediàtric..... | 160 |
| 5. (Contingut xifrat)..... | 162 |
| 6. Resum general | 162 |
| CONCLUSIONS | 163 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 163 |
| ANNEX | |

Llistat d'abreviatures

| | |
|----------------|--|
| ADN | àcid desoxiribonucleic |
| ADNc | ADN complementari |
| ARN | àcid ribonucleic |
| ARNlnc | ARN llarg no codificant |
| ARNm | ARN missatger |
| ARNmi | microARN |
| ARNsh | ARN <i>short-hairpin</i> |
| ARNsi | ARN petit d'interferència |
| CAV1 | caveolina-1 |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DMSO | dimetil sulfòxid |
| ERK1/2 | <i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i> |
| FBS | sèrum boví fetal |
| IQGAP1 | <i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i> |
| P/S | penicil·lina/estreptomicina |
| PBS | tampó fosfat salí |
| PCR | reacció en cadena de la polimerasa |
| PDZ | <i>postsynaptic density protein, Disks large, Zona occludens</i> |
| p-EPHA2 | EPHA2 fosforilat al residu S897 |
| RMS | rabdomiosarcoma |
| RPMI | RPMI 1640 |

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| RTK | receptors tirosina quinasa |
| RT-qPCR | retrotranscripció i PCR quantitativa |
| S897 | serina 897 d'EPHA2 |
| SAM | <i>sterile alpha motif</i> |
| SE | sarcoma d'Ewing |
| SH2 | <i>Src homology-2</i> |

Introducció

1. SARCOMES

Els sarcomes són un grup heterogeni de tumors malignes d'origen mesenquimal. Aquests tumors són poc freqüents i afecten pacients de totes les edats¹⁻³; tot i que alguns subtipus són més freqüents en nens i adolescents^{4,5}. Fonamentalment, els sarcomes es classifiquen en sarcomes de parts toves i sarcomes ossis, essent l'osteosarcoma i el sarcoma d'Ewing (SE) els que tenen una major incidència respectivament dins d'aquest últim grup¹.

Des del punt de vista histològic, els sarcomes comprenen més de 100 entitats diferents³, fet que complica la classificació i el correcte diagnòstic d'aquests pacients. A nivell molecular, els sarcomes es divideixen en: a) tumors amb cariotips pràcticament diploides amb mutacions puntuals i/o translocacions recíproques específiques (com per exemple mutacions en el gen *KIT* en sarcoma gastrointestinal o la translocació *EWS-FLI1* en SE); i b) tumors amb cariotips complexos no balancejats, amb múltiples guanys i pèrdues de material genètic^{6,7}.

En els darrers anys, s'han introduït modificacions en el tractament d'aquests tumors que han aconseguit millorar el pronòstic de la malaltia¹. Malgrat això, les combinacions terapèutiques testades pels pacients amb metàstasi segueixen sent insuficients, ja que aquests encara tenen una taxa de supervivència baixa^{1,2}. Aquest fet posa de manifest la necessitat de desenvolupar estudis moleculars més detallats que permetin millorar les teràpies disponibles^{2,8}.

En aquest context, aquesta tesi se centra en l'estudi d'un d'aquests sarcomes: el SE.

2. SARCOMA D'EWING

El SE és el segon tumor ossi més freqüent en nens i adolescents, per darrere de l'osteosarcoma, tot i que també pot afectar teixits tous^{9,10}. Aquest tumor maligne pertany a la família de tumors del SE que també inclou altres neoplàsies de cèl·lules petites i rodones, com els tumors neuroectodèrmics primitius perifèrics (PNET) o els tumors d'Askin^{9,11}.

2.1. ASPECTES HISTÒRICS

L'any 1921, el patòleg James Ewing va descriure al radi d'una adolescent de 14 anys un tumor de cèl·lules petites i rodones, que va anomenar endotelioma difús de l'os¹². En aquest estudi, descrivia que era un tipus de tumor diferent d'altres tipus de càncers coneguts fins al moment. En conseqüència i en honor seu, anys més tard aquest tipus de tumor es va rebatejar com a sarcoma d'Ewing¹³. Més endavant, a la dècada dels vuitanta, es va descriure el primer cas de SE extraesquelètic, que afectava teixits tous¹⁴.

Històricament, el diagnòstic diferencial d'aquests tumors ha estat difícil, fent-se en moltes ocasions per exclusió d'altres possibles entitats¹⁵. No obstant, aquesta situació va canviar de manera radical també en la dècada dels vuitanta, quan diferents investigadors van descriure que els tumors de la família del SE compartien una translocació cromosòmica comuna^{16,17}. Anys més tard, investigadors francesos van descriure que aquesta translocació donava lloc a una fusió entre els gens *EWS* i *FLI1*¹⁸. Aquesta troballa va ser clau per ajudar a definir el diagnòstic d'aquests pacients, i a dia d'avui és essencial per determinar la pauta clínica a seguir^{15,19,20}.

2.2. EPIDEMIOLOGIA I PRONÒSTIC

El SE és el segon tumor ossi més freqüent en nens i adolescents^{10,21}. Tot i així, està considerat una malaltia rara, ja que afecta menys de 5 persones per cada 10.000 habitants²². La seva incidència general és baixa, de 0,6 a 3 casos per milió d'habitants, però incrementa fins a un màxim de 5 casos per milió en adolescents^{5,19,23}. D'altra banda, el SE presenta una lleugera predominança en homes (1,3:1)^{19,24} i és més comú en caucàsics que en afroamericans o asiàtics^{10,25,26}.

A l'inici dels anys 70, la taxa de supervivència d'aquests pacients era inferior al 25 %^{21,27}. A dia d'avui, amb les pautes de quimioteràpia disponibles, la supervivència als 5 anys ha incrementat fins al 60-75 % en els pacients amb malaltia localitzada en el moment del diagnòstic^{10,21}. Malgrat això, aquests pacients encara tenen una taxa de recurrència d'un 15-30 %²¹(25595632).

Pel que fa al desenvolupament de la malaltia, un altre factor característic del SE és una elevada taxa de metàstasi. Aproximadament el 90 % dels pacients que no segueixen pautes de quimioteràpia moren després de la cirurgia radical, fet que suggereix la presència de micrometàstasi en el moment del diagnòstic²⁸. De fet, un 30 % dels pacients ja presenta metàstasi en el moment del diagnòstic^{10,21}. En aquest grup, la supervivència als 5 anys cau fins al 30 % en casos de metàstasi pulmonar i fins al 10 % en metàstasi òssia i de medul·la òssia^{21,29}, posant de manifest la necessitat de teràpies més efectives per aquests pacients.

Per tot això, la presència de metàstasi esdevé el principal factor pronòstic de la malaltia. No obstant, encara no s'ha pogut determinar perquè les metàstasis pulmonars tenen millor pronòstic que la resta²³. Val a dir que a

INTRODUCCIÓ

banda de la presència de metàstasi, diversos estudis han determinat que existeixen altres factors de mal pronòstic com: una edat superior als 20 anys, un volum tumoral superior als 200 mL en el moment del diagnòstic o la localització axial dels tumors primaris. Aquest últim factor probablement està relacionat amb una major dificultat en la realització de la cirurgia inicial^{21,30}.

2.3. MANIFESTACIÓ CLÍNICA

El primer símptoma de la majoria de pacients de SE és el dolor causat per la destrucció del teixit circumdant que es produeix a mesura que el tumor creix³¹. Tot i així, només un terç dels pacients presenten una massa palpable quan comencen els primers símptomes. Per aquest motiu, en moltes ocasions, quan aquests pacients acudeixen a la consulta mèdica són erròniament diagnosticats de tendinitis o esquinç, confonent els símptomes amb els d'un trauma esportiu. De fet, es calcula que aproximadament un 25 % dels pacients no es diagnostiquen correctament fins a 5 mesos després de la primera visita³².

Altres símptomes del SE són: febre, pèrdua de pes, anèmia, marcadors d'inflamació elevats (com per exemple determinades citoquines o la taxa de sedimentació eritrocítica) i marcadors elevats de recanvi de teixit ossi com les proteïnes lactat deshidrogenasa i fosfatasa alcalina^{19,32-35}.

Pel que fa a localització, el SE pot aparèixer en qualsevol os del cos (figura I1), essent els llocs predilectes la diàfisi dels ossos tubulars (part central dels ossos llargs com la tibia o el peroné) i la pelvis³⁶. En el 45-50 % dels casos afecta a les extremitats, sent més comunes les inferiors que les superiors. Això va seguit d'un 26 % dels casos afectant la pelvis, un 16 % afectant la

caixa toràcica i un 6 % afectant la columna vertebral^{10,36}. Quan afecta ossos llargs, es pot produir una elevació del periosti, que és la membrana de teixit connectiu que recobreix els ossos. En aquests casos, es pot formar el que es coneix com a triangle de Codman, detectable mitjançant radiografia^{36,37}.

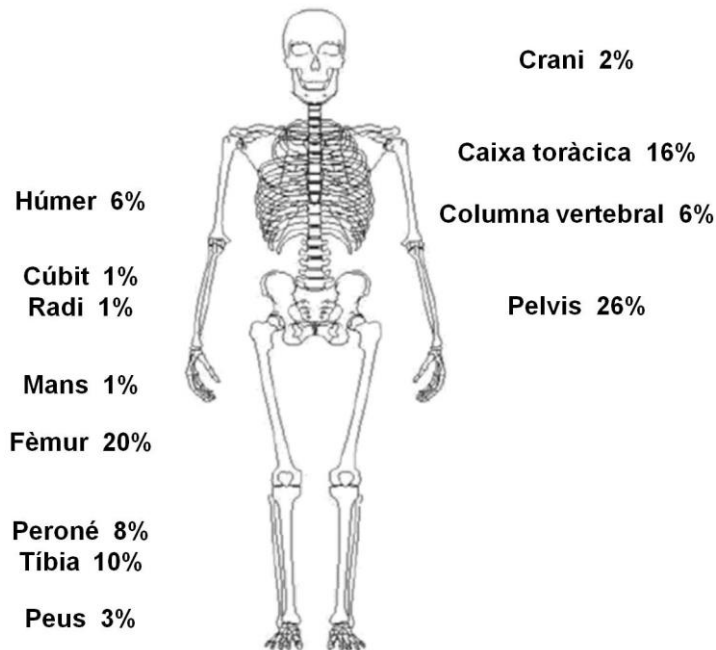


Figura 11: Distribució i incidència dels tumors primaris de SE desenvolupats en teixit ossi. Imatge modificada de Bernstein *et al.* 2006³⁸.

Tot i ser un tumor principalment ossi, aproximadament en un 15 % dels casos, el tumor primari es desenvolupa en teixits tous¹⁵. Diversos estudis han descrit que els casos extraesquelètics tenen una lleugera predominança en dones i en pacients d'edat superior respecte als casos esquelètics. A més, aquests pacients tenen un pronòstic significativament millor als casos de SE d'os^{36,39,40}.

INTRODUCCIÓ

En relació a les metàstasis, els principals teixits afectats són els pulmons, els ossos i la medul·la òssia. Tanmateix, tot i que amb poca freqüència, les metàstasis també poden aparèixer en nòduls limfàtics, fet que s'associa a malaltia disseminada^{23,29,36}.

2.4. CÈL·LULA D'ORIGEN

Malgrat que els òrgans i teixits afectats en SE són àmpliament coneguts, la cèl·lula d'origen del SE segueix sent un aspecte que genera controvèrsia entre els professionals que estudien la malaltia. Degut a la localització dels tumors, l'origen mesenquimal semblaria ser el més probable⁴¹. En aquesta direcció, molts grups de recerca han intentat reproduir el que succeeix en els primers moments del desenvolupament d'aquests tumors, però els resultats no han convergit en una única conclusió.

Les dues principals hipòtesis sobre la cèl·lula d'origen són les que postulen que es tracta de cèl·lules mare mesenquimals o de la cresta neural^{42,43}. Inicialment, es va observar que els tumors i les línies de SE tenien un perfil d'expressió similar al de teixits neuronals i que expressaven un conjunt de marcadors neuroectodèrmics^{44,45}. No obstant, estudis posteriors han revelat que l'expressió d'*EWS-FLI1* determina un programa d'expressió neuronal independentment del context cel·lular, fet que resta pes a la teoria de l'origen neuronal⁴³.

Pel que fa l'origen mesenquimal, s'ha observat que l'expressió d'*EWS-FLI1* en cèl·lules mare mesenquimals promou perfils d'expressió gènica similars als dels tumors de SE. A més, s'ha observat que l'expressió d'*EWS-FLI1*

bloqueja la diferenciació terminal de cèl·lules pluripotents de la medul·la òssia i de mioblasts murins^{46,47}. De manera complementària, el silenciament d'*EWS-FLI1* en cèl·lules de sarcoma genera un perfil d'expressió gènica similar al de cèl·lules mare mesenquimals. Finalment, l'expressió del gen quimèric en cèl·lules mare mesenquimals promou la formació de tumors en ratolins^{43,48,49}, fet que recolza la hipòtesi de l'origen mesenquimal.

Està àmpliament descrit que tant les cèl·lules mare mesenquimals com les de la cresta neural són permissives a la introducció d'*EWS-FLI1*⁴⁸⁻⁵⁰. Paral·lelament, però, un altre grup va descriure que la introducció de la fusió *EWS-FLI1* en precursors osteocondrogènics reproduïx el fenotip del SE⁵¹, ampliant així el ventall de possibilitats. Altrament, estudis recents hipotetitzen que les cèl·lules mare mesenquimals podrien derivar del neuroepiteli a través d'un intermediari de la cresta neural⁴¹, fet que faria convergir les dues hipòtesis.

2.5. TRANSLOCACIONS CROMOSÒMIQUES: *EWS-FLI1*

A nivell genètic, el SE es caracteritza per la presència d'una translocació cromosòmica recíproca entre un membre de la família TET (*TLS*, *EWS* i *TAF15*) i un altre membre de la família ETS (*E26 transformation-specific*).

De manera independent, les proteïnes de la família TET són proteïnes d'unió a ARN, que s'han vist implicades en la regulació de la transcripció i del *splicing*, entre d'altres. A més, les proteïnes d'aquesta família tenen expressió ubiqua en teixits embrionaris i adults, localitzant-se principalment a nucli^{52,53}. Per la seva banda, els membres ETS són proteïnes que actuen com a elements reguladors de l'activitat de l'ADN, principalment com a factors de

INTRODUCCIÓ

transcripció. A nivell tissular en general tenen expressió ubiqua, tot i que alguns membres tenen una expressió molt més limitada, com per exemple FLI1, que en adults s'expressa principalment a les cèl·lules hematopoiètiques^{53,54}.

En la majoria dels casos, la fusió TET-ETS es produeix per la translocació cromosòmica $t(11;22)(q24;q12)$. Aquesta apareix aproximadament en un 85 % dels pacients i dona lloc al gen quimèric *EWS-FLI1*^{17,18,55}. En termes de freqüència poblacional, la segona translocació més comuna és la $t(21;22)(q22;q12)$, que apareix en un 10-15 % dels pacients i que dona lloc a la fusió *EWS-ERG*⁵⁵⁻⁵⁷. Seguidament, es troben altres translocacions menys freqüents que s'especifiquen a la taula I1^{36,55}. En diversos estudis, s'ha intentat establir una correlació entre el tipus de translocació i el pronòstic de la malaltia. Tot i així, finalment s'ha determinat que no hi ha diferències significatives entre pacients amb diferents tipus de fusions⁵⁸⁻⁶⁰. Val a dir que a banda dels tumors de SE, es troba el que es coneix com a sarcomes *Ewing-like*, que presenten similituds a nivell histològic amb el SE. A nivell clínic, els tumors *Ewing-like* es tracten com els casos de SE, malgrat que presenten translocacions cromosòmiques que no inclouen gens ETS ni tampoc sempre inclouen un membre de la família TET. Per exemple, algunes d'aquestes translocacions són *EWS-SMARCA5* o *CIC-DUX4*^{30,61,62}. Els pacients de sarcomes *Ewing-like* no responen de la mateixa manera a la quimioteràpia que els de SE, i de fet, estudis de seqüenciació d'ARN han demostrat que presenten perfils d'expressió molt diferents dels que es troben en SE. Conjuntament, això indica la necessitat de tractar-los com a entitats biològiques independents^{63,64}.

Taula I1: Translocacions cromosòmiques descrites al SE. Taula adaptada de Riggi et al. 2007⁶⁵.

| Membre TET | Membre ETS | Freqüència |
|------------|-------------|------------|
| <i>EWS</i> | <i>FLI1</i> | 85 % |
| <i>EWS</i> | <i>ERG</i> | 10-15 % |
| <i>EWS</i> | <i>ETV1</i> | <1 % |
| <i>EWS</i> | <i>ETV4</i> | <1 % |
| <i>EWS</i> | <i>FEV</i> | <1 % |
| <i>TLS</i> | <i>ERG</i> | <1 % |

Actualment, està àmpliament acceptat que la fusió cromosòmica esdevé el principal motor del SE⁶⁶. La unió entre l'extrem N-terminal d'*EWS* (que conté un domini d'activació transcripcional) i l'extrem C-terminal de *FLI1* (que conté un domini d'unió a l'ADN i un domini de transactivació)⁵³, genera un factor de transcripció aberrant. Aquesta proteïna quimèrica té un fort potencial com activador i repressor transcripcional de múltiples dianes⁶⁷. *EWS-FLI1* s'uneix a l'ADN mitjançant les regions consens ETS i mitjançant els microsatèl·lits GGAA, que poden trobar-se o no a la regió promotora dels gens diana. Està descrit, a més, que el número de repeticions GGAA correlaciona de manera positiva amb el potencial activador d'*EWS-FLI1*^{68,69}.

És molt comú en càncer que l'epigenoma de les cèl·lules malignes sigui molt divergent del que es troba en teixit sa. En SE, concretament, es coneix que l'epigenoma està moduladirectament per la proteïna de fusió *EWS-FLI1* mitjançant diferents mecanismes com la remodelació d'histones^{70,71}. En aquesta direcció, s'ha vist que *EWS-FLI1* és capaç d'induir l'expressió de gens del grup *Polycomb* com *EZH2*, que actua com a repressor transcripcional

INTRODUCCIÓ

mitjançant la metilació d'histones o *BMI-1*, que promou la compactació de la cromatina i el silenciament gènic mitjançant la ubiquitinació d'histones. Així, l'expressió d'*EZH2* i *BMI-1*, que s'ha relacionat amb la transformació maligna del SE, es tradueix en la inhibició de la diferenciació cel·lular i el manteniment del potencial de cèl·lula mare^{55,72,73}. D'altra banda, una de les dianes directes d'EWS-FLI1, *NKX2.2*, actua com a repressor transcripcional mitjançant el reclutament de HDAC (desacetilases d'histona)^{74,75} i també és conegut que EWS-FLI1 regula l'expressió de demetilases d'histona, com *LSD1*^{76,77}. Paral·lelament, s'ha demostrat que la proteïna de fusió modula l'estructura dels nucleosomes. EWS-FLI1 és capaç d'unir-se a seqüències amb motius ETS, desplaçar els factors de transcripció ETS *wild type* i inactivar així *enhancers* conservats; alhora que també és capaç de generar nous *enhancers*^{70,71,78}. Pel que fa a la metilació de l'ADN, s'han fet estudis a escala genòmica. Concretament, s'ha demostrat que el SE té un perfil de metilació característic que el diferencia d'altres entitats tumorals, i s'han trobat més de 800 gens hipo- o hipermetilats. Malgrat que s'ha observat heterogeneïtat en el perfil de metilació entre pacients, no s'ha pogut establir cap correlació amb variables clíniques^{79,80}.

Diferents estudis de silenciament de la fusió han permès desxifrar i reproduir el transcriptoma del SE^{69,81-83}. Els gens diana del factor de transcripció EWS-FLI1 inclouen oncogens, gens supressors de tumors i gens relacionats amb apoptosi, proliferació, diferenciació, angiogènesi o invasió^{53,66,84}. Per exemple, promou l'expressió d'*IGF1* (*insulin-like growth factor 1*) de manera directa i la de *MYC* (*V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) de manera indirecta, ambdues proteïnes relacionades amb proliferació i supervivència cel·lular. De fet, s'ha descrit que l'activació d'IGF1R (*IGF1 receptor*) és essencial per a la transformació oncogènica i s'ha postulat com a diana terapèutica^{85,86}. D'altra

banda, la proteïna de fusió inhibeix l'expressió de *p21* i *p57*, resultant en una inhibició de l'apoptosi⁵³. Així doncs, globalment, EWS-FLI1 regula l'expressió de centenars de gens diana i esdevé essencial pel manteniment del fenotip neoplàsic^{66,67}.

La translocació entre els gens *EWS* i *FLI1*, que es dona a nivell intrònic, no sempre es produeix pel mateix punt de ruptura, de manera que es generen diferents proteïnes de fusió^{53,87,88} (figura I2). Les fusions més freqüents són:

-Tipus 1: exons 1-7 d'*EWS* i exons 6-10 de *FLI1*.

-Tipus 2: exons 1-7 d'*EWS* i exons 5-10 de *FLI1*.

-Tipus 3: exons 1-10 d'*EWS* i exons 6-10 de *FLI1*.

Malgrat tot, la reintroducció d'*EWS-FLI1* en qualsevol dels models testats no reproduïx completament la transformació maligna del SE, arribant a ser tòxica en alguns tipus cel·lulars⁸⁹. En conseqüència, es creu que a banda d'*EWS-FLI1* són necessàries altres alteracions, genètiques i/o epigenètiques, pel desenvolupament d'aquests sarcomes⁴¹.

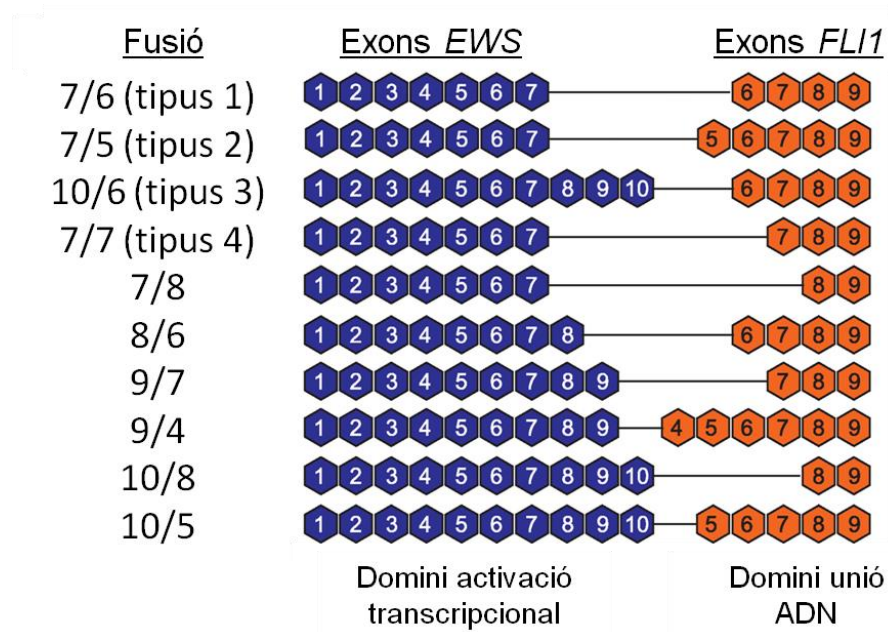


Figura I2: Esquema dels diferents tipus de fusions gèniques descrites entre *EWS* i *FLI1*. Imatge modificada de Luo *et al.* 2012⁹⁰.

2.6. ALTRES ALTERACIONS GENÈTIQUES

Tot i que els tumors pediàtrics es caracteritzen per presentar les taxes de mutació més baixes⁹¹, al SE es troben de manera recurrent alteracions en determinades vies de senyalització. Alguns exemples de les vies i mutacions estudiades que contribueixen a la patogènesi són:

-Mutacions en la ruta de Rb (*Retinoblastoma-associated protein*). Diversos autors han descrit la presència de mutacions i delecions en els supressors tumorals *Rb* i *p16^{INK4A}* en un 20-30 % dels pacients de SE^{92,93}. Anys enrere, s'havia arribat a considerar que les mutacions en *p16^{INK4A}* eren la segona alteració genètica més freqüent en pacients de SE⁹⁴. Paral·lelament, en *p16* també s'han descrit inactivacions postranscripcionals⁹². Totes aquestes

alteracions s'han relacionat amb un fenotip neoplàsic més agressiu i amb una pitjor resposta al tractament amb agents quimioterapèutics⁹³. Concretament, aquestes mutacions són especialment greus en pacients de SE pel fet que el gen *CCND1* (*Ciclina D1*) sigui una diana transcripcional d'EWS-FLI1. Així, *CCND1* es troba sobreexpressat en aquests pacients i promou una inactivació de la proteïna Rb i una desregulació del cicle cel·lular^{84,95,96}.

- Mutacions en la ruta de TP53. Diversos estudis senyalen la presència de mutacions en *TP53* en un 10-20 % dels pacients de SE. Aquestes mutacions no mostren correlació amb la mida tumoral ni amb la taxa de proliferació cel·lular (mesurada pel marcador Ki-67), però sembla que defineixen un subgrup de pacients amb pitjor pronòstic^{93,97}. Tot i així, comparant el SE amb altres tipus de tumors, la incidència de mutacions en aquesta via és baixa, ja que *TP53* és el gen més freqüentment mutat en càncer^{98,99}.

- Guanys i pèrdues de material genètic. A banda de la fusió descrita, alguns pacients de SE presenten altres alteracions cromosòmiques. Entre aquestes, es poden trobar delecions o duplicacions de regions cromosòmiques o fins i tot de cromosomes sencers, fet que provoca la presència d'aneuploidies. Un exemple és el guany de la regió 1q, que es troba present en un 30 % dels pacients de SE aproximadament i que s'ha relacionat amb la recaiguda del càncer i un mal pronòstic^{84,100}. Dins d'aquest locus s'ha localitzat el gen *CDT2*, que codifica per una ubiquitina lligasa, i que s'ha hipotetitzat com a responsable d'una desregulació a nivell transcripcional del cicle cel·lular i d'un increment del marcador de proliferació Ki-67 en SE¹⁰⁰. D'altra banda, també s'han descrit duplicacions del cromosoma 8 en pacients de SE, la majoria es troben en casos de tumors recurrents i metàstasi⁸⁴.

2.7. DIAGNÒSTIC

El temps entre l'aparició dels primers símptomes del SE i el diagnòstic definitiu ha disminuït de manera significativa en els últims 30 anys. Aquest canvi, que suposa un benefici pels pacients, principalment es deu a una millora en les tècniques de diagnòstic de la malaltia¹⁰¹.

Actualment, els mètodes més àmpliament utilitzats pel diagnòstic inicial d'aquests tumors són l'exploració física i les tècniques d'imatge. Pels casos de SE d'os, la radiografia és la tècnica més emprada, mostrant sovint destrucció de l'os afectat i uns marges del tumor poc definits (figura I3A). A més, mitjançant radiografia també es poden detectar reaccions del periosti que es veuen en forma d'espícules calcificades o del que es coneix vulgarment com a capes de ceba (figura I3B). En alguns casos, també s'utilitza la ressonància magnètica per completar el diagnòstic, ja que és una tècnica més sensible que la radiografia. Altrament, mitjançant ressonància magnètica es determinen millor els marges del tumor, que esdevenen un factor clau en cas d'extirpació quirúrgica del mateix^{36,101}.

Pel que fa als casos de SE extraesquelètic, la tomografia computada és la tècnica més emprada, de la mateixa manera que succeeix amb les metàstasis pulmonars^{101,102}. D'altra banda, per la detecció de metàstasis d'os s'està imposant en els últims anys la tomografia per emissió de positrons amb ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa com a tècnica d'elecció¹⁰³.

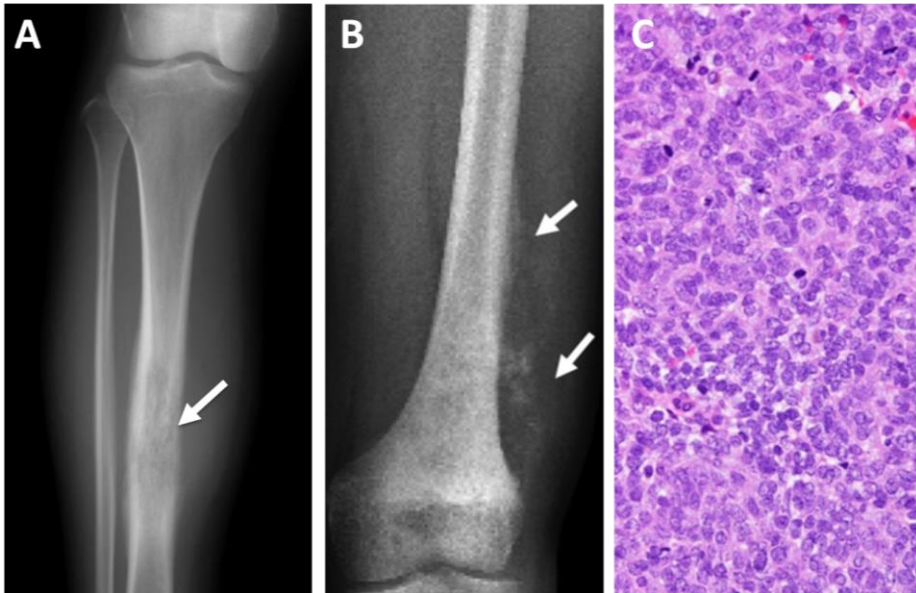


Figura I3: Tècniques d'imatge pel diagnòstic de sarcomes. **A)** Radiografia d'una pacient de SE que mostra destrucció del teixit ossi a la tibia causada per la presència tumoral. **B)** Radiografia d'una pacient d'osteosarcoma que mostra una reacció del periosti del fèmur, de forma similar al que es troba en SE. **C)** Tinció d'hematoxilina/eosina que mostra la histologia clàssica dels tumors de SE, que inclou cèl·lules petites i rodones amb una elevada proporció nucli/citoplasma. Imatges extretes d'Ozaki *et al.* 2015¹⁰¹ i Kaste *et al.* 2011¹⁰³.

Malgrat la millora en les tècniques d'imatge, el diagnòstic diferencial del SE requereix una biòpsia tumoral, que permeti una anàlisi histològica i molecular específica per aquesta patologia. A nivell histològic, el SE presenta cèl·lules petites i rodones, amb una relació nucli/citoplasma elevada i cromatina poc condensada (figura I3C). Com a marcadors de diagnòstic per immunohistoquímica s'utilitzen les proteïnes CD99 o FLI1, aquesta última per detectar la presència de la fusió gènica. CD99 és una proteïna de membrana que es troba present en un 90 % dels pacients aproximadament.

INTRODUCCIÓ

No obstant, aquest marcador no és específic del SE, ja que també s'expressa en sarcoma sinovial o limfoma, entre d'altres^{36,101}. Pel que fa a la seva funció, diversos estudis han mostrat que la inhibició de CD99 disminueix la capacitat tumorigèna i metastàtica de les cèl·lules de SE¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Altres marcadors emprats, tot i que menys freqüents, són: vimentina, desmina, sinaptofisina o l'enolasa específica de neurones^{67,107}.

Com s'ha mencionat, aquests marcadors (a excepció de FLI1) no permeten el diagnòstic diferencial de SE, fet que posa de manifest la necessitat d'estudis moleculars més específics. En aquesta direcció, les translocacions cromosòmiques característiques del SE esdevenen el millor marcador. Aquestes es poden detectar per RT-PCR (retrotranscripció i reacció en cadena de la polimerasa) o FISH (hibridació *in situ* fluorescent), a partir de material tumoral congelat o preservat en parafina^{101,108}. De fet, els transcrits característics del SE es poden detectar també en sang per determinar la presència de malaltia mínima residual¹⁰⁹. Altrament, el número de còpies d'*EWS-FLI1* en l'ADN lliure circulant s'ha correlacionat amb canvis en la mida dels tumors i amb la presència de metàstasi¹¹⁰.

2.8. TRACTAMENT

El SE actualment es tracta seguint una modalitat multidisciplinària que inclou quimioteràpia, cirurgia i radioteràpia. Tot i que dècades enrere la radioteràpia s'utilitzava com a tractament únic, diversos estudis han demostrat que si no s'acompanya de cirurgia, resulta en elevades taxes de recurrència local. Actualment, de forma general, la radioteràpia s'administra postcirurgia^{30,101}.

En relació a la quimioteràpia, es pot prescriure abans o després de la cirurgia en funció de la localització i la mida del tumor. En general s'administra per reduir la mida del tumor i facilitar així la seva posterior excisió, fet que incrementa molt la preservació funcional de les extremitats implicades. D'altra banda, també s'administra per tractar possibles micrometàstasis presents en el moment del diagnòstic^{101,111}. La pauta de quimioteràpia que es segueix actualment consisteix en cicles de tractament que combinen 6 agents: Vincristina (V), Doxorubicina (D), Etopòsid (E), Ciclofosfamida (C), Ifosfamida (I) i Actinomicina-D (A). La Vincristina inhibeix la polimerització dels microtúbuls, inhibint així la mitosi; la Doxorubicina és una antraciclina que actua com a agent intercalant de l'ADN; l'Etopòsid és un inhibidor de la topoisomera II, que inhibeix la replicació de l'ADN; la Ciclofosfamida i la Ifosfamida són agents alquilants de l'ADN; i per últim, l'Actinomicina-D actua inhibint la transcripció de l'ADN¹¹².

El protocol més utilitzat a Europa és el que combina VIDE/VAI (sigles referents als fàrmacs mencionats anteriorment), i que ha permès incrementar notablement la supervivència dels pacients amb malaltia localitzada^{101,113,114}. Pel que fa als pacients amb malaltia disseminada, a banda del protocol mencionat anteriorment, s'ha intentat afegir dosis elevades de quimioteràpia (amb Busulfà i Melfalà) seguides d'un transplantament autòleg de cèl·lules mare. Tot i així, no hi ha hagut un increment significatiu de la supervivència a llarg termini per aquests pacients^{30,115}.

Malgrat que la supervivència dels pacients és bastant elevada, pels tumors no quimiosensibles, pels casos de recaiguda i per la presència de metàstasi no hi ha cap tractament estàndard que hagi demostrat ser efectiu. Aquest fet posa de rellevància la necessitat de trobar noves teràpies que, en l'era de la

INTRODUCCIÓ

medicina personalitzada, s'intenta que siguin específiques per les alteracions concretes d'aquest sarcoma³⁰.

2.9. NOVES APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES

En els darrers anys, molts grups de recerca han unit esforços per desenvolupar noves teràpies efectives pels pacients de SE. Entre aquestes aproximacions es troben inhibidors de vies de senyalització, fàrmacs epigenètics i molècules dirigides contra la proteïna de fusió. Els més estudiats es descriuen a continuació:

-Camptotecines: són uns compostos d'origen vegetal que inhibeixen l'acció de la topoisomerasa I. En conseqüència, es produeixen múltiples ruptures de l'ADN i les cèl·lules canceroses entren en mort cel·lular. Dos derivats de les camptotecines que s'han provat en la clínica són l'Irinotecan i el Topotecan. En pacients de SE, han demostrat aportar benefici terapèutic en monoteràpia i en teràpia combinada amb Ciclofosfamida o Temozolamida (un agent alquilant). Les millors respostes s'han observat en dos assajos clínics de fase 2, un de Topotecan en combinació amb Ciclofosfamida, i l'altre d'Irinotecan en combinació amb Temozolamida. Així, s'ha arribat a obtenir un 60 % de resposta parcial i s'han descrit casos de regressió total en pacients amb relapses tumorals^{112,116,117}.

-ET-743: també conegut com a Ecteinascidina 743, Trabectedina o Yondelis. És un producte d'origen marí que s'ha utilitzat en múltiples assajos clínics de diversos sarcomes portadors de translocacions cromosòmiques. Tot i que s'ha demostrat que aquest compost interfereix amb l'activitat d'EWS-FLI1, els assajos fase 1 i 2 només han aconseguit resposta en un número limitat de pacients. Estudis de farmacocinètica han demostrat que les

dosis pautades no assoleixen la concentració mitja inhibidòria (IC50) en sang durant tot el tractament, fet que posa de manifest la necessitat d'estudis addicionals per determinar la dosi d'aplicació, o el desenvolupament d'anàlegs més potents^{113,116}.

-Inhibidors de PARP1 (*poly ADP ribose polymerase 1*): diversos assajos preclínic han proposat que la inhibició de PARP1, que participa en la reparació de l'ADN, pot ser beneficiosa pels pacients de SE. Tanmateix, un estudi va revelar que les cèl·lules amb nivells més elevats d'*EWS-FLI1* eren les més sensibles a inhibidors d'aquesta proteïna com l'Olaparib. Malgrat que un assaig clínic fase 2 amb pacients metastàtics o recurrents de SE va demostrar que tot i que l'Olaparib en monoteràpia resultava insuficient, la seva combinació resulta prometedora. Concretament, el tractament combinat amb Temozolamida o Trabectedina en dos estudis independents ha demostrat regressions tumorals completes en tots els ratolins injectats amb cèl·lules de SE^{113,116,118,119}.

-Inhibidors de la via IGF: aquesta via de senyalització ha estat una de les més estudiades en SE. De fet, *EWS-FLI1* promou l'expressió d'*IGF1R* i suprimeix l'expressió del seu regulador negatiu *IGFBP3* (*insulin like growth factor binding protein 3*). Tot i que múltiples estudis preclínic proposen la inhibició d'aquesta via com a teràpia potencial, assajos clínic fase 1 amb anticossos monoclonals contra IGFR1 només han mostrat respostes en un petit percentatge de pacients. En conseqüència, seria interessant trobar marcadors de resposta pel grup de pacients que es puguin beneficiar d'aquesta teràpia. Altrament, la combinació d'anticossos contra IGFR1 amb inhibidors de la via de mTOR, que havia mostrat molta eficàcia en models preclínic, no va tenir l'efecte esperat en un assaig fase 2^{85,116,120,121}.

INTRODUCCIÓ

-Compostos epigenètics: el fet que el SE estigui promogut per un factor de transcripció aberrant suggereix que regular l'estat de la cromatina pugui tenir algun benefici per aquests pacients. A més, s'ha descrit que diversos complexos que regulen l'activitat de la cromatina es troben alterats en SE^{71,116,122}. En conseqüència, s'han utilitzat diferents aproximacions com agents demetilants o inhibidors de les HDAC que han mostrat activitat *in vitro*. Pel que fa a la clínica, s'han començat assajos fase 1/2 amb Vorinostat (un inhibidor de HDAC), demostrant de moment que està ben tolerat en pacients de SE^{113,123}.

-Inhibidors d'EWS-FLI1: la proteïna quimèrica, que és la causa fonamental del desenvolupament del SE, participa en múltiples processos tumorals, i és la principal diana terapèutica d'interès (figura I4). Tot i la dificultat d'inhibir un factor de transcripció, s'han provat múltiples i diverses alternatives. Per exemple, s'han fet *screenings* de fàrmacs que reverteixin l'empremta genètica d'EWS-FLI1, i així s'han identificat molècules com la Citarabina o la Mitramicina. La Citarabina disminueix l'expressió proteica d'EWS-FLI1 i ha mostrat activitat *in vitro* en models de xenoempelts. D'altra banda, la Mitramicina no altera l'expressió d'EWS-FLI1 però sí bloqueja la seva activitat, revertint el perfil d'expressió gènica i mostrant regressions tumorals en estudis amb animals. Tot i així, estudis clínics fase 1/2 amb aquests compostos no han mostrat eficàcia com a monoteràpia per pacients de SE. Altres compostos com YK-4-279 o Midostaurina també s'estan avaluant *in vitro*^{113,116}.

A banda d'aquests compostos, la manera més específica per silenciar la fusió és el tractament amb un ARN petit d'interferència (ARNsi). De fet, estudis amb animals ja han demostrat l'efectivitat d'aquesta aproximació pel que fa a

creixement tumoral i al desenvolupament de metàstasi. Tot i així, la manca de mecanismes per millorar l'estabilitat de l'ARNsi i per incrementar l'alliberament específic a les cèl·lules de SE encara limita la seva aplicació a la clínica. En aquesta direcció, hi ha estudis prometedors amb nanodiamants, que han mostrat una bona eficiència d'alliberament de l'ARNsi a l'interior de cèl·lules de SE en cultiu^{66,124–126}.

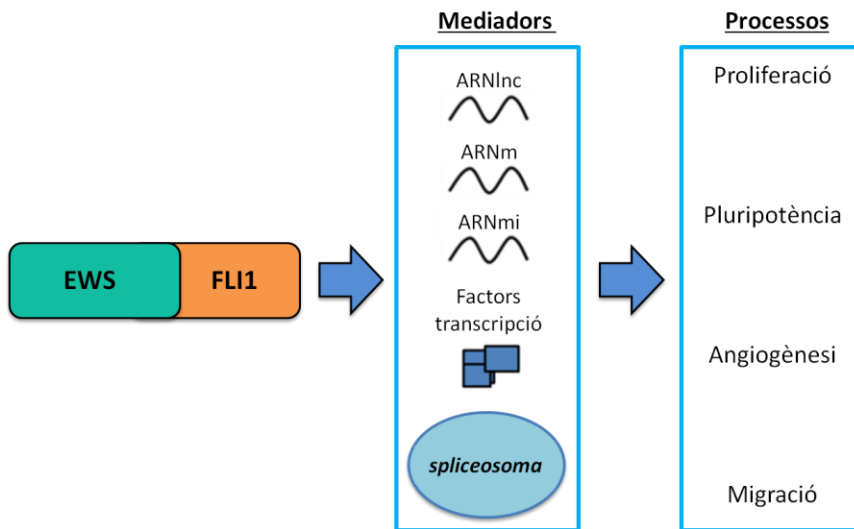


Figura I4: Efecte pleiotròpic d'EWS-FLI1 en diversos processos tumorals mitjançant regulació transcripcional. Actuant com a factor de transcripció aberrant, EWS-FLI1 regula ARNlnc (ARN llarg no codificant), ARNm (ARN missatger) i ARNmi (microARN). Tanmateix, unint-se a la maquinària de *splicing* també altera aquest procés. Imatge modificada de Sand *et al.* 2015⁴².

Paral·lelament a aquestes vies, el nostre grup de recerca va descriure que *Caveolina-1* (*CAV1*) era una diana transcripcional directa d'EWS-FLI1 i que era summament important en la tumorigenicitat del SE¹²⁷. El gen *CAV1* codifica per un component estructural de les caveoles i s'ha descrit com a proteïna d'ancoratge de múltiples substrats. Diferents estudis han demostrat

INTRODUCCIÓ

la implicació de CAV1 en diversos processos tumorals com transformació cel·lular, creixement tumoral, resistència a fàrmacs o metàstasi^{128,129}. Un d'aquests estudis, publicat pel nostre grup, va descriure que CAV1 regula l'angiogènesi en SE per mitjà de la seva interacció amb EPHA2, que és un receptor tirosina quinasa. En aquell treball es va descriure que la interacció entre CAV1 i EPHA2 promou l'expressió de *bFGF* (*basic fibroblast growth factor*), que actua com a quimioatraient per les cèl·lules endotelials i regula així el procés d'angiogènesi¹³⁰. Per tal d'esbrinar si EPHA2 participa en altres processos tumorals en SE, en aquesta tesi s'ha volgut profunditzar en el seu paper.

3. RECEPTORS TIROSINA QUINASA

Els receptors tirosina quinasa (RTK) són proteïnes de membrana implicades en diversos processos cel·lulars com, per exemple, proliferació, diferenciació, metabolisme, mobilitat cel·lular o apoptosi. Tanmateix, regulen el desenvolupament i la homeòstasi^{131,132}. El proteoma humà inclou 58 membres, que estan classificats en 20 subfamílies. A nivell estructural, tots aquests receptors són similars, consten d'un domini extracel·lular per on s'uneixen al lligand, una hèlix transmembrana i una regió citoplasmàtica que inclou el domini tirosina quinasa a més de regions reguladores¹³³.

Així, el primer pas de la ruta d'acció clàssica d'aquestes proteïnes consisteix en unir-se als seus lligands, que poden ser factors de creixement, citoquines o hormones. A continuació, els receptors activats poden autofosforilar-se en residus tirosina o formar dímers per donar lloc a una fosforilació creuada. Actualment, es coneix que la majoria de RTK necessiten formar dímers o

grans oligòmers per activar-se. Les fosforilacions d'aquests receptors es produeixen de manera ordenada, començant per residus tirosina del domini quinasa i després en altres regions de la fracció citoplasmàtica. Tot seguit, es recluten proteïnes adaptadores amb dominis SH2 (*Src homology-2*) i PTB (*phosphotyrosine-binding*) que s'uneixen als residus fosfotirosina. Gràcies a aquestes proteïnes adaptadores, els receptors poden fosforilar altres substrats i s'inicia la cascada de senyalització corresponent (figura I5). Finalment, per tornar a l'estat basal, intervenen múltiples mecanismes de regulació, com l'activitat de proteïnes tirosina fosfatasa que s'uneixen als receptors pel domini SH2 o la internalització i la conseqüent degradació del complex lligand-receptor, la qual provoca una disminució de la quantitat de receptor disponible^{131,133,134}.

INTRODUCCIÓ

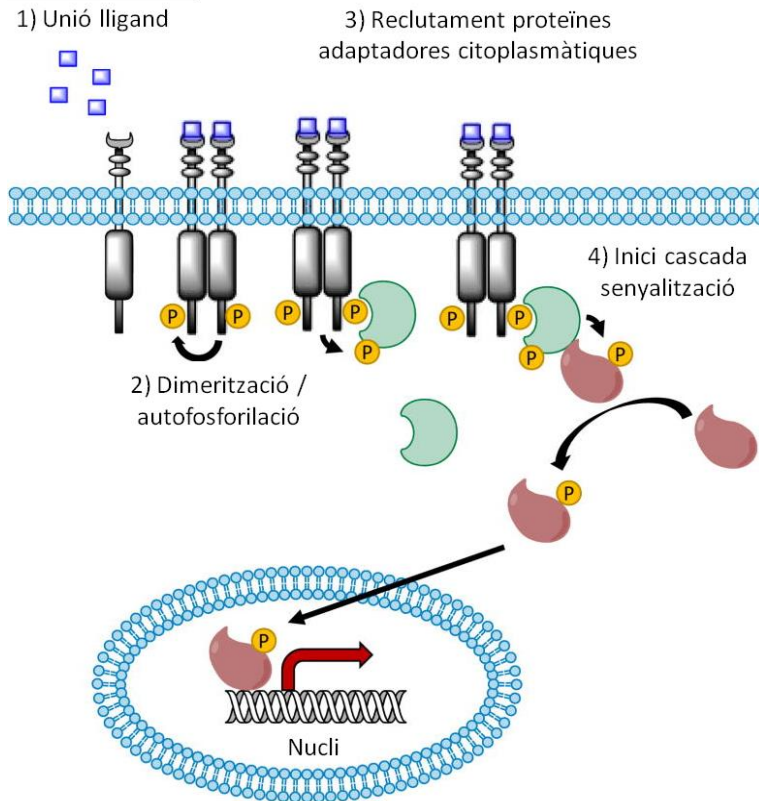


Figura I5: Via d'acció canònica dels RTK. Després d'unir-se al lligand, aquests receptors formen oligòmers i es fosforilen entre ells. Tot seguit, s'hi uneixen proteïnes adaptadores i s'inicien múltiples cascades de senyalització. Imatge modificada de Chen *et al.* 2015³⁴.

Uns anys enrere, quan aquests receptors es van començar a estudiar, es pensava que la senyalització que seguien era lineal, com per exemple la via RTK-Grb2-Sos-Ras/MAPK (*mitogen activated protein kinase*). No obstant, en els darrers anys, ha incrementat l'evidència que aquests receptors activen xarxes de senyalització interconnectades. Els motius que avalen aquesta teoria són, per una banda, que cada receptor té múltiples llocs de fosforilació i que cadascun d'aquests pot connectar diferents molècules adaptadores. A més, cada molècula adaptadora pot interaccionar amb múltiples molècules de

senyalització. Tanmateix, estudis moleculars recolzen aquesta hipòtesi, proposant els RTK no sols com a efectors inicials, sinó com a nodes de regulació de vies de senyalització^{132,133,135}.

A banda de la seva funció canònica de membrana activant vies de senyalització, els RTK també tenen activitat directa a diferents orgànuls cel·lulars. Fragments solubles dels RTK o receptors sencers internalitzats poden ser transportats a nucli (unint-se per exemple a factors de transcripció), reticle endoplasmàtic o mitocondries (per la via de transport retrògrad de vesícules). Així, els RTK són capaços de regular de manera directa l'activitat de determinats substrats en aquests orgànuls, com per exemple interaccionant amb l'ARN helicasa A o STAT3 a nucli^{134,136–138}.

El fet que aquestes proteïnes estiguin conservades al llarg de l'evolució en diferents espècies posa de manifest la seva importància^{139–141}. Concretament, alteracions en la seva expressió, activitat o distribució cel·lular s'han relacionat amb inflamació, diabetis o càncer^{133–135}. Una de les malalties on han estat més estudiats els RTK és el càncer, ja que diversos membres es troben freqüentment mutats o sobreexpressats. Els RTK s'han associat amb l'inici i progressió de la malaltia i també amb la resistència a quimioteràpia. De fet, hi ha varis assajos clínics en pacients de càncer amb anticossos monoclonals o petits inhibidors contra aquests receptors per tal d'abrogar la seva funció^{133,135,142}.

3.1. SUBFAMÍLIA EPH

El receptor motiu d'aquesta tesi, EPHA2, forma part de la subfamília Eph (*Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma receptors*), que deu el seu nom a la

INTRODUCCIÓ

línia cel·lular de la que es va aïllar l'ADNc (ADN complementari) del primer membre descrit. Aquesta subfamília és la més gran dins dels RTK, comptant en humans amb 14 membres i 8 lligands, que són les efrines¹³². És interessant remarcar que els receptors Eph es troben presents en tots els organismes animals, amb un sol membre en *Drosophila* o *C. elegans* però incrementant el número en vertebrats superiors¹³⁹⁻¹⁴¹. Els receptors Eph es divideixen en dos grups: els que s'uneixen preferentment a efrines tipus A (EphA1-8, EphA10) i els que s'uneixen preferentment a efrines tipus B (EphB1-4, EphB6). Pel que fa als lligands, en humans hi ha descrites 5 efrines tipus A i 3 efrines tipus B^{143,144}. Tot i així, es coneix certa promiscuïtat entre aquestes proteïnes, ja que cada receptor és capaç d'unir més d'una efrina diferent, i de vegades els receptors tipus A uneixen efrines B i viceversa^{145,146}.

Pel que fa a l'estructura de les efrines tipus A, són proteïnes de baix pes molecular (al voltant d'uns 20 kDa) que consten d'un domini d'unió al receptor i estan unides a la membrana cel·lular mitjançant un glicolípide: el glicosilfosfatidilinositol. Això les diferencia de les efrines tipus B, que s'uneixen a la superfície cel·lular per una regió transmembrana hidrofòbica^{143,147}. Les efrines són proteïnes exposades a la superfície cel·lular, cosa que les diferencia de la resta de lligands que en general són solubles, com per exemple les citoquines. Per aquest motiu, la interacció efrina-receptor és altament dependent dels contactes cèl·lula-cèl·lula, una expressant el receptor i l'altre el lligand, fet que es coneix com a interacció *trans*^{148,149}.

Aquesta interacció amb l'ambient cel·lular fa que un dels processos on estan implicats els receptors Eph sigui l'atracció i repulsió cel·lular. Així, esdevenen importants en el desenvolupament embrionari, controlant processos com la formació dels marges tissulars, la direccionalitat dels axons, o el

posicionament cel·lular dins d'un teixit¹⁵⁰⁻¹⁵². Per exemple, una prolongació axonal que contingui un determinat receptor, serà atreta a una determinada zona que contingui la seva efrina corresponent. D'igual manera, un contacte receptor-efrina també pot determinar repulsió cel·lular i així organitzar l'estructura tissular¹⁵³. D'altra banda, en organismes adults, els receptors Eph estan implicats en regeneració de teixits, plasticitat sinàptica i també són importants en cèl·lules mare adultes¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Altrament, també s'han relacionat amb adhesió o migració cel·lular, ambdós processos altament relacionats amb la organització del citoesquelet d'actina^{153,157}. A nivell molecular, això s'explica en gran mesura per les Rho GTPases, que poden ser inhibides o activades pels receptors Eph, i que juguen un paper molt important en la regulació del citoesquelet¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Mecanísticament, després d'unir-se a les efrines, aquests receptors formen grans oligòmers per activar-se i en general s'internalitzen per promoure vies de senyalització com la de FAK (*focal adhesion kinase*) o la de les GTPases Ras¹⁶¹. La finalització d'aquesta senyalització pot donar-se per un tall proteolític del receptor i/o la efrina, per l'acció d'una fosfatasa o per una internalització i posterior degradació dels complexos lligand-receptor^{134,143,162,163}. Un dels aspectes característics dels receptors Eph és que aquesta senyalització és bidireccional, succeeix tant a la cèl·lula que expressa el receptor (senyalització *forward*) com a la que expressa el lligand (senyalització *reverse*), tot i que activa vies molt diferents^{148,153}. En les cèl·lules que expressen les efrines tipus A o B, la família de quinases Src sembla tenir un paper essencial en aquesta senyalització. Malgrat això, les vies més estudiades són les que s'activen a la cèl·lula que expressa el receptor, que es considera la via canònica^{133,153}.

INTRODUCCIÓ

Paral·lelament, hi ha estudis que han demostrat alternatives a aquestes rutes clàssiques d'acció. D'una banda, s'ha descrit que aquests receptors poden actuar en *cis*, interaccionant amb efrines expressades per la mateixa cèl·lula, tot i que això s'ha relacionat amb efectes inhibidors de la senyalització^{152,164}. D'altra banda, també s'ha descrit que el receptor EphB2 pot ser secretat per les cèl·lules mitjançant exosomes. Així, pot actuar en cèl·lules que expressin el seu lligand tot i que no estiguin en contacte directe. En la mateixa direcció, s'ha descrit que les cèl·lules tumorals alliberen formes solubles i funcionals de la efrina-A1, que poden actuar de forma paracrina. Globalment, aquestes troballes suposen un canvi de paradigma en l'estudi dels receptors Eph¹⁶⁵⁻¹⁶⁷, que encara requereix molta recerca.

En relació a patologies, es coneix que la pèrdua d'alguns membres d'aquesta família provoca malformacions en els hemisferis cerebrals i altres desordres neurològics^{138,143,168}. De forma oposada, s'han trobat diversos receptors d'aquesta família sobreexpressats en càncer^{135,149}. Malgrat que les cèl·lules tumorals en moltes ocasions no expressen les efrines, aquests receptors també presenten senyalització independent del lligand. Així, per mitjà de *crosstalk* amb altres receptors com EGFR (*epidermal growth factor receptor*) o IGF1R poden activar senyalització prooncogènica i promoure, entre d'altres, proliferació, adhesió, angiogènesi o invasió cel·lular^{161,169,170}. Per exemple, els receptors EphB4 i EPHA2 es troben sobreexpressats en càncer de mama, fet que s'ha relacionat de forma general amb un mal pronòstic^{149,171,172}. Per aquest motiu, actualment hi ha diverses molècules patentades per tal d'inhibir aquests receptors en diferents tipus de tumors^{173,174}.

Contràriament, també s'han descrit efectes supressors pels receptors Eph, com per exemple EphB2 en càncer colorectal. En aquest cas, la via de WNT

(*wingless type*) es troba hiperfosforilada i promou l'expressió d'EphB2, que a l'interaccionar amb el seu lligand inhibeix la migració i invasió de les cèl·lules tumorals. De fet, en estadis avançats de la malaltia el receptor esdevé silenciats transcripcionalment^{143,175,176}. Així, aquest paper dual en determinats tipus de càncer incrementa la complexitat de l'estudi d'aquest sistema.

3.1.1. ESTRATÈGIES PER INHIBIR LA SENYALITZACIÓ EFRINA-RECEPTOR

La implicació dels receptors Eph en diferents patologies ha obert la porta a teràpies dirigides a modular la seva activitat o expressió, ja sigui d'un receptor concret o de diversos membres de la família. A més, també s'estan estudiant com a eina per dirigir compostos de manera específica als teixits on estan expressats. En aquesta direcció, s'han desenvolupat diverses molècules dirigides contra ells que es resumeixen a la taula I2.

Una de les estratègies més utilitzades és el tractament amb dominis extracel·lulars recombinants de les efrines o dels receptors, que s'uneixen a la seva parella corresponent. Aquests dominis poden activar o inhibir la senyalització i poden tenir una vida mitja elevada. Per exemple, el domini extracel·lular del receptor EphB4 s'ha utilitzat en càncer com agent antiangiogènica^{149,177}. Els anticossos poden ser una altra aproximació, donada la seva elevada capacitat d'unió, la seva especificitat i la vida mitja elevada. Igual que amb els dominis extracel·lulars recombinants, els anticossos poden tenir efectes activadors o inhibidors, i s'estan desenvolupant contra els receptors i contra les efrines pel tractament del càncer¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

INTRODUCCIÓ

De forma complementària, també es poden emprar pèptids agonistes o antagonistes o molècules petites (compostos de baix pes molecular). Les molècules petites, no obstant, a dia d'avui encara no han mostrat una bona afinitat d'unió, probablement degut a la gran mida i flexibilitat del complex efrina-receptor^{149,181}. El que sí ha demostrat millor eficiència són els inhibidors de l'activitat quinasa. Tot i així, aquests tenen poca especificitat i actuen sobre molts RTK alhora. De fet, inhibidors quinasa dissenyats per altres famílies han demostrat activitat en receptors Eph, com per exemple el Dasatinib^{173,182-184}. La última tecnologia utilitzada és el silenciament gènic dels lligands o receptors mitjançant ARNsi. Aquests són molt específics, i eliminen qualsevol possibilitat d'interacció efrina-receptor. Per exemple, s'han obtingut bons resultats amb un ARNsi contra el receptor EphB4 en models de càncer d'ovari, on s'ha observat un increment de l'apoptosi i una disminució del creixement tumoral *in vivo*. Malgrat això, l'estabilitat dels ARNsi és baixa i, a més, sovint s'han d'unir a d'altres molècules per arribar a les cèl·lules diana^{180,185}.

Taula 12: Molècules dissenyades per modular la família Eph. Adaptat de Barquilla *et al.* 2015¹⁴⁹. *Forward*: senyalització a la cèl·lula que conté el receptor. *Reverse*: senyalització a la cèl·lula que conté la efrina. DEC: domini extracel·lular.

| Agent | Diana | | Efecte senyalització | | | |
|------------------------------------|---------------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Receptor/ Efrina | Altres | Forward | Reverse | Forward No canònica | Reverse No canònica |
| DEC Eph | Efrina A o B | Improbable | Disminució | Disminució | Disminució o no efecte | No efecte |
| DEC Efrina | Receptor A o B | Improbable | Increment o disminució | Disminució | No efecte | Disminució o no efecte |
| Anticòs inhibidor | Receptor | Improbable | Disminució | Disminució o no efecte | Disminució o no efecte | - |
| Anticòs inhibidor | Efrina | Improbable | Disminució o no efecte | Disminució | No efecte | Disminució o no efecte |
| Anticòs activador | Receptor | Improbable | Increment | Disminució o no efecte | Disminució o no efecte | No efecte |
| Pèptid antagonista | Receptor | Improbable | Disminució | Disminució | No efecte | No efecte |
| Pèptid agonista | Receptor | Improbable | Increment | Disminució | Disminució o no efecte | No efecte |
| Molècula petita antagonista | Múltiples receptors | Possible | Disminució | Disminució | No efecte | No efecte |
| Molècula petita agonista | Múltiples receptors | Possible | Increment | Disminució | Disminució o no efecte | No efecte |
| Inhibidor RTK | Múltiples receptors | Sí | Disminució | No efecte | No efecte | No efecte |
| ARNsi | Receptor | Improbable | Disminució | Disminució | Disminució | No efecte |
| ARNsi | Efrina | Improbable | Disminució | Disminució | No efecte | Disminució |

INTRODUCCIÓ

Un dels receptors que s'ha intentat inhibir emprant diverses d'aquestes aproximacions és EPHA2, que està implicat en diversos tipus càncer, i que és la principal proteïna d'estudi en aquesta tesi.

3.1.2. EL RECEPTOR EPHA2

El receptor EPHA2 va ser descobert l'any 1990 com a resultat d'un cribratge per localitzar proteïnes tirosina quinasa a partir d'ADNc de cèl·lules epitelials. De fet, EPHA2 inicialment es va anomenar Eck, que correspon a *Epithelial cell kinase*. Just aquell mateix any es va descobrir de manera independent la proteïna efrina-A1, que en un principi es va descriure com a diana del TNF (*tumor necrosis factor*). Tot i que la efrina-A1 és el principal lligand del receptor EPHA2, no va ser fins el 1994 que es va descriure com a lligand del receptor EPHA2, que va ser considerat receptor orfe fins al moment¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Malgrat això, s'ha descrit que EPHA2 també pot ser activat per les efrines A2-A5¹⁴⁷.

EPHA2 posseeix una estructura similar a la resta de receptors de la seva família, presentant un 55-70 % d'homologia de seqüència amb els altres membres¹⁴⁷ (figura I6). A la regió extracel·lular (N-terminal), té un domini d'unió al lligand, una regió rica en cisteïnes (domini Cys), i dos dominis de repetició fibronectina tipus III. EPHA2 també consta d'una regió transmembrana que el manté unit a la superfície cel·lular i d'un domini juxtamembrana intracel·lular¹⁸⁹. En la regió juxtamembrana conté dos residus tirosina conservats (Y588 i Y594) que són molt importants per l'autofosforilació i activació del receptor¹⁹⁰. També a l'interior de la cèl·lula es troba el domini quinasa, un domini SAM (*sterile alpha motif*) necessari per

l'oligomerització del receptor i un domini d'unió a motius PDZ (*Postsynaptic density protein, Disks large, Zona occludens*)^{189,191}. El domini SAM i el domini PDZ són fonamentals per a la interacció proteïna-proteïna^{143,147}.

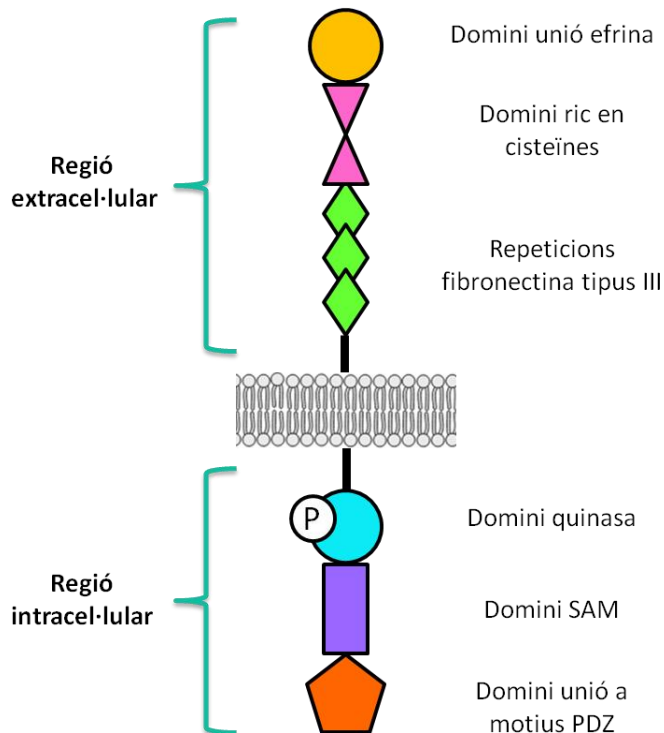


Figura 16: Estructura del receptor EPHA2. A la regió extracel·lular es troba el domini d'unió a lligand mentre que a la regió intracel·lular estan els dominis que uneixen les proteïnes adaptadores necessàries per iniciar la cascada de senyalització.

En relació a les vies de senyalització, els residus fosfotirosina al llarg del receptor esdevenen claus per interaccionar amb proteïnes citoplasmàtiques que continguin dominis SH2. Així, EPHA2 interacciona per exemple amb Grb7, una proteïna essencial per la migració cel·lular¹⁹². Al mateix temps, EPHA2 també pot unir-se a altres proteïnes que continguin dominis d'unió a

INTRODUCCIÓ

PDZ. Per exemple, mitjançant el domini d'unió a PDZ, pot interaccionar amb la proteïna PATJ (*Pals-1-associated tight junction protein*), que al mateix temps recluta RhoA (*Ras Homolog Family Member A*) i promou l'angiogènesi¹⁹³. Altres de les molècules diana d'EPHA2 són les MAPK, les PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinases*) i les quinases de la família Src, que esdevenen molt importants en els processos tumorals^{189,194}. A banda d'això, EPHA2 també pot interaccionar amb altres RTK. Per exemple, s'ha descrit que pot unir-se a ErbB2 (HER-2) i activar així les Rho GTPases i la senyalització d'ERK1/2, que resulta en un increment en la proliferació i migració cel·lular¹⁴³.

Tanmateix, pel que fa a la regulació de l'expressió d'*EPHA2*, s'han descrit diferents mecanismes. D'una banda, *EPHA2* és diana transcripcional de TP53 en resposta a dany de l'ADN^{195,196} i del repressor transcripcional HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*), que és un supressor tumoral freqüentment silenciada en càncer¹⁹⁷. D'altra banda, *EPHA2* també està regulat per diferents microARNs (ARNmi) com el miR-141 o el miR-200a^{198,199}. De forma paral·lela, també s'ha descrit que l'estabilitat de la proteïna és important per determinar la quantitat de receptor present a les cèl·lules. Aquesta regulació ajuda a incrementar els nivells proteics d'EPHA2 en determinades circumstàncies^{200–202}.

A nivell funcional, *EPHA2* es troba fortament expressat durant l'etapa embrionària, on s'ha vist implicat en la gastrulació i en el desenvolupament del sistema òptic, l'oïda interna, el ronyó o el cervell, entre d'altres^{203–206}. De fet, mutacions en els dominis quinasa i SAM d'aquest receptor s'han descrit com a causa de cataractes congènites, que és la discapacitat visual més comuna en nens que pot ser tractada^{147,203,207}. En les etapes posteriors al

desenvolupament embrionari, en general hi ha una disminució dels nivells d'expressió d'aquesta família de receptors²⁰⁸. En adults, *EPHA2* s'ha trobat expressat en diversos tipus de teixits, especialment en aquells que contenen una elevada proporció de cèl·lules epitelials en divisió, com la pell o l'intestí^{209–211}. Tot i així, no existeix una caracterització profunda de l'expressió i funció d'aquesta proteïna en teixit adult sa, i no s'ha relacionat amb cap altra patologia de l'edat adulta més enllà del càncer^{147,194,211}.

3.1.2.1. SENYALITZACIÓ D'EPHA2 INDEPENDENT DE LLIGAND

Independentment de la funció canònica mitjançant les efrines, s'ha descrit recentment que *EPHA2* també pot presentar activitat independent de lligand i de l'activitat tirosina quinasa, de forma alternativa a la via clàssica d'acció (figura I7). De fet, en diferents tumors s'ha descrit una baixa fosforilació d'*EPHA2* en residus tirosina tot i la seva sobreexpressió. Així, la funció independent de lligand explica el paper oncogènic d'*EPHA2* tot i no estar fosforilat en els clàssics residus tirosina^{194,212}. Recentment, es va descobrir que la funció independent de lligand d'*EPHA2* recau en la fosforilació del residu serina 897 (S897), i només succeeix en absència del lligand²¹². Concretament, en presència d'efrina-A1, *EPHA2* es fosforila en residus tirosina i es desfosforila en el residu S897. La fosforilació S897 inicialment es va descriure que era responsabilitat d'*AKT*^{212,213}. No obstant, en els darrers anys, s'ha descrit que també pot ser promoguda per la via MEK1/2-ERK1/2-RSK1/2 (*Ribosomal Protein S6 Kinase*)^{214,215}. La fosforilació S897 pot ser promoguda per diferents factors de creixement com EGF (*epidermal growth factor*) o HGF (*hepatocyte growth factor*) i es tradueix en un increment de la polaritat cel·lular, una reorganització del citoesquelet d'actina i un increment

INTRODUCCIÓ

de la proliferació, migració i invasió cel·lular^{143,212–215}. Per últim, és interessant remarcar el fet que el residu S897 només està present en els receptors EphA1 i EPHA2, suggerint que aquest tipus de regulació independent de lligand només es troba en aquests dos receptors¹⁴³.

3.1.2.2. FUNCIÓ ONCOGÈNICA O SUPRESSORA D'EPHA2 EN CÀNCER

Després del desenvolupament embrionari, el rol que més s'ha estudiat d'EPHA2 és la seva contribució als processos tumorals. Paradoxalment, s'ha descrit que pot tenir un paper promotor o supressor del fenotip neoplàsic. Aquest paper dual està altament relacionat amb la seva activitat dependent o independent de lligand (figura I7), amb el tipus cel·lular i amb la interacció amb l'estroma tumoral.

L'activitat oncogènica d'EPHA2 està relacionada principalment amb la seva sobreexpressió i senyalització independent de lligand. Donat que l'efrina-A1 disminueix l'expressió d'EPHA2, només en absència del lligand aquest receptor es pot trobar sobreexpressat. Per citar alguns casos, EPHA2 s'ha trobat sobreexpressat en pacients de càncer de pròstata^{216,217}, d'ovari^{218,219}, o de melanoma^{220,221}. En general, això s'ha relacionat amb una manca de fosforilació en residus tirosina, un increment en l'angiogènesi, la proliferació, migració i invasió cel·lular, la taxa de metàstasi i, en conseqüència, un pitjor pronòstic pels pacients^{143,211}. Aquest paper promovent el fenotip invasiu s'explica en part per la capacitat d'EPHA2 de promoure la proliferació i migració de les cèl·lules endotelials en absència d'efrina-A1^{130,222,223}.

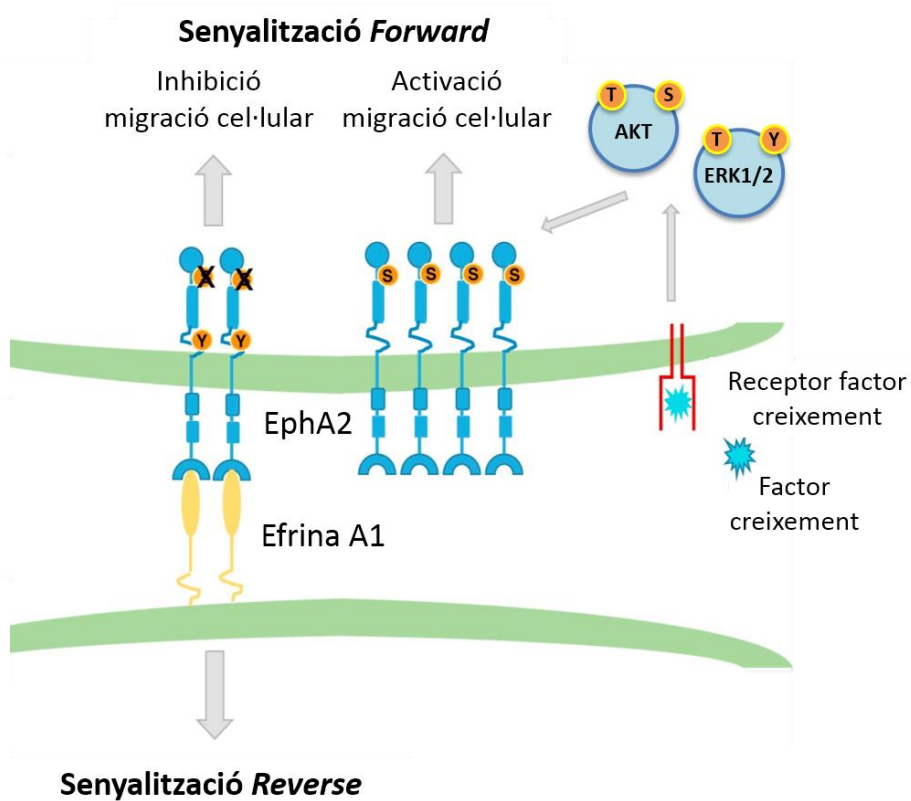


Figura 17: Senyalització d'EPHA2. En presència del seu lligand, EPHA2 esdevé fosforilat en residus tirosina i perd la fosforilació del residu S897. Així, EPHA2 activa diferents vies de senyalització que promouen una inhibició de la migració cel·lular. En absència del lligand, EPHA2 es troba fosforilat en el residu S897, promovent un increment en la polaritat cel·lular i l'extensió dels lamel·lipodis. En conseqüència, hi ha un increment en la migració i invasió cel·lulars. Les proteïnes AKT i ERK1/2 són les principals responsables de la fosforilació del residu S897 d'EPHA2, en resposta a estímuls com factors de creixement. Tota aquesta senyalització que es dona a la cèl·lula que expressa el receptor es coneix com a *Forward*. Per contra, la senyalització que s'activa a la cèl·lula que expressa el lligand es coneix com a *Reverse*. S: serina; T: treonina; Y: tirosina. Imatge modificada de Taylor *et al.* 2017¹⁴³.

INTRODUCCIÓ

D'altra banda, el paper supressor d'EPHA2 en diversos tumors s'ha relacionat amb la seva interacció amb efrina-A1. Així, entre d'altres, el receptor és capaç d'inhibir la fosforilació d'AKT, cosa que provoca una retracció dels lamel·lipodis i una disminució en el potencial migratori i invasiu de les cèl·lules tumorals²¹². Altrament, l'activació d'EPHA2 mitjançant el lligand promou una disminució de la fosforilació de FAK i una inactivació de les integrines. Aquest lligand també indueix una regulació de les Rho GTPases i promou modificacions del citoesquelet d'actina. Aquests i d'altres mecanismes disminueixen la capacitat d'adhesió, migració i invasió de les cèl·lules tumorals^{143,224–226}. Contràriament, la interacció efrina-A1/EPHA2 també ha mostrat un paper oncogènic en línies cel·lulars de carcinoma hepatocel·lular, trobant-se sobreexpressada la efrina-A1 en pacients i promovent la proliferació de les cèl·lules tumorals²²⁷.

Pel que fa als sarcomes pediàtrics, EPHA2 no és dels RTK més estudiats. Tot i així, està descrit que es troba sobreexpressat en línies cel·lulars d'osteosarcoma respecte a teixit ossi sa, on no s'expressa. A més, està present en la majoria de mostres humanes analitzades d'aquest tumor i aquesta expressió mostra una tendència a una menor supervivència^{228,229}. En rhabdomyosarcoma orbital, s'ha mostrat que l'expressió d'EPHA2 està relacionada amb la capacitat de les cèl·lules tumorals per mimetitzar la formació de vasos sanguinis, la qual cosa correlaciona amb un pitjor pronòstic pels pacients²³⁰. Per últim, en relació al SE, el nostre grup va descriure que EPHA2 s'expressa en pacients i que és important per regular l'angiògenesis mitjançant de la seva interacció amb CAV1 (23951165). En la mateixa direcció, un altre grup va descriure que *EPHA2* es troba sobreexpressat a nivell transcripcional en SE, respecte mostres musculars i

cèl·lules hematopoiètiques control²³¹. Conjuntament, això suggereix un paper important d'EPHA2 en sarcomes pediàtrics.

3.1.2.3. INHIBICIÓ TERAPÈUTICA D'EPHA2

Després de veure la rellevància d'EPHA2 en diversos tumors, diferents grups han desenvolupat mètodes per tal d'inhibir l'activitat oncogènica d'aquest receptor^{149,173,189}. Alguns dels més utilitzats són:

-Anticossos contra EPHA2: s'han dissenyat diversos anticossos agonistes contra el domini extracel·lular del receptor. Aquests, han aconseguit disminuir els nivells d'EPHA2 total degut a la internalització i posterior degradació del mateix, simulant l'efecte de l'efrina-A1. Així, s'ha mostrat eficàcia en models murins preclínic de càncer com a agent únic^{232,233}. En combinació amb altres tractaments, aquests anticossos també han incrementat la citotoxicitat d'agents quimioterapèutics com el Tamoxifè o Docetaxel^{233,234}.

-Molècules petites: una de les més utilitzades és el Dasatinib, que ha demostrat una inhibició del creixement tumoral en diferents models de xenoempelts. El Dasatinib va ser inicialment dissenyat per inhibir la proteïna quinasa BCR-ABL1 (*Breakpoint Cluster Region-ABL proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*) del cromosoma Filadèlfia en leucèmies. Tot i així, posteriorment es va descriure que és un inhibidor de múltiples RTK, incloent EPHA2. Tanmateix, s'ha demostrat que la presència d'EPHA2 és essencial per determinar la sensibilitat al fàrmac en diferents línies tumorals, i que el Dasatinib és capaç de disminuir els nivells d'expressió d'EPHA2^{189,235,236}.

INTRODUCCIÓ

-Silenciament gènic d'*EPHA2*: l'ús d'ARNsi ha demostrat una disminució de la proliferació cel·lular i un increment en l'apoptosi en línies de glioma. A més, en treballs sobre càncer gàstric i d'ovari, s'ha observat una disminució del volum tumoral en xenoempelts tractats amb nanopartícules o liposomes carregats amb un ARNsi contra *EPHA2*^{218,237-239}. De fet, actualment s'estan reclutant pacients per un assaig clínic fase 1 amb complexos liposoma-ARNsi*EPHA2* per pacients de càncer recurrent (#NCT01591356²⁴⁰).

4. (CONTINGUT XIFRAT)

Hipòtesi i objectius

1. HIPÒTESI

Ateses les evidències que el receptor de membrana EPHA2 està sobreexpressat en pacients de SE, i la relació d'aquest receptor com a marcador de malignitat, és possible que EPHA2 contribueixi al fenotip neoplàsic de les cèl·lules de SE. (CONTINGUT XIFRAT)

2. OBJECTIUS

Els objectius que es plantegen en aquesta tesi doctoral són:

- I. Avaluar el grau d'expressió del receptor EPHA2 i determinar el paper de la fosforilació S897 en cèl·lules de SE.
- II. Analitzar els efectes de silenciar o sobreexpressar *EPHA2* en cèl·lules de SE i desxifrar els mecanismes moleculars associats al receptor en aquestes cèl·lules.
- III. Determinar el rol d'EPHA2 en un altre sarcoma pediàtric.
- IV. CONTINGUT XIFRAT
- V. CONTINGUT XIFRAT

Materials i mètodes

1. LÍNIES CEL·LULARS

Les línies cel·lulars amb les quals es va treballar es descriuen a la taula M1. Totes van ser validades i autenticades per l'empresa qGenomics.

1.1. CONDICIONS DE CULTIU

Pel manteniment cel·lular, les línies es van cultivar en medi RPMI 1640 (RPMI) complementat amb un 1 % de penicil·lina/estreptomicina (P/S) i un 10 % de sèrum fetal boví (FBS), prèviament inactivat a 56 °C. Les cèl·lules es van mantenir en un incubador HERAcell humidificat a 37 °C amb una atmosfera al 5 % de CO₂. Per dividir les cèl·lules, es va utilitzar tripsina-EDTA per desenganxar-les de la placa, que es va bloquejar amb medi RMPI suplementat amb P/S i FBS. Les cèl·lules es van centrifugar durant 5 min a 1200 rpm i es van sembrar diluïdes en una nova placa.

Per tots els experiments es van utilitzar cèl·lules en fase exponencial de creixement que no arribessin a confluència i amb un màxim de 10 passis des del moment de la descongelació.

1.2. RECOMPTE CEL·LULAR

El recompte es va realitzar utilitzant la cambra Kova Glasstic Slide que presenta un sistema similar a la cambra de Neubauer. Es va utilitzar la mitjana de 4 àrees de comptatge independents i es van comptar cèl·lules vives i mortes.

MATERIALS I MÈTODES

La mort cel·lular es va avaluar mitjançant la tinció amb blau de tripà. Les cèl·lules vives presenten la membrana cel·lular intacta, motiu pel qual exclouen la tinció amb blau de tripà. Pel contrari, aquest colorant penetra en les cèl·lules mortes, que queden tenyides de color blau. El número de cèl·lules sembrades per cada experiment fa referència a la quantitat de cèl·lules vives.

Taula M1: Resum de les línies cel·lulars utilitzades. Es detalla el nom de la línia, el tipus de tumor, la seva adquisició, l'origen cel·lular i el cariotip. ^a*Children's Cancer Research Institute*, Viena, Àustria. ^b*Institut Curie*, Paris, França. ^c*The Research Institute Nationwide Children's Hospital*, Columbus, Ohio, USA. ^d*Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Braunschweig, Alemanya. ^eDepartament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron -Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. ^f*Department of Oncology and Children's Research Center, University Children's Hospital*, Zurich, Suïssa. ^g*National Cancer Institute*, Bethesda, MD, USA. SE: sarcoma d'Ewing. RMS: rabdomiosarcoma. ARMS: rabdomiosarcoma alveolar. ERMS: rabdomiosarcoma embrionari.

| Línia | Tipus tumor | Adquisició | Origen cel·lular | Cariotip |
|----------------|-------------|-----------------------------------|---|---|
| A673 | SE | Dr. Heinrich Kovar ^a | Pacient de 15 anys ²⁴¹ | Múltiples reordenacions cromosòmiques. Entre elles, t(11;22) que dona lloc a <i>EWS-FLI1</i> tipus I ²⁴² |
| EW7 | SE | Dr. Olivier Delattre ^b | Efusió pleural d'un pacient de 20 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dona lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ²⁴³ |
| RH1 | SE | Dr. Peter Houghton ^c | <i>Xenograft</i> d'un pacient erròniament diagnosticat com a RMS ²⁴⁴ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dona lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ²⁴⁴ |
| SK-N-MC | SE | Comprada a DSMZ ^d | Massa supraorbital d'una pacient de 14 anys ²⁴⁵ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dona lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ²⁴³ |

| | | | | |
|-----------------|------|---|---|--|
| STA-ET-1 | SE | Dr. Heinrich Kovar ^a | Húmer d'una pacient de 13 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ²⁴³ |
| TC252 | SE | Dr. Heinrich Kovar ^a | Metàstasi pulmonar d'un pacient de 20 anys prèviament tractat ^{246,247} | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ⁹² |
| TC71 | SE | Comprada a DSMZ ^d | Húmer d'un pacient de 22 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus I ²⁴³ |
| RD-ES | SE | Comprada a DSMZ ^d | Húmer d'un pacient de 19 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus II ^{243,245,248} |
| SK-ES1 | SE | Comprada a DSMZ ^d | Os d'un pacient de 18 anys ²⁴⁸ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus II ^{245,248} |
| A4573 | SE | Dr. Santiago Ramón y Cajal ^e | Efusió pleural d'una pacient de 17 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(11;22) que dóna lloc a <i>EWS-FLI1</i> de tipus III ²⁴⁹ |
| CADO-ES | SE | Dr. Heinrich Kovar ^a | Efusió pleural d'una pacient de 19 anys ²⁴³ | Translocació cromosòmica t(21;22) que dóna lloc a <i>EWS-ERG</i> ²⁴⁸ |
| RH4 | ARMS | Dr. Peter Houghton ^c | Pacient de 7 anys ²⁵⁰ | Translocació t(2;13)(q35;q14) ²⁵⁰ |
| RH41 | ARMS | Comprada a DSMZ ^d | Xenograft de metàstasi pulmonar de la mateixa pacient que la línia RH4 ²⁵⁰ | Translocació t(2;13)(q35;q14) ²⁵⁰ |
| RH28 | ARMS | Dr. Beat Schäfer ^f | Nòdul axil·lar metastàtic d'un pacient de 17 anys ²⁵⁰ | Translocació t(2;13)(q35;q14). Propera a la tetraploidia ²⁵⁰ |
| RMS13 | ARMS | Dr. Beat Schäfer ^f | Es creu que prové d'un pacient de 16 anys ²⁵⁰ | Translocació t(2;13)(q35;q14) ²⁵⁰ |
| RH30 | ARMS | Dr. Peter Houghton ^c | Metàstasi de medul·la òssia d'un pacient de 16 anys ²⁵⁰ | Translocació t(2;13)(q35;q14). Propera a la triploidia ²⁵⁰ |
| CW9010 | ARMS | Dr. Frederic Barr ^g | Desconegut ²⁵⁰ | Translocació t(1;13) ²⁵⁰ |
| RD | ERMS | Comprada a DSMZ ^d | Massa pèlvica d'una pacient de 7 anys ²⁵⁰ | Hiperploïdia ²⁵⁰ |

MATERIALS I MÈTODES

| | | | | |
|--------------|----------------|-------------------------------|---|---|
| RH36 | ERMS | Dr. Beat Schäfer ^f | Relapse paratesticular d'un pacient de 15 anys ²⁵⁰ | Desconegut |
| RUCH2 | RMS Botrioides | Dr. Beat Schäfer ^f | Massa vaginal d'una pacient de 15 mesos ²⁵⁰ | Reordenacions cromosòmiques múltiples ²⁵⁰ |
| A204 | Tumor rabdoide | Comprada a DSMZ ^d | Pacient de 13 mesos ²⁴¹ | Població mixta: diploidia i tetraploidia ²⁴¹ |

1.3. CRIOPRESERVACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS

Les cèl·lules es van mantenir criopreservades a passis curts tripsinitzant-les d'una placa p100 de la manera convencional i centrifugant 5 min a 1200 rpm. El pèl·let cel·lular es va resuspendre en medi de congelació (10 % dimetil sulfòxid (DMSO); 90 % FBS) i es va dividir en dos criotubs que es van congelar de forma immediata a -80 °C i posteriorment a -196 °C en nitrogen líquid.

1.4. OBTENCIÓ DE PÈL·LETS CEL·LULARS

Aquests es van obtenir després de tripsinitzar les cèl·lules en cultiu de la manera rutinària, centrifugar-les 10 min a 1800 rpm i fer un posterior rentat amb PBS seguit d'una centrifugació de 10 min més a 1800 rpm. Aquests pèl·lets es van utilitzar *a posteriori* per fer extracció de proteïna, ADN o ARN.

2. TRACTAMENTS AMB COMPOSTOS QUÍMICS

Per tots els tractaments, si no s'indica el contrari, les cèl·lules van ser sembrades en medi RPMI amb FBS al 10 % i P/S a l'1 %.

2.1. INHIBIDORS DE LA VIA D'ERK1/2

Per tal d'inhibir aquesta via es van utilitzar dos compostos diferents: U0126 i Trametinib, que són inhibidors selectius de les proteïnes MEK-1 i MEK-2. La inhibició del complex MEK1/2 resulta en una disminució de la fosforilació i conseqüent activació d'ERK1/2. Es van sembrar les cèl·lules en una placa p100 i quan van arribar a una confluència de com a mínim el 50 % es van tractar en les següents condicions:

-U0126 a una concentració 20 μ M durant 24-48 h. En alguns casos també es van realitzar els experiments amb medi sense sèrum.

-Trametinib a concentracions 50-500 nM durant 3-24 h.

2.2. INHIBIDORS DE LA VIA D'AKT

Per tal d'inhibir aquesta via es van utilitzar els compostos MK-2206 i BKM-120. MK-2206 és un inhibidor al·lostèric d'AKT, mentre que BKM-120 és un inhibidor selectiu de PI3K. La inhibició de PI3K resulta en una disminució de la fosforilació i conseqüent activació d'AKT. Es van sembrar les cèl·lules en una placa p100 i quan van arribar a una confluència de com a mínim el 50 % es van tractar en les següents condicions:

-MK-2206 a concentracions 1-10 μ M durant 24 h.

-BKM-120 a concentracions 1-5 μ M durant 24 h.

2.3. (CONTINGUT XIFRAT)

3. AMPLIFICACIÓ DE PLASMIDIS

Els plasmidis utilitzats per les transfeccions van ser pCMV6 Entry-*EPHA2*-Flag (Qiagen) en el cas de la reintroducció d'*EPHA2* i el vector pRS-shRNA *EPHA2* B (Qiagen) per silenciar el receptor. Totes les transfeccions es van fer amb el seu corresponent control de vector buit i/o vector més seqüència control. Els plasmidis comercials utilitzats van ser transformats i amplificats prèviament en bacteris i després purificats utilitzant un *kit* comercial.

3.1. TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Es van barrejar 50 μ L dels bacteris competents de la soca DH5 α d'*E.coli* amb 50 ng del vector desitjat en tubs de polipropilè i es va deixar 30 min en gel. Seguidament, es va realitzar un xoc tèrmic de 45 seg a 42 °C. Es va deixar la reacció 2 min en gel i a continuació es van afegir 250 μ L de medi SOC i es van deixar créixer els bacteris 1 h a 37 °C en agitació. A continuació, es van sembrar 100 μ L del cultiu en plaques de LB (*Luria Broth*)-agar amb l'antibiòtic corresponent: ampicil·lina 50 μ g/mL o kanamicina 25 μ g/mL. Les plaques es van deixar créixer tota la nit en una estufa a 37 °C perquè es formessin les colònies bacterianes.

3.2. CULTIU DE BACTERIS

Per tal de multiplicar la quantitat de material genètic i caracteritzar-lo, es van créixer les colònies transformades en cultiu líquid. De cada placa es van picar entre 1-3 colònies en un tub amb 5 mL de medi LB amb l'antibiòtic de resistència corresponent i es va créixer tota la nit a 37 °C en agitació.

D'aquest medi, es van utilitzar 3 mL per fer una purificació d'àcids nucleics i comprovar l'eficiència de replicació del vector. Això es va fer mitjançant una *miniprep* amb el *kit* "Plasmid ADN Purification" de la casa Macherey-Nagel, seguint les instruccions del fabricant. Tot seguit, es va comprovar si s'havia obtingut una concentració del plasmidi elevada amb l'ajuda de l'espectrofotòmetre Nanodrop.

En els casos on la concentració i puresa de la *miniprep* eren adients, els altres 2 mL del cultiu inicial es van inocular en 200 mL de medi LB amb antibiòtic i es va créixer tota la nit a 37 °C en agitació. D'aquest cultiu es va realitzar la *maxiprep*, que permet obtenir més quantitat de plasmidi i amb una puresa superior que la *miniprep*, ideal per transfectar en cèl·lules eucariotes. Per això es va utilitzar el *kit* EndoFree Plasmid Maxi de la casa comercial Qiagen, seguint les instruccions del fabricant. L'ADN purificat es va tornar a quantificar amb el Nanodrop i també es va comprovar la seva identitat mitjançant digestió amb enzims de restricció.

3.3. DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ

Es van analitzar els mapes de restricció dels diferents vectors buscant dos possibles resultats. D'una banda, es va buscar un enzim de tall únic per tal de linealitzar el vector i comprovar que tenia la mida que corresponia. D'altra banda, es van buscar dos enzims que permetessin alliberar l'insert per comprovar de manera independent la mida del vector i de l'insert.

Les digestions es van realitzar a partir de 200 ng d'ADN durant 1 h a 37 °C emprant enzims de diferents cases comercials. Els fragments es van analitzar mitjançant una electroforesi d'àcids nucleics.

3.4. ELECTROFORESI D'ÀCIDS NUCLEICS

L'electroforesi es va realitzar utilitzant gels d'agarosa d'entre 0,8-1,5 % (en funció de la mida dels fragments a separar) en tampó Tris-acetat-EDTA (TAE), emprant bromur d'etidi com a agent intercalant. Es va carregar tot el producte de la digestió afegint tampó de càrrega per densificar les mostres i visualitzar la seva correguda en el gel. Com a referència es va posar un marcador de pes molecular.

4. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Es va generar un mutant d'EPHA2 mitjançant la substitució de la S897 per una alanina. Es va partir del vector comercial pCMV6 Entry-EPHA2-Flag d'Origene i es van dissenyar els primers *Forward*: 5' GTGTCTATCCGGCTCCCCGCCACGAGCGGCTCGGAGG 3' i *Reverse*: 5' CCTCCGAGCCGCTCGTGGCGGGGAGCCGGATAGACAC 3' per generar el canvi desitjat. La mutagènesi es va realitzar amb l'ajuda del *kit* comercial *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* d'Agilent. El material resultant de la reacció es va transformar i amplificar en bacteris. Finalment, tota la seqüència codificant del vector es va seqüenciar per verificar el canvi de S897 a A897 i per descartar altres possibles mutacions sorgides durant el procés.

5. TRANSFECCIONS ESTABLES I SELECCIÓ DE CLONS

Per transfectar les línies cel·lulars de manera estable es van sembrar entre 300.000 i 900.000 cèl·lules (en funció de la línia cel·lular) en una placa de cultiu de 12 pous. Al dia següent, quan les cèl·lules ja estaven adherides i a

una confluència aproximada del 80 %, es va afegir l'agent liposomal (lipofectamina) i l'ADN. Per cada condició es van barrejar 4 µL de lipofectamina amb 1,6 µg del plasmidi en 200 µL de RMPI i passats 20 min es van afegir els liposomes resultants a les cèl·lules amb medi sense antibiòtic. 24 h després de la transfecció, les cèl·lules es van cultivar en una placa de 150 mm per poder aïllar clons individuals. Al cap de 24 h addicionals es va afegir el medi de selecció amb l'antibiòtic corresponent per a cada vector.

La selecció clonal va tenir lloc durant 15 dies aproximadament, canviant el medi de selecció dos cops per setmana. Després d'aquest període, es van aïllar clons individuals amb l'ajuda d'un escuradents quan van arribar a una mida determinada. L'eficiència de la transfecció es va comprovar analitzant els nivells de la proteïna d'interès per *western blot*.

La concentració d'antibiòtic necessària per cada línia cel·lular es va determinar prèviament mitjançant una corba de resistència. Aquesta es va realitzar cultivant les cèl·lules en medi amb antibiòtic a diferents concentracions. Al cap de 15 dies, es va establir com a concentració de treball la concentració d'antibiòtic més baixa a la qual totes les cèl·lules estaven mortes. Pels models de silenciament d'*EPHA2*, la concentració de puromicina utilitzada va ser 0,5 µg/mL per A673 i 0,2 µg/mL per TC252. Pel model de reintroducció d'*EPHA2 wild type* o el mutant S897A a la línia RH1, la concentració de neomicina emprada va ser 800 µg/mL. Els plasmidis utilitzats es detallen en la taula M2.

Taula M2: Resum dels plasmidis utilitzats en les transfeccions estables.

| Vector | Aplicació | Referència | Resistència |
|---|--|-------------------------------------|-------------|
| pRS | Control | Origene #TR30012 | Puromicina |
| pRS-shRNA SCR | Control | Origene #TR20003 | Puromicina |
| pRS-shRNA <i>EPHA2</i> B | Silenciament d' <i>EPHA2</i> | Origene #TR320327B | Puromicina |
| pRS-shRNA <i>EPHA2</i> C | Silenciament d' <i>EPHA2</i> | Origene #TR320327C | Puromicina |
| pCMV6 Entry- Flag | Control | Origene PS100001 | Neomicina |
| pCMV6 Entry- <i>EPHA2</i> -Flag | Expressió d' <i>EPHA2 wild type</i> | Origene RC205725 | Neomicina |
| pCMV6 Entry- <i>EPHA2</i> S897A- Flag | Expressió d' <i>EPHA2</i> mutant S897A | Obtingut per mutagènesi dirigida | Neomicina |

6. TRANSFECCIONS TRANSITÒRIES

Per transfectar les línies cel·lulars de manera transitòria (24-72 h), es van sembrar entre 500.000 i 1.500.000 cèl·lules (en funció de la línia cel·lular) en una placa de cultiu de 6 pous. Al dia següent, quan les cèl·lules ja estaven adherides i a una confluència mínima del 50 %, es va afegir l'agent liposomal (en aquest cas DharmaFECT) i l'ARNsi. Per cada condició es van barrejar 200 µL de RMPI, 4 µL de DharmaFECT i la quantitat d'ARNsi necessària perquè quedés a una concentració final de 50-100 nM. Passats 20 min es va afegir la mescla a les cèl·lules amb medi sense antibiòtic. Al cap de 24-72 h de transfecció es va procedir amb la tècnica desitjada.

Els ARNsi emprats es van extreure de bases de dades bibliogràfiques o es van dissenyar mitjançant l'eina bioinformàtica "BLOCK-IT™ RNAi

Designer” de la casa comercial Thermo Fisher Scientific. Com a control de les transfeccions transitòries es van transfectar les cèl·lules amb un ARNsi inespecífic (NT: *non-targeting*). Les seqüències dels ARNsi emprats són: NT

| | | |
|------------------------|------|-----------------|
| 5' UAAGGCUAUGAGAGAUAC | 3'; | <i>EPHA2</i> |
| 5' GUGUCAAAACAUCGUGAGC | 3'; | <i>EWS-FLI1</i> |
| 5' GCAGAACCCUUCUUAUGAC | 3' i | <i>ADAM19</i> |
| 5' GCUCCUCCUACACAGAAA | 3'. | |

7. ANÀLISI DE L'EXPRESSION GÈNICA

7.1. EXTRACCIÓ D'ARN_m

L'ARN missatger (ARN_m) total es va obtenir a partir de pèl·lets cel·lulars conservats a -80 °C. Els pèl·lets es van descongelar en gel i es va realitzar l'extracció utilitzant els *kits* “NucleoSpin RNA” o “NucleoSpin miRNA” (en el cas de l'*array* d'expressió gènica) de la casa comercial Macherey-Nagel, seguint les instruccions del fabricant. Els extractes obtinguts es van quantificar amb el Nanodrop, verificant al mateix temps la puresa de l'extracció.

7.2. OBTENCIÓ D'ADN COMPLEMENTARI PER RETROTRANSCRIPCIÓ

A partir de l'ARN_m obtingut, es va sintetitzar l'ADN_c mitjançant una reacció de transcripció inversa amb reactius de la casa comercial Life Technologies. Es va utilitzar el sistema d'encebadors oligo-dT, que s'aparellen amb les cues poliA dels ARNs i permet obtenir una representació

MATERIALS I MÈTODES

no esbiaixada dels ARNs del transcriptoma. Així, la reacció es va iniciar partint de 2 µg d'ARNm i 1 µL d'oligo-dT, en un volum final de 12 µL en aigua. Aquesta mescla es va desnaturalitzar 5 min en el termociclador a 65 °C. Tot seguit, es va afegir a cada reacció 1 µL de l'enzim transcriptasa SuperScript, 4 µL del tampó de retrotranscripció de l'enzim, 2 µL de DTT (ditiotreitol) i 1 µL de nucleòtids 10 mM. Després d'homogeneïtzar, es va seguir un programa al termociclador de 50 min a 42 °C, 15 min a 70 °C i finalment es van refredar els tubs a 4 °C.

7.3. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

Es va preparar la reacció partint de 10 ng d'ADNc, utilitzant 5 µL de la PCR MasterMix i 1 µL de les sondes TaqMan comercials (Life Technologies) en un volum final de 10 µL. Això es va carregar per triplicat en una placa de 384 pous, i es va córrer la reacció emprant les condicions universals del termociclador LightCycler 480 II de Roche. Els cicles llindar obtinguts de cada mostra es van corregir pel gen *housekeeping* β-actina. Els nivells d'expressió relativa respecte una mostra interna es van obtenir emprant el software de la casa comercial.

8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA PER *WESTERN BLOT*

8.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

L'extracció de proteïna de línies cel·lulars per *western blot* es va realitzar partint de pèl·lets cel·lulars congelats o de mostres tumorals, emprant aproximadament 200 mg de teixit trossejat.

Els extractes proteics es van obtenir per lisi cel·lular, utilitzant el tampó RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) en presència d'inhibidors de proteases i fosfatases: una pastilla de cada inhibidor per cada 10 mL de RIPA. Les mostres es van resuspendre en un volum d'entre 50-150 μ L pels pèl·lets cel·lulars i 250-500 μ L per les mostres tumorals, i es van incubar 30 min en gel. Seguidament, es van sonicar les mostres mitjançant dos polsos de 7 seg a una amplitud del 100 %, amb un pas intermedi de 7 seg de refredament en gel. Per últim, es van centrifugar durant 20 min a 13000 rpm a 4 °C i es va recollir el sobrenedant que contenia l'extracte proteic total. Aquestes mostres es van conservar a -80 °C.

8.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA

La concentració de proteïna dels extractes es va mesurar mitjançant el *kit* comercial "Pierce BCA Protein Assay". En plaques de 96 pous es va barrejar 25 μ L de mostra proteica (prèviament diluïda 1:25 en aigua) amb 200 μ L de la barreja dels reactius A:B (relació 1:50) del *kit*. Es va mantenir 30 min a 37 °C i posteriorment es va llegir l'absorbància a 562 nm. La concentració es

MATERIALS I MÈTODES

va determinar emprant una recta patró feta amb dilucions seriades d'albumina.

8.3. WESTERN BLOT

Amb la finalitat d'estudiar l'expressió proteica, es van barrejar 50 µg de proteïna amb 10 µL tampó de càrrega Laemmli suplementat amb un 5 % de 2-mercaptoetanol. Les mostres es van desnaturalitzar durant 10 min a 95 °C i es van carregar en gels d'acrilamida-SDS (dodecilsulfat sòdic). Com a referència es va carregar també un marcador de pes molecular pretenyit en tots els gels. El percentatge d'acrilamida en el gel separador era d'entre el 8-12 % en funció del pes molecular de les proteïnes estudiades; el gel concentrador era sempre del 4 %.

L'electroforesi es va realitzar en condicions desnaturalitzants durant 80-100 min a 120 V en tampó d'electroforesi (Tris-glicina-SDS). Posteriorment, es van transferir les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 µm de porus per transferència humida: 70 min a 400 mA en tampó de transferència (Tris-glicina) amb un 20 % de metanol. Tot seguit, les membranes es van bloquejar amb una solució de llet al 5 % en PBS-T (PBS; Tween 0,1 %-sigma) durant 1 h.

Els anticossos primaris i secundaris es van utilitzar a les concentracions indicades a la taula M3. La dilució es va preparar en solució de bloqueig i es va incubar durant tota la nit a 4 °C en agitació. Al dia següent, es van fer tres rentats de 5 min amb PBST i es van incubar durant 1 h a temperatura ambient les membranes amb l'anticòs secundari; preparat també en solució

de bloqueig i conjugat amb peroxidasa. Seguidament, es van fer tres rentats de 10 min amb PBST.

Pel procés de revelat, es van utilitzar els sistemes de quimioluminiscència Pierce ECL i ECL Prime, aquest últim quan es requeria major sensibilitat. Es va posar 1 mL de cada reactiu del *kit* al damunt de la membrana, es va incubar 1 min i es van realitzar exposicions a diferents temps emprant pel·lícules fotosensibles d'autoradiografia. El revelat es va fer amb una màquina reveladora automàtica de la casa comercial AGFA, utilitzant els líquids de revelat i fixació recomanats pel fabricant.

Taula M3: Resum dels anticossos utilitzats per la tècnica *western blot*. S'indica el pes molecular de les bandes detectades i mostrades a les figures. *Els anticossos secundaris emprats són: cabra anti-ratolí (Invitrogen #81-6520) i cabra anti-conill (Invitrogen #G-21234), ambdós conjugats amb peroxidasa. Mo: ratolí; Rb: conill.

| Anticòs primari | Casa comercial | Referència | Dilució primari | Dilució secundari* | Pes molecular (kDa) |
|------------------------|----------------|------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| α -tubulina | Abcam | ab28439 | 1:10000 | Mo 1:10000 | 54 |
| β -actina-HRP | Abcam | ab49900 | 1:10000 | - | 42 |
| ADAM19 | Abcam | ab104800 | 1:1000 | Rb 1:2000 | 115 |
| AKT | Cell Signaling | 9272 | 1:2000 | Rb 1:5000 | 60 |
| Fosfo-AKT S473 | Cell Signaling | 4060 | 1:1000 | Rb 1:2000 | 60 |
| CAV1 | BD Biosciences | 610059 | 1:10000 | Rb 1:10000 | 21-24 |
| EPHA2 | Cell Signaling | 6997 | 1:1000 | Rb 1:2000 | 140 |
| Fosfo-EPHA2 S897 | Cell Signaling | 6347 | 1:1000 | Rb 1:2000 | 140 |
| ERK1/2 | Cell Signaling | 4695 | 1:2000 | Rb 1:5000 | 42-44 |
| Fosfo-ERK1/2 T202/Y204 | Cell Signaling | 4376 | 1:1000 | Rb 1:2000 | 42-44 |
| FLI-1 | MyBioSource | MBS300723 | 1:2000 | Rb 1:2000 | 50 |
| IQGAP1 | Millipore | 05-504 | 1:1000 | Mo 1:2000 | 185 |

9. ANÀLISI DE L'EXPRESSION PROTEICA PER IMMUNOHISTOQUÍMICA

9.1. PREPARACIÓ I TALL DE BLOCS DE PARAFINA

La inclusió de les mostres en parafina i el posterior tall d'aquests blocs es van realitzar pel servei d'histologia de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Els talls es van realitzar al micròtom amb un gruix de 3 μm , es van dipositar sobre un portaobjectes i es van conservar a temperatura ambient. Aquest servei també es va encarregar de fer la tinció per hematoxilina/eosina dels talls.

9.2. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Les mostres es van incubar durant tota la nit a 60 °C per iniciar el procés de desparafinat. Al dia següent, es van realitzar una sèrie de rentats consecutius per eliminar completament la parafina i rehidratar els talls: 3 rentats de 10 min xilol, 3 rentats de 10 min etanol 100 %, 3 rentats de 10 min etanol 96 %, 5 min etanol 70 % i aigua destil·lada.

El desemmascament dels epítops es va realitzar escalfant les mostres durant 7 min a 240 °C en tampó citrat (àcid cítric 1,81 mM; citrat sòdic 0,82 mM; pH 6,0). Un cop temperades i rentades amb PBS, es va bloquejar l'activitat de la peroxidasa endògena del teixit amb una solució al 3 % de peròxid d'hidrogen en metanol durant 15 min. Es van fer rentats de 5 min amb aigua de l'aixeta i PBS i es van bloquejar les mostres durant 30 min amb el reactiu indicat del *kit* "LSAB2" de la casa comercial Dako. Tot seguit, es

van incubar les mostres amb l'anticòs primari (EPHA2 1:100; Fosfo-EPHA2 S897 1:100) tota la nit a 4 °C en solució de bloqueig en una cambra humida.

Al dia següent, es van temperar les mostres, es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS i es van incubar amb l'anticòs secundari biotinilat del *kit* durant 30 min a temperatura ambient en cambra humida. Es va fer un rentat addicional amb PBS i es van incubar les mostres amb la solució d'estreptavidina-peroxidasa durant 30 min a temperatura ambient en cambra humida. Seguidament, es va realitzar l'últim rentat amb PBS i es van revelar amb diaminobencidina (DAB), aturant la reacció amb aigua en un temps màxim de 10 min.

Finalment, es va fer una tinció amb hematoxilina i es van passar les mostres per una bateria de deshidratació (ordre invers a la d'hidratació), seguit del muntatge amb medi DPX. Les mostres es van analitzar i fotografiar al microscopi òptic.

10. ANÀLISI D'INTERACCIÓ PROTEICA PER IMMUNOPRECIPITACIÓ

10.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

L'obtenció dels extractes proteics per immunoprecipitació (IP) es va realitzar a partir de pèl·lets cel·lulars prèviament congelats o recent recol·lectats. Els extractes proteics es van obtenir per lisi cel·lular utilitzant entre 150-300 µL del tampó d'IP (KCl 150 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 1 mM; glicerol al 10 %; Igepal al 0,8 %; Tris-HCl 50 mM pH 7,8) amb els inhibidors de proteases i fosfatases prèviament esmentats. Després de resuspendre els pèl·lets, es van

MATERIALS I MÈTODES

incubar les mostres 30 min en gel i es van centrifugar 30 min a 13000 rpm a 4 °C. El sobrenedant es va recollir en un tub nou i es va conservar a -80 °C.

10.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ

Aquesta tècnica va ser emprada per detectar proteïnes que interaccionaven directament o formant part del mateix complex. Per això es va partir de 500 µg de proteïna que es van diluir en 500 µL de tampó d'IP. Aquí es va afegir l'anticòs corresponent a la dilució prèviament establerta (EPHA2: Millipore #05-480, dilució 1:250) o una immunoglobulina control inespecífica. Aquesta reacció es va incubar durant tota la nit a 4 °C en agitació. Al dia següent, es van agafar 50 µL de boles magnètiques de proteïna G (amb afinitat pels anticossos utilitzats per la IP) i es van rentar amb tampó d'IP fent ús del vòrtex i del suport magnètic. A continuació, es van posar en contacte les boles magnètiques amb els complexos proteïna-anticòs incubats durant la nit i es va deixar 15 min en agitació a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es van realitzar tres rentats de les boles amb tampó d'IP per eliminar la proteïna que no s'havia unit. Tot seguit, es van afegir 25 µL de tampó de càrrega de *western blot* a les boles i aquesta barreja es va desnaturalitzar durant 10 min a 100 °C. El sobrenedant es va recollir per analitzar per *western blot*.

11. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Aquesta tècnica es va utilitzar per estudiar la localització de proteïnes dins la cèl·lula. Es van sembrar entre 100000 i 300000 cèl·lules en cubreobjectes de vidre rodons en plaques de 24 pous. En el moment que les cèl·lules assolien una confluència del 70-80 %, es van fer tres rentats amb PBS i es van fixar

les cèl·lules amb formaldehid fred al 4 % durant 20 min. Tot seguit, es van permeabilitzar les cèl·lules amb Tritó X-100 al 0,1 % en PBS durant 10 min i es van fer tres rentats amb PBS. El bloqueig es va realitzar amb un 10 % de sèrum fetal boví diluït en PBS durant 1 h. Després de bloquejar, es van incubar a 4 °C en una cambra humida tota la nit amb els anticossos primaris (EPHA2: Millipore #05-480, dilució 1:200) preparats en solució de bloqueig.

L'endemà es van temperar les mostres, es van fer tres rentats amb PBS i es va incubar l'anticòs secundari (AlexaFluor 488 cabra anti-ratolí, Invitrogen #A11001, dilució 1:200) en solució de bloqueig, durant 1 h a temperatura ambient en cambra humida. Tot seguit, es van fer tres rentats amb PBS i es van marcar els nuclis amb DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durant 20 min, seguit de tres rentats addicionals amb PBS. Finalment, les mostres es van muntar amb una gota del medi ProLong Gold. Les preparacions es van fotografiar al microscopi de fluorescència o al microscopi confocal. Les imatges es van analitzar amb el software Image J dels *National Institutes of Health* (NIH).

12. ASSAIG CLONOGÈNIC

Aquest assaig s'utilitza per valorar la capacitat de les cèl·lules de créixer a baixa densitat. Per això, es van sembrar 500 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous amb medi complet. Quan les colònies van ser visibles a ull nu (aproximadament uns 14 dies després de la sembra), es van fixar amb metanol fred durant 10 min. Posteriorment es van rentar amb PBS i es van tenyir durant 20 min amb cristall violeta al 2 %. L'excés de cristall violeta es

MATERIALS I MÈTODES

va rentar amb aigua. Finalment es van escanejar les plaques i es van comptar les colònies de forma manual.

De forma paral·lela, en algunes ocasions el cristall violeta es va destenyir amb àcid acètic glacial al 10 % durant 30 min i la densitat òptica de la solució es va quantificar mitjançant un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 570 nm.

13. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Per aquest propòsit es van sembrar entre 2.500 i 10.000 cèl·lules per pou en una placa de 96 pous i es va monitoritzar la viabilitat cel·lular al llarg del temps. Per cada lectura es va aspirar el medi de cultiu i es va afegir 100 µL del reactiu *Cell Proliferation Reagent WST-1*, prèviament diluït 1:20 en medi de cultiu. El WST-1 (*water-soluble tetrazolium 1*) és una sal de tetrazole que mitjançant reductases mitocondrials, es redueix a formazà, que és un producte cromogènic. Al cap de 2 h d'afegir el reactiu es va llegir l'absorbància a 440 nm mitjançant un espectrofotòmetre. La quantitat de formazà formada es va correlacionar amb el número de cèl·lules metabòlicament actives i, en conseqüència, amb la viabilitat cel·lular.

14. ASSAIG DE MIGRACIÓ CEL·LULAR

Aquest experiment es va realitzar seguint el principi de la càmera de Boyden, que es basa en l'ús de dos compartiments separats per una membrana porosa que les cèl·lules poden travessar. En general, un dels dos compartiments té algun tipus de quimioatració que estimula les cèl·lules a migrar. En aquest cas es van utilitzar *transwells* amb una membrana de policarbonat amb porus

de 8 µm de diàmetre. Amb aquesta finalitat, es van tripsinitzar les cèl·lules i es va realitzar un rentat amb RPMI per eliminar l'FBS. Es van sembrar a la part superior del *transwell* 150000 cèl·lules en 150 µL de medi RPMI sense FBS. D'altra banda, en una placa de 24 pous, es van posar 500 µL de medi RPMI amb un 10 % de FBS per pou, que va servir com a quimioatració. Seguidament, es van passar els *transwells* a la placa de 24 pous, de manera que la part inferior dels mateixos estigués en contacte amb el medi amb FBS.

Passades 24-48 h, en funció de la línia cel·lular, es van recollir els *transwells* de l'incubador i es van rentar amb PBS. La part interior dels *transwells* es va netejar amb un bastonet de cotó per eliminar les cèl·lules que no havien migrat a través dels porus. Tot seguit, es van fixar les cèl·lules migrades de la part exterior amb etanol al 70 % durant 30 min i després es van tenyir amb cristall violeta al 2 % durant 20 min. Es van rentar els *transwells* amb PBS i finalment es van separar les membranes, que es van muntar en un portaobjectes. Es van fotografiar 5 camps de cada membrana al microscopi òptic i es va realitzar el comptatge amb el programa Image J.

En alguns casos, les membranes es van destenyir amb àcid acètic glacial al 10 % durant 30 min i la solució es va quantificar per espectrofotometria a una longitud d'ona de 570 nm.

15. ASSAIG D'INVASIÓ CEL·LULAR

15.1. CÀMERA DE BOYDEN

L'assaig d'invasió en càmera de Boyden es va realitzar igual que el de migració però recobrint l'interior dels *transwells* amb una capa de Matrigel. El Matrigel es va conservar a 4 °C des de la seva recepció. Tot el material sòlid i líquid que havia d'entrar en contacte amb el Matrigel va ser prèviament refredat a 4 °C per evitar la seva polimerització abans del moment desitjat. Pel recobriment, es van posar 50 µL de la solució 1:20 de Matrigel en medi RPMI a l'interior dels *transwells*. Es va deixar polimeritzar durant 4-6 h a 37 °C i es va procedir com a l'assaig de migració. Els temps d'incubació dels experiments d'invasió van ser entre 48-72 h.

15.2. RTCA xCELLigence

El sistema RTCA (*Real-Time Cell Analysis*) xCELLigence permet monitoritzar a temps real, mitjançant elèctrodes d'or, la impedància d'un cultiu cel·lular. Això es pot extrapolar per avaluar nivells de proliferació, adhesió, migració o invasió, entre d'altres.

En el nostre cas, utilitzant les plaques CIM (*cell invasion and migration*), que contenen càmeres de Boyden amb aquests elèctrodes integrats, es van realitzar assajos d'invasió. Al ser el mateix principi que la càmera de Boyden, el procediment va ser el mateix però canviant alguns paràmetres per adaptar-ho a la mida d'aquestes càmeres. D'aquesta manera, es van recobrir els *transwells* amb 30 µL de la solució de Matrigel 1:20 i posteriorment es van sembrar 40000 cèl·lules a la part superior del *transwell* en un volum de 100 µL de RPMI. A la part inferior del *transwell*, es van posar 100 µL de medi amb un

10 % de FBS. L'experiment es va monitoritzar durant 120 h prenent mesures cada 15 min i els resultats es van analitzar amb el *software* de la casa comercial.

16. ZIMOGRAMA

L'anàlisi de l'activitat de les metal·loproteïnases (MMP-2 i MMP-9) es va determinar mitjançant zimograma amb substrat de gelatina. En primer lloc, es va recollir medi de cultius cel·lulars crescuts en una placa p100 sense FBS durant 24-48 h (medi condicionat). Aquests medis es van centrifugar durant 10 min a 1800 rpm per eliminar les restes cel·lulars. El sobrenedant es va recollir i concentrar 1:10 mitjançant *Centricon 10 K*. Tot seguit, es va realitzar una electroforesi en condicions no reductores en un gel d'acrilamida al 8 % amb un 0,025 % (p/v) de gelatina prèviament dissolta a 37 °C durant 2 h. Es va carregar un màxim de 30 µL de cada mostra barrejats amb tampó de càrrega 5X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 10 % SDS; 0,1 % bromofenol; 50 % glicerol) i es van escalfar a 65 °C durant 10 min. L'electroforesi es va realitzar amb tampó d'electroforesi a 180 V durant 90 min a 4 °C. Acabada l'electroforesi, el gel es va rentar durant 1 h a temperatura ambient amb una solució al 2,5 % de Tritó X-100 per substituir l'SDS present en el gel. Seguidament, el gel es va incubar tota la nit a 37 °C en tampó col·lagenasa (Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 5 mM CaCl₂; 0,2 M NaCl) amb un 0,2 % de Brij35, necessari per l'activació de les MMPs. Finalment, el gel es va tenyir amb una solució al 0,1 % de blau de *Comassie*, deixant sense tinció les zones d'activitat de les MMP, on la gelatina havia estat degradada.

17. ANÀLISI D'EXPRESSION GÈNICA – MICROARRAY

El *microarray* d'expressió gènica es va realitzar al Servei d'Anàlisi de Microarrays de l'IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona). L'amplificació, marcatge i hibridació es va realitzar d'acord amb el protocol del *kit GeneChip WT PLUS Reagent*. Tot seguit, les mostres es van hibridar a l'*array GeneChip Human Gene 2.0 ST* d'Affymetrix en el forn d'hibridació *GeneChip 640*. Els rentats i l'escaneig es van realitzar amb el *kit Expression Wash, Stain, and Scan* i amb el sistema *GeneChip* d'Affymetrix (*GeneChip Fluidics Station 450* i *GeneChip Scanner 3000 7G*). Després de passar el control de qualitat i de restar el soroll de fons, es va aplicar el model *limma* (*Linear Models for Microarray*)²⁵¹, que és un test estadístic emprat per detectar gens diferencialment expressats entre condicions. Seguidament, es va realitzar la correcció per comparacions múltiples utilitzant el *false discovery rate* (FDR)²⁵². Els gens amb un *p*-valor inferior a 0,05 i un *fold change* superior a 1,5 es van considerar significatius. Les anàlisis funcionals es van realitzar amb l'*Ingenuity Pathway Analysis* v 9.0 (Ingenuity Systems, www.qiagenbioinformatics.com) i amb el *Gene Set Enrichment Analysis* amb les col·leccions C2, C4, and C7^{253,254}. Totes les anàlisis es van fer amb el programa R (v 3.1.1, www.R-project.org) amb els paquets *aroma.affymetrix*²⁵⁵, *Biobase*²⁵⁶ i *limma*²⁵⁷.

18. ASSAJOS *IN VIVO* AMB RATOLINS IMMUNODEPRIMITS

18.1. MANTENIMENT DELS ANIMALS

Pels experiments *in vivo* es van comprar femelles immunodeprimides de la soca BALB/c^{nu/nu} d'entre 6-7 setmanes d'edat a la casa comercial Harlan. Els animals es van mantenir establats en *racks* de la casa comercial Allentown, amb gàbies apilades ventilades de manera individual. Els ratolins disposaven d'aigua i menjar *ad libitum*, consistent en pinso Teckland irradiat de la casa Harlan i aigua filtrada i clorada. Els animals es trobaven una sala SPF (*Specific Pathogen Free*) que es va mantenir a una temperatura de 18-22 °C, amb una humitat relativa del 60-70 % i cicles de 12 h de llum i 12 de fosc, amb canvis graduals cada 30 min.

El manteniment dels animals i la supervisió veterinària es va fer seguint les normatives establertes per l'AAALAC (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*). Els procediments realitzats es troben descrits dins del protocol de treball del Dr. Martínez Tirado autoritzat pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya.

18.2. CREIXEMENT TUMORAL MITJANÇANT INDUCCIÓ DE TUMORS SUBCUTANIS

Per valorar el creixement tumoral, a cada ratolí se li van injectar de manera subcutània cinc milions de cèl·lules al flanc posterior esquerre de la línia A673 parental o transfectades amb els vectors control. Al mateix ratolí, al flanc posterior dret, se li van injectar cinc milions de cèl·lules de la línia A673

MATERIALS I MÈTODES

amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. Es van utilitzar 8 ratolins per cada condició.

Les cèl·lules tenien un màxim de 3 passis des del moment de la descongelació i s'havien cultivat sense antibiòtic per descartar l'emascament de possibles contaminacions bacterianes. El dia de la injecció, es van preparar les cèl·lules de les diferents condicions de manera que cada injecció de 100 μ L per ratolí contenia cinc milions de cèl·lules.

Cada 48 h, els ratolins es van examinar i pesar, i els tumors es van mesurar amb peu de rei per seguir l'evolució del creixement. Quan els tumors van arribar a un volum d'1 cm^3 , es va practicar l'eutanàsia als ratolins seguint les directrius ètiques de la institució. Tot seguit, els tumors es van extreure i es van separar en dues meitats: la primera es va congelar i la segona es va fixar durant 24 h amb formaldehid al 4 %. Els tumors fixats es van incloure en parafina per la seva posterior anàlisi.

18.3. ASSAIG DE METÀSTASI EXPERIMENTAL INTRAVENÓS

Per avaluar el potencial metastàtic dels models cel·lulars, es van injectar per via intravenosa per la vena de la cua dos milions de cèl·lules de la línia A673 parental, transfectades amb els vectors control o transfectades amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. Es van utilitzar 10 ratolins per condició.

Les cèl·lules es van preparar igual que per l'experiment subcutani, però finalment es van resuspendre els dos milions de cèl·lules necessàries per cada ratolí en 100 μ L de PBS estèril. Cada 48 h, els ratolins es van examinar i pesar per descartar signes de morbiditat. Passats 60 dies després de la injecció

inicial, es va practicar l'eutanàsia als ratolins seguint les directrius ètiques de la institució, es van extreure els pulmons i es van fixar en formaldehid al 4 %. A ull nu, es va fer una primera anàlisi macroscòpica de la incidència de metàstasi pulmonar que després es va completar amb una anàlisi microscòpica dels talls. D'altra banda, a la necròpsia també es va realitzar una observació general de la resta d'òrgans de les cavitats toràcica i abdominal per detectar possibles metàstasis a ull nu. Els pulmons fixats es van incloure en parafina, es van tallar i es van tenyir amb hematoxilina/eosina com s'ha descrit anteriorment.

18.4. ASSAIG DE METÀSTASI ORTOTÒPIC

L'assaig de metàstasi espontània va consistir en injectar dos milions de cèl·lules tumorals A673 o TC71 resuspeses en 100 µL de medi RPMI en el múscul gastrocnemi dret de ratolins immunodeprimits. Cada 48 h els ratolins es van examinar i pesar, i l'extremitat que contenia el tumor es va mesurar amb peu de rei per seguir l'evolució del creixement. Un cop el tumor primari va assolir una mida aproximada de 800 mm³, es va procedir a extirpar-lo quirúrgicament, anestesiant els animals amb Isoflurà (3,0 L/min durant la inducció; 1,5 L/min durant la intervenció). Després de l'extracció del tumor, la ferida es va tancar amb fil de sutura i es va administrar Buprenorfina als animals durant 72 h per pal·liar el dolor provocat per la intervenció. Val a dir que des que els animals despertaven de l'anestèsia conservaven total mobilitat i podien fer vida normal.

Passats 60 dies després de la injecció inicial, es va practicar l'eutanàsia als ratolins seguint les directrius ètiques de la institució, es van extreure els

MATERIALS I MÈTODES

pulmons i es van fixar en formaldehid al 4 %. A ull nu es va fer una primera anàlisi macroscòpica de la incidència de metàstasi pulmonar que després es va completar amb una anàlisi microscòpica dels talls. D'altra banda, a la necròpsia també es va realitzar una observació general de la resta d'òrgans de les cavitats toràcica i abdominal per detectar possibles metàstasis a ull nu. Els pulmons fixats es van incloure en parafina, es van tallar i es van tenyir amb hematoxilina/eosina com s'ha descrit anteriorment.

Inicialment, es va posar a punt el mètode amb les línies parentals A673 i TC71. Seguidament, es va repetir el procés injectant cèl·lules de la línia A673 parental, transfectades amb els vectors control o transfectades amb el vector de silenciament d'*EPHA2*, utilitzant 8 ratolins per condició.

19. ANÀLISI ESTADÍSTICA

De manera general tots els experiments es van realitzar per triplicat i es van analitzar les dades mitjançant la prova *t* de Student. Per l'anàlisi estadística de la incidència de metàstasi en els experiments *in vivo* amb ratolins immunodeprimits, es va utilitzar el test exacte de Fisher. Els resultats es mostren com la mitjana dels experiments \pm la desviació estàndard. Es van considerar diferències significatives aquelles en les que el *p*-valor del test era inferior a 0,05.

20. EQUIPS, MATERIAL FUNGIBLE I REACTIUS

En aquesta secció es reflecteixen els equips, material fungible, *kits* i reactius emprats en aquesta tesi.

20.1. EQUIPAMENT

Agitador per tubs d'assaig ECN444-1378, VWR

Agitador Titramax 100/101/1000, Heidolph

Campana de flux laminar CV-100, Telstar

Centrífuga 5804, Eppendorf

Incubador HERAcell 150, Thermo Scientific

Màquina de revelat Curix60, AGFA-Healthcare

Microcentrífuga CT15E/CT15RE, VWR

Microscopi confocal TCS SP5 model DMI6000, Leica

Microscopi invertit Eclipse 80i, Nikon

Microscopi invertit universal IX70, Olympus

Minicentrífuga Galaxy MiniStar, VWR

ND-100 Espectrofotòmetre, Nanodrop

Sonicador UP50H Ultrasonic Processor, Hielscher

Suport magnètic PureProteome, Millipore

Termobloc analògic, VWR

Termociclador 2720, Applied Biosystem

Termociclador LightCycler 480 II, Roche

xCELLigence RTCA DP System, ACEA Biosciences

20.2. MATERIAL FUNGIBLE

Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare #28-9068-37

Centricons Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters – Ultracel 10 k, Millipore #UFC901024

Criotubs 1,6 mL rosca interna, Sarstedt #72.380

Cubreobjectes 12 mm diàmetre, Menzel-Gläsen #631-0713

Cubreobjectes 24 x 60 mm, Menzel-Gläsen #MZ3016

MATERIALS I MÈTODES

Kova glassic slide, Fisher Scientific #10298483
Pipeta serologia 5 mL, Jet Biofil #GSP010005
Pipeta serològica 10 mL, Jet Biofil #GSP010010
Pipeta serològica 25 mL, Jet Biofil #GSP010025
Placa Lightcycler 480 384 pous, Roche #04729749001
Plaques CIM 16, ACEA #11705665817001
Plaques cultius cel·lulars 100 mm, Cultek #430167
Plaques cultius cel·lulars 12 pous, Jet Biofil #TCP011012
Plaques cultius cel·lulars 150 mm, Cultek #430599
Plaques cultius cel·lulars 24 pous, Jet Biofil #TCP011024
Plaques cultius cel·lulars 6 pous, Jet Biofil #TCP011006
Plaques cultius cel·lulars 96 pous, Jet Biofil #TCP011096
Transwell Permeable Supports, Cultek #3422
Tub eppendorf microcentrífuga 0,5 mL, Sarstedt #72699
Tub tipus eppendorf microcentrífuga 1,5 mL, Sarstedt #7269000
Tub estèril amb rosca 15 mL, Sarstedt #62.554.502
Tub estèril amb rosca 50 mL, Sarstedt #62.547.254
Xeringa insulina 1 mL, 25 GA, 5/8 polzades, 0,5 x 116 mm

20.3. REACTIUS

Àcid acètic glacial, Merck #1.00056.2500
Àcid cítric monohidratat, Merck #1002440500
Àcid clorhídric 37 %, Merck #1.00317.1000
Acrilamida 30 %, Bio-Rad #161-0156
Agarosa SeaKem, Cambrex #50005
Ampicil·lina, Sigma-Aldrich #A9518-5G

Bacto-agar, Difco #0140-01

BKM-120, Selleckchem #S2247

Blau de Comassie, Sigma-Aldrich #B-0149

Blau tripa, Sigma #T8154

Boles magnètiques de proteïna G Pureproteome, Merck #LSKMAGN01

Brij35 30 %, Sigma-Aldrich #B4184

Bromur d'etidi, Sigma-Aldrich #E1510-10 mL

Cell Proliferation Reagent WST-1, Sigma #05015944001

Citrat sòdic dihidratat, Sigma-Aldrich #S1804

Clorur càlcic dihidratat, VWR #1023820500

Clorur de magnesi, Merck #1725711000

Clorur de potassi, Merck #1.049.360.500

Clorur sòdic, Merck #1064045000

Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Sigma #11836170001

Cristall violeta, Sigma-Aldrich #C3886-25G

DAPI, Life Technologies #D3571

DharmaFECT 1 Transfection Reagent, Fisher Scientific #W9945D

Diaminobencidina, Dako #K3468

Dimetil sulfòxid, Sigma-Aldrich #D2650-100 mL

dNTPs 10 mM MIX, Life Technologies #18427-013

Dulbecco's PBS 10X sense calci ni magnesi, Biowest #X0515-500

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare #RPN2232

EGTA, Sigma-Aldrich #E3889

Eosina, Sigma-Aldrich #HT110232

Etanol absolut, Merck #1.00983.2500

Etanol 96 %, Merck #50.651.071.000

MATERIALS I MÈTODES

FBS South American, Life Technologies #10270-106
Gelatina de pell bovina tipu B, Sigma-Aldrich #G9391-100G
Geneticina G-418 Sulfat, Life Technologies #11811-031
Glicerol 99 %, Sigma-Aldrich #G7757-500 mL
Hematoxilina de Harris, Sigma-Aldrich #HHS80-2'5L
Igepal CA-630, Sigma-Aldrich #I3021
Isopropanol, Merck #1.09634.2500
Kanamicina, Sigma-Aldrich #K4000
Kit EndoFree Plasmid Maxi, Qiagen #12362
Kit immunohistoquímica LSAB2, Dako #K0675
Kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis, Agilent Technologies #200519
Kit NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel #740588.250
Kit NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel #740955.520
Kit NucleoSpin miRNA Macherey-Nagel #22740971.50
LB Broth, Acumedia #7290A
Lipofectamina 2000, Life Technologies #11668030
Matrigel Basement Membrane Matrix, Cultek #354234
Medi muntatge DPX, BDH #360294H
Medi muntatge ProLong Gold, Life Technologies #P-36931
Medi SOC, Life Technologies #46-0700
Membrana nitrocel·lulosa 0,2 µm, BioRad #162-0112
Metanol, Panreac #141091.1214
MK22-06, Selleckchem #S1078-50 mg
Oligo-dT Primer, Life Technologies #18418-012
Formaldehid solució 4 %, VWR #1004969010
Penicilina/Estreptomicina, Life Technologies #15140-122

Peròxid d'hidrogen, Sigma-Aldrich #H1009-500 mL

PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche #04906845001

Pierce BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific #23225

Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific #4832106

Portaobjectes SuperFrost Plus, VWR #631-0108

Puromicina, Sigma-Aldrich #P8833

RPMI 1640 amb Glutamax, Life Technologies #61870044

SDS 10 %, Applichem #A0676

Sondes Real-Time *TaqMan Gene Expression Assays*, Life Technologies: *ACT1N* #4333762F, *ADAM19* #Hs00224960_m1, *CCL2* #Hs00234140_m1, *EWS-FLI1* #Hs03024497_FT, *LUM* #Hs00929860_m1, *PCDH8* #Hs04187285_g1, *PI3KCG* #Hs00277090_m1, *PTPN21* #Hs00234784_m1

Subcloning Efficiency DH5 *competent cells*, Life Technologies #18265-017

SuperScript II *Reverse Transcriptase*, Life Technologies #18064-014

Tampó Laemmli, Bio-Rad #161-0737

Tampó Pierce RIPA, Thermo Fisher Scientific #89900

Tampó TAE 50X, Severn Biotech #20-6001-10

Tampó Tris-glicina-SDS 10X, Bio-Rad #161-0772

Tampó Tris-glicina 10X, Bio-Rad #161-0771

TaqMan 2X Universal PCR MasterMix, Life Technologies #4324018

Trametinib LC Laboratories #T-8123

Tripsina-EDTA, Life Technologies #25300-054

Tris(hidroximetil)aminometà, Merck #1.08382.5000

Tritó X-100, Merck #1.086.031.000

Tween-20, Sigma-Aldrich #P1379-500 mL

U0126 LC Laboratories #U-6770

Vector pCMV6-*EPHA2* Myc-DKK tagged vector, Origene #RC205725

Vector pRS-sh*EPHA2*, Origene #TR320327

MATERIALS I MÈTODES

Xilol, Merck #1.08681.2500

2-mercaptoetanol, Merck #8.057.400.250

Resultats

1. ÀMPLIA EXPRESSIÓ D'EPHA2 EN LÍNIES DE SE

En un treball anterior del nostre grup de recerca, es va descriure que EPHA2 s'expressava a nivell proteic en un panell de línies cel·lulars de SE¹³⁰. No obstant, a l'inici d'aquesta tesi doctoral es va voler ampliar aquest panell a 11 línies cel·lulars. Després d'ampliar el panell, es va determinar que el receptor es troba expressat en totes les línies de SE analitzades, tot i que amb diferents graus d'expressió (figura R1). Seguidament, tenint en compte la relació de la fosforilació del residu S897 amb les característiques oncogèniques del receptor, es va avaluar si aquesta modificació postraduccional es produïa en línies de SE. Així, es va observar que aquesta fosforilació es troba present de manera constitutiva en 7 de les 11 línies emprades, també amb nivells variables (figura R1).

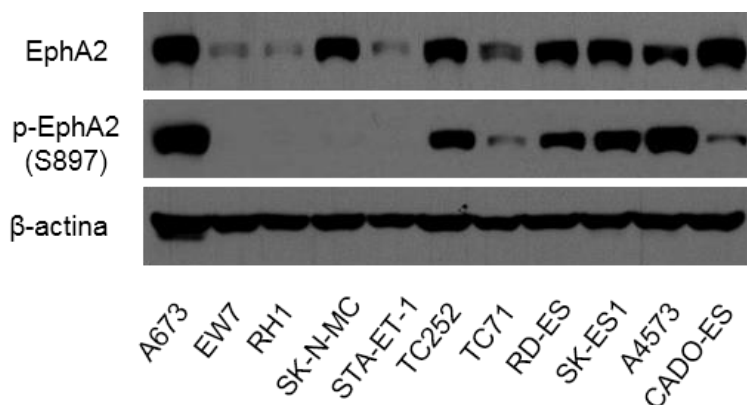


Figura R1: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió d'EPHA2 i la fosforilació S897 en un panell de línies de SE. Com a control de càrrega es va utilitzar la β-actina.

2. CORRELACIÓ POSITIVA ENTRE EPHA2 I EL FENOTIP NEOPLÀSIC EN LÍNIES DE SE

Per tal de tenir una visió global de la rellevància del receptor EPHA2, es va intentar establir una correlació entre el fenotip neoplàsic i els nivells d'expressió del receptor i/o la fosforilació S897 en un panell de línies cel·lulars de SE. Amb aquest propòsit es van seleccionar, d'una banda, tres línies cel·lulars amb una elevada fosforilació del residu S897 d'EPHA2: A673, TC252 i A4573; i d'altra banda, tres línies amb una baixa fosforilació en aquest residu: EW7, TC71 i SK-N-MC. Val a dir que SK-N-MC tot i tenir nivells baixos de la fracció fosforilada té una expressió d'EPHA2 total similar a les línies A673, TC252 i A4573.

Amb aquest panell de línies, inicialment es van realitzar experiments de proliferació utilitzant el reactiu WST-1, que és una sal de tetrazole que serveix com a indicador de viabilitat cel·lular. Així, es va observar que les tres línies amb major fosforilació S897 proliferaven més de manera significativa respecte les de menor fosforilació (figura R2).

Paral·lelament, es van realitzar experiments de migració cel·lular amb aquestes 6 línies cel·lulars. Per això es va utilitzar l'assaig en càmera de Boyden emprant sèrum boví fetal com a quimioatracent. Amb aquest assaig es va determinar que les línies amb nivells elevats de la fosforilació S897 migraven més, de manera significativa, que les línies amb nivells baixos de la fosforilació (figura R3).

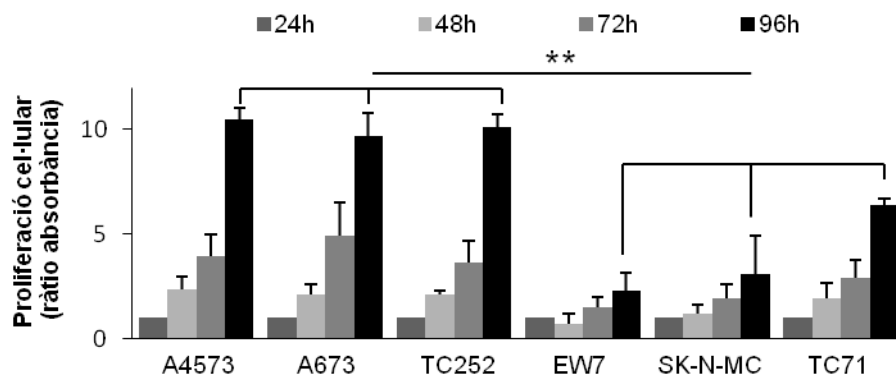


Figura R2: Assaig de proliferació amb WST-1 comparant línies amb nivells elevats de la fosforilació S897 d'EPHA2 (A4573, A673, TC252) versus línies amb baixa fosforilació S897 (EW7, TC71, SK-N-MC). Prova t de Student: **p≤0,005.

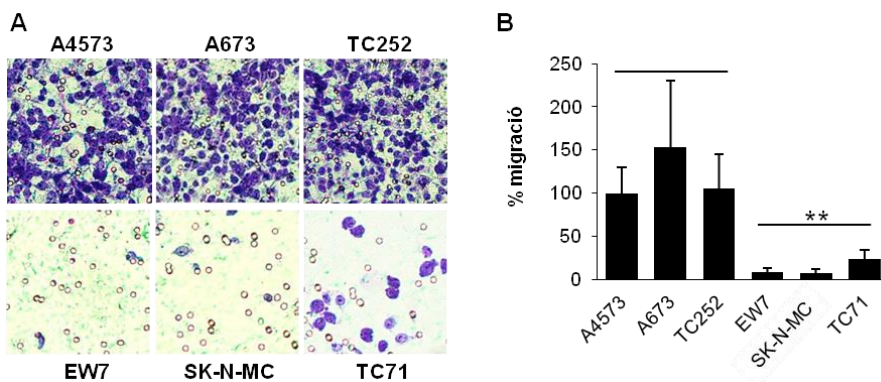


Figura R3: A) Imatges representatives d'un assaig de migració cel·lular en càmera de Boyden en el panell de línies seleccionades d'elevada (A4573, A673, TC252) o baixa (EW7, TC71, SK-N-MC) fosforilació S897, 48 h de migració. Fotografies de la part inferior dels *transwells* mostrant les cèl·lules que han migrat a través dels porus. Augment 20X. B) Quantificació de l'assaig de migració. Normalització respecte la línia A4573. Prova t de Student: **p≤0,005.

És interessant remarcar el fenotip de la línia cel·lular SK-N-MC, que tot i tenir nivells d'EPHA2 comparables als d'A673, TC252 o A4573, es comportava com les línies de baixa expressió. Conjuntament, aquests resultats suggereixen que la fosforilació del residu S897 confereix un avantatge, en termes de proliferació i migració cel·lular, a les cèl·lules tumorals de SE.

3. LA VIA DE SENYALITZACIÓ D'ERK1/2 ÉS RESPONSABLE DE LA FOSFORILACIÓ D'EPHA2 EN EL RESIDU S897 I EXISTEIX UNA RETROALIMENTACIÓ POSITIVA ENTRE LES DUES PROTEÏNES

Donada la importància de la fosforilació S897, es va decidir aprofundir en l'estudi de les proteïnes quinases responsables d'aquesta modificació^{212,215}. S'ha descrit a la literatura que les principals vies de senyalització responsables d'aquesta fosforilació són PI3K/AKT i MEK1/2-ERK1/2. Així, inicialment es va comprovar per *western blot* l'estat de les proteïnes AKT, ERK1/2 i les seves formes fosforilades en un panell de línies de SE. Totes les línies estudiades expressaven AKT i ERK1/2, però es va observar un estat variable de les formes fosforilades (figura R4). En general, les línies amb nivells baixos de p-EPHA2 presentaven també nivells baixos de p-AKT i p-ERK1/2. No obstant, no es va poder establir cap correlació específica entre una d'aquestes dues fosforilacions i la presència de la fosforilació S897 d'EPHA2.

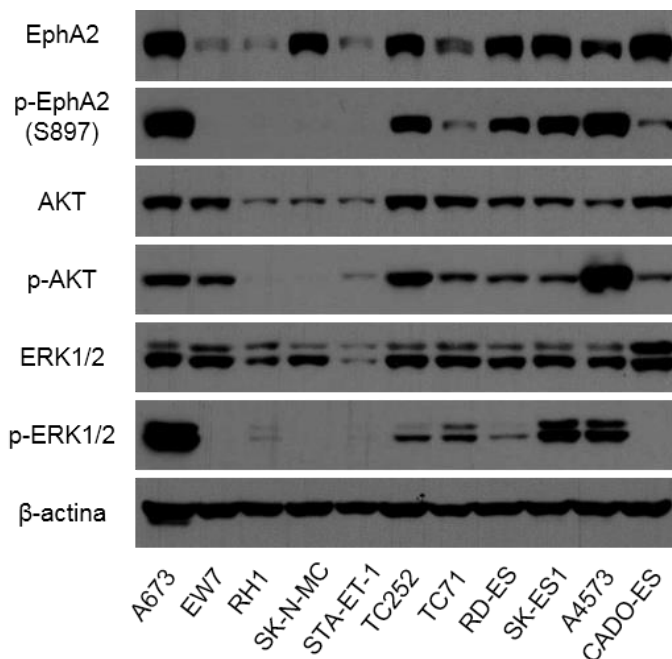


Figura R4: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió d'AKT, ERK1/2 i les seves formes fosforilades en un panell de línies de SE. Com a control de càrrega es va utilitzar la β -actina.

Seguidament, es van sotmetre les cèl·lules de SE a diferents tractaments amb inhibidors de les vies PI3K/AKT i MEK1/2-ERK1/2 per tal d'esbrinar si algun d'aquests podia revertir la fosforilació S897 d'EPHA2. Com a inhibidors de la via d'ERK1/2, es van utilitzar els compostos U0126 i Trametinib, i com a inhibidors de la via d'AKT es van utilitzar el MK22-06 i el BKM-120. Després de tractaments de 24 h en les línies A673 i TC252, es van recollir les cèl·lules i es va comprovar per *western blot* que els tractaments eren efectius observant la disminució d'ERK1/2 o AKT fosforilats segons corresponia (figura R5). Tot i la bona eficiència dels tractaments, només en el cas dels inhibidors d'ERK1/2 es va observar una disminució en la fosforilació S897 d'EPHA2. D'aquesta manera, es va concloure que en les

RESULTATS

cèl·lules de SE la via d'ERK1/2 és la responsable de promoure aquesta fosforilació.

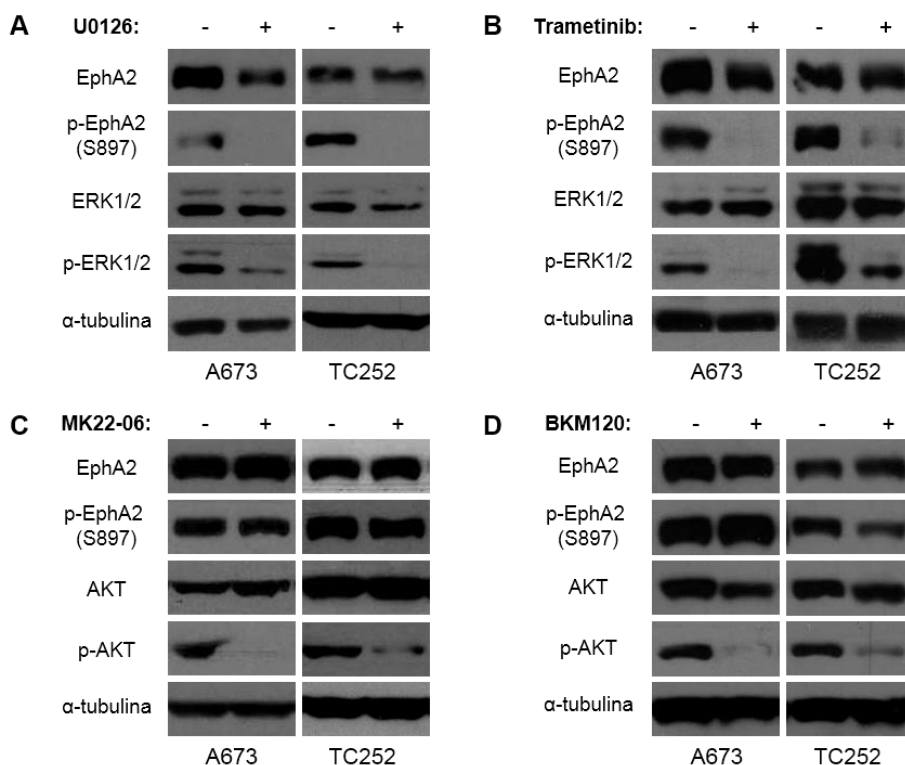


Figura R5: *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'EPHA2 i p-EPHA2 (S897) en les línies A673 i TC252 tractades amb els inhibidors d'ERK1/2 U0126 (A) i Trametinib (B) o amb els inhibidors d'AKT MK-2206 (C) i BKM120 (D). Les concentracions emprades van ser U0126 20 μ M, Trametinib 50 nM, MK22-06 1 μ M i BKM120 5 μ M durant 24 h. La fosforilació d'ERK1/2 i d'AKT es mostra com a control de l'eficiència del tractament. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

Paral·lelament, es va silenciar *EPHA2* de manera estable en la línia de SE A673 i es van seleccionar els clons positius. En aquests clons de baixa expressió d'*EPHA2*, també es va analitzar l'expressió d'ERK1/2 i la seva forma fosforilada. Així, es va observar una disminució de la fosforilació

d'ERK1/2 al silenciar *EPHA2*, cosa que suggereix l'existència d'una regulació entre aquestes dues proteïnes (figura R6). Aquest fet indica una retroalimentació positiva entre les vies, ja que a l'inhibir ERK1/2 farmacològicament hi ha una disminució en la fosforilació S897 d'EPHA2 i al silenciar *EPHA2* disminueix la fracció fosforilada d'ERK1/2.

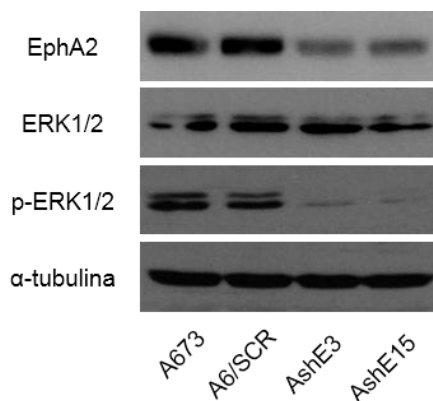


Figura R6: *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'ERK1/2 i p-ERK1/2 en un model de silenciament estable d'*EPHA2*. SCR: seqüència control. AshE# correspon als clons silenciats. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

4. CAV1 I IQGAP1 REGULEN LA FOSFORILACIÓ DEL RESIDU S897 D'EPHA2

Anteriorment a l'inici d'aquesta tesi, el nostre grup de recerca va descriure que la interacció entre CAV1 i EPHA2 promovia el procés d'angiogènesi en línies de SE. En absència de CAV1, hi havia una redistribució d'EPHA2 de la membrana al citoplasma i una disminució dels nivells de fosforilació de residus tirosina d'EPHA2, corresponent a la senyalització depenent del lligand¹³⁰. Tot això correlacionava amb una reducció en la migració de cèl·lules endotelials i de l'angiogènesi.

RESULTATS

Per estudiar més detingudament la regulació entre aquestes dues proteïnes, es va avaluar si CAV1 també era important per la senyalització independent de lligand d'EPHA2. Per aquest motiu, es van analitzar els nivells de fosforilació S897 d'EPHA2 en models estables de silenciament de *CAV1* disponibles al grup (figura R7). D'aquesta manera, es va demostrar que el silenciament de *CAV1* provocava una disminució en la fosforilació S897 d'EPHA2, tot i que en alguns casos també s'observava una lleugera disminució dels nivells d'EPHA2 total.

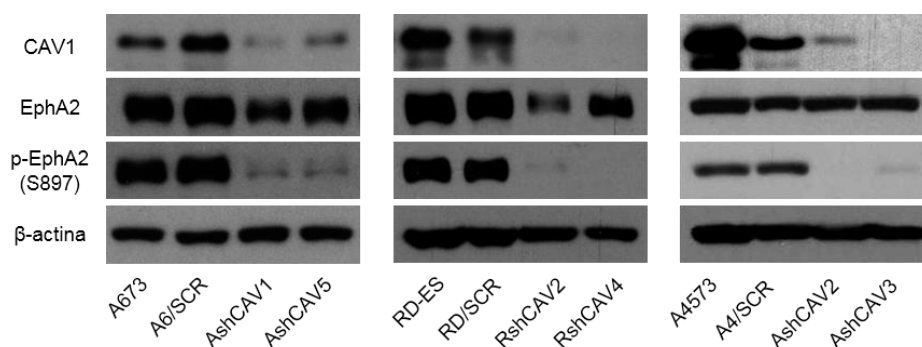


Figura R7: *Western blot* representatiu que mostra els nivells de fosforilació S897 d'EPHA2 en clons de les línies de SE A673, RD-ES i A4573 silenciats per *CAV1*. SCR: seqüència control. shCAV# correspon als diferents clons silenciats. Com a control de càrrega es va utilitzar la β-actina.

Tanmateix, es va avaluar l'estat de la fosforilació S897 en un model de silenciament estable d'*IQGAP1*. *IQGAP1* és una proteïna de *scaffolding* per la senyalització de diferents vies, incloent la de les MAPK, i la seva expressió ha estat relacionada amb processos oncogènics en diferents entitats tumorals²⁵⁸⁻²⁶⁰. Durant l'elaboració d'aquesta tesi doctoral, el nostre grup de recerca va descriure que *IQGAP1* podia interaccionar amb *CAV1*. A més, el seu

silenciament en línies de SE va resultar en una disminució de la migració i invasió cel·lulars²⁶¹.

Per comprovar si IQGAP1 regulava la senyalització d'EPHA2, es van analitzar per *western blot* els nivells d'EPHA2 i p-EPHA2 en un model de silenciament estable d'*IQGAP1*. En els clons silenciats es va observar una disminució de la fosforilació S897 respecte les cèl·lules control (figura R8).

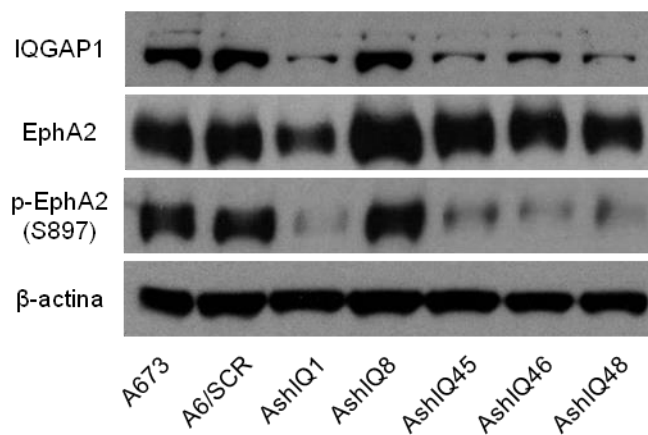


Figura R8: *Western blot* representatiu que mostra els nivells de fosforilació S897 d'EPHA2 en clons de la línia de SE A673 silenciats per *IQGAP1*. SCR: seqüència control. AshIQ# correspon als diferents clons silenciats. Com a control de càrrega es va utilitzar la β -actina.

Així doncs, els resultats indiquen que CAV1 i IQGAP1 regulen la funció independent de lligand d'EPHA2. Aquest fet podria contribuir a explicar, al menys de manera parcial, la funció de CAV1 i IQGAP1 en SE, que s'ha vist relacionada amb diferents processos tumorals.

5. EFECTES DE LA SOBREEXPRESSION D'EPHA2 EN LÍNIES DE SE. PAPER CLAU DEL RESIDU S897

Per tal de profunditzar en els efectes d'EPHA2 en cèl·lules de SE, es va transfectar un vector d'expressió del receptor a la línia RH1, que presentava baixa expressió. De forma paral·lela, per analitzar el rol específic de la S897, es va generar per mutagènesi dirigida un canvi en aquest residu. Així, es va canviar la serina per una alanina, que és un aminoàcid no fosforilable (figura R9A). Aquest mutant, que es va anomenar S897A, també es va reintroduir a la línia RH1. De forma general, en tots els experiments de la tesi, es van utilitzar com a control les cèl·lules sense transfectar, que es citen com a línies parentals. A més, per descartar possibles efectes del mateix procés de transfecció, com a control també es va utilitzar el mateix vector sense cap insert, que es va anomenar CMV en referència al nom comercial del seu promotor.

Després de les transfeccions estables, es va comprovar per *western blot* que les cèl·lules transfectades amb el vector *wild type* expressaven EPHA2 i que aquest es trobava fosforilat en el residu S897 (figura R9B). Tanmateix, es va comprovar que les cèl·lules que expressaven el mutant S897A no tenien aquest residu fosforilat, tal i com s'esperava després de la mutagènesi. A continuació, es va analitzar la via d'ERK1/2 per veure si una sobreexpressió d'EPHA2 promovia canvis en aquesta proteïna, d'igual manera que passava al silenciar EPHA2. Així, es va observar un increment en la fosforilació d'ERK1/2 en les cèl·lules RH1 on s'havia introduït EPHA2 *wild type* (figura R9B), però no en la reintroducció de la forma mutant. Aquest resultat suggereix que la retroalimentació entre EPHA2 i ERK1/2 depèn de la presència de la fosforilació S897.

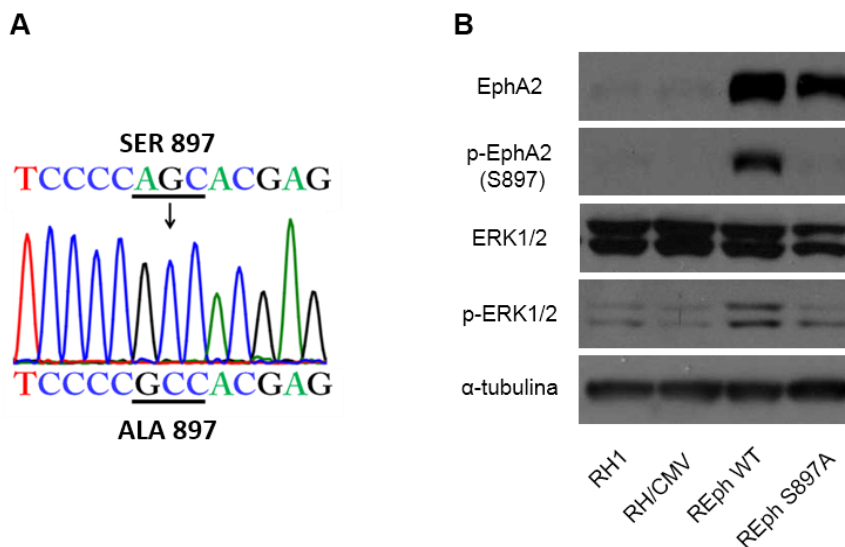


Figura R9: A) Esquema de la mutagènesi dirigida per canviar el residu S897 d'EPHA2 per una alanina. B) *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'EPHA2, p-EPHA2, ERK1/2 i p-ERK1/2 en el model de reintroducció d'EPHA2 *wild type* i el mutant S897A en la línia cel·lular RH1. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

Tot seguit, amb aquest model es van realitzar experiments de proliferació cel·lular mitjançant WST-1 i experiments de migració cel·lular en càmera de Boyden. Així, es va observar un increment significatiu en la proliferació i migració en les cèl·lules RH1 que expressaven *EPHA2 wild type* (figura R10-11). No obstant, el canvi del residu serina per una alanina, va ser suficient per revertir aquest increment de proliferació i migració cel·lulars, ja que al reintroduir el mutant S897A d'EPHA2 no es van observar canvis respecte les cèl·lules control. Així doncs, aquests resultats indiquen que per promoure la

RESULTATS

proliferació i migració cel·lular no només es necessita la presència de la proteïna EPHA2 sinó que aquesta ha d'estar fosforilada en el residu S897.

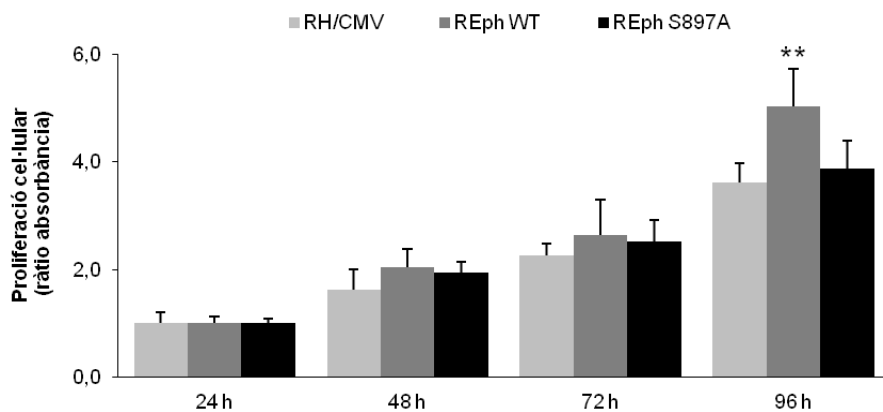


Figura R10: Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 en el model de reintroducció d'*EPHA2 wild type* i del mutant S897A en la línia cel·lular RH1. CMV: seqüència control. WT: *wild type*. S897A: mutant. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

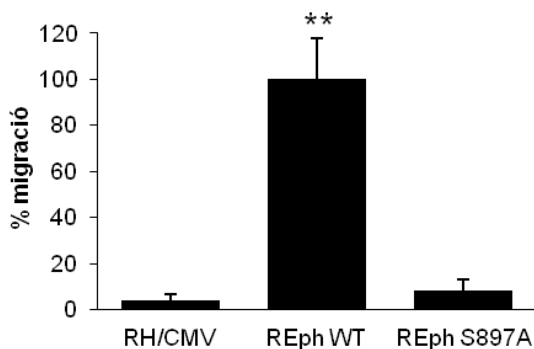


Figura R11: Assaig de migració en càmera de Boyden en el model de reintroducció de la línia RH1, 72 h de migració. CMV: seqüència control. WT: *wild type*. S897A: mutant. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

6. EFECTES DEL SILENCIAMENT D'EPHA2 *IN VITRO* EN LÍNIES DE SE

Per profunditzar en el rol d'EPHA2 en cèl·lules de SE, de manera complementària al model de reintroducció en la línia RH1, es van generar dos models de silenciament gènic estable en les línies cel·lulars A673 i TC252. Per aquest motiu es van transfectar les cèl·lules amb un ARNsh (*ARN short-hairpin*) dirigit contra *EPHA2*. En aquestes transfeccions es va utilitzar com a control el mateix vector però amb una seqüència aleatòria (SCR: *scramble*).

Degut a la baixa eficiència de transfecció d'aquestes línies de SE, es van aïllar i amplificar diversos clons en els que es va comprovar el silenciament de manera individual per *western blot* (figura R12). Es van seleccionar els que tenien un silenciament d'un 50 % o més, i de cada línia cel·lular es va

RESULTATS

treballar com a mínim amb dos clons diferents. El model de la línia A673 és el mateix que s'ha presentat abans a la figura R6.

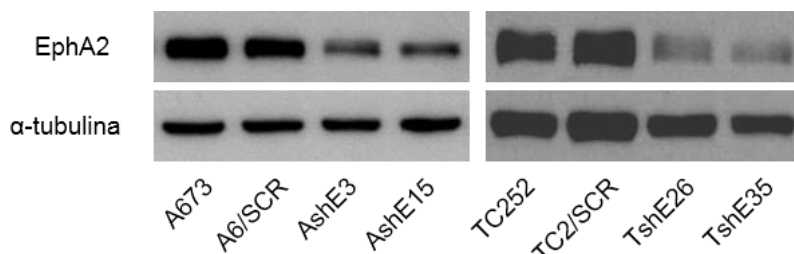


Figura R12: *Western blot* representatiu mostrant els clons seleccionats pel silenciament d'*EPHA2* en les línies de SE A673 i TC252. SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. A/TshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. Després de seleccionar els clons de treball de cada línia, utilitzant aquests dos models es van realitzar clonogènies per comprovar si *EPHA2* intervenia en la capacitat de formar colònies a baixa densitat. El resultat va ser que tant en les cèl·lules A673 com en les TC252 silenciades per *EPHA2* es va observar una disminució significativa en la capacitat clonogènica (figura R13).

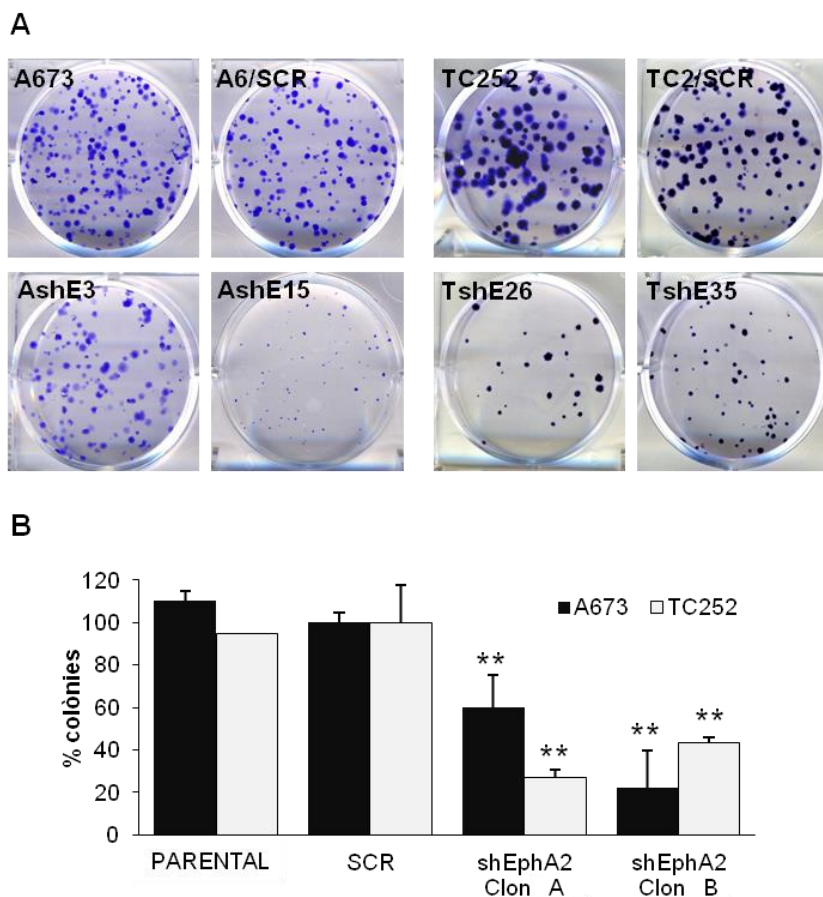


Figura R13: A) Imatges representatives d'un assaig clonogènic amb els models de silenciament d'*EPHA2* en les línies A673 i TC252, 15 dies de creixement. Tinció amb cristall violeta. **B)** Quantificació de l'assaig clonogènic. Es mostren els clons d'A673 i TC252 agrupats com a clon A (AshE3 i TshE26) i B (AshE15 i TshE35). SCR: seqüència control. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

Tot seguit, es van realitzar experiments de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 i es va observar que el silenciament del receptor *EPHA2*, en ambdues línies, redueix de manera significativa la capacitat proliferativa de les cèl·lules *in vitro* (figura R14).

RESULTATS

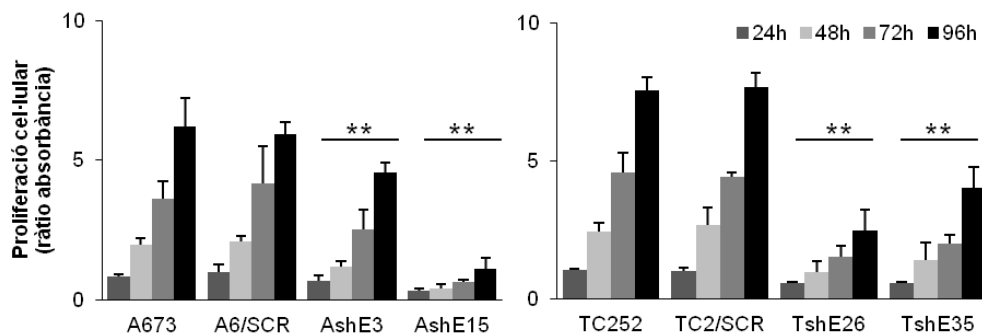


Figura R14: Assaig de proliferació dels models de silenciament d'*EPHA2* mitjançant el reactiu WST-1. A/TshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. SCR: seqüència control. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

Paral·lelament, es van fer assajos de migració en càmera de Boyden utilitzant sèrum boví fetal com a atraient per comprovar si *EPHA2* està implicat en la motilitat cel·lular de línies de SE. En aquests experiments es va observar que el silenciament d'*EPHA2* disminueix de forma dràstica la capacitat migratòria de les cèl·lules de SE A673 i TC252 (figura R15A).

Amb aquests models, a més, es van realitzar assajos d'invasió en càmera de Boyden utilitzant Matrigel. D'aquesta manera es va observar que el silenciament d'*EPHA2* també promou una disminució de la capacitat invasiva de les línies A673 i TC252 (figura R15B). Després d'observar una disminució en la migració cel·lular, era esperable la disminució també en la invasió cel·lular, ja que són processos relacionats. El fet que *EPHA2* estigui implicat en migració i invasió cel·lular *in vitro* suggereix que pugui ser un proteïna implicada en el procés metastàtic, pel que es va decidir profunditzar en aquest fenotip.

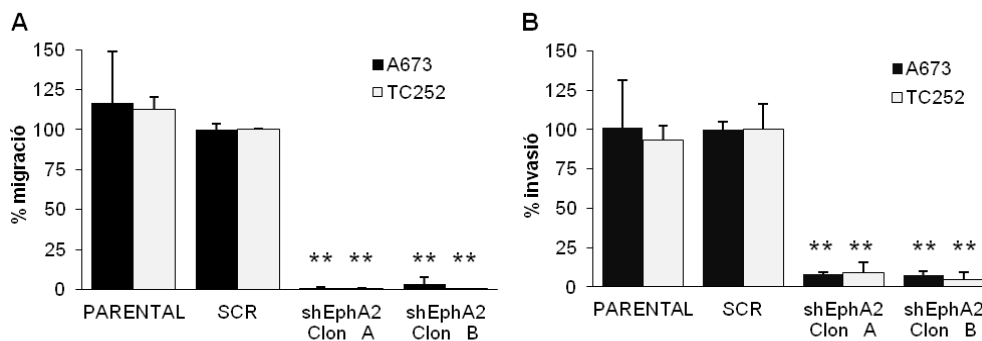


Figura R15: A) Assaig de migració en càmera de Boyden en els models de silenciament d'*EPHA2*. 24 o 48 h de migració en les cèl·lules A763 i TC252 respectivament. B) Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel, en els models de silenciament d'*EPHA2*. 48 o 72 h d'invasió en les cèl·lules A763 i TC252 respectivament. Es mostren els clons d'A673 i TC252 agrupats com a clon A (AshE3 i TshE26) i B (AshE15 i TshE35). SCR: seqüència control. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

Per aquest propòsit, es va utilitzar el sistema xCELLigence. Aquest sistema es basa en el mateix principi que la càmera de Boyden però, mitjançant sensors en la part inferior dels *transwells*, permet monitoritzar a temps real la invasió cel·lular (figura R16). Amb aquesta tècnica també es va observar una disminució significativa de la invasió en presència de Matrigel en les cèl·lules silenciades per *EPHA2*. De fet, aquestes cèl·lules no van envair ni a temps llargs d'experiment.

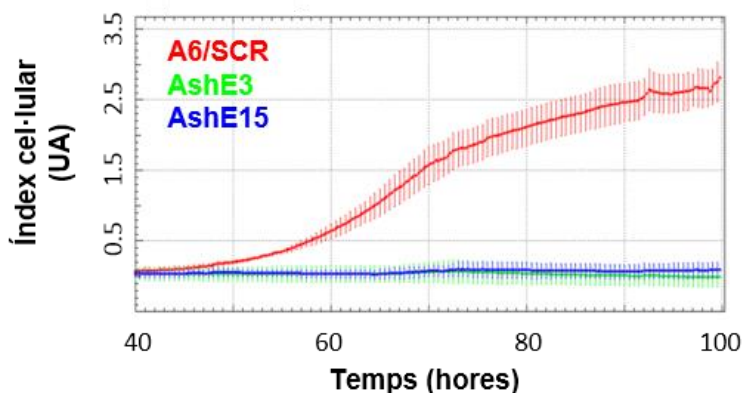


Figura R16: Assaig d'invasió a temps real en presència de Matrigel mitjançant el sistema xCELLigence. AshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. SCR: seqüència control.

7. EL SILENCIAMENT D'*EPHA2* EN LÍNIES DE SE INHIBEIX EL CREIXEMENT TUMORAL *IN VIVO*

Després d'analitzar el fenotip *in vitro*, es va avaluar la rellevància del receptor *EPHA2* en experiments *in vivo* amb ratolins immunodeprimits. Amb aquest propòsit, es van induir tumors subcutanis en ratolins de la soca BALB/*c^{nu/nu}*, injectant cinc milions de cèl·lules A673 *wild type* o silenciades per *EPHA2*. En cada ratolí es van induir dos tumors, un en el costat esquerre amb cèl·lules control i un altre en el costat dret amb cèl·lules silenciades per *EPHA2*. Cada 48 h es va monitoritzar el creixement tumoral i quan els tumors van assolir una mida d'1 cm³ es va practicar l'eutanàsia dels ratolins. Utilitzant aquest model *in vivo*, es va observar una reducció significativa en el creixement dels tumors induïts amb els clons silenciats per *EPHA2* respecte els tumors induïts amb les cèl·lules control (figura R17A-B). A més, es va

comprovar per *western blot* que els tumors mantenen el silenciament gènic d'*EPHA2* al final de l'experiment en els casos que pertocava (figura R17C).

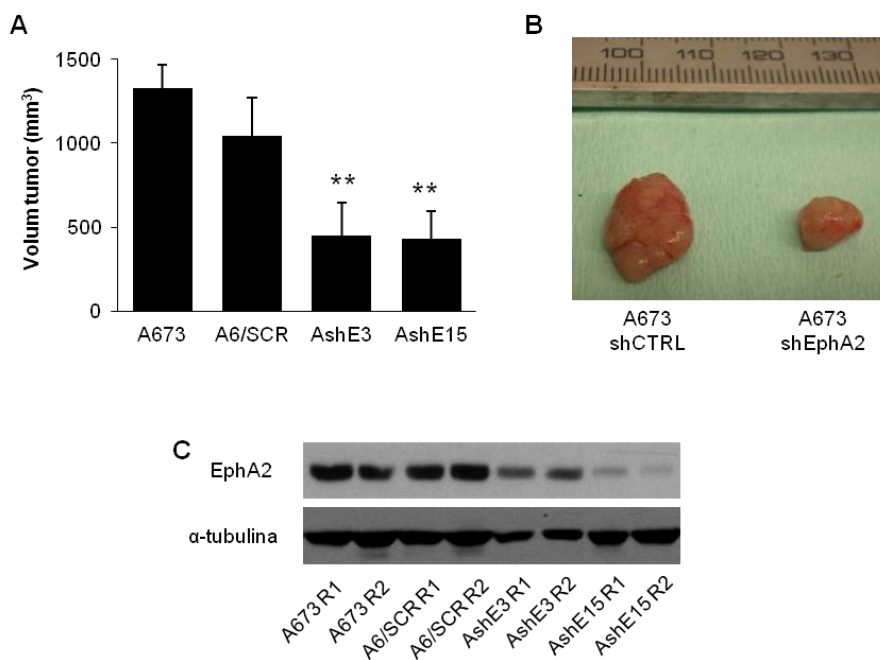


Figura R17: A) Creixement tumoral *in vivo* en ratolins immunodeprimits després d'una injecció subcutània de les cèl·lules tumorals utilitzant el model de silenciament d'*EPHA2* en la línia A673. Es representa el volum dels tumors en el moment del sacrifici. n=8 B) Imatges representatives dels tumors control o silenciats per *EPHA2* en el moment de l'extracció. C) *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'*EPHA2* en les mostres de tumors subcutanis recollits al final de l'experiment. AshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. R1 i R2 fa referència a diferents individus. SCR: plasmidi control. Test exacte de Fisher: **p≤0,005.

Aquests resultats suggereixen que *EPHA2*, a més promoure la proliferació cel·lular *in vitro*, és una proteïna important per afavorir el creixement tumoral del SE *in vivo*.

8. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL DE METÀSTASI ORTOTÒPIC

De forma paral·lela a la feina esmentada anteriorment, es va desenvolupar un nou model ortotòpic de metastasi (figura R18). Actualment, el model més emprat en l'estudi del procés metastàtic *in vivo* és la clàssica injecció de cèl·lules tumorals a través de la vena de la cua de ratolins. Tot i així, aquest model presenta limitacions importants ja que no reproduïx completament el procés que succeeix en condicions fisiològiques. En un tumor generat de manera espontània en un pacient, les cèl·lules tumorals han de completar tot el procés metastàtic: formar un tumor, migrar des d'aquest tumor primari, degradar la matriu que les envolta fins arribar a un vas, intravasari, circular i sobreviure en el torrent sanguini, extravasari, infiltrar-se en el nou teixit i ser capaç de créixer i sobreviure en aquest nou nínxol²⁶². En canvi, a l'injectar les cèl·lules tumorals directament al torrent sanguini, es salten els passos de migració i invasió des del tumor primari així com la intravasació, que són essencials per a que una cèl·lula completi el procés de metastasi.

Per aquesta raó, i basant-nos en un model de metastasi prèviament publicat pel grup del Dr. Loeb²⁶³, es va desenvolupar un model que consisteix en una injecció ortotòpica per tal de procurar l'aparició de metastasis pulmonars espontànies. Així, es van injectar dos milions de cèl·lules de les línies A673 o TC71 al múscul gastrocnemi dret de l'extremitat posterior de ratolins immunodeprimits BALB/c^{nu/nu}. Cada 48 h es va monitoritzar el creixement tumoral i quan els tumors van assolir una mida de 800 mm³ es va extreure el tumor primari (aproximadament 15 dies postinjecció). D'aquesta manera, es va evitar l'eutanàsia dels animals en aquell moment i es va incrementar el

temps per la formació de metàstasis. A més, és remarcable comentar que els animals mantenen una extremitat completament funcional després de la intervenció.

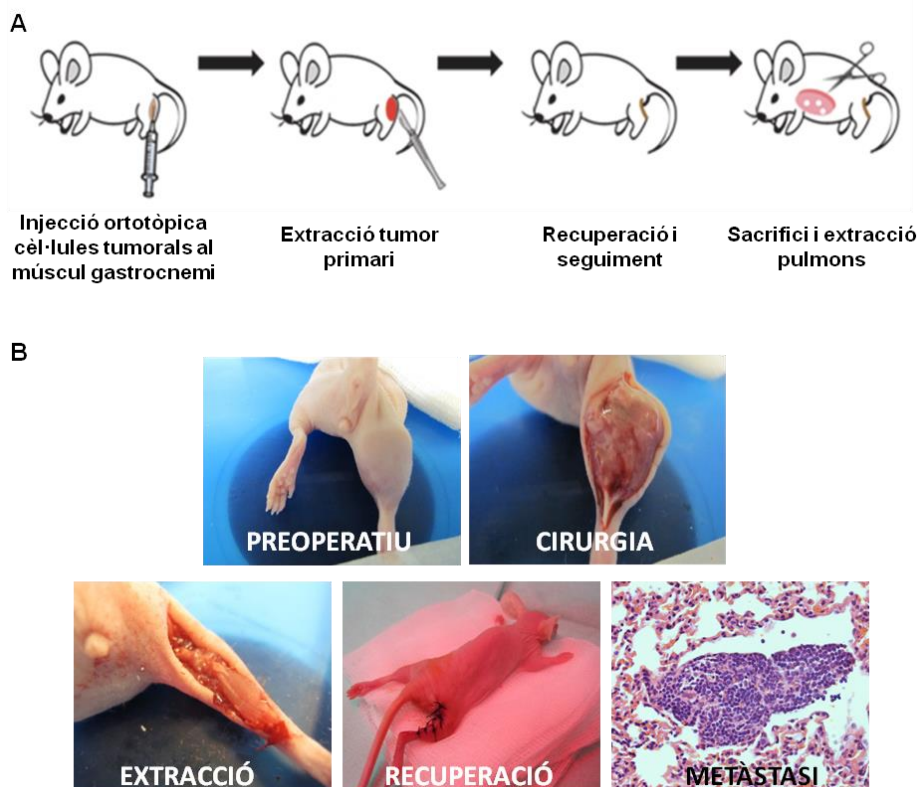


Figura R18: Desenvolupament d'un model de metàstasi ortotòpic amb cèl·lules de SE. A i B) Esquema del procés emprant ratolins immunodeprimits.

Passats 60 dies després de la injecció inicial, es va realitzar la necròpsia dels animals i es van buscar possibles metàstasis visibles a ull nu en tots els òrgans viscerals, però no se'n van observar. Tot seguit, donat que els pulmons són el principal teixit metastàtic de les cèl·lules de SE, aquests es van extreure per detectar l'existència de metàstasis visibles al microscopi (micrometàstasi) posteriorment. D'aquesta manera, amb les línies parentals A673 i TC71, es va

RESULTATS

obtenir una incidència d'un 70-80 % de ratolins amb una o més micrometàstasis pulmonars espontànies.

9. EL SILENCIAMENT D'*EPHA2* EN LÍNIES DE SE DISMINUEIX LA INCIDÈNCIA DE METÀSTASIS *IN VIVO*

Després d'observar una reducció en la migració i invasió *in vitro* al silenciar el receptor *EPHA2* en les línies de SE A673 i TC252, es van realitzar assajos de metàstasi en ratolins immunodeprimits de la soca BALB/*c^{nu/nu}* per comprovar les conseqüències *in vivo*. Inicialment, es va realitzar un assaig de metàstasi experimental injectant a la vena de la cua dos milions de cèl·lules A673 control o silenciades pel receptor. Seguidament, es van monitoritzar els animals per detectar possibles signes de morbiditat associats a l'aparició de metàstasis pulmonars. Passats 60 dies de la injecció es van extreure els pulmons per detectar la presència de micrometàstasis. En aquest experiment, es va observar que un 80 % dels ratolins injectats amb les cèl·lules controls presentaven metàstasis pulmonars (figura R19), mentre que només un 50 % dels ratolins injectats amb les cèl·lules silenciades per *EPHA2*, en tots dos clons, en presentaven. L'anàlisi estadística va determinar com a significativa la diferència entre els ratolins injectats amb cèl·lules control i ratolins injectats amb cèl·lules amb baixa expressió d'*EPHA2*.

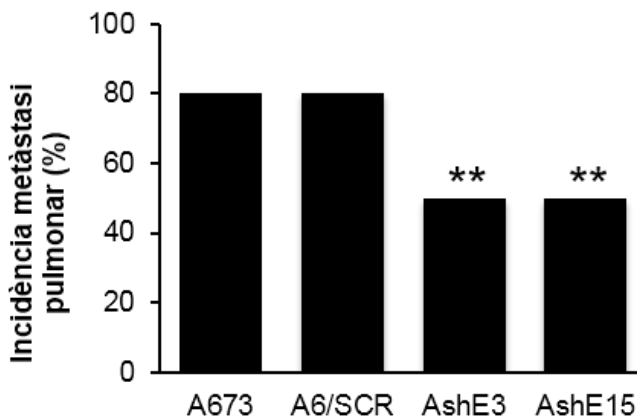


Figura R19: Incidència de metàstasi pulmonar en un assaig de metàstasi experimental en ratolins immunodeprimits. Injecció de cèl·lules tumorals a la vena de la cua utilitzant el model de silenciament d'*EPHA2* de la línia A673. AshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. SCR: plasmidi control. n=10. Test exacte de Fisher: ** $p \leq 0,005$.

Per abordar el procés metastàtic amb una altra aproximació, es va analitzar l'aparició de metàstasis espontànies mitjançant el model ortotòpic a múscul. Així doncs, es van injectar les cèl·lules A673 control o silenciades per *EPHA2* al múscul gastrocnemi dret i es va repetir el procés que s'ha descrit anteriorment. Un cop extirpats els tumors primaris i passats 60 dies des de la injecció de les cèl·lules tumorals, es van extreure els pulmons per detectar la presència de micrometàstasis. Tanmateix, es va comprovar histològicament que també en aquest model hi havia una disminució significativa en la incidència de metàstasis induïdes per les cèl·lules que tenien el receptor *EPHA2* silenciats (figura R20A). Més d'un 70 % dels ratolins injectats amb les cèl·lules control van desenvolupar metàstasis pulmonars espontànies, mentre que només ho van fer aproximadament el 40 % dels ratolins injectats amb les cèl·lules de baixa expressió d'*EPHA2*. A més, es va realitzar un recompte del

RESULTATS

número de metàstasis en les seccions pulmonars analitzades de cada ratolí. D'aquesta manera, es va observar que també hi havia una reducció significativa en el número de metàstasis per ratolí, en aquells injectats amb les cèl·lules silenciades per *EPHA2* (figura R20B). De forma representativa, es mostren imatges del teixit pulmonar dels ratolins injectats amb les cèl·lules tumorals control o silenciades per *EPHA2* (figura R21).

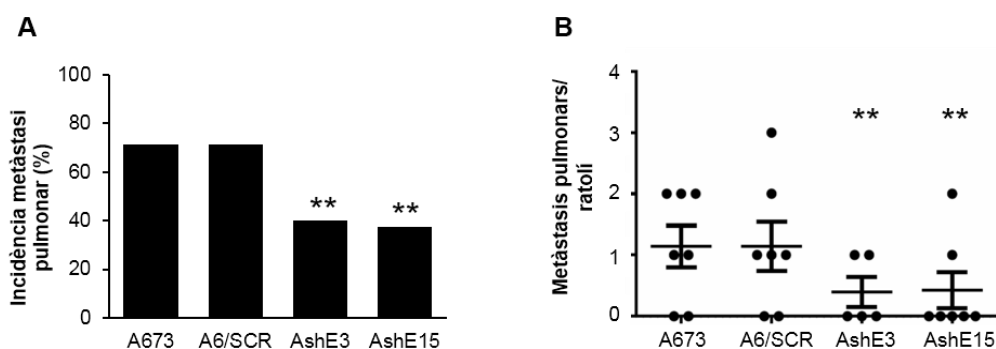


Figura R20: A) Incidència de metàstasi pulmonar en un assaig de metàstasi espontani en ratolins immunodeprimits. Injecció de cèl·lules tumorals al múscul gastrocnemi utilitzant el model de silenciament d'*EPHA2* de la línia A673. n=7. B) Recompte del número de metàstasis pulmonars per ratolí en el mateix experiment. AshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. SCR: plasmidi control. Test exacte de Fisher: **p≤0,005.

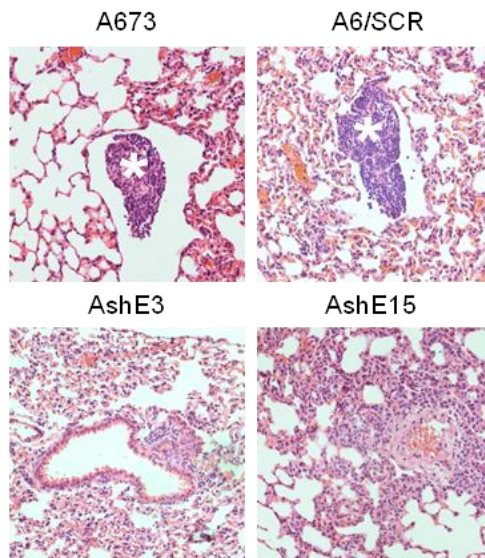


Figura R21: Fotografies representatives del teixit pulmonar en l'assaig de metàstasi ortotòpic. Ratolins injectats amb les cèl·lules tumorals control o silenciades per *EPHA2* al múscul gastrocnemi. Es marquen amb un asterisc les metàstasis pulmonars. Augment 20X. AshE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. SCR: plasmidi control.

Així doncs, els resultats demostren que *EPHA2* juga un paper fonamental en el desenvolupament de metàstasis en cèl·lules de SE.

10. EL SILENCIAMENT D'*EPHA2* EN LÍNIES DE SE ALTERA L'EXPRESSIÓ D'UN GRUP DE GENS IMPLICATS EN SENYALITZACIÓ, MOVIMENT I SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR

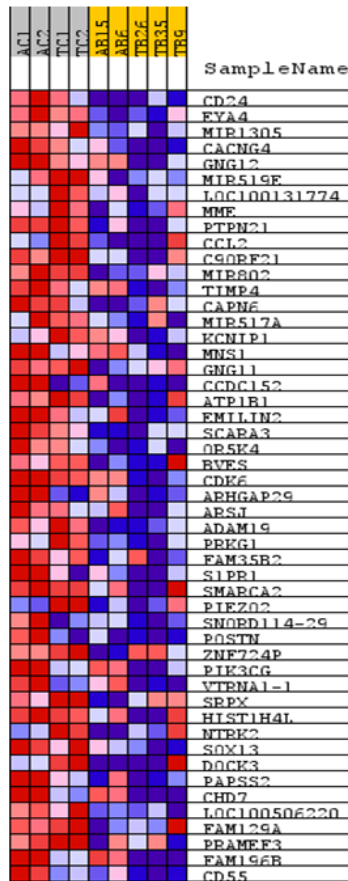
Per tal d'aprofundir, a nivell molecular, en els efectes del silenciament del receptor *EPHA2* en cèl·lules de SE, es va realitzar un *microarray* d'expressió

RESULTATS

gènica. Es va utilitzar la tecnologia Genechip d’Affymetrix per comparar les línies cel·lulars A673 i TC252 control, respecte les que estaven transfectades amb l’ARNsh contra *EPHA2*. Per aquest experiment, es van recollir les cèl·lules en fase exponencial de creixement i es va realitzar una extracció d’ARN que permetés recuperar tant els ARNm com ARNs no codificants: ARNmi i ARNlnc (ARN llarg no codificant). Aquestes mostres es van processar i es van hibridar contra una matriu que conté més de 48.000 sondes, que representen una gran part del genoma. Després d’analitzar els resultats, es van seleccionar els gens que presentaven un *p*-valor inferior a 0,05 i un canvi d’1,5 vegades més o menys expressió respecte les cèl·lules control.

Amb aquesta llista de gens es va realitzar un *heat map* (figura R22) per obtenir una representació gràfica dels gens que es troben diferencialment expressats entre les cèl·lules control i les silenciades. A partir d’aquesta anàlisi, també es va generar un diagrama de Venn (figura R23), on es representa la quantitat de gens que estan diferencialment expressats entre condicions, així com els que coincideixen entre els clons de les línies A673 i TC252. En el model d’A673 es van trobar 2027 gens alterats, mentre que en el model de la línia TC252 només se’n van trobar 249.

Top 50 gens
infraexpressats



Top 50 gens
sobreexpressats

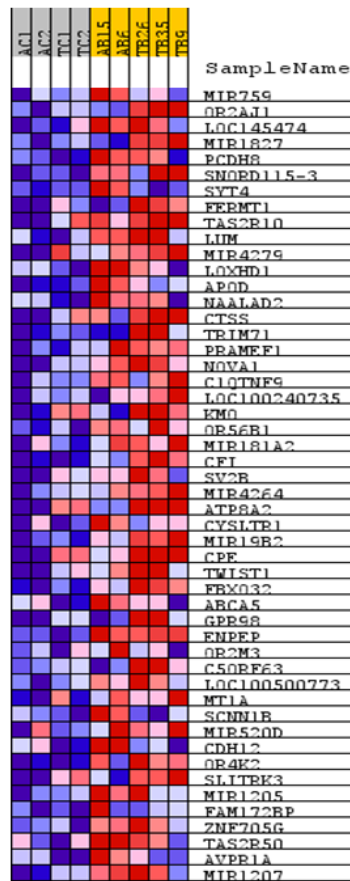


Figura R22: Heat map dels gens infra- i sobreexpressats en les cèl·lules A673 i TC252 control respecte les silenciades. Vermell: gens sobreexpressats; Blau: gens infraexpressats. AC# i TC# (gris): cèl·lules control; AB# i TB# (groc): cèl·lules silenciades.

RESULTATS

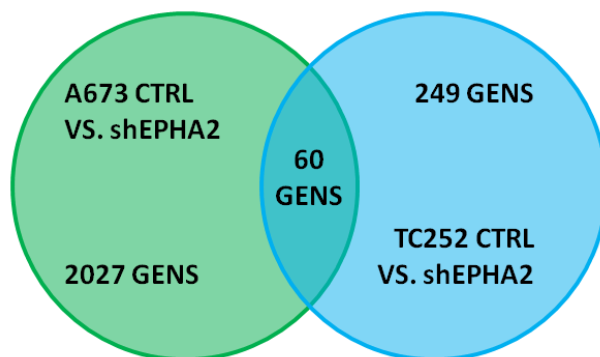


Figura R23: Diagrama de Venn mostrant el número de gens diferencialment expressats després del silenciament d'*EPHA2* en les línies A673 i TC252. La intersecció representa els gens comuns entre les dues línies cel·lulars.

No obstant, per tal de buscar mecanismes representatius de les línies de SE, la llista de gens amb la qual es va decidir treballar va ser la comuna a les dues línies cel·lulars, obtenint d'aquesta manera un total de 60 gens diferencialment expressats (taula R1).

Taula R1: llistat de gens diferencialment expressats després del silenciament d'*EPHA2* en les línies A673 i TC252. AffyID: identificador Affymetrix. Efecte: increment o disminució de l'expressió en les cèl·lules silenciades per *EPHA2*.

| # | AffyID | Símbol | Descripció | Efecte |
|---|----------|----------------------|--|------------|
| 1 | 17096242 | <i>AAED1</i> | <i>AbpC/TSA antioxidant enzyme domain containing 1</i> | Disminueix |
| 2 | 17002194 | <i>ADAM19</i> | <i>ADAM metallopeptidase domain 19</i> | Disminueix |
| 3 | 16673525 | <i>ATP1B1</i> | <i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 1 polypeptide</i> | Disminueix |
| 4 | 16773379 | <i>ATP8A2</i> | <i>ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2</i> | Incrementa |

| | | | | |
|----|----------|--------------------------|---|------------|
| 5 | 16837172 | CACNG4 | <i>calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4</i> | Disminueix |
| 6 | 16833204 | CCL2 | <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i> | Disminueix |
| 7 | 17117110 | CD24 | <i>CD24 molecule</i> | Disminueix |
| 8 | 17069272 | CHD7 | <i>chromodomain helicase DNA binding protein 7</i> | Disminueix |
| 9 | 16692834 | CTSS | <i>cathepsin S</i> | Incrementa |
| 10 | 17075973 | DUSP4 | <i>dual specificity phosphatase 4</i> | Disminueix |
| 11 | 16850595 | EMILIN2 | <i>elastin microfibril interfacier 2</i> | Disminueix |
| 12 | 16969766 | ENPEP | <i>glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)</i> | Incrementa |
| 13 | 16976329 | EPHA5 | <i>EPH receptor A5</i> | Incrementa |
| 14 | 17012721 | EYA4 | <i>eyes absent homolog 4 (Drosophila)</i> | Disminueix |
| 15 | 17065851 | FAM66D | <i>family with sequence similarity 66, member D</i> | Incrementa |
| 16 | 16780775 | FGF14-IT1 | <i>FGF14 intronic transcript 1 (non-protein coding)</i> | Incrementa |
| 17 | 16846985 | FLJ44342 | <i>uncharacterized LOC645460</i> | Incrementa |
| 18 | 16690036 | FRRS1 | <i>ferric-chelate reductase 1</i> | Incrementa |
| 19 | 17084866 | GLIPR2 | <i>GLI pathogenesis-related 2</i> | Disminueix |
| 20 | 17048450 | GNG11 | <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11</i> | Disminueix |
| 21 | 16688323 | GNG12 | <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12</i> | Disminueix |
| 22 | 17005593 | HIST1H3E | <i>histone cluster 1, H3e</i> | Disminueix |
| 23 | 17016506 | HIST1H4L | <i>histone cluster 1, H4l</i> | Disminueix |
| 24 | 16731408 | HTR3B | <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B, ionotropic</i> | Disminueix |
| 25 | 16679349 | KMO | <i>kynurenine 3-monoxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)</i> | Incrementa |
| 26 | 16683268 | LOC10099651 1 | <i>uncharacterized LOC100996511</i> | Incrementa |
| 27 | 16768406 | LUM | <i>lumican</i> | Incrementa |
| 28 | 16815953 | MIR4718 | <i>microRNA 4718</i> | Incrementa |

RESULTATS

| | | | | |
|----|----------|--------------------------|--|------------|
| 29 | 16847839 | MIR5047 | <i>microRNA 5047</i> | Incrementa |
| 30 | 16809748 | MNS1 | <i>meiosis-specific nuclear structural 1</i> | Disminueix |
| 31 | 17114368 | MOSPD1 | <i>motile sperm domain containing 1</i> | Disminueix |
| 32 | 16726880 | NEAT1 | <i>nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)</i> | Incrementa |
| 33 | 17092490 | NFIB | <i>nuclear factor I/B</i> | Disminueix |
| 34 | 17086386 | NTRK2 | <i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i> | Disminueix |
| 35 | 16676515 | NUCKS1 | <i>nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1</i> | Disminueix |
| 36 | 16670164 | OTTHUMG0000043433 | NULL | Incrementa |
| 37 | 17088006 | PALM2-AKAP2 | <i>PALM2-AKAP2 readthrough</i> | Disminueix |
| 38 | 16967875 | PARM1 | <i>prostate androgen-regulated mucin-like protein 1</i> | Incrementa |
| 39 | 16779486 | PCDH8 | <i>protocadherin 8</i> | Incrementa |
| 40 | 17050134 | PIK3CG | <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma</i> | Disminueix |
| 41 | 16914070 | PKIG | <i>protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma</i> | Disminueix |
| 42 | 16659395 | PRAMEF22 | <i>PRAME family member 22</i> | Disminueix |
| 43 | 16795582 | PTPN21 | <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21</i> | Disminueix |
| 44 | 16749105 | PYROXD1 | <i>pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1</i> | Disminueix |
| 45 | 16732878 | RNA5SP352 | <i>RNA, 5S ribosomal pseudogene 352</i> | Incrementa |
| 46 | 17095566 | SHC3 | <i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3</i> | Disminueix |
| 47 | 16961162 | SLITRK3 | <i>SLIT and NTRK-like family, member 3</i> | Incrementa |
| 48 | 17012711 | SNORA33 | <i>small nucleolar RNA, H/ACA box 33</i> | Incrementa |
| 49 | 16676277 | SOX13 | <i>SRY (sex determining region Y)-box 13</i> | Disminueix |
| 50 | 17110071 | SRPX | <i>sushi-repeat containing protein, X-linked</i> | Disminueix |
| 51 | 16707120 | STAMBPL1 | <i>STAM binding protein-like 1</i> | Disminueix |
| 52 | 17048083 | STEAP2 | <i>STEAP family member 2, metalloreductase</i> | Incrementa |

| | | | | |
|----|----------|-----------------|---|------------|
| 53 | 17076103 | TEX15 | <i>testis expressed 15</i> | Incrementa |
| 54 | 16950825 | TIMP4 | <i>TIMP metalloproteinase inhibitor 4</i> | Disminueix |
| 55 | 16960463 | TMEM183B | <i>transmembrane protein 183B</i> | Disminueix |
| 56 | 16785938 | TTC9 | <i>tetratricopeptide repeat domain 9</i> | Disminueix |
| 57 | 17024710 | ULBP3 | <i>UL16 binding protein 3</i> | Disminueix |
| 58 | 16712272 | VIM-AS1 | <i>VIM antisense RNA 1</i> | Disminueix |
| 59 | 16991991 | WWC1 | <i>WW and C2 domain containing 1</i> | Disminueix |
| 60 | 17115934 | XGPY2 | <i>Xg pseudogene, Y-linked 2</i> | Incrementa |

Amb aquests 60 gens es va realitzar la primera anàlisi bioinformàtica, que va ser un *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Aquesta anàlisi permet correlacionar el perfil d'expressió gènica obtingut en un grup de mostres (en aquest cas es van utilitzar els 60 gens de la llista comuna), amb patrons similars que es trobin en repositoris de dades, corresponents a altres experiments que s'hagin publicat anteriorment. D'aquesta manera, es va observar que els gens que correlacionen amb processos metastàtics estaven associats a l'expressió d'*EPHA2*, fet que concorda amb el fenotip observat en el nostre treball (figura R24A). D'altra banda, també es va observar una forta correlació entre els gens alterats al silenciar *EPHA2* i la senyalització d'*EGFR* (figura R24B). Aquesta troballa és interessant ja que suggereix l'existència de *crossstalk* entre les dues proteïnes, com ja s'ha descrit en altres tipus de tumors^{170,220}.

RESULTATS

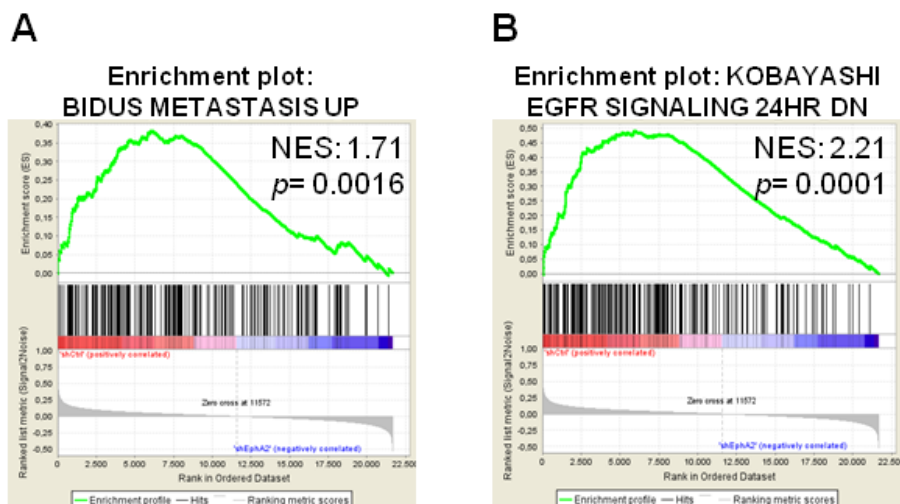


Figura R24: *Gene Set Enrichment Analysis* mostrant una correlació entre els gens diferencialment expressats al silenciar *EPHA2* amb aquells implicats en processos metastàtics (A) o en la senyalització del receptor EGFR (B). NES: *Normalized Enrichment Score*. p: p-valor.

Tot seguit, com a estudi funcional, es va realitzar un *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA). Aquesta anàlisi permet esbrinar quines determinades funcions cel·lulars i moleculars estan enriquides en una llista concreta de gens, i així es va veure de forma global en quines funcions cel·lulars estava implicat *EPHA2* en cèl·lules de SE (taula R2). D'aquesta manera, es va observar que les cèl·lules que tenien *EPHA2* silenciat presentaven alteracions en vies de senyalització, moviment, supervivència i mort cel·lular així com també en modificacions posttraduccional i síntesi de proteïnes.

Taula R2: *Ingenuity Pathway Analysis*. Es mostren diverses funcions cel·lulars significativament alterades després del silenciament d'*EPHA2*.

| Funcions cel·lulars i moleculars | <i>p</i> -valor (rang) | # molècules |
|----------------------------------|------------------------|-------------|
| Senyalització cel·lular | 0,0330-0,000476 | 10 |
| Moviment cel·lular | 0,0328-0,000648 | 23 |
| Mort i supervivència cel·lular | 0,0470-0,000725 | 34 |
| Modificacions postraduccional | 0,0393-0,000835 | 12 |
| Síntesi de proteïnes | 0,000835-0,000835 | 3 |

Les tres primeres categories d'aquesta anàlisi correlacionen amb els resultats dels experiments *in vitro*, ja que corresponen a funcions que s'havien vist alterades en els models de reintroducció o silenciament d'*EPHA2* en les diferents línies de SE. No obstant, és interessant remarcar el fet que la majoria d'aquests gens mai abans havien estat relacionats amb *EPHA2*.

De la llista de gens que es van trobar alterats, es van triar 6 per tal de validar els resultats del *microarray* mitjançant RT-qPCR (figura R25). La selecció dels gens a validar es va basar en la seva relació a la bibliografia amb processos tumorals. D'una banda, es van seleccionar 4 gens que promouen el fenotip neoplàsic i que es trobaven infraexpressats en les cèl·lules amb *EPHA2* silenciats. D'altra banda, es van seleccionar 2 gens relacionats amb processos supressors de tumors que es trobaven sobreexpressats en les cèl·lules amb *EPHA2* silenciats²⁶⁴. Els gens infraexpressats seleccionats van ser: *ADAM19* (metal·loproteïnasa implicada en adhesió i migració), *CCL2* (quimiocina implicada en processos immunomoduladors), *PIK3CG* (quinasa reguladora

RESULTATS

de múltiples vies de senyalització) i *PTPN21* (fosfatasa relacionada amb creixement cel·lular i transformació oncogènica). Els gens sobreexpressats seleccionats van ser: *PCDH8* (protocadherina implicada en adhesió cel·lular) i *LUM* (proteoglicà relacionat amb fibres de col·lagen)²⁶⁴.

Per la validació es van fer servir les mateixes mostres d'ARN utilitzades per l'*array* així com també mostres independents. En la gràfica de resultats (figura R25), per tal de simplificar l'anàlisi, es mostren agrupats els controls i els clons de cada línia cel·lular. A excepció del gen *PIK3CG* en la línia cel·lular A673, on no es va observar una disminució significativa, es van reproduir els resultats de l'*array* mitjançant RT-qPCR. En conseqüència, es van considerar validats els resultats obtinguts.

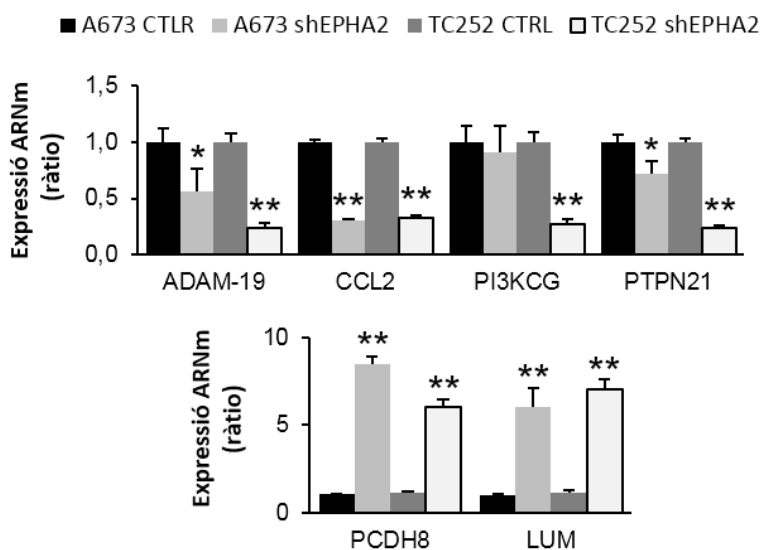


Figura R25: Validació per RT-qPCR de 4 gens infraexpressats i 2 gens sobreexpressats després del silenciament d'*EPHA2*. CTRL: promig entre la línia parental i les cèl·lules transfectades amb el vector buit. *shEPHA2*: promig entre com a mínim 2 clons de cada línia cel·lular, incloent els emprats pels experiments *in vitro*. Prova *t* de Student: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$

Tot seguit, es va voler aprofundir en el rol dels gens *PCDH8* i *LUM*, que havien estat descrits com a supressors tumorals en diverses entitats²⁶⁵⁻²⁶⁸. Malauradament, no es va obtenir una bona senyal per *western blot* amb els anticossos testats per aquestes proteïnes, cosa que va dificultar el seu estudi. Per aquest motiu, es va prioritzar l'anàlisi de la funció del gen *ADAM19*, que és una metal·loproteïnasa implicada en migració i invasió cel·lular que mai abans s'havia relacionat amb *EPHA2*^{269,270}.

11. LA PROTEÏNA ADAM19 ESTÀ IMPLICADA EN LA CAPACITAT MIGRATÒRIA DE LES CÈL·LULES DE SE

Per tal d'analitzar el paper d'ADAM19 en cèl·lules de SE es van realitzar experiments de silenciament transitori en la línia A673. Per aquest propòsit es va dissenyar un ARNsi contra *ADAM19* que es va transfectar emprant un agent liposomal. Com a control es va utilitzar un altre ARNsi que no estava dirigit contra cap regió del genoma. Al cap de 48 h de la transfecció, es van recollir els extractes cel·lulars per comprovar l'eficiència del silenciament per *western blot* (figura R26A).

Després de comprovar que l'ARNsi era efectiu, es van realitzar experiments de migració amb les cèl·lules transfectades mitjançant *transwells*. En les cèl·lules silenciades per *ADAM19* es va observar una reducció significativa en la capacitat de migració d'un 75 % aproximadament (figura R26B).

RESULTATS

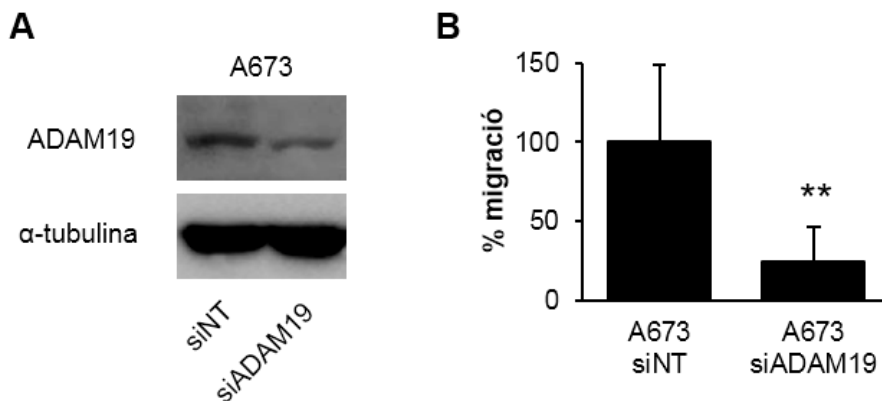


Figura R26: A) *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'ADAM19 en la línia A673 després de 48 h de la transfecció amb un ARNsi control (NT: *non-targeting*) o dirigit contra ADAM19. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. B) Assaig de migració en càmera de Boyden amb les cèl·lules transfectades 24 h prèviament a la sembra de l'experiment. 24 h de migració. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

Així doncs, el silenciament d'ADAM19 explica, com a mínim de manera parcial i en termes de migració cel·lular, els efectes observats al silenciar EPHA2. Aquests resultats suggereixen que aquesta metal·loproteïna pot ser important en la patogènesi del SE.

12. ÀMPLIA EXPRESSIÓ D'EPHA2 EN LÍNIES DE RABDOMIOSARCOMA

Després d'observar la funció oncogènica d'EPHA2 en SE, i pensant en el potencial terapèutic d'aquest receptor per dirigir substàncies citotòxiques de manera selectiva a les cèl·lules tumorals, es va voler estudiar la seva implicació en un altre sarcoma pediàtric: el rabdomiosarcoma (RMS). El RMS és el sarcoma de parts toves més comú en infants i adolescents i també

compta amb una translocació cromosòmica en un subgrup de pacients (RMS alveolar), igual que passa en el SE¹. En primer lloc, es va comprovar per *western blot* que les línies de RMS també presentaven una àmplia expressió del receptor EPHA2 (figura R27). A continuació, tenint en compte la rellevància de la fosforilació del residu S897, es va analitzar si aquesta modificació postraducciona es produïa en línies de RMS. Així, es va observar que en la majoria de línies de RMS analitzades EPHA2 es trobava fosforilat de manera constitutiva en aquest residu (figura R27).

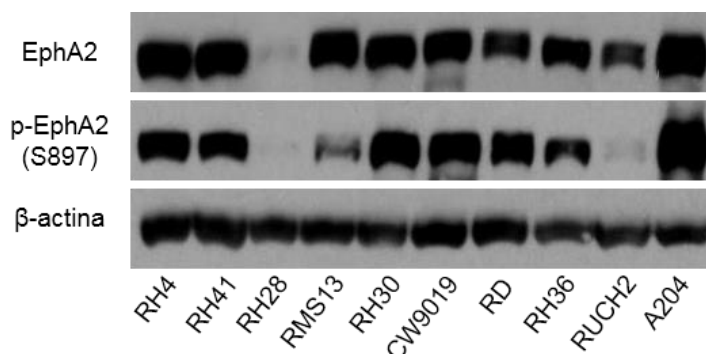


Figura R27: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió d'EPHA2 i la fosforilació S897 en un panell de línies de RMS. Com a control de càrrega es va utilitzar la β-actina.

13. ERK1/2 ÉS RESPONSABLE DE LA FOSFORILACIÓ DEL RESIDU S897 D'EPHA2 EN LÍNIES DE RMS

Seguidament, igual que s'havia fet amb les línies de SE, es va comprovar quines proteïnes eren responsables de la fosforilació S897 en línies de RMS. Com a inhibidor de MEK1/2-ERK1/2 es va utilitzar el Trametinib i com a

RESULTATS

inhibidor de la via PI3K-AKT es va utilitzar el compost MK22-06. Després de tractaments de 3-24 h, es van recollir les cèl·lules i es va comprovar per *western blot* que els tractaments eren efectius observant la disminució d'ERK1/2 o AKT fosforilats segons corresponia (figura R28).

En el cas del Trametinib, es va observar una forta disminució en la fosforilació S897 d'EPHA2 en les dues línies de RMS emprades. En el cas de l'inhibidor MK22-06, la fosforilació S897 no es va veure afectada en la línia RMS13, tot i que en la línia RH4 es va observar una lleugera disminució. Així doncs, els resultats suggereixen que la principal via responsable de promoure aquesta fosforilació en RMS és la senyalització MEK1/2-ERK1/2, igual que passava en el cas del SE.

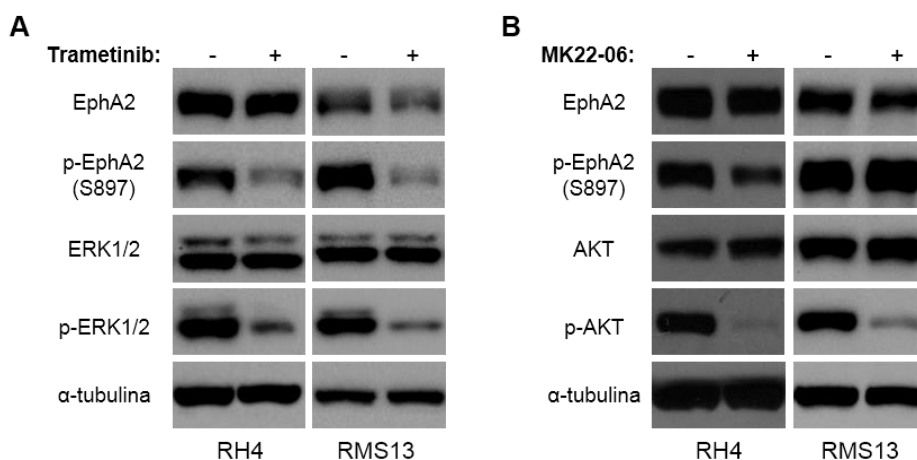


Figura R28: *Western blot* representatiu mostrant els nivells d'EPHA2 i p-EPHA2 (S897) en les línies RH4 i RMS13 tractades amb l'inhibidor d'ERK1/2 Trametinib (A) o amb l'inhibidor d'AKT MK-2206 (B). Les concentracions emprades van ser Trametinib 50 nM durant 3 h i MK22-06 1 μ M durant 24 h. La fosforilació d'ERK1/2 i d'AKT es mostra com a control de l'eficiència del tractament. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

14. EPHA2 TAMBÉ PROMOU EL FENOTIP NEOPLÀSIC EN LÍNIES DE RMS

Per caracteritzar la funció d'EPHA2 en RMS, es va generar un model estable de silenciament en la línia RH4, utilitzant els mateixos vectors control i de silenciament que s'havien emprat per les línies de SE. En conseqüència, es va transfectar la línia cel·lular RH4 amb un ARNsh dirigit contra *EPHA2* i amb un vector control que contenia una seqüència aleatòria (SCR: *scramble*).

Degut a la baixa eficiència de transfecció d'aquesta línia, es van aïllar i amplificar diversos clons en els que es va comprovar el silenciament de manera individual per *western blot* (figura R29A). Es van seleccionar aquells que tenien un silenciament d'un 50 % o més, i es va treballar com a mínim amb dos clons diferents per cada experiment.

Amb aquest model de silenciament inicialment es van fer assajos de migració, ja que havia estat el procés més clarament afectat en les línies de SE. Amb aquest propòsit, es van emprar càmeres de Boyden per comprovar si EPHA2 estava implicat en la motilitat cel·lular en RMS. Així, es va observar que els dos clons de la línia RH4 amb nivells baixos del receptor presentaven una disminució significativa en la capacitat migratòria respecte les cèl·lules control (figura R29B).

RESULTATS

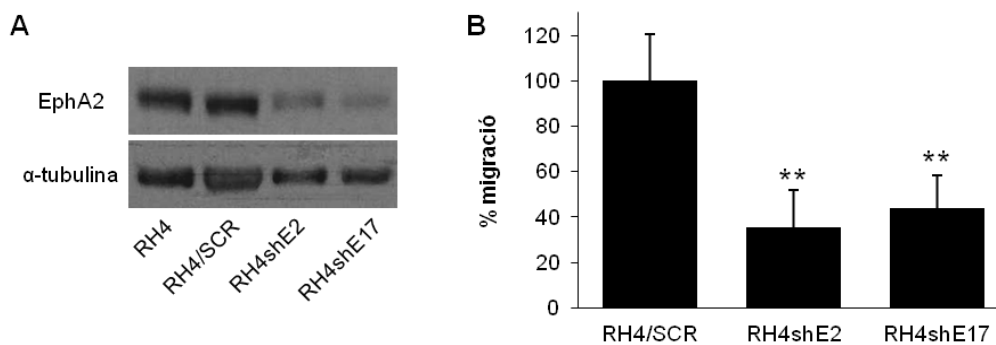


Figura R29: A) *Western blot* representatiu mostrant els clons seleccionats pel silenciament d'*EPHA2* en la línia de RMS RH4. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. B) Assaig de migració en càmera de Boyden en el model de silenciament d'*EPHA2*. 24 h de migració. SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. RH4shE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. Prova *t* de Student: ** $p \leq 0,005$.

Paral·lelament, amb aquest model es van realitzar experiments de proliferació mitjançant el reactiu WST-1. Així, es va observar que el silenciament del receptor *EPHA2* reduïa de manera significativa la capacitat proliferativa de les cèl·lules *in vitro* (figura R30A). A més, es van realitzar assajos clonogènics per comprovar si *EPHA2* intervenia en la capacitat de formar colònies a baixa densitat en RMS. El resultat va ser que en els dos clons de treball silenciats per *EPHA2* es va observar una disminució significativa en la capacitat clonogènica respecte les cèl·lules control (figura R30B).

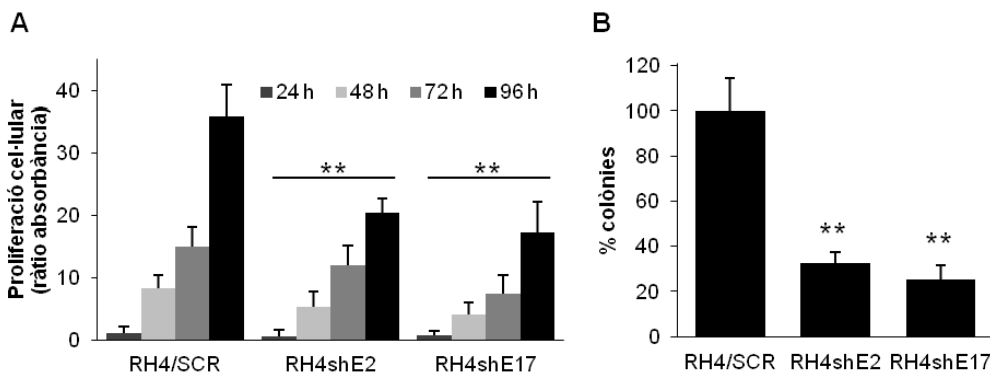


Figura R30: A) Assaig de proliferació del model de silenciament d'*EPHA2* en la línia RH4 mitjançant el reactiu WST-1. B) Quantificació d'un assaig clonogènic amb el model de silenciament d'*EPHA2*, 15 dies de creixement. SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. RH4shE# correspon a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament d'*EPHA2*. Prova *t* de Student: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

Així doncs, els resultats indiquen que *EPHA2* també té una funció oncogènica en línies cel·lulars de RMS *in vitro*. Aquest fet suggereix que *EPHA2* pugui ser una diana terapèutica a valorar no tan sols en SE sinó també en altres tipus de sarcomes pediàtrics.

15. (CONTINGUT XIFRAT)

Discussió

1. CONNEXIÓ ENTRE EPHA2, LA FOSFORILACIÓ DEL RESIDU S897 I EL FENOTIP AGRESSIU DE LES CÈL·LULES DE SE

El paper de les proteïnes tirosina quinasa en càncer ha estat estudiat durant molts anys per diversos grups de recerca. En aquesta família de proteïnes, s'han trobat mutacions activadores i amplificacions gèniques que contribueixen a la progressió de la malaltia^{135,142}. En moltes ocasions, s'ha intentat dissenyar teràpies dirigides contra aquestes proteïnes, algunes de les quals han aconseguit millorar el pronòstic dels pacients. Entre els casos d'èxit consten, per exemple, els inhibidors d'ErbB2 per pacients de càncer de mama que expressen aquest marcador²⁷¹⁻²⁷³, la inhibició de la proteïna de fusió Bcr-Abl en pacients de leucèmia^{274,275}, o el tractament amb inhibidors tirosina quinasa per KIT en pacients de tumors de l'estroma gastrointestinal (GIST)^{276,277}.

D'entre les proteïnes tirosina quinasa, els RTK són ben coneguts pel seu paper en proliferació, invasió i disseminació de les cèl·lules canceroses. La unió dels lligands al domini extracel·lular desemboca en l'activació canònica del seu domini tirosina quinasa intracel·lular. Per contra, darrerament s'ha fet evident que aquests receptors també actuen de forma independent a l'activitat tirosina quinasa, mitjançant la fosforilació de residus serina/treonina presents a la seva estructura¹³⁴.

Dins dels RTK, es troba el receptor de membrana EPHA2. La sobreexpressió d'EPHA2 s'ha descrit en múltiples tipus de tumors, on s'ha relacionat amb els estats avançats de la malaltia i un pitjor pronòstic pels pacients¹⁴³. El nostre grup de recerca va descriure uns anys enrere que EPHA2 estava expressat en pacients de SE i que la seva funció dependent de

DISCUSSIÓ

l·ligand era important per regular el procés d'angiogènesi en aquests tumors¹³⁰. A més, en altres tipus de sarcomes, com per exemple l'osteosarcoma, també s'ha estudiat el paper oncogènic d'EPHA2, on s'ha relacionat la seva expressió amb una menor supervivència dels pacients^{228,229}.

Per aprofundir encara més en el paper d'EPHA2 en SE, en aquesta tesi es va començar per avaluar l'expressió d'EPHA2 i l'estat de la fosforilació S897 en un panell de línies de SE. D'aquesta manera, es va trobar una àmplia expressió del receptor i una expressió variable de la fosforilació S897 en funció de cada línia cel·lular. Així doncs, es va demostrar, per primera vegada, la presència de la fosforilació responsable de la funció independent de l·ligand d'EPHA2 en línies cel·lulars de SE.

El desconeixement de la cèl·lula d'origen del SE es tradueix en una manca de base de comparació pel que fa a l'expressió d'EPHA2 en aquests tumors. Tanmateix, en aquest treball no es va comparar l'expressió d'EPHA2 respecte cèl·lules primàries, però diversos estudis afirmen que la proteïna EPHA2 no s'expressa o ho fa a nivells indetectables en teixit ossi no patològic. D'altra banda, s'ha descrit que *EPHA2* es troba sobreexpressat a nivell transcripcional en SE comparant respecte mostres musculars i cèl·lules hematopoietiques control^{229,231}. En conseqüència, es podria deduir que EPHA2 es troba sobreexpressat en SE. Al no ser diana directa de la proteïna de fusió EWS-FLI1, ha d'haver-hi altres mecanismes que regulin els nivells de l'ARNm d'*EPHA2* o el seu recanvi proteic. Per exemple, podria ser que diferents microARNs que regulen l'expressió d'*EPHA2* i que han mostrat activitat supressora en càncer es trobessin silenciats o inactius en SE. Entre els microARNs que regulen *EPHA2* consten, entre d'altres, miR-141 i miR-200a en càncer de mama^{199,278,279} o miR-520d en càncer gàstric²⁸⁰, però

aquests no s'han vist alterats en SE fins al moment. Un altre dels mecanismes clàssics de regulació dels receptors Eph són les mateixes efrines, i de fet està demostrat que la unió receptor-lligand promou la degradació proteica d'EPHA2 via proteasoma^{189,281}. D'altra banda, pel que fa a vies de senyalització, en càncer colorectal es va observar que la presència d'un mutant de KRAS promovia l'expressió d'*EPHA2* i l'estabilitat de la proteïna, regulant de forma dual la quantitat de receptor disponible^{282,283}. Altrament, la via de les MAPK, que es troba activada de forma constitutiva en SE²⁸⁴, també s'ha relacionat amb un increment de l'expressió d'*EPHA2* en diferents entitats tumorals^{170,285}, suggerint que aquest podria ser un mecanisme de regulació probable en SE. Una altra diana important en SE són les proteïnes de la família Hsp90, la inhibició de les quals ha demostrat reduir el creixement tumoral en models preclínic de SE^{286,287}. Aquesta família de proteïnes, de forma interessant, també s'ha descrit com a reguladora de l'estabilitat proteica d'EPHA2²⁰², ampliant així el panell dels possibles mecanismes responsables de la sobreexpressió del receptor en SE, que s'hauran d'analitzar més detalladament en futurs estudis.

Els experiments realitzats amb un panell de línies de SE van revelar que aquelles amb un índex de proliferació i migració superior són les que presenten nivells més elevats de la fosforilació S897 d'EPHA2, suggerint que aquesta fosforilació confereix un avantatge cap a un fenotip més agressiu en SE. Dintre d'aquest panell, és interessant remarcar el fenotip de la línia SK-N-MC, que presenta una baixa fosforilació del residu S897. Aquestes cèl·lules, tot i presentar nivells elevats d'EPHA2, es comporten com les línies de baixa expressió en termes de migració i proliferació cel·lular.

DISCUSSIÓ

De forma complementària, la introducció d'un vector d'expressió d'*EPHA2 wild type* en una línia de baixa expressió (RH1) va incrementar el seu fenotip maligne en relació a proliferació i migració cel·lular. No obstant, la introducció d'un mutant no fosforilable en el residu S897, generat per mutagènesi dirigida, no va produir cap efecte apreciable. Aquests resultats van demostrar que en línies de SE no és només la presència d'*EPHA2* el que confereix propietats oncogèniques, sinó la fosforilació específica del residu S897. Conjuntament, aquests resultats concorden amb el que s'ha observat en altres tipus de tumors. Per exemple, en línies de glioblastoma la fosforilació del residu S897 s'ha relacionat amb un increment de la proliferació cel·lular²¹⁵; i en càncer de pròstata o melanoma, la senyalització independent de lligand d'*EPHA2* s'ha associat amb la motilitat cel·lular i el potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals^{212,220}.

2. SENYALITZACIÓ D'*EPHA2* EN SE: RELLEVÀNCIA D'*ERK1/2*, *CAV1* I *IQGAP1*

En un inici, es va descriure que la via de senyalització responsable de la fosforilació d'*EPHA2* al residu S897 era *PI3K/AKT*^{212,213}. Tot i així, recentment alguns grups han demostrat que la via de les *MAPK* també pot ser responsable d'aquesta fosforilació^{214,215}. Per aquest motiu, utilitzant inhibidors químics d'aquestes dues vies, es va intentar desxifrar el mecanisme de regulació d'*EPHA2* en SE.

Els resultats obtinguts suggereixen que en les línies A673 i TC252, la fosforilació d'*EPHA2* en el residu S897 depèn de la via senyalització de les *MAPK*, ja que només es va observar una disminució de la fosforilació al

tractar les cèl·lules amb inhibidors d'ERK1/2. Per contra, en els tractaments amb inhibidors d'AKT no es van observar canvis. Val a dir que la presència de la fosforilació S897 es pot detectar en cèl·lules de SE en condicions basals, sense necessitat d'afegir cap factor de creixement o de cultivar les cèl·lules en presència de sèrum, fet que contrasta amb molts dels d'estudis sobre aquesta fosforilació. Independentment de la via responsable d'aquesta modificació postraduccional, sovint es necessita algun estímul extern, com HGF o TNF- α , per detectar aquesta fosforilació²¹²⁻²¹⁴. En cèl·lules de SE, la via de les MAPK es troba constitutivament activada²⁸⁸, en A673 per una mutació activadora en BRAF²⁸⁹ i probablement en altres línies cel·lulars degut a una regulació recíproca amb la senyalització del receptor IGF1R, que es troba activat per l'acció d'EWS-FLI1^{85,284}. En conseqüència, és coherent pensar que EPHA2 es trobi constitutivament fosforilat en el residu S897 en cèl·lules de SE per acció de les MAPK. De fet, en línies cel·lulars de càncer de mama i pàncrees, que compten amb mutacions activadores de BRAF i/o KRAS, també s'ha observat una fosforilació constitutiva del residu S897 d'EPHA2²¹⁴.

De forma complementària, en línies de SE, es va observar una disminució de la fosforilació d'ERK1/2 al silenciar *EPHA2* i un increment de la mateixa fosforilació a l'introduir un vector d'expressió d'*EPHA2 wild type*. Notablement, la reintroducció del mutant no fosforilable S897A no va provocar canvis en la fosforilació d'ERK1/2. D'aquesta manera, els resultats suggereixen l'existència d'un *feedback* regulador entre EPHA2 i ERK1/2 on, independentment del seu lligand, EPHA2 actua a la vegada com a substrat i com a efector d'ERK1/2.

DISCUSSIÓ

Les proteïnes de *scaffolding* tenen la propietat d'interaccionar amb diverses molècules alhora i així intervenen en múltiples processos cel·lulars. Algunes de les seves funcions són: generar complexos multiproteics que permeten connectar proteïnes de senyalització, estabilitzar components cel·lulars, dirigir la localització de les proteïnes amb les que interaccionen o protegir-les de l'acció de fosfatases. Totes aquestes funcions de les proteïnes de *scaffolding* són importants en la regulació de la via de les MAPK²⁹⁰. Per exemple, és conegut que la interacció d'ERK1 amb les proteïnes de *scaffolding* VDAC o SEF1 determina la seva localització a les mitocondries o a l'aparell de Golgi respectivament^{291,292}. De fet, ERK1/2 regula centenars de substrats, i s'estima que pràcticament la meitat són nuclears i l'altra meitat citosòlics. Per tant, la localització d'ERK1/2 esdevé essencial per promoure una correcta senyalització²⁹³.

En aquesta direcció, el nostre grup va demostrar que l'activació de les MAPK promou la migració de les cèl·lules de SE, i que la fosforilació d'ERK1/2 depèn de l'expressió de CAV1 i d'IQGAP1²⁶¹; les quals poden actuar com a proteïnes de *scaffolding*. D'una banda, CAV1 s'ha relacionat pràcticament amb tots els processos tumorals i és diana directa de la proteïna de fusió EWS-FLI1¹²⁸. D'altra banda, IQGAP1 és ben coneguda per la seva regulació del citoesquelet d'actina i la promoció del fenotip invasiu de les cèl·lules tumorals mitjançant la interacció amb proteïnes quinases^{260,294}. De forma paral·lela, el nostre grup també va descriure que la interacció entre CAV1 i EPHA2 és essencial per promoure el procés d'angiogènesi en SE, mitjançant la funció dependent de lligand d'EPHA2¹³⁰. En aquest context, els resultats d'aquesta tesi han permès aprofundir en la relació entre totes aquestes proteïnes.

Analizant la funció independent de lligand d'EPHA2, s'ha demostrat que la fosforilació del residu S897 depèn de la presència de CAV1 i d'IQGAP1, posant de manifest la relació entre aquestes tres proteïnes en la progressió tumoral del SE. Malgrat això, el mecanisme que regula la fosforilació d'EPHA2 mitjançant CAV1 i IQGAP1 no està completament desxifrat. Una opció factible seria que la manca de CAV1 o d'IQGAP1, que actuen com a proteïnes d'ancoratge per múltiples nodes de senyalització, es tradueixi en un desacoblament entre EPHA2 i ERK1/2. Concretament, està descrit que en absència de CAV1, la proteïna EPHA2 es redistribueix de la membrana plasmàtica al citoplasma¹³⁰. D'altra banda, també es coneix que IQGAP1 uneix BRAF, MEK1/2 i ERK1/2 i regula la seva activitat. De fet, en cèl·lules silenciades per *IQGAP1*, no es produeix l'activació de BRAF dependent d'EGFR, posant de manifest la rellevància de les proteïnes de *scaffolding* en la senyalització de les MAPK^{258,295}. En aquesta línia, és possible que sense CAV1 o IQGAP1, degut a una incorrecta localització, no es produeixi la fosforilació creuada entre EPHA2 i ERK1/2.

Una altra hipòtesi sobre el vincle entre aquestes proteïnes seria que CAV1 i IQGAP1 reguessin proteïnes de senyalització que actuïn de forma indirecta sobre EPHA2 i ERK1/2. De fet, en les línies cel·lulars de SE testades, no s'ha desxifrat si la fosforilació ERK1/2-EPHA2 és directa, però probablement depèn d'altres proteïnes que actuïn com a intermediàries. ERK1/2 fosforila residus serina i treonina que es troben propers a prolines, essent les seqüències consens més freqüents Pro-X-Ser/Thr-Pro o simplement Ser/Thr-Pro^{290,296}. La seqüència flanquejant del residu S897 d'EPHA2 no segueix aquesta pauta, fet que suggereix que la fosforilació ERK1/2-EPHA2 sigui indirecta. Per exemple, s'ha descrit que proteïnes de la família RPS6KA (*ribosomal protein S6 kinase A*), que són serina/treonina

DISCUSSIÓ

quinases com ERK1/2, i que estan regulades per aquesta, catalitzen de manera directa la fosforilació S897 d'EPHA2²¹⁴.

Paral·lelament, s'ha descrit que EPHA2 pot promoure la fosforilació d'ERK1/2 de manera indirecta. Alguns dels mecanismes observats es donen mitjançant la unió de molècules adaptadores com SHC als seus residus tirosina fosforilats o mitjançant la fosforilació de residus tirosina de la proteïna SHP2^{297,298}. No obstant, en línies de SE, sembla que la fosforilació d'ERK1/2 és independent del domini tirosina quinasa d'EPHA2, i aquest és un mecanisme que no s'havia descrit fins al moment. Es coneix que la fosforilació del residu S897 d'EPHA2 i l'activitat quinasa del receptor són mútuament excloents²¹², i en el model de reintroducció d'*EPHA2* s'ha demostrat que la fosforilació d'ERK1/2 depèn del residu S897 d'EPHA2. En conseqüència, els resultats suggereixen que en cèl·lules de SE, de manera independent del seu domini quinasa, EPHA2 hauria d'actuar sobre altres quinases que regulin la fosforilació d'ERK1/2.

Conjuntament, els resultats demostren la necessitat d'un eix de senyalització EPHA2-CAV1-IQGAP1-ERK1/2 per promoure el fenotip oncogènic de les cèl·lules de SE. Tot i així, calen estudis més detallats per aclarir les quinases que fosforilen directament ERK1/2 i EPHA2 i desxifrar el rol exacte de cadascuna de les proteïnes dins d'aquest node de regulació.

3. EL SILENCIAMENT D'EPHA2 REVERTEIX EL FENOTIP NEOPLÀSIC I EL POTENCIAL METASTÀTIC DE LES CÈL·LULES DE SE I REGULA L'EXPRESSIÓ D'UN GRUP DE GENS IMPLICATS EN SENYALITZACIÓ, MOVIMENT I SUPERVIVÈNCIA CEL·LULAR

Per analitzar més profundament el paper oncogènic d'EPHA2 al SE, de forma complementària al model de reintroducció d'EPHA2 a la línia cel·lular RH1, es van generar dos models de silenciament gènic estable en les línies A673 i TC252.

La disminució en la proliferació, la capacitat clonogènica i el creixement tumoral *in vivo* en les cèl·lules silenciades per EPHA2 van fer palès que la progressió del SE depèn de la senyalització d'EPHA2. Aquest fet és similar al que succeeix en altres tipus de càncer, com per exemple mama o pròstata, on l'expressió d'EPHA2 s'ha associat a estadis avançats de la malaltia i a un pitjor pronòstic pels pacients^{143,189}. Malgrat que el silenciament d'EPHA2 va afectar diversos processos cel·lulars, l'efecte més pronunciat va ser el bloqueig de la migració i invasió cel·lular *in vitro* i de la progressió metastàtica *in vivo*. Val a dir que per avaluar el potencial metastàtic de les cèl·lules de SE *in vivo*, es van emprar dues aproximacions diferents: un assaig de metàstasi experimental, mitjançant injecció intravenosa de les cèl·lules tumorals, i un assaig de metàstasi espontani, mitjançant injecció ortotòpica al múscul gastrocnemi.

Donat que EPHA2 participa en la migració i invasió *in vitro*, cabria pensar que en les cèl·lules amb nivells baixos del receptor hi hauria menys migració des del tumor primari, menys invasió de la matriu, i en conseqüència, menys

DISCUSSIÓ

intravasació i metastàsi. Així, s'esperaria que en el model ortotòpic la diferència en la incidència de metastàsi, entre les cèl·lules control i les silenciades per *EPHA2*, fos encara més gran que en el model d'injecció intravenosa. No obstant, la reducció en el percentatge de metastàsi pulmonar va ser molt similar entre els dos models. Així doncs, aquests resultats suggereixen que *EPHA2* és important en les darreres etapes del procés metastàtic: supervivència al torrent sanguini, extravasació, infiltració en el nou teixit o colonització del mateix²⁶². En aquesta línia, un estudi en càncer de pròstata va descartar que la implicació d'*EPHA2* en metastàsi fos dependent de la migració transendotelial, l'adhesió cel·lular o la resistència a *l'anoikis*. Per contra, sí que es va demostrar una implicació d'*EPHA2* en la capacitat clonogènica *in vitro*, fet que es va relacionar amb la colonització òssia i pulmonar de les cèl·lules tumorals *in vivo*²⁹⁹. En els nostres models de SE també s'ha observat una implicació d'*EPHA2* en la capacitat clonogènica, fet que va suggerir que aquesta podria ser responsable de les diferències en metastàsi. A més, es va establir que en càncer de pròstata *EPHA2* regulava l'expressió de *CXCR4*²⁹⁹, al qual se l'ha relacionat en SE amb la migració i invasió cel·lular i amb un mal pronòstic pels pacients^{300,301}. Paral·lelament, altres estudis sí que han relacionat *EPHA2* i els seus lligands amb la migració a través de cèl·lules endotelials³⁰²⁻³⁰⁴, posant de manifest la necessitat d'estudis més detallats per determinar la implicació d'*EPHA2* en el context cel·lular del SE. Malgrat tot, els resultats indiquen que l'expressió d'*EPHA2* és necessària per la propagació metastàtica del SE, de manera consistent al que succeeix en altres entitats tumorals^{198,220,282,305}.

El fet que la presència de metastàsi sigui el principal factor pronòstic dels pacients de SE li dona molta rellevància al fenotip que es descriu en aquest treball. Els resultats poden suggerir que la presència d'*EPHA2* fosforilat al

residu S897 pugui ser útil com a marcador de pronòstic de la malaltia. Lamentablement, però, no s'ha aconseguit marcatge per immunohistoquímica amb cap dels anticossos testats per la fosforilació del residu S897, fet que ha impossibilitat validar-la com a marcador pronòstic.

També és interessant remarcar el desenvolupament del model de metàstasi ortotòpic al múscul gastrocnemi, ja que és una aproximació més fisiològica que la clàssica injecció intravenosa. Aquest model, al ser més complex, pot ser útil per detectar diferències en el procés metastàtic que amb una altra tècnica no s'observarien, com el cas d'un article publicat pel nostre grup en el decurs d'aquesta tesi²⁶¹. A més, suposa una disminució de la severitat del protocol respecte altres models^{263,306,307}, ja que els animals mantenen una extremitat completament funcional durant tot l'experiment. D'altra banda, aquest model de metàstasi espontani també es pot aplicar per l'estudi d'altres tipus de sarcomes i, de fet, ja tenim constància que la injecció ortotòpica de cèl·lules tumorals de RMS produeix metàstasis pulmonars de forma similar a les cèl·lules de SE. No obstant, s'ha de continuar perfeccionant la tècnica per tal d'intentar disminuir el percentatge de ratolins amb recidives locals.

Per analitzar amb més detall els mecanismes moleculars associats a les propietats oncogèniques d'EPHA2, es van identificar els gens regulats pel receptor mitjançant un *microarray* d'expressió gènica, emprant models de silenciament estable d'EPHA2 en dues línies de SE. En el model d'A673 es van trobar 2027 gens alterats en les cèl·lules silenciades, mentre que en el model de la línia TC252 només se'n van trobar 249. Aquest canvi tan gran en el número de gens diferencialment expressats entre línies pot ser degut a diversos motius com diferències en el nivell de silenciament aconseguit o en el *background* genètic intrínsec de cada línia. Per exemple, A673 presenta

DISCUSSIÓ

mutacions en *TP53* i *CDKN2B* mentre que la seqüència d'aquests gens en TC252 no es troba alterada⁹².

Malgrat tot, es va observar que EPHA2 regulava l'expressió de 60 gens de forma comuna en les línies A673 i TC252. A més, de manera consistent amb el fenotip observat *in vitro* i *in vivo*, emprant aquests 60 gens es va detectar *in silico* que EPHA2 estava implicat en senyalització, moviment i supervivència cel·lular en SE mitjançant l'anàlisi IPA.

Per la seva banda, l'anàlisi GSEA va mostrar una forta correlació entre EPHA2 i la via de senyalització d'EGFR. Això concorda amb diversos estudis que postulen un vincle entre aquestes dues proteïnes, ja que l'expressió d'EPHA2 s'ha relacionat amb la resistència de les cèl·lules tumorals a inhibidors d'EGFR^{308,309}. El paper del receptor EGFR en SE és controvertit. Mentre que alguns estudis afirmen que al voltant d'un 80 % de pacients expressen la proteïna EGFR i que la seva inhibició pot ser citotòxica *in vitro*, en experiments *in vivo* no s'ha aconseguit disminuir el creixement tumoral amb els mateixos inhibidors³¹⁰⁻³¹². Pel que fa a altres membres de la família EGFR, es coneix que la interacció entre EPHA2 i ErbB2 promou la capacitat tumorigèna i la progressió metastàtica en càncer de mama³¹³. No obstant, ErbB2 no sembla participar en la malignitat del SE^{314,315}. D'altra banda, es coneix que la proteïna ErbB4 promou la capacitat metastàtica de les cèl·lules de SE, de manera similar al que succeeix amb EPHA2^{316,317}. En conseqüència, es podria especular sobre l'existència d'un *cross-talk* oncogènic entre EPHA2 i ErbB4 en aquest tumor pediàtric.

Les anàlisis GSEA i IPA també van confirmar una correlació entre EPHA2 i mecanismes moleculars relacionats a la propagació metastàtica. En aquesta direcció, un dels principals processos detectats en l'anàlisi IPA va ser la

direccionalitat del moviment axonal. Aquest procés és profundament important durant el posicionament neuronal en el desenvolupament embrionari, i és ben conegut que els receptors de la família Eph participen en aquesta orientació del moviment axonal^{167,318,319}. De forma addicional, en els darrers anys, diversos estudis estan posant de manifest que les vies de senyalització implicades en aquest procés biològic juguen un paper important en la progressió tumoral i metastàtica. Concretament, s'ha descrit que això és deu a que poden regular l'angiogènesi, la mort, l'adhesió o la invasió cel·lular en diversos tipus de càncer^{320,321}.

Del conjunt de 60 gens alterats en les cèl·lules amb *EPHA2* silenciats, es van seleccionar 6 pel procés de validació. 4 dels gens seleccionats (*ADAM19*, *CCL2*, *PIK3CG* i *PTPN21*) estan associats amb la progressió tumoral i es trobaven infraexpressats en les cèl·lules amb nivells baixos d'*EPHA2*. Per contra, els altres 2 gens seleccionats s'associen a funcions supressores i es van trobar sobreexpressats en les cèl·lules amb nivells baixos del receptor (*PCDH8* i *LUM*). *PCDH8* és un membre de la família de les cadherines que es troba inactivat en diversos tipus de càncer i actua com a supressor tumoral^{265,322}. *LUM* és un membre de la família SLRP (*small leucine-rich proteoglycan*), conegut per disminuir la migració i invasió cel·lular i el creixement independent d'ancoratge *in vitro*, així com les metastasis *in vivo*^{267,268,323}. *CCL2* codifica per una quimiocina inflamatòria relacionada amb la infiltració de macròfags associats als tumors i la progressió tumoral. Concretament, la proteïna *CCL2* es troba sobreexpressada en diverses entitats tumorals com per exemple càncer de pulmó, mama o pròstata. En els casos en que aquesta proteïna és secretada per les cèl·lules tumorals, pot reclutar monòcits i macròfags associats als tumors. Així, aquestes cèl·lules infiltrades formen un microambient protector i promouen el creixement

DISCUSSIÓ

tumoral i les metàstasis^{324–326}. D'altra banda, *PIK3CG* i *PTPN21* codifiquen per proteïnes de senyalització cel·lular que s'han vist implicades en la progressió tumoral i en la resistència a agents quimioterapèutics^{327–330}. De forma interessant, *PTPN21* defosforila de manera directa ErbB1 i ErbB4, cosa que podria suggerir un nou mecanisme de regulació entre *EPHA2* i la senyalització de la família EGFR^{331,332}.

En aquest treball es va decidir aprofundir en el rol d'*ADAM19*, que és un membre de la família de disintegrines i metal·loproteïnases ADAM. Les proteïnes de la família ADAM estan implicades en diverses funcions biològiques com el desenvolupament embrionari, l'adhesió i migració cel·lular, senyalització o proteòlisi³³³. Experiments de silenciament d'*ADAM19* mitjançant ARNsi van reproduir els efectes de silenciar *EPHA2* en termes de migració cel·lular. De forma consistent, l'alteració de diferents membres de la família ADAM s'ha associat al creixement i la invasió de cèl·lules tumorals mitjançant la regulació de diferents integrines i factors de creixement^{333,334}. Els resultats aquí presentats mostren per primera vegada una relació entre *EPHA2* i *ADAM19*, fet que suggereix que aquest últim participa en la progressió metastàtica del SE mitjançant un mecanisme dependent d'*EPHA2*. Es coneix que el miARN-145 és el principal miARN silenciador per la proteïna de fusió EWS-FLI1, i se li atribueixen funcions supressores en SE en models de reintroducció^{335,336}. Tanmateix, està descrit que *ADAM19* és diana directa del miARN-145 en altres entitats tumorals²⁶⁹. A més, de forma interessant, aquest miARN també regula un altre dels gens que s'han trobat alterats en l'anàlisi d'expressió gènica: *PIK3CG*³³⁷. En conseqüència, es podria plantejar la hipòtesi que el silenciament d'*EPHA2* d'alguna manera incrementa l'activitat del miARN-145 i així disminueix

l'expressió d'*ADAM19*, revertint de forma parcial l'empremta oncogènica d'EWS-FLI1.

Tot i haver aprofundit específicament en el rol d'*ADAM19* com a efector de la senyalització d'*EPHA2*, no es pot subestimar la implicació dels altres gens que s'han trobat alterats en el fenotip neoplàsic del SE. Per exemple, *CCL2* podria ser un factor clau per promoure un nínxol ideal per la progressió metastàtica mitjançant la regulació del sistema immune³²⁴. En aquesta direcció, seria interessant realitzar estudis addicionals, que es podrien fer emprant models murins humanitzats³³⁸, per desxifrar la contribució de *CCL2* en el procés metastàtic.

De forma global, els resultats de l'anàlisi d'expressió gènica concorden amb el fenotip observat al silenciar el receptor, i a més d'això, obren la porta a l'estudi de múltiples gens que fins ara no s'havien relacionat amb *EPHA2*, i que podrien participar en la progressió del SE. Tot i així, no s'ha desxifrat el mecanisme pel qual *EPHA2* regula aquest conjunt de gens, però una hipòtesi seria mitjançant la fosforilació d'*ERK1/2*, que s'ha vist afectada en els models de silenciament o reintroducció d'*EPHA2*.

Aproximadament la meitat dels substrats d'*ERK* són proteïnes nuclears i, entre d'altres, aquestes poden ser factors de transcripció (com *ELK1* o *FOS*) o receptors nuclears (com el receptor d'estrogen o *PPARG*). Com a resultat d'aquestes interaccions, *ERK1/2* pot activar o inhibir la transcripció gènica²⁹⁰. D'altra banda, les funcions nuclears d'*ERK1/2* també s'associen a la remodelació de la cromatina, mitjançant la regulació de *PARP1*³³⁹, o a interaccions directes amb l'ADN, que poden promoure repressió transcripcional³⁴⁰. En relació a *EPHA2*, està descrit que la seva senyalització dependent de lligand promou canvis en *ERK1/2*, que al mateix temps regula

DISCUSSIÓ

l'expressió gènica^{211,285,341}. No obstant, la localització i activitat subcel·lular d'ERK1/2 depèn de la seva via d'activació, havent-se relacionat l'activació per receptors acoblats a proteïnes G a les funcions nuclears i l'activació mitjançant β -arrestina a les funcions citoplasmàtiques³⁴². En conseqüència, no es pot assegurar que la regulació d'ERK1/2 mitjançant la funció independent de lligand d'EPHA2 promogui també la seva translocació a nucli.

D'altra banda, no es pot menystenir la regulació d'EPHA2 sobre altres factors de transcripció o reguladors transcripcionals, com podrien ser CTNNB1 (*catenin beta 1*) o SNAI1 (*snail family transcriptional repressor 1*), que s'han relacionat amb EPHA2 en altres entitats tumorals³⁰⁵. Malgrat això, els resultats d'una anàlisi *in silico* per cercar factors de transcripció enriquits en els nostres models de silenciament no va aportar resultats que es poguessin reproduir *in vitro*.

Per últim, també cal considerar la possibilitat que EPHA2 actuï localment a nucli regulant la transcripció gènica. En els darrers anys, està incrementant l'estudi de les funcions nuclears dels RTK, que arriben a aquest compartiment cel·lular mitjançant el transport retrògrad de vesícules, i que s'han associat principalment a la regulació de l'expressió gènica¹³⁴. En diversos tipus de càncer com el de pulmó o pàncrees, la localització nuclear dels RTK s'ha associat a un pitjor pronòstic de la malaltia^{343,344}. Dins de la família Eph, tan EphA4 com EphB2 s'han trobat a nucli, malgrat encara no s'ha desxifrat el seu rol en aquest compartiment cel·lular^{345,346}. I més concretament, la localització nuclear d'EPHA2 s'ha associat al potencial metastàtic en melanoma uveal, mentre que la localització citoplasmàtica s'ha relacionat amb un millor pronòstic pels pacients³⁴⁷.

Els resultats previs sobre la funció dependent de lligand d'EPHA2 en SE¹³⁰, juntament amb aquestes dades, suggereixen que la inhibició d'EPHA2 i els seus efectors podria ser una nova estratègia en la teràpia contra el SE. En aquesta direcció, el fàrmac que està més avançat a la clínica és el Dasatinib, que s'està utilitzant en centenars d'assajos clínics. Tot i que inicialment es va desenvolupar com un inhibidor tirosina quinasa de BCR-ABL i SRC, també ha demostrat ser efectiu en la inhibició de la fosforilació de residus tirosina d'EPHA2 i en disminuir la fosforilació del seu residu S897¹⁸². Actualment, entre d'altres, hi ha un assaig clínic fase 2 en marxa per comprovar la seva eficàcia en sarcomes recorrents o metastàtics, incloent casos de SE (#NCT00464620²⁴⁰). No obstant, el Dasatinib no és un inhibidor específic i, per tant, els efectes observats tan a nivell preclínic com clínic no es poden atribuir a la inhibició d'una única proteïna. Per tal d'inhibir específicament EPHA2, s'estan desenvolupant compostos més selectius com el candidat 4a, que ha demostrat inhibir la proliferació cel·lular d'una línia de glioblastoma *in vitro*³⁴⁸. Ja en fase clínic, també es troben dos assajos per tal de suprimir específicament EPHA2. El primer, és un assaig fase 1 que es basa en el tractament amb un anticòs monoclonal, el DS-8895a, dirigit contra la regió juxtamembrana d'EPHA2 pel tractament de casos de càncer avançats o metastàtics (#NCT02252211^{240,349}). En segon lloc, es troba un assaig clínic fase 1 per pacients de càncer recurrent, que es basa en l'administració d'un ARNsi contra *EPHA2* mitjançant liposomes neutres (#NCT01591356^{240,349}). D'altra banda, el fet que EPHA2 s'hagi relacionat amb la resistència a quimioteràpia en diferents entitats tumorals, també fa pensar que la seva inhibició podria ser beneficiosa en SE. Així, la combinació d'agents quimioterapèutics amb inhibidors d'EPHA2 podria sensibilitzar les cèl·lules tumorals de SE resistents als tractaments convencionals^{221,308}.

4. EPHA2 TAMBÉ JUGA UN PAPER ONCOGÈNIC EN UN ALTRE TIPUS DE SARCOMA PEDIÀTRIC

Els sarcomes pediàtrics són entitats que presenten una gran heterogeneïtat clínica, havent-se descrit més de 100 subtipus diferents. Tot i que de forma aïllada són poc freqüents, conjuntament representen el 10-14% del total de casos de càncer infantil. Mentre que en general presenten un elevat percentatge de casos que responen bé als tractaments convencionals, una característica comuna dels sarcomes pediàtrics és la baixa supervivència dels pacients que presenten metàstasi al moment del diagnòstic^{1,350}.

Per tal de comprovar si la funció d'EPHA2 en la progressió maligna és comuna entre aquests tumors, vàrem ampliar l'estudi al RMS, que comparteix moltes similituds amb el SE. El RMS és el sarcoma de parts toves més comú en nens i adolescents i representa el 5 % dels tumors pediàtrics^{351,352}. L'origen d'aquests tumors recau en cèl·lules progenitores de llinatge muscular i la classificació actual divideix el RMS en 2 subtipus histològics majoritaris: el RMS embrionari (ERMS) i l'alveolar (ARMS). L'ERMS és el subtipus més freqüent i amb millor pronòstic, mentre que l'ARMS té menor incidència però conté el grup de pacients amb pitjor pronòstic^{1,351,353}. Una de les similituds que presenta el RMS respecte al SE és que la presència de metàstasi és un dels principals factors de pronòstic. Aquestes apareixen aproximadament en el 15 % dels pacients i disminueixen la taxa de supervivència als 5 anys fins al 42 % pels pacients d'ERMS i fins al 18 % en els pacients d'ARMS³⁵⁴. A més, la majoria de pacients d'ARMS presenten translocacions cromosòmiques que principalment donen lloc a les proteïnes de fusió PAX3-FOXO1 o PAX7-FOXO1^{351,355,356}, de forma similar al que succeeix en el SE amb EWS-FLI1.

Els resultats obtinguts en línies de RMS apunten també a un paper oncogènic d'EPHA2 en aquest tumor pediàtric, regulant els mateixos processos cel·lulars que en SE. Tan EPHA2 com la fosforilació del residu S897 es van detectar en la pràctica totalitat de les línies de RMS emprades. Així, es va demostrar per primer cop la presència de la fosforilació responsable de la funció independent de lligand d'EPHA2 en línies cel·lulars de RMS. Pel que fa a la senyalització responsable d'aquesta fosforilació, tant la via de PI3K/AKT com la via de les MAPK són essencials en la progressió del RMS³⁵⁷. No obstant, en relació a EPHA2, els resultats indiquen que la fosforilació oncogènica d'EPHA2 en RMS depèn de la senyalització MEK1/2-ERK1/2, igual que passava en SE. Per últim, els estudis funcionals van revelar una implicació d'EPHA2 en capacitat clonogènica, proliferació i migració cel·lular. Conjuntament, aquests resultats concorden amb el fenotip tumoral agressiu associat a la fosforilació S897 en SE, i suggereixen un paper oncogènic d'EPHA2 en els sarcomes infantils.

Tot i que calen estudis més detallats sobre el paper d'EPHA2 en RMS, els resultats suggereixen que juga un paper similar al de SE. En conseqüència, es podria valorar investigar-lo com a marcador pronòstic de la malaltia o utilitzar-lo com a diana terapèutica. (CONTINGUT XIFRAT).

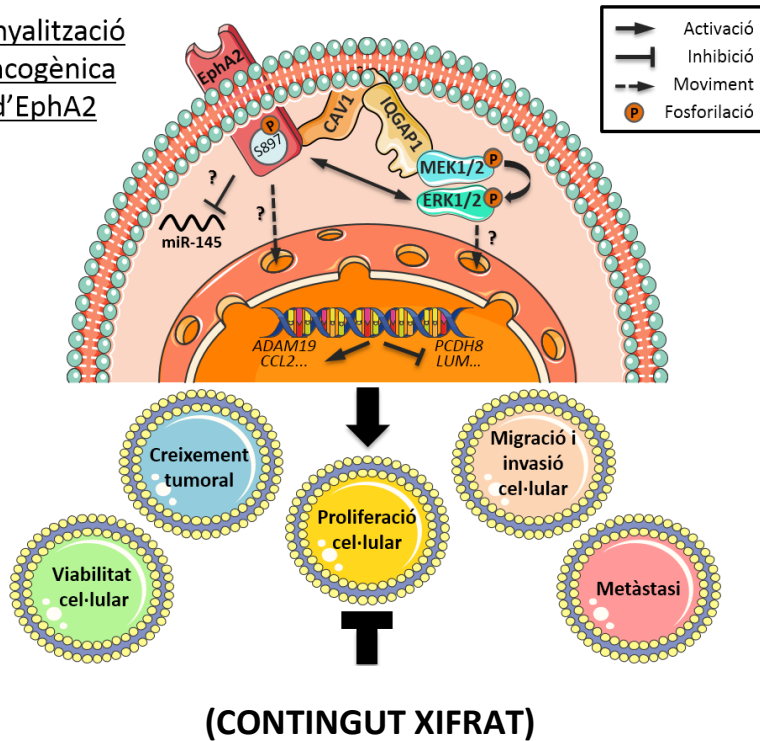
5. (CONTINGUT XIFRAT)

6. RESUM GENERAL

El conjunt de resultats d'aquest treball demostren que l'expressió d'EPHA2 en les cèl·lules tumorals és essencial per la propagació del SE, remarcant la importància de l'activitat independent de lligand d'EPHA2 en aquest procés (figura D1). De forma sorprenent, els resultats indiquen que EPHA2 presenta una retroalimentació positiva recíproca amb la proteïna ERK1/2 mitjançant un mecanisme independent de les efrines, fet que no s'havia observat amb antelació. La implicació d'ERK1/2, però no d'AKT, en aquesta retroalimentació és avantguardista i rellevant en el camp dels sarcomes. L'estudi transcripcional exhaustiu va revelar que EPHA2 activa un conjunt específic de gens que promouen el fenotip maligne. De forma consistent, el silenciament d'*EPHA2* promou un retard en l'aparició i progressió del SE, participant en múltiples processos tumorals mitjançant la funció independent de lligand. Tanmateix, l'estudi d'EPHA2 en un altre sarcoma pediàtric va reproduir el paper oncogènic del receptor i la seva regulació mitjançant la via de les MAPK.

Globalment, aquests resultats evidencien que EPHA2 i els seus efectors poden ser noves dianes a estudiar per la teràpia contra el SE, posant de manifest el potencial que pot tenir revertir la funció d'EPHA2 en teràpies antimetastàtiques. Així, els resultats suggereixen la possibilitat d'inhibir l'expressió o activitat d'EPHA2 per bloquejar el creixement i el fenotip invasiu del SE. (CONTINGUT XIFRAT)

Senyalització
oncogènica
d'EphA2



(CONTINGUT XIFRAT)

Figura D1: Senyalització d'EPHA2 en una cèl·lula de SE i efecte de la inhibició dual d'EPHA2 i *EWS-FLI1*. A la part superior es pot observar com EPHA2 es troba fosforilat en el residu S897 i actua així com a efector i substrat d'ERK1/2. CAV1 i IQGAP1 també són essencials per la fosforilació oncogènica d'EPHA2 en SE. Mitjançant mecanismes encara no desxifrats com podria ser la translocació d'ERK1/2 o del propi EPHA2 a nucli, el receptor promou un perfil de transcripció que afavoreix el fenotip maligne. (CONTINGUT XIFRAT). Aquesta imatge, realitzada amb recursos de Servier Medical Art, és una representació abstracta que només pretén remarcar els esdeveniments mencionats en aquesta tesi.

Conclusions

Dels resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral es pot concloure que:

- I. El receptor EPHA2 es troba àmpliament expressat en línies de SE.
- II. La fosforilació del residu S897 d'EPHA2 és variable entre línies de SE i determina el paper oncogènic del receptor en aquest tumor.
- III. La via de les MAPK és la responsable de la fosforilació del residu S897 d'EPHA2 en línies de SE. A més, existeix una retroalimentació positiva entre EPHA2 i ERK1/2.
- IV. La fosforilació del residu S897 d'EPHA2 també depèn de la presència de CAV1 i IQGAP1.
- V. El silenciament del receptor *EPHA2* en línies de SE reverteix el fenotip neoplàsic *in vitro* i disminueix la tumorigenicitat i capacitat metastàtica *in vivo*.
- VI. El silenciament del receptor *EPHA2* en línies de SE altera l'expressió d'un grup de gens implicats en senyalització, moviment i supervivència cel·lular. Entre d'altres, EPHA2 promou l'expressió d'*ADAM19* en cèl·lules de SE.
- VII. El silenciament d'*ADAM19* disminueix la migració de les cèl·lules de SE.
- VIII. EPHA2 i la fosforilació del residu S897 també s'expressen en un panell de línies de RMS.
- IX. El silenciament d'*EPHA2* reverteix el fenotip agressiu de les cèl·lules de RMS *in vitro*.

CONCLUSIONS

X. CONTINGUT XIFRAT

XI. CONTINGUT XIFRAT

Bibliografia

1. HaDuong, J. H., Martin, A. A., Skapek, S. X. & Mascarenhas, L. Sarcomas. *Pediatr. Clin. North Am.* **62**, 179–200 (2015).
2. Martín Liberal, J. *et al.* Targeted therapies in sarcomas: challenging the challenge. *Sarcoma* **2012**, 626094 (2012).
3. de Alava, E. Molecular pathology in sarcomas. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Spanish Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* **9**, 130–44 (2007).
4. Sangkhathat, S. Current management of pediatric soft tissue sarcomas. *World J. Clin. Pediatr.* **4**, 94–105 (2015).
5. Valery, P. C., Laversanne, M. & Bray, F. Bone cancer incidence by morphological subtype: a global assessment. *Cancer causes Control* **26**, 1127–39 (2015).
6. Taylor, B. S. *et al.* Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat. Rev. cancer* **11**, 541–57 (2011).
7. Jain, S., Xu, R., Prieto, V. G. & Lee, P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 416–28 (2010).
8. Demicco, E. G. & Lazar, A. J. Clinicopathologic considerations: how can we fine tune our approach to sarcoma? *Semin. Oncol.* **38 Suppl 3**, S3-18 (2011).
9. Ross, K. A., Smyth, N. A., Murawski, C. D. & Kennedy, J. G. The biology of ewing sarcoma. *ISRN Oncol.* **2013**, 759725 (2013).
10. Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R. B. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 425–30 (2008).
11. Kauer, M. *et al.* A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS One* **4**, e5415 (2009).
12. Ewing, J. Diffuse Endothelioma of Bone. *Proc. New York Pathol. Soc.* **450**, 17–24 (1921).
13. Codman, E. Bone Sarcoma. An Interpretation of the Nomenclature used by the Committee on the Registry of Bone Sarcoma of the American College of Surgeons. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **85**, 1662 (1925).

BIBLIOGRAFIA

14. Angervall, L. & Enzinger, F. M. Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer* **36**, 240–51 (1975).
15. Janknecht, R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* **363**, 1–14 (2005).
16. Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Dubousset, J. & Mazabraud, A. [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *Comptes rendus des seances l'Academie des Sci.* **296**, 1105–7 (1983).
17. Turc-Carel, C., Philip, I., Berger, M. P., Philip, T. & Lenoir, G. M. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet. Cytogenet.* **12**, 1–19 (1984).
18. Delattre, O. *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**, 162–5 (1992).
19. Ludwig, J. A. Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 412–8 (2008).
20. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. *Ewing Sarcoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2002).
21. Duchman, K. R., Gao, Y. & Miller, B. J. Prognostic factors for survival in patients with Ewing's sarcoma using the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program database. *Cancer Epidemiol.* **39**, 189–95 (2015).
22. Federación Española de Enfermedades Raras. Available at: <http://www.enfermedades-raras.org/index.php>. (Accessed: 8th March 2017)
23. Potratz, J., Dirksen, U., Jürgens, H. & Craft, A. Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **29**, 1–11 (2012).
24. Stiller, C. A. *et al.* Patterns of care and survival for patients aged under 40 years with bone sarcoma in Britain, 1980-1994. *Br. J. Cancer* **94**, 22–9 (2006).
25. Parkin, D. M., Stiller, C. A. & Nectoux, J. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int. J. cancer* **53**, 371–6 (1993).

26. Beck, R. *et al.* EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations. *Cancer Genet.* **205**, 304–12 (2012).
27. Phillips, R. F. & Higinbotham, N. L. The curability of Ewing's endothelioma of bone in children. *J. Pediatr.* **70**, 391–7 (1967).
28. Chaturvedi, A., Hoffman, L. M., Welm, A. L., Lessnick, S. L. & Beckerle, M. C. The EWS/FLI Oncogene Drives Changes in Cellular Morphology, Adhesion, and Migration in Ewing Sarcoma. *Genes Cancer* **3**, 102–16 (2012).
29. Karosas, A. O. Ewing's sarcoma. *Am. J. Heal. Pharm.* **67**, 1599–605 (2010).
30. Gaspar, N. *et al.* Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3036–46 (2015).
31. Patricio, M. B. *et al.* Ewing's sarcoma in children: twenty-five years of experience at the Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (I.P.O.F.G.). *J. Surg. Oncol.* **47**, 37–40 (1991).
32. Widhe, B. & Widhe, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J. Bone Joint Surg. Am.* **82**, 667–74 (2000).
33. Rutkowski, P., Kamińska, J., Kowalska, M., Ruka, W. & Steffen, J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J. Surg. Oncol.* **84**, 151–9 (2003).
34. Bacci, G. *et al.* Ewing's sarcoma family tumours. Differences in clinicopathological characteristics at presentation between localised and metastatic tumours. *J. Bone Joint Surg. Br.* **89**, 1229–33 (2007).
35. Ilić, I., Manojlović, S., Cepulić, M., Orlić, D. & Seiwert, S. Osteosarcoma and Ewing's sarcoma in children and adolescents: retrospective clinicopathological study. *Croat. Med. J.* **45**, 740–5 (2004).
36. Moore, D. D. & Haydon, R. C. Ewing's sarcoma of bone. *Cancer Treat. Res.* **162**, 93–115 (2014).
37. Shapeero, L. G. *et al.* Periosteal Ewing sarcoma. *Radiology* **191**, 825–31 (1994).

BIBLIOGRAFIA

38. Bernstein, M. *et al.* Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* **11**, 503–19 (2006).
39. Applebaum, M. A. *et al.* Clinical features and outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma. *Cancer* **117**, 3027–32 (2011).
40. Raney, R. B. *et al.* Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **15**, 574–82 (1997).
41. Monument, M. J., Bernthal, N. M. & Randall, R. L. Salient features of mesenchymal stem cells-implications for Ewing sarcoma modeling. *Front. Oncol.* **3**, 24 (2013).
42. Sand, L. G. L., Szuhai, K. & Hogendoorn, P. C. W. Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 16176–215 (2015).
43. Eid, J. E. & Garcia, C. B. Reprogramming of mesenchymal stem cells by oncogenes. *Semin. Cancer Biol.* **32**, 18–31 (2015).
44. Lipinski, M. *et al.* Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res.* **47**, 183–7 (1987).
45. Staeger, M. S. *et al.* DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res.* **64**, 8213–21 (2004).
46. Torchia, E. C., Jaishankar, S. & Baker, S. J. Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res.* **63**, 3464–8 (2003).
47. Eliazer, S., Spencer, J., Ye, D., Olson, E. & Ilaria, R. L. Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 482–92 (2003).
48. Riggi, N. *et al.* Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* **65**, 11459–68 (2005).
49. Riggi, N. *et al.* EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* **68**, 2176–85 (2008).
50. von Levetzow, C. *et al.* Modeling initiation of Ewing sarcoma in human

- neural crest cells. *PLoS One* **6**, e19305 (2011).
51. Tanaka, M. *et al.* Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J. Clin. Invest.* **124**, 3061–74 (2014).
 52. Tan, A. Y. & Manley, J. L. The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J. Mol. Cell Biol.* **1**, 82–92 (2009).
 53. Ordóñez, J. L., Osuna, D., Herrero, D., de Alava, E. & Madoz-Gúrpide, J. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res.* **69**, 7140–50 (2009).
 54. Liu, M. *et al.* Role of Ets Proteins in Development, Differentiation, and Function of T-Cell Subsets. *Med. Res. Rev.* **36**, 193–220 (2016).
 55. Lawlor, E. R. & Sorensen, P. H. Twenty Years on: What Do We Really Know about Ewing Sarcoma and What Is the Path Forward? *Crit. Rev. Oncog.* **20**, 155–71 (2015).
 56. Peter, M. *et al.* An EWS/ERG fusion with a truncated N-terminal domain of EWS in a Ewing's tumor. *Int. J. cancer* **67**, 339–42 (1996).
 57. Desmaze, C. *et al.* Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* **97**, 12–9 (1997).
 58. Ginsberg, J. P. *et al.* EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1809–14 (1999).
 59. Le Deley, M.-C. *et al.* Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 1982–8 (2010).
 60. van Doorninck, J. A. *et al.* Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1989–94 (2010).
 61. Sumegi, J. *et al.* A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Mod. Pathol.* **24**, 333–42 (2011).
 62. Graham, C., Chilton-MacNeill, S., Zielenska, M. & Somers, G. R. The

BIBLIOGRAFIA

- CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of pediatric primitive round cell sarcomas. *Hum. Pathol.* **43**, 180–9 (2012).
63. Kovar, H. *et al.* The second European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit--A joint effort to deconstructing the multiple layers of a complex disease. *Oncotarget* **7**, 8613–24 (2016).
64. Wang, W.-L. & Lazar, A. J. Undifferentiated ‘round’ cell (‘Ewing-like’) sarcoma: not always so-round nor Ewing-like. *Virchows Arch.* **470**, 371–372 (2017).
65. Riggi, N. & Stamenkovic, I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett.* **254**, 1–10 (2007).
66. Kovar, H. Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 1315–28 (2014).
67. Sankar, S. & Lessnick, S. L. Promiscuous partnerships in Ewing’s sarcoma. *Cancer Genet.* **204**, 351–65 (2011).
68. Guillon, N. *et al.* The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* **4**, e4932 (2009).
69. Gangwal, K. *et al.* Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing’s sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10149–54 (2008).
70. Riggi, N. *et al.* EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* **26**, 668–81 (2014).
71. Tomazou, E. M. *et al.* Epigenome mapping reveals distinct modes of gene regulation and widespread enhancer reprogramming by the oncogenic fusion protein EWS-FLI1. *Cell Rep.* **10**, 1082–95 (2015).
72. Richter, G. H. S. *et al.* EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5324–9 (2009).
73. Douglas, D. *et al.* BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer Res.* **68**, 6507–15 (2008).
74. Smith, R. *et al.* Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing’s sarcoma. *Cancer Cell* **9**, 405–16 (2006).

75. Owen, L. A., Kowalewski, A. A. & Lessnick, S. L. EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One* **3**, e1965 (2008).
76. Bennani-Baiti, I. M., Machado, I., Llombart-Bosch, A. & Kovar, H. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Hum. Pathol.* **43**, 1300–7 (2012).
77. Sankar, S. *et al.* Reversible LSD1 Inhibition Interferes with Global EWS/ETS Transcriptional Activity and Impedes Ewing Sarcoma Tumor Growth. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4584–4597 (2014).
78. Patel, M. *et al.* Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription. *Genome Res.* **22**, 259–70 (2012).
79. Huertas-Martínez, J. *et al.* DNA methylation profiling identifies PTRF/Cavin-1 as a novel tumor suppressor in Ewing sarcoma when co-expressed with caveolin-1. *Cancer Lett.* **386**, 196–207 (2017).
80. Sheffield, N. C. *et al.* DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat. Med.* **23**, 386–395 (2017).
81. Hancock, J. D. & Lessnick, S. L. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell cycle* **7**, 250–6 (2008).
82. Kinsey, M., Smith, R. & Lessnick, S. L. NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol. cancer Res. MCR* **4**, 851–9 (2006).
83. Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P. & Delattre, O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7275–83 (2004).
84. Toomey, E. C., Schiffman, J. D. & Lessnick, S. L. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene* **29**, 4504–16 (2010).
85. van Maldegem, A. M., Bovée, J. V. M. G., Peterse, E. F. P., Hogendoorn, P. C. W. & Gelderblom, H. Ewing sarcoma: The clinical relevance of the insulin-like growth factor 1 and the poly-ADP-ribose-polymerase pathway. *Eur. J. Cancer* **53**, 171–80 (2016).

BIBLIOGRAFIA

86. Toretsky, J. A., Kalebic, T., Blakesley, V., LeRoith, D. & Helman, L. J. The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 30822–7 (1997).
87. Hameed, M. Small round cell tumors of bone. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **131**, 192–204 (2007).
88. Lin, P. P. *et al.* Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **59**, 1428–32 (1999).
89. Lessnick, S. L., Dacwag, C. S. & Golub, T. R. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* **1**, 393–401 (2002).
90. Luo, W. *et al.* Antibody detection of translocations in Ewing sarcoma. *EMBO Mol. Med.* **4**, 453–61 (2012).
91. Watson, I. R., Takahashi, K., Futreal, P. A. & Chin, L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 703–18 (2013).
92. Kovar, H. *et al.* Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* **15**, 2225–32 (1997).
93. Huang, H.-Y. *et al.* Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J. Clin. Oncol.* **23**, 548–58 (2005).
94. Wei, G. *et al.* Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* **89**, 793–9 (2000).
95. Sanchez, G. *et al.* Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6004–9 (2008).
96. Zhang, J., Hu, S., Schofield, D. E., Sorensen, P. H. B. & Triche, T. J. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* **64**, 6026–34 (2004).
97. de Alava, E. *et al.* Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* **89**, 783–92 (2000).
98. Hainaut, P. & Pfeifer, G. P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026179 (2016).

99. Muller, P. A. J. & Vousden, K. H. p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* **15**, 2–8 (2013).
100. Mackintosh, C. *et al.* 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* **31**, 1287–98 (2012).
101. Ozaki, T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. *J. Orthop. Sci.* **20**, 250–63 (2015).
102. Galyfos, G. *et al.* Extraosseous Ewing Sarcoma: Diagnosis, Prognosis and Optimal Management. *Indian J. Surg.* **78**, 49–53 (2016).
103. Kaste, S. C. Imaging pediatric bone sarcomas. *Radiol. Clin. North Am.* **49**, 749–65, vi–vii (2011).
104. Rocchi, A. *et al.* CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 668–80 (2010).
105. Manara, M. C. *et al.* CD99 triggering induces methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-1R/RAS/Rac1 signaling. *Oncotarget* **7**, 79925–79942 (2016).
106. Ventura, S. *et al.* CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF- κ B signaling. *Oncogene* **35**, 3944–54 (2016).
107. Parafioriti, A. *et al.* Ewing's Sarcoma: An Analysis of miRNA Expression Profiles and Target Genes in Paraffin-Embedded Primary Tumor Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
108. Lewis, T. B., Coffin, C. M. & Bernard, P. S. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mod. Pathol.* **20**, 397–404 (2007).
109. Miller, I. V. *et al.* First identification of Ewing's sarcoma-derived extracellular vesicles and exploration of their biological and potential diagnostic implications. *Biol. cell* **105**, 289–303 (2013).
110. Krumbholz, M. *et al.* Genomic EWSR1 Fusion Sequence as Highly Sensitive and Dynamic Plasma Tumor Marker in Ewing Sarcoma. *Clin. cancer Res.* **22**, 4356–65 (2016).

BIBLIOGRAFIA

111. Jürgens, H. & Dirksen, U. Ewing sarcoma treatment. *Eur. J. Cancer* **47 Suppl 3**, S366-7 (2011).
112. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/>. (Accessed: 19th March 2017)
113. Amaral, A. T. *et al.* Innovative therapies in Ewing Sarcoma. *Adv. Anat. Pathol.* **21**, 44–62 (2014).
114. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **25 Suppl 3**, iii113-23 (2014).
115. Seo, J. *et al.* High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of children and adolescents with Ewing sarcoma family of tumors. *Korean J. Pediatr.* **56**, 401–6 (2013).
116. Grohar, P. J. & Helman, L. J. Prospects and challenges for the development of new therapies for Ewing sarcoma. *Pharmacol. Ther.* **137**, 216–24 (2013).
117. Casey, D. A. *et al.* Irinotecan and temozolomide for Ewing sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Pediatr. Blood Cancer* **53**, 1029–34 (2009).
118. Brenner, J. C. *et al.* PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **72**, 1608–13 (2012).
119. Ordóñez, J. L. *et al.* The PARP inhibitor olaparib enhances the sensitivity of Ewing sarcoma to trabectedin. *Oncotarget* **6**, 18875–90 (2015).
120. Wagner, L. M. *et al.* Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* **62**, 440–4 (2015).
121. Malempati, S. *et al.* Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **30**, 256–62 (2012).
122. Lawlor, E. R. & Thiele, C. J. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2768–79 (2012).
123. Witt, O. *et al.* Phase I/II intra-patient dose escalation study of vorinostat

- in children with relapsed solid tumor, lymphoma or leukemia. *Klin. Padiatr.* **224**, 398–403 (2012).
124. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E. & Triche, T. J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **65**, 8984–92 (2005).
 125. Potratz, J., Jürgens, H., Craft, A. & Dirksen, U. Ewing sarcoma: biology-based therapeutic perspectives. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **29**, 12–27 (2012).
 126. Bertrand, J.-R. *et al.* Plasma hydrogenated cationic detonation nanodiamonds efficiently deliver to human cells in culture functional siRNA targeting the Ewing sarcoma junction oncogene. *Biomaterials* **45**, 93–8 (2015).
 127. Tirado, O. M. *et al.* Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* **66**, 9937–47 (2006).
 128. Sáinz-Jaspeado, M. *et al.* Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget* **2**, 305–12 (2011).
 129. Sáinz-Jaspeado, M. *et al.* Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol. cancer Res.* **8**, 1489–500 (2010).
 130. Sáinz-Jaspeado, M. *et al.* EPHA2-induced angiogenesis in ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent on caveolin-1. *PLoS One* **8**, e71449 (2013).
 131. Schlessinger, J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a008912–a008912 (2014).
 132. Volinsky, N. & Kholodenko, B. N. Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a009043 (2013).
 133. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–34 (2010).
 134. Chen, M.-K. & Hung, M.-C. Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases. *FEBS J.* **282**, 3693–721 (2015).
 135. Tan, A.-C., Vyse, S. & Huang, P. H. Exploiting receptor tyrosine kinase co-activation for cancer therapy. *Drug Discov. Today* **22**, 72–84 (2017).

BIBLIOGRAFIA

136. Salvi, M. Receptor tyrosine kinases take a direct route to mitochondria: an overview. *Curr. Protein Pept. Sci.* **14**, 635–40 (2013).
137. Carpenter, G. & Liao, H.-J. Receptor tyrosine kinases in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008979 (2013).
138. Sadowski, L., Pilecka, I. & Miaczynska, M. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp. Cell Res.* **315**, 1601–9 (2009).
139. Bossing, T. & Brand, A. H. Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* **129**, 4205–18 (2002).
140. Tischer, S., Reineck, M., Söding, J., Münder, S. & Böttger, A. Eph receptors and ephrin class B ligands are expressed at tissue boundaries in *Hydra vulgaris*. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 759–65 (2013).
141. Chin-Sang, I. D. *et al.* The divergent *C. elegans* ephrin EFN-4 functions in embryonic morphogenesis in a pathway independent of the VAB-1 Eph receptor. *Development* **129**, 5499–510 (2002).
142. Aveic, S. & Tonini, G. P. Resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors in solid tumors: can we improve the cancer fighting strategy by blocking autophagy? *Cancer Cell Int.* **16**, 62 (2016).
143. Taylor, H., Campbell, J. & Nobes, C. D. Ephs and ephrins. *Curr. Biol.* **27**, R90–R95 (2017).
144. Gale, N. W. *et al.* Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* **17**, 9–19 (1996).
145. Dai, D., Huang, Q., Nussinov, R. & Ma, B. Promiscuous and specific recognition among ephrins and Eph receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 1729–40 (2014).
146. Qin, H. *et al.* Structural characterization of the EphA4-Ephrin-B2 complex reveals new features enabling Eph-ephrin binding promiscuity. *J. Biol. Chem.* **285**, 644–54 (2010).
147. Park, J. E., Son, A. I. & Zhou, R. Roles of EPHA2 in Development and Disease. *Genes (Basel)*. **4**, 334–57 (2013).
148. Jørgensen, C. *et al.* Cell-specific information processing in segregating populations of Eph receptor ephrin-expressing cells. *Science (80-.)*. **326**,

- 1502–9 (2009).
149. Barquilla, A. & Pasquale, E. B. Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 465–87 (2015).
 150. Batlle, E. *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* **111**, 251–63 (2002).
 151. Batlle, E. & Wilkinson, D. G. Molecular mechanisms of cell segregation and boundary formation in development and tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008227 (2012).
 152. Kao, T.-J. & Kania, A. Ephrin-mediated cis-attenuation of Eph receptor signaling is essential for spinal motor axon guidance. *Neuron* **71**, 76–91 (2011).
 153. Kania, A. & Klein, R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 240–56 (2016).
 154. Ashton, R. S. *et al.* Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nat. Neurosci.* **15**, 1399–406 (2012).
 155. Khodosevich, K., Watanabe, Y. & Monyer, H. EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J. Cell Sci.* **124**, 1268–79 (2011).
 156. Hruska, M. & Dalva, M. B. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* **50**, 35–44 (2012).
 157. Astin, J. W. *et al.* Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1194–204 (2010).
 158. Nunan, R. *et al.* Ephrin-Bs Drive Junctional Downregulation and Actin Stress Fiber Disassembly to Enable Wound Re-epithelialization. *Cell Rep.* **13**, 1380–95 (2015).
 159. Li, J.-J. *et al.* EphB3 Stimulates Cell Migration and Metastasis in a Kinase-dependent Manner through Vav2-Rho GTPase Axis in Papillary Thyroid Cancer. *J. Biol. Chem.* **292**, 11112–11121 (2017).
 160. Takeuchi, S., Katoh, H. & Negishi, M. Eph/ephrin reverse signalling induces axonal retraction through RhoA/ROCK pathway. *J. Biochem.* **158**,

BIBLIOGRAFIA

- 245–52 (2015).
161. Murai, K. K. & Pasquale, E. B. ‘Eph’ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* **116**, 2823–32 (2003).
 162. Lin, K.-T., Sloniewski, S., Ethell, D. W. & Ethell, I. M. Ephrin-B2-induced cleavage of EphB2 receptor is mediated by matrix metalloproteinases to trigger cell repulsion. *J. Biol. Chem.* **283**, 28969–79 (2008).
 163. Zhuang, G., Hunter, S., Hwang, Y. & Chen, J. Regulation of EPHA2 receptor endocytosis by SHIP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Rac1 activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 2683–94 (2007).
 164. Falivelli, G. *et al.* Attenuation of eph receptor kinase activation in cancer cells by coexpressed ephrin ligands. *PLoS One* **8**, e81445 (2013).
 165. Alford, S. *et al.* Soluble ephrin a1 is necessary for the growth of HeLa and SK-BR3 cells. *Cancer Cell Int.* **10**, 41 (2010).
 166. Wykosky, J. *et al.* Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EPHA2 receptor. *Oncogene* **27**, 7260–73 (2008).
 167. Gong, J., Körner, R., Gaitanos, L. & Klein, R. Exosomes mediate cell contact-independent ephrin-Eph signaling during axon guidance. *J. Cell Biol.* **214**, 35–44 (2016).
 168. Dines, M. & Lamprecht, R. The Role of Ephs and Ephrins in Memory Formation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, pyv106 (2016).
 169. Efazat, G. *et al.* Ephrin B3 interacts with multiple EphA receptors and drives migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 60332–60347 (2016).
 170. Larsen, A. B., Stockhausen, M.-T. & Poulsen, H. S. Cell adhesion and EGFR activation regulate EPHA2 expression in cancer. *Cell. Signal.* **22**, 636–44 (2010).
 171. Husa, A.-M., Magić, Ž., Larsson, M., Fornander, T. & Pérez-Tenorio, G. EPH/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer. *Oncotarget* **7**, 21362–80 (2016).
 172. Youngblood, V. M. *et al.* The Ephrin-A1/EPHA2 Signaling Axis

- Regulates Glutamine Metabolism in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* **76**, 1825–36 (2016).
173. Boyd, A. W., Bartlett, P. F. & Lackmann, M. Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 39–62 (2014).
174. Harrison, C. Patents related to EPH receptors and ligands. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 13 (2014).
175. Drucker, A. *et al.* Ephrin b2 receptor and microsatellite status in lymph node-positive colon cancer survival. *Transl. Oncol.* **6**, 520–7 (2013).
176. Jäggle, S. *et al.* Silencing of the EPHB3 tumor-suppressor gene in human colorectal cancer through decommissioning of a transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4886–91 (2014).
177. Djokovic, D. *et al.* Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC Cancer* **10**, 641 (2010).
178. Hasegawa, J. *et al.* Novel anti-EPHA2 antibody, DS-8895a for cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.* **17**, 1158–1167 (2016).
179. Abéngozar, M. A. *et al.* Blocking ephrinB2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth. *Blood* **119**, 4565–76 (2012).
180. Pasquale, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 165–80 (2010).
181. Noberini, R., Lamberto, I. & Pasquale, E. B. Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 51–7 (2012).
182. Huang, J. *et al.* Cross-talk between EPHA2 and BRAf/CRaf is a key determinant of response to Dasatinib. *Clin. cancer Res.* **20**, 1846–55 (2014).
183. Kung, A. *et al.* Development of Specific, Irreversible Inhibitors for a Receptor Tyrosine Kinase EphB3. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 10554–60 (2016).
184. Martiny-Baron, G. *et al.* The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis. *Angiogenesis* **13**, 259–67 (2010).

BIBLIOGRAFIA

185. Spannuth, W. A. *et al.* Converging evidence for efficacy from parallel EphB4-targeted approaches in ovarian carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2377–88 (2010).
186. Lindberg, R. A. & Hunter, T. cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6316–24 (1990).
187. Holzman, L. B., Marks, R. M. & Dixit, V. M. A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5830–8 (1990).
188. Bartley, T. D. *et al.* B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* **368**, 558–60 (1994).
189. Tandon, M., Vemula, S. V. & Mittal, S. K. Emerging strategies for EPHA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 31–51 (2011).
190. Xu, Q. *et al.* Identifying three-dimensional structures of autophosphorylation complexes in crystals of protein kinases. *Sci. Signal.* **8**, rs13 (2015).
191. Singh, D. R. *et al.* The SAM domain inhibits EPHA2 interactions in the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 31–38 (2017).
192. Borthakur, S., Lee, H., Kim, S., Wang, B.-C. & Buck, M. Binding and function of phosphotyrosines of the Ephrin A2 (EPHA2) receptor using synthetic sterile α motif (SAM) domains. *J. Biol. Chem.* **289**, 19694–703 (2014).
193. Lennon, F. E. *et al.* Transactivation of the receptor-tyrosine kinase ephrin receptor A2 is required for the low molecular weight hyaluronan-mediated angiogenesis that is implicated in tumor progression. *J. Biol. Chem.* **289**, 24043–58 (2014).
194. Beauchamp, A. & Debinski, W. Ephs and ephrins in cancer: ephrin-A1 signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 109–15 (2012).
195. Dohn, M., Jiang, J. & Chen, X. Receptor tyrosine kinase EPHA2 is regulated by p53-family proteins and induces apoptosis. *Oncogene* **20**, 6503–15 (2001).
196. Lion, M. *et al.* Interaction between p53 and estradiol pathways in transcriptional responses to chemotherapeutics. *Cell Cycle* **12**, 1211–24

- (2013).
197. Foveau, B. *et al.* The receptor tyrosine kinase EPHA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *J. Biol. Chem.* **287**, 5366–78 (2012).
198. Chen, X. *et al.* miR-141 is a key regulator of renal cell carcinoma proliferation and metastasis by controlling EPHA2 expression. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2617–30 (2014).
199. Tsouko, E., Wang, J., Frigo, D. E., Aydoğdu, E. & Williams, C. miR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the EPHA2 oncogene. *Carcinogenesis* **36**, 1051–60 (2015).
200. Walker-Daniels, J., Hess, A. R., Hendrix, M. J. C. & Kinch, M. S. Differential regulation of EPHA2 in normal and malignant cells. *Am. J. Pathol.* **162**, 1037–42 (2003).
201. Kim, J. *et al.* The SAM domains of Anks family proteins are critically involved in modulating the degradation of EphA receptors. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1582–92 (2010).
202. Annamalai, B., Liu, X., Gopal, U. & Isaacs, J. S. Hsp90 is an essential regulator of EPHA2 receptor stability and signaling: implications for cancer cell migration and metastasis. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1021–32 (2009).
203. Dave, A. *et al.* EPHA2 MUTATIONS CONTRIBUTE TO CONGENITAL CATARACT THROUGH DIVERSE MECHANISMS. *Mol. Vis.* **22**, 18–30 (2016).
204. Cheng, C., Ansari, M. M., Cooper, J. A. & Gong, X. EPHA2 and Src regulate equatorial cell morphogenesis during lens development. *Development* **140**, 4237–45 (2013).
205. Miao, H. *et al.* EphA kinase activation regulates HGF-induced epithelial branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* **162**, 1281–92 (2003).
206. Ganju, P., Shigemoto, K., Brennan, J., Entwistle, A. & Reith, A. D. The Eck receptor tyrosine kinase is implicated in pattern formation during gastrulation, hindbrain segmentation and limb development. *Oncogene* **9**, 1613–24 (1994).
207. Dave, A. *et al.* Mutations in the EPHA2 gene are a major contributor to inherited cataracts in South-Eastern Australia. *PLoS One* **8**, e72518 (2013).

BIBLIOGRAFIA

208. Coulthard, M. G. *et al.* The role of the Eph-ephrin signalling system in the regulation of developmental patterning. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 375–84 (2002).
209. Hafner, C., Becker, B., Landthaler, M. & Vogt, T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer. *Mod. Pathol.* **19**, 1369–77 (2006).
210. Hafner, C. *et al.* Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin. Chem.* **50**, 490–9 (2004).
211. Wykosky, J. & Debinski, W. The EPHA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol. cancer Res.* **6**, 1795–806 (2008).
212. Miao, H. *et al.* EPHA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* **16**, 9–20 (2009).
213. Harada, K., Negishi, M. & Katoh, H. HGF-induced serine 897 phosphorylation of EPHA2 regulates epithelial morphogenesis of MDCK cells in 3D culture. *J. Cell Sci.* **128**, 1912–21 (2015).
214. Zhou, Y. *et al.* Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EPHA2. *Nat. Commun.* **6**, 7679 (2015).
215. Hamaoka, Y., Negishi, M. & Katoh, H. EPHA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation. *Cell. Signal.* **28**, 937–45 (2016).
216. Taddei, M. L. *et al.* Kinase-dependent and -independent roles of EPHA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am. J. Pathol.* **174**, 1492–503 (2009).
217. Chen, P., Huang, Y., Zhang, B., Wang, Q. & Bai, P. EPHA2 enhances the proliferation and invasion ability of LNCaP prostate cancer cells. *Oncol. Lett.* **8**, 41–46 (2014).
218. Shen, H. *et al.* Enhancing chemotherapy response with sustained EPHA2 silencing using multistage vector delivery. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1806–15 (2013).
219. Nishimura, M. *et al.* Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment. *Cancer Discov.* **3**, 1302–15 (2013).

220. Paraiso, K. H. T. *et al.* Ligand-independent EPHA2 signaling drives the adoption of a targeted therapy-mediated metastatic melanoma phenotype. *Cancer Discov.* **5**, 264–73 (2015).
221. Miao, B. *et al.* EPHA2 is a mediator of vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma. *Cancer Discov.* **5**, 274–87 (2015).
222. Wiedemann, E. *et al.* Regulation of endothelial migration and proliferation by ephrin-A1. *Cell. Signal.* **29**, 84–95 (2017).
223. Zhou, N. *et al.* Inactivation of EPHA2 promotes tight junction formation and impairs angiogenesis in brain endothelial cells. *Microvasc. Res.* **82**, 113–21 (2011).
224. Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E. & Wang, B. Activation of EPHA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2**, 62–9 (2000).
225. Buricchi, F. *et al.* Redox regulation of ephrin/integrin cross-talk. *Cell Adh. Migr.* **1**, 33–42 (2007).
226. Petty, A. *et al.* A small molecule agonist of EPHA2 receptor tyrosine kinase inhibits tumor cell migration in vitro and prostate cancer metastasis in vivo. *PLoS One* **7**, e42120 (2012).
227. Iida, H. *et al.* Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of α -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut* **54**, 843–51 (2005).
228. Posthumadeboer, J. *et al.* Surface proteomic analysis of osteosarcoma identifies EPHA2 as receptor for targeted drug delivery. *Br. J. Cancer* **109**, 2142–54 (2013).
229. Fritsche-Guenther, R. *et al.* De novo expression of EPHA2 in osteosarcoma modulates activation of the mitogenic signalling pathway. *Histopathology* **57**, 836–50 (2010).
230. Chen, L., He, Y., Sun, S., Sun, B. & Tang, X. Vasculogenic mimicry is a major feature and novel predictor of poor prognosis in patients with orbital rhabdomyosarcoma. *Oncol. Lett.* **10**, 1635–1641 (2015).
231. Nordberg, J. *et al.* Systemic analysis of gene expression profiles identifies ErbB3 as a potential drug target in pediatric alveolar rhabdomyosarcoma. *PLoS One* **7**, e50819 (2012).

BIBLIOGRAFIA

232. Bruckheimer, E. M. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity effector-enhanced EPHA2 agonist monoclonal antibody demonstrates potent activity against human tumors. *Neoplasia* **11**, 509–17, 2 p following 517 (2009).
233. Merritt, W. M. *et al.* Clinical and biological impact of EPHA2 overexpression and angiogenesis in endometrial cancer. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 1306–14 (2010).
234. Gökmen-Polar, Y. *et al.* Dual targeting of EPHA2 and ER restores tamoxifen sensitivity in ER/EPHA2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **127**, 375–84 (2011).
235. Chang, Q., Jorgensen, C., Pawson, T. & Hedley, D. W. Effects of dasatinib on EPHA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 1074–82 (2008).
236. Huang, F. *et al.* Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res.* **67**, 2226–38 (2007).
237. Zhou, Z. *et al.* RNA interference targeting EPHA2 inhibits proliferation, induces apoptosis, and cooperates with cytotoxic drugs in human glioma cells. *Surg. Neurol.* **70**, 562-8-9 (2008).
238. Mangala, L. S., Han, H. D., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. Liposomal siRNA for ovarian cancer. *Methods Mol. Biol.* **555**, 29–42 (2009).
239. Yuan, W. *et al.* Silencing of EPHA2 inhibits invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells in vitro and in vivo. *Neoplasia* **59**, 105–13 (2012).
240. Home - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. (Accessed: 19th March 2017)
241. Giard, D. J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417–23 (1973).
242. Martínez-Ramírez, A. *et al.* Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet. Cytogenet.* **141**, 138–42 (2003).
243. Beverly, T. A. *Human Cell Culture*. **1**, (Springer Netherlands, 1999).

244. Smith, M. A. *et al.* SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr. Blood Cancer* **50**, 703–6 (2008).
245. Dauphinot, L. *et al.* Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* **20**, 3258–65 (2001).
246. Stea, B., Cavazzana, A. & Kinsella, T. J. Small-cell osteosarcoma: correlation of in vitro and clinical radiation response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**, 1233–8 (1988).
247. Noguera, R., Navarro, S. & Triche, T. J. Translocation (11;22) in small cell osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **45**, 121–4 (1990).
248. Ottaviano, L. *et al.* Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes. Chromosomes Cancer* **49**, 40–51 (2010).
249. Huang, H. J. *et al.* R1507, an anti-insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) antibody, and EWS/FLI-1 siRNA in Ewing's sarcoma: convergence at the IGF/IGFR/Akt axis. *PLoS One* **6**, e26060 (2011).
250. Hinson, A. R. P. *et al.* Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front. Oncol.* **3**, 183 (2013).
251. Smyth, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, 1–25 (2004).
252. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing Author (s): Yoav Benjamini and Yosef Hochberg Source : Journal of the Royal Statistical Society . Series B (Methodological), Vol . 57 , No . 1. *J R Stat. Soc B* **57**, 289–300 (1995).
253. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15545–50 (2005).
254. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–73 (2003).
255. Bengtsson, H., Simpson, K., Bullard, J. & Hansen, K. aroma.affymetrix:

BIBLIOGRAFIA

- A generic framework in R for analyzing small to very large Affymetrix data sets in bounded memory. *Methods Tech Repor*, 1–9 (2008).
256. Huber, W. *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* **12**, 115–21 (2015).
257. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
258. White, C. D., Brown, M. D. & Sacks, D. B. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett.* **583**, 1817–24 (2009).
259. Diao, B. *et al.* IQGAP1-siRNA inhibits proliferation and metastasis of U251 and U373 glioma cell lines. *Mol. Med. Rep.* **15**, 2074–2082 (2017).
260. Choi, S. & Anderson, R. A. IQGAP1 is a phosphoinositide effector and kinase scaffold. *Adv. Biol. Regul.* **60**, 29–35 (2016).
261. Lagares-Tena, L. *et al.* Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway. *Oncotarget* **7**, 56889–56903 (2016).
262. Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* **14**, 306–21 (2014).
263. Goldstein, S. D., Hayashi, M., Albert, C. M., Jackson, K. W. & Loeb, D. M. An orthotopic xenograft model with survival hindlimb amputation allows investigation of the effect of tumor microenvironment on sarcoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **32**, 703–15 (2015).
264. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. Available at: <http://www.genecards.org/>. (Accessed: 9th February 2016)
265. Yu, J. S. *et al.* PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene* **27**, 4657–65 (2008).
266. Zhang, C. *et al.* PCDH8 is Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Liver Cancer: Diagnostic and Clinical Significance. *J. Cancer* **7**, 446–52 (2016).
267. Stasiak, M. *et al.* Lumican Inhibits SNAIL-Induced Melanoma Cell Migration Specifically by Blocking MMP-14 Activity. *PLoS One* **11**, e0150226 (2016).

268. Karamanou, K. *et al.* Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **7**, 45138 (2017).
269. Sun, Z. *et al.* MiR-145 suppressed human retinoblastoma cell proliferation and invasion by targeting ADAM19. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 14521–7 (2015).
270. Shan, N., Shen, L., Wang, J., He, D. & Duan, C. MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 385–91 (2015).
271. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (80-.)*. **235**, 177–82 (1987).
272. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–92 (2001).
273. Loibl, S. & Gianni, L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* (2016). doi:10.1016/S0140-6736(16)32417-5
274. NOWELL, P. C. & HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**, 85–109 (1960).
275. Malagola, M., Papayannidis, C. & Baccarani, M. Tyrosine kinase inhibitors in Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia: facts and perspectives. *Ann. Hematol.* **95**, 681–93 (2016).
276. Serrano, C. *et al.* Novel Insights into the Treatment of Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors. *Target. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s11523-017-0490-9
277. Demetri, G. D. *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* **347**, 472–80 (2002).
278. Liu, C. *et al.* A qRT-PCR and Gene Functional Enrichment Study Focused on Downregulation of miR-141-3p in Hepatocellular Carcinoma and Its Clinicopathological Significance. *Technol. Cancer Res. Treat.* 1533034617705056 (2017). doi:10.1177/1533034617705056
279. Li, P. *et al.* Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is

BIBLIOGRAFIA

- associated with cell migration and invasion: involvement of ANP32E targeting. *Cancer Med.* **6**, 662–672 (2017).
280. Li, R., Yuan, W., Mei, W., Yang, K. & Chen, Z. MicroRNA 520d-3p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by downregulating EPHA2 expression. *Mol. Cell. Biochem.* **396**, 295–305 (2014).
281. Walker-Daniels, J., Riese, D. J. & Kinch, M. S. c-Cbl-dependent EPHA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol. Cancer Res.* **1**, 79–87 (2002).
282. Dunne, P. D. *et al.* EPHA2 Expression Is a Key Driver of Migration and Invasion and a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin. cancer Res.* **22**, 230–42 (2016).
283. Brannan, J. M. *et al.* Expression of the receptor tyrosine kinase EPHA2 is increased in smokers and predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4423–30 (2009).
284. Chandhanayingyong, C., Kim, Y., Staples, J. R., Hahn, C. & Lee, F. Y. MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. *Sarcoma* **2012**, 1–8 (2012).
285. Pratt, R. L. & Kinch, M. S. Ligand binding up-regulates EPHA2 messenger RNA through the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol. cancer Res.* **1**, 1070–6 (2003).
286. Martins, A. S. *et al.* A Pivotal Role for Heat Shock Protein 90 in Ewing Sarcoma Resistance to Anti-Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Treatment: In vitro and In vivo Study. *Cancer Res.* **68**, 6260–6270 (2008).
287. Ambati, S. R. *et al.* Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma. *Mol. Oncol.* **8**, 323–336 (2014).
288. Zenali, M. J., Zhang, P. L., Bendel, A. E. & Brown, R. E. Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in Ewing family of tumors. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **39**, 160–6 (2009).
289. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–54 (2002).

290. Wortzel, I. & Seger, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* **2**, 195–209 (2011).
291. Galli, S. *et al.* A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS One* **4**, e7541 (2009).
292. Torii, S., Kusakabe, M., Yamamoto, T., Maekawa, M. & Nishida, E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev. Cell* **7**, 33–44 (2004).
293. Ahmed, S. *et al.* Data-driven modeling reconciles kinetics of ERK phosphorylation, localization, and activity states. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 718 (2014).
294. Watanabe, T., Wang, S. & Kaibuchi, K. IQGAPs as Key Regulators of Actin-cytoskeleton Dynamics. *Cell Struct. Funct.* **40**, 69–77 (2015).
295. Ren, J.-G., Li, Z. & Sacks, D. B. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10465–9 (2007).
296. Gonzalez, F. A., Raden, D. L. & Davis, R. J. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J. Biol. Chem.* **266**, 22159–63 (1991).
297. Pratt, R. L. & Kinch, M. S. Activation of the EPHA2 tyrosine kinase stimulates the MAP/ERK kinase signaling cascade. *Oncogene* **21**, 7690–9 (2002).
298. Miura, K. *et al.* Involvement of EPHA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene* **32**, 5292–301 (2013).
299. Taddei, M. L. *et al.* EPHA2 induces metastatic growth regulating amoeboid motility and clonogenic potential in prostate carcinoma cells. *Mol. cancer Res.* **9**, 149–60 (2011).
300. Krook, M. A. *et al.* Stress-Induced CXCR4 Promotes Migration and Invasion of Ewing Sarcoma. *Mol. Cancer Res.* **12**, 953–964 (2014).
301. Li, Y.-J., Dai, Y.-L., Zhang, W.-B., Li, S.-J. & Tu, C.-Q. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* **17**, 59–69 (2017).
302. Tawadros, T., Brown, M. D., Hart, C. A. & Clarke, N. W. Ligand-

BIBLIOGRAFIA

- independent activation of EPHA2 by arachidonic acid induces metastasis-like behaviour in prostate cancer cells. *Br. J. Cancer* **107**, 1737–44 (2012).
303. Trinidad, E. M., Zapata, A. G. & Alonso-Colmenar, L. M. Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh. Migr.* **4**, 363–7 (2010).
304. Locard-Paulet, M. *et al.* Phosphoproteomic analysis of interacting tumor and endothelial cells identifies regulatory mechanisms of transendothelial migration. *Sci. Signal.* **9**, ra15-ra15 (2016).
305. Huang, J. *et al.* EPHA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer cells. *Oncogene* **33**, 2737–47 (2014).
306. Sottnik, J. L., Duval, D. L., Ehrhart, E. J. & Thamm, D. H. An orthotopic, postsurgical model of luciferase transfected murine osteosarcoma with spontaneous metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **27**, 151–60 (2010).
307. Aanstoos, M. E., Regan, D. P., Rose, R. J., Chubb, L. S. & Ehrhart, N. P. Do Mesenchymal Stromal Cells Influence Microscopic Residual or Metastatic Osteosarcoma in a Murine Model? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **474**, 707–15 (2016).
308. Amato, K. R. *et al.* EPHA2 Blockade Overcomes Acquired Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Res.* **76**, 305–18 (2016).
309. Koch, H., Busto, M. E. D. C., Kramer, K., Médard, G. & Kuster, B. Chemical Proteomics Uncovers EPHA2 as a Mechanism of Acquired Resistance to Small Molecule EGFR Kinase Inhibition. *J. Proteome Res.* **14**, 2617–25 (2015).
310. Applebaum, M. A. *et al.* Comparative evaluation of strategies for quantifying signaling pathway proteins in Ewing sarcoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **22**, 593–9 (2014).
311. Chernoguz, A. *et al.* EGFR inhibition fails to suppress vascular proliferation and tumor growth in a Ewing's sarcoma model. *J. Surg. Res.* **173**, 1–9 (2012).
312. Andersson, M. K. & Aman, P. Proliferation of Ewing sarcoma cell lines is suppressed by the receptor tyrosine kinase inhibitors gefitinib and vandetanib. *Cancer Cell Int.* **8**, 1 (2008).

313. Brantley-Sieders, D. M. *et al.* The receptor tyrosine kinase EPHA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J. Clin. Invest.* **118**, 64–78 (2008).
314. Ye, D. *et al.* The epidermal growth factor receptor HER2 is not a major therapeutic target in Ewing sarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **25**, 459–66 (2003).
315. Scotlandi, K. *et al.* Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Eur. J. Cancer* **41**, 1349–1361 (2005).
316. Kang, H.-G. *et al.* E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res.* **67**, 3094–105 (2007).
317. Mendoza-Naranjo, A. *et al.* ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1087–102 (2013).
318. Nugent, A. A., Kolpak, A. L. & Engle, E. C. Human disorders of axon guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 837–43 (2012).
319. Pasquale, E. B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133**, 38–52 (2008).
320. Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C. & Chédotal, A. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat. Rev. cancer* **11**, 188–97 (2011).
321. Short, C. A., Suarez-Zayas, E. A. & Gomez, T. M. Cell adhesion and invasion mechanisms that guide developing axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **39**, 77–85 (2016).
322. Morris, M. R. *et al.* Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene* **30**, 1390–401 (2011).
323. Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K. & Tzanakakis, G. N. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* **60**, 818–23 (2008).
324. Borsig, L., Wolf, M. J., Roblek, M., Lorentzen, A. & Heikenwalder, M. Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* **33**, 3217–24 (2014).

BIBLIOGRAFIA

325. Craig, M. J. & Loberg, R. D. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 611–9 (2006).
326. Qian, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–5 (2011).
327. Schmid, M. C. *et al.* PI3-kinase γ promotes Rap1a-mediated activation of myeloid cell integrin $\alpha 4\beta 1$, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One* **8**, e60226 (2013).
328. Subramaniam, P. S. *et al.* Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL. *Cancer Cell* **21**, 459–72 (2012).
329. Roda-Navarro, P. & Bastiaens, P. I. Dynamic recruitment of protein tyrosine phosphatase PTPD1 to EGF stimulation sites potentiates EGFR activation. *PLoS One* **9**, e103203 (2014).
330. Wu, Z.-Z., Lu, H.-P. & Chao, C. C.-K. Identification and functional analysis of genes which confer resistance to cisplatin in tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 262–76 (2010).
331. Carlucci, A. *et al.* PTPD1 supports receptor stability and mitogenic signaling in bladder cancer cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 39260–70 (2010).
332. Plani-Lam, J. H.-C. *et al.* PTPN21 exerts pro-neuronal survival and neuritic elongation via ErbB4/NRG3 signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 53–62 (2015).
333. Giebeler, N. & Zigrino, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel)*. **8**, 122 (2016).
334. Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin. cancer Res.* **15**, 1140–4 (2009).
335. Ban, J. *et al.* Hsa-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene* **30**, 2173–80 (2011).
336. Riggi, N. *et al.* EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev.* **24**, 916–32 (2010).
337. Li, W. *et al.* Pulmonary microRNA expression profiling in an immature piglet model of cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury. *Artif.*

- Organs* **39**, 327–35 (2015).
338. Ito, R., Takahashi, T., Katano, I. & Ito, M. Current advances in humanized mouse models. *Cell. Mol. Immunol.* **9**, 208–214 (2012).
339. Cohen-Armon, M. *et al.* DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol. Cell* **25**, 297–308 (2007).
340. Hu, S. *et al.* Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell* **139**, 610–22 (2009).
341. Nasreen, N., Mohammed, K. A., Lai, Y. & Antony, V. B. Receptor EPHA2 activation with ephrinA1 suppresses growth of malignant mesothelioma (MM). *Cancer Lett.* **258**, 215–22 (2007).
342. Eishingdrelo, H. & Kongsamut, S. Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr. Chem. genomics Transl. Med.* **7**, 9–15 (2013).
343. Coleman, S. J. *et al.* Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO Mol. Med.* **6**, 467–81 (2014).
344. Traynor, A. M. *et al.* Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung cancer* **81**, 138–41 (2013).
345. Kuroda, C. *et al.* Distribution, gene expression, and functional role of EphA4 during ossification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 22–7 (2008).
346. Vardi, A. *et al.* Soy phytoestrogens modify DNA methylation of GSTP1, RASSF1A, EPH2 and BRCA1 promoter in prostate cancer cells. *In Vivo (Brooklyn)*. **24**, 393–400 (2010).
347. Vukoja, V. *et al.* [Expression of EPHA2 in Metastatic and Non-Metastatic Primary Uveal Melanoma]. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* **232**, 290–7 (2016).
348. Heinzlmeir, S. *et al.* Chemoproteomics-aided medicinal chemistry for the discovery of EPHA2 inhibitors. *ChemMedChem* (2017). doi:10.1002/cmdc.201700217

BIBLIOGRAFIA

349. Wagner, M. J. *et al.* Preclinical mammalian safety studies of EPHARNA (DOPC nanoliposomal EPHA2-targeted siRNA). *Mol. Cancer Ther.* molcanther.0541.2016 (2017). doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0541
350. Roberts, S. S., Chou, A. J. & Cheung, N.-K. V. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. *Front. Oncol.* **5**, 181 (2015).
351. Sun, X. *et al.* Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma* **2015**, 232010 (2015).
352. Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B. & Ross, J. A. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer* **115**, 4218–26 (2009).
353. Zhu, B. & Davie, J. K. New insights into signalling-pathway alterations in rhabdomyosarcoma. *Br. J. Cancer* **112**, 227–31 (2015).
354. Joshi, D. *et al.* Age is an independent prognostic factor in rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* **42**, 64–73 (2004).
355. Galili, N. *et al.* Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* **5**, 230–5 (1993).
356. Davis, R. J., D'Cruz, C. M., Lovell, M. A., Biegel, J. A. & Barr, F. G. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **54**, 2869–72 (1994).
357. Jahangiri, A. & Weiss, W. A. It Takes Two to Tango: Dual Inhibition of PI3K and MAPK in Rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5811–5813 (2013).

Annex

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi la doctoranda ha participat en l'elaboració de 3 articles originals i 1 article de revisió que es detallen a continuació:

- I. Huertas-Martínez J, Court F, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Almacellas-Rabaiget O, Sáinz-Jaspeado M, García-Monclús S, Lagares-Tena L, Buj R, Hontecillas-Prieto L, Sastre A, Azorin D, Sanjuan X, López-Alemaný R, Moran S, Roma J, Gallego S, Mora J, García Del Muro X, Giangrande PH, Peinado MA, Alonso J, de Alava E, Monk D, Esteller M, Tirado OM. DNA methylation profiling identifies PTRF/Cavin-1 as a novel tumor suppressor in Ewing sarcoma when co-expressed with caveolin-1. *Cancer Letters*, Feb 1;386:196-207 (2017).

- II. Lagares-Tena L, García-Monclús S, López-Alemaný R, Almacellas-Rabaiget O, Huertas-Martínez J, Sáinz-Jaspeado M, Mateo-Lozano S, Rodríguez-Galindo C, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Tirado OM. Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway. *Oncotarget* 5, online (2016).

- III. Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Lagares-Tena L, López-Alemaný R, Mulet-Margalef N, Huertas-Martínez J, García-Monclús S, García Del Muro X, Muñoz-Pinedo C, Tirado OM. The importance of being dead: cell death mechanisms assessment in anti-sarcoma therapy. *Frontiers in Oncology*, 5 (82), pp. 1 – 12 (2015).

- IV. Huertas-Martínez J, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Barrau I, García-Monclús S, Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Núñez-Álvarez Y, Mateo-Lozano S, Mora J, Roma J, Toran N, Moran S, López-Alemaný R, Gallego S, Esteller M, Peinado MA, Del Muro XG, Tirado OM.. Caveolin-1 is down-regulated in alveolar rhabdomyosarcomas and negatively regulates tumor growth. *Oncotarget*, 5 (20), pp. 9744 – 9755 (2014).



Original Article

DNA methylation profiling identifies PTRF/Cavin-1 as a novel tumor suppressor in Ewing sarcoma when co-expressed with caveolin-1



Juan Huertas-Martínez ^a, Franck Court ^b, Santiago Rello-Varona ^a, David Herrero-Martín ^a, Olga Almacellas-Rabaiget ^a, Miguel Sáinz-Jaspeado ^a, Silvia Garcia-Monclús ^a, Laura Lagares-Tena ^a, Raquel Buj ^c, Lourdes Hontecillas-Prieto ^d, Ana Sastre ^e, Daniel Azorin ^f, Xavier Sanjuan ^{a,g}, Roser López-Alemaný ^a, Sebastian Moran ^b, Josep Roma ^h, Soledad Gallego ^h, Jaume Mora ⁱ, Xavier García del Muro ^{a,j}, Paloma H. Giangrande ^k, Miquel A. Peinado ^c, Javier Alonso ^l, Enrique de Alava ^{d,m}, Dave Monk ^b, Manel Esteller ^{b,n,o}, Oscar M. Tirado ^{a,*}

^a Sarcoma Research Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, 08908, Spain

^b Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC), Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, 08908, Spain

^c Institut Germans Trias i Pujol (IGTP), Program in Predictive and Personalized Medicine of Cancer (IMPPC), Badalona, Barcelona, 08916, Spain

^d Laboratory of Molecular Pathology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla, 41013, Spain

^e Unidad de Hematología y Oncología Pediátrica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, 28046, Spain

^f Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, 28009, Spain

^g Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, 08908, Spain

^h Laboratory of Translational Research in Pediatric Cancer, Vall d'Hebron Research Institute, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 08035, Spain

ⁱ Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu, Esplugues de Llobregat, Barcelona, 08950, Spain

^j Sarcoma Multidisciplinary Unit, Institut Català d'Oncologia-ICO, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, 08908, Spain

^k Department of Internal Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA, 52242, USA

^l Unidad de Tumores Sólidos Infantiles, Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid, 28029, Spain

^m Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, 41013, Spain

ⁿ Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

^o Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 September 2016

Received in revised form

3 November 2016

Accepted 17 November 2016

Keywords:

DNA methylation

Ewing sarcoma

PTRF

Cavin-1

Caveolae

Apoptosis

ABSTRACT

Epigenetic modifications have been shown to be important in developmental tumors as Ewing sarcoma. We profiled the DNA methylation status of 15 primary tumors, 7 cell lines, 10 healthy tissues and 4 human mesenchymal stem cells lines samples using the Infinium Human Methylation 450K. Differential methylation analysis between Ewing sarcoma and reference samples revealed 1166 hypermethylated and 864 hypomethylated CpG sites (Bonferroni $p < 0.05$, δ - β -value with absolute difference of >0.20) corresponding to 392 and 470 genes respectively. Gene Ontology analysis of genes differentially methylated in Ewing sarcoma samples showed a significant enrichment of developmental genes. Membrane and cell signal genes were also enriched, among those, 11 were related to caveola formation. We identified differential hypermethylation of CpGs located in the body and S-Shore of the *PTRF* gene in Ewing sarcoma that correlated with its repressed transcriptional state. Reintroduction of PTRF/Cavin-1 in Ewing sarcoma cells revealed a role of this protein as a tumor suppressor. Restoration of caveolae in the membrane of Ewing sarcoma cells, by exogenously reintroducing PTRF, disrupts the MDM2/p53 complex, which consequently results in the activation of p53 and the induction of apoptosis.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals, Gran Via 199, 3^a Planta, 08908, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Fax: +34 932607426.

E-mail address: omartinez@idibell.cat (O.M. Tirado).

Introduction

In contrast to the vast majority of tumor types, Ewing sarcoma (ES), a pediatric cancer characterized by the presence of the fusion protein EWS/FLI1, has a very low mutation burden [1–3]. This suggests a role for EWS/FLI1 as the key promoter in the development of ES [4]. Besides acting as a direct modulator of transcription, EWS/FLI1 appears to exert its oncogenic functions through epigenetic modifications on the transcriptome [5,6].

Caveolae are small flask-shaped invaginations approximately 60–80 nm in diameter on the plasma membrane, which are involved in signal transduction, cholesterol transport, mechanosensing and clathrin-independent endocytosis [7]. Although presence of these structures in cancer cells is mostly related to tumor suppression [8,9], the expression of their two main components, caveolin-1 (CAV1) and Polymerase I and transcription released factor (PTRF, also known as Cavin-1), is associated with tumor suppression as well as oncogenesis [10]. Our group has been working extensively in revealing the mechanisms linking CAV1 over-expression, presumably outside caveolae, in ES with tumor progression by promoting migration, invasion, angiogenesis and resistance to chemotherapy [11–14].

DNA methylation profiles have been shown to be a very useful tool for clinical predictions in terms of therapy response and/or prognosis for multiple tumor types [15,16]. Two patterns of DNA methylation changes have been observed: (i) global hypomethylation associated with increased chromosomal instability, reactivation of transposable elements and loss of imprinting [17,18] and (ii) hypermethylation of CpG islands located in promoter regions of tumor suppressor genes, conventionally associated with transcriptional silencing [19]. Therefore, the identification of specific DNA methylation markers would be helpful for understanding the pathogenetic mechanism as well as for developing new therapeutic strategies for ES.

In the current study, we analyze the methylome of several ES tumors and cell lines in comparison to a significant number of healthy tissues and cells as reference. Our results point to PTRF, known to interact with caveolin-1 to form caveolae, as a novel tumor suppressor in ES.

Materials and methods

Supplementary Materials and Methods, with more detailed explanations, are available in the online version of this article.

Infinium methylation assay

We generated a HM450K Methylome containing 7 ES cell lines and 15 ES tumor samples. Reference samples were HM450K methylomes corresponding to 4 mesenchymal stem cells, 2 adipose, 3 muscle, 3 leukocyte, 2 brain, 1 liver, and 1 pancreas from different publicly available data sets. Data processing and statistical analysis were done with in-house R-scripts (www.r-project.org).

For the Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip array processing, β values were obtained from genome studio after background subtraction and internal control normalization. Differential methylation analyses between groups were performed with Limma package and p -values were adjusted by Bonferroni correction.

Genomic annotations come from GenomeStudio software. Heatmaps were generated with gplots package in R. Hypermethylated genes were organized into hierarchical categories through Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>).

Bisulfite conversion

DNA methylation was analyzed by bisulfite sequencing using EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research). The PCR products were purified using High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and Sanger sequenced (GATC). Primers were designed using PrimerSelect [20] and Bsearch [21]. Lollipop representations were generated using the Methylation Plotter web tool [22].

Cells, treatments and transfections

Established cell lines were authenticated (STR profiling) by qGenomics SL (Esplugues de Llobregat, Spain). Exponentially growing cells within two sequential passages were used for all experiments.

Cell lines were treated with 2.5 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza, Sigma–Aldrich) for 72 h to allow global CpG demethylation.

Full length PTRF cDNA and CAV1 cDNA in a pCMV-Entry vector were obtained from Origene #RC209277 and #RC210274, respectively. Cells were transfected using Lipofectamine 2000.

Effects of PTRF or CAV1 transfection and PTRF/CAV1 co-transfection in ES cells were measured 72 h after seeding, by trypan blue (Sigma–Aldrich) counting and flow cytometry assays. To further analyze cell death, cells were treated after 24 h with 20 μ M Z-VAD-fmk for 24 h. To analyze the role of caveolae in cell death cells were treated after 24 h with 10 μ M Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD, Sigma–Aldrich) for 48 h.

For clonogenic assays, cells were fixed and stained with crystal violet (Sigma–Aldrich).

Transient transfections with siRNA were carried out with DharmaFECT (GE Healthcare).

Clinical material

For the methylome study, tumor specimens were collected from 15 patients with ES undergoing surgical resection/core biopsy at *Hospital Universitari Vall d'Hebron*, Barcelona, Spain and *Hospital Universitario La Paz*, Madrid, Spain. For testing the expression of PTRF in Tissue Micro Arrays (TMAs), 86 tumor samples were collected at the *Hospital Universitario Virgen del Rocío*, Seville, Spain. Written informed consent was obtained from each patient. Staining of PTRF in the TMA was scored by a trained pathologist on a positive–negative scale. PTRF staining at endothelia was considered as an internal positive control.

Protein analysis

Protein analyses encompassing expression assessment, immunoprecipitation assays, immunohistochemical studies and immunofluorescence localization analysis were performed as previously described [11,12].

Mouse tumor transplantation

In vivo tumors were induced with subcutaneous injections of model cells in the posterior flank of 32 (TC2/PTRF model) or 41 (Ew/PTRF/CAV1 model) athymic nude mice (Envigo). Tumor volumes were measured three times per week by caliper. When the tumor reached a mean volume of around 1 cm³, mice were euthanized and the tumor was removed for further analysis. Animal care procedures were followed according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Ethics approval was provided by the locally appointed ethics committee from IDIBELL, Barcelona, Spain.

Electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) was performed in the Scientific and Technological Centers of *Universitat de Barcelona*. Electron microscopy was performed with a Tecnai 12 Spirit electron microscope (FEI).

Flow cytometry

For cell cycle analysis, cells were collected and stained with the DNA-binding 10 μ g/mL Hoechst-33342 in the presence of 1 μ g/mL propidium iodide (PI) and 40 nM of the mitochondrial probe DiOC₆(3) for 30 min at 37 °C. Cytofluorometric determinations were performed by means of a Gallios flow cytometer and data were statistically evaluated using Kaluza software (Beckman Coulter).

Quantitative real time PCR

Total RNA was extracted using the Total RNA Isolation Kit (NucleoSpin RNA II, Macherey–Nagel). cDNA synthesis was performed with SuperScript II Reverse Transcriptase. SYBR green based real time RT-PCR was performed under universal cycling conditions on a Light Cycler 480 (Roche) using designed primers for *PMAIP1* (Noxa) and *RPL32*. Cycle threshold (CT) values were normalized to *RPL32*. Relative expression level of the target gene among the different samples was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method [23].

Statistics

Otherwise stated, data were analyzed for statistical significance using Student's t test. Unless otherwise stated, experiments were performed thrice; $p \leq 0.05$ was regarded as significant.

Results

Methylation profile of ES

In order to generate a global view of the DNA methylation landscape of ES, we investigated 15 primary ES tumors, 7 ES cell

lines, 10 healthy tissues and 4 human mesenchymal stem cells (hMSC) lines samples using the Infinium Human Methylation 450K (HM450K) BeadChip. After quality control analysis and data filtering, the methylation status of a total of 467,273 CpGs and 3091 non-CpGs was quantified in all ES derived samples. We used publicly available data for the reference (detailed in [Supplementary Material & Methods](#)). Pearson correlation matrix showed decreased correlation between tumor cell lines and the rest of the samples (Fig. 1A). In fact, as previously reported [24], heatmap clustering showed higher methylation in tumor cell lines than in tumor samples (Fig. 1B). Taking this into consideration, we performed DNA methylation analysis of sites with the same methylation status in tumor and cell lines but different to the reference. Thus, a differential methylation analysis between ES and healthy reference samples revealed 1166 hypermethylated and 864 hypomethylated CpG sites (Bonferroni $p < 0.05$, δ - β -value with absolute difference of >0.20) corresponding to 392 and 470 genes respectively (Fig. 1C and [Table S1](#)). Gene Ontology (GO) analysis of differential hypermethylated regions showed enrichment of developmental genes related to morphogenesis, development and differentiation ([Table S2](#)). Analysis of the positions with differentially methylated CpG sites was performed according to the genomic annotation categories stated in Bibikova et al. [25]. Our results (Fig. 1D) showed that hypermethylation was located mostly on islands, in promoters, shores, enhancers and DNase I hypersensitive sites (DHS)-associated regions while hypomethylation was differentially located in non-CpG islands. Known tumor suppressor genes (*FHIT*, *PIK3API*, *HHEX*) were hypermethylated in promoter associated regions and hypomethylation was widely observed in body gene regions of key genes for ES such as cyclin D1 (*CCND1*) ([Table S1](#)).

Co-expression of PTRF and CAV1 translates in an increase of caveolae formation and apoptotic cell death

Differential methylation in enhancer regions was repeatedly present in ES samples. Among the genes whose enhancer regions were affected, we focused our attention on *PTRF* whose product is required for caveolae formation [26]. Despite of having high levels of CAV1, ES cells contain few caveolae in their plasma membrane [13] and under-expression of *PTRF* could explain such event. Besides hypermethylation on a putative enhancer region within the gene, we also found hypermethylation in an S-Shore located close to the promoter region of *PTRF* (Fig. 2A–B). In contrast to non-tumorigenic human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which express *PTRF*, ES cells barely had any expression of *PTRF* (Fig. 2C). Furthermore, treatment of three different ES cell lines with the DNA methylation inhibitor 5-aza resulted in the recovery of *PTRF* expression (Fig. 2D). Due to the hypermethylation pattern of *PTRF* found in cells lines and tumor samples, we used immunohistochemistry (IHC) on TMAs to analyze *PTRF* expression in a panel of 86 ES patients. Only 38.37% (33 patients) showed expression of *PTRF* (Fig. 2E). Importantly, Kaplan–Meier method compared by Long-rank (Mantel–Cox test) analysis in 67 patients of our cohort with available clinical data showed higher overall survival in patients that expressed *PTRF*, $p = 0.006$ (Fig. 2F and [Table S3](#)). Together, these findings strongly suggest that *PTRF* could be a tumor suppressor and a prognosis marker in ES.

In order to demonstrate the tumor suppressor role of *PTRF*, we established a stable pool cell line and selected clone lineages that express *PTRF* by transfecting ES cells (TC252) with the expression vector pEGFP-*PTRF* (Fig. 3A). We observed *PTRF* co-localization with CAV1 in the plasma membrane (Fig. 3B). Moreover, interaction of both proteins was also demonstrated by immunoprecipitation (IP) experiments (Fig. 3C). *PTRF* transfection resulted in a

significant increase in cell death (Fig. 3D) and a significant reduction in colony formation (Fig. 3E). To investigate *PTRF*-induced cell death, we examined cleavage of caspase-3 (Fig. S1A) and inhibition of cell death by the use of the pan caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. S1B–C). Our results provided sufficient evidence for classifying *PTRF* induced cell death as apoptosis. These *in vitro* results were further confirmed in our *in vivo* approach (Fig. S1D) where the incidence of tumor formation in athymic nude mice was significantly lower (Fisher's exact test $p = 0.001$) in mice engrafted with *PTRF*-transfected cells (2/16, 12.5%) than in mice with empty vector-transfected cells (12/16, 75%). Furthermore, tumor size at the end of the experiment was dramatically reduced when *PTRF*-transfected cells were injected (Fig. S1E). Interestingly, images acquired *via* TEM showed that most of the dying *PTRF* expressing cells had an increase in the number of caveolae (Fig. 3F–G and Fig. S1F). Newly formed caveolae appeared to be morphologically similar to those found in HUVEC (Fig. S2A): Ω -shaped invaginations in a 25–100 nm range [7]. Moreover, A673 cells treated with 5-aza also showed an increase in the number of caveolae (Fig. S2B–D). These results were further confirmed (Fig. S3) by stably transfecting TC252 cells with a different *PTRF* expression system (pCMV-*PTRF*). Furthermore, treatment of TC252 *PTRF*-transfected cells with M β CD, a disruptor of caveolae formation [27], resulted in a reduced cell death rate similar to control cells (Fig. S4). Although the involvement of other unknown non-caveolae effects cannot be discarded, these results strongly suggest that the caveolae formation is responsible for the increase of cell death.

To further confirm that co-expression of *PTRF* and CAV1 is responsible for the induction of apoptosis in ES cells, we stably transfected *PTRF* in another ES cell line (Ew7) that does not naturally express CAV1 (Fig. 4A–B). In this particular case, no change in cell cycle was determined by flow cytometry (Fig. 4C) nor in colony formation (Fig. 4D). We then stably transfected CAV1 in Ew/CMV and Ew/*PTRF* transfected cells (Fig. 4E). The deleterious effects observed in the TC252 model were reproduced in terms of cell death induction (Fig. 4F, Fig. S5A), colony formation (Fig. 4G) and tumor induction in nude mice (Fig. 4H, Fig. S5B). In absence of CAV1, *PTRF* localized mostly in the cytoplasm (Fig. S6A) and consequently only in the Ew/*PTRF*/CAV1 model were we able to observe an increase in caveolae formation (Fig. S6B–C). Together, these results strongly support the hypothesis that co-expression of *PTRF* and CAV1 in ES cells results in an increase in caveolae formation leading to apoptotic cell death.

Induction of cell death as a result of PTRF/CAV1 co-expression is p53-dependent

Mutations of *TP53* are only found in about 10% of ES patients [28]. TC252 and Ew7 cell lines are wild type for *TP53* [29,30]. Therefore, we hypothesized that apoptosis was due to activation of p53 as a consequence of caveolae formation. To test our hypothesis, we transiently knocked-down p53 in the TC252/*PTRF* model. Indeed, effective down-regulation of p53 in two clones of this model significantly reduced cell death and caspase-3 cleavage to levels close to GFP-transfected control cells (Fig. 5A–B). To confirm the involvement of p53 in the induction of apoptotic cell death *via* caveolae formation, we set up two stable models of *PTRF* expression in ES cell lines with impaired p53 function, A673 (mutated *TP53*) and SK-N-MC (*TP53* null) [29,30]. Despite of showing efficient transfection and increase of caveolae formation, cell death was not observed yet a reduction of clonogenicity was verified in some of the *PTRF* clones tested (Fig. 5C–D and Fig. S7). Transient transfection of *TP53* in A673 *PTRF*-expressing cells resulted in a significant increase in cell death (Fig. 5E) confirming p53 cell death dependency.

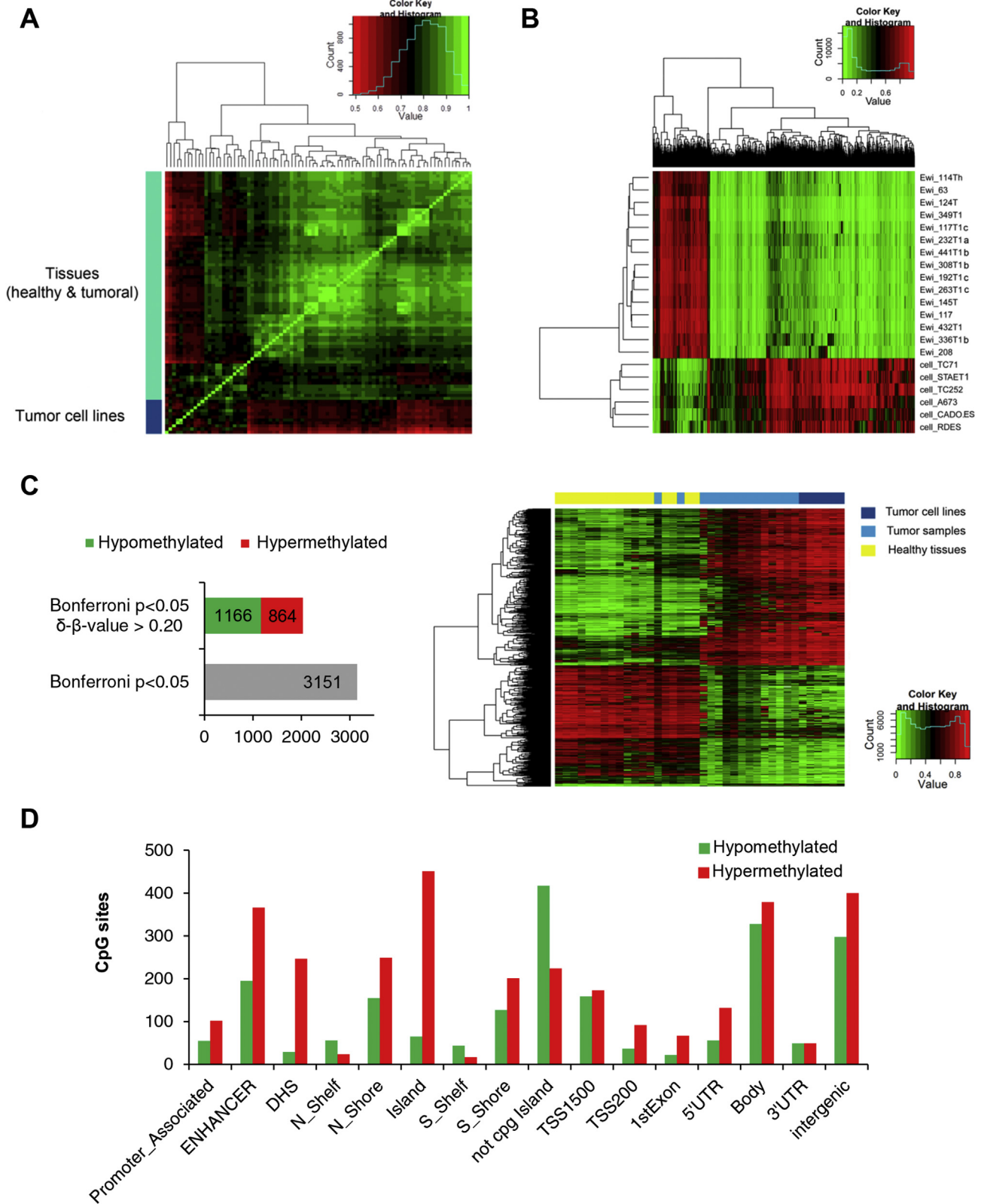
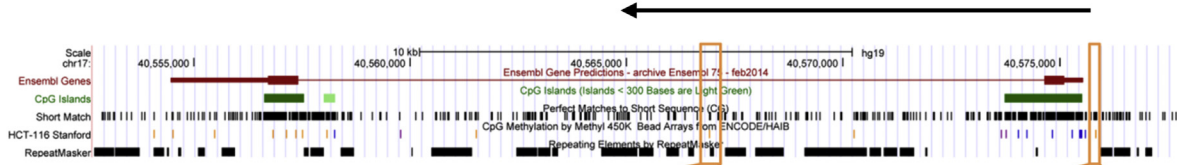
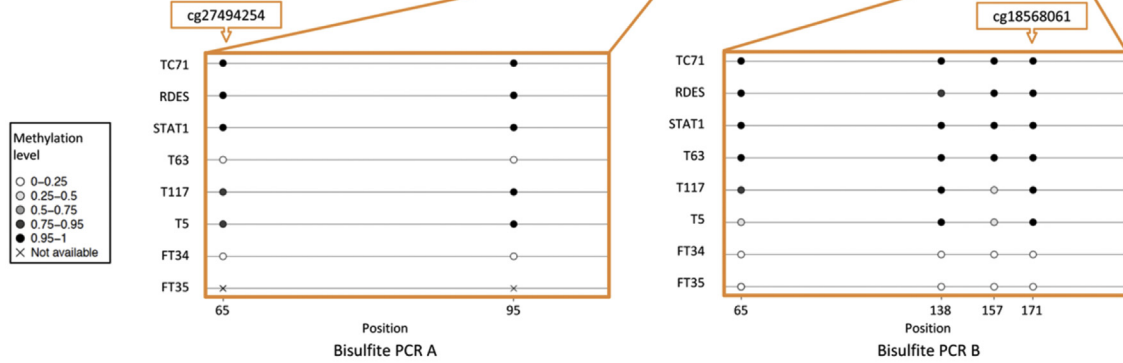


Fig. 1. Methylation profile of ES. (A) Pearson correlation matrix for the methylomes of our samples. (B) Heatmap illustrating the difference of methylation between ES tumors samples and cells. (C) Results for the differential methylation analysis of healthy tissues vs. ES samples (tumor samples and cell lines). Left panel: details of the analysis for the 467,273 CpG probes; 464,122 are not significantly different and 3151 have a adjust *p* values under 0.05 of which 1166 are hypermethylated in cancer and 864 are hypomethylated in cancer (delta cut off >20%). Right panel heatmap for these probes hypo and hypermethylated. (D) Position of probes differentially methylated based on the genome studio annotation.

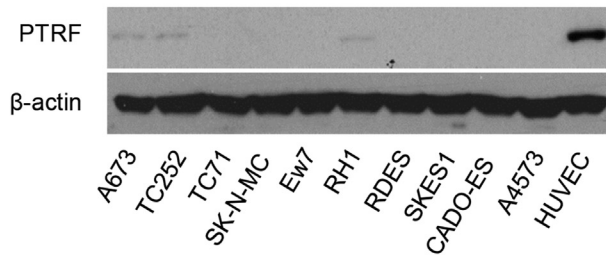
A



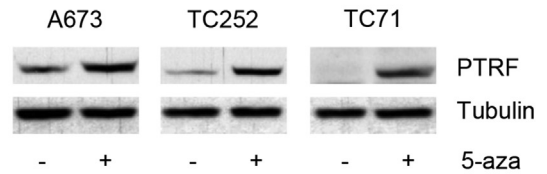
B



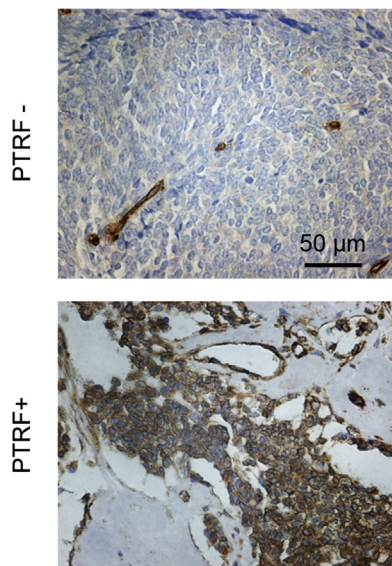
C



D



E



F

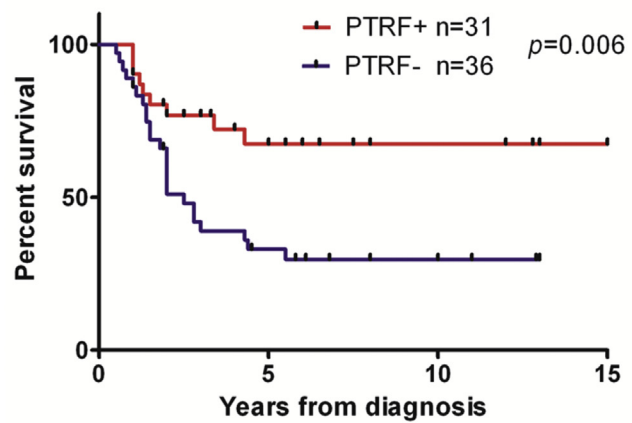


Fig. 2. PTRF repression by methylation is linked to tumorigenicity. (A) Representation of the *PTRF* gene in the UCSC Genome Browser. The tracks indicate the CpG islands, the position of CpG sites (short match) and the location of Infinium 450K methylation arrays probes (HCT-116 Stanford). The boxes indicate the location of cg27494254 and cg18568061 probes and the two regions analyzed for DNA methylation. Arrow on the top indicates transcription sense. (B) DNA methylation levels of the CpGs analyzed by bisulfite sequencing are illustrated using the Methylation plotter web tool. (C) Immunoblots showing PTRF expression in different ES cell lines. (D) PTRF expression in different ES cell lines treated with the demethylating agent 5-aza (2.5 µM) for 72 h. (E) Representative images of PTRF⁺ and PTRF⁻ ES samples from TMA analysis. Scale bar, 50 µm. (F) Kaplan–Meier survival plot (based on PTRF expression measured by IHC) from TMA annotated samples. Overall survival is shown. Long-rank (Mantel–Cox test) analysis was used to generate *p* value.

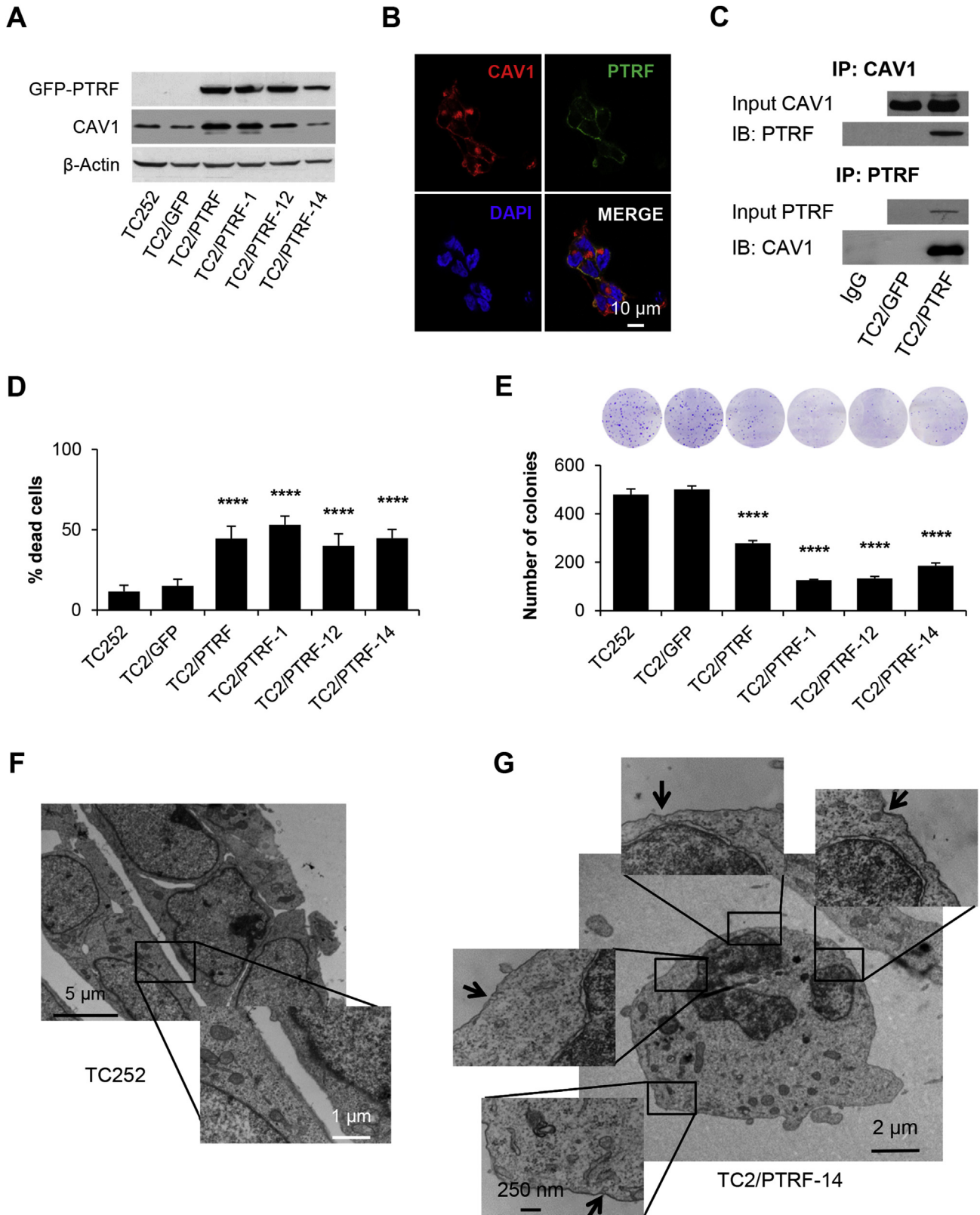


Fig. 3. PTRF re-expression in TC252 decreases cell viability. (A) Immunoblot of cell lysates from TC252 cells stably transfected with GFP-empty vector (TC2/GFP) or GFP-tagged PTRF (TC2/PTRF). Both pool population and selected clones (numbered) are showed. (B) Representative immunofluorescence images of CAV1 (red) on selected clone TC2/PTRF-1, PTRF is labeled in green (GFP). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 10 μ m. (C) CAV1 and PTRF immunoprecipitation (IP) in TC252 GFP-tagged PTRF-transfected model, western blot for CAV1 and PTRF. Input and IgG controls are shown in each IP sequence. (D) Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay in TC252 PTRF-expressing model. (E) Clonogenic assay in TC252 GFP tagged PTRF-expressing model. Above: representative images of each condition. (F) Transmission electron microscopy (TEM) images from parental TC252 cells, scale bars 5 μ m and 1 μ m. (G) TEM images from selected clone TC2/PTRF-14. Arrows indicate the presence of caveolae in the plasma membrane. Scale bars, 2 μ m and 250 nm. In (D) and (E): mean \pm SD. Student's *t* test was used to generate *p* values. The **** indicates $p \leq 0.0001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

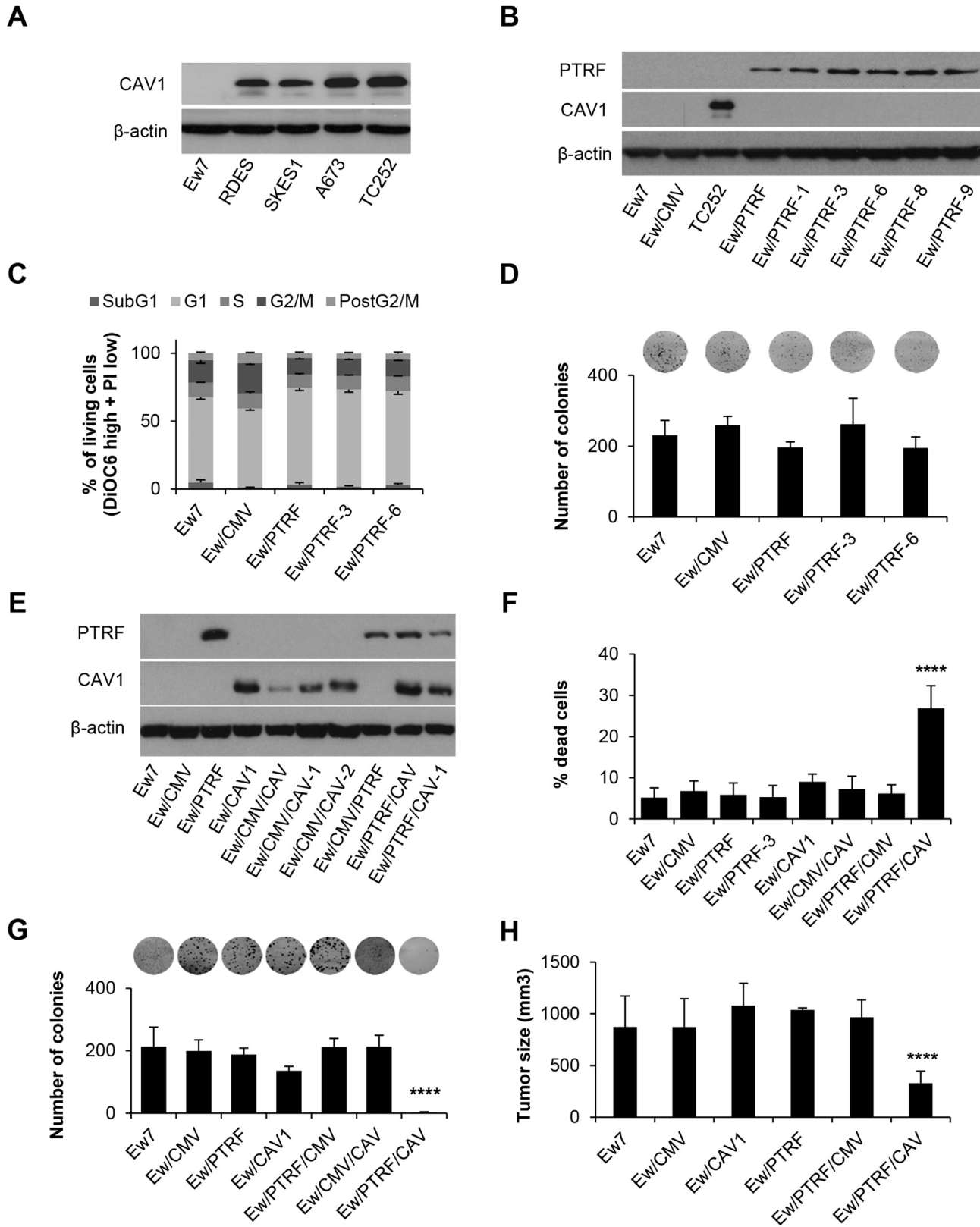


Fig. 4. PTRF induces cell death when co-transfected with CAV1 in Ew7 model. (A) Immunoblots showing CAV1 expression in selected ES cell lines. (B) Ew7 cell line was transfected with the empty-vector (Ew/CMV) or PTRF-expressing vector (Ew/PTRF). Both pool population and selected clones (numbered) are showed. TC252 was used as a CAV1 positive control. (C) Hoechst-33342 cell cycle profiling by flow cytometry gated to living cells (DiOC high PI low). (D) Clonogenic assay of the Ew7 stably PTRF-transfected selected clones. (E) Immunoblot validation in Ew7 models transfected with PTRF, CAV1 or both. Cells were transfected with the empty-vector (Ew/CMV or Ew/PTRF/CMV), CAV1-expressing vector (Ew/CAV or Ew/CAV/CMV), or co-transfected with CAV1 and PTRF-expressing vector (Ew/PTRF/CAV as pool and clone Ew7/PTRF/CAV-1). (F) Trypan blue exclusion assay determination of cell viability, of the co-transfected model. (G) Clonogenic assay in Ew7 PTRF/CAV1 co-transfected model. (H) Tumor size (mm³) at the end of the experiment from the Ew/PTRF/CAV model. Mice numbers were Ew7 (n = 5), Ew/CMV (n = 11), Ew/CAV1 (n = 6), Ew/PTRF (n = 4), Ew/PTRF/CMV (n = 9) and Ew/PTRF/CAV (n = 6). In (C), (D), (F), (G) and (H): mean ± SD. Student's *t* test was used to generate *p* values. The **** indicates *p* ≤ 0.0001.

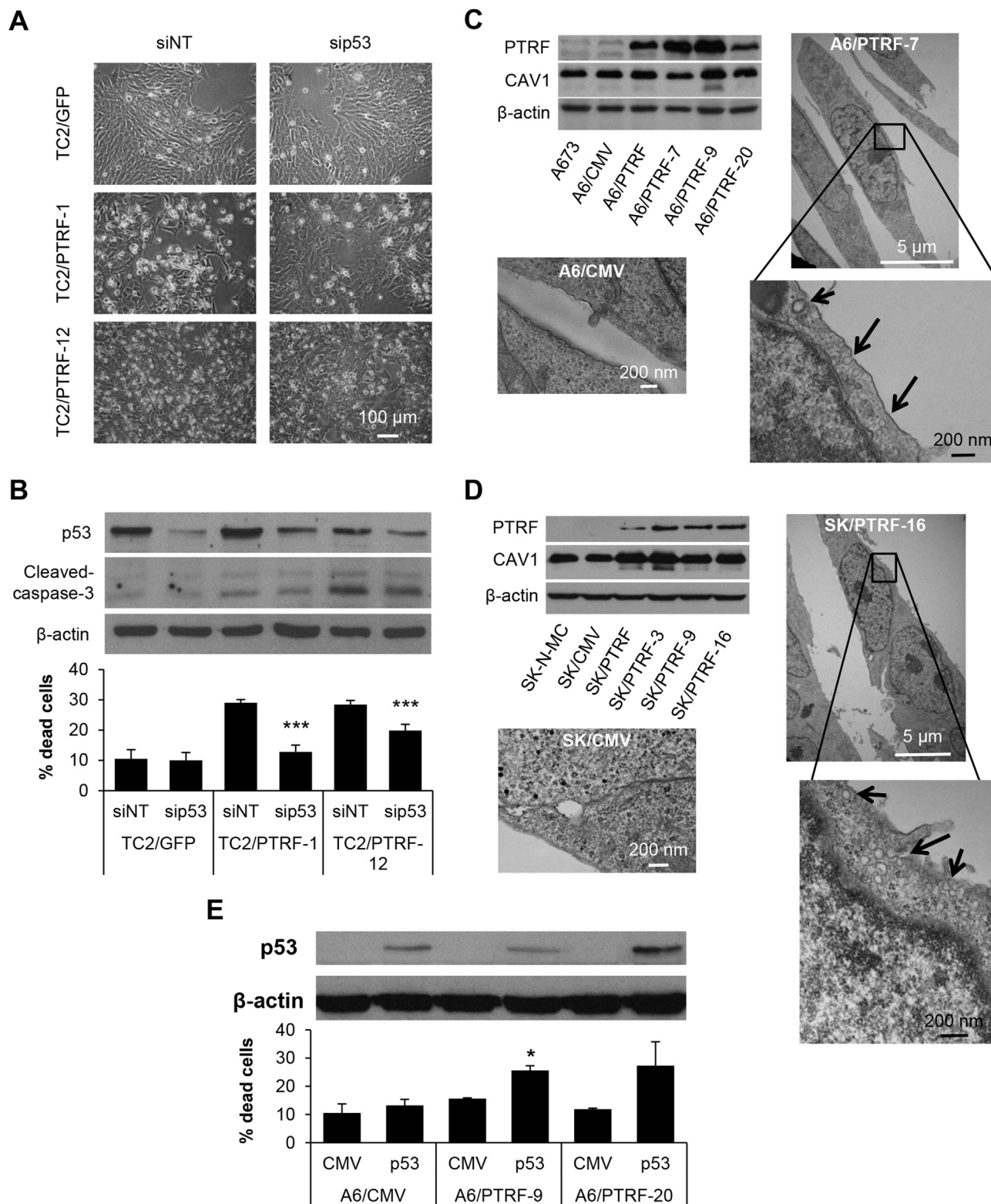


Fig. 5. PTRF promotes p53-dependent cell death. (A and B) TC252 GFP tagged PTRF-expressing model treated either with NT siRNA or *TP53* siRNA: representative images from treatment. Scale bar, 100 μm; representative immunoblots and trypan blue exclusion assay for cell death quantification. (C) Generation of A673 model of PTRF over-expression: (right, up) Validation by immunoblot of stably selected clones transfected both with empty-vector (CMV) or exogenous PTRF; (right, down) microphotograph from control cells; (left) microphotograph of selected clon (A6/PTRF-7) and magnification showing caveolae (indicated by arrows). Scale bars, 5 μm and 200 nm. (D) Generation of SK-N-MC model of PTRF over-expression: (right, up) Validation by immunoblot of stably selected clones transfected both with empty-vector (CMV) or exogenous PTRF; (right, down) microphotograph from control cells; (left) microphotograph of selected clon (SK/PTRF-16) and magnification showing caveolae (indicated by arrows). Scale bars, 5 μm and 200 nm. (E) p53 re-expression in A673 cells: immunoblots from cell lysates of A673 transfected cells with p53 or CMV vectors and trypan blue exclusion assay for cell death quantification. In (A) and (E): mean ± SD. Student's *t* test was used to generate *p* values. The * and *** indicate *p* < 0.05 and *p* ≤ 0.001 respectively.

Reduction of MDM2/p53 interaction frees p53 to induce apoptosis

Binding with the Murine Double Minute-2 (MDM2) oncoprotein, usually highly expressed in pediatric tumor cells, frequently reduces p53 availability [31,32]. We observed an inverse correlation between MDM2 and p53 on PTRF clones in the presence of CAV1 (Fig. 6A and Fig. S8). Accordingly, through co-IP assay we observed that the interaction p53-MDM2 was significantly reduced in TC2/PTRF clones (Fig. 6B). Furthermore, except for the pool population, we found up-regulation of p53 pro-apoptotic targets Noxa (product of the *PMAIP1* gene) and PUMA in the majority of our TC252 GFP-PTRF-expressing clones (Fig. 6C–D).

Direct sequestration of MDM2 by the complex CAV1/PTRF could link caveolae restoration with cell death induction, as it was described during the impairment of wound healing in diabetes [33]. However, we failed finding MDM2 in complexes with CAV1 and/or PTRF within our models. Still, we decided to test if caveolae restoration could be affecting the phosphorylation balance of MDM2, a known mechanism of disruption of the MDM2/p53 complex [34]. Indeed, tyrosine phosphorylation of MDM2 was observed only in TC252 PTRF clones (Fig. 6E). Taken together, our results suggest that restoration of caveolae contributes to enhance MDM2 phosphorylation and thus disrupts its complex with p53. Released p53 would sequentially drive the onset of cell death.

Discussion

DNA methylation signatures point toward disease mechanisms, useful biomarkers and therapeutic targets. Methylation profiles can be useful to unveil common patterns among cancer entities. One major constraint that has to be taken into account is that cell culture *in vitro* induces methylation changes *per se*, meaning that cell lines and tissue samples generally cluster separately [24,35]. In spite of this phenomenon, we identified a characteristic methylation signature for ES. Like Patel et al. [36], we found aberrant hypermethylation of promoter CpG islands in many genes (*HHEX*, *FHIT*, etc) known to act as tumor suppressors in other tumor entities [37,38]. Likewise, we also found hypomethylation of body regions related to key genes for ES progression such as *CCND1* [39]. Interestingly, *CCND1* is highly expressed in various types of tumors besides ES [40,41]. Similar to recent reported data on neuroblastoma tumors [42] we identified significant hypomethylation in body and 3'-UTR regions of this gene. These regions have been linked to enriched regions for enhancers [43] and related to regulation of its expression. Therefore, over-expression of this gene in ES might be explained by a similar mechanism.

During the period of development, tissue growth and differentiation is regulated by complex cellular processes that involve precise regulation of both cell division and apoptosis. Defects in any of the pathways that control these processes could promote transformation [44]. ES formation, as in any other childhood developmental tumor, could therefore be driven by the normal growth- and differentiation-promoting mechanisms that occur during development. From this point of view, ES pathogenesis is intimately linked to the processes of organogenesis, tissue growth and maturation. Accordingly, GO analysis of the differentially hypermethylated genes points to pathologic alterations by DNA methylation on genes related to the processes of morphogenesis and differentiation. In fact, many of those genes were found to be restrictive of differentiation lineages in human embryonic cells [45], suggesting that besides the reported effects of the fusion protein on developmental and differentiation genes, DNA methylation plays an important role in that process [46].

As previously reported for *CCND1* [42], we found differential methylation within the body gene of *PTRF*. In contrast to breast

cancer cells [8], we did not find hypermethylation of its promoter except for two CpG sites in the S-Shore located close to the promoter region. As ES cells have a unique enhancer signature not found in any other tumor and/or cell type [5,6], differential methylation in the S-Shore might be responsible for the silencing of this gene as has been previously demonstrated for *CAV1* in breast cancer [47]. Although *PTRF* belongs to the family of proteins called caveins known, as caveolins, to be necessary for the formation of caveolae [10]; recent research provided data that *PTRF* may not be so essential in caveolae formation and function [48]. Caveolae are major signaling hubs and their alteration contributes to tumor progression in ways not completely unveiled [49]. As *CAV1*, the role of *PTRF* in cancer is controversial, thought to act as an oncogene in pancreatic cancer [50] and as a tumor suppressor in prostate cancer [51]. According to the differential methylation status of *PTRF* validated in different tumor samples and cell lines, its expression was almost undetectable in most of ES cell lines and in more than 60% of patients. Overall survival analysis showed *PTRF* expression as a putative predictor of good prognosis. In agreement with several studies, co-expression of *PTRF* and *CAV1* resulted in an increase in the number of caveolae [50–53]. Despite the limitations of transmission electron microscopy for quantitative studies, we easily found caveolae in both *PTRF*-expressing and 5-aza treated cells whereas it was rather difficult to find any in control samples. Surprisingly, re-expression of *PTRF* in ES cells resulted in a great suppressor effect only in the presence of *CAV1* and when the p53 pathway was intact. To our knowledge this is the first study demonstrating that the increase of caveolae in a tumor cell results in significant cell death. The latest published studies reporting tumor suppression after re-introducing *PTRF* regard to prostate cancer [54], where they observed reduced migration, angiogenesis and lymphangiogenesis but not cell death. Like A673, where we observe loss of clonogenicity but not cell death induction, all the prostate cancer cell lines used in those studies are mutants for *TP53* [55]. As in prostate cancer, ES combines high expression of *CAV1* [13] with nearly undetectable levels of *PTRF*. In fact, *CAV1* has been shown to promote resistance to chemotherapy [56], metastasis [11,14] and angiogenesis [12]; results that support the hypothesis that the oncogenic functions described for *CAV1* in ES are most likely caveolar-independent. At least in a *TP53* intact background, re-introduction of *PTRF* would favor the formation of caveolae and so sequestering *CAV1* from non-caveolar domains to caveolae. Thus, one possibility is that MDM2 also gets sequestered and p53 freely activates the apoptotic machinery. In close agreement with this possibility, re-introduction of *PTRF* in fibroblasts results in sequestration of MDM2 by newly formed caveolae and activation of the p53 pathway [32]. However, we were unable to demonstrate direct interaction of MDM2 neither with *CAV1* nor with *PTRF*. That leaves open the question of whether *CAV1/PTRF* could induce cell death *via* non-caveolar interactions, but we consider that it is hardly unlikely as both proteins relocate towards the plasma membrane when expressed together. Likewise, MDM2 might still be being sequestered by other caveolar components. Another possibility is that caveolae formation activates a signaling pathway that promotes the phosphorylation of MDM2 and consequently the disruption of the MDM2/p53 complex. Therefore, our results suggest that differential phosphorylation of MDM2 indeed occurs in *PTRF*-expressing TC252 cells. When *TP53* is mutated, re-introduction of *PTRF* does not induce apoptosis, but affects the clonogenic capacity of ES cells. Therefore, we cannot rule out the activation of an alternative tumor suppressive pathway independent of p53. For example, caveolae may serve as platform to suppress several signal transduction pathways related to tumor progression as previously described [57,58].

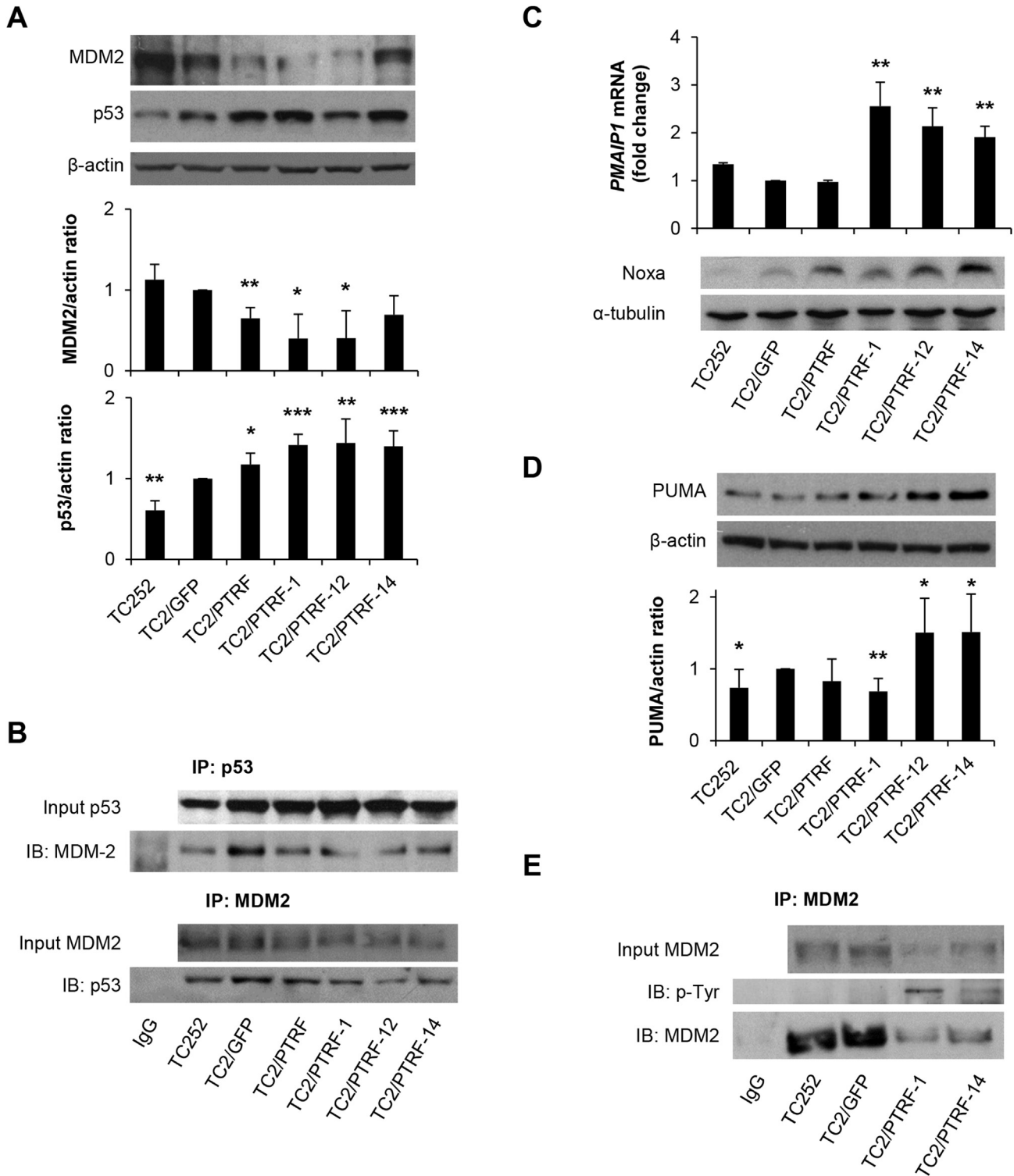


Fig. 6. Caveolae induces phosphorylation of MDM2 leading to p53 activation. (A) Representative immunoblots and quantification from in TC252 GFP tagged PTRF-transfected model cell lysates incubated with MDM2 and p53 antibodies. (B) p53 and MDM2 IP in TC252 GFP tagged PTRF-transfected model, western blot for MDM2 and p53. Input and IgG control are shown in each IP sequence. (C) Noxa levels in TC252 GFP tagged PTRF transfected model measured by real-time PCR (*PMAIP1* gene, up) and a representative immunoblot (down). (D) Representative immunoblot and quantification from TC252 GFP tagged PTRF-transfected model for PUMA. (E) MDM2 IP in TC252 GFP tagged PTRF-transfected model, western blot for phospho-Tyr and MDM2. Input and IgG control are shown in each IP sequence. In (A), (C) and (D): mean \pm SD. Student's *t* test was used to generate *p* values. The *, ** and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p \leq 0.001$ respectively.

In summary, methylation profiling of ES uncovered PTRF as a tumor suppressor and a putative useful prognosis marker. Furthermore, we showed for the first time that re-introduction of PTRF in ES cells in an intact *TP53* background results in significant

induction of apoptosis. We are confident that these effects are induced as a consequence of caveolae formation, which neutralizes the oncogenic activities of CAV1 by turning it into a tumor suppressor (Fig. 7). Our results have therapeutic implications for ES

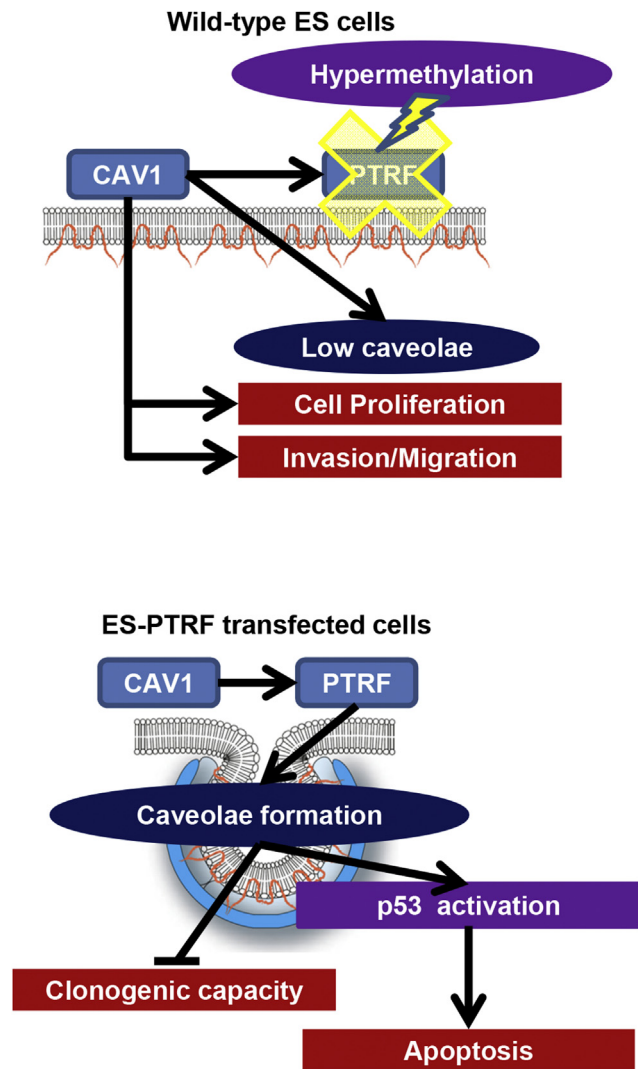


Fig. 7. Graphic summary of experimental conclusions. Caveola and flatten plasma membrane graphics are both adapted from reference [7].

patients with wild type *TP53*. Restoring PTRF expression in these patients could be performed as monotherapy using epigenetic drugs. One could also envision combining these PTRF therapeutic strategies with drugs that restore p53 activity for treating ES patients that harbor loss of function *TP53* mutations.

Funding

OMT: Instituto de Salud Carlos III and EU's Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa/A way to achieve Europe" (CES12/021; PI11/00038; PI15/00035). EdA, JM & OMT: Fundación científica de la AECC (GCB13131578DE Á). SR-V: Marie Curie COFUND-Bearriu De Pinós Researcher (BP-B 00109). SR-V & SG-M: Fundación Alba Pérez lucha contra el cáncer infantil. DH-M: Fundación Científica de la AECC. RB: FPI fellow (BES-2012-055368). JA: Instituto de Salud Carlos III (PI12/00816) and Spanish Cancer Network-RTICC (RD12/0036/0027). MAP: MINECO (SAF2015-64521-R).

Author contributions

OMT conceived and supervised the study. JHM designed and performed the main experiments and coordinated the data

analysis. FC, SR-V, DH-M, OA-R, MS-J, SG-M, LL-T, RB, LH-P, RL-A and SM contributed to the design and conduct of experiments. MAP, ME and XGM contributed to the data analysis. FC, SM and DM performed bioinformatics data analyses. AS, DA and XS performed histopathological analyses of the samples. JR, SG, JM, JA and EA provided tumor samples. JHM, SR-V, PHG and OMT wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Data and materials availability

Data bases from the methylome analysis are publicly accessible at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE89041>.

Acknowledgments

The authors thank the donors, Seville's HUVR-IBiS Biobank (Andalusian Public Health System Biobank and ISCIII-Red de Biobancos PT13/0010/0056) and Hospital Infantil Universitario Niño Jesús at Madrid, Spain, for the human specimens used in this study.

Conflict of interests

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.020>.

References

- [1] A.S. Brohl, D.A. Solomon, W. Chang, J. Wang, Y. Song, S. Sindiri, et al., The genomic landscape of the Ewing sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation, *PLoS Genet.* 10 (2014) e1004475, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004475>.
- [2] B.D. Crompton, C. Stewart, A. Taylor-Weiner, G. Alexe, K.C. Kurek, M.L. Calicchio, et al., The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma, *Cancer Discov.* 4 (2014) 1326–1341, <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1037>.
- [3] F. Tirorde, D. Surdez, X. Ma, M. Parker, M.C. Le Deley, A. Bahrami, et al., Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations, *Cancer Discov.* 4 (2014) 1342–1353, <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0622>.
- [4] N. Gaspar, D.S. Hawkins, U. Dirksen, I.J. Lewis, S. Ferrari, M.-C. Le Deley, et al., Ewing sarcoma: current management and future approaches through collaboration, *J. Clin. Oncol.* 33 (2015) 3036–3046, <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5256>.
- [5] N. Riggì, B. Knoechel, S.M. Gillespie, E. Rheinbay, G. Boulay, M.L. Suvà, et al., EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma, *Cancer Cell* 26 (2014) 668–681, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.004>.
- [6] E.M. Tomazou, N.C. Sheffield, C. Schmidl, M. Schuster, A. Schönegger, P. Datlinger, et al., Epigenome mapping reveals distinct modes of gene regulation and widespread enhancer reprogramming by the oncogenic fusion protein EWS-FLI1, *Cell Rep.* 10 (2015) 1082–1095, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.042>.
- [7] J.P.X. Cheng, B.J. Nichols, Caveolae: one function or many? *Trends Cell Biol.* 26 (2015) 177–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.010>.
- [8] L. Bai, X. Deng, Q. Li, M. Wang, W. An, A. Deli, et al., Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer, *J. Cell Biochem.* 113 (2012) 322–328, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23358>.
- [9] V.J. Hernandez, J. Weng, P. Ly, S. Pompey, H. Dong, L. Mishra, et al., Cavin-3 dictates the balance between ERK and Akt signaling, *Elife* 2 (2013) e00905, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00905>.
- [10] R. Gupta, C. Toufaily, B. Annabi, Caveolin and cavin family members: dual roles in cancer, *Biochimie* 107 Pt B (2014) 188–202, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.010>.
- [11] M. Sáinz-Jaspeado, L. Lagares-Tena, J. Lasheras, F. Navid, C. Rodríguez-Galindo, S. Mateo-Lozano, et al., Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 1489–1500, <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0060>.
- [12] M. Sáinz-Jaspeado, J. Huertas-Martínez, L. Lagares-Tena, J. Martín Liberal, S. Mateo-Lozano, E. de Alava, et al., EphA2-induced angiogenesis in Ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent

- on caveolin-1, *PLoS One* 8 (2013) e71449, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071449>.
- [13] O.M. Tirado, S. Mateo-Lozano, J. Villar, L.E. Dettin, A. Llorc, S. Gallego, et al., Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 9937–9947, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0927>.
- [14] L. Lagares-Tena, S. García-Monclús, R. López-Alemayn, O. Almacellas-Rabaiget, J. Huertas-Martínez, M. Sáinz-Jaspeado, et al., Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway, *Oncotarget* (2016), <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.10872>.
- [15] H. Heyn, M. Esteller, DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 679–692, <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3270>.
- [16] C.R. Goding, D. Pei, X. Lu, Cancer: pathological nuclear reprogramming? *Nat. Rev. Cancer* 14 (2014) 568–573, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3781>.
- [17] S. Bender, Y. Tang, A.M. Lindroth, V. Hovestadt, D.T.W. Jones, M. Kool, et al., Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas, *Cancer Cell* 24 (2013) 660–672, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.006>.
- [18] G. Raddatz, Q. Gao, S. Bender, R. Jaenisch, F. Lyko, Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1003146, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003146>.
- [19] M. Fang, J. Ou, L. Hutchinson, M.R. Green, The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG island methylator phenotype, *Mol. Cell* 55 (2014) 904–915, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.010>.
- [20] K.J. Graham, M.J. Holland, PrimerSelect: a transcriptome-wide oligonucleotide primer pair design program for kinetic RT-PCR-based transcript profiling, *Methods Enzymol.* 395 (2005) 544–553, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95028-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95028-3).
- [21] L.-C. Li, R. Dahiya, MethPrimer: designing primers for methylation PCRs, *Bioinformatics* 18 (2002) 1427–1431.
- [22] I. Mallona, A. Díez-Villanueva, M.A. Peinado, Methylation plotter: a web tool for dynamic visualization of DNA methylation data, *Source Code Biol. Med.* 9 (2014) 11, <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0473-9-11>.
- [23] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [24] K.E. Varley, J. Gertz, K.M. Bowling, S.L. Parker, T.E. Reddy, F. Pauli-Behn, et al., Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues, *Genome Res.* 23 (2013) 555–567, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.147942.112>.
- [25] M. Bibikova, B. Barnes, C. Tsan, V. Ho, B. Klotzle, J.M. Le, et al., High density DNA methylation array with single CpG site resolution, *Genomics* 98 (2011) 288–295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>.
- [26] M.M. Hill, M. Bastiani, R. Luettnerforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.J. Nixon, et al., PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function, *Cell* 132 (2008) 113–124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042>.
- [27] W. Kwok, S.H. Lee, C. Culbertson, K. Kornyszczuk, M.G. Clemens, Caveolin-1 mediates endotoxin inhibition of endothelin-1-induced endothelial nitric oxide synthase activity in liver sinusoidal endothelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297 (2009) G930–G939.
- [28] D.M. Lerman, M.J. Monument, E. McIlvaine, X. Liu, D. Huang, L. Monovich, et al., Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group, *Pediatr. Blood Cancer* 62 (2015) 759–765, <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.25340>.
- [29] H. Kovar, G. Jug, D.N. Aryee, A. Zoubek, P. Ambros, B. Gruber, et al., Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors, *Oncogene* 15 (1997) 2225–2232, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1201397>.
- [30] L. Dauphinot, C. De Oliveira, T. Melot, N. Sevenet, V. Thomas, B.E. Weissman, et al., Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression, *Oncogene* 20 (2001) 3258–3265, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204437>.
- [31] G. Barone, D.A. Tweddle, J.M. Shohet, L. Chesler, L. Moreno, A.D.J. Pearson, et al., MDM2-p53 interaction in paediatric solid tumours: preclinical rationale, biomarkers and resistance, *Curr. Drug Targets* 15 (2014) 114–123.
- [32] D. Volonte, F. Galbiati, Polymerase I and transcript release factor (PTRF)/cavin-1 is a novel regulator of stress-induced premature senescence, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 28657–28661, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C111.235119>.
- [33] M.S. Bitar, S.M. Abdel-Halim, F. Al-Mulla, Caveolin-1/PTRF upregulation constitutes a mechanism for mediating p53-induced cellular senescence: implications for evidence-based therapy of delayed wound healing in diabetes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305 (2013) E951–E963, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2013>.
- [34] D.W. Meek, Regulation of the p53 response and its relationship to cancer, *Biochem. J.* 469 (2015) 325–346, <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20150517>.
- [35] P.T. Hennessey, M.F. Ochs, W.W. Mydlarz, W. Hsueh, L. Cope, W. Yu, et al., Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts, *PLoS One* 6 (2011) e20584, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020584>.
- [36] N. Patel, J. Black, X. Chen, A.M. Marcondes, W.M. Grady, E.R. Lawlor, et al., DNA methylation and gene expression profiling of Ewing sarcoma primary tumors reveal genes that are potential targets of epigenetic inactivation, *Sarcoma* 2012 (2012) 498472, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/498472>.
- [37] M.T. Simpson, I. Venkatesh, B.L. Califf, L.K. Thiel, D.M. Coley, K.N. Winsor, et al., The tumor suppressor HHEX inhibits axon growth when prematurely expressed in developing central nervous system neurons, *Mol. Cell Neurosci.* 68 (2015) 272–283, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2015.08.008>.
- [38] W. Yan, N. Xu, X. Han, X.-M. Zhou, B. He, The clinicopathological significance of FHIT hypermethylation in non-small cell lung cancer, a meta-analysis and literature review, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19303, <http://dx.doi.org/10.1038/srep19303>.
- [39] G. Sanchez, D. Bittencourt, K. Laud, J. Barbier, O. Delattre, D. Auboeuf, et al., Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6004–6009, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710748105>.
- [40] Y.J. Choi, X. Li, P. Hydrbring, T. Sanda, J. Stefano, A.L. Christie, et al., The requirement for cyclin D function in tumor maintenance, *Cancer Cell* 22 (2012) 438–451, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.015>.
- [41] S. Kumari, Puneet, S.B. Prasad, S.S. Yadav, M. Kumar, A. Khanna, et al., Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer, *Med. Oncol.* 33 (2016) 40, <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-016-0754-8>.
- [42] S. Gómez, G. Castellano, G. Mayol, M. Suñol, A. Queiros, M. Bibikova, et al., DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights, *Epigenomics* 7 (2015) 1137–1153, <http://dx.doi.org/10.2217/epi.15.49>.
- [43] D. Aran, A. Hellman, DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition, *Cell* 154 (2013) 11–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.018>.
- [44] P.J. Scotting, D.A. Walker, G. Perilongo, Childhood solid tumours: a developmental disorder, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 481–488, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1633>.
- [45] W. Xie, M.D. Schultz, R. Lister, Z. Hou, N. Rajagopal, P. Ray, et al., Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells, *Cell* 153 (2013) 1134–1148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.022>.
- [46] F. Tirode, K. Laud-Duval, A. Prieur, B. Delorme, P. Charbord, O. Delattre, Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors, *Cancer Cell* 11 (2007) 421–429, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.02.027>.
- [47] X. Rao, J. Evans, H. Chae, J. Pilrose, S. Kim, P. Yan, et al., CpG island shore methylation regulates caveolin-1 expression in breast cancer, *Oncogene* 32 (2013) 4519–4528, <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2012.474>.
- [48] T. Timmel, S. Kunz, F. Seifert, M. Schuelke, S. Spuler, Cavin 1 function does not follow caveolar morphology, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308 (2015) C1023–C1030, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2014>.
- [49] U.E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia, M.P. Lisanti, Caveoleae and signalling in cancer, *Nat. Rev. Cancer* 15 (2015) 225–237, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3915>.
- [50] M. Bastiani, L. Liu, M.M. Hill, M.P. Jedrychowski, S.J. Nixon, H.P. Lo, et al., MURC/cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 1259–1273, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200903053>.
- [51] C.S. Aung, M.M. Hill, M. Bastiani, R.G. Parton, M.-O. Parat, PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: role of matrix metalloproteinase 9, *Eur. J. Cell Biol.* 90 (2011) 136–142, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.004>.
- [52] N. Briand, C. Prado, G. Mabileau, F. Lasnier, X. Le Lièpvre, J.D. Covington, et al., Caveolin-1 expression and cavin stability regulate caveoleae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation, *Diabetes* 63 (2014) 4032–4044, <http://dx.doi.org/10.2337/db13-1961>.
- [53] N. Chaudhary, G.A. Gomez, M.T. Howes, H.P. Lo, K.-A. McMahon, J.A. Rae, et al., Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis, *PLoS Biol.* 12 (2014) e1001832, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001832>.
- [54] Z.D. Nassar, M.M. Hill, R.G. Parton, M.-O. Parat, Caveola-forming proteins caveolin-1 and PTRF in prostate cancer, *Nat. Rev. Urol.* 10 (2013) 529–536, <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2013.168>.
- [55] A. van Bokhoven, M. Varella-Garcia, C. Korch, W.U. Johannes, E.E. Smith, H.L. Miller, et al., Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines, *Prostate* 57 (2003) 205–225, <http://dx.doi.org/10.1002/pros.10290>.
- [56] O.M. Tirado, C.M. MacCarthy, N. Fatima, J. Villar, S. Mateo-Lozano, V. Notario, Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 426–436, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24754>.
- [57] C. Trimmer, D. Whitaker-Menezes, G. Bonuccelli, J.N. Milliman, K.M. Daumer, A.E. Aplin, et al., CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway, *Cancer Res.* 70 (2010) 7489–7499, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0900>.
- [58] W.-T. Chiu, H.-T. Lee, F.-J. Huang, K.D. Aldape, J. Yao, P.S. Steeg, et al., Caveolin-1 upregulation mediates suppression of primary breast tumor growth and brain metastases by stat3 inhibition, *Cancer Res.* 71 (2011) 4932–4943, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4249>.

Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway

Laura Lagares-Tena¹, Silvia García-Monclús¹, Roser López-Aleman¹, Olga Almacellas-Rabaiget¹, Juan Huertas-Martínez¹, Miguel Sáinz-Jaspeado¹, Silvia Mateo-Lozano², Carlos Rodríguez-Galindo³, Santiago Rello-Varona¹, David Herrero-Martín¹, Oscar M. Tirado¹

¹Sarcoma Research Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

²Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

³Pediatric Hematology/Oncology, Dana-Farber/Boston Children's Cancer and Blood Disorders Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence to: Oscar M. Tirado, **email:** omartinez@idibell.cat

Keywords: caveolin-1, Ewing sarcoma, metastasis, mmp9, mapk

Received: December 22, 2015

Accepted: July 18, 2016

Published: July 28, 2016

ABSTRACT

Ewing sarcoma (ES) is a bone and soft tissue sarcoma affecting mostly children and young adults. Caveolin-1 (CAV1) is a well-known target of EWS/FLI1, the main driver of ES, with an oncogenic role in ES. We have previously described how CAV1 is able to induce metastasis in ES via matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). In the present study we showed how CAV1 silencing in ES reduced MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation. Accordingly, chemical inhibition of MEK1/2 resulted in reduction in MMP-9 expression and activity that correlated with reduced migration and invasion. IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 (IQGAP1) silencing reduced MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation and MMP-9 expression. Furthermore, IQGAP1 silenced cells showed a marked decrease in their migratory and invasive capacity. We demonstrated that CAV1 and IQGAP1 localize in close proximity at the cellular edge, thus IQGAP1 could be the connecting node between CAV1 and MEK/ERK in ES metastatic phenotype. Analysis of the phosphorylation profile of CAV1-silenced cells showed a decrease of p-ribosomal protein S6 (RPS6). RPS6 can be phosphorylated by p90 ribosomal S6 kinases (RSK) proteins. CAV1-silenced cells showed reduced levels of p-RSK1 and treatment with U0126 provoked the same effect. Despite not affecting ERK1/2 and RPS6 phosphorylation status neither MMP-9 expression nor activity, RSK1 silencing resulted in a reduced migratory and invasive capacity *in vitro* and reduced incidence of metastases *in vivo* in a novel orthotopic model. The present work provides new insights into CAV1-driven metastatic process in ES unveiling novel key nodes.

INTRODUCTION

ES is the second most common bone tumor in children and adolescents. This tumor is very aggressive and highly metastatic. Approximately, one third of ES patients present metastasis at diagnosis, being lung and bone marrow the most common sites. The treatment and prognosis of ES patients are determined among other factors by the presence of metastases. The 5-year

survival rate of metastatic patients ranges from 20 to 45% depending on location (lung and bone/bone marrow respectively), compared to 60-70% of those with localized disease [1]. Therefore, in order to find new therapeutic targets, further advances in the knowledge of ES metastatic key regulators are mandatory.

ES tumors have a distinctive chromosomal translocation that gives rise to a fusion protein, most commonly EWS/FLI1 (85% of cases) [2, 3]. These fusion

proteins act as aberrant transcription factors, deregulating the expression of several target genes, therefore affecting different pathways involved in the initiation, maintenance and progression of the tumor [4-6]. Our group has previously described CAV1 as one of these target genes, demonstrating its role in the malignant phenotype of ES [7], promoting cell proliferation [8], angiogenesis [9], metastasis [10] and chemotherapy resistance [11].

Matrix metalloproteinases (MMPs) are implicated in extracellular matrix remodeling and have been related to metastasis progression [12-13]. Especially MMP-9 has been related to tumor aggressiveness in different tumor types, including sarcomas [14]. In ES CAV1 seems to regulate indirectly MMP-9 transcription [10], thus promoting tumor metastasis. MEK/ERK is a pathway constitutively activated in ES [15], thus ERK1/2 could be a putative mediator of CAV1 pro-invasive role. Hence, the goal of this study is to further understand the mechanism through which CAV1 exerts its role in ES metastatic behavior.

RESULTS

MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation is reduced in CAV1-knockdown cells

The MEK/ERK pathway has been previously related with *MMP-9* expression and regulation of invasion [16]. As A673 ES cells bear an activating mutation (V599E) in *B-Raf*, ERK1/2 could be a good candidate for MMP-9 regulation [17]. As expected, we detected in A673 cells more phosphorylated ERK1/2 than in other ES cell lines harbouring the same EWS/FLI1 fusion type (TC71, TC252, RH1, EW7) (Figure 1A). Moreover, we found a decrease in ERK1/2 phosphorylation in our previously published CAV1-knockdown models (Figure 1B). We also observed a reduction in the phosphorylated form of the direct activator of ERK1/2, MEK1/2 (Figure 1B). These results correlated with an inhibition of MMP-9 at the transcriptional level (Supplementary Figure S1) [10].

We further investigated the involvement of MEK/ERK pathway in the reduced invasive phenotype described in CAV1-knockdown ES models [10]. We treated A673 and TC71 cells with a specific MEK1/2 inhibitor, U0126. As expected, after 24 h we observed a decrease in MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation levels as shown in Figure 2A. The same inhibitory effect was confirmed in *MMP-9* expression and proteolytic activity (Figure 2B and 2C). Additionally, U0126-treated cells migrated significantly less than the untreated ones (Figure 2D) and showed a lower invasive capacity (Figure 2E), thus partially reproducing the observed phenotype in CAV1-silenced cells. These observations strongly suggest that p-ERK1/2 could be implicated in

the CAV1-dependent regulation of MMP-9 transcription in ES cells.

IQGAP1 links CAV1 and MEK/ERK in ES migration and invasion

IQGAP1 has been involved in invasion [18] and linked to ERK2 modulating its activity [19]. Thus, IQGAP1 could be playing a similar role in ES. First, we checked that all ES cell lines expressed IQGAP1 (Figure 3A). Then, we obtained a stable silencing model of IQGAP1 in the ES cell line A673. IQGAP1-silenced cells showed a reduction in p-MEK1/2 and p-ERK1/2 levels (Figure 3B). Likewise, knockdown of IQGAP1 diminished *MMP-9* expression and the migratory and invasive capacity of A673 cells (Figure 3C-3E). Finally, by sucrose gradient and co-immunofluorescence (IF) experiments in A673 and TC71 cells we were able to show a close pattern of distribution of IQGAP1 and CAV1 at the cellular edge, particularly in membrane protrusions (Figure 3F and 3G). These results suggest that IQGAP1 could be acting as a scaffold between CAV1 and MEK/ERK pathway in the metastatic phenotype of ES cells.

RPS6 and RSK1 phosphorylation is decreased in CAV1-silenced cells

The activation of ERK1/2 pathway can be triggered by different membrane receptors [20]. We analyzed the phosphorylation profile of the A673 CAV1-knockdown model focusing on several Tyrosine kinases receptors, as well as different intracellular signaling nodes. Surprisingly, the only significant change that we were able to detect was a reduction in RPS6 phosphorylation (Figure 4A) (Supplementary Table S1). The decrease in p-RPS6 was then confirmed in two CAV1-silenced models (Figure 4B). Both RPS6 and p-RPS6 are well expressed in ES cell lines (Figure 4C). We proceeded to check, by immunohistochemistry (IHC), the status of p-RPS6 in a tissue microarray (TMA) of 26 ES patients [21-22]. We found a significant correlation between high p-RPS6 levels and prolonged survival of ES patients (Supplementary Figure S2, Supplementary Table S2). Although RPS6 is described as a main target of the mTOR pathway it can also be phosphorylated on Ser235/236 by RSK proteins in an ERK1/2-dependent manner [23]. RSK family proteins are involved in several cellular functions such as cell cycle regulation, migration and survival [24-25]. RSK family comprises four members, RSK1-4, that can be phosphorylated by ERK1/2 [24]. ES cell lines express similar levels of RSK1 although there are higher variations regarding RSK2 (Figure 5A and 5B); however, neither RSK3 nor RSK4 were detected (data not shown). We could appreciate clear differences in the

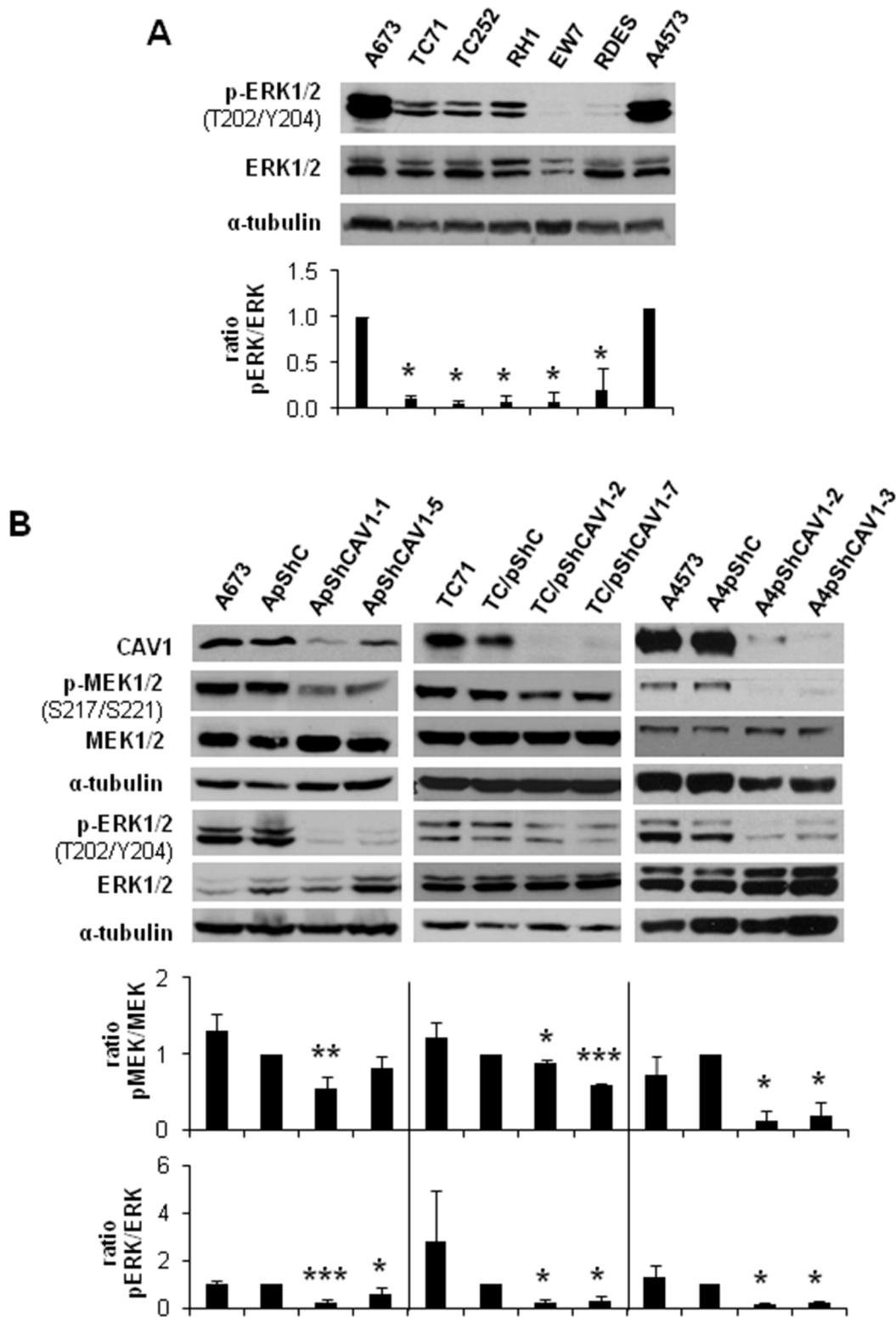


Figure 1: MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation is reduced in CAV1-knockdown cells. A. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of ERK1/2 in different ES cell lines. B. Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in A673, TC71 and A4573 CAV1-silenced models. α -tubulin was used as loading control. Quantification of the phosphorylated vs. total ratios is shown below each set of blots. Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

phosphorylation status of RSK1 and RSK2 among the ES cell lines tested (Figure 5A and 5B). We focused our attention in the expression and phosphorylation status of RSK1 in A673 and TC71 CAV1-silenced models. RSK1 phosphorylation levels were reduced in shCAV1 cells (Figure 5C). Furthermore, when treated during 24 h with U0126, not only RSK1 but also RPS6 phosphorylation levels were reduced in both cell lines (Figure 5D).

RSK1 silencing did not affect RPS6 phosphorylation nor *MMP-9* expression and activity

As we observed lower RSK1 phosphorylation in CAV1-knockdown cells, we analyzed the specific role of this protein in the CAV1-dependent *MMP-9* regulation in ES cells. With that purpose, we established a specific

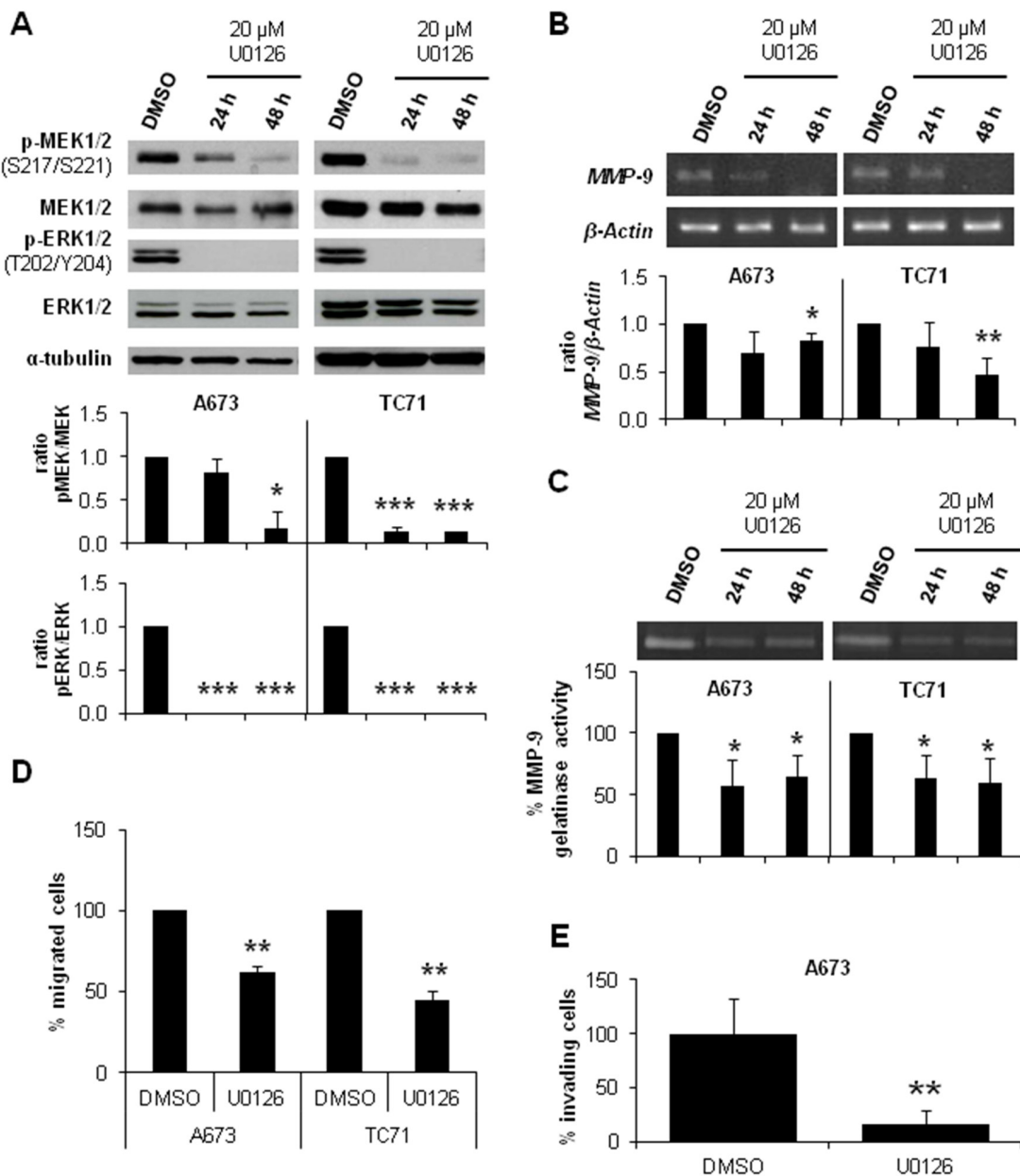


Figure 2: MEK1/2 inhibitor U0126 reduced *MMP-9* expression and activity and diminished migration and invasion in ES cell lines. **A.** Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in A673 and TC71 cell lines treated with vehicle (DMSO) or 20 μ M U0126. Quantification of the phosphorylated vs. total ratios is shown below the blot. **B.** Semi-quantitative RT-PCR and corresponding quantifications showing *MMP-9*/ β -Actin ratio in A673 and TC71 cell lines treated with vehicle (DMSO) or 20 μ M U0126. **C.** Zymogram and corresponding quantification of the *MMP-9* gelatinase activity in A673 and TC71 cell lines treated with vehicle (DMSO) or 20 μ M U0126. **D.** Quantification of the transwell migratory capacity of A673 and TC71 treated cells (U0126) regarding their controls (DMSO). **E.** Quantification of the matrigel-coated transwell invasive capacity of A673 and TC71 treated cells (U0126) regarding their controls (DMSO). Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

and stable RSK1-knockdown model in the A673 cell line. RSK1 silencing was effectively achieved without affecting RSK2 levels (Figure 6A). RSK1 interference did not cause any variation in the phosphorylation

levels of ERK1/2 and RPS6 (Figure 6B) neither in *MMP-9* expression and/or activity (Figure 6C and 6D). Nonetheless, RSK1-knockdown seemed to affect the migratory and the invasive capacity of shRSK1 A673

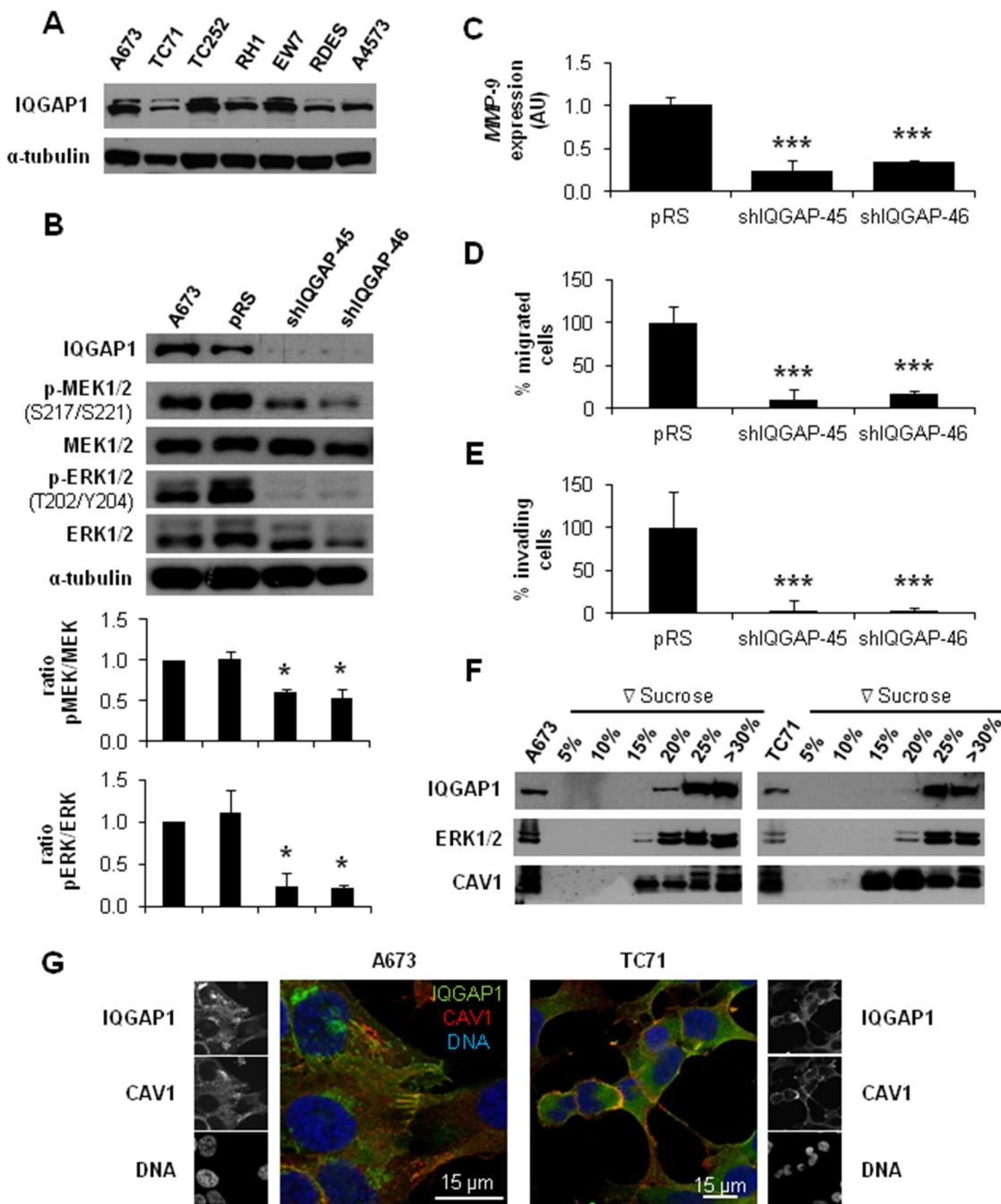


Figure 3: IQGAP1 intermediates in CAV1-regulation of migratory and invasive capacity of ES cells. **A.** Representative western blot showing the expression levels of IQGAP1 in different ES cell lines. **B.** Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in IQGAP1-interfered cells. α -tubulin was used as loading control in every panel. Quantification of the phosphorylated vs. total ratios is shown below each set of blots. **C.** Quantitative real time RT-PCR showing *MMP-9* levels (β -Actin as reference) in A673 shIQGAP1 model. **D.** Quantification of the transwell migratory capacity in A673 IQGAP1-interfered cells. **E.** Quantification of the matrigel-coated transwell invasive capacity in A673 IQGAP1-silenced model. **F.** Western blot of IQGAP1, ERK1/2 and CAV1 in sucrose gradient separation phases from A673 (left) and TC71 (right) cell lines. **G.** Confocal imaging showing IQGAP1 (green) and CAV1 (red) in A673 (left) and TC71 (right) cell lines. Scale bar 15 μ m. Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

cells *in vitro* as both were drastically diminished (Figure 6E and 6F). Although RPS6 phosphorylation and *MMP-9* regulation in ES seems to be independent of RSK1 these results confirmed the important role of RSK1 in ES migration and invasion.

RSK1 silencing reduced the incidence of metastases *in vivo*

Our *in vitro* results suggest that RSK1 might have effects on migration and invasion of ES cells. Both steps are crucial for the occurrence of metastasis. Therefore,

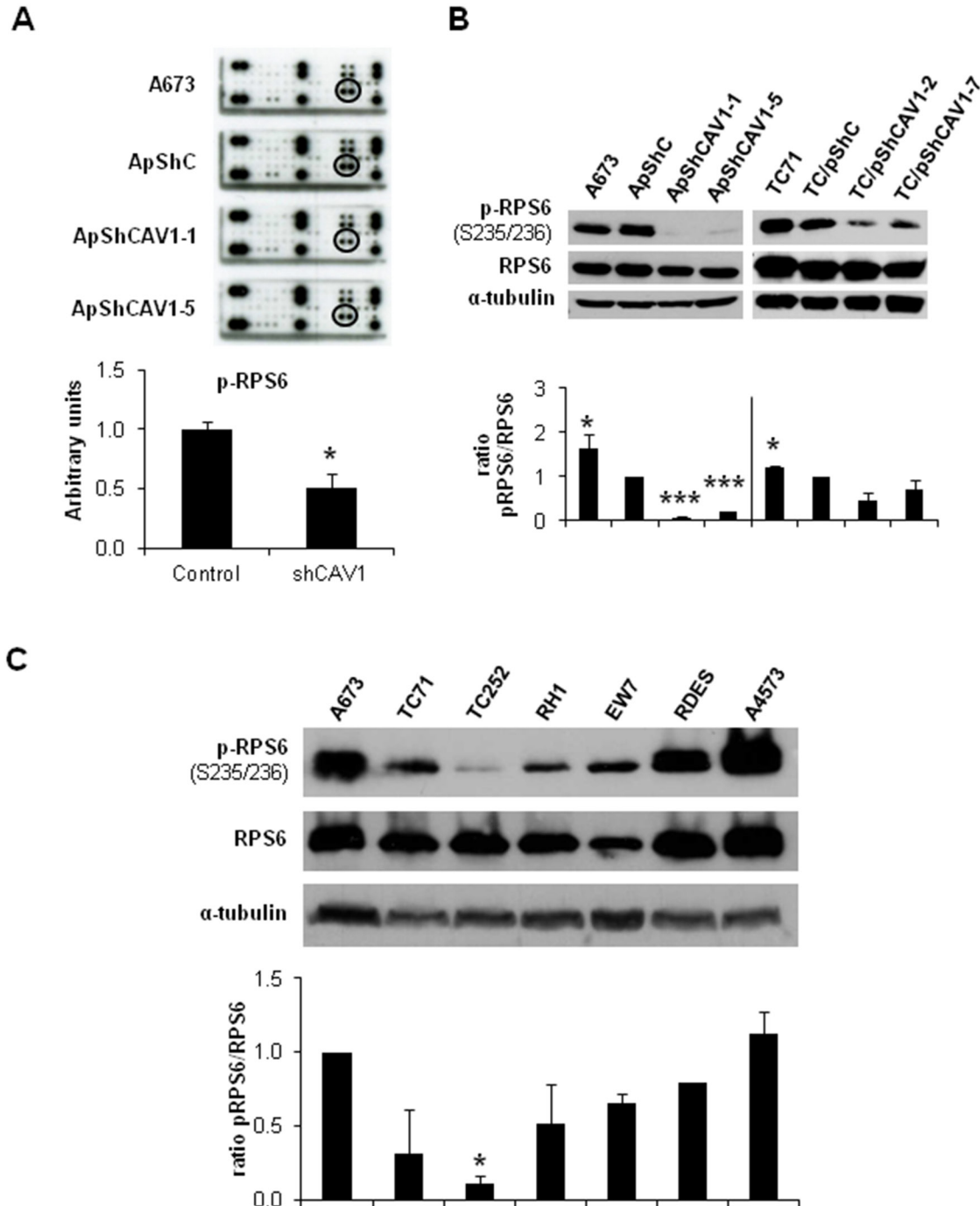


Figure 4: RPS6 phosphorylation is decreased in CAV1-silenced cells. A. RTK Signaling Antibody Array performed with A673 CAV1-knockdown model. Quantification data of p-RPS6 expression corresponds to the circled spots. B. Representative blots of RPS6, either total or phosphorylated, in shCAV1 models. α -tubulin was used as loading control. C. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of RPS6 in different ES cell lines. α -tubulin was used as loading control. Quantification of the phosphorylated vs. total ratios is shown below each set of blots. Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

we sought whether RSK1 silencing has any effect *in vivo* using an experimental metastatic assay. This first attempt based on i.v. injection of A673 RSK1-knockdown cells failed to show any difference on lung colonization (Supplementary Figure S3). Thus, we developed a modified version of a previously described orthotopic model [26], as we consider that this new methodological approach recapitulates more accurately the steps of

metastasis in ES patients. Cells were injected into the gastrocnemius muscles of BALB/*c^{nu/nu}*. Once primary tumor-bearing limbs reached a volume of 800 mm³, gastrocnemius muscles were surgically resected to reduce morbidity associated with excessive tumor growth and to allow metastases to form. A summary of the model and images of each step are depicted in Figure 7A and 7B. For all the different types of cells injected (shRSK1 vs.

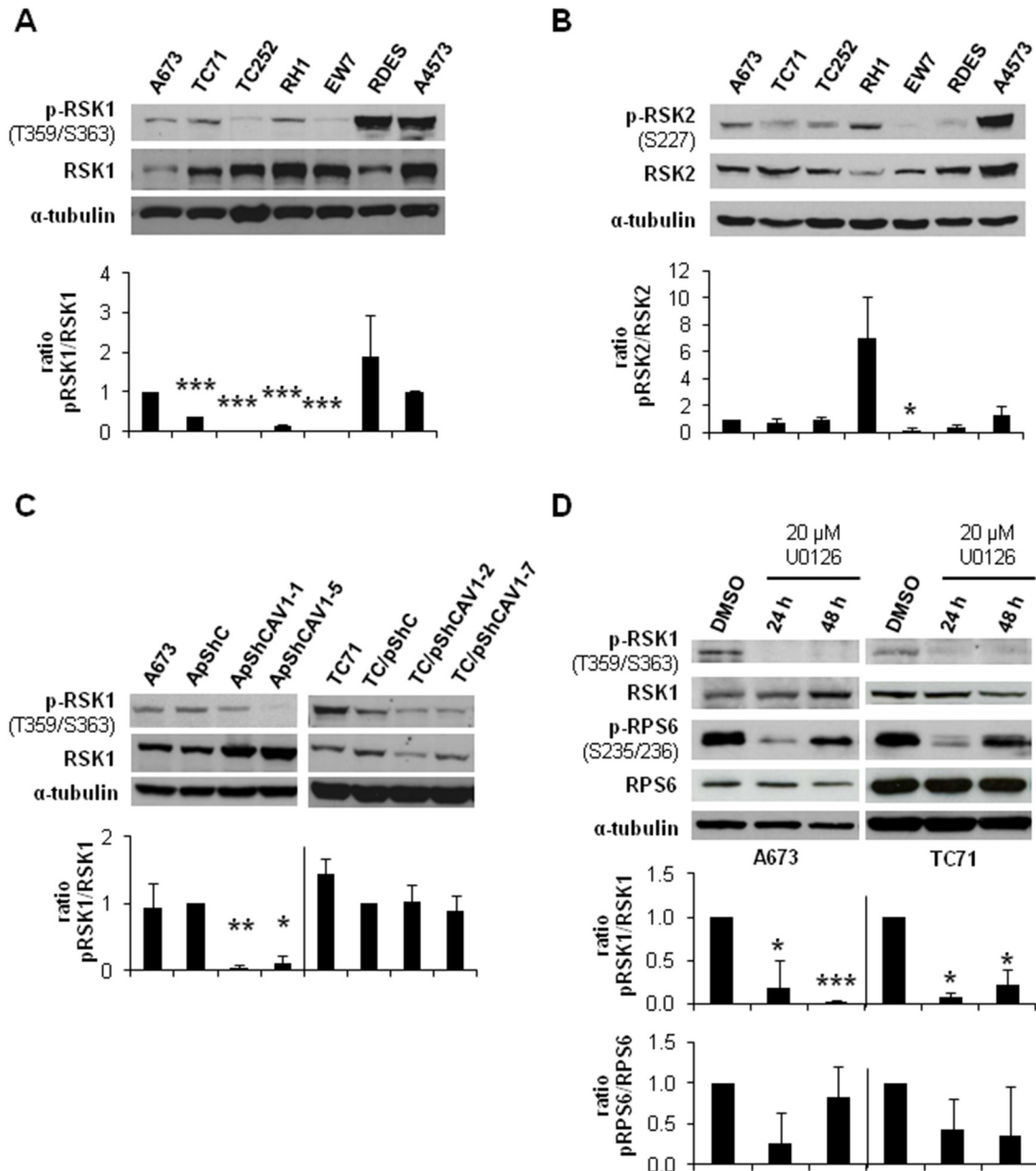


Figure 5: CAV1-knockdown and MEK1/2 inhibition reduced RSK1 phosphorylation levels. A. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of RSK1 in different ES cell lines. B. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of RSK2 in different ES cell lines. C. Representative blots of RSK1, either total or phosphorylated, in shCAV1 models. D. Representative blots of RSK1 and RPS6, either total or phosphorylated, in A673 and TC71 cell lines treated with vehicle (DMSO) or 20 μM U0126. α-tubulin was used as loading control in every panel. Quantification of the phosphorylated vs. total ratios is shown below each set of blots. Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

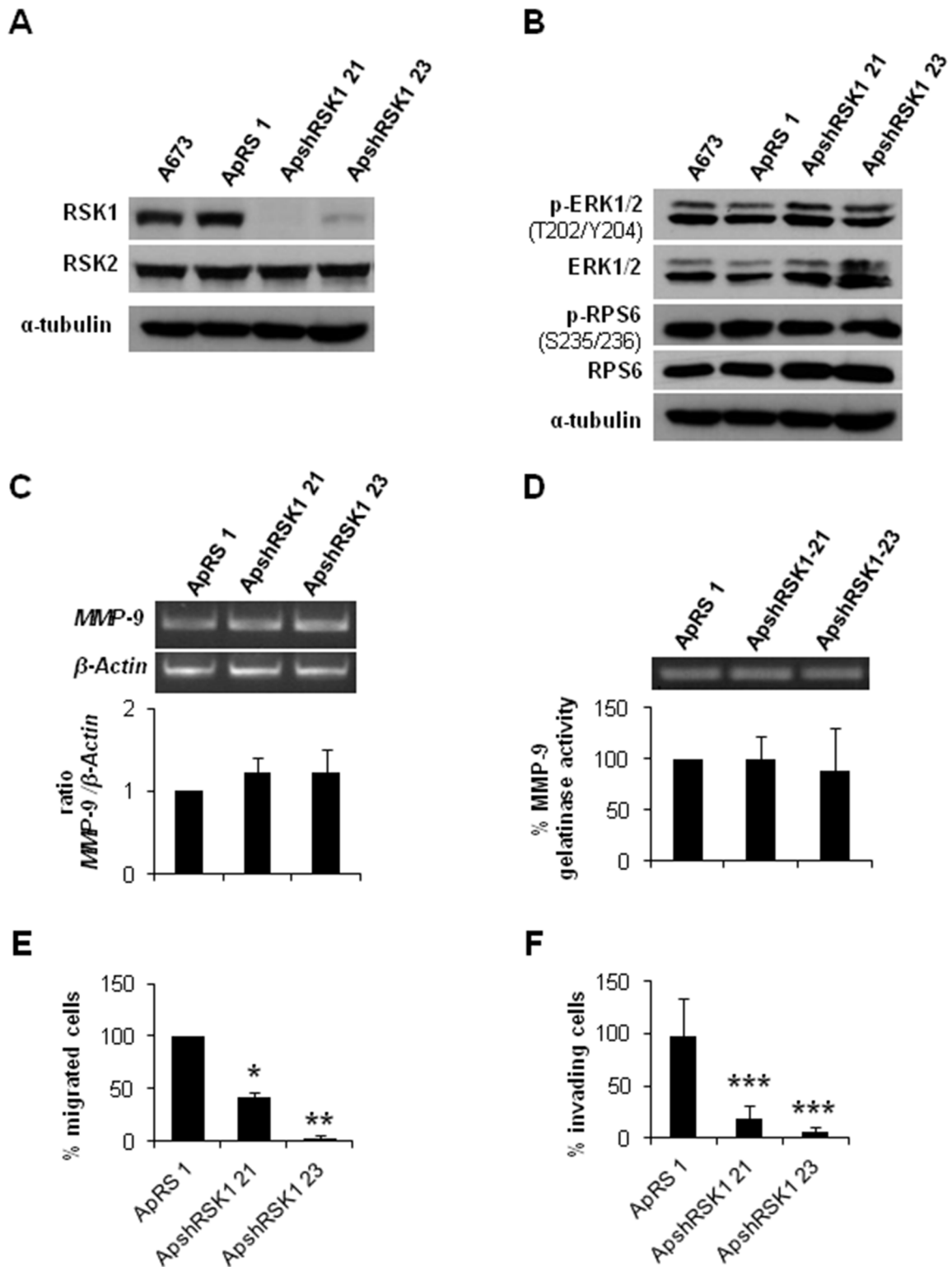


Figure 6: RSK1 silencing did not affect *MMP-9* expression but abrogate both migration and invasion of ES cells. A. Immunoblot of RSK1 expression levels in A673 shRSK1. **B.** Representative blots of RSK1 and RPS6, either total or phosphorylated, in RSK1-silenced cells. α -tubulin was used as loading control. **C.** Semi-quantitative RT-PCR and corresponding quantification showing *MMP-9*/ β -Actin ratio in A673 RSK1-knockdown model. **D.** Zymogram and corresponding quantification of the *MMP-9* gelatinase activity in A673 shRSK1 cells. **E.** Quantification of the transwell migratory capacity of A673 RSK1-interfered cells. **F.** Quantification of the matrigel-coated transwell invasive capacity of A673 RSK1-knockdown low expression model. Statistical significance was achieved by the Student's *t* test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$ *** $p < 0.0001$.

control), the frequency of primary tumor occurrence was 100%, thus showing no differences regarding growth rate or tumor size. Tumors were extracted between 18-20 days after inoculation and mice were sacrificed 60 days post-injection, lungs extracted and the number of metastases counted. After histological examination of the lungs, 83% of mice injected with control cells showed presence of

metastases, while in RSK1-silenced clones the metastases incidence was reduced to 33.33 % and 28.57% (Figure 7C and 7D). These *in vivo* results are in concordance with those obtained *in vitro*, as RSK1 silencing has a drastic effect on migration and invasion and point to RSK1 as a key pro-metastatic agent in ES.

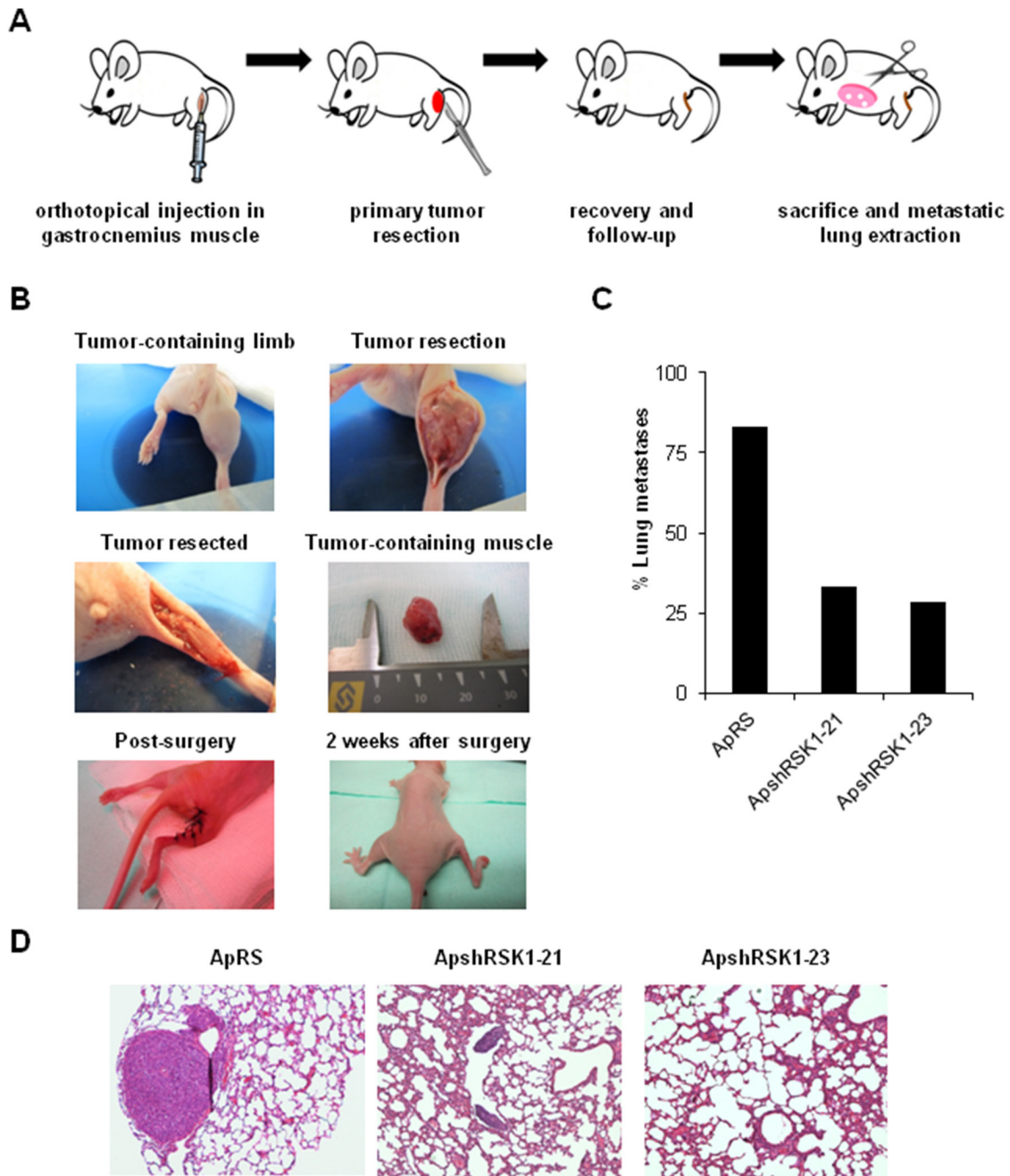


Figure 7: RSK1 silencing reduced the incidence of metastases *in vivo* in an ES orthotopic xenograft model. A and B. Scheme and pictures depicting A673 RSK1-knockdown model after orthotopic implantation inside gastrocnemius muscle and removal of muscle after primary tumor growth. **C.** Lung metastasis incidence in A673 RSK1-silenced cells after primary tumor removal. **D.** Representative images of lungs recovered from mice orthotopically injected with A673 shRSK1 cells (magnification, $\times 100$). Drawings in Figure 7A are adapted from graphics deposited in Wikimedia Commons and Servier Medical Art under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

DISCUSSION

We have previously reported the oncogenic and pro-invasive role of CAV1 in ES and how *MMP-9* expression is reduced once CAV1 is silenced [7, 10]. MEK/ERK pathway is involved in several cellular processes as cell adhesion, cell cycle regulation, migration, survival, differentiation, proliferation, metabolism and/or protein expression [27]. *MMP-9* regulation through ERK1/2 has been well characterized in a variety of cellular models [16, 28-29]. ERK1/2 is activated and has been related to metastasis in several cancers as hepatocellular carcinoma [30], lung cancer [31] or colorectal carcinoma [32]. Besides, constitutive activation of this pathway has been described in ES [15, 33]. ERK1/2 activity is regulated by CAV1 in different tumor types. For example CAV1 silencing results in a decrease in ERK1/2 phosphorylation in colon cancer [34] and in metastatic lung cancer cells [35].

In the present work we have verified the activation of ERK1/2 in most of ES cell lines and how the phosphorylated forms of ERK1/2 and its precursor MEK1/2 were reduced in CAV1-silenced ES cells. Moreover, when treated with MEK1/2 inhibitor U0126, A673 and TC71 cells showed, besides p-MEK1/2 and p-ERK1/2 inhibition, lower *MMP-9* expression, reduced proteolytic activity and cellular migration and invasion were impeded. These results are the same previously described in the CAV1-knockdown models [10]; thus we have found a correlation in ES between MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation inhibition and a reduction in *MMP-9* expression and proteolytic activity. ERK1/2 has been linked with important targets of EWS/FLI-1 as IGF-1 [36] or tumor suppressor LOX [37]. Indeed, U0126 increased sensitivity to IGF-1R antibody figitumumab while MEK/ERK activation via p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) contributes to IGF1R-related therapies resistance in metastatic ES [38-39]. All these facts give evidence of the crucial role of MEK/ERK pathway in the pro-metastatic effect that CAV1 exerts through *MMP-9* in ES cells.

IQGAP1 has been described as a scaffold for MAPK signaling pathway [40]. Scaffold proteins coordinate many intracellular signaling processes assuring the correct flow of information inside the cell [41]. IQGAP1 behaves as a modulator of several cellular mechanisms as cytoskeleton organization or cellular adhesion, interacts with ERK2 and MEK1/2 [19, 40] and has been associated with proliferation [42] and invasion [43]. First, we verified the expression of IQGAP1 in the ES cell lines. Stable silencing of IQGAP1 in A673 cells resulted in a reduction in p-MEK1/2 and p-ERK1/2 levels besides a marked decrease of *MMP-9* expression, migration and invasion. We showed that IQGAP1 and CAV1 share localization at membrane protusions in ES cells. These results suggest that IQGAP1 could be the hub connecting CAV1 and

MEK/ERK in ES as it has been already described in other neoplasias [44].

Analysis of the phosphorylation profile of A673 shCAV1 model revealed a reduction in RPS6 phosphorylation as the only significant change among Tyr-kinase receptors. Lower p-RPS6 levels were also detected in TC71 shCAV1 cells. RPS6 is a cytoplasmic 40S ribosomal protein that belongs to the S6E family of ribosomal proteins. RPS6 is a major substrate in the ribosome of protein kinases and it is involved in cell growth and proliferation via translation of specific mRNAs [23]. In six of the seven ES cell lines checked RPS6 was phosphorylated. In a set of ES patients we observed a positive correlation between high p-RPS6 levels and improved survival. Our observation is in agreement with what it has been previously described in other ES patients set: the association between p-mTOR protein overexpression and better survival [39].

RPS6 can be phosphorylated on Ser235/236 by RSK proteins in an ERK1/2-dependent manner [23]. The four RSK isoforms have been implicated in several neoplasias [24]. Although ES cell lines show almost the same level of RSK1 there are evident differences within them concerning the phosphorylation forms of RSK1 and RSK2. CAV1 silencing in A673 and TC71 cells diminished p-RSK1 as U0126 treatment did. A673 and TC71 cells treatment with U0126 during 24 h caused also a decrease in phospho-RPS6 levels but were recovered 24 h later. We could not detect any p-RPS6 variation in A673 RSK1-knockdown cells regarding controls, thus in ES RPS6 phosphorylation seems to be RSK1-independent. RSK1-knockdown did not change p-ERK1/2 levels and neither affected *MMP-9* expression or activity. Therefore, RSK1 seems not to be implicated in *MMP-9* regulation in ES. Nevertheless, RSK1 is affecting the migratory and invasive capacity of A673 cells. Our results agree with previous studies that show the crucial role of RSK1 in the migratory phenotype of epithelial [45] or melanoma cells, promoting migration through RhoA inhibition [46]. Conversely, in lung cancer cells RSK1 silencing increases cell motility [47]. So, RSK1 may have contrary effects on migration capacity depending on the cellular background, being proactive in ES cells. RSK1 inhibition did not affect p-ERK1/2 and p-RPS6 status and neither *MMP-9* expression nor its activity. Moreover, the experimental metastasis model showed no differences between RSK1 silenced cells and controls, suggesting that RSK1 has no role on the ability of lung colonization of ES cells. However, we could verify in a new orthotopic model that the metastatic capacity of A673 shRSK1 cells is not only reduced *in vitro* but also *in vivo*. Therefore, our results point to RSK1 as an important pro-metastatic player in ES as it has been previously described in other tumors [48-49]. We are also presenting for the first time this modified version of a previously described orthotopic model [26]. We believe that this orthotopic model recapitulates

more closely the metastatic steps in ES as the primary tumor grows in its natural environment. Resection of the gastrocnemius is a low-aggressive surgery that allows the survival of the mice with a normal mouse life for a period long enough for the development of distant metastases. Thus, this animal model may become a valuable experimental tool to analyze metastatic potential not only in ES but in other sarcomas too.

In summary, we demonstrate that CAV1 regulates the expression and activity of *MMP-9* through the MEK/ERK pathway in ES being IQGAP1 the putative connecting node. We have also unveiled RPS6 as an important signaling node under CAV1 influence. Moreover we showed that RSK1 is a key player in ES metastasis. A full comprehensive understanding of ES metastatic process is mandatory to develop novel therapeutic strategies. Thus, as several clinically tested MEK/ERK inhibitors are available, ES patients could benefit from their application.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and stable transfections

A673, TC252 (gifts from Dr. Heinrich Kovar, Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria), RH1 (gift from Dr. Peter Houghton, Greehey Children's Cancer Research Institute, San Antonio, Texas, USA), EW7 (gift from Dr. Olivier Delattre, Institut Curie, Paris, France), A4573 (gift from Dr. Santiago Ramón y Cajal, Hospital Universitari Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain), TC71 and RD-ES (bought from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) cell lines were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen). All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air and checked regularly for mycoplasma infection. Exponentially growing cells within two sequential passages were used for all experiments. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the protocols of the manufacturer. Transfected cells were selected with 0.4 mg/mL neomycin (Invitrogen) or 0.5 µg/mL puromycin (Sigma-Aldrich) for 14 days. CAV1 silencing was done as previously described [10]. pRS-shRNA anti-RSK1 was bought from OriGene. Antibiotic-resistant pools and individual clones were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (0.4 mg/mL) or puromycin (0.5 µg/mL). For MEK1/2 inhibitor treatment, A673 and TC71 cells were seeded and after 24 h, cells were incubated with 20 µM U0126 (CAS number 109511-58-2, LC Laboratories) in absence of serum for 24 and 48 h. Then, medium was collected for zymography and cells were harvested for protein or RNA extraction (described below).

Western blot

ES cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Buffer, Thermo Scientific) containing protease inhibitors (complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (PhosStop, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and centrifuged at 13,000 g, at 4 °C, for 30 minutes. The protein content of the supernatants was determined with the BCA assay system (Pierce). Lysate aliquots (50 µg) were resolved by 8, 10 or 12% SDS-PAGE (depending on the size of the protein that was analyzed) and transferred onto nitrocellulose membranes (0.2 mm, Bio-Rad). After blocking with 5% skimmed milk in Dulbecco's PBS (DPBS) containing 0.1% Tween20 at room temperature for 1 h, membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody (CAV1 #610059 from BD Transduction Lab; ERK1/2 #4695, Phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204 #4376, MEK1/2 #4694, Phospho-MEK1/2 Ser217/221 #9154, RPS6 #2217, Phospho-RPS6 Ser235/236 #4858, RSK1 #9333, Phospho-RSK1 Thr359/Ser363 #9344, RSK2 #9340, Phospho-RSK2 Ser227 #3556 from Cell Signaling Technology, IQGAP1 #05-504 from Millipore). Blots were then incubated at room temperature for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit and goat anti-mouse) and the peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (Pierce) following the instructions of the manufacturer. Immunodetection of α -tubulin (#ab28439 from Abcam) was used as a loading reference. Measure of the intensity of the bands was done with Image J software (NIH).

Gelatin zymography

Metalloproteinase activity was analyzed by gelatin zymography. In brief, cells were cultivated in serum-free medium for 48 h. Conditioned medium was then collected and concentrated to one-tenth of its original volume and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels (10%) containing 120 µg/mL of gelatin. After electrophoresis, the gel was incubated for 60 minutes in 2.5% Triton X-100 and left overnight at 37°C in 50 mmol/L of Tris (pH 8.0)/5 mmol/L CaCl₂. Then, the gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue and destained with 10% isopropanol in 10% acetic acid, and the gelatinolytic activity was identified as transparent bands in the Coomassie brilliant blue-stained background. Measure of the intensity of the bands was done with Image J software (NIH).

Transwell migration assay

1.5×10⁵ cells in 150 µL free-serum media were added to the top chamber of 8 µm Costar polycarbonate transwells (Transwell Permeable Supports-Corning), while in the bottom chamber 500 µL of complete media were added. After 24 h for A673 and 36 h for TC71, cells on the upper membrane surface were removed and migratory cells

on the membrane underside were fixed using 70% ethanol and stained using 0.1% crystal violet solution (Invitrogen). The number of migrated cells (crystal violet stained ones) on the underside membrane was determined counting by optical microscopy. Data were presented as the average number of migratory cells in 5 high-power fields (100X). Each experiment was performed in triplicate, and then the data were averaged for statistical analysis.

Matrigel invasion assay

8 μ m Costar polycarbonate transwells (Transwell Permeable Supports-Corning) were coated with 50 μ l cold Matrigel (BD Biosciences) diluted 1:20 in RMPI 1640 and placed in a 37°C incubator for 6 h. Cells were seeded, stained and counted as in the migration assay, but stopping the reaction after 60 h.

Reverse transcription-PCR

Total RNA (2 μ g), extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Amplifications of *MMP-9* and *β -actin* were carried out using specific primers (forward primer GAGGAATACCTGTACCGCTATG, reverse primer CAAACCGAGTTGGAACCAC for *MMP-9*; forward primer CGGGACCTGACTGACTACCTC, reverse primer CTTCATTGTGCTGGGTGC for *β -actin*) designed using the Oligo 6.0 software (National Bioscience). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semi-quantitative estimation of relative mRNA abundance. Experiments were carried out at least twice.

Quantitative real time PCR

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed under universal cycling conditions on an ABI 7300HT instrument (Applied Biosystems) using commercially available *MMP-9* probe (Hs00234579_m1) and mastermix (all from Life Technologies). Cycle threshold (CT) values were normalized to *β -actin* (ACTB). Experiments were performed at least three times and in triplicates. Relative expression level of the target gene among the different samples was calculated using the $\Delta\Delta$ CT method [50]. Mean values and standard deviations were calculated based on the results of three biological replicates at least.

Receptor tyrosine kinase (RTK) phosphorylation array

Total protein extracts from A673 CAV1 knockdown cells were analyzed with PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Chemiluminescent Readout)

(Cell Signaling Technology #7982), that allows for the simultaneous detection of 28 receptor tyrosine kinases and 11 important signaling nodes, when phosphorylated at tyrosine or other residues. Manufacturer instructions were followed. Measure of the intensity of the bands was done with Image J software (NIH).

Sucrose gradient

Sucrose gradient was performed as described elsewhere [51]. Briefly, two 10 cm dishes of A673 and TC71 cells were washed twice with cold PBS and resuspended in 500 μ l of homogenization buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L sodium chloride, and 5 mmol/L EDTA), supplemented with 10 μ g/mL leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin. Cells were disrupted at 4°C by nitrogen cavitation in a cell disruption bomb (Parr Instrument Company) at 800 psi for 15 minutes and collected dropwise. Afterward, cells were passed back and forth through a 22-gauge needle 25 times at 4°C. Nuclei and unbroken cells were removed by centrifugation at 1,600 g in a MLA-130 rotor (Beckman Coulter) for 5 minutes at 4°C. The resulting supernatant (500 μ L) was mixed with an equal volume of 2.5 M sucrose and loaded at the bottom of a discontinuous sucrose gradient formed by layers of 200 μ L of 30, 25, 20, 15, 10, and 5% sucrose (wt/vol) freshly prepared in homogenization buffer. Gradients were centrifuged in a TLS-55 swinging-rotor (Beckman Coulter) without brake at 166,000 g for 3 h at 4°C. Five fractions of 280 μ l were collected from the top in addition to a final lower fraction of 700 μ L by using a CentriTube Slicer (Beckman Coulter). The gradients shown in the figures are representative of at least two independent experiments.

Immunofluorescence

For immunofluorescence, ES cells were cultured in sterile slides (Millicell EZ slide from Millipore) for 24 h until 60-70% confluence. Expression of CAV1 in ES was analyzed using a rabbit polyclonal antibody with a 1:1000 dilution (CAV1 #610059, BD). IQGAP1 expression was analyzed using an antibody at a 1:100 dilution (IQGAP1 #05-504, Millipore). Cells were fixed with 4% formaldehyde, washed thrice in Dulbecco's PBS (DPBS), permeabilized in 0.1% Triton for 2 minutes, blocked for 1 h in blocking buffer (10% fetal bovine serum in DPBS) and incubated with primary antibodies overnight. Cells were then washed thrice in DPBS for 5 minutes each followed by a 1 h incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit; Invitrogen). Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) for 5 minutes. Then, cells were washed twice in DPBS for 10 minutes and twice in distilled water for 10 minutes, and mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). Photographs were taken with a Leica TCS SP5 spectral

confocal microscope (argon, 405 diode and DPSS561 lasers) using a lambda blue 63×1.35 numerical aperture oil objective. Images were analyzed with the Image J software (NIH).

Tissue samples and immunohistochemistry

Tumor samples were processed and p-RPS6 expression analyzed as described elsewhere [10]. p-RPS6 was detected with a 1:400 dilution of a phospho-RPS6 Ser235/236 antibody (#4858, Cell Signaling Technology).

Experimental metastasis assay

The *in vivo* experimental metastasis model was performed as described previously [10]. Briefly, 2×10^6 cells resuspended in 100 μ L of saline solution were injected intravenously (i.v.) in the tail of athymic nude mice (BALB/c^{nu/nu}) purchased from Harlan. After 45 days mice were euthanized and lungs were excised for further analysis. Tumors were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Metastases were counted under an optical microscope. Data are given as mean \pm SD.

In vivo orthotopic xenograft model

2×10^6 cells resuspended in 0.1 mL of PBS were injected using a 25 gauge needle into the gastrocnemius muscles of 6 weeks old female athymic nude mice (BALB/c^{nu/nu}) from Harlan (n=7 for each clon). The growth of primary tumors was monitored by periodical measurements of the limb using a caliper. Tumor volume was calculated according to the formula ($L \times l^2/2$), where L is the longer diameter and l the shorter diameter. Once primary tumor-bearing limbs reached a volume of 800 mm³ (18-20 days after inoculation), gastrocnemius muscles were surgically resected to reduce morbidity associated with excessive tumor growth and to allow metastases to form. Mice were maintained anesthetized in a 3% isoflurane chamber during all the surgical procedure. Tumor-bearing gastrocnemius were identified by Achilles tendon and completely resected till the knee. Afterwards, the injury was sealed using a TB10 silk suture. Mice received an i.p. injection of meloxicam (1 mg/kg) as analgesia after surgery and kept under a warm lamp until recovery that was almost complete after 15 minutes. At day 60 after inoculation mice were euthanized and lungs were harvested and fixed in 10% buffered paraformaldehyde for histopathological analysis. However, 20% of mice developed local relapses in areas adjacent to the surgery site so they were euthanized before the experiment end-point but also included in the experiment. In both metastasis models animal care procedures were followed according to the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. Ethics approval was provided by the locally appointed ethics committee from IDIBELL, Barcelona, Spain.

Statistical analysis

Two-tailed Student's *t*-test was used to determine statistical significance. Unless otherwise stated, experiments were performed thrice; $p \leq 0.05$ was regarded as significant. The analysis was done using either Microsoft Excel or GraphPad Prism software.

Abbreviations

Ewing sarcoma (ES), caveolin-1 (CAV1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), mitogen-activated protein kinase (MAPK), ribosomal protein S6 (RPS6), p90 ribosomal S6 kinases (RSK), IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 (IQGAP1), short hairpin (sh), receptor tyrosine kinases (RTK), immunofluorescence (IF), immunohistochemistry (IHC).

ACKNOWLEDGMENTS

L. Lagares-Tena was funded by the *Comissionat per a Universitats i Recerca* (CUR) from *Departament d'Innovació, Universitats i Empresa* (DIUE) de la *Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu*. S Rello-Varona and S García-Monclús are funded by *Asociación Alba Pérez lucha contra el cáncer infantil*. D Herrero-Martín and O Almacellas-Rabaiget are funded by *Asociación Española contra el Cáncer-AECC*. This work was funded by AECC and *Instituto de Salud Carlos III: Acción Estratégica de Salud* (CES12/021; PI11/00038; PI15/00025) and EU's *Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (FEDER) “*Una manera de hacer Europa/A way to achieve Europe*”.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

OMT conceived and supervised the study. LL-T designed and performed the main experiments and coordinated the data analysis. SG-M and RL-A conceived and developed the orthotopic metastasis model. SG-M, RL-A, OA-R, JH-M, MS-J, SR-V and DH-M contributed to the design and conduct of experiments. CR-G provided tumor samples. SM-L contributed to the writing of the manuscript. LL-T, SR-V, DH-M and OMT wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M et al. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015; 33:3036-46.

2. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 1992; 359:162-165.
3. Mackintosh C, Madoz-Gúrpide J, Ordóñez JL, Osuna D, Herrero-Martín D. The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther*. 2010; 9:655-67.
4. Hancock JD, Lessnick SL. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle*. 2008; 7:250-6.
5. Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008; 68:2176-85.
6. Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS ONE*. 2008; 3:e1965.
7. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llort A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 2006; 66:9937-47.
8. Sengupta A, Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Auto-stimulatory action of secreted caveolin-1 on the proliferation of Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol*. 2011; 38:1259-65.
9. Sáinz-Jaspeado M, Huertas-Martinez J, Lagares-Tena L, Martín-Liberal J, Mateo-Lozano S, de Alava E, de Torres C, Mora J, García del Muro X, Tirado OM. EphA2-induced angiogenesis in Ewing sarcoma cells Works through bFGF production and is dependent on caveolin-1. *PLoS One*. 2013; 8:e71449.
10. Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan V, Garcia del Muro X, Fabra A, Tirado OM. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res*. 2010; 8:1489-500.
11. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation. *Int J Cancer*. 2010; 126:426-36.
12. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol Cancer Res*. 2010; 8:629-42.
13. Chiang AC, Massagué J. Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med*. 2008; 359:2814-2823.
14. Benassi MS, Gamberi G, Magagnoli G, Molendini L, Ragazzini P, Merli M, Chiesa F, Balladelli A, Manfrini M, Bertoni F, Mercuri M, Picci P. Metalloproteinase Expression and Prognosis in Soft Tissue Sarcomas. *Ann Oncol*. 2001; 12:75-80.
15. Zenali MJ, Zhang PL, Bendel AE, Brown RE. Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in Ewing family of tumors. *Ann Clin Lab Sci*. 2009; 39:160-6.
16. Beliveau A, Mott JD, Lo A, Chen EI, Koller AA, Yaswen P, Muschler J, Bissell MJ. RAF-Induced MMP-9 Disrupts Tissue Architecture of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and is Necessary for Tumor Growth in vivo. *Genes Dev*. 2010; 24:2800-11.
17. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature*. 2002; 417:949-954.
18. Liu Z, Liu D, Bojdani E, El-Naggar AK, Vasko V, Xing M. IQGAP1 plays an important role in the invasiveness of thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2010; 16:6009-18.
19. Roy M, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem*. 2004; 279:17329-37.
20. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007; 26:3100-12.
21. Lai R, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Liu T, Fuller CE, Ganti R, Dien J, Dalton J, Billups C, Khoury JD. STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol*. 2006; 208:624-32.
22. Ban J, Aryee DN, Fourtouna A, van der Ent W, Kauer M, Niedan S, Machado I, Rodriguez-Galindo C, Tirado OM, Schwentner R, Picci P, Flanagan AM et al. Suppression of deacetylase SIRT1 mediates tumor-suppressive NOTCH response and offers a novel treatment option in metastatic Ewing sarcoma. *Cancer Res*. 2014; 74:6578-88.
23. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*. 2007; 282:14056-64.
24. Lara R, Seckl MJ, Pardo OE. The p90 RSK Family Members: Common Functions and Isoform Specificity. *Cancer Res*. 2013; 73:5301-8.
25. Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*. 2012; 441:553-69.
26. Hong S-H, Tilan JU, Galli S, Izycka-Swieszewska E, Polk T, Horton M, Mahajan A, Christian D, Jenkins S, Acree R, Connors K, Ledo P et al. High neuropeptide Y release associates with Ewing sarcoma bone dissemination - in vivo model of site-specific metastases. *Oncotarget*. 2015; 6:7151-7165. doi: 10.18632/oncotarget.3345.
27. Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, Function and Regulation. *Pharmacol Res*. 2012; 66:105-43.
28. Lan YY, Hsiao JR, Chang KC, Chang JS, Chen CW, Lai HC, Wu SY, Yeh TH, Chang FH, Lin WH, Su IJ, Chang Y. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A promotes invasion of nasopharyngeal carcinoma cells through ERK/

- Fra-1-mediated induction of matrix metalloproteinase 9. *J Virol.* 2012; 86:6656-67.
29. Liu P, Wilson MJ. miR-520c and miR-373 target mTOR and SIRT1, activate the Ras/Raf/MEK/Erk pathway and NF- κ B, with up-regulation of MMP-9 in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2012; 227:867-76.
 30. Chen K, Zhang S, Ji Y, Li J, An P, Ren H, Liang R, Yang J, Li Z. Baicalein Inhibits the Invasion and Metastatic Capabilities of Hepatocellular Carcinoma Cells via Down-Regulation of the ERK Pathway. *PLoS One.* 2013; 8:e72927.
 31. Lee SH, Jaganath IB, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of Raf-MEK-ERK and Hypoxia pathways by Phyllanthus prevents metastasis in human lung (A549) cancer cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13:271.
 32. Ai X, Wu Y, Zhang W, Zhang Z, Jin G, Zhao J, Yu J, Lin Y, Zhang W, Liang H, Datta PK, Zhang M et al. Targeting ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2013; 14:1059-67.
 33. Silvano RE, Eliazar S, Wolff NC, Ilaria RL Jr. Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. *Oncogene.* 2000; 19:4523-30.
 34. Basu Roy UK, Henkhaus RS, Loupakis F, Cremolini C, Gerner EW, Ignatenko NA. Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2013; 133:43-57.
 35. Pancotti F, Roncuzzi L, Maggiolini M, Gasperi-Campani A. Caveolin-1 silencing arrests the proliferation of metastatic lung cancer cells through the inhibition of STAT3 signaling. *Cell Signal.* 2012; 24:1390-7.
 36. van de Luijngaarden AC, Versleijen-Jonkers YM, Roeffen MH, Schreuder HW, Flucke UE, van der Graaf WT. Prognostic and therapeutic relevance of the IGF pathway in Ewing's sarcoma patients. *Target Oncol.* 2013; 8:253-60.
 37. Agra N, Cidre F, García-García L, de la Parra J, Alonso J. Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in Ewing sarcoma cells. *PLoS One.* 2013; 8:e66281.
 38. Zheng H, Shen H, Oprea I, Worrall C, Stefanescu R, Girmita A, Girmita L. β -Arrestin-biased agonism as the central mechanism of action for insulin-like growth factor 1 receptor-targeting antibodies sarcoma in Ewing's. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:20620-5.
 39. Mora J, Rodríguez E, de Torres C, Cardesa T, Ríos J, Hernández T, Cardesa A, de Alava E. Activated growth signaling pathway expression in Ewing sarcoma and clinical outcome. *Pediatr Blood Cancer.* 2012; 58:532-8.
 40. Roy M, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Cell Biol.* 2005; 25:7940-7952.
 41. Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science.* 2011; 332:680-686.
 42. Jadeski L, Mataraza JM, Jeong HW, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:1008-1017.
 43. Nabeshima K, Shimao Y, Inoue T, Koono M. Immunohistochemical analysis of IQGAP1 expression in human colorectal carcinomas: its overexpression in carcinomas and association with invasion fronts. *Cancer Lett.* 2002; 176:101-109.
 44. Vetterkind S, Poythress RH, Lin QQ, Morgan KG. Hierarchical scaffolding of an ERK1/2 activation pathway. *Cell Commun Signal.* 2013; 11:65.
 45. Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR, Winther O, Taunton J et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell.* 2009; 35:511-22.
 46. Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D, Lannigan D, Smith JA, Slingerland JM. RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 9268-73.
 47. Lara R, Mauri FA, Taylor H, Derua R, Shia A, Gray C, Nicols A, Shiner RJ, Schofield E, Bates PA, Waelkens E, Dallman M et al. An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis. *Oncogene.* 2011; 30:3513-21.
 48. Salhi A, Farhadian JA, Giles KM, Vega-Saenz de Miera E, Silva IP, Bourque C, Yeh K, Chhangawala S, Wang J, Ye F, Zhang DY, Hernando-Monge E et al. RSK1 activation promotes invasion in nodular melanoma. *Am J Pathol.* 2015; 185:704-16.
 49. Sulzmaier FJ, Ramos JW. RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2013; 73:6099-105.
 50. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.
 51. Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJ, Fajardo A, Gelabert-Baldrich M, Tebar F, Enrich C, Gross SP, Parton RG, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol.* 2013; 203:985-1001.



The importance of being dead: cell death mechanisms assessment in anti-sarcoma therapy

Santiago Rello-Varona¹, David Herrero-Martín¹, Laura Lagares-Tena¹, Roser López-Alemaný¹, Núria Mulet-Margalef¹, Juan Huertas-Martínez¹, Silvia García-Monclús¹, Xavier García del Muro¹, Cristina Muñoz-Pinedo² and Oscar Martínez Tirado^{1*}

¹ Sarcoma Research Group, Molecular Oncology Laboratory, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

² Cell Death Regulation Group, Molecular Oncology Laboratory, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Edited by:

Thomas Grunewald,
Ludwig-Maximilians-Universität
München, Germany

Reviewed by:

David Loeb, Johns Hopkins
University, USA
Joanna Kitlinska, Georgetown
University, USA

*Correspondence:

Oscar Martínez Tirado, Grup de
Recerca en Sarcomas, Institut de
Investigació Biomèdica de Bellvitge,
Hospital Duran i Reynals 3^a planta,
Gran Via de l'Hospitalet 199,
L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona
08908, Spain
e-mail: omartinez@idibell.cat

Dedication:

To the memory of Alba Pérez.

Cell death can occur through different mechanisms, defined by their nature and physiological implications. Correct assessment of cell death is crucial for cancer therapy success. Sarcomas are a large and diverse group of neoplasias from mesenchymal origin. Among cell death types, apoptosis is by far the most studied in sarcomas. Albeit very promising in other fields, regulated necrosis and other cell death circumstances (as so-called "autophagic cell death" or "mitotic catastrophe") have not been yet properly addressed in sarcomas. Cell death is usually quantified in sarcomas by unspecific assays and in most cases the precise sequence of events remains poorly characterized. In this review, our main objective is to put into context the most recent sarcoma cell death findings in the more general landscape of different cell death modalities.

Keywords: cell death mechanisms, sarcoma, translocation-bearing sarcomas, apoptosis, necrosis, autophagic cell death, mitotic catastrophe

INTRODUCTION

FACTS

- Sarcomas are a highly heterogeneous group of mesenchymal tumors.
- Among cell death mechanisms, only apoptosis has been extensively studied in sarcomas.
- Fusion proteins, actors of translocation-derived sarcomagenesis, play an anti-apoptotic role in sarcomas.
- Proper and deeper assessment of cell death in sarcomas is mandatory.

CHALLENGES

- Can we improve the current therapeutic protocols in sarcomas through a better knowledge of cell death mechanisms?

- Can we assess more accurately the sequence of events of every type of cell death?
- Which are the key molecules that determine tumor cell death after therapy?
- Do translocation-bearing sarcomas have specific weaknesses in their cell death signaling networks?

Cancer therapies are aimed to induce the specific destruction of tumor cells without compromising patient health. This makes cell death mechanisms a central point of any therapeutic approach (1, 2). However, no every death is equally desirable in terms of therapy (3). The need of theoretical arrangement in the field has become evident during the past years. Our knowledge on cell death mechanisms has increased enormously and

Abbreviations: AIF, apoptosis inducing factor; Akt, protein kinase B; Apaf-1, apoptotic protease activating factor 1; Bak, Bcl-2 homologous antagonist/killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-x_L, B-cell lymphoma-extra large; BubR1, mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta protein; CD133, prominin-1; CD99, cluster of differentiation 99 protein; cFLIP, cellular FLICE inhibitory protein; Chk1, checkpoint kinase 1; c-Myc, cellular avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DRAL, downregulated in rhabdomyosarcoma LIM protein; ERG, protein encoded by erythroblast transformation-specific related gene; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; EWS, Ewing sarcoma RNA-binding protein; FasL, fas ligand protein; FLI1, Friend leukemia integration 1 transcription factor; FOXO1, forkhead box protein O1; HDAC1, histone deacetylase 1; IGF-1R, insulin-like growth factor 1 receptor; IHC, immunohistochemistry; JAK, Janus kinase; MC, mitotic catastrophe; MDM2, mouse double minute 2 homolog protein; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; miRNA, micro RNA; MLKL, mixed lineage kinase domain-like protein; mTOR, mammalian target

of rapamycin protein; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells protein; NGFR, low-affinity nerve growth factor receptor; Noxa, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; *oct4*, octamer-binding transcription factor 4; p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PAX, protein encoded by paired box gene; PD, progression disease; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PET-CT, positron emission tomography; PI, propidium iodide; PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; Plk1, polo-like kinase 1; PM, plasma membrane; PR, partial response; pRb, retinoblastoma protein; puma, p53 upregulated modulator of apoptosis; RAE, *raf* proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RANK, receptor activator of nuclear factor κB; ROS, reactive oxygen species; *sox2*, sex determining region Y-box 2; SSX, protein encoded by synovial sarcoma X breakpoint gene; STS, soft tissue sarcoma; SYT, protein encoded by synovial sarcoma translocation on chromosome 18 gene; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

the available methodology has become more and more sophisticated. Therefore, a clear nomenclature based on reliable markers has been proposed (1, 4). Additionally, the growing number of cell death participants have been organized in clear hierarchic frameworks (5).

Sarcomas are a rare and heterogeneous group (more than 50 different clinical and molecular entities) of malignant tumors with mesenchymal origin. Molecular biology of sarcomas has remained elusive until recently, and a better knowledge remains as an unmet need (6). New drugs against potential targets in tumor cells with a crucial role in their metabolism or pro-survival fitness could improve the prognosis of these patients. Indeed, the relatively high rate of therapeutic failure and tumor relapse demands a better assessment of cell death induction. But scientific efforts in this discipline are historically undermined by the relative low investments and isolated work (7).

The scientific landscape involving cell death mechanisms in sarcomas can be improved. The majority of articles included in the present review focused on apoptosis (mostly) and necrosis, whose morphological characters (Figure 1) and signaling players (Figure 2) are better described. Many studies about cell death in sarcomas just describe the occurrence of cell death without a proper characterization of the sequence-of-events leading to a particular form of death. The aim of the present review is to help sarcoma researchers to face new knowledge on cell death mechanisms in order to routinely include it in their assessments.

CELL DEATH MECHANISMS

APOPTOSIS

Apoptosis involves a cellular controlled demolition process. Signaling cascades are finely orchestrated and secured, to ensure

its perfect onset only when it is required (8). Caspases are the major actors in cellular demolition; once triggered, caspases can cross-activate each other and thus amplify the apoptotic signal (8). Apoptosis is by far the most studied form of cell death in sarcoma research. Nevertheless, researchers either employ uninformative methods about the form of death (i.e., Trypan Blue assay), or the mechanisms leading to such death are not always fully analyzed. Apoptosis recognition is easy by simple morphological features visible under the microscope: nuclear condensation and fragmentation, blebbing etc. (Figure 1). Other techniques (immunofluorescence or western blotting of cleaved caspases and/or caspase substrates, etc.) can be used to monitor specific mediators and executors of the process (9–11). Based on their biochemical features, we can describe two major pathways in apoptotic signaling: the intrinsic or mitochondrial pathway and the death receptor pathway (Figure 2).

Mitochondrial apoptosis

The “intrinsic pathway” is defined by the role of the mitochondria as encounter point of most of its initiators and mediators. The Bcl-2 family of proteins controls this pathway by regulating the formation of a pore in the mitochondrial outer membrane (12). Several signaling pathways converge in the regulation of Bcl-2 proteins, from DNA-damage sensor system to organelle stress and malfunction or growth factor signaling (Figure 2) (13, 14). In order to demonstrate that a drug or physiological input induces apoptosis through the mitochondrial pathway, exogenous overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 family members can be performed; this should either prevent cell death or switch the mechanism to necrosis.

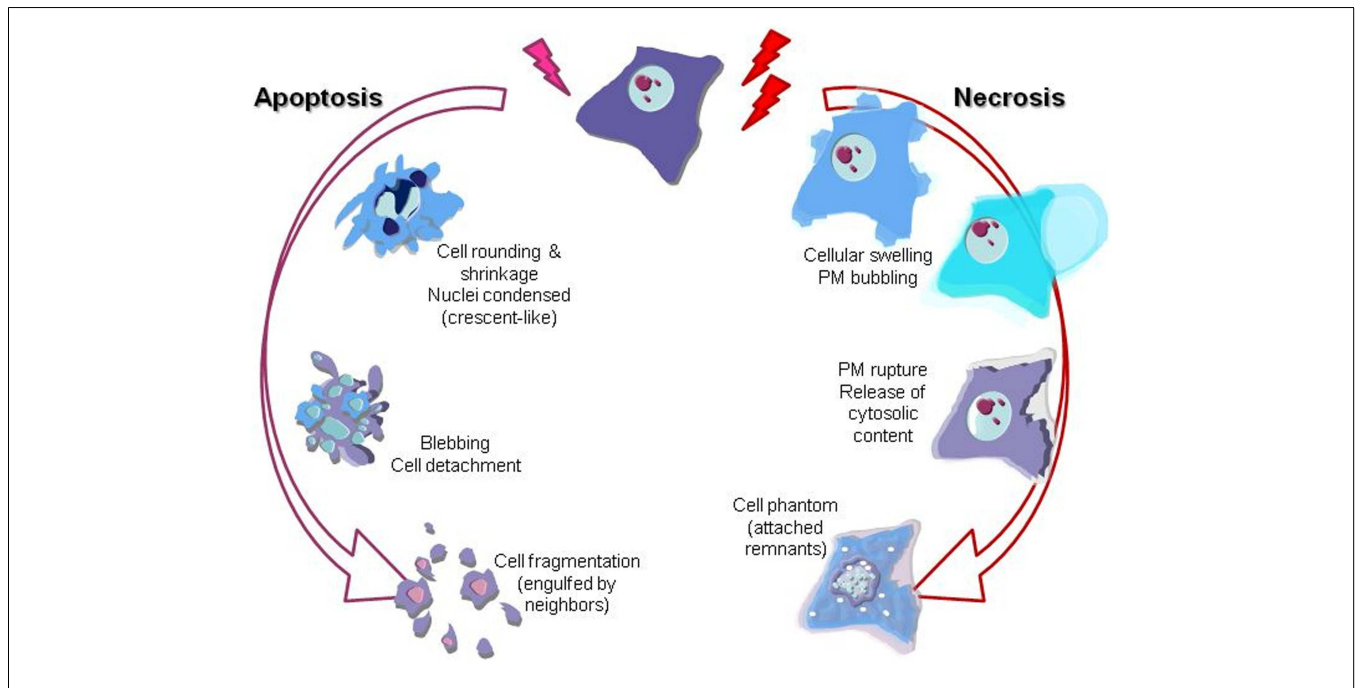
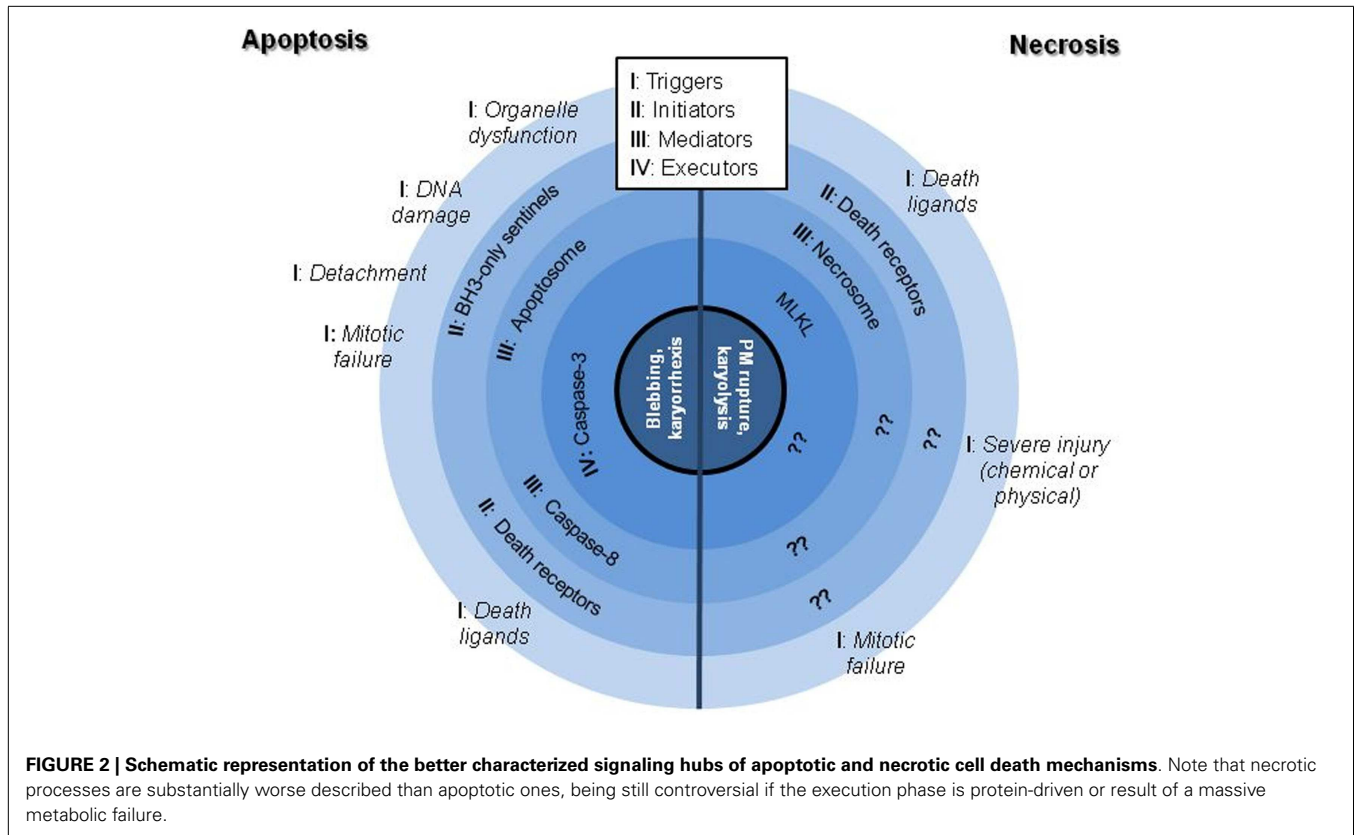
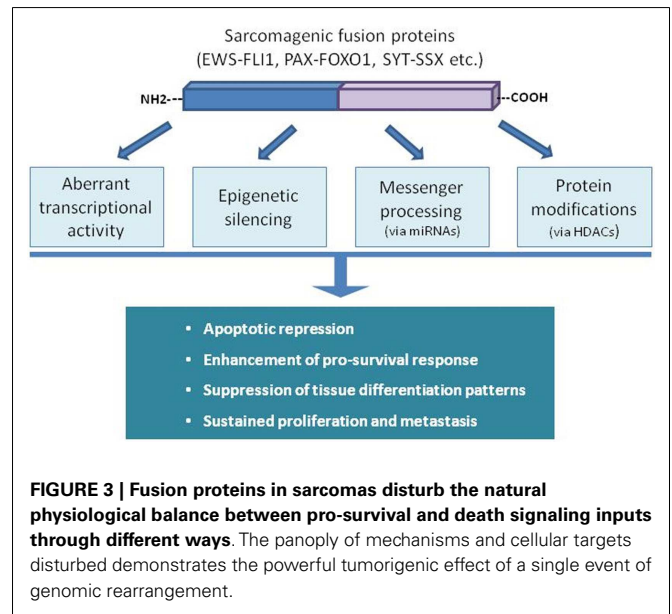


FIGURE 1 | Graphical illustration of the most prominent morphological features of apoptotic and necrotic cell death mechanisms. Nuclei changes (karyorrhexis), cytoplasm shrinkage, and blebbing are the most evident

descriptors of apoptosis. On the other hand, necrosis is clearly recognizable by cell swelling (loss of osmotic barrier) leading to the plasma membrane (PM) breakage and final release of the inner soluble content and nuclei karyolysis.



Some sarcomas rely on the presence of specific aberrant fusion proteins, generated after chromosomal rearrangements. Deregulation of gene expression in sarcomas driven by these chimeric oncoproteins can occur at different levels (epigenetic silencing, transcription activity, messenger processing, etc.) affecting every cellular process, including apoptosis (Figure 3). In the case of Ewing Sarcoma (ES), the fusion proteins EWS-FLI1 or EWS-ERG have an inhibitory effect on part of the apoptotic machinery (15, 16). This effect is mediated by direct or indirect interactions with several signaling pathways modulating apoptosis repression and inducing sustained growth (17–20). Alveolar rhabdomyosarcoma (aRMS) is also dependent on fusion proteins involving different PAX proteins with FOXO1, which also targets different signaling networks in order to ensure evasion of apoptosis (21, 22). SYT-SSX chimera proteins are present in the majority of synovial sarcoma tumors. They are involved in resistance to pro-apoptotic stimuli by modulating the levels and the activity of key apoptotic players of the Bcl-2 family of proteins (23). Furthermore, certain translocation-bearing sarcomas are also characterized by failure to complete tissue differentiation (i.e., RMS to skeletal muscle, liposarcoma to adipocytes) in a process mediated by their specific fusion protein and linked to the inhibition of apoptosis induction (24–26). Several recent studies have linked miRNAs status with apoptosis regulation in chromosome translocation-bearing sarcomas. Hence, mitochondrial apoptotic resistance in ES correlates with miR-125b upregulation through p53 and Bak (27) but overexpression of miR-206 in RMS promotes proliferation arrest and some sort of cell death (28). Overexpression of miR-145 and



miR-451 in liposarcoma cell lines decreases cellular proliferation, impairs cell cycle progression, and boosts cell death (29), whereas overexpression of miR-26a-2 has the opposite effects (30).

The levels and status of key pro- and anti-apoptotic proteins are also crucial for understanding the differential sensitivity of cells toward apoptosis. Most ES cells have both the p53 downstream

pathway and the DNA-damage signaling pathway functionally intact. The resistance of some ES cell lines to p53-induced apoptosis has been linked to a high Bcl-2/Bax ratio and low levels of Apaf-1 (31). However, the influence of fusion proteins inactivates p53 by deacetylation at Lys-382 driven by both EWS-FLI1 and HDAC1 (32), meaning that re-expression or re-activation of p53 could be a good strategy against these tumors. Similar phenomena occur in other fusion-positive sarcomas and accordingly, histone deacetylase inhibitors have been successfully tested as apoptotic inducers in different sarcoma types (33, 34). p53 re-activator agents as Nutlin-3 and/or PRIMA-1 are able to induce apoptosis successfully through Noxa, Puma, or p21 upregulation in both mutant and wild-type p53 sarcoma cell lines (35–37). Among downstream p53 targets p21, c-Myc, Bax, MDM2, DRAL, Bcl-2, and Bcl-x_L have been suggested as key apoptotic regulators in different sarcoma models (38–43). Plasma membrane-anchored growth receptors such as NGFR or IGF-1R have an anti-apoptotic role (44, 45). In contrast, distinct behaviors have been suggested for the closely related receptors PDGFR α and β (46). Thus, PDGFR α favors cellular stemness and PDGFR β promotes angiogenesis in the tumor stroma. Hepatocyte-growth-factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2) act as tumor suppressors leading to apoptosis and necrosis in leiomyosarcoma (47). Also, inhibition of endogenous tyrosine kinase B (TrkB) signaling suppresses cell proliferation and increases apoptosis in cultured leiomyosarcoma cells (48). In this context, tyrosine kinase inhibitors like Sorafenib induce apoptosis on many leiomyosarcoma or synovial sarcoma cell lines by inhibiting the RAF/MEK/ERK signaling pathway, among others (49, 50). Apoptotic cascades induced by other kinase inhibitors like JAK1 and 2 have been analyzed in detail in RMS and ES cells. These inhibitors lead to the alteration of the balance between the pro-apoptotic Bax and the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-x_L, the release of cytochrome c, and the activation of caspase-9, -8, and -3 (51, 52).

Many other different strategies have been used in sarcomas to induce mitochondrial apoptosis. Betulinic acid is able to target the mitochondria in ES, promoting the permeabilization of the outer membrane resulting in the release, from the mitochondria to the cytosol, of soluble factors such as AIF and cytochrome c, who ultimately leads to caspase activation (53). Direct targeting of mitochondrial physiology was also explored in RMS with photodynamic therapy (54) and ROS-generation agents (55). Proteasome inhibitors as Bortezomib generate a major stress in the cell machinery, triggering a number of different reactions, many of them aimed to induce apoptosis. Bortezomib has been successfully employed in different pre-clinical models (56, 57). Heat shock proteins are among the most important actors against protein stress in cells. Accordingly, Hsp-90 antagonists had been shown to induce transient growth arrest and apoptosis in RMS cells (58). Likewise, some metabolic disruptors like 2-deoxyglucose, Lovastatin, and Catechins have been successfully tested as promoters of mitochondrial apoptosis by unbalancing the equilibrium of Bcl-2 family of proteins (59–61). Furthermore, down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) also leads to apoptosis, identified by PARP cleavage, in pediatric sarcomas (62).

To keep their correct physiology, cells rely in their interaction with neighbors and microenvironment, meaning that detachment

is a major apoptotic trigger. The process of detachment-induced apoptosis is termed anoikis (4). The lack of attachment activates signals from the plasma membrane, mostly by integrins and the focal adhesion kinase (FAK) that regulate the BH3-only proteins through the mitochondrial commitment to cell suicide (**Figure 2**) (63). Cell culture in non-adherent conditions, like soft-agar, is the better way to study this process. Suppression of anoikis cell death is considered an important hallmark of transformed cells and thus, a pre-metastatic key process (64).

Anoikis resistance in sarcomas has been described to be associated with integrins, Bcl-2 and caspase-8, CD99 isoforms, RANK, and ERK (65–68). ES cells survival in non-adherent conditions is mediated by E-cadherin dependent spheroid formation, avoiding apoptotic triggering by means of the PI3K/Akt pathway (69). Scotlandi *et al.* demonstrated the relevance of IGF-1R in the anoikis-resistant ES cell line TC71. Impairment of IGF-1R signaling (by neutralizing antibodies or siRNAs expression) led to a lower survival in anchorage-independent growth conditions and a decrease on metastatic ability (70). In synovial sarcoma, the increased IGF-2 synthesis protects cells from anoikis and is required for tumor formation *in vivo* (71). Another trans-membrane growth factor receptor, the ErbB4 Tyrosine kinase, gets phosphorylated in ES spheroids and its expression is linked to anoikis avoidance, metastatic disease, and bad outcome (72). In RMS, spheroids obtained after cell culture enrichment express stem cell gene markers such as *oct4*, *pax3*, *sox2*, *c-myc*, and *nanog*. It was also found that CD133 was upregulated in these spheres, conferring cells higher resistance to Cisplatin and Chlorambucil *in vivo* (73). In osteosarcoma (OS) cells, anoikis can be induced by zoledronic acid, DNA methylation inhibitors as decitabine or cyclooxygenase-2 inhibitors via PI3K/Akt pathway inhibiting β -catenin, TrkB, and E-cadherin (74–76).

Several of the aforementioned reports present indeed interesting data for a number of plausible targets concerning mitochondrial apoptosis. However, it is worth noting that in most of these cases, apoptotic analyses rely only in AnnexinV (AnnV) tests or caspase-3 activation kits, being uninformative about the precise processes involved. Although extended in the community, when the end-points of AnnV-PI tests are not carefully selected, this could lead to the misidentification of late apoptotic and necrotic cells; similarly, caspase-3 is a common final step in apoptotic cell death that does not imply a single precise activation pathway (**Figure 2**) (11).

The death receptor pathway

Caspase-8 is the most characteristic mediator of the “death receptor pathway” (**Figure 2**). In this case, the triggers of the apoptotic process are extracellular signals (mostly from the TNF family) and the initiators and mediators encounter not in the mitochondrial outer membrane but rather close to the plasma membrane (77). Besides direct stimulation of cell death, death receptors can also induce specific protein synthesis by means of the NF- κ B pathway that balances and even counteracts the apoptotic signaling (78).

TRAIL is a death ligand that has been studied in several sarcomas for therapeutic purposes (79–81). TRAIL-induced apoptosis is regulated by other receptors and downstream effectors including

cFLIP and the Bcl-2 family (82–84). The TRAIL receptor, death receptor 5, has been identified as a mediator of chemically induced apoptosis in RMS, synovial sarcoma and leiomyosarcoma, activating several apoptosis triggers (85–87). TNF α and FasL receptors play also a significant role in the survival/apoptotic balance with p21 as critical mediator of the anti-apoptotic effect of TNF α -induced NF- κ B (88, 89). Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 gene family, has been linked to FasL induced apoptosis in ES (90). Activation of death receptors could be combined with other challenges like doxorubicin, interleukin-12, or immunotoxins (91–93). Some other TNF receptor-related proteins, like NGFR, have been proposed to be crucial in specific sarcomas (94). Thus, there is still a need for a better understanding of the role of the other cell death receptors in sarcomas.

Besides the death receptors themselves, the best strategy to enhance extrinsic apoptosis is repressing NF- κ B activation. This rationale has been employed with success against ES and synovial sarcoma (95, 96). Sensitization to apoptosis has also been achieved by re-expressing caspase-8 through demethylation or gene transfer (97).

NECROSIS

Necrosis, in contrast to apoptosis, has been viewed classically as a form of accidental death brought about by injury to the cell by pathogens or toxins. Despite the extended pre-judice, necrosis is more than a mere accidental death (5). Loss of plasma membrane integrity, the “cellular explosion”, is the major morphological feature and characteristic element of necrosis (**Figure 1**) (9, 98). Non-accidental or “regulated” necrosis has attracted a growing interest in the scientific community in the last years. Necroptosis is the best known phenotype in this group. It is induced by either the activation of death receptors or specific injuries that are followed by the recruitment of the so-called necrosome of which the principal participants are the receptor-interacting protein kinases (RIPK1 and RIPK3), which finally activate the executor MLKL (**Figure 2**) (99).

Necroptosis is just starting to be studied in sarcomas. It can be distinguished from apoptosis by its distinct morphology and the inability of caspase inhibitors to prevent it (10, 11). In an OS model, RIPK1-mediated necroptosis was confirmed as the main cell death mechanism involved in Shikonin therapy, as only Necrostatin-1 (an inhibitor of RIPK1) was able to induce treatment reversion (100). Basit *et al.* found that Obatoclox (a Bcl-2 inhibitor) treatment in RMS cell lines promoted necroptosis rather than autophagic cell death, being autophagy only a necessary event required for the necrosome assembly (101). So, it becomes clear that there is still a big room for improvement in the accurate characterization of regulated necrosis responses in anti-sarcoma therapy.

OTHER SCENARIOS FOR THE CELL DEATH DRAMA

The long-standing dichotomy apoptosis-necrosis is in part nothing but a classification artifact. Many times the exact nature of the mechanism triggered relies simply on the intensity of the injury or on the available energy (102). Furthermore, in the cell death landscape, there are other “circumstances” worth of some additional explanation.

A classical example of “double-edged sword” is autophagy, sometimes included as a cell death mechanism, although it usually proceeds as a pro-survival process. Autophagy targets apoptotic-signaling mitochondria for isolation and degradation, thus interrupting the apoptotic outcome. Several proteins cross-link autophagy and apoptosis signaling pathways, being mTOR one of the most studied (103). As a process impacting the energy availability, autophagy also dialogs with necrotic signaling and some reports point to a close relationship with necroptotic triggering (101, 102). Again, it seems to be a question of threshold. In many cases, an excessive autophagy can lead to cell death but this death follows a mixed pattern with parallel apoptotic or necrotic phenotypes. Only when inhibition of autophagy can impede cell death and the final phenotype is considered non-apoptotic cell death, we can classify it as “autophagic cell death” (4, 102). Among the different techniques available, autophagy can be better followed by microscopy assessment of autophagosome formation (11, 104).

To our knowledge, except for some interesting report showing autophagic triggering of necroptosis in RMS (101), no instances of true autophagic cell death have been described in sarcomas yet. Indeed, its role in cancer therapy is still controversial (102). In ES and OS, the protective role of autophagy was insufficient to block apoptotic cell death when triggered by either the intrinsic or the death receptor pathways (105, 106). Autophagy has also been described to be actively removing micronuclei in OS cells, generating an interesting connection with the stabilization of cells recovering from failures during mitosis (107).

Mitotic catastrophe (MC), previously classified as a form of cell death, constitutes a crossroad that could drive cells to die with either apoptotic or necrotic features, go into senescence, or even survive (108). Again, the precise features of the final death phenotype depend on cell context and energy availability (108, 109). The clearest triggers of MC are the dysfunctions of the mitotic spindle. Those dangers are monitored by specific checkpoint proteins determining the final outcome. Thus, cells evading the mitotic arrest have an increase in chromosome instability (110). MC can be easily followed by means of microscopy observation, usually aided with fluorescent markers, video-microscopy, and cell fate imaging analysis.

Proper metaphase arrangement is required for mitosis and is a key process monitored by several checkpoint regulators (**Figure 2**). BubR1, involved in the mitotic spindle checkpoint, has been shown to be necessary for survival in some RMS cell lines and its knock-down promoted growth suppression and “mitotic catastrophe” but the final outcome was not elucidated (111). Plk1 is another major component of MC signaling: siRNA inhibition of Plk1 killed RMS cells and the chemical inhibitor BI 2536 induced G₂/M arrest and cell death in OS cell lines (112, 113). Inhibitors of Aurora kinases block the formation of the cleavage furrow, disrupting cytokinesis, and killing leiomyosarcoma and synovial sarcoma cells (114, 115). Chk1 blockade with CEP-3891 caused an abrogation of the S and G₂ checkpoints after ionizing radiation, giving rise to nuclear fragmentation as a consequence of defective chromosome segregation and promoting cell death (116). Many active drugs tested in sarcoma cells have been described to disrupt normal cell cycle. Those compounds range from small molecules or plant derivatives, to cell cycle kinase inhibitors, viral proteins etc. Several studies showed

Table 1 | Summary of already published clinical trials that evaluate target therapies in sarcomas, classified regarding the mechanism of action.

| | Mechanism of action | Drugs | Trial (reference) | Study population | Benefits | Common severetoxicities |
|----------------------------|---|--|---|--|---|--|
| Apoptosis | PARP inhibitors | Olaparib | Phase II (127) | Recurrent/metastatic adult ES (failure to prior CH), <i>n</i> = 12 patients | NO responses SD: 4 patients, TTP: 5.7 weeks | No significant toxicities |
| | Heat shock protein inhibitors | Retaspimycin (Hsp-90 INH) | Phase I (128) | Metastatic and/or unresectable STS, <i>n</i> = 54 patients | PR: 2 patients (proof of clinical activity) | Grade 3–4: Fatigue Nausea and vomiting Headache Arthralgia |
| | Proteasome inhibitor | Bortezomib | Phase II (129) | Metastatic OS, ES, RMS, and STS with no prior treatment for advanced disease, <i>n</i> = 25 patients | Lack of benefit (trial prematurely closed) | Grade 3–4: Neuropathy Asthenia Myalgias |
| | MDM2 inhibitor | RG7112 | Proof of mechanism study (130) Phase I (131) | WDLS or DDLS with MDM2 amplification receive RG7112 prior to surgery, <i>n</i> = 20 patients Phase I trial with extension cohort for sarcoma patients, <i>n</i> = 30 (sarcoma patients) | SD: 14 patients, IHQ: activation of p53 pathway Metabolic responses (PET-CT) IHQ: activation of p53 (MDM2-independent) | Grade 3–4 Neutropenia Thrombocytopenia Grade 3–4 Cytopenias |
| | PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors | Ridaforolimus (mTOR INH) | Phase II (132) | Pre-treated advanced bone and STS, <i>n</i> = 212 patients | RR: 1.9%, clinical benefit: 28.8% | Grade 3–4 Fatigue Stomatitis Hypertriglyceridemia Anemia Thrombocytopenia |
| | | | Phase III (133) | Advanced bone and STS with clinical benefit to previous CH were randomized to maintenance Ridaforolimus or Placebo, <i>n</i> = 711 patients | Improvement in PFS (17.7 weeks with Ridaforolimus vs. 14.6 weeks with Placebo, HR: 0.72, <i>p</i> : 0.001) | Similar to previous study |
| | | Everolimus (mTOR INH) | Phase II (134) | Pre-treated advanced bone and STS, <i>n</i> = 41 patients | Poor clinical activity | Grade 3–4 Hyperglycemia Stomatitis Pain Asthenia |
| | Anti-angiogenic therapy | Sorafenib (VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, and c-Kit INH) | Phase II (135) | Pre-treated advanced STS, <i>n</i> = 101 patients | RR: 14.5%, SD: 32.9% (leiomyosarcoma better PFS) | Grade 3–4 Fatigue Diarrhea Hand-foot Syndrome Nausea and vomiting |
| Phase III (136) | | | Pre-treated non-adipocytic STS randomized to PAZOPANIB vs. PLACEBO, <i>n</i> = 369 patients | Improvement in PFS (4.6 months with PAZOPANIB vs. 1.6 months with Placebo, HR: 0.31, <i>p</i> < 0.0001) | Grade 3–4 Asthenia Hypertension Anorexia Alteration of transaminases | |
| Mitotic catastrophe | CDK inhibitors | Palbociclib (CDK4 and CDK6 INH) | Phase II (137) | WDLS or DDLS with CDK4 amplification and pRb expression | 66% of patients free of PD at 12 weeks | Grade 3–4 Anemia Neutropenia Thrombocytopenia |

CH: chemotherapy, DDLS: dedifferentiated liposarcoma, HR: hazard ratio, INH: inhibitor, MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor, PFS: progression-free survival, RR: response rate, SD: stabilization disease, STS: soft-tissues sarcoma, TTP: time to progression, WDLS: well-differentiated liposarcoma.

Table 2 | Summary of clinical trials that are ongoing and evaluate target therapies in sarcomas, classified regarding the mechanism of action.

| | | Ongoing trials specific for sarcomas | Status www.clinicaltrials.gov | Identifier www.clinicaltrials.gov |
|---|---|---|----------------------------------|--------------------------------------|
| Apoptosis | PARP inhibitors | ESP1/SARC025 global collaboration: a Phase I study of a combination of the PARP inhibitor, niraparib, and temozolomide in patients with previously treated, incurable Ewing sarcoma | Ongoing, but not recruiting | NCT02044120 |
| | | Olaparib in adults with recurrent/metastatic Ewing's sarcoma. | Ongoing, but not recruiting. | NCT01583543 |
| | Heat shock protein inhibitor | A trial of ganetespib Plus sirolimus: phase 1 includes multiple sarcoma subtypes and Phase 2 MPNST | Ongoing, but not recruiting | NCT02008877 |
| | PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors | Phase II study of everolimus in children and adolescents with refractory or relapsed osteosarcoma | Recruiting | NCT01216826 |
| | | Phase II open label, non-randomized study of Sorafenib and everolimus in relapsed and non-resectable osteosarcoma (SERIO) | Ongoing, but not recruiting | NCT01804374 |
| | | Study of everolimus with bevacizumab to treat refractory malignant peripheral nerve sheath tumors | Ongoing, but not recruiting | NCT01661283 |
| | | Phase II study of everolimus in children and adolescents with refractory or relapsed rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas | Recruiting | NCT01216839 |
| | Anti-angiogenic therapy | Sorafenib tosylate, combination chemotherapy, radiation therapy, and surgery in treating patients with high-risk stage IIB–IV soft tissue sarcoma | Recruiting | NCT02050919 |
| | | Pazopanib hydrochloride followed by chemotherapy and surgery in treating patients with soft tissue sarcoma | Recruiting | NCT01446809 |
| | | Activity and tolerability of pazopanib in advanced and/or metastatic liposarcoma. a phase ii clinical trial | Recruiting | NCT01692496 |
| Study of pazopanib in the treatment of osteosarcoma metastatic to the lung | | Recruiting | NCT01759303 | |
| Study of pre-operative therapy with pazopanib (votrient®) to treat high-risk soft tissue sarcoma (NOPASS) | | Recruiting | NCT01543802 | |
| Mitotic catastrophe | Aurora-kinase inhibitors | Alisertib in treating patients with advanced or metastatic sarcoma | Recruiting | NCT01653028 |
| | CDK inhibitors | PD0332991 in patients with advanced or metastatic liposarcoma | Recruiting | NCT01209598 |

cell cycle arrest and changes in the levels of MC mediators as Survivin. For example, Keyomarsi's group showed that combined therapy with doxorubicin and roscovitine in synovial sarcoma and leiomyosarcoma induced a synergistic increase in autophagy in addition to a marked arrest in G₂/M (117). Links between MC and autophagy have also been commented previously for OS (107). In any case, it would be desirable to perform an exhaustive mitotic study or cell fate analysis together with the proper assessment of the nature of cell cycle blockade (metaphase arrest, G₂ stop, or even senescence).

CELL DEATH MECHANISMS IN ANTI-SARCOMA CLINICAL TRIALS

New targeted therapies linked to key cell death mechanisms are continuously being developed (118). Preferred to cytostatic alternatives, cell death induction is the goal of the vast majority of

cancer treatments. And among the known mechanisms, apoptosis is the center of therapeutic developments (118). As a non-inflammatory mechanism, apoptosis is traditionally considered cleaner than necrosis, but its exact relevance in overall therapeutic success is uncertain. Necrosis, due to its pro-inflammatory nature, has been regarded as a back door for metastatic cells to escape from the primary tumor (3, 119). But, depending on the circumstances, necrosis could be effective enough to induce tumor clearance (120). Conversely, a particular apoptotic phenotype with the ability to trigger immune response against cancer cells has been described (119). Moreover, classic chemotherapeutic agents are shown to induce apoptosis by interfering with the normal cell division processes and this could lead to the triggering of MC (108, 109, 121). Induction of MC vs. direct apoptosis triggering depends of the effective drug concentration within the cells and thus, could be different among the tumor mass (122). MC drives most of

the cells to major death mechanisms but opens the gates for the appearance of new stable karyotypes translating into perhaps new resistant cancer clones (108, 123, 124).

The treatment of advanced sarcomas is based on classic chemotherapeutic agents: anthracyclines and ifosfamide as first option and, after progression, other agents like gemcitabine in combination with docetaxel (or Dacarbazine) and trabectedin. The benefit of chemotherapy is well-known, but limited, because a high percentage of patients die due to the disease in approximately 1 year from diagnosis (125, 126).

In the past years, several sarcoma-focused clinical trials have evaluated the activity in monotherapy of novel drugs with known connections to a particular cell death mechanism (Table 1). So far, only two phase III trials have been reported, reflecting that targeted therapies have been mostly developed in recent years and remain in a pre-clinical stage (127–137). The first trial was focused on the mTOR signaling pathway, which links apoptosis with autophagy (102, 103). The study evaluated the role of ridaforolimus as maintenance therapy after clinical benefit to chemotherapy (133). The other trial analyzed the activity of Pazopanib (a multitargeted kinase inhibitor) in pre-treated soft-tissue sarcoma patients (136).

It is easily noticeable that many of the targets mentioned above have still not reached the clinical trial stage in sarcomas. Further research should be aimed to fill that gap by a better description of the pre-clinical effects in terms of quantity and quality (type, characterization, assessment of resistant phenotypes, etc.) of the induced cell death. A summary of the ongoing clinical trials in sarcomas are included in Table 2.

CONCLUDING REMARKS

As often happens with research on rare diseases, sarcoma research suffers from funding shortage and delayed implementation of technical advances. But there is also an urgent need to improve current therapeutic modalities in sarcomas and reduce their burden. Additionally, due to their heterogeneity, sarcoma models are very difficult to compare among them. Those constraints define sarcoma research today. Cell death induction is the basis of cancer therapy, but we are still far from understanding the mechanisms of cell death signaling in sarcomas. The relatively low attention paid to particular phenomena like autophagy or MC, with crucial roles in therapy success, is symptomatic that we need to get back to the laboratory benches and improve our methods (3, 118, 124). We abuse too often of indirect tests, easy to read-out in flow cytometers, or high-content analyzers. And perhaps, we rely too much in bibliographic data, not looking for the actual connections between our treatments and the specific cell death trigger.

Sarcoma research needs the implementation of a better determination of cell death mechanisms. The definition of the nature of cell death is not a vain effort as the differences in mechanisms could have tremendous consequences in terms of chemo-resistance or in immunogenic potential (108, 119, 123, 124). We need to dedicate more time to define cell death circumstances, but sometimes it seems that this attention only happens when researchers are faced with unusual/specific cell death signals (death receptors, MC, necroptosis etc.) while relying in the bulk caspase-3 or AnnV-PI kits for the rest of the occasions.

The extra work we are proposing is neither difficult nor exhausting, as it requires only to spend a little time looking “what” actually happens to our cells (and “when”). Cell death is evident to the trained eye by merely observing the cells in the cell culture room’s inverted microscope (Figure 1). Then, there are enough valuable tests, clear and easy to perform, for the major cell death pathways (138). Performed in the correct set of end-points a simple DAPI staining would serve to determine whether we are facing apoptosis, necrosis, or MC (10, 11). Therefore, we encourage researchers to perform those tests and include their results in their publications prior to embark themselves into more complex analysis about the intimacy of cell physiology. Let’s concentrate on describing better “what” is happening before moving on solving “how” it is happening.

ACKNOWLEDGMENTS

SR-V is a MarieCurieCOFUND-BeatriuDePinòs Researcher (The European Union 7th Framework Program for RD and the *Generalitat de Catalunya*’s Department for Economy and Knowledge: Secretary for Universities and Research). DH-M is funded by *Asociación Española contra el Cáncer-AECC*. LL-T is funded by the *Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR)* from *Departament d’Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu*. SG-M is funded by *Asociación Alba Pérez lucha contra el cáncer infantil*. This work was funded by *Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (CP06/00151; CES12/021; PI11/00038; PI12/01908)*. Studies in CMP’s lab related to the topic of this review are supported by *Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII* grant PI13/00139. We apologize to those whose valuable work could not be covered in this issue for space reasons.

REFERENCES

- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* (2009) **16**:3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150
- Fulda S. Exploiting apoptosis pathways for the treatment of pediatric cancers. *Pediatr Blood Cancer* (2009) **53**:533–6. doi:10.1002/pbc.21922
- Ricci MS, Zong W. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* (2006) **11**:342–57. doi:10.1634/theoncologist.11-4-342
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* (2012) **19**:107–20. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) **15**:135–47. doi:10.1038/nrm3737
- Ordóñez JL, Osuna D, García-Domínguez DJ, Amaral AT, Otero-Motta AP, Mackintosh C, et al. The clinical relevance of molecular genetics in soft tissue sarcomas. *Adv Anat Pathol* (2010) **17**:162–81. doi:10.1097/PAP.0b013e3181d98cbf
- Martín Liberal J, Lagares-Tena L, Sáinz-Jaspeado M, Mateo-Lozano S, García Del Muro X, Tirado OM. Targeted therapies in sarcomas: challenging the challenge. *Sarcoma* (2012) **2012**:626094. doi:10.1155/2012/626094
- Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* (2013) **23**:620–33. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.006
- Rello S, Stockert JC, Moreno V, Gámez A, Pacheco M, Juarraz A, et al. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* (2005) **10**:201–8. doi:10.1007/s10495-005-6075-6

10. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* (2008) **44**:205–21. doi:10.1016/j.jmeth.2007.12.001
11. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2011) **10**:221–37. doi:10.1038/nrd3373
12. Braun F, de Carné Trécesson S, Bertin-Ciftci J, Juin P. Protect and serve: Bcl-2 proteins as guardians and rulers of cancer cell survival. *Cell Cycle* (2013) **12**:2937–47. doi:10.4161/cc.25972
13. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol* (2014) **16**:728–36. doi:10.1038/ncb3005
14. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007) **8**:275–83. doi:10.1038/nrm2147
15. Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* (1997) **14**:1259–68. doi:10.1038/sj.onc.1201099
16. Soldatenkov VA, Trofimova IN, Rouzaut A, McDermott F, Dritschilo A, Notario V. Differential regulation of the response to DNA damage in Ewing's sarcoma cells by ETS1 and EWS/FLI-1. *Oncogene* (2002) **21**:2890–5. doi:10.1038/sj.onc.1205393
17. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med* (2009) **15**:750–6. doi:10.1038/nm.1983
18. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKC α phosphorylation. *Int J Cancer* (2010) **126**:426–36. doi:10.1002/ijc.24754
19. Surdez D, Benetkiewicz M, Perrin V, Han Z-Y, Pierron G, Ballet S, et al. Targeting the EWSR1-FLI1 oncogene-induced protein kinase PKC- β abolishes ewing sarcoma growth. *Cancer Res* (2012) **72**:4494–503. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0371
20. Stoll G, Surdez D, Tirode F, Laud K, Barillot E, Zinovyev A, et al. Systems biology of Ewing sarcoma: a network model of EWS-FLI1 effect on proliferation and apoptosis. *Nucleic Acids Res* (2013) **41**:8853–71. doi:10.1093/nar/gkt678
21. Ahn EH, Mercado GE, Laé M, Ladanyi M. Identification of target genes of PAX3-FOXO1 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncol Rep* (2013) **30**:968–78. doi:10.3892/or.2013.2513
22. Jothi M, Mal M, Keller C, Mal AK. Small molecule inhibition of PAX3-FOXO1 through AKT activation suppresses malignant phenotypes of alveolar rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther* (2013) **12**:2663–74. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0277
23. Jones KB, Su L, Jin H, Lenz C, Randall RL, Underhill TM, et al. SS18-SSX2 and the mitochondrial apoptosis pathway in mouse and human synovial sarcomas. *Oncogene* (2013) **32**:e1–5. doi:10.1038/onc.2012.247
24. Yang Z, Zhang J, Cong H, Huang Z, Sun L, Liu C, et al. A retrovirus-based system to stably silence GDF-8 expression and enhance myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *J Gene Med* (2008) **10**:825–33. doi:10.1002/jgm.1216
25. Taylor BS, DeCarolis PL, Angeles CV, Brenet F, Schultz N, Antonescu CR, et al. Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas. *Cancer Discov* (2011) **1**:587–97. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0181
26. Wu YV, Okada T, DeCarolis P, Succi N, O'Connor R, Geha RC, et al. Restoration of C/EBP α in dedifferentiated liposarcoma induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Genes Chromosomes Cancer* (2012) **51**:313–27. doi:10.1002/gcc.21917
27. Iida K, Fukushi J-I, Matsumoto Y, Oda Y, Takahashi Y, Fujiwara T, et al. miR-125b develops chemoresistance in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Cancer Cell Int* (2013) **13**:21. doi:10.1186/1475-2867-13-21
28. Missiaglia E, Shepherd CJ, Patel S, Thway K, Pierron G, Pritchard-Jones K, et al. MicroRNA-206 expression levels correlate with clinical behaviour of rhabdomyosarcomas. *Br J Cancer* (2010) **102**:1769–77. doi:10.1038/sj.bjc.6605684
29. Gits CMM, van Kuijk PF, Jonkers MBE, Boersma AWM, Smid M, van Ijcken WF, et al. MicroRNA expression profiles distinguish liposarcoma subtypes and implicate miR-145 and miR-451 as tumor suppressors. *Int J Cancer* (2014) **135**:348–61. doi:10.1002/ijc.28694
30. Lee DH, Amanat S, Goff C, Weiss LM, Said JW, Doan NB, et al. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis* (2013) **2**:e47. doi:10.1038/onc.2013.10
31. Kovar H, Pospisilova S, Jug G, Printz D, Gadner H. Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression. *Oncogene* (2003) **22**:3193–204. doi:10.1038/sj.onc.1206391
32. Li Y, Li X, Fan G, Fukushi J-I, Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Impairment of p53 acetylation by EWS-FlI1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett* (2012) **320**:14–22. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.018
33. Hecker RM, Amstutz RA, Wachtel M, Walter D, Niggli FK, Schäfer BW. p21 downregulation is an important component of PAX3/FKHR oncogenicity and its reactivation by HDAC inhibitors enhances combination treatment. *Oncogene* (2010) **29**:3942–52. doi:10.1038/onc.2010.145
34. Su L, Sampaio AV, Jones KB, Pacheco M, Goytain A, Lin S, et al. Deconstruction of the SS18-SSX fusion oncoprotein complex: insights into disease etiology and therapeutics. *Cancer Cell* (2012) **21**:333–47. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.010
35. Pishas KI, Al-Ejeh F, Zinonos I, Kumar R, Evdokiou A, Brown MP, et al. Nutlin-3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma. *Clin Cancer Res* (2011) **17**:494–504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1587
36. Miyachi M, Kakazu N, Yagyu S, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, et al. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res* (2009) **15**:4077–84. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2955
37. Aryee DNT, Niedan S, Ban J, Schwentner R, Muehlbacher K, Kauer M, et al. Variability in functional p53 reactivation by PRIMA-1(Met)/APR-246 in Ewing sarcoma. *Br J Cancer* (2013) **109**:2696–704. doi:10.1038/bjc.2013.635
38. Leiser AL, Anderson SE, Nonaka D, Chuai S, Olshen AB, Chi DS, et al. Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* (2006) **101**:86–91. doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.055
39. Taylor AC, Schuster K, McKenzie PP, Harris LC. Differential cooperation of oncogenes with p53 and Bax to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer* (2006) **5**:53. doi:10.1186/1476-4598-5-53
40. Cheney MD, McKenzie PP, Volk EL, Fan L, Harris LC. MDM2 displays differential activities dependent upon the activation status of NF κ B. *Cancer Biol Ther* (2008) **7**:38–44. doi:10.4161/cbt.7.1.5125
41. Scholl FA, McLoughlin P, Ehler E, de Giovanni C, Schäfer BW. DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol* (2000) **151**:495–506. doi:10.1083/jcb.151.3.495
42. Armistead PM, Salganick J, Roh JS, Steinert DM, Patel S, Munsell M, et al. Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. *Cancer* (2007) **110**:2293–303. doi:10.1002/cncr.23038
43. Margue CM, Bernasconi M, Barr FG, Schäfer BW. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene* (2000) **19**:2921–9. doi:10.1038/sj.onc.1203607
44. Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* (2001) **37**:1719–25. doi:10.1016/S0959-8049(01)00190-3
45. Mayeenuddin LH, Yu Y, Kang Z, Helman LJ, Cao L. Insulin-like growth factor 1 receptor antibody induces rhabdomyosarcoma cell death via a process involving AKT and Bcl-x(L). *Oncogene* (2010) **29**:6367–77. doi:10.1038/onc.2010.364
46. Ehnman M, Missiaglia E, Folestad E, Selve J, Strell C, Thway K, et al. Distinct effects of ligand-induced PDGFR α and PDGFR β signaling in the human rhabdomyosarcoma tumor cell and stroma cell compartments. *Cancer Res* (2013) **73**:2139–49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1646
47. Nakamura K, Abarzua F, Hongo A, Kodama J, Nasu Y, Kumon H, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2) are potential targets in uterine leiomyosarcoma. *Int J Oncol* (2010) **37**:605–14. doi:10.3892/ijo.00000709
48. Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y. Inhibition of uterine sarcoma cell growth through suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling. *PLoS One* (2012) **7**:e41049. doi:10.1371/journal.pone.0041049
49. Pula G, Pistilli A, Montagnoli C, Stabile AM, Rambotti MG, Rende M. The tricyclic antidepressant amitriptyline is cytotoxic to HTB114 human

- leiomyosarcoma and induces p75(NTR)-dependent apoptosis. *Anticancer Drugs* (2013) **24**:899–910. doi:10.1097/CAD.0b013e328364312f
50. Michels S, Trautmann M, Sievers E, Kindler D, Huss S, Renner M, et al. SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells. *Cancer Res* (2013) **73**:2518–28. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3023
 51. Cen L, Hsieh F-C, Lin H-J, Chen C-S, Qualman SJ, Lin J. PDK-1/AKT pathway as a novel therapeutic target in rhabdomyosarcoma cells using OSU-03012 compound. *Br J Cancer* (2007) **97**:785–91. doi:10.1038/sj.bjc.6603952
 52. Yan S, Li Z, Thiele CJ. Inhibition of STAT3 with orally active JAK inhibitor, AZD1480, decreases tumor growth in Neuroblastoma and Pediatric Sarcomas In vitro and In vivo. *Oncotarget* (2013) **4**:433–45.
 53. Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Pädiatrie* (1999) **211**:319–22. doi:10.1055/s-2008-1043808
 54. Seitz G, Warmann SW, Armeanu S, Heitmann H, Ruck P, Hoffman RM, et al. In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma. *Int J Oncol* (2007) **30**:615–20. doi:10.3892/ijo.30.3.615
 55. Herrero Martín D, Boro A, Schäfer BW. Cell-based small-molecule compound screen identifies fenretinide as potential therapeutic for translocation-positive rhabdomyosarcoma. *PLoS One* (2013) **8**:e55072. doi:10.1371/journal.pone.0055072
 56. Nakamura T, Tanaka K, Matsunobu T, Okada T, Nakatani F, Sakimura R, et al. The mechanism of cross-resistance to proteasome inhibitor bortezomib and overcoming resistance in Ewing's family tumor cells. *Int J Oncol* (2007) **31**:803–11. doi:10.3892/ijo.31.4.803
 57. Bersani F, Taulli R, Accornero P, Morotti A, Miretti S, Crepaldi T, et al. Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* (2008) **44**:876–84. doi:10.1016/j.ejca.2008.02.022
 58. Lesko E, Gozdzik J, Kijowski J, Jenner B, Wiecha O, Majka M. HSP90 antagonist, geldanamycin, inhibits proliferation, induces apoptosis and blocks migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro and seeding into bone marrow in vivo. *Anticancer Drugs* (2007) **18**:1173–81. doi:10.1097/CAD.0b013e3282ef532d
 59. Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, et al. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* (2001) **7**:158–67.
 60. Sun Y, Wang H, Lin F, Hua J, Zhou G. Inhibition of proliferation and gene expression regulation by (-)-epigallocatechin-3-gallate in human synovial sarcoma cells. *Med Oncol* (2011) **28**:1463–8. doi:10.1007/s12032-010-9560-x
 61. Ramírez-Peinado S, Alcázar-Limones F, Lagares-Tena L, El Mjijad N, Caro-Maldonado A, Tirado OM, et al. 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* (2011) **71**:6796–806. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0759
 62. Holt SV, Brookes KE, Dive C, Makin GWJ. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. *Oncol Rep* (2011) **25**:1177–81. doi:10.3892/or.2011.1167
 63. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1833**:3481–98. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.026
 64. Crompton BD, Carlton AL, Thorner AR, Christie AL, Du J, Calicchio ML, et al. High-throughput tyrosine kinase activity profiling identifies FAK as a candidate therapeutic target in Ewing sarcoma. *Cancer Res* (2013) **73**:2873–83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1944
 65. Díaz-Montero CM, McIntyre BW. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells. *Eur J Cancer* (2003) **39**:2395–402. doi:10.1016/S0959-8049(03)00575-6
 66. Lin D, Feng J, Chen W. Bcl-2 and caspase-8 related anoikis resistance in human osteosarcoma MG-63 cells. *Cell Biol Int* (2008) **32**:1199–206. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.002
 67. Scotlandi K, Zuntini M, Manara MC, Sciandra M, Rocchi A, Benini S, et al. CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene* (2007) **26**:6604–18. doi:10.1038/sj.onc.1210481
 68. Akiyama T, Choong PFM, Dass CRRANK-. Fc inhibits malignancy via inhibiting ERK activation and evoking caspase-3-mediated anoikis in human osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* (2010) **27**:207–15. doi:10.1007/s10585-010-9319-y
 69. Kang H-G, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, et al. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res* (2007) **67**:3094–105. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3259
 70. Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M, Cerisano V, et al. Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther* (2002) **9**:296–307. doi:10.1038/sj.cgt.7700442
 71. Sun Y, Gao D, Liu Y, Huang J, Lessnick S, Tanaka S. IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene* (2006) **25**:1042–52. doi:10.1038/sj.onc.1209143
 72. Mendoza-Naranjo A, El-Naggar A, Wai DH, Mistry P, Lazic N, Ayala FRR, et al. Tavares Guerreiro Fregnani JH, et al. *EMBO Mol Med* (2013) **5**:1019–34. doi:10.1002/emmm.201202343
 73. Walter D, Satheesha S, Albrecht P, Bornhauser BC, D'Alessandro V, Oesch SM, et al. CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One* (2011) **6**:e19506. doi:10.1371/journal.pone.0019506
 74. Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM. Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone* (2003) **33**:216–28. doi:10.1016/S8756-3282(03)00223-0
 75. Al-Romaih K, Somers GR, Bayani J, Hughes S, Prasad M, Cutz J-C, et al. Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells in vitro and in xenografts: identification of apoptotic genes as targets for demethylation. *Cancer Cell Int* (2007) **7**:14. doi:10.1186/1475-2867-7-14
 76. Liu B, Qu L, Yang Z, Tao H. Cyclooxygenase-2 inhibitors induce anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Med Hypotheses* (2012) **79**:98–100. doi:10.1016/j.mehy.2012.04.012
 77. Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis. *Biofactors* (2013) **39**:343–54. doi:10.1002/biof.1112
 78. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* (2013) **12**:86. doi:10.1186/1476-4598-12-86
 79. Wang S, Ren W, Liu J, Lahat G, Torres K, Lopez G, et al. TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. *Clin Cancer Res* (2010) **16**:2591–604. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2443
 80. Gasparini C, Vecchi Brumatti L, Monasta L, Zauli G. TRAIL-based therapeutic approaches for the treatment of pediatric malignancies. *Curr Med Chem* (2013) **20**:2254–71. doi:10.2174/0929867311320170009
 81. Karlisch C, Harati K, Chromik AM, Bulut D, Klein-Hitpass L, Goertz O, et al. Effects of TRAIL and taurolidine on apoptosis and proliferation in human rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and epithelioid cell sarcoma. *Int J Oncol* (2013) **42**:945–56. doi:10.3892/ijo.2013.1772
 82. Petak I, Douglas L, Tillman DM, Vernes R, Houghton JA. Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* (2000) **6**:4119–27.
 83. Cheong H-J, Lee KS, Woo IS, Won J-H, Byun JH. Up-regulation of the DR5 expression by proteasome inhibitor MG132 augments TRAIL-induced apoptosis in soft tissue sarcoma cell lines. *Cancer Res Treat* (2011) **43**:124–30. doi:10.4143/crt.2011.43.2.124
 84. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods Enzymol* (2014) **544**:99–128. doi:10.1016/B978-0-12-417158-9.00005-4
 85. Sakai T, Eskander RN, Guo Y, Kim KJ, Mefford J, Hopkins J, et al. Flavokawain B, a kava chalcone, induces apoptosis in synovial sarcoma cell lines. *J Orthop Res* (2012) **30**:1045–50. doi:10.1002/jor.22050
 86. Eskander RN, Randall LM, Sakai T, Guo Y, Hoang B, Zi X. Flavokawain B, a novel, naturally occurring chalcone, exhibits robust apoptotic effects and induces G2/M arrest of a uterine leiomyosarcoma cell line. *J Obstet Gynaecol Res* (2012) **38**:1086–94. doi:10.1111/j.1447-0756.2011.01841.x
 87. Kang Z, Chen J-J, Yu Y, Li B, Sun S-Y, Zhang B, et al. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clin Cancer Res* (2011) **17**:3181–92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2874
 88. Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, Besançon F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene* (2000) **19**:61–8. doi:10.1038/sj.onc.1203246

89. Mitsiades N, Poulaki V, Leone A, Tsokos M. Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* (1999) **91**:1678–84. doi:10.1093/jnci/91.19.1678
90. Lee B, Galli S, Tsokos M. Sensitive Ewing sarcoma and neuroblastoma cell lines have increased levels of BAD expression and decreased levels of BAR expression compared to resistant cell lines. *Cancer Lett* (2007) **247**:110–4. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.033
91. Ricci C, Polito L, Nanni P, Landuzzi L, Astolfi A, Nicoletti G, et al. HER/erbB receptors as therapeutic targets of immunotoxins in human rhabdomyosarcoma cells. *J Immunother* (2002) **25**:314–23. doi:10.1097/00002371-200207000-00003
92. Zhou Z, Lafleur EA, Koshkina NV, Worth LL, Lester MS, Kleinerman ES. Interleukin-12 up-regulates Fas expression in human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells by enhancing its promoter activity. *Mol Cancer Res* (2005) **3**:685–91. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0092
93. Kuçi S, Rettinger E, Voss B, Weber G, Stais M, Kreyenberg H, et al. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* (2010) **95**:1579–86. doi:10.3324/haematol.2009.019885
94. Fanburg-Smith JC, Miettinen M. Low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in dermatofibrosarcoma protuberans and other nonneural tumors: a study of 1,150 tumors and fetal and adult normal tissues. *Hum Pathol* (2001) **32**:976–83. doi:10.1053/hupa.2001.27602
95. Horiuchi K, Morioka H, Nishimoto K, Suzuki Y, Susa M, Nakayama R, et al. Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylperoxyquinomicin (DHMEQ). *Cancer Lett* (2008) **272**:336–44. doi:10.1016/j.canlet.2008.07.021
96. Mathieu J, Besançon F. Clinically tolerable concentrations of arsenic trioxide induce p53-independent cell death and repress NF-kappa B activation in Ewing sarcoma cells. *Int J Cancer* (2006) **119**:1723–7. doi:10.1002/ijc.21970
97. Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* (2001) **20**:5865–77. doi:10.1038/sj.onc.1204750
98. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* (2007) **32**:37–43. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001
99. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med* (2014) **370**:455–65. doi:10.1056/NEJMr1310050
100. Fu Z, Deng B, Liao Y, Shan L, Yin F, Wang Z, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer* (2013) **13**:580. doi:10.1186/1471-2407-13-580
101. Basit F, Cristofanon S, Fulda S. Obatoclastin (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ* (2013) **20**:1161–73. doi:10.1038/cdd.2013.45
102. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1833**:3448–59. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
103. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) **15**:81–94. doi:10.1038/nrm3735
104. Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* (2010) **221**:117–24. doi:10.1002/path.2694
105. Lorin S, Borges A, Ribeiro Dos Santos L, Souquère S, Pierron G, Ryan KM, et al. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for DRAM-dependent induction of autophagy and apoptosis in 2-methoxyestradiol-treated Ewing sarcoma cells. *Cancer Res* (2009) **69**:6924–31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1270
106. Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* (2006) **281**:30373–82. doi:10.1074/jbc.M602097200
107. Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Mariño G, et al. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle* (2012) **11**:170–6. doi:10.4161/cc.11.1.18564
108. Vitale I, Galluzzi L, Senovilla L, Criollo A, Jemaà M, Castedo M, et al. Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization. *Cell Death Differ* (2011) **18**:1403–13. doi:10.1038/cdd.2010.145
109. Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* (2007) **6**:686–95. doi:10.4161/cc.6.6.3990
110. Morales AG, Brassesco MS, Pezok JA, Oliveira JC, Montaldi AP, Sakamoto-Hojo ET, et al. BI 2536-mediated PLK1 inhibition suppresses HOS and MG-63 osteosarcoma cell line growth and clonogenicity. *Anticancer Drugs* (2011) **22**:995–1001. doi:10.1097/CAD.0b013e32834a16d4
111. Wan X, Yeung C, Kim SY, Dolan JG, Ngo VN, Burkett S, et al. Identification of FoxM1/Bub1b signaling pathway as a required component for growth and survival of rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* (2012) **72**:5889–99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1991
112. Hu K, Lee C, Qiu D, Fotovati A, Davies A, Abu-Ali S, et al. Small interfering RNA library screen of human kinases and phosphatases identifies polo-like kinase 1 as a promising new target for the treatment of pediatric rhabdomyosarcomas. *Mol Cancer Ther* (2009) **8**:3024–35. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0365
113. Lund-Andersen C, Patzke S, Nähse-Kumpf V, Syljuåsen RG. PLK1-inhibition can cause radiosensitization or radioresistance dependent on the treatment schedule. *Radiother Oncol* (2014) **110**:355–61. doi:10.1016/j.radonc.2013.12.014
114. Shan W, Akinfenwa PY, Savannah KB, Kolomeyevskaya N, Laucirica R, Thomas DG, et al. A small-molecule inhibitor targeting the mitotic spindle checkpoint impairs the growth of uterine leiomyosarcoma. *Clin Cancer Res* (2012) **18**:3352–65. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3058
115. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, Ose T, Obuse C, Maenaka K, et al. Simultaneous inhibition of Src and aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Eur J Cancer* (2012) **48**:2417–30. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.028
116. Syljuåsen RG, Sørensen CS, Nylandsted J, Lukas C, Lukas J, Bartek J. Inhibition of Chk1 by CEP-3891 accelerates mitotic nuclear fragmentation in response to ionizing radiation. *Cancer Res* (2004) **64**:9035–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2434
117. Lambert LA, Qiao N, Hunt KK, Lambert DH, Mills GB, Meijer L, et al. Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model. *Cancer Res* (2008) **68**:7966–74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1333
118. Reed JC. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nat Clin Pract Oncol* (2006) **3**:388–98. doi:10.1038/nponc0538
119. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:353–63. doi:10.1038/nri2545
120. Guerriero JL, Ditsworth D, Fan Y, Zhao F, Crawford HC, Zong W-X. Chemotherapy induces tumor clearance independent of apoptosis. *Cancer Res* (2008) **68**:9595–600. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2452
121. Machado E, Guillamot M, Malumbres M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ* (2012) **19**:369–77. doi:10.1038/cdd.2011.197
122. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* (2006) **6**:583–92. doi:10.1038/nrc1893
123. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) **10**:478–87. doi:10.1038/nrm2718
124. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* (2012) **13**:795–806. doi:10.1038/nrg3317
125. Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Cesne AL, Terrier P, Bonvalot S, Collin F, et al. Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Cancer* (2011) **117**:1049–54. doi:10.1002/cncr.25538
126. Billingsley KG, Lewis JJ, Leung DH, Casper ES, Woodruff JM, Brennan MF. Multifactorial analysis of the survival of patients with distant metastasis arising from primary extremity sarcoma. *Cancer* (1999) **85**:389–95. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19990115)85:2<389::AID-CNCR17>3.3.CO;2-A
127. Choy E, Butrynski J, Harmon D, Morgan J, George S, Wagner A, et al. Translation of preclinical predictive sensitivity of Ewing sarcoma to PARP inhibition: phase II study of olaparib in adult patients with recurrent/metastatic Ewing sarcoma following failure of prior chemotherapy. *Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*. Washington DC (2013). LB-174.
128. Wagner AJ, Chugh R, Rosen LS, Morgan JA, George S, Gordon M, et al. A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* (2013) **19**:6020–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0953

129. Maki RG, Kraft AS, Scheu K, Yamada J, Wadler S, Antonescu CR, et al. A multi-center phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer* (2005) **103**:1431–8. doi:10.1002/cncr.20968
130. Ray-Coquard I, Blay J-Y, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol* (2012) **13**:1133–40. doi:10.1016/S1470-2045(12)70474-6
131. Kurzock R, Blay J-Y, Bui-Nguyen B, Wagner A, Maki RG, Schwartz GK, et al. A phase I study of MDM2 antagonist RG7112 in patients (pts) with relapsed/refractory solid tumors. *Proceedings of the 2012 ASCO Meeting*. Chicago, IL (2012). e13600.
132. Chawla SP, Staddon AP, Baker LH, Schuetze SM, Tolcher AW, D'Amato GZ, et al. Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* (2012) **30**:78–84. doi:10.1200/JCO.2011.35.6329
133. Demetri GD, Chawla SP, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Staddon AP, Milhem MM, et al. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J Clin Oncol* (2013) **31**:2485–92. doi:10.1200/JCO.2012.45.5766
134. Yoo C, Lee J, Rha SY, Park KH, Kim TM, Kim YJ, et al. Multicenter phase II study of everolimus in patients with metastatic or recurrent bone and soft-tissue sarcomas after failure of anthracycline and ifosfamide. *Invest New Drugs* (2013) **31**:1602–8. doi:10.1007/s10637-013-0028-7
135. Santoro A, Comandone A, Basso U, Soto Parra H, De Sanctis R, Stroppa E, et al. Phase II prospective study with sorafenib in advanced soft tissue sarcomas after anthracycline-based therapy. *Ann Oncol* (2013) **24**:1093–8. doi:10.1093/annonc/mds607
136. Van der Graaf WTA, Blay J-Y, Chawla SP, Kim D-W, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* (2012) **379**:1879–86. doi:10.1016/S0140-6736(12)60651-5
137. Dickson MA, Tap WD, Keohan ML, D'Angelo SP, Gounder MM, Antonescu CR, et al. Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *J Clin Oncol* (2013) **31**:2024–8. doi:10.1200/JCO.2012.46.5476
138. Rello-Varona S, Herrero-Martin D, Lopez-Aleman R, Munoz-Pinedo C, Tirado OM. “(Not) All (Dead) Things Share the Same Breath”: identification of cell death mechanisms in anticancer therapy. *Cancer Res* (2015) **75**(6):913–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3494

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 16 January 2015; accepted: 21 March 2015; published online: 07 April 2015.
 Citation: Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Lagares-Tena L, López-Aleman R, Mulet-Margalef N, Huertas-Martínez J, García-Monclús S, García del Muro X, Muñoz-Pinedo C and Tirado OM (2015) The importance of being dead: cell death mechanisms assessment in anti-sarcoma therapy. *Front. Oncol.* 5:82. doi: 10.3389/fonc.2015.00082
 This article was submitted to *Pediatric Oncology*, a section of the journal *Frontiers in Oncology*.

Copyright © 2015 Rello-Varona, Herrero-Martín, Lagares-Tena, López-Aleman, Mulet-Margalef, Huertas-Martínez, García-Monclús, García del Muro, Muñoz-Pinedo and Tirado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Caveolin-1 is down-regulated in alveolar rhabdomyosarcomas and negatively regulates tumor growth

Juan Huertas-Martínez¹, Santiago Rello-Varona¹, David Herrero-Martín¹, Ignasi Barrau¹, Silvia García-Monclús¹, Miguel Sáinz-Jaspeado¹, Laura Lagares-Tena¹, Yaiza Núñez-Álvarez⁵, Silvia Mateo-Lozano², Jaume Mora², Josep Roma³, Nuria Toran³, Sebastian Moran⁴, Roser López-Alemaný¹, Soledad Gallego³, Manel Esteller⁴, Miguel A. Peinado⁵, Xavier García del Muro¹ and Oscar M. Tirado¹

¹ Sarcoma research group, Molecular Oncology Lab, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

² Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

³ Biomedical Research Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁴ Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁵ Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer, Badalona, Barcelona, Spain

Correspondence to: Oscar M. Tirado, **email:** omartinez@idibell.cat

Keywords: alveolar rhabdomyosarcoma, Caveolin-1, muscular differentiation, 5-AZA-2'-deoxycytidine, epigenetics, cell death

Received: June 26, 2014

Accepted: August 26, 2014

Published: August 27, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Rhabdomyosarcoma is the most common soft tissue sarcoma of childhood and adolescence. Despite advances in therapy, patients with histological variant of rhabdomyosarcoma known as alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS) have a 5-year survival of less than 30%. Caveolin-1 (CAV1), encoding the structural component of cellular caveolae, is a suggested tumor suppressor gene involved in cell signaling. In the present study we report that compared to other forms of rhabdomyosarcoma (RMS) CAV1 expression is either undetectable or very low in ARMS cell lines and tumor samples. DNA methylation analysis of the promoter region and azacytidine-induced re-expression suggest the involvement of epigenetic mechanisms in the silencing of CAV1. Reintroduction of CAV1 in three of these cell lines impairs their clonogenic capacity and promotes features of muscular differentiation. *In vitro*, CAV1-expressing cells show high expression of Caveolin-3 (CAV3), a muscular differentiation marker. Blockade of MAPK signaling is also observed. *In vivo*, CAV1-expressing xenografts show growth delay, features of muscular differentiation and increased cell death. In summary, our results suggest that CAV1 could function as a potent tumor suppressor in ARMS tumors. Inhibition of CAV1 function therefore, could contribute to aberrant cell proliferation, leading to ARMS development.

INTRODUCTION

Rhabdomyosarcoma (RMS) is a rare soft tissue sarcoma, more frequent in children, accounting for 3-4% of childhood cancers. It is believed to be caused by the disruption of regulatory mechanisms that lead to the myogenic phenotype in primitive mesenchymal stem cells [1]. RMS comprises two histological subtypes, alveolar (ARMS) and embryonal (ERMS), each of

them with different prognosis and various genetic and molecular alterations. ERMS typically occurs in the head, neck and genitourinary sites and is associated with loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 11 (the 11p15.5 region) which codify for various tumor suppressor genes [2-3] imprinted in physiological but not in pathologic conditions. ARMS, on the other hand, commonly arises in the trunk and extremities and is linked with acquired specific chromosomal translocations t(2;13)

(q35;q14) or t(1;13)(p36;q14) in 70 to 85% of cases. These translocations give rise to the fusion of the PAX3 or PAX7 transcription factor to the forkhead (FOXO1) transcription factor. All characterized PAX-FOXO1 chromosomal translocations generate structurally equivalent, in-frame PAX-FOXO1 chimeric transcription factors, where the PAX paired box and homeodomain DNA-binding domains are fused to the transcriptional activation domain of FOXO1 [4]. PAX3/7-FOXO1 aberrant fusion proteins behave as oncoproteins deregulating PAX3 and PAX7 transcription factor networks that play a role in skeletal muscle development, thus altering aspects of the muscle development, growth and/or maintenance. In the end PAX/FOXO1 proteins drive neoplastic transformation of skeletal muscle lineage cells towards malignant, developmentally arrested primitive myoblasts [5].

Caveolin-1 (CAV1) is the principal structural protein responsible for the formation of caveolae in the cell membrane. The capacity of CAV1 to associate with a wide variety of proteins is crucial in a number of processes, ranging from vesicular transport and cholesterol homeostasis to nitric oxide production and cell migration, among others [6-9]. CAV1 has been thoroughly characterized in many cancers due to its ability to regulate cell cycle progression and intracellular signal transduction, and it has been shown to act both as a tumor suppressor or tumor promoter depending on the cellular background [10-12].

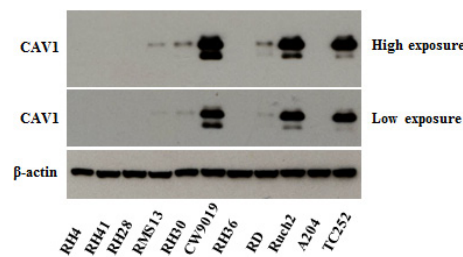
In a recent study, it was shown that CAV1 was predominantly expressed in the ERMS histotype and placed CAV1 as a valuable marker of diagnosis for RMS characterized by low degree of differentiation [13]. We further confirmed the absence of CAV1 in ARMS cell lines [12]. However, the mechanism responsible for CAV1 absence and its putative role in ARMS as a tumor suppressor has not been investigated yet. We show here that CAV1 silencing in ARMS cells is a consequence of promoter methylation. Additionally, we show that re-expression of CAV1 in three of these cell lines is cytostatic and promotes features of muscular differentiation. *In vivo*, CAV1-expressing tumor cells show growth delay and higher muscular differentiation in comparison to untransfected and vector transfected cells. Our results demonstrate that CAV1 could function as a potent tumor suppressor in ARMS tumors. Inhibition of CAV1 function could contribute to aberrant cell proliferation, leading to ARMS development.

RESULTS

CAV1 is down-regulated in ARMS cell lines and tumor samples

We and others have previously shown down-regulation of CAV1 in ARMS cell lines [12-13]. To further determine the expression levels of CAV1 in RMS cell lines and patients, we analyzed its expression by western blot in a panel of human cell lines and by immunohistochemistry (IHC) in a tissue microarray (TMA) of 70 patients (Figure 1 and Supplementary Table S1). Most of the ARMS cell lines tested had very low or undetectable levels of CAV1 (Figure 1A). In the TMA (Figure 1B), CAV1 expression

A



B

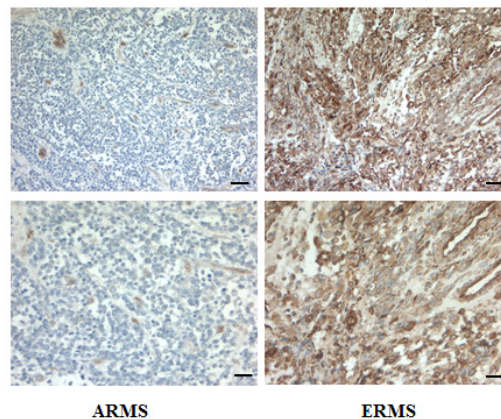


Figure 1: CAV1 expression in rhabdomyosarcomas.

(A) Western blot showing CAV1 expression (at high and low exposure) in different ARMS (RH4, RH41, RH28, RMS13, RH30, PAX3/FOXO1- and CW9019, PAX7/FOXO1-), ERMS (RH36, RD), Botryoid (RUCH2) and Rhabdoid (A204) cell lines, using a Ewing sarcoma cell line (TC252) as a positive control, (B) CAV1 staining from a pleural ARMS sample (right panel), representative of the absence of CAV1 expression in these patients, and from a pelvic ERMS in stage 4 (left panel), representative of high expression of CAV1. Scale bars 100 μ m and 50 μ m for the higher magnification.

was detected mostly in ERMS patients (28/39) and was localized in the cytosol and plasma membrane. Barely any expression was found in ARMS patients (2/12). Expression in other forms of RMS was variable (9/19). As shown in supplementary Table S1, not enough clinical information was available to establish any significant statistical correlation.

CAV1 is silenced in ARMS cells by epigenetic mechanisms

CAV1 has been reported to be up-regulated by the DNA methyltransferase inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) in several types of cancer [14]. Moreover, hypermethylation of the *CAV1* promoter in human cancer has also been shown [15-17]. Analysis of DNA methylation in the *CAV1* gene promoter (Figure

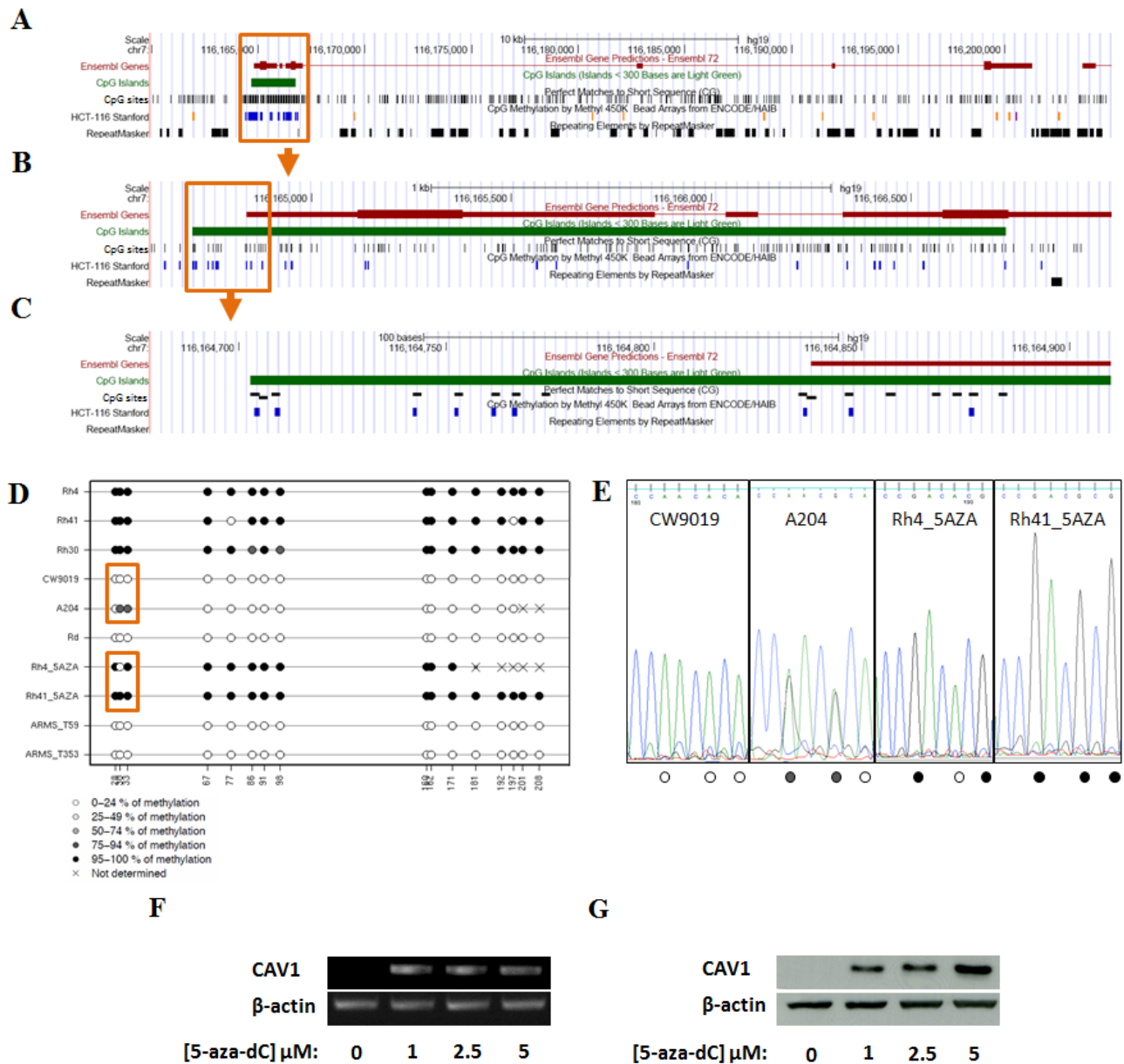


Figure 2: Analysis of DNA methylation in the *CAV1* gene promoter. (A) Representation of the *CAV1* gene in the UCSC Genome Browser. The promoter-associated CpG island is boxed. The tracks indicate the position of CpG sites and Infinium 450K methylation arrays (HCT-116 Stanford), (B) Enlarged display of the CpG island. The region analyzed for DNA methylation is boxed, (C) Region analyzed for DNA methylation by bisulfite sequencing, (D) DNA methylation levels of the CpGs analyzed by bisulfite sequencing (E) Detail of the electropherogram showing three CpGs differentially methylated enclosed in a box in panel D. Methylation level of each CpG is indicated at the bottom of the sequence (reverse strand) using the same code of panel D, RT-PCR (F) and Western Blot (G) 72h after 5-aza-dC treatment in RH4 cells.

2A-C) of RMS cell lines and tumor samples showed hypermethylation in the promoter-associated CpG island in 5 out of 6 ARMS cell lines but in any of the other cell lines used in the experiment nor in the two ARMS tumor samples (Figure 2D-E and Supplementary Figure S1). Treatment of RH4 cells with increasing concentrations of 5-aza-dC induced re-expression of *CAV1* mRNA and protein (Figure 2F and G). Similar results were obtained in other three ARMS cell lines (RH41, RH28 and RMS13) (Supplementary Figure S2).

Over-expression of CAV1 suppresses tumorigenicity of ARMS cells

In order to explore the role of CAV1 in the progression of ARMS we stably transfected RH4, RH41 and RH28 cells with the expression vector pCMV6-CAV1. Over-expression of CAV1 was confirmed in several selected clones by western blot (Figure 3A, Supplementary Figure S3A and Supplementary Figure S4). Changes in CAV1 protein expression were also confirmed by immunofluorescence, where over-expressing

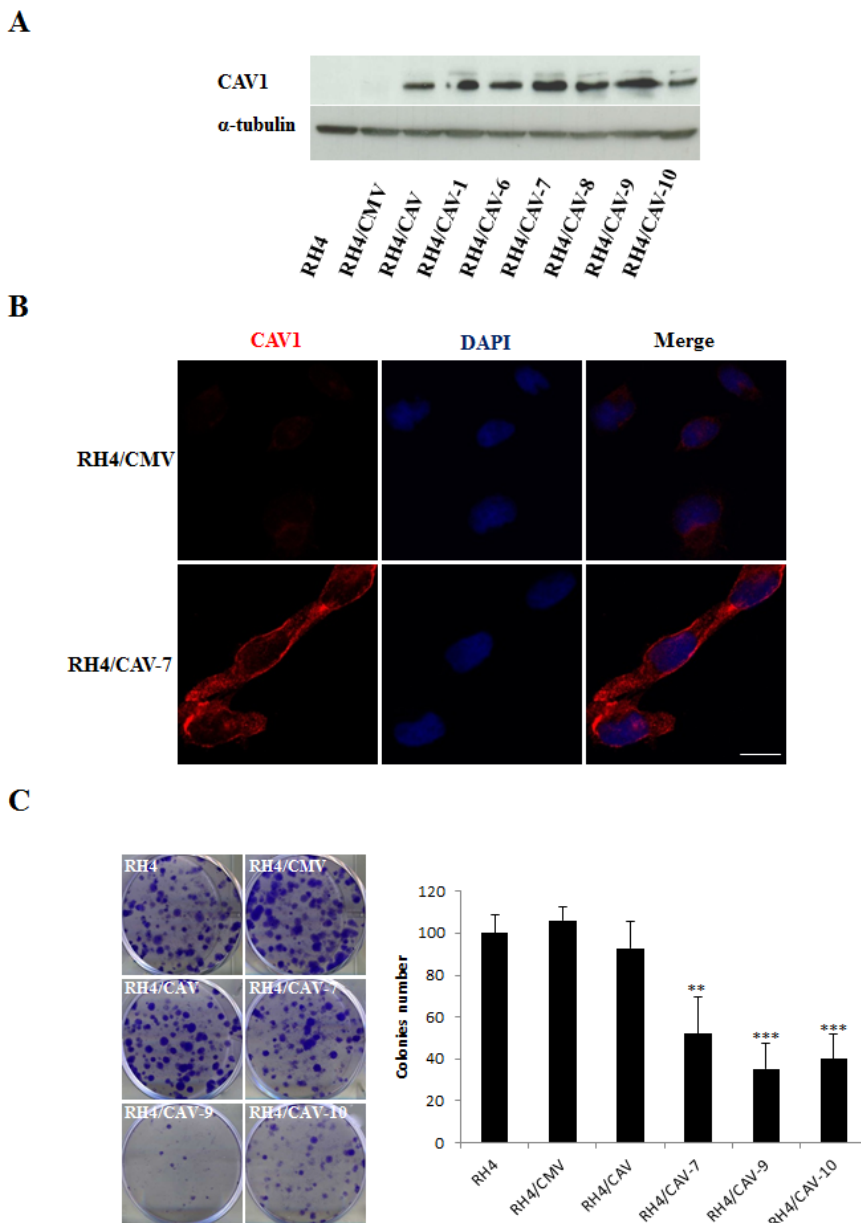


Figure 3: Effects of CAV1 transfection in the RH4 cell line. (A) Western Blot showing expression of CAV1 on isolated clones, (B) Immunofluorescence showing expression and localization of CAV1 in the plasma membrane of RH4 transfected cells, Scale bars 10µm, (C) Clonogenic assay using the RH4 model showing a decrease in the clonogenic capacity in the CAV1 transfected cells (CMV stands for empty vector transfected cells and CAV refers to CAV1 transfected cells, the number indicates the clone). Statistical significance was assessed by the Student's *t* test: ** $p \leq 0.001$ and *** $p \leq 0.0001$.

cells demonstrated increased cytoplasm and membrane localization of CAV1 following transfection (Figure 3B). Moreover, as a result of CAV1 reintroduction, clonogenic growth was significantly affected (Figure 3C and Figure S3B). It is well known that the biological behavior of a tumor is related to the degree of differentiation of its

cells, and a lower degree of differentiation generally correlates with greater tumor growth. Accordingly, as a consequence of CAV1 transfection we observed elongated cell morphology and appearance of cross-striations in some cells, consistent with a more differentiated myogenic phenotype (Figure 4A). This effect was further highlighted

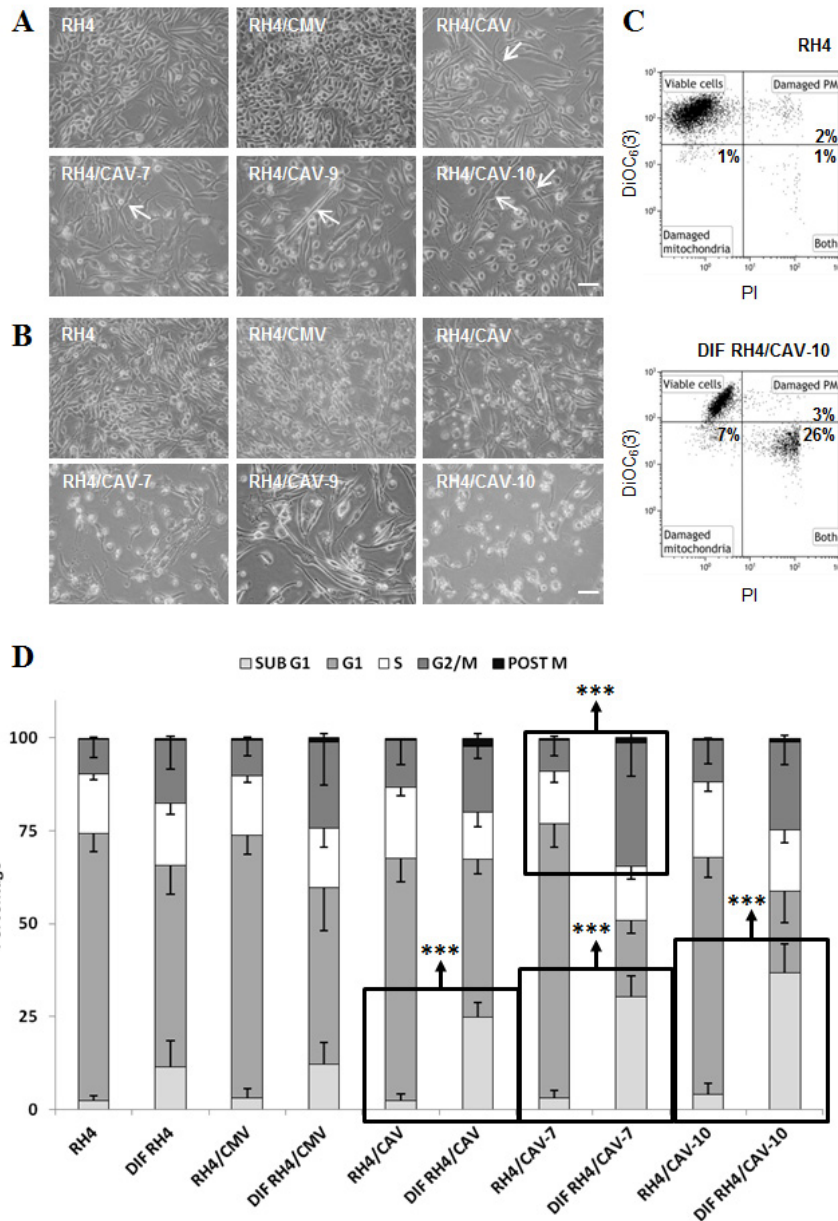


Figure 4: RH4 rhabdomyosarcoma cells expressing CAV1 show an increased capacity for initiate differentiation process, but they die before fully completing it. (A) CAV1 expressing RH4 cells cultured in differentiation media (RPMI medium without serum) for 72 h change their morphology by the acquisition of an elongate form (arrows), (B) Wild-type RH4 rhabdomyosarcoma cells grow normally in differentiation conditions up to 120 h, but transfected cells expressing CAV1 die, (C) Cytofluorometric plots showing the acquisition of the vital dye DiOC₆(3) which accumulates in mitochondria maintaining their characteristic membrane potential ($\Delta\psi_m$) and the cell death marker Propidium Iodide (PI) who only enters in cells whose plasma membrane barrier is broken. RH4/CAV-10 population shows a clear shift towards losing both the $\Delta\psi_m$ and the membrane integrity, hallmarks of apoptosis, (D) Cell cycle analysis by means of cytofluorometric measurement of DNA-binding dye PI content in fixed cells. Cells cultured in differentiation conditions show a trend to be arrested in G₂/M phase of the cell cycle. The G₂/M blockade becomes significant in RH4/CAV-7 line. CAV1 expressing cells show a marked increase of the number of cells with a DNA content inferior of the G₁ phase (apoptotic). Statistical significance was assessed by the Student's *t* test: ****p* ≤ 0.0001. Scale bars 50 μ m.

in differentiation conditions on RH4 and RH28 models (Figure 4B and Supplemental Figure S5A). Additionally, under differentiation conditions most of CAV1 transfected cells failed to maintain the polarization of the outer mitochondrial membrane and the barrier of the plasma membrane (as visualized by cytofluorometric analysis with the probes DiOC₆(3) and Propidium Iodide (PI) (Figure 4C and Supplemental Figure S5B). When cultivated in differentiation conditions (Figure 4D, Supplementary Figure S5C and Supplementary Figure S6), CAV1-transfected cells significantly increased the amount of apoptotic cells. More interestingly, differentiation

conditions led to an increase of G₂/M cells (assumed as G₂ cells as microscopical observation showed not dividing cells) especially significant in clone 7. Combination of the DiOC₆(3)-PI viability assay with the cell permeable DNA dye Hoechst-33342 pointed that at least part of the dying cells start apoptosis from G₂ phase (data not shown).

Most importantly, *in vivo* experiments on the RH4 model showed that, 40 days after s.c. injection into nude mice, CAV1-derived xenografts were significantly smaller ($p \leq 0.05$) than those induced by control cells (Figure 5A). Immunohistochemical analyses of paraffin-embedded tumors showed no detectable CAV1 expression in control

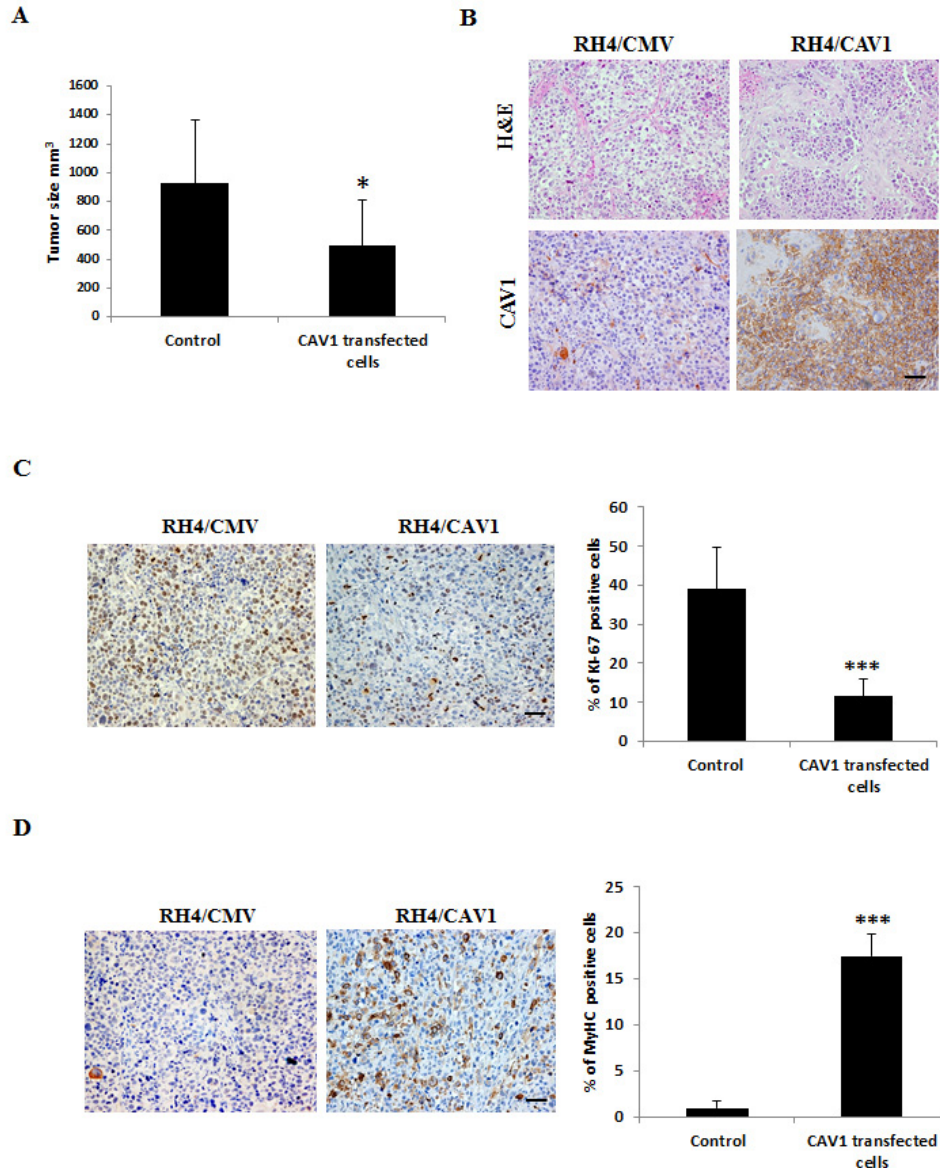


Figure 5: CAV1 delays ARMS *in vivo* tumor growth. (A) Graphic comparing tumor size (mm³) in the RH4/CAV1 model (Control states for RH4 and RH4/CMV, CAV1 transfected cells states for RH4/CAV-7 and RH4/CAV). CAV1 expressing cells grow significantly less than control cells, (B) Histopathology was examined by hematoxylin/eosin (H&E) and CAV1 expression by IHC staining, (C) proliferative capacity of the tumors was evaluated by Ki-67 staining. Positive cells were counted and percentage represented in the graphic, (D) differentiation state of the tumor was evaluated by MyHC staining. Positive cells were counted and percentage was represented in the graphic. Statistical significance was assessed by the Student's *t* test: *** $p < 0.0001$. Scale bars 50 μ m.

xenografts compared with the highly positive staining of CAV1–derived tumors (Figure 5B). Interestingly, CAV1-derived xenografts showed significant less Ki-67, a known marker of proliferation. On the other hand CAV1-derived xenografts showed more Myosin Heavy Chain (MyHC) staining (Figure 5C-D) suggesting tumors are less proliferative and more prone to differentiate. Altogether, these data show that CAV1 is a key negative effector of tumorigenesis, necessary for the development of the transformed phenotype in ARMS sarcomagenesis.

Because PAX/FOXO1 proteins block terminal differentiation in ARMS [5], we analyzed possible changes in these proteins as a consequence of CAV1 transfection. No significant changes were observed under proliferation (Figure 6A) or under differentiation conditions (Figure 6B). However, in clones 7 and 10, where higher phenotypic alterations were observed, under differentiation conditions FOXO1 levels were decreased. ERK dephosphorylation is key at the onset of myogenesis [14]. Furthermore, CAV1 is known to block MAPK signaling as part of its tumor suppressive activities [15]. Therefore, in order to go deeply into the mechanism by which CAV1 delays tumor growth in ARMS we sought to analyze the effects of CAV1 expression on MAPK signaling. Results showed that indeed, CAV1 expression caused ERK dephosphorylation under proliferating conditions (Figure 6A). This effect was further accentuated in the majority of the clones, except for clone 9, when cells were grown under differentiation conditions (Figure 6B). Moreover, a known marker of differentiation, CAV3, was increased both under proliferation and differentiation conditions (Figure 6A and 6B).

In order to demonstrate the CAV1 dependent pro-differentiation effects on ARMS cells we tested the

modulation of myogenin in the early and MyHC in the late phase of differentiation. As shown in Supplementary Figure S7, in comparison to controls CAV1 transfected cells showed an upregulation of myogenin up to 72 hours followed by an important decrease at 120 hours. MyHC appeared mostly at 120 hours (Supplementary Figure S7).

Overall our results strongly suggest that CAV1 expression delays ARMS cell growth, at least in part, by blocking ERK signaling, turning malignant cells toward a more permissive state for differentiation and cell death.

DISCUSSION

Testing for the expression of CAV1 in several sarcoma cell lines we found that its expression in most alveolar rhabdomyosarcoma cells was very low or undetectable [12]. Because proliferating myoblasts express CAV1 [16], we postulated that very low or no expression on proliferating tumor cells suggest that CAV1 would have suppressive activities on ARMS. In fact, a tumor suppressor role for CAV1 has been clearly demonstrated in several types of cancer [17-19] including sarcomas [20]. To test our hypothesis we validated first the expression levels of CAV1 on a broader number of cell lines and in tumor samples. Results confirmed that most ARMS cell lines, except for CW9019 (PAX7-FOXO1), and patients presented barely any expression of CAV1. This result might suggest that downregulation of CAV1 correlates specifically with PAX3-FOXO1 expression. Unfortunately, we did not possess exact information about the type of translocation in our ARMS patients cohort. Analysis of this issue in further patient cohorts will help to elucidate whether this relationship exist.

CAV1 can be negatively regulated by several means.

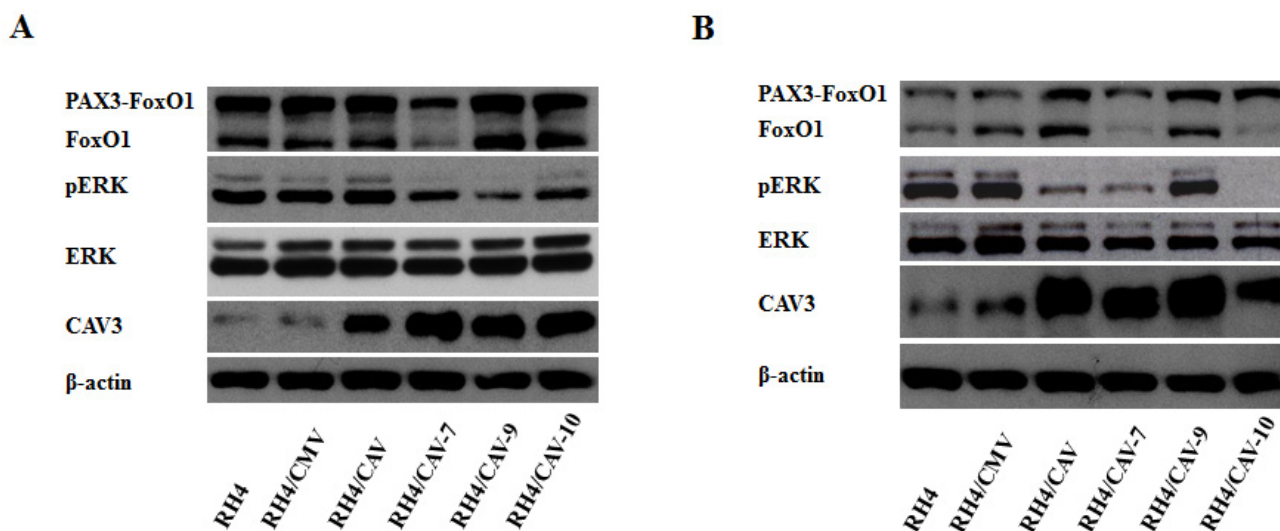


Figure 6: CAV1 affects ERK phosphorylation and promotes changes in CAV3. (A) Western blot showing PAX3-FOXO1, FOXO1, CAV1, ERK, phospho-ERK and CAV3 levels in cells grown in proliferating conditions or (B) grown under differentiation conditions.

For example, DNA methylation, that is an epigenetic mechanism of transcriptional regulation. Deregulation of DNA methylation in cancer results in inappropriate silencing of tumor suppressor genes by hypermethylation of the promoter region and oncogene overexpression by loss of methylation [21-23]. Thus, hypermethylation of CAV1 promoter has been shown to maintain it at low expression levels in some types of cancer such as breast and colon [24-25]. Therefore, we tested this possibility in several cell lines and tumor samples. Bisulfite sequencing showed heavy hypermethylation of the CAV1 promoter in ARMS cell lines. However, although no expression of CAV1 was detected in tumor samples no methylation was observed in its promoter, suggesting that promoter hypermethylation is a secondary event to gene silencing which would be induced by other mechanisms [26]. In this regard, one possibility is that expression of CAV1 might be regulated by microRNAs (miRNAs). In fact several miRNAs such as miR-124, miR-203, miR-199a and miR-802 had been found to directly suppress CAV1 in other tumors [27-31]. Among them miR-199a is the only one found highly expressed in ARMS [32] suggesting that this miRNA could be a good candidate as responsible for CAV1 downregulation in the tumor samples studied. Whether miR-199a targets CAV1 in ARMS deserves therefore further work. Another possibility is proteasomal degradation. Actually, CAV1 had also been shown to be degraded by the proteasome [33]. Hence, activity of stromal factors acting on proteasome pathways in tumor cells can occur in ARMS patients and be responsible of CAV1 downregulation.

Our gain of function experiments clearly demonstrated that CAV1 had suppressive activities in ARMS cells both *in vitro* and *in vivo*, effects that were highlighted when cells were grown under differentiation conditions. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) dissipation is a well known process in apoptosis signaling, whereas the influx of Propidium Iodide inside the cells is a sign of loss of cationic pumps shared by late apoptotic cells and necrotic ones. Different end-point analyses (data not shown) suggests that the dissipation of the mitochondrial membrane potential precedes the loss of the plasma membrane barrier, indicating that CAV1 transfected cells triggered apoptosis in differentiation conditions.

One of the key features of ARMS is its incapacity to proceed through terminal differentiation [4]. Furthermore, the degree of myogenic differentiation in these tumors has been shown to inversely correlate with proliferation, migration and invasion [34]. Our results strongly suggest that CAV1 mediates tumor suppression, at least in part, by turning tumor cells more prone to differentiate. Accordingly, CAV3, a marker of differentiation [35] was highly upregulated in CAV1 transfected cells. Likewise, dephosphorylation of ERK1/2, necessary for cell fusion [36] prior to myotube formation and higher expression

of myosin heavy chain proteins, exclusive of myotubes [37] were also observed. Interestingly, FOXO1 levels were reduced in clones 7 and 10 paralleling phenotypic alterations in cells cultured under differentiation conditions. In agreement with these results, FOXO1 has been shown to delay and negatively regulate skeletal myoblast differentiation [38].

Recently Faggi *et al.* reported that overexpression of CAV1 leads to rhabdomyosarcoma cell proliferation [39], using the RH30 cell line as a model of high expression of CAV1. These reported results argue against the conclusions of our study. Nevertheless, in our panel of cells, RH30 and RMS13 (cells that come from the same patient) showed fairly low levels of CAV1. Furthermore, treatment of RMS13 with 5-aza-dC induced re-expression of CAV1 mRNA and protein. So, in our opinion this cell line is not representative of highly expressed CAV1 and therefore our panel of ARMS cells reflects better the role of CAV1 as a putative tumor suppressor in ARMS.

In summary, our results suggest that CAV1 could function as a potent tumor suppressor in ARMS tumors. Inhibition of CAV1 function therefore could contribute to aberrant cell proliferation, leading to ARMS development. Finally, we propose that mimicking CAV1 function may be of therapeutic use for the treatment of ARMS.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, stable transfection and treatments

RH4 and RH30 (kindly provided by Dr. Peter Houghton, The Research Institute Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio), RH28, RMS13, RH36 and Ruch2 (kindly provided by Dr. Beat Schäfer, Department of Oncology and Children's Research Center, University Children's Hospital, Zurich, Switzerland), CW9019 (kindly provided by Dr. Frederic Barr, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA), RH41, RD and A204 (bought from DSMZ, Libniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig Germany) and TC252 cell lines (kindly provided by Dr. Heinrich Kovar, Children's Cancer Research Institute (CCRI), Viena, Austria) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen). All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Exponentially growing cells within two sequential passages were used for all experiments. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the protocols of the manufacturer. Transfected cells were selected with neomycin [0.6 mg/ml for RH4 0.4 mg/ml for RH41, Invitrogen] for 14 days. pCMV6-CAV1 was bought from OriGene Technologies, Medical Center, Rockville, Maryland. Antibiotic-resistant pools

and individual clones were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (0.4 mg/ml or 0.6 mg/ml). For differentiation experiments cells were serum deprived for 72h. All cell lines were treated with 5-AZA-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) (Sigma) to allow global CpG demethylation. 2×10^5 cells/well were plated in 6-well dishes and treated after 24h with 1, 2.5 and 5 μ M 5-aza-dC for 72h. Drug was added every 24h.

Bisulfite sequencing

Caveolin 1 CpG island methylation was analyzed by bisulfite sequencing. Briefly, 300 ng of genomic DNA were converted with EZ DNA methylation kitTM (Zymo Research), according to manufacturer's instructions. Two different fragments spanning a total of 16 CpGs (Figure 2) were amplified by a nested PCR performed in triplicate and pooled before purification using JETQUICK PCR Spin KIT (Genomed), to ensure a representative methylation profile. The PCR products were sequenced using specific primers at GATC Biotech service. The primers used for the PCR amplifications were designed using MethPrimer and Bisearch [40] are: external PCR (GAGGTGGGAAGGGATGGTTTA, AAATTTCCCTAAACTATACTTTAA), internal PCR A (GTTGTTTATATTGGGTATTTTGT, TCTAAACACATCCCCAAAATTC), internal PCR B (ATTTTTGTTGAGATGATGTATTG, TCTAAACACATCCCCAAAATTC). Lollipop representations were generated using the Methylation Plotter web tool [41].

Clonogenic assay

For clonogenic assays, 500 cells/well were seeded in 6-well plates. When colonies reached saturation (14 days after seeding) cells were fixed with 4% formaldehyde for 30 minutes, washed with Dulbecco's PBS (DPBS), stained with violet crystal for 20 minutes and washed with water. Plates were scanned and colonies counted. Images reflect representative results of at least three independent experiments.

Flow cytometry

For the simultaneous quantification of plasma membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$), living cells were collected and stained with 1 μ g/mL propidium iodide (PI, which only incorporates into dead cells, from Molecular Probes) and 40 nM of the $\Delta\psi_m$ -sensitive dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3), from Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C. The cell-permeable DNA-binding dye Hoechst-33342 (Molecular Probes)

were also added (10 μ g/mL final concentration) for determining the cell-cycle status of live or dying cells.

For cell cycle analysis, cells were fixed in 70% ice-cold ethanol and labeled with 50 μ g/ml PI in the presence of 500 μ g/ml RNase (Sigma-Aldrich). Cytofluorometric determinations were performed by means of a Gallios flow cytometer and data were statistically evaluated using Kaluza software (Beckman Coulter). Only the events characterized by normal forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters were included in subsequent analyses.

Western Blot analysis

Cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Buffer, Thermo Scientific) containing protease inhibitors (Complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (PhoStop, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and centrifuged at 13000 \times g, at 4°C, for 20 minutes. The protein content of the supernatants was determined with BCA assay system (Pierce). Lysate aliquots (50 μ g) were resolved by 8%, 10% or 12% (depending on the protein molecular weight) SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking with 5% skimmed milk in PBS containing 0.2% Tween 20 at room temperature for 1 hour, membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (CAV1 #610059 from BD, FoxO1 #2880, ERK1/2 #4695, phospho-ERK1/2 #4376 from Cell Signaling Technology; CAV3 #sc5310 and Myogenin #sc-12732 from Santa Cruz; MyHC MF 20 from Developmental Studies Hybridoma Bank). Blots were then incubated at room temperature for 1 hour with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and the peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (Pierce) following the instructions of the manufacturer. Immunodetection of β -actin (#ab49900) from Abcam was used as a loading reference.

Xenografts

In vivo tumors were induced with subcutaneous injections of RH4/CAV1 model (3×10^6 cells), resuspended in 100 μ L of Matrigel Matrix (BD), in the hind legs of 10 athymic nude mice purchased from Charles River (Left flank RH4, right flank RH4/CAV-7 n=5; Left flank RH4/CMV, right flank RH4/CAV n=5). When the tumor reached a mean volume of about 1cm³ mice were euthanized and the tumor was removed for further analysis. Tumors were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Tumor volumes were calculated using the formula $V = (1/2)a \times b^2$, where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. Data are given as mean \pm SD. Statistical analysis was done by unpaired Student's

t test. Animal care procedures were followed according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Ethics approval was provided by the locally appointed ethics committee from the Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Immunohistochemical techniques were done as previously described [42]. Expression of CAV1 in xenografts was analyzed using a rabbit polyclonal antibody (CAV1 #610059, BD). Proliferation marker Ki-67 and differentiation marker MyHC were analyzed using rabbit polyclonal antibody (Ki-67 #18-0191Z, Life Technologies) and Mouse monoclonal antibody (eMHC F1652 Developmental Studies Hybridoma Bank). Immunofluorescence of ARMS cells was performed as described [43]. Photographs were taken with a Leica TCS SP5 spectral confocal microscope (argon, 405 diode and DPSS561) using a lambda blue 63×1.35 numerical aperture oil objective. Images were analyzed with Image J software (freely available from the National Institutes of Health (NIH) at the address <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

Total RNA (2µg), extracted using the Total RNA Isolation Kit (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel), was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Primers 5'-ACAAGCCCAACAACAAGG-3' (forward) and 5'-ATCGGGATGCCAAAGAGG-3' (reverse) were used for amplification of *Caveolin-1* (259 bp); and for β -*Actin* (432 bp), 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3' (forward) and 5'-CTTCATTGTGCTGGGTGC-3' (reverse) from Invitrogen. Amplification of *Caveolin-1* was adjusted at an annealing temperature of 58.4 °C and 59.5 °C for β -*Actin*. For each set of primers, the numbers of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semi-quantitative estimate of relative mRNA abundance. RT-PCR determinations were carried out thrice for each relevant transcript.

Quantitative Real Time PCR

Total RNA was extracted using the Total RNA Isolation Kit (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel). 2 µg of RNA were used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed under universal cycling conditions on an ABI 7300HT instrument (Applied Biosystems) using commercially available CAV1 probe (Hs00971716_m1) and mastermix

(all from Life Technologies). Cycle threshold (C_T) values were normalized to Beta Actin (ACTB). Experiments were performed at least three times and in triplicates. Relative expression level of the target gene among the different samples was calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method [44]. Mean values and standard deviations were calculated based on the results of three biological replicates at least.

Statistical Analysis

Data were analyzed for statistical significance using Student's *t* test. Unless otherwise stated, experiments were performed thrice; $P \leq 0.05$ was regarded as significant.

ACKNOWLEDGMENTS

S Rello-Varona is a MarieCurieCOFUND-BeatriuDePinós Researcher (The European Union 7th Framework Program for R+D and the Generalitat de Catalunya's Department for Economy and Knowledge: Secretary for Universities and Research). D Herrero-Martín is funded by Asociación Española contra el Cáncer-AECC. S García-Monclús is funded by Asociación Alba Pérez lucha contra el cáncer infantil. L Lagares-Tena is funded by the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. Y Núñez-Alvarez is funded by a FPU fellowship. This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (CP06/00151; CES12/021; PI11/00038) and Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-23638).

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests

REFERENCES

1. Macquarrie KL, Yao Z, Young JM, Cao Y, Tapscott SJ. miR-206 integrates multiple components of differentiation pathways to control the transition from growth to differentiation in rhabdomyosarcoma cells. *Skelet Muscle* 2012; 2(1):7.
2. Loh WE Jr, Scrabble HJ, Livanos E, Arboleda MJ, Cavenee WK, Oshimura M, Weissman BE. Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(5):1755-9.
3. Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PF, Nakamura Y, Feinberg AP. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 1993 16; 260(5106):361-4.
4. Marshall AD, Grosveld GC. Alveolar rhabdomyosarcoma

- The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skelet Muscle* 2012; 2(1):25.
5. Graf Finckenstein F, Shahbazian V, Davicioni E, Ren YX, Anderson MJ. PAX-FKHR function as pangenes by simultaneously inducing and inhibiting myogenesis. *Oncogene* 2008; 27(14):2004-14.
 6. Smart EJ, Ying Ys, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*. 1996; 271(46):29427-35.
 7. García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 1997; 272(41):25437-40.
 8. Grande-García A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*. 2007; 177(4):683-94.
 9. Boscher C, Nabi IR. Caveolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 729:29-50.
 10. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*. 2008; 27(4):715-35.
 11. Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett*. 2008; 268(2):187-201.
 12. Sáinz-Jaspeado M, Martin-Liberal J, Lagares-Tena L, Mateo-Lozano S, Garcia del Muro X, Tirado OM. Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget*. 2011; 2(4):305-12.
 13. Rossi S, Poliani PL, Cominelli M, Bozzato A, Vescovi R, Monti E, Fanzani A. Caveolin 1 is a marker of poor differentiation in Rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*. 2011; 47(5):761-72.
 14. Murray J, Huss JM. Estrogen-related receptor α regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 301(3):C630-45.
 15. Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem*. 2004; 279(49):51630-46
 16. Volonte D, Liu Y, Galbiati F. The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J*. 2005; 19(2):237-9.
 17. Quann K, Gonzales DM, Mercier I, Wang C, Sotgia F, Pestell RG, Lisanti MP, Jasmin JF. Caveolin-1 is a negative regulator of tumor growth in glioblastoma and modulates chemosensitivity to temozolomide. *Cell Cycle*. 2013; 12(10):1510-20.
 18. Chiu WT, Lee HT, Huang FJ, Aldape KD, Yao J, Steeg PS, Chou CY, Lu Z, Xie K, Huang S. Caveolin-1 upregulation mediates suppression of primary breast tumor growth and brain metastases by stat3 inhibition. *Cancer Res*. 2011; 71(14):4932-43.
 19. Bender F, Montoya M, Monardes V, Leyton L, Quest AF. Caveolae and caveolae-like membrane domains in cellular signaling and disease: identification of downstream targets for the tumor suppressor protein caveolin-1. *Biol Res*. 2002; 35(2):151-67.
 20. Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, Schneider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol*. 2001; 158(3):833-9.
 21. Sakai E, Nakajima A, Kaneda A. Accumulation of aberrant DNA methylation during colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(4):978-87.
 22. Stefansson OA, Esteller M. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013; 183(4):1052-63.
 23. Weisenberger DJ. Characterizing DNA methylation alterations from The Cancer Genome Atlas. *J Clin Invest*. 2014; 124(1):17-23.
 24. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett*. 1999; 448(2-3):221-30.
 25. Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chang JG. Promoter CpG methylation of caveolin-1 in sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2004; 24(3a):1645-50.
 26. Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 2002; 12:5380-7.
 27. Yang S, Liu X, Li X, Sun S, Sun F, Fan B, Zhao S. MicroRNA-124 reduces caveolar density by targeting caveolin-1 in porcine kidney epithelial PK15 cells. *Mol Cell Biochem*. 2013; 384(1-2):213-9.
 28. Miao L, Xiong X, Lin Y, Cheng Y, Lu J, Zhang J, Cheng N. miR-203 inhibits tumor cell migration and invasion via caveolin-1 in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett*. 2014; 7(3):658-662.
 29. Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, Copin MC, Wallaert B, Glowacki F, Dewaeles E, Milosevic J, Maurizio J, Tedrow J, Marcet B, Lo-Guidice JM, Kaminski N, Barbry P, Luedde T, Perrais M et al. miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet*. 2013; 9(2):e1003291.
 30. Shi XE, Li YF, Jia L, Ji HL, Song ZY, Cheng J, Wu GF,

- Song CC, Zhang QL, Zhu JY, Yang GS. MicroRNA-199a-5p Affects Porcine Preadipocyte Proliferation and Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(5):8526-38.
31. Lin DH, Yue P, Pan C, Sun P, Wang WH. MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(6):1087-98.
 32. Sarver AL, Phalak R, Thayanithy V, Subramanian S. S-MED: sarcoma microRNA expression database. *Lab Invest*. 2010; 90(5):753-61.
 33. Chanvorachote P, Nimmannit U, Lu Y, Talbott S, Jiang BH, Rojanasakul Y. Nitric oxide regulates lung carcinoma cell anoikis through inhibition of ubiquitin-proteasomal degradation of caveolin-1. *J Biol Chem*. 2009; 284(41):28476-84.
 34. Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol*. 2013; 20(6):387-97.
 35. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*. 1996; 271(25):15160-5.
 36. Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res*. 2006; 66(3):1320-6.
 37. Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol*. 2007; 92(5):783-97.
 38. Kitamura T, Kitamura YI, Funahashi Y, Shawber CJ, Castrillon DH, Kollipara R, DePinho RA, Kitajewski J, Accili D. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest*. 2007; 117(9):2477-85.
 39. Faggi F, Mitola S, Sorci G, Riuzzi F, Donato R, Codenotti S, Poliani PL, Cominelli L, Vescovi R, Rossi S, Calza S, Colombi N, Penna F, Costelli P, Perini I, Sampaolesi M, Monti E, Fanzani A. Phosphocaveolin-1 enforces tumor growth and chemoresistance in rhabdomyosarcoma. *PLoS One* 2014; 9(1): e84618.
 40. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18:1427–1431.
 41. Mallona I, Diez-Villanueva A, Peinado MA. Methylation plotter: a web tool for dynamic visualization of DNA methylation data. *Source Code for Biology and Medicine* 2014; in press.
 42. Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan X, Garcia Del Muro X, Fabra A, Tirado OM. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res*. 2010; 8(11):1489-500.
 43. Sáinz-Jaspeado M, Huertas-Martinez J, Lagares-Tena L, Martin Liberal J, Mateo-Lozano S, de Alava E, de Torres C, Mora J, Del Muro XG, Tirado OM. EphA2-induced angiogenesis in ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent on caveolin-1. *PLoS One* 2013; 8(8):e71449.
 44. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.