



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterització funcional de LOXL2 en el rabdiosarcoma alveolar

Olga Almacellas Rabaiget



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Programa de Doctorat en Biomedicina

Caracterització funcional de LOXL2 en el rabdomiosarcoma alveolar

Memòria presentada per Olga Almacellas Rabaiget per optar al títol 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 Dra. Roser López Alemany, i la tutoria del Dr. Albert Tauler Girona.

Olga Almacellas Rabaiget

Dr. Òscar Martínez Tirado

Dra. Roser López Alemany

Dr. Albert Tauler Girona

Barcelona, 2018



Aquesta tesi ha estat possible gràcies al finançament dels projectes de l'AECC (Asociación Española Contra el Cáncer), de la fundació Alba Pérez i del projecte EuroNanoMed2 gestionat a través de l'ISCIII (Instituto de Salud Carlos III).



TAULA DE CONTINGUT

LLISTAT D'ABREVIATURES	13
-------------------------------	-----------

INTRODUCCIÓ	15
--------------------	-----------

1. Sarcomes	17
2. Rabdomiosarcoma	18
2.1. Aspectes històrics	18
2.2. Epidemiologia i pronòstic	18
2.3. Manifestació clínica	19
2.4. Factors de risc	20
2.5. Diagnòstic	21
2.6. Classificació histològica	23
2.6.1. ERMS	23
2.6.2. ARMS	24
2.6.3. Pleomòrfic	24
2.6.4. Esclerosant / de cèl·lules fusiformes	24
2.7. Classificació molecular i característiques genètiques	26
2.7.1. RMS amb proteïna de fusió: translocacions cromosòmiques <i>PAX3/7-FOXO1</i>	26
2.7.1.1. Dianes de la proteïna de fusió	28
2.7.1.2. Esdeveniments oncogènics que col·laboren amb la proteïna de fusió	29
2.7.2. RMS sense proteïna de fusió	30
2.8. Cèl·lula d'origen	32
2.9. Alteracions en els mecanismes de diferenciació terminal	35
2.10. Tractament	36
2.11. Noves aproximacions terapèutiques	39
3. Metàstasi	42
4. Família de proteïnes lisil oxidasa	45
4.1. Estructura	45
4.2. Família de proteïnes LOX en condicions fisiològiques: funció lisil oxidasa	47
4.3. Malalties associades a la família de proteïnes LOX	48
4.3.1. La família de proteïnes LOX en patologies no tumorals	48

4.3.2.	La família de proteïnes LOX en càncer	49
5.	LOXL2	50
5.1.	Estructura de LOXL2	50
5.1.1.	Domini SRCR i N-glicosilacions	50
5.1.2.	Domini catalític	52
5.2.	Tall proteolític	53
5.3.	LOXL2 en càncer	55
5.3.1.	LOXL2 com a supressor tumoral	55
5.3.2.	LOXL2 com a promotor tumoral: mecanismes d'acció	56
5.3.2.1.	LOXL2 promou la TEM	58
5.3.2.2.	LOXL2 activa la via FAK/SCR	59
5.3.2.3.	HIF-1 α i angiogènesi	60
5.3.2.4.	LOXL2 en la diferenciació tumoral	60
5.3.2.5.	LOXL2 i MEC en processos tumorals	61
5.4.	Regulació de l'expressió de <i>LOXL2</i>	62
5.5.	Estratègies terapèutiques per tal d'inhibir LOXL2	64

HIPÒTESI I OBJECTIUS **67**

1.	Hipòtesi	69
2.	Objectius	69

MATERIALS I MÈTODES **71**

1.	Cultius cel·lulars	73
1.1.	Condicions de cultiu	74
1.2.	Descongelació i criopreservació de línies cel·lulars	75
1.3.	Recompte cel·lular	75
1.4.	Obtenció de pèl·lets cel·lulars	76
1.5.	Obtenció i concentració de medis condicionats	76
2.	Tractaments cel·lulars	76
2.1.	Tunicamicina	76
2.2.	LOXL2 recombinant humà	76
2.3.	Z-VAD-FMK	76
2.4.	Calpeptina	77
3.	Amplificació de plasmidis	77
3.1.	Transformació bacteriana	77
3.2.	Cultiu de bacteris	77

3.3.	Digestió amb enzims de restricció	78
3.4.	Electroforesi d'àcids nucleics	78
4.	Mutagènesi dirigida	78
5.	Transfeccions estables i selecció de clons	80
6.	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	81
7.	Transfeccions transitòries	82
8.	Anàlisi de l'expressió gènica (RT-qPCR)	83
8.1.	Extracció d'ARNm i ARNs no codificants	83
8.2.	Obtenció d'ADN complementari per retrotranscripció	83
8.3.	PCR quantitativa a temps real	83
9.	Anàlisi de l'expressió proteica per <i>western blot</i>	84
9.1.	Extracció de proteïna	84
9.2.	Quantificació de proteïna	84
9.3.	<i>Western blot</i>	84
10.	Subfraccionament cel·lular	86
11.	Anàlisi histològic	87
12.	Immunohistoquímica	88
13.	Immunofluorescència	89
13.1.	Teixits	89
13.2.	Línies cel·lulars	89
14.	Anticossos testats en la detecció de LOXL2	90
15.	Anàlisi d'interacció proteica per immunoprecipitació	93
15.1.	Extracció de proteïna	93
15.2.	Immunoprecipitació	93
16.	Anàlisi d'interacció proteica per <i>pull down</i>	93
16.1.	Extracció de proteïna	94
16.2.	<i>Pull down</i>	94
17.	Espectrometria de masses	95
18.	Test d'activitat enzimàtica de LOXL2	95
19.	Assaig clonogènic	96
20.	Assaig de proliferació cel·lular	96
21.	Assaig de migració cel·lular	97
22.	Assaig d'invasió cel·lular	97
23.	Assaig <i>in vivo</i> amb ratolins atímics	98
23.1.	Manteniment dels animals	98
23.2.	Assaig de metàstasi espontània ortotòpic	98
24.	Anàlisi estadística	99

25. Creació de figures	99
26. Equipament, material fungible i reactius	99
26.1. Equipament	99
26.2. Material fungible	100
26.3. Reactius	101

RESULTATS **105**

1. Àmplia expressió de LOXL2 en línies cel·lulars de RMS	107
2. Correlació entre l'expressió de LOXL2 i la supervivència en pacients de RMS	108
3. LOXL2 localitza al citoplasma i nucli en línies cel·lulars de RMS i es secreta al medi extracel·lular on es processa proteolíticament	109
4. LOXL2 es troba N-glicosilat, modificació essencial per a la seva secreció	111
5. Expressió dels membres de la família LOX en línies cel·lulars de RMS	113
6. El silenciament transitori de LOXL2 redueix la proliferació i migració cel·lular en línies d'ARMS	115
7. El silenciament estable de LOXL2 redueix el fenotip neoplàstic en línies d'ARMS	119
8. Efectes del guany d'expressió de LOXL2 en la línia cel·lular d'ARMS RH28: paper de l'activitat catalítica lisil oxidasa	124
9. La reintroducció de LOXL2 en la línia RH28 incrementa la incidència i el nombre de metàstasis espontànies <i>in vivo</i>	136
10. El silenciament o la reintroducció de LOXL2 en les línies d'ARMS no altera l'expressió dels altres membres de la família LOX	141
11. LOXL2 secretat no és internalitzat	142
12. Un mutant no secretable de LOXL2 incrementa la capacitat migratòria i invasiva de cèl·lules RH28 però no la proliferativa i clonogènica	143
13. El silenciament transitori de LOXL2 en el model de reintroducció RH28 LOXL2/FLAG reverteix els efectes observats	150
14. Identificació de proteïnes que poden interaccionar potencialment amb LOXL2: vimentina com a nou <i>partner</i>	154
15. Vimentina es troba sobreexpressada en línies cel·lulars de RMS i el seu silenciament transitori redueix la migració i invasió cel·lular en la línia RH4	160
16. La reintroducció de LOXL2 en la línia cel·lular RH28 incrementa la proteòlisi de vimentina, la qual és parcialment dependent de calpaïna-2	166
17. Expressió de LOXL2 en línies de SE	171
18. LOXL2 inhibeix el fenotip neoplàstic en cèl·lules de SE, independentment de la seva activitat catalítica	172

<u>DISCUSSIÓ</u>	<u>177</u>
1. Expressió i localització de LOXL2 en RMS	179
2. LOXL2 està implicat en la capacitat proliferativa, clonogènica, migratòria i invasiva de les cèl·lules de RMS i incrementa la formació de metàstasis <i>in vivo</i> , independentment de la seva capacitat catalítica	184
3. Funció de LOXL2 en un altre sarcoma pediàtric	188
4. Família de proteïnes LOX en RMS	190
5. Paper de la N-glicosilació de LOXL2	191
6. LOXL2 interacciona amb vimentina i calpaïna-2, participant en la regulació dels filaments de vimentina	195
7. Resum general	203
<u>CONCLUSIONS</u>	<u>205</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>209</u>
<u>ANNEX I</u>	<u>239</u>
<u>ANNEX II</u>	<u>243</u>
<u>ANNEX III</u>	<u>249</u>

LLISTAT D'ABREVIATURES

ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNc	ADN complementari
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
ARNmi	micro ARN
ARNsh	<i>ARN short-hairpin</i>
ARNsi	<i>ARN small interference</i>
ARMS	rabdomiosarcoma alveolar
CM	medi condicionat
ERMS	rabdomiosarcoma embrionari
FBS	sèrum boví fetal
H&E	hematoxilina i eosina
LOX	<i>lysyl oxidase</i>
LOXL2	<i>lysyl oxidase-like 2</i>
LTQ	<i>lysine tyrosylquinone</i>
MEC	matriu extracel·lular
MS	espectrometria de masses
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
RMS	rabdomiosarcoma
RT-qPCR	retrotranscripció i PCR quantitativa
SRCR	<i>scavenger receptor cystein-rich domain</i>
SE	sarcoma d'Ewing
TMA	<i>tissue microarray</i>

INTRODUCCIÓ

1. SARCOMES

Els sarcomes són un grup heterogeni poc freqüent de tumors malignes d'origen mesenquimal que es divideixen en sarcomes de parts toves i sarcomes ossis^{1,2}. El leiomioma i el liposarcoma són els tumors més freqüents dels sarcomes de parts toves³. Altrament, l'osteosarcoma i el sarcoma d'Ewing (SE) són els que tenen una major incidència dins els sarcomes ossis⁴.

A nivell epidemiològic, representen un 1 % dels càncers ens adults i un 15 % en nens⁵. Concretament, poden afectar pacients de totes les edats, encara que alguns subtipus específics són més freqüents en nens i adolescents, com ara el SE, el rhabdomyosarcoma (RMS) i l'osteosarcoma. D'altra banda, altres subtipus com el leiomioma o el liposarcoma són més comuns en pacients de major edat⁶.

Histològicament els sarcomes comprenen més de 100 entitats diferents, fet que complica la seva classificació⁶. Des del punt de vista molecular es poden dividir en dos categories principals: a) tumors amb un cariotip senzill, que a la vegada es subclassifiquen en tumors amb translocacions recíproques específiques (com la translocació *PAX3/7-FOXO1* en RMS) i en tumors amb mutacions oncogèniques específiques (com per exemple mutacions en el gen *KIT* [*KIT Proto-oncogene Receptor Tyrosine Kinase*] en sarcoma gastrointestinal de l'estroma) i b) sarcomes amb un cariotip complex sense un patró específic i amb una alta inestabilitat genòmica^{2,6,7}.

Alguns sarcomes presenten una alta taxa de metàstasi i una alta resistència al tractament, sent tumors agressius⁸. En els darrers anys, s'han introduït diversos canvis que han aconseguit millorar el pronòstic de la malaltia, com són modificacions en les modalitats de diagnòstic i en els tractaments (tècniques quirúrgiques i teràpies adjuvants)^{8,9}. Malgrat això, les teràpies actuals per als pacients amb metàstasi continuen sent insuficients, posant de manifest la necessitat de desenvolupar estudis moleculars més acurats que permetin millorar les teràpies disponibles^{10,11}.

Dins dels sarcomes, els sarcomes pediàtrics són un grup complex de tumors que afecten nens i adolescents. Aquests, a la vegada, també es divideixen en sarcomes de parts toves i sarcomes ossis, i els tres més freqüents són el RMS, l'osteosarcoma i el SE¹². De fet, els dos principals sarcomes pediàtrics d'interès del nostre Grup de Recerca són el RMS i el SE i, concretament, aquesta tesi es centra principalment en el RMS.

2. RABDOMIOSARCOMA

El RMS és el sarcoma de parts toves més comú en nens i adolescents que representa un 3-4 % dels càncers infantils. En canvi, és molt menys freqüent en adults¹³. Pel que fa a l'origen d'aquest tumor, s'ha proposat que resulta d'una diferenciació aberrant de les cèl·lules mare mesenquimals dirigides a la miogènesi¹⁴.

2.1. ASPECTES HISTÒRICS

El RMS va ser inicialment descrit al 1854 pel Dr. C. O. Weber en una lesió a la llengua d'un jove de 21 anys, però no va ser fins al 1946 que el Dr. A. P. Stout va publicar la primera classificació formal del RMS¹⁵. El definia com un tumor de múscul estriat, però també d'altres teixits tous, amb unes característiques i ratis de proliferació molt variables que podia afectar tots dos sexes i totes les edats, des de recents nascuts a edats avançades¹⁵.

Posteriorment, al 1958, es va fer una classificació histològica del RMS diferenciant entre quatre subtipus: embrionari (ERMS), alveolar (ARMS), pleomòrfic i botrioid¹⁶. Durant els anys posteriors es va acumular evidència d'una translocació cromosòmica en un subtipus de RMS. L'anàlisi cromosòmic de diferents tumors va confirmar la translocació t(2;13)(q37;q14) o t(1;13)(p36;q14) en pacients d'ARMS però no d'ERMS^{17,18}. Finalment, a mitjans dels anys 90 es va descriure que la translocació cromosòmica que esdevenia entre el gen que codifica per al factor de transcripció Forkhead (*FKHR/FOXO1: Forkhead Box Protein O1*) i els gens que codifiquen per als factors de transcripció PAX3 o PAX7 (*Paired Gene Box 3 o 7*) donava lloc a les proteïnes de fusió PAX3-FKHR (PAX3-FOXO1)¹⁹ i PAX7-FKHR (PAX7-FOXO1)²⁰. Aquesta troballa va ser clau per al diagnòstic dels pacients amb translocació cromosòmica, els quals presenten un pitjor pronòstic que els pacients sense²¹.

2.2. EPIDEMIOLOGIA I PRONÒSTIC

El RMS és el tercer tumor sòlid extracranial més comú en nens després del neuroblastoma i el tumor de Wilms²². Presenta una incidència de 4,5 casos per milió a l'any i hi ha una lleugera predominança en caucàsics i en el sexe masculí (ràtio homes:dones de 1,5:1)^{22,23}. Pel que fa a l'edat d'aparició, el RMS presenta dos pics, un entre els 2 i 6 anys, el qual correspon a l'ERMS, i l'altre pic entre els 10 i 18 anys, el qual correspon a l'ARMS. En relació als subtipus, la variant majoritària en un 60 % dels casos és l'ERMS, en canvi, l'ARMS té una incidència del 20 %. Altres RMS com el botrioid i el pleomòrfic són més comuns en adults²⁴.

La supervivència del RMS ha millorat substancialment al llarg de les últimes dècades. Concretament, al voltant dels anys 80 la supervivència lliure de malaltia (mesurada sempre als 5 anys del diagnòstic) era d'un 55 %. Actualment, la supervivència del RMS en malaltia localitzada i no metastàtica és d'un 70 %²⁴. No obstant, un factor clau per a la taxa de supervivència és la presència de metàstasis, fins al punt que, la supervivència decau al 20-29 % en els casos de RMS metastàtic²⁵. A part de la presència de metàstasi, múltiples factors com la histologia del tumor, l'estadi de la malaltia, l'edat en el diagnòstic i la localització i mida del tumor en determinen el pronòstic. Concretament, pel que fa a l'edat de diagnòstic influeix negativament en la supervivència: en nens de menys de 15 anys la supervivència és d'un 67 %, en adolescents entre 15 i 19 anys al voltant d'un 50 % i d'un 27 % en adults^{26,27}. En relació amb la histologia del tumor, els pacients d'ARMS tenen un pitjor pronòstic que els d'ERMS: una supervivència d'un 40-60 % en l'ARMS enfront a un 80-87 % en l'ERMS^{23,28}. Finalment, les zones amb un pronòstic més favorable són: cap i coll (regió no parameningea), regió genitourinària (excloent bufeta i pròstata) i la via biliar, la resta es classifiquen com a zones amb un pronòstic no favorable²⁹.

2.3. MANIFESTACIÓ CLÍNICA

La manifestació clínica dels pacients amb RMS és diversa: poden presentar una massa asimptomàtica o bé símptomes que estan associats amb la massa tumoral i complicacions relacionades amb el lloc del tumor. En són un exemple la paràlisi del nervi cranial en tumors en la zona parameningea o l'obstrucció de l'intestí en tumors intraabdominals. Altres símptomes que es poden donar són: inflamació que no desapareix i continua augmentant, mal de cap, problemes urinaris i sang en la orina, nas, gola, vagina o recte^{30,31}.

En relació al dolor, no és un símptoma consistent i acostuma a aparèixer per efecte de la massa tumoral i la compressió de les estructures adjacents al tumor. En alguns adolescents, la inflamació en algunes àrees com les extremitats o la regió paratesticular es sol confondre amb un dany musculoesquelètic i, al no estar associat al dolor, l'àrea en qüestió no sol rebre atenció mèdica fins més endavant³⁰.

Pel que fa a la localització, el RMS pot aparèixer en qualsevol lloc del cos (Figura I1), incloent zones on normalment no es troba múscul estriat. En particular, els llocs més freqüents d'aparició del RMS són: regió de cap i coll, que inclou la zona orbital i parameningea (40 %), tracte genitourinari (22 %) i extremitats (18 %). Altres

INTRODUCCIÓ

localitzacions menys freqüents (15 %) inclouen el tors, la regió intratoràcica, la regió anal i perianal, l'abdomen, el retroperitoneu i el tracte biliar^{24,32,33}.

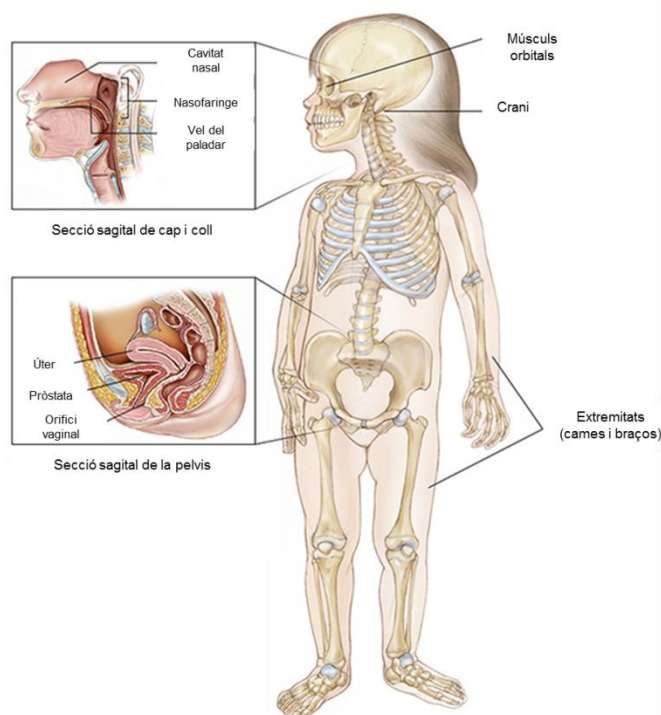


Figura I1: Principals parts del cos afectades per RMS. Imatge modificada de *American Society of Clinical Oncology* (2004)¹³.

2.4. FACTORS DE RISC

La majoria de casos de RMS es deuen a fenòmens esporàdics sense un factor de risc reconegut que hi predisposi. No obstant, hi ha les següents excepcions: a) diferents condicions genètiques associades amb el RMS i b) un elevat pes al néixer o un llarg període gestacional s'associen a una major incidència d'ERMS³⁴.

Amb referència a les condicions genètiques associades al RMS, alguns dels síndromes associats són: neurofibromatosis tipus I, síndrome de Costello, síndrome Beckwith-Wiedemann, síndrome de Noonan, síndrome Rubinstein-Taybi, retinoblastoma hereditari o el síndrome de Li-Fraumeni^{30,35}.

Alguns d'aquests síndromes amb una major predisposició al RMS presenten mutacions que inactiven gens supressors tumorals, incrementant el risc de càncer. A tall d'exemple, trobem la mutació en *TP53* (*Tumor Protein P53*) en el síndrome de Li-Fraumeni³⁶ o mutacions en *RB1* (*Retinoblastoma protein 1*) en el retinoblastoma³⁷. Altrament, diferents mutacions en la via RAS (*Ras proto-oncogene*) també predisposen

al RMS, com ara mutacions en *NF1* (*Neurofibromin 1*) en la neurofibromatosi de tipus I, o pacients amb mutacions en *HRAS* (*HRas proto-oncogene*) en el síndrome de Costello^{35,38}.

2.5. DIAGNÒSTIC

Un diagnòstic acurat dels diferents subtipus de RMS és essencial per tal de seleccionar el millor tractament disponible i obtenir una resposta òptima. Dos aspectes destacats en l'avaluació del RMS són determinar l'extensió de la malaltia primària i la presència o absència de metàstasi^{30,39}.

En primer lloc, prèviament a la biòpsia del tumor, es duen a terme diferents estudis d'imatge i proves comuns de laboratori com ara comptatge cel·lular en sang, proves de funcionalitat renal i hepàtica i anàlisi urinària²². Paral·lelament, de forma general es realitza una avaluació radiològica. Tot seguit, les tècniques d'imatge emprades solen dependre de la localització del tumor. La tomografia computeritzada (TC) es realitza a la part superior o inferior, en funció del tumor, i la imatge per ressonància magnètica (IRM; Figura I2) es sol aplicar a la regió cranial³⁰.

Paral·lelament, és necessària una avaluació dels nodes limfàtic regionals. En aquest cas es sol realitzar una TC o IRM dels nodes limfàtics. Si l'aparença no és normal, sempre i quan sigui possible, es realitza una biòpsia dels nòduls, ja que si és positiva es modifica el pla de tractament⁴⁰. Una altra tècnica que s'utilitza per tal d'identificar àrees de metàstasi que no es detecten amb les altres tècniques d'imatge és la tomografia per emissió de positrons amb 18-fluorodeoxiglucosa (PET-TC; Figura I2)⁴¹. En alguns casos concrets, també es realitzen puncions a la medul·la òssia o un escaneig ossi mitjançant gammagrafia òssia⁴².

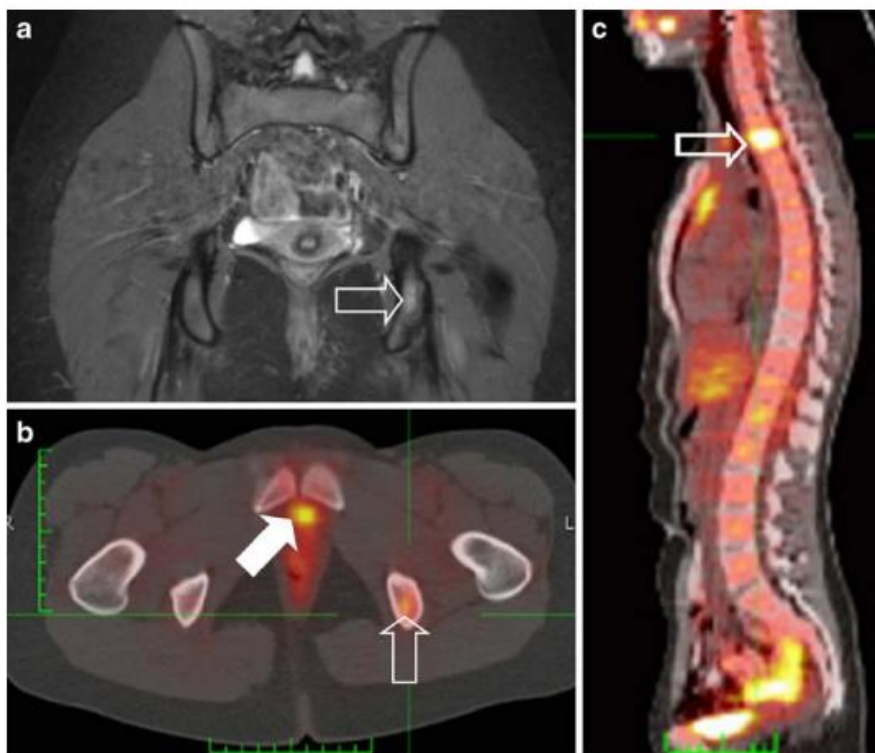


Figura 12: Pacient diagnosticada inicialment amb ARMS en l'anus. Dos anys després, es detecta la presència de múltiples metàstasis. **A)** Imatge IRM de la pelvis (visió frontal) on s'observa una major intensitat en l'isqui esquerra (fletxa buida). **B)** Imatge PET-TC que confirma la malaltia recurrent en la mateixa localització (fletxa buida). La fletxa sòlida indica l'excreció del marcador en la bufeta urinària. **C)** Imatge PET-TC que mostra una altra lesió en la columna vertebral (fletxa buida). Imatges obtingudes de Van Rijn R. *et al.* (2008)⁴³.

Finalment, el diagnòstic definitiu va acompanyat de la biòpsia del tumor, que consisteix en un anàlisi histopatològic, immunohistoquímic i molecular.

Des d'un punt de vista histològic, el RMS s'engloba dins el grup de sarcomes de cèl·lules blaves i rodones. Principalment consisteix en dues variants histològiques: l'ERMS i l'ARMS. A més, hi ha altres variants minoritàries com el botrioid (actualment es considera un subgrup de l'ERMS) i el RMS pleomòrfic^{24,30}. Aquesta distinció histològica no solament s'ha utilitzat àmpliament per al diagnòstic, sinó també per a la divisió en grups de risc, l'assignació d'una teràpia i la monitorització de malaltia residual durant el tractament^{25,44,45}. Mitjançant tinció hematoxilina i eosina (H&E) diferents trets caracteritzen cada subtipus histològic (veure Introducció, secció 2.6 Classificació histològica). Per a la seva classificació també es realitza immunohistoquímica (IHC) d'un panell de marcadors miogènics específics de múscul

esquelètic. En concret, MyoD1 (*Myogenic Differentiation 1*) i miogenina són els més utilitzats ja que mostren un marcatge nuclear positiu en gairebé tots els casos de RMS i són gairebé exclusius d'aquests tumors⁴⁶. No obstant, hi ha casos on les característiques morfològiques poden donar lloc a error i, en aquest cas, els pacients de RMS poden ser distingits en funció de les seves característiques moleculars^{46,47}.

A nivell molecular (veure Introducció, secció 2.7 Classificació molecular i característiques genètiques) el RMS és classifica en RMS amb proteïna de fusió (fusió positiu) i RMS sense proteïna de fusió (fusió negatiu). El perfil d'expressió gènica difereix considerablement entre aquests dos tipus de pacients^{48,49}. A la vegada, els pacients amb diferents proteïnes de fusió, PAX3-FOXO1 o PAX7-FOXO1, també presenten perfils diferents^{50,51}. Tenint en compte que la presència de la proteïna de fusió és un dels principals factors pronòstic del RMS^{23,28}, és necessari estudiar-ne el seu estat. Així doncs, la translocació es detecta amb bona sensibilitat i especificitat realitzant hibridació fluorescent *in situ* (FISH: *fluorescent in situ hybridization*) o RT-qPCR (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)⁵².

2.6. CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA

2.6.1. ERMS

A nivell microscòpic, l'ERMS s'assembla al múscul esquelètic immadur. Es caracteritza per zones de condensació variable amb hipo- i hipercel·lularitat (Figura 13A). Igual que el múscul embriogènic, les zones denses corresponen a àrees miogèniques, en canvi, les zones menys condensades s'assemblen més al teixit mesenquimal primitiu. La condensació cel·lular resulta d'una expressió i interacció de proteïnes de la matriu, molècules d'adhesió i receptors cel·lulars, l'expressió dels quals s'inicia pels reguladors miogènics PAX3 o PAX7⁵³.

L'ERMS principalment esdevé a la regió de cap i coll i a les regions genitourinàries. És el subtipus més freqüent en nens, representant entre el 60 i 70 % de RMS infantils. A més, presenta una distribució bimodal: un pic major entre els 0-5 anys i un pic més petit en l'adolescència²³.

D'altra banda, el subtipus botrioid era inicialment considerat una variant histològica més de RMS. No obstant, la classificació de tumors de teixits tous i ossos de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va modificar aquesta classificació i va englobar-lo dins de l'ERMS⁵⁴. A nivell microscòpic, les lesions del RMS botrioid originen una capa diferenciada que es defineix per una condensació cel·lular per sota

INTRODUCCIÓ

de la capa epitelial (Figura I3B). També poden presentar-se lesions amb zones hipocel·lulars, que semblen inflamació crònica²⁹.

El tumors de tipus botrioid representen un 10 % dels casos de RMS i són tumors que es formen sota la superfície mucosa de diferents cavitats. Les localitzacions característiques del RMS botrioid són: vagina, bufeta urinària, nasofaringe i conductes biliars extrahepàtics, tot i que poden tenir altres localitzacions inusuals^{29,55}.

2.6.2. ARMS

A nivell microscòpic, l'ARMS presenta cèl·lules redones, petites i densament situades en la regió on estan confinades, fent que s'assembli als alvèols pulmonars (Figura I3C)²⁹. És més, presenten un nucli gran i un citoplasma petit. L'ARMS representa un 20 % dels casos de RMS i principalment té lloc en el tors i les extremitats. Afecta totes les edats, però és més comú en adolescents i adults joves³⁵. Cal remarcar que presenta un pitjor pronòstic que l'ERMS, sent el subtipus de RMS més agressiu²¹.

Després de la classificació inicial histològica es va demostrar que molts d'aquests tumors (un 80 %) contenen la translocació cromosòmica t(1;13) o t(2;13), on el domini d'unió a l'ADN de *PAX3* o *PAX7* s'uneix al domini de transactivació de *FOXO1*, formant la proteïna de fusió *PAX3/7-FOXO1*^{19,29,56,57}. Aquest punt es discuteix més endavant (veure Introducció, secció 2.7.1 RMS amb proteïna de fusió: translocacions cromosòmiques *PAX3/7-FOXO1*).

2.6.3. PLEOMÒRFIC

La variant pleomòrfica consisteix en cèl·lules grans amb citoplasmes eosinofílics, entrellaçades, amb nuclis hiper cromatínics i nombroses mitosis (Figura I3D). Clínicament no afecta a nens, sinó bàsicament a adults: solament un 1 % dels RMS pediàtrics són pleomòrfics^{29,58}.

El RMS pleomòrfic és un subtipus molt agressiu amb un mal pronòstic, igual que altres sarcomes pleomòrfics d'adults⁵⁹. Diversos estudis revelen un cariotip complex, amb rearranjaments i ampliació gènica, que permeten distingir el RMS pleomòrfic d'altres sarcomes adults pleomòrfics^{60,61}.

2.6.4. ESCLEROSANT / DE CÈL·LULES FUSIFORMES

La quarta edició (2013) de la classificació de tumors de teixits tous i ossis de la OMS va afegir la variant esclerosant, prèviament englobada en l'ERMS, dins del subtipus de

cèl·lules fusiformes. Així doncs, les dues variants actualment comparteixen la designació de RMS esclerosant / de cèl·lules fusiformes⁵⁴.

Aquest subtipus es caracteritza per un alt grau de hialurinització i de deposició de la matriu, amb una morfologia en forma de fus (Figura I3E)²⁹. A més, presenta un bon pronòstic i les seves principals localitzacions són les extremitats, la regió de cap i coll i la regió paratesticular⁶².

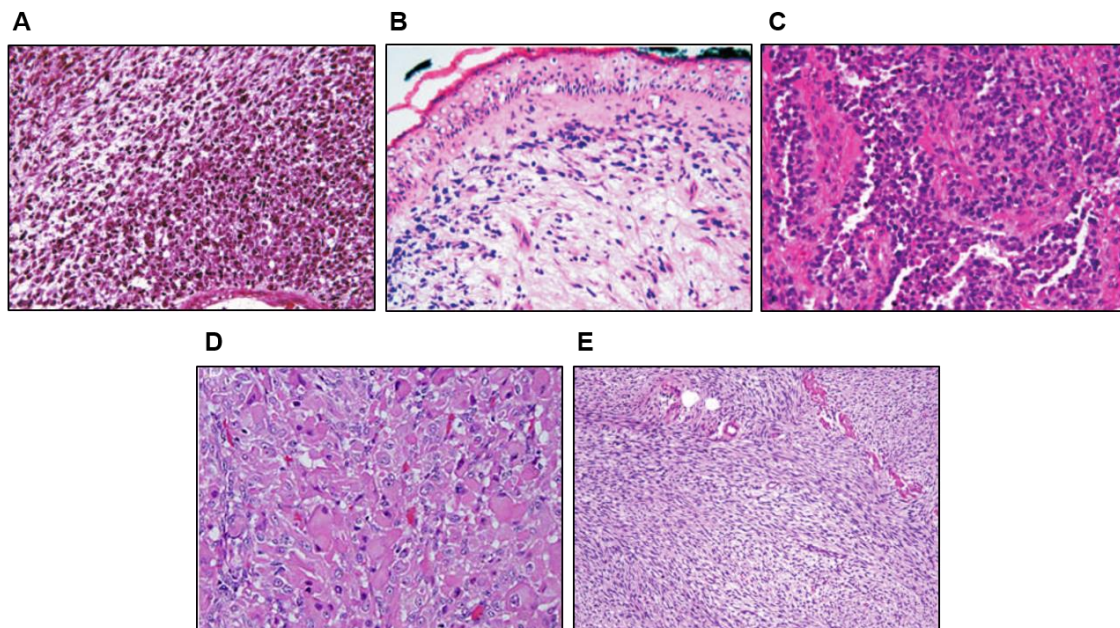


Figura I3: Tinció hematoxilina i eosina (H&E) dels diferents subtipus histològics de RMS: **A)** ERMS, **B)** Botrioid, **C)** ARMS, **D)** Pleomòrfic i **E)** Esclerosant/fusiforme. Imatges modificades de Parham D. *et al.* (2006)²⁹ i Parham D. *et al.* (2013)⁶³.

Durant anys la classificació histològica del RMS s'ha utilitzat àmpliament per predir el pronòstic i assignar els pacients en grups de risc^{24,44}. No obstant, més endavant es va demostrar que la baixa supervivència dels pacients amb ARMS es devia principalment a la presència de la proteïna de fusió PAX3/7-FOXO1 i no a les seves característiques histològiques²¹. Un exemple és un estudi realitzat amb pacients d'ERMS i ARMS on els pacients sense proteïna de fusió dels dos subgrups eren indistingibles a nivell de resposta clínica, tot i les clares diferències morfològiques⁴⁷. Per tant, actualment és més acurat utilitzar una classificació molecular, la qual es detalla a continuació.

2.7. CLASSIFICACIÓ MOLECULAR I CARACTERÍSTIQUES GENÈTIQUES

2.7.1. RMS AMB PROTEÏNA DE FUSIÓ: TRANSLOCACIONS CROMOSÒMIQUES *PAX3/7-FOXO1*

Un 70-80 % dels tumors ARMS es caracteritzen per una translocació cromosòmica específica. Concretament, en un 60-70 % dels casos d'ARMS aquesta translocació és la t(2;13)(q35;q14). Altrament, en un 10 % dels casos es troba la translocació t(1;13)(p36;q14). Aquestes translocacions cromosòmiques donen lloc a les proteïnes de fusió o factors de transcripció quimèrics *PAX3-FOXO1* o *PAX7-FOXO1* respectivament, també anomenades *PAX3-FKHR* o *PAX7-FKHR*. Aquestes proteïnes presenten una alteració en la seva expressió, localització i funció en comparació a les proteïnes natives (*wild type: wt*)^{51,64}.

PAX3 i *PAX7* formen part de la família de factors de transcripció *PAX*⁶⁵. Ambdós estan involucrats en el desenvolupament i diferenciació del sistema nerviós i del múscul esquelètic^{66,67}. Altrament, *FOXO1* forma part de la família de factors de transcripció *FOX* o *Forkhead*, els quals són importants reguladors metabòlics, de la proliferació cel·lular i de l'apoptosi⁶⁸.

A nivell estructural, *PAX3* i *PAX7* contenen a la part N-terminal un domini d'unió a l'ADN (DBD: *DNA Binding Domain*), format per un domini *paired* (PB: *Paired Box domain*) i un *homeodomini* (HD: *Homeodomain*), i a la part C-terminal el domini de transactivació o d'activació transcripcional (TAD: *Transactivation Domain*). D'altra banda, *FOXO1* està format a la part N-terminal pel DBD, que conté el domini *Forkhead* (FD: *Forkhead Domain*), i el TAD a la part C-terminal⁵¹ (Figura I4).

El punt de tall té lloc en el setè intró dels gens *PAX3* i *PAX7*, interrompent el TAD i mantenen intacte el PB i el HD. En el gen *FOXO1*, el tall té lloc al primer intró, produint una interrupció en el FD però deixant intacte el TAD⁶⁹. Com a resultat d'aquesta fusió, les proteïnes consisteixen en el DBD de *PAX3/7* i el TAD de *FOXO1* (Figura I4).

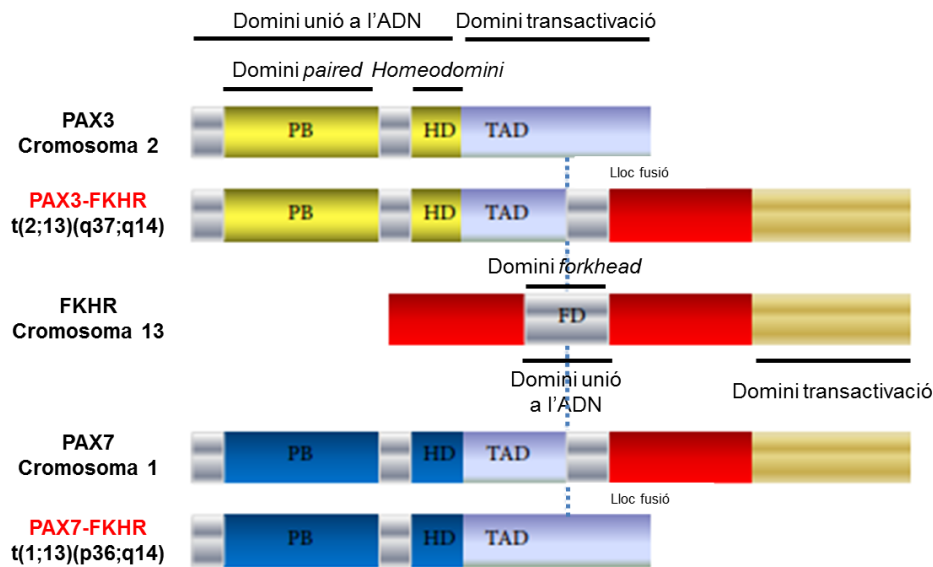


Figura I4: Esquema on es mostren els diferents dominis de PAX3, PAX7 i FKHR, indicant el domini d'unió a l'ADN i el domini de transactivació (TAD) en cada un d'ells. En PAX3/PAX7 s'indica el domini *paired box* (PB) i el *homeodomini* (HD). En FKHR s'especifica el domini *forkhead* (FD). A més, la línia discontinua senyalitza el lloc de fusió, generant les proteïnes PAX3-FKHR i PAX7-FKHR, esquema de les quals també es representa. Modificat de Sun X. *et al.* (2015)¹⁴.

Aquestes proteïnes de fusió activen la transcripció des del DBD de PAX3/7 però són més potents com a activadors transcripcionals que PAX3 o PAX7 *wt* (de 10 a 100 cops més). Això és degut a que el domini de FKHR és insensible als efectes inhibitoris de l'extrem N-terminal de PAX3 o PAX7⁷⁰. A més, els nivells d'expressió de les proteïnes de fusió són molt més elevats que les proteïnes *wt*. Això té lloc principalment per dos mecanismes: en PAX3-FOXO1 és mitjançant un increment en la transcripció gènica independent del nombre de còpies i en PAX7-FOXO1 s'associa a una amplificació gènica⁷¹. És més, les proteïnes de fusió són resistents als mecanismes que regulen la seva localització subcel·lular, localitzant solament a nucli. Això promou nivells elevats de les proteïnes quimèriques a nucli, on regulen la transcripció de diferents gens amb domini d'unió a PAX3 i PAX7, promovent finalment el procés tumorigènic⁷².

L'expressió de la proteïna de fusió PAX3-FOXO1 s'associa a un pronòstic no favorable, principalment en els pacients amb metàstasi, on la supervivència als 4 anys és d'un 8 %, en comparació als pacients amb PAX7-FOXO1, on és d'un 75 %^{64,73}. Un dels motius de la baixa supervivència en els pacients amb PAX3-FOXO1 és que són molt propensos a fer metàstasi a la medul·la òssia⁶⁴.

INTRODUCCIÓ

A banda d'aquestes dues proteïnes de fusió, s'han descrit un parell de casos de fusions esporàdiques de *PAX3* amb gens diferents a *FOXO1*, es tracta de *NCOA1* i *NCOA2* (*Nuclear Receptor Coactivator 1 i 2*)^{48,74}. Ambdós s'han donat en tumors classificats histològicament com a ERMS^{75,76}.

2.7.1.1. DIANES DE LA PROTEÏNA DE FUSIÓ

Un dels grans objectius de la recerca en el RMS ha estat identificar quines són les dianes transcripcionals de *PAX3/7-FOXO1* que són importants en el desenvolupament tumoral⁶⁵.

L'especificitat d'unió de la proteïna quimèrica la determina el DBD de *PAX3* o *PAX7*. No obstant, aquesta unió es veu a la vegada modificada pel domini C-terminal de *FOXO1*⁷⁷. Curiosament, s'ha descrit *splicing* alternatiu en la regió que codifica per al PB, el qual resulta en diferents isoformes que es coexpressen: dues isoformes *PAX3-FOXO1* i quatre isoformes *PAX7-FOXO1*, les quals només difereixen en algun residu⁷⁸. Aquest petits canvis estructurals també poden modificar l'afinitat d'unió i l'activitat transcripcional, tot i que certament no es coneixen quins són els canvis que promouen en els seus gens diana⁷⁸.

S'han utilitzat diferents aproximacions per tal de determinar les possibles dianes transcripcionals de *PAX3/7-FOXO1* en comparació a *PAX3/7 wt* o a RMS fusió negatius. Els perfils d'expressió gènica en comparar mostres tumorals positives i negatives per a la fusió confirmen gens diferencialment expressats que es poden classificar en tres categories: factors de transcripció, proteïnes amb activitat quinasa i gens del desenvolupament⁷⁹. Per exemple, el factor de transcripció *MYCN* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog*) s'ha vist sobreexpressat en l'ARMS⁸⁰ o alguns factors importants per a la miogènesi es troben silenciats⁴⁹.

Altres mètodes per determinar possibles dianes de *PAX3-7/FOXO1* consisteixen en l'ús de llibreries d'ADN per fer un *screening* de regions que s'uneixen i posteriorment amplificar-les i seqüenciar-les, o també *microarrays* per tal de determinar els efectes *downstream* de les proteïnes de fusió. Altrament, en estudis *in vitro* on s'ha expressat la proteïna de fusió de forma ectòpica s'ha vist que les dianes regulades són altament dependents del model cel·lular⁵¹. Per exemple, en transfectar *PAX3-FOXO1* en línies d'ERMS s'ha observat un increment en *PAX3 wt*, un increment en *CXCR4* (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 4*), una disminució en *PAX7 wt*⁸¹, així com també una alteració en la regulació de la via JAK/STAT (*Janus Kinase / Signal Transducer and*

Activator Of Transcription)⁸². En altres models com en mioblasts murins, la proteïna de fusió PAX3-FOXO1 inhibeix la diferenciació miogènica⁸³, mentre que en fibroblasts murins promou la transformació oncogènica⁸⁴.

Altres dianes ben establertes de PAX3-FOXO1 són *MET (Mesenchymal Epithelial Transition proto-oncogene)* i, tal com s'ha anomenat prèviament, *CXCR4*. Aquests receptors cel·lulars són importants durant el procés metastàtic ja que els seus lligands són secretats per la medul·la òssia, lloc freqüent on fa metàstasi l'ARMS^{85,86}. Cal també anomenar com a dianes de PAX3-FOXO1 importants per al procés metastàtic a *EZR (ezrin)*⁸⁷, *SIX1 (Sine Oculis Homeobox Homolog 1)*⁸⁸ i *MMP2 (Matrix Metalloproteinase 2)*⁸⁹. Una altra diana, en aquest cas important per a la proliferació cel·lular, és *BCL-X_L (B-cell lymphoma-extra large)*, proteïna anti-apoptòtica que es veu activada per la proteïna de fusió⁹⁰. Per acabar, diversos receptors tirosina quinasa també s'han descrit com a dianes de PAX3/7-FOXO1 i s'han trobat sobreexpressats en RMS, com ara *IGF1R (Insuline-like Growth Factor Receptor 1)*⁹¹ i inclús alguns receptors amb presència de mutacions, com és el cas de *FGFR4 (Fibroblast Growth Factor Receptor 4)*⁹²⁻⁹⁴.

En resum, PAX3/7-FOXO1 és una proteïna amb múltiples funcions: estimula la proliferació, inhibeix l'apoptosi, indueix l'angiogènesi, activa el programa miogènic i simultàniament inhibeix la diferenciació terminal, entre probablement moltes altres funcions encara no conegudes, ja que es tracta d'una proteïna que continua sent activament estudiada⁹⁵.

2.7.1.2. ESDEVENIMENTS ONCOGÈNICS QUE COL·LABOREN AMB LA PROTEÏNA DE FUSIÓ

L'expressió de la proteïna de fusió PAX3/7-FOXO1 es considera el principal esdeveniment en la tumorigènesi del RMS fusió positius: en diversos estudis, la seva transfecció indueix la transformació oncogènica, en canvi, el silenciament de la seva expressió produeix l'efecte contrari^{84,96}. No obstant, en línies cel·lulars murines s'ha vist un paper dual de PAX3/7-FOXO1 en funció dels seus nivells d'expressió i d'activitat⁹⁷: nivells baixos de la proteïna quimèrica estimulen la proliferació cel·lular i la transformació oncogènica, en canvi, nivells elevats (comparables a les cèl·lules tumorals de l'ARMS) produeix un fenotip contrari i un efecte tòxic, inhibint la proliferació i promovent la mort cel·lular^{48,98}. Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules progenitores proveeixen un ambient únic i/o que altres esdeveniments col·laboren amb la proteïna de fusió i són necessaris per a la transformació

INTRODUCCIÓ

oncogènica. De fet, diferents estudis demostren aquesta última hipòtesi, en experiments on PAX3/7-FOXO1 no és suficient per a la transformació oncogènica completa^{24,99-101}.

S'han identificat alteracions genètiques com a possibles col·laboradors amb la proteïna de fusió durant la tumorigènesi del RMS com: pèrdua del segon al·lel de *FKHR*⁵¹; silenciament gènic per mecanismes epigenètics en gens com *CDKN2A*¹⁰² (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*; supressor tumoral que promou aturada en cicle cel·lular) o en *CASP8*¹⁰³ (*caspase-8*; implicada en mort cel·lular); i inactivació del supressor tumoral *TP53*¹⁰⁴, entre altres.

Una altra alteració genètica molt freqüent en aquests tumors és l'amplificació cromosòmica. Les tres amplificacions més comuns que s'han vist en ARMS engloben els cromosomes 2, 12 i 13 i es solen relacionar amb un increment en l'expressió gènica¹⁰⁵. La regió del cromosoma 12, concretament 12q13-15, inclou gens com: el factors de transcripció *CHOP* (*C/EBP Homologous Protein*), la via *SHH* (*Sonic Hedgehog*), *CDK4* (*Cyclin Dependent Kinase 4*) i l'inhibidor de p53 *MDM2* (*Mouse Double Minute 2*)¹⁰⁶. En quant al cromosoma 2, regió 2p24, conté el factor de transcripció *MYCN*, implicat en regular la proliferació i diferenciació cel·lular^{80,107,108}. Finalment, l'última regió freqüentment amplificada en l'ARMS és la 13q31-32¹⁰⁹. Aquesta regió conté principalment dos gens: *GPC5* (*Glypican Proteoglycan 5*) i *C13ORF25*. *GPC5* incrementa la proliferació cel·lular mitjançant *FGF2* (*Fibroblast Growth Factor 2*), *HGF* (*Hepatocyte Growth Factor*) and *WNT1A* (*Wnt Family Member 1A*)^{109,110}. D'altra banda, *C13ORF25* codifica pel clúster de microARNs miR-17-92 (*MIR17HG*), el qual s'ha vist implicat en diversos càncers¹¹¹.

2.7.2. RMS SENSE PROTEÏNA DE FUSIÓ

Una característica important del RMS sense proteïna de fusió és la pèrdua d'heterozigocitat (LOH: *loss of heterozygosity*). Aquest procés produeix, com en molts altres tumors sòlids, la pèrdua d'un al·lel i, en conseqüència, la inactivació d'un supressor tumoral o bé l'activació d'un oncogen^{112,113}. En general, tots els RMS presenten aquesta característica, no obstant, és molt més elevada en ERMS o ARMS sense proteïna de fusió²⁵.

La regió més freqüent amb LOH és al cromosoma 11, tant en el braç llarg com el curt²⁵, i es troba present en un 77 % de RMS negatius per a la proteïna de fusió i un 24 % de RMS positius per a la proteïna de fusió²⁵. És més, el LOH en la regió 11p15.5 es considera un aspecte distintiu de l'ERMS. El LOH en aquesta regió afecta els gens

IGF2 (*Insulin Like Growth Factor 2*), *H19* (*H19 transcript, non-protein coding*) i *CDKN1C* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C*). El LOH resulta en la pèrdua de l'al·lel maternal *IGF2*, el qual es veu silenciats, i la duplicació de l'al·lel paternal, produint la sobreexpressió de *IGF2*¹¹³. Un altre mecanisme que promou la sobreexpressió de *IGF2* és la pèrdua d'*imprinting* (LOI: *loss of imprinting*)^{91,114,115}. L'*imprinting* és un fenomen epigenètic que produeix que els gens expressin l'al·lel maternal o el paternal. En condicions normals com és el múscul sa, l'*imprinting* produeix l'expressió de l'al·lel patern de *IGF2* i els al·lells materns de *H19* i *CDKN1C*^{91,116}. En el RMS, el LOI en *IGF2* resulta en l'expressió d'ambdós al·lells^{91,114,115}. No obstant, aquest fenomen sol estar més associat amb l'ARMS. Pel que fa a *H19* i *CDKN1C*, són supressors tumorals que es veuen silenciats mitjançant la pèrdua d'expressió de l'al·lel matern, fent que només s'expressi el patern, el qual no és actiu³⁵.

S'han trobat altres regions amb LOH en els RMS negatius per a la proteïna de fusió, com és la regió cromosòmica 8q o la 9q22. La regió 9q22 està afectada en el 30 % dels ERMS i inclou el gen supressor tumoral *PTCH1* (*Patched 1*)²⁵. Aquest gen regula negativament la via de senyalització SHH la qual, en conseqüència, està activada¹¹⁷.

A part de la pèrdua d'heterozigocitat, que és l'alteració genètica més freqüent, també tenen lloc altres mutacions en els RMS sense proteïna de fusió¹¹⁸ (Taula I1).

Taula I1: Mutacions observades en RMS negatius per a la proteïna de fusió. S'indica el locus, el gen afectat i el tipus de mutació: puntual, deleció, desequilibri al·lèlic o LOH. Modificat de Kikuchi *et al.* (2011)¹¹⁸.

Locus	Gen	Mutació
17p13.1	<i>TP53</i>	Puntual
13q14.2	<i>RB1</i>	Desequilibri al·lèlic
12q14.3-q15	<i>MDM2</i>	Amplificació
12p12.1	<i>KRAS</i>	Puntual
12q24	<i>PTPN11</i>	Puntual
11p15.5	<i>HRAS</i>	Puntual
	<i>H19/IGF2/CDKN1C</i>	LOH
9p21	<i>CDKN2A/ARF</i>	Deleció
9q22.3	<i>PTCH</i>	Deleció
5q35.1-qter	<i>FGFR4</i>	Puntual
1p13.2	<i>NRAS</i>	Puntual

INTRODUCCIÓ

Després del LOH en el cromosoma 11, l'alteració genètica més freqüent en els RMS sense proteïna de fusió és en el supressor tumoral *TP53*⁹¹. La via de senyalització pot ser afectada per una mutació pròpia en *TP53* o bé per altres alteracions, com per exemple un increment en l'expressió de *MDM2*^{119,120} o la pèrdua de mediadors *upstream* com *CDKN2A*¹⁰². De fet, un altre supressor tumoral alterat freqüentment en els RMS sense proteïna de fusió és *RB1*¹²¹. A més, diferents mutacions activadores de la via RAS han estat descrites, com ara en *HRAS*, *NRAS* i *KRAS*^{122,123}.

Altres vies moleculars alterades en el RMS sense fusió són: la via d'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), receptor que s'expressa àmpliament en tumors d'ERMS¹²⁴, el receptor PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*), també sobreexpressat en ERMS¹²⁵, o mutacions en el factor de transcripció repressor BCOR (*BCL6 Corepressor*)¹²⁶, el qual s'associa a desacetilases d'histones, entre altres.

2.8. CÈL·LULA D'ORIGEN

La cèl·lula d'origen del RMS és un tema de gran discussió i controvèrsia. Tots els subtipus de RMS expressen marcadors del llinatge miogènic adult o embrionari, com per exemple MyoD1, miogenina i PAX3/7, fet que planteja el seu possible origen muscular⁹¹. Tot i això, moltes vegades l'evidència de diferenciació miogènica es troba limitada a un percentatge de cèl·lules molt baix i les cèl·lules tumorals rarament mostren diferenciació muscular. Així doncs, sembla molt probable una diferenciació aberrant del múscul esquelètic com a origen del RMS, motiu pel qual és clau entendre el procés de diferenciació miogènica^{50,127}.

En l'embrió, les cèl·lules del mesoderm generen les cèl·lules miogèniques, la majoria de les quals es diferenciarien per produir les fibres del múscul esquelètic sota el control de factors de transcripció miogènics com ara PAX3 o PAX7^{99,125}. Concretament, l'expressió del factor de transcripció PAX3 és necessària durant el desenvolupament embrionari per a l'especificació miogènica abans de l'expressió dels factors reguladors miogènics (MRFs: *Myogenic Regulatory Factors*)^{50,101,128}. Altrament, en el múscul adult hi ha una població anomenada "cèl·lules satèl·lit", la qual actua com a precursor miogènica¹²⁹. Aquesta població presenta cèl·lules mare de múscul esquelètic i és responsable del manteniment i creixement muscular després del naixement, així com de la reparació muscular després d'un dany. Quan aquestes cèl·lules s'activen, proliferen i es diferencien de forma terminal^{50,101,128}.

La diferenciació miogènica és un procés altament regulat de forma seqüencial per l'expressió de PAX3/7 i els MRFs. L'expressió de PAX3 o PAX7 en l'embrió o en

l'adult, respectivament, va disminuint a mesura que avança la miogènesi, promovent la proliferació i migració dels precursors i permetent que tingui lloc la diferenciació. Quan els nivells de PAX3/7 disminueixen, incrementa l'expressió dels MRFs (miogenina, MyoD1 i Myf5 [*Myogenic Factor 5*], entre altres), factors que promouen la conversió a mioblasts i la seva fusió en fibres del múscul esquelètic (Figura 15)^{50,101,128}.

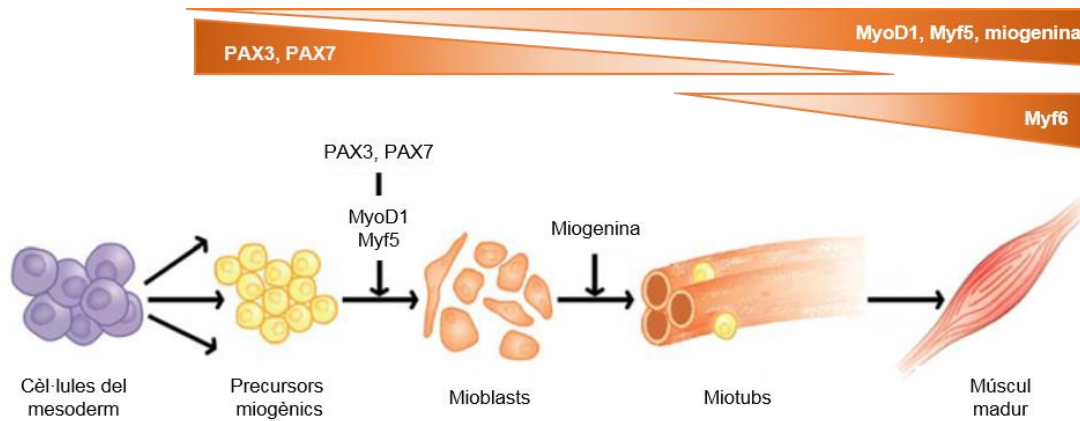


Figura 15: Representació del procés miogènic. La diferenciació muscular de les cèl·lules del mesoderm depèn de l'expressió de factors de transcripció MRFs i PAX3/7. Durant el desenvolupament embrionari, el manteniment cel·lular i la regeneració del múscul esquelètic l'expressió seqüencial de PAX3 i PAX7 seguida de l'expressió altament regulada de MyoD1, Myf5, miogenina i Myf6 (*Myogenic Factor 6*) són punts clau en la diferenciació muscular esquelètica. Modificat de Hettmer S. *et al.* (2010)¹⁰¹.

De forma general, s'ha descrit que la transformació oncogènica de progenitors mesenquimals o bé de progenitors de múscul esquelètic condueix a una desregulació en el desenvolupament del múscul esquelètic, donant lloc al tumor¹⁰¹. Alternativament, s'ha suggerit que el RMS es pot formar a partir de cèl·lules musculars madures¹⁰¹. És més, degut a la complexitat i heterogeneïtat del RMS, s'han proposat diferents orígens en funció del subtipus de RMS. És a dir, alguns autors proposen que el moment en que la transformació oncogènica té lloc està relacionat amb el grau de diferenciació del tumor¹³⁰. Així, es planteja que l'ERMS té origen en els mioblasts o cèl·lules satèl·lit, ja que presenta un fenotip més diferenciat, en canvi, l'ARMS, subtipus tumoral més indiferenciat, s'originaria a partir de cèl·lules mare mesenquimals¹⁰¹.

INTRODUCCIÓ

Hi ha diversos estudis on obtenen models *in vitro* i *in vivo* amb l'objectiu de tenir un millor coneixement sobre els possibles orígens del RMS. Tot seguit s'exemplifiquen alguns dels resultats obtinguts en aquests models.

En models *in vitro*, la combinació de *SV40 T* (oncoproteïna derivada de *Simian Vacuolating Virus 40 TAg*), sobreexpressió de telomerasa i *RAS* mutant en mioblasts humans va donar lloc a un fenotip proper a l'ERMS. En canvi, les mateixes modificacions genètiques en precursors humans de múscul esquelètic fetal van resultar en un fenotip de sarcoma més heterogeni¹³¹. Una altra aproximació *in vitro* va consistir en transformar cèl·lules mare mesenquimals murines amb *PAX3/7-FOXO1*, un mutant dominant negatiu de *p53*, *SV40 T* i *RAS* mutant, obtenint un fenotip similar a l'ARMS¹⁰⁴.

En models *in vivo* es suggereix un origen de l'ARMS a partir de fibres musculars diferenciades. Un exemple és l'expressió condicional de *PAX3/7-FOXO1* en cèl·lules *Myf6+* (cèl·lules terminalment diferenciades), la qual genera un fenotip compatible amb l'ARMS. No obstant, aquest fenomen no es dona en expressar *PAX3/7-FOXO1* en cèl·lules satèl·lit *PAX7+*^{132,133}. Un altre estudi *in vivo* que suggereix un origen de l'ARMS en múscul diferenciat és en *Drosophila*. L'expressió de *PAX7-FOXO1* de forma condicional en múscul va produir la desadhesió de les cèl·lules de la miofibra i la migració a altres teixits no musculars¹³⁴. Malgrat això, si el múscul esquelètic madur és la cèl·lula d'origen de l'ARMS seria complicat explicar les característiques morfològiques i la poca diferenciació d'aquest tumor¹³⁵.

Pel que fa a models animals relacionats amb l'estudi de l'origen de l'ERMS, la mutació en *TP53* en mioblasts al final de la diferenciació muscular (*Myf6+*) va generar una gran penetrància de tumors compatibles amb l'ERMS. D'altra banda, aquesta mutació en cèl·lules satèl·lit *Pax7+* derivarien en un sarcoma més indiferenciat¹³⁶. Finalment, un altre model obtingut és en *zebrafish*, on a diferència de l'anterior estudi, s'ha suggerit a les cèl·lules satèl·lit com a precursoras de l'ERMS^{123,137}.

Finalment, tot i que les dades de diversos estudis concordin en que l'origen del RMS és postnatal, cal remarcar el model murí del mutant *Ptch1+/-*, el qual originava un fenotip compatible amb l'ERMS solament quan s'expressava en cèl·lules embrionàries, però no si la seva deleció era postnatal¹³⁸.

En conjunt, actualment el més acceptat és que les cèl·lules satèl·lit tenen un rol en l'ERMS i les cèl·lules mare mesenquimals en l'ARMS¹³⁰. No obstant, el RMS és un conjunt de tumors amb gran variabilitat, on la cèl·lula d'origen no ha de ser

necessàriament una única cèl·lula comú. L'heterogeneïtat del RMS reflexa una etiologia molt més complexa, que es pot veure afectada per diversos factors, com ara el fons genètic de la cèl·lula d'origen, els esdeveniments genètics que tenen lloc o factors del propi hoste^{50,137}. Per tant, tot i que el RMS es caracteritzi per expressar marcadors de diferenciació muscular, no es pot descartar que la cèl·lula d'origen sigui d'un altre tipus mesenquimal¹³⁰. De fet, més recentment, s'han descrit nous possibles orígens del RMS. Com a exemple, en un estudi indueixen la formació de l'ERMS a partir de cèl·lules de teixit adipós mitjançant l'activació de la via SHH¹³⁹. Un altre exemple és en progenitors endotelials, els quals s'ha descrit que poden donar lloc a un subtipus concret de RMS de cap i coll sense proteïna de fusió, també modulant la via SHH¹⁴⁰.

2.9. ALTERACIONS EN ELS MECANISMES DE DIFERENCIACIÓ TERMINAL

El RMS, de forma similar a altres neoplàsies malignes, mostra una diferenciació alterada que pot anar des de tumors altament diferenciats a no diferenciats¹²⁷. Tot i això, no està clar si és una causa o una conseqüència de la malaltia⁵⁰.

El principal factor de transcripció que controla la diferenciació terminal en el múscul esquelètic és MyoD1. MyoD1 s'expressa en les línies de RMS, no obstant, la seva activitat transcripcional està alterada^{95,141}. De fet, varis estudis proposen que és la desregulació de l'activitat de MyoD1 i no els nivells de la seva expressió el que condiciona el bloqueig en la diferenciació del RMS¹²⁷. Un dels principals mecanismes que inhibeixen l'activitat de MyoD1 és mitjançant proteïnes repressores com MyoR¹⁴². Un altre mecanisme, només descrit en l'ARMS, és mitjançant KMT1A (*Histone Methyl Transferase 1A*). Aquesta metil transferasa presenta una expressió alta en ARMS i és l'encarregada de la trimetilació de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3), marcador que inhibeix la transcripció de la MyoD1 i, per tant, la diferenciació¹⁴³.

L'heterogeneïtat del RMS suggereix que l'alteració en mecanismes específics de diferenciació pot estar associada a diferents manifestacions del tumor. Un cas particular és PAX3/7-FOXO1. Aquesta proteïna de fusió pot alterar per ella mateixa la diferenciació, però l'efecte depèn de la cèl·lula recipient. Per exemple, la transfecció de *PAX3-FOXO1* en fibroblasts murins o cèl·lules mare mesenquimals pot activar el programa miogènic, o bé inclús, ser el condicionant inicial de la transformació i inhibir la diferenciació terminal¹⁰⁰. Per tant, *PAX3/7-FOXO1* pot actuar com a *pangen*, poden activar la diferenciació i inhibir-la de forma simultània⁹⁵. El mateix s'observa en una de les dianes de PAX3-FOXO1, *IGF1R*, l'expressió de la qual s'ha relacionat en promoure

INTRODUCCIÓ

un estat proliferatiu i, a la vegada, l'expressió de marcadors de diferenciació^{91,144}. Altres dianes transcripcionals de PAX3-FOXO1 que es troben afectades inhibint la diferenciació muscular i promovent la proliferació són *MET*¹⁴⁵, *JARID2* (*Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2*)¹⁴⁶ o *FGFR4*⁹².

A més de la proteïna de fusió PAX3/7-FOXO1 en l'ARMS i la inactivació general de MyoD1, s'han identificat altres vies que contribueixen a la diferenciació aberrant del RMS¹²⁷. En són un exemple l'alteració en la via de les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)¹⁴⁷, com p38¹⁴⁸, la via de p53¹⁴⁹ o alteracions en els nivells de miostatina¹⁵⁰. Finalment, altres alteracions específiques descrites a nivell post-transcripcional són mitjançant ARNmi específics de múscul que poden contribuir a la diferenciació aberrant del RMS¹⁵¹. ARNmi promiogènics com miR-1, miR-26a, miR-27a, miR-29 o miR-206 s'han trobat infraexpressats en línies i tumors de RMS en comparació a múscul normal. Més concretament, miR-29 es troba epigenèticament silenciada per la via NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) i la seva reexpressió promou la diferenciació muscular¹⁵².

2.10. TRACTAMENT

El tractament que es realitza a cada pacient depèn de l'estrat al qual ha estat assignat. L'equip intergrup al d'estudi del RMS IRSG (*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group*), ara anomenat el Comitè de sarcomes de parts toves del grup d'oncologia pediàtrica (COG: *Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group*) es va formar al 1972 amb l'objectiu d'investigar la biologia del RMS i millorar-ne el tractament¹⁵³. Posteriorment, han realitzat diferents assajos clínics prospectius, anomenats IRS-I fins a IRS-IV per tal d'incorporar nous agents terapèutics i actualitzar la classificació i l'estratificació¹⁵³⁻¹⁵⁵. L'estratificació del RMS és complexa i el procés inclou tres passos: 1) assignar l'estadi, 2) assignar el grup i 3) assignar un grup de risc¹⁵³.

Per tal d'assignar l'estadi (1 al 4) es valora el lloc primari, la dimensió del tumor i la presència (M₁) o absència de metàstasi (M₀; veure Taula I2)^{22,153}.

Taula I2: Classificació establerta per l'IRSG dels pacients amb RMS segons estadis. N₀: nòduls regionals sense implicació clínica; N₁: nòduls regionals amb implicació clínica i N_x: estat dels nòduls regionals desconegut. M₀: absència de metàstasi; M₁: presència de metàstasi. Modificat de Raney R. *et al.* (2001)¹⁵³.

Estadi	Localització tumor primari	Mida del tumor	Nòduls limfàtics regionals	Metàstasis distants
1	Llocs favorables: òrbita, cap i coll (excloent la zona parameningea), genitourinari (excloent bufeta i pròstata) i tracte biliar	Qualsevol	N ₀ o N ₁ o N _x	M ₀
2	Llocs no favorables: bufeta i pròstata, extremitats, parameningea cranial, altres (tronc, retroperineu...)	≤5cm	N ₀ o N _x	M ₀
3	Llocs no favorables: bufeta i pròstata, extremitats, parameningea cranial, altres (tronc, retroperineu...)	≤5cm	N ₁	M ₀
		≥5cm	N ₀ o N ₁ o N _x	M ₀
4	Qualsevol	Qualsevol	N ₀ o N ₁ o N _x	M ₁

Posteriorment, el sistema classifica en grups que venen determinats pel resultat de la resecció quirúrgica inicial i els marges del tumor, els nòduls limfàtics i la biòpsia (Taula I3)^{22,153}.

Taula I3: Classificació establerta per l'IRSG dels pacients amb RMS segons grups (I al IV). Modificat de Raney R. *et al.* (2001)¹⁵³.

Grup	Definició
I	Tumor localitzat, resecció quirúrgica completa amb marges microscòpics nets i absència d'implicació dels nòduls limfàtics
II	Tumor localitzat i eliminació completa amb a) malaltia microscòpica residual, b) nòduls regionals afectats i eliminats o c) nòduls regionals afectats i eliminats amb malaltia microscòpica residual
III	Tumor localitzat, eliminació incompleta amb malaltia residual
IV	Metàstasi distant present al diagnòstic

Finalment, els pacients es classifiquen en grups de risc (baix, intermedi o alt) que és el que acaba determinant el tractament assignat (Taula I4). Els grups de risc s'estableixen en funció de la histologia del tumor i de l'estadi i grup assignat prèviament^{22,153}.

Taula I4: Classificació establerta per l'IRSG dels pacients amb RMS segons grups de risc. Modificat de Raney R. *et al.* (2001)¹⁵³.

Grup de risc	Histologia	Estadi	Grup
Baix	ERMS	1	I, II, III
	ERMS	2, 3	I, II
Intermedi	ERMS	2,3	III
	ARMS	1, 2, 3	I, II, III
Alt	ERMS o ARMS	4	IV

Actualment, el tractament més comú és la teràpia múltiple que inclou quimioteràpia, cirurgia i/o radioteràpia³⁰.

Segons els protocols del COG, la quimioteràpia en RMS consisteix en: vincristina, actinomicina D i ciclofosfamida (VAC). A partir d'aquest tractament, en funció del grup de risc, s'han afegit algunes modificacions. En el grup de risc baix, per tal de reduir l'ús de radioteràpia, s'ha incorporat el tractament amb antraciclina i ifosfamida. En pacients amb un risc intermedi, els estudis de IRSG i COG han intentat millorar la supervivència, sense gaire èxit, mitjançant la incorporació d'altres agents quimioteràpics com ara etopòsit, ifosfamida, cisplatí, irinotecan, topotecan o la doxorubicina^{156,157}. En els pacients d'alt risc, on urgeix una millora en el tractament, es combina vincristina, doxorubicina i ciclofosfamida. Aquesta última s'alterna amb etopòsit i ifosfamida¹⁵⁸.

Pel que fa a la cirurgia, s'intenta eliminar de forma completa el tumor sempre i quan sigui possible i la localització ho permeti. En el cas que hi hagi malaltia residual microscòpica, es recomana el pretractament del tumor i la reexcisió³⁰.

Finalment, la radioteràpia es sol combinar seguidament de la quimioteràpia en pacients que no han estat operats, en aquells on després de la cirurgia hi ha presència de malaltia residual microscòpica amb nòduls limfàtics afectats i també en pacients amb histologia alveolar^{159,160}.

Tot i les millores en el tractament, la supervivència ha millorat poc en els darrers anys i la toxicitat dels tractaments continua sent elevada, fet que condueix a la necessitat, d'una banda, de millorar la classificació en grups de risc i, de l'altra, de desenvolupar noves teràpies dirigides.

2.11. NOVES APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES

Entendre millor la biologia del RMS i identificar nous biomarcadors i noves dianes terapèutiques són aspectes claus per tal de desenvolupar noves teràpies dirigides. Tot seguit, s'enumeren algunes noves aproximacions terapèutiques que presenten resultats esperançadors *in vitro* i *in vivo*.

En primer lloc, els majors esforços s'han centrat en els RMS positius per a la proteïna de fusió, ja que són els que presenten un pitjor pronòstic. Varis estudis han demostrat com la inhibició de la proteïna de fusió té efectes antitumorals en models *in vitro* i *in vivo* (mitjançant ARNsi, *small interference*, i ARNsh, *short-hairpin*)¹⁶¹⁻¹⁶³. No obstant, aquestes tecnologies encara no són traslladables a la clínica i degut a la dificultat d'inhibir el factor transcripcional PAX3/7-FOXO1 s'han seguit altres estratègies indirectes amb la finalitat d'inhibir algunes de les dianes d'aquesta proteïna. Per exemple, una diana terapèutica potencial és el receptor IGF1R, diana de PAX3/7-FOXO1 i sobreexpressat en RMS. El seu bloqueig ha obtingut bons resultats *in vitro*¹⁶⁴. Tot i això, la inhibició per si sola del receptor no és una estratègia òptima degut a la complexitat de la via¹⁶⁵. La via IGF activa diferents vies de senyalització com PI3K-AKT-mTOR i RAS-RAF-MEK-ERK, essent necessària la modulació de múltiples components d'aquestes vies per tal d'obtenir una teràpia anti-tumoral més efectiva¹⁶⁵. En particular, la combinació d'inhibir IGF1R i mTOR aconsegueix una inhibició additiva^{166,167}. Altrament, la combinació de la inhibició de la via RAS-RAF-MEK-ERK amb la inhibició de la via PI3K-AKT-mTOR també ha obtingut millors resultats, produint un efecte sinèrgic que els inhibidors per separat no produïen^{168,169}.

Altres receptors tirosina quinasa sobreexpressats en RMS i dianes de PAX3/7-FOXO1 són FGFR4 i MET. La inhibició de FGFR4 amb ponatibib redueix el creixement tumoral en models *in vivo* de RMS¹⁷⁰. Pel que fa a MET, la seva expressió és alta principalment en l'ARMS, en canvi, en l'ERMS és més variable¹⁷¹. No obstant, el silenciament de MET produeix efectes *in vitro* i *in vivo* en ambdós subtipus de RMS, podent-se beneficiar d'una teràpia dirigida contra MET¹⁷¹.

L'expressió de receptors de citoquines com CXCR4 i el factor angiogènic VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) estan associats a un pronòstic no favorable en ARMS i ERMS, esdevenint noves dianes terapèutiques potencials¹⁷². Alguns estudis *in vitro* i *in vivo* han aconseguit induir mort cel·lular amb fàrmacs anti-angiogènics^{173,174}.

En l'ERMS s'ha descrit la sobreexpressió de c-Myc, diana *downstream* de la via RAS-RAF-MEK-ERK¹⁷⁵. La inhibició de MEK/ERK és una diana terapèutica potencial en

INTRODUCCIÓ

aquesta variant histològica^{176,177} en combinació amb la radioteràpia, ja que sensibilitza les cèl·lules a les radiacions¹⁷⁸. En l'ARMS *MYCN* està amplificat i, per tant, c-Myc es sobreexpressa, sent la seva inhibició una altra alternativa de tractament¹⁷⁹.

Inhibir els efectors de PAX3/7-FOXO1 no ha estat l'única estratègia desenvolupada. Una altra opció és utilitzar inhibidors dirigits contra els moduladors i coreguladors de la proteïna de fusió¹⁸⁰. Per exemple, la inhibició dels enzims moduladors histones desacetilases disminueix la transcripció de la proteïna de fusió, o un altre exemple és la inhibició del coregulador BRD4. BRD4 (*Bromodomain Protein 4*) és un activador transcripcional que col·labora amb PAX3/7-FOXO1 unit-se als super *enhancers*, que són regions d'ADN reguladores distants al promotor que poden incrementar o disminuir la transcripció gènica¹⁸¹. La inhibició de BRD4 bloqueja la unió als super *enhancers*, produint la repressió dels gens diana de PAX3/7-FOXO1, la mort cel·lular *in vitro* i la disminució del creixement tumoral *in vivo*, afectant també l'estabilitat de la proteïna de fusió¹⁸².

Altres fàrmacs que s'han testat en RMS amb resultats prometedors són inhibidors de: ALK (*Anaplàstic Lymphoma Kinase*)^{183,184}, V-ATPasa (*Vacuolar-type H⁺ ATPase*)¹⁸⁵, PDGFR¹²⁵ o BRAF (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*)¹⁸⁶, entre altres.

Finalment, un altre tractament alternatiu consisteix en la immunoteràpia. Aquesta aproximació s'ha realitzat principalment en pacients amb malaltia metastàtica o recurrent. Específicament, s'han realitzat dos assajos clínics amb selecció de cèl·lules immunitàries autòlogues. En el primer, les cèl·lules dendrítiques dels pacients es van aïllar, electroporar amb un pèptid de la fusió i immunoestimar. L'altre assaig clínic va consistir en seleccionar els limfòcits sense CD25⁺, limfòcits T que causen la immunosupressió i, per altra banda, electroporar les cèl·lules dendrítiques amb el propi lisat tumoral del pacient i també immunoestimar. Ambdues estratègies van millorar la supervivència als 5 anys a un 43 % i 51 %, respectivament^{187,188}. D'altra banda, s'estan realitzant altres assajos clínics, com una vacuna amb lisat tumoral i combinada amb citocina IL-7¹⁸⁹, o bé cèl·lules T citotòxiques que expressen antígens associats al tumor¹⁹⁰.

En conjunt, al llarg dels anys els tractaments han millorat la supervivència de pacients amb RMS de risc baix o mitjà, no obstant, s'ha arribat a un llindar on durant els últims 25 anys no s'han aconseguit millores en la supervivència dels pacients amb alt risc¹⁹¹. Per tant, per tal d'establir noves teràpies és necessari, d'una banda, millorar la estratificació de pacients en subgrups i, de l'altra, desenvolupar noves teràpies dirigides contra dianes específiques, que permetin distingir entre la heterogeneïtat dels

pacients amb diferents tipus de RMS. Per això, és necessari tenir un millor coneixement de les característiques genètiques i epigenètiques i de les vies moleculars involucrades en la tumorigenicitat d'aquest tumor i en la resistència a fàrmacs, així com desxifrar quin és el seu origen i obtenir millors models animals que el reproduïxin^{24,192}.

Un altre aspecte a comentar és que degut al conjunt d'esdeveniments que caracteritzen el RMS, com són translocacions cromosòmiques, mutacions, pèrdua d'heterozigocitat o d'*imprinting* i activació aberrant de múltiples gens o vies de senyalització, la inhibició d'un sol esdeveniment no serà suficient, sinó que serà necessària la combinació de diferents estratègies. Per tant, els esforços s'estan centrant en trobar combinacions d'agents quimioteràpics amb diferents teràpies específiques dirigides¹⁸⁵.

3. METÀSTASI

La metàstasi és la primera causa de mort en els pacients amb càncer¹⁹³. En el RMS, la supervivència cau en picat en malaltia metastàtica i gairebé el 25 % dels pacients la presenten en el moment del diagnòstic. A més, els pacients amb presència de metàstasi que expressen PAX3-FOXO1 són els que presenten un pitjor pronòstic, on la supervivència als 4 anys és d'un 8 %^{64,73}. Els teixits metastàtics més freqüents són els pulmons, seguit dels ossos, la medul·la òssia i els nòduls limfàtics^{39,50}.

La metàstasi consisteix en un conjunt de processos biològics on un grup reduït de cèl·lules tumorals adquireixen capacitats per colonitzar i formar una nova lesió que creix progressivament en un teixit distant¹⁹⁴. El procés consisteix en una sèrie d'etapes: les cèl·lules tumorals invadeixen el teixit adjacent i intravasen als vasos limfàtics o als sanguinis, on les que sobreviuen es mantenen en el torrent sanguini fins a extravasarse i colonitzar un teixit¹⁹⁵ (Figura I6).

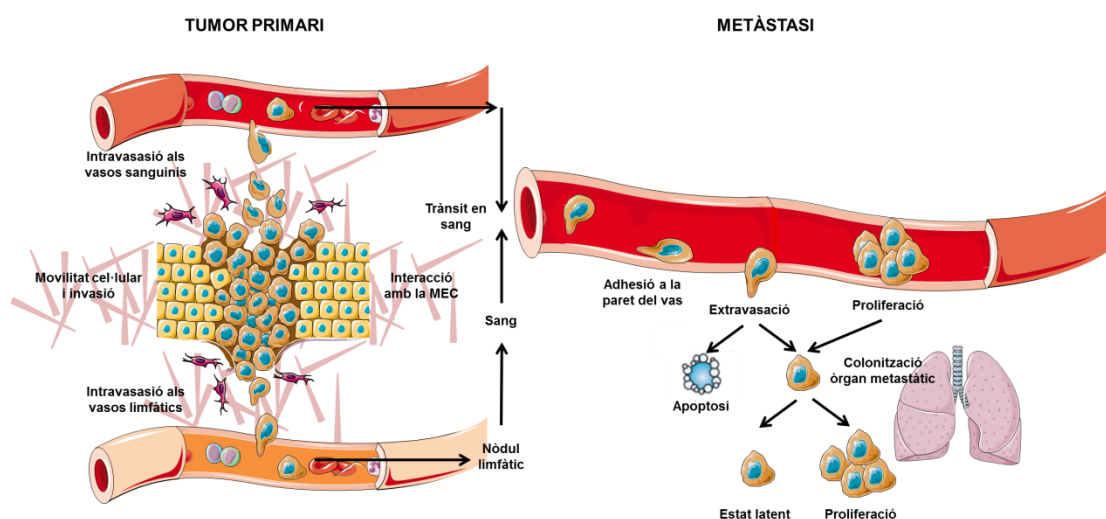


Figura I6: Esquema del procés metastàtic. En el tumor primari, les cèl·lules tumorals proliferen, interaccionen amb la matriu extracel·lular (MEC), migren i invadeixen el teixit circumdant. Poden intravasarse als vasos sanguinis o als vasos limfàtics. Des dels vasos limfàtics arribaran a un nòdul limfàtic des d'on accediran a la sang. Les cèl·lules tumorals seguiran el trànsit en sang, les que sobrevisquin poden adherir-se a la paret del vas i extravasarse, o proliferar en el propi torrent sanguini. Les cèl·lules que extravasatin poden morir per apoptosi, o bé migrar, invair i colonitzar un nou teixit, des d'on podran mantenir-se en estat latent i/o proliferar. Les cèl·lules tumorals es representen en marró, les normals en groc i els fibroblasts en rosa.

En els humans, només s'identifica el procés metastàtic en estadis avançats, quan la lesió és suficientment gran per detectar-la per tècniques d'imatge o bé quan es detecta cèl·lules tumorals en els nòduls limfàtics. Així, entendre millors les vies involucrades en el procés metastàtic ajudarà a desenvolupar millors teràpies i incrementar la supervivència dels pacients^{193,196,197}.

En el procés d'invasió, les cèl·lules experimenten canvis en l'adherència cèl·lula-cèl·lula, regulats per cadherines, i cèl·lula-matriu extracel·lular (MEC), regulats per integrines, adquirint capacitats proteolítiques i migratòries¹⁹³. La MEC proveu suport estructural i químic a les cèl·lules, regulant varies funcions cel·lulars com l'adhesió, comunicació, expressió gènica i migració^{198,199}. Les cèl·lules de l'estroma i els fibroblasts associats al càncer (*cancer-associated fibroblasts*: CAFs), juntament amb les cèl·lules tumorals, són els responsables de l'expressió i organització aberrant dels components de la MEC, així com de la secreció de múltiples factors de creixement, citocines i quimiocines en el microambient tumoral, facilitant la progressió del tumor²⁰⁰⁻²⁰².

En els carcinomes, tumors d'origen epitelial, el conjunt de canvis en les cèl·lules que impliquen la pèrdua d'adhesió i polaritat cel·lular i l'adquisició de característiques mesenquimals que els permeten alliberar-se del substrat, migrar i invair teixits adjacents s'anomena transició epitelial-mesenquima (TEM)²⁰³. La TEM és un procés dinàmic en que diferents factors de transcripció regulen la repressió de gens epitelials (d'adhesió i polaritat cel·lular) així com l'activació de gens mesenquimals i la reorganització del citoesquelet. Alguns dels factors claus en la TEM són la pèrdua d'E-cadherina i l'expressió de N-cadherina, β -catenina i vimentina²⁰⁴. Contràriament, els sarcomes són tumors d'origen mesenquimal i, per tant, la TEM no hi té lloc²².

Un cop les cèl·lules tumorals intravasen, la sang és un ambient dur on no totes sobreviuen. L'extravasació té lloc mitjançant l'adhesió a la MEC endotelial¹⁹³. En alguns models es proposa que hi ha cèl·lules que ràpidament extravasen o bé moren en el torrent sanguini, en canvi, altres proposen que les cèl·lules tumorals proliferen en els vasos abans d'extravasar²⁰⁵.

Finalment, la colonització és un procés altament ineficient on moltes moren i l'èxit depèn de la interacció amb el microambient. El microambient està format per múltiples tipus cel·lulars, MEC i diferents cèl·lules reclutades que faciliten la metastasi i, a vegades, contribueix a la selectivitat de l'òrgan¹⁹⁵. Recentment s'ha proposat que es forma un nínxol metastàtic, lloc format per múltiples proteïnes i cèl·lules derivades de la medul·la òssia, que es creu que prepara els òrgans per a l'arribada de cèl·lules

INTRODUCCIÓ

tumorals metastàtiques²⁰⁶. Per últim, l'angiogènesi o formació de nous vasos aportarà l'oxigen, els factors de creixements, nutrients i metabòlits necessaris per al creixement de la metàstasi²⁰⁷.

4. FAMÍLIA DE PROTEÏNES LISIL OXIDASA

La funció tradicional de les proteïnes de la família LOX (*lysyl oxidase*) és el remodelatge de la MEC, no obstant, recentment se'ls hi ha atribuït un paper important en la progressió tumoral i la metastasi²⁰⁸. Aquesta família està formada per la *lysyl oxidase* (LOX) i quatre proteïnes *lysyl oxidase-like* (LOXL1, LOXL2, LOXL3 i LOXL4)²⁰⁹⁻²¹⁴.

4.1. ESTRUCTURA

Tots els membres de la família comparteixen un domini carboxi-terminal (C-terminal) altament conservat, amb més d'un 50 % d'identitat de seqüència²¹⁵, i un domini amino-terminal (N-terminal) més variable. A més, tots presenten un pèptid senyal per tal de ser secretats²¹⁵ (Figura I7).

D'una banda, la regió C-terminal conté el domini catalític lisil oxidasa, el qual inclou: un domini d'unió a coure ric en histidines (His-X-His-X-His), el cofactor *lysine tyrosylquinone* (LTQ), els dos essencials per a l'activitat catalítica, i el domini *cytokine receptor-like* (CRL) de funció desconeguda²¹⁶⁻²¹⁸.

D'altra banda, en funció de la regió N-terminal la família es pot dividir en dos subgrups. LOX i LOXL1 es caracteritzen per tenir un propèptid altament bàsic (pI > 8), en canvi, LOXL2, LOXL3 i LOXL4 tenen quatre dominis *scavenger* rics en cisteïnes (SRCR: *scavenger receptor cystein-rich domain*)^{214,219,220}.

En LOX i LOXL1, el domini propèptid permet el correcte plegament i secreció a la MEC com a proenzims, on posteriorment són processats proteolíticament²²¹. La principal proteasa descrita que catalitza aquest tall és BMP-1 (*bone morphogenetic protein 1*), encara que ho fa en residus diferents en les dues proteïnes²¹⁹⁻²²². Aquest tall proteolític allibera el propèptid i activa el domini catalític^{220,221}. A més, el propèptid de LOXL1, a diferència del de LOX, presenta un domini ric en prolines^{215,223}.

Pel que fa al domini N-terminal de LOXL2-4, està format per quatre dominis SRCR, cadascun dels qual conté sis residus de cisteïna²²⁴. Encara no s'ha determinat la funció biològica d'aquests dominis, tot i que es creu que són importants per tal d'establir interaccions amb altres proteïnes²²⁴.

Finalment, una modificació comú en tots els membres de la família, menys LOXL1, és la N-glicosilació (Figura I7). En LOX, s'han predit tres N-glicosilacions en la regió N-terminal, les quals no són necessàries per la secreció de la proteïna ni per al

INTRODUCCIÓ

processament proteolític, però sí per l'activitat enzimàtica²²¹. En LOXL2, s'han descrit tres residus N-glicosilats i dos s'han confirmat per MS, Asn455 i Asn644. Aquestes modificacions sí semblen ser essencials per a la secreció de LOXL2^{225,226}. Pel que fa a LOXL3 i LOXL4, contenen un lloc de N-glicosilació predit en el domini catalític, similar a LOXL2 (Asn644) i altres en els SRCR, no conservats en LOXL2²¹⁵. No obstant, la funció d'aquestes modificacions encara no s'ha determinat.

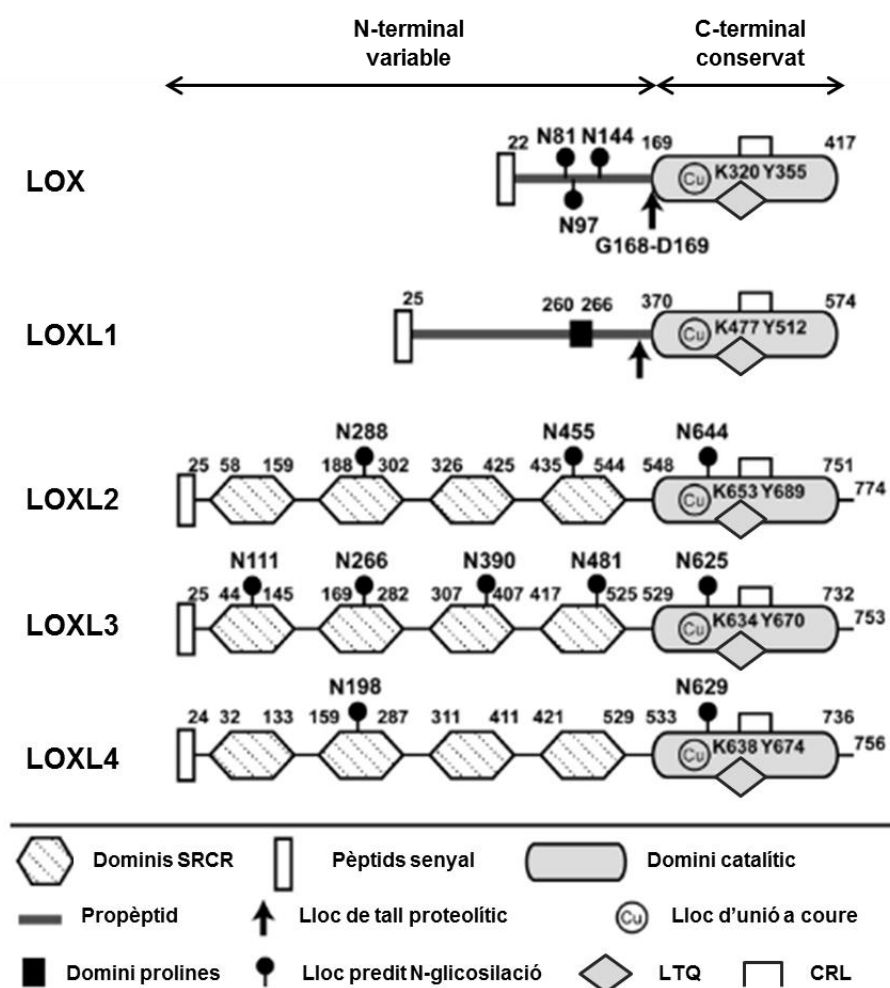


Figura 17: Estructura de la família de proteïnes lisil oxidasa: LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 i LOXL4. En LOX i LOXL1, la regió N-terminal està formada per un propèptid i en LOXL1, a més, per un domini ric en prolines. En aquestes dues proteïnes s'indica amb una fletxa el lloc de tall proteolític per BMP-1. La regió N-terminal de LOXL2, LOXL3 i LOXL4 compren quatre dominis SCRC (*scavenger receptor cystein-rich domain*). En la regió C-terminal de totes elles, altament conservada, es representa el lloc d'unió a coure (Cu), el cofactor LTQ (*lysine tyrosylquinone*) i el CRL (*cytokine receptor-like*). De forma general, s'especifica els residus que formen el LTQ en cada proteïna: lisina (K) i tirosina (Y); els llocs predits de N-glicosilació; els pèptids senyal i el total d'aminoàcids de cada una de les proteïnes. Modificat de Moon J. *et al.* (2014)²¹⁵.

4.2 FAMÍLIA DE PROTEÏNES LOX EN CONDICIONS FISIOLÒGIQUES: FUNCIÓ LISIL OXIDASA

La família de proteïnes LOX és coneguda tradicionalment per catalitzar la desaminació oxidativa dels grups ϵ -amino de les lisines i hidroxilisines del col·lagen i l'elastina, promovent el *crosslinking* d'aquestes molècules en la MEC. El col·lagen i l'elastina són les proteïnes primàries estructurals de la MEC, que a partir de *crosslinks* intermoleculares s'uneixen per tal de formar una xarxa funcional²²⁷. Aquest procés de remodelatge de la MEC és essencial per tal de mantenir la seva rigidesa així com la integritat estructural de molts teixits²²⁸ (Figura I8).

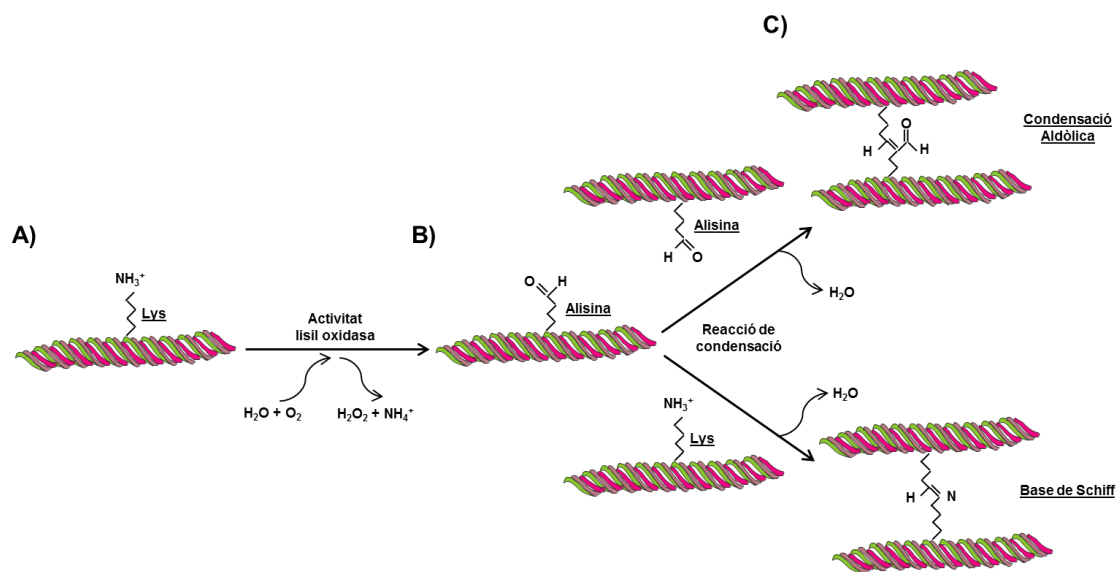


Figura I8: Esquema de la reacció catalitzada per l'activitat lisil oxidasa entre molècules de col·lagen. **A)** Un residu de Lys del col·lagen es desamina oxidativament a través de les lisil oxidases: el grup ϵ -amino de la Lys es converteix en un aldehyd. En la reacció es requereix oxigen i aigua i s'allibera peròxid d'hidrogen i amoni. **B)** El residu resultant s'anomena alisina (lisina desaminada). Una alisina pot condensar amb una altra alisina o amb un residu de lisina sense modificar. **C)** La condensació de dues alisines té lloc per condensació aldòlica (superior). Alternativament, una alisina condensa amb una lisina a través de la formació d'una base de Schiff (inferior). Les dues reaccions alliberen una molècula d'aigua. Finalment, el producte bifuncional pot tornar a condensar per formar tri-, tetra- o inclús penta- *crosslinks* (no es representa). El col·lagen es representa com una triple hèlix.

INTRODUCCIÓ

El desenvolupament de models animals de pèrdua o guany de funció ha ajudat a entendre el paper d'alguns d'aquests enzims en la fisiologia de l'organisme. Fins al moment, s'han generat models murins de *LOX*, *LOXL1* i *LOXL2*. La deleció de *LOX* provoca letalitat perinatal degut a aneurismes aòrtics, disfunció cardiovascular i ruptura del diafragma, així com problemes en pulmons i pell per fragmentació de fibres elàstiques²²⁹. La deleció de *LOXL1* no és letal però afecta a la correcta deposició de les fibres d'elastina en l'úter, pulmó, pell i aorta²³⁰. Finalment, la deleció de *LOXL2* sí promou letalitat en la meitat dels ratolins, principalment associada a defectes del cor i/o distensió dels vasos sanguinis hepàtics²³¹. Altrament, la sobreexpressió de *LOXL2* promou esterilitat masculina degut a una disfunció de l'epidídim per una desorganització de l'epiteli, increment de la fibrosis i inflamació aguda²³¹. Els diferents fenotips obtinguts en aquests models animals i la falta de compensació entre les proteïnes LOX indica l'especificitat de substrat i de funció de cada una d'elles^{208,232}.

4.3 MALALTIES ASSOCIADES A LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES LOX

L'expressió dels membres de la família LOX està altament controlada durant el desenvolupament normal. Malgrat això, s'ha descrit una expressió i activitat aberrant d'aquestes proteïnes en diverses malalties, bàsicament associades a la MEC i al càncer²³³.

4.3.1. LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES LOX EN PATOLOGIES NO TUMORALS

L'alteració de l'expressió dels membres de la família LOX s'ha associat amb desordres relacionats amb la regulació de la MEC.

D'una banda, la reducció de l'activitat lisil oxidasa s'ha detectat en varies patologies humanes hereditàries com la malaltia de Menkes²³⁴ i el síndrome de la banya occipital (*occipital horn*)²³⁵. Aquestes patologies estan causades per mutacions que afecten a la disponibilitat de coure i, per tant, a la pèrdua d'activitat catalítica lisil oxidasa, provocant nombroses alteracions en els teixits. Els baixos nivells d'expressió i/o activitat també s'han associat a altres malalties humanes com la cutis laxa congènita²³⁶ o la predisposició als aneurismes aòrtics²³⁷.

D'altra banda, en múltiples processos fibròtics hi ha una major activitat i expressió dels membres de la família LOX²³⁵. En la fibrosis hi ha una excessiva deposició dels components de la MEC, sobretot col·lagen, que altera les propietats físiques, bioquímiques i biomecàniques de la matriu afectant la funció de l'òrgan²³². Així, alts nivells de LOX i LOXL2 s'han associat a la malaltia de Wilson i a la cirrosis biliar

primària²³⁸. Aquestes malalties es caracteritzen per una acumulació de coure que provoca un error hepàtic progressiu acompanyat de fibrosis²³⁸. Altres malalties relacionades amb un increment de l'activitat lisil oxidasa, i per tant un increment en la fibrosis, són l'aterosclerosi²³⁹, l'esclerodèrmia²⁴⁰ i la cirrosis de fetge²⁴¹.

4.3.2. LA FAMÍLIA DE PROTEÏNES LOX EN CÀNCER

Un increment en la formació i remodelatge de la MEC crea un microambient més rígid, el qual promou la progressió tumoral i desestabilitza la polaritat cel·lular, l'adhesió cel·lular i incrementa la senyalització de factors de creixement^{242,243}.

En varis càncers s'ha vist una desregulació d'enzims que remodelen la matriu i, concretament, de membres de la família LOX. Aquesta desregulació pot ser per sobreexpressió o per silenciament i, conseqüentment, poden actuar com a supressors o promotors tumorals²⁴⁴.

Principalment, els dos membres de la família LOX que s'han vist implicats en un major nombre de processos tumorals són LOX i LOXL2. LOX va ser inicialment descrit com un supressor tumoral, ja que la seva sobreexpressió inhibia la transformació induïda per *HRAS* en cèl·lules de ratolí^{245,246}. Posteriorment, es va veure que aquest efecte era degut al propèptid de LOX, el qual actualment es considera l'únic responsable del paper supressor tumoral de LOX. Altres models on s'ha vist un paper supressor del propèptid de LOX són: fibroblasts de ronyó de rata (NRKFs: *normal rat kidney fibroblasts*)^{247,248}, cèl·lules epitelials de mama que expressen *HRAS*²⁴⁹ i cèl·lules tumorals de pulmó H1299^{250,251}. Per contra, hi ha moltes evidències de la funció de LOX com a promotor tumoral: en varis estudis s'estableix una correlació entre l'alta expressió de LOX i la progressió tumoral, com en carcinoma escamós de cap i coll²⁵², carcinoma renal^{253,254}, càncer de mama^{252,255}, colorectal^{256,257} i de pròstata²⁵⁸.

Finalment, molts pocs estudis han mostrat alteracions en l'expressió de LOXL1, LOXL3 i LOXL4 en càncer. En canvi, la participació de LOXL2 en la progressió tumoral ha estat molt estudiada i es descriurà posteriorment en detall (veure Introducció, secció 5.3 LOXL2 en càncer).

5. LOXL2

LOXL2 localitza al cromosoma 8p21 i està format per 14 exons i 13 introns^{213,259}. A nivell proteic, *LOXL2* consta de 774 aminoàcids, amb un pes molecular predit de 87 kDa. Presenta múltiples modificacions i per *western blot* es detecta una forma secretada al medi extracel·lular d'uns 100 kDa i un fragment proteolític d'uns 60 kDa^{211,259,260}. A més de la localització extracel·lular també s'ha descrit una expressió intracel·lular^{259,260}. En teixits, *LOXL2* presenta un patró d'expressió bastant ampli: s'ha detectat en melsa, timus, colon, múscul esquelètic, pròstata, intestí, cor, fetge, entre d'altres, i amb uns nivells més elevats en placenta i úter²¹³.

5.1. ESTRUCTURA DE LOXL2

Fins fa relativament poc no s'havia obtingut l'estructura de *LOXL2* per cristal·lografia o NMR (ressonància magnètica nuclear), ni tampoc de cap altre membre de la família^{261,262}. Això és degut, principalment, a l'alt contingut en cisteïnes que presenten, tant en el domini catalític com en els SRCR, essent altament insolubles i dificultant l'expressió i purificació de proteïnes recombinants²¹⁵. Tot seguit, es detallen diferents estudis on han obtingut proteïnes recombinants de *LOXL2* (*LOXL2r*) en diferents models, els quals han permès entendre millor la seva estructura, així com la primera cristal·lografia de *LOXL2*.

5.1.1. DOMINIS SRCR I N-GLICOSILACIONS

El primer *LOXL2r* es va obtenir en *Escherichia coli*²⁶³, ara bé, es va aïllar en cossos d'inclusió i posteriorment va ser necessària la seva desnaturalització amb urea, el seu plegament i la seva activació amb coure. La proteïna presentava activitat lisil oxidasa, però un inhibidor clàssic de LOX, β -aminopropionitril (β -APN)²⁶⁴, no tenia efecte sobre *LOXL2r*, suggerint que tot i l'alta homologia i identitat en els dominis catalítics el lloc actiu era diferent. A més, l'obtenció de *LOXL2r* amb diferents delecions en els dominis SRCR va suggerir que aquests no eren importants en regular l'activitat catalítica²⁶³.

Posteriorment, es va obtenir *LOXL2r* en cèl·lules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), el qual es detectava en el medi de cultiu en una forma de 100 i 65 kDa i presentava activitat lisil oxidasa. A més, altre cop l'inhibidor β -APN no era funcional²³⁸.

En un altre model, cèl·lules MCF-10A (epitelials de mama) i MCF-7 (tumoral de mama no metastàtiques) es va obtenir *LOXL2r* en el medi de cultiu en dues formes: 100 i

60 kDa^{226,260}. En aquest model es va confirmar mitjançant inhibidors de proteases que la forma de 60 kDa es forma per proteòlisi²⁶⁰.

D'altra banda, en LOXL2r produït en cèl·lules murines de mieloma es van observar dues formes, de 87 i 60 kDa, les quals la seva activitat lisil oxidasa sí era sensible a β -APN. A més, un anticòs contra els quatre dominis SRCR inhibia l'activitat oxidasa, proposant que els SRCR sí modulen l'activitat catalítica²⁶⁵.

Tot seguit, es van obtenir en cèl·lules de *Drosophila* dos mutants de LOXL2r en els dominis SRCR: un sense cap domini (Δ 1-4SRCR-LOXL2) i l'altre amb solament el quart (Δ 1-3SRCR-LOXL2). Els dos mutants tenien activitat lisil oxidasa però el Δ 1-4SRCR-LOXL2 presentava menys activitat catalítica, suggerint altre cop que aquests dominis, i en aquest cas especialment el quart, sí són importants en regular l'activitat enzimàtica de LOXL2²²⁵.

Paral·lelament, s'han predit tres possibles llocs de N-glicosilació (Asn-X-Ser/Thr) en hLOXL2 (humà): Asn-288 (en el segon domini SRCR), Asn-455 (en el quart domini SRCR) i Asn-644 (en el domini catalític; Figura 17). En els mutants SRCR descrits prèviament en cèl·lules de *Drosophila* es va confirmar per espectrometria de masses (MS) dos dels tres residus N-glicosilats: Asn-455 i Asn-644. En aquests constructes, mitjançant mutagènesis dirigida es van modificar els residus Asn pel residu no glicosilable Gln. Aquesta modificació va inhibir la secreció i va afectar l'estabilitat de la proteïna, ja que es va detectar en quantitats molt petites i en la fracció insoluble cel·lular²²⁵. Tot seguit, per tal de confirmar l'efecte de la manca de glicosilació²⁶⁶, van tractar els mateixos constructes no mutats amb l'inhibidor de la N-glicosilació tunicamicina. El tractament amb aquest agent inhibia completament la secreció de LOXL2 i només es va trobar en la fracció insoluble, demostrant que els N-glicans són essencials per al plegament i la secreció de LOXL2²²⁵. Posteriorment, els mateixos autors van reintroduir LOXL2 en cèl·lules MCF-7 demostrant altre cop que la N-glicosilació del residu Asn-288 no és essencial per a la secreció de LOXL2 però sí els Asn-455 i Asn-644²²⁶. A més, mutants en aquests dos últims residus (Asn per Gln) no solament no eren secretats, sinó que eren solubles en la fracció intracel·lular. Aquest resultat contradeïa l'obtingut en cèl·lules de *Drosophila*, on els mutants eren insolubles. Per tant, en aquest model les N-glicosilacions serien essencials per a la secreció de LOXL2 però no per al plegament i l'estabilitat²²⁶.

Finalment, a principis de l'any 2018 es va aconseguir la primera estructura cristal·lina de LOXL2²⁶². L'estructura es va obtenir a partir de LOXL2 secretat per cèl·lules humanes embrionàries de ronyó (HEK293T) mitjançant cristal·lografia de rajos X. El

crystal·l consistia en LOXL2 processat, sense el primer i segon domini SRCR. Aquest estudi ha aportat nova informació estructural de LOXL2 sobretot en quant al seu domini catalític, el qual es discuteix més endavant. Pel que fa als dominis SRCR, es va descriure que el SRCR4 i SRCR3 interaccionen entre ells, però que només SRCR3 contacta amb el lloc catalític²⁶². A més, el crystal·l es va obtenir d'un mutant de LOXL2 en el residu glicosilat Asn-455, observant com en aquest model el residu glicosilat no era essencial per a la secreció de LOXL2, a diferència dels models previs^{225,226}, ni tampoc per l'activitat catalítica²⁶².

En conjunt, els estudis realitzats fins al moment mostren com LOXL2 presenta N-glicosilacions, Asn-455 i Asn-644 confirmades per MS, les quals poden ser essencials per a l'estabilitat de la proteïna i la seva secreció al medi extracel·lular. Un cop secretada, la proteïna d'uns 100 kDa es processa proteolíticament en una forma d'uns 60-65 kDa. Finalment, l'activitat catalítica de LOXL2 sembla ser diferent de la de LOX i, a més, els dominis SRCR sí poden tenir un paper en modular-la.

5.1.2. DOMINI CATALÍTIC

LOXL2, igual que els altres membres de la família LOX, presenta tres histidines altament conservades en el domini catalític (His626-X-His628-X-His630) que s'han proposat com a lloc d'unió al coure (Cu^+)^{217,267}. El rol del Cu^+ en l'activitat catalítica d'aquestes proteïnes és una tema de controvèrsia. D'una banda, es va proposar que la seva funció era essencial en l'activitat lisil oxidasa, ja que l'eliminació del coure amb un quelant inhibia completament la seva activitat catalítica²⁶⁷. Altrament, uns altres autors també van utilitzar un quelant de coure i, en aquest cas, l'activitat catalítica es va veure reduïda però no completament, proposant que el Cu^+ juga un paper estructural per tal d'estabilitzar el cofactor LTQ o l'enzim²⁶⁸. Finalment, es va obtenir un doble mutant de LOXL2r amb dos dels tres residus His mutats a Gln²⁶⁹. En expressar aquest mutant en cèl·lules HEK293T no es va detectar activitat lisil oxidasa, confirmant així la importància dels residus His i el Cu^{+270} .

Un altre component clau del domini catalític de LOXL2 i dels membres de la família és el LTQ. Aquest es va identificar inicialment per MS i espectroscòpia Raman en LOX boví²¹⁶. Posteriorment, es va confirmar en hLOXL2 per MS que els residus Lys-653 i Tyr-689 són els precursors del LTQ²²⁵ (Figura I9). La seva biogènesi és autocatalítica i requereix de Cu^+ i oxigen. Probablement té lloc al reticle endoplasmàtic, ambient més oxidatiu que el citosol²⁷¹. A més de la seva funció en l'activitat lisil oxidasa, el LTQ té un paper en la N-glicosilació i la secreció de LOXL2, ja que en un estudi on muten el

residu Lys-653 observen com en eliminar la càrrega positiva en aquest residu (com per exemple mutant Lys a Ser) s'impedia la N-glicosilació de LOXL2 i, per tant, la seva secreció²²⁶.

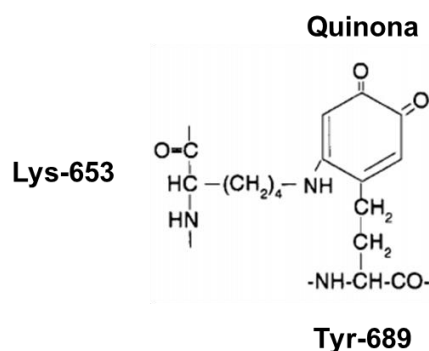


Figura 19: Estructura del cofactor LTQ, on es representa el residu Lys-653, Tyr-689 i la quinona. Modificat de Smith-Mungo L.I. i Kagan H.M. (1998)²²⁸.

Finalment, l'estructura cristal·lina ha aportat nova informació pel que fa al domini catalític de hLOXL2²⁶². Aquest està format per 14 làmines- β i tres hèlix- α . A més, es va confirmar el lloc d'unió a Cu^+ així com els residus precursors del cofactor LTQ (Lys-653 i Tyr-689, sent aquest últim el més accessible ja que està a la superfície proteica). No obstant, sorprenentment, el lloc d'unió a Cu^+ estava ocupat per zinc. En presència de zinc, l'activitat enzimàtica de LOXL2 es trobava inhibida. En eliminar el zinc no es van veure efectes, però en afegir Cu^+ s'activava l'activitat lisil oxidasa. Per tant, els resultats van mostrar com l'estructura obtinguda és d'un precursor inactiu de LOXL2, unit a zinc, i que la unió a Cu^+ és l'element que activava l'activitat enzimàtica i a la vegada permetia la formació del LTQ²⁶². Per tant, el cofactor LTQ i el Cu^+ són necessaris per a l'activitat lisil oxidasa.

5.2. TALL PROTEOLÍTIC

Inicialment es va descriure quin era el lloc de tall proteolític de LOX i LOXL1 i quines eren les proteases responsables: BMP-1 talla el prodomini en els residus Gly168 i Asp169 de LOX²¹⁹⁻²²¹. No obstant, aquest lloc de tall no està conservat en LOXL2. En LOXL2 varis articles havien descrit la secreció al medi extracel·lular en una forma de 100 kDa i el seu processament dependent de proteases a una forma d'uns 60-65 kDa^{238,260}.

INTRODUCCIÓ

Primer es va descriure el lloc de tall de LOXL2 entre la regió que uneix el SRCR2 i SRCR3, en la Lys-317. Aquest punt de tall es va identificar purificant el fragment de proteòlisi del medi de cèl·lules HEK293 transfectades amb *LOXL2* i realitzant microsequenciació d'Edman²⁷². Tanmateix, els autors van proposar que el tall proteolític depenia d'una serina proteasa. A més, van avaluar l'efecte del processament proteolític en l'activitat catalítica, observant que les dues formes, la total i el fragment de proteòlisi, són actives²⁷². Posteriorment, es van plantejar si l'activitat enzimàtica de la forma proteolitzada estava incrementada respecte la forma total, igual que esdevé en LOX (la forma processada presenta tres vegades més activitat catalítica que la forma total)^{219,273,274}. No van observar diferències d'activitat en ambdues formes en substrats petits. En canvi, en un substrat gran i insoluble, com el col·lagen IV, solament la forma processada va ser capaç d'interaccionar i desaminar-lo oxidativament, ja que els dominis SRCR1-2 bloquejaven la interacció. Conseqüentment, es va plantejar que el processament catalític no era necessari per tal d'activar l'activitat enzimàtica, però sí que era un mecanisme regulador que assegura una interacció substrat-enzim eficient²⁷².

Més recentment uns altres autors han confirmat el lloc de tall específic de LOXL2 així com una proteasa involucrada²⁷⁵. Els resultats d'aquest article van demostrar també el mateix lloc de tall específic de LOXL2, el qual es troba entre el segon i el tercer SRCR (Lys-317) i la seqüència de reconeixement és Arg(P4)-X-Arg(P2)-Lys(P1), on P representa la posició de l'aminoàcid (Figura I10).

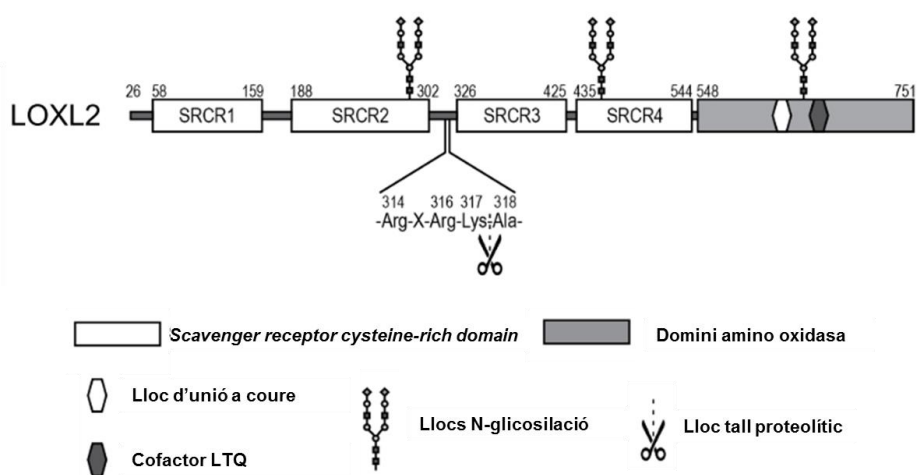


Figura I10: Representació esquemàtica de l'estructura de LOXL2 amb el lloc de tall proteolític identificat entre el segon i tercer domini SRCR. A més, s'hi representa el domini amino oxidasa, el lloc d'unió a coure, el cofactor LTQ i els llocs de N-glicosilació. Modificat d'Okada K. *et al.* (2017)²⁷⁵.

D'entre les diferents proteases candidates, van validar a PACE4 (*Subtilisin/Kexin-Like Protease 4*) com la principal proteasa responsable del processament de LOXL2. Tot i que la seqüència d'aminoàcids que envolta el lloc de tall està conservada en LOXL3 i LOXL4, la seqüència de reconeixement està alterada, confirmant l'especificitat en LOXL2²⁷⁵.

Posteriorment, els mateixos autors van comprovar si l'activitat enzimàtica de la forma proteolitzada estava alterada. L'eliminació dels dos primers dominis SRCR no va tenir cap efecte en l'activitat lisil oxidasa de LOXL2 sobre tropoelastina, però sí un lleuger increment sobre col·lagen tipus IV²⁷⁵. No obstant, més estudis són necessaris per entendre la funció biològica d'aquest processament.

5.3. LOXL2 EN CÀNCER

L'expressió de LOXL2 s'ha associat amb diferents processos relacionats amb el càncer. Tot seguit es detallen les seves funcions, les quals són altament dependents del context cel·lular i de l'expressió espacial i temporal, podent tenir rols oposats²³³.

5.3.1. LOXL2 COM A SUPRESSOR TUMORAL

S'ha descrit una baixa expressió de *LOXL2* en diversos tumors i línies cel·lulars, sent un candidat a supressor tumoral²⁴⁴. En la següent taula es recullen els diferents estudis on s'ha detectat una baixa expressió (ARN o proteïna) de LOXL2 en teixits o cèl·lules tumorals (Taula I5). Cal destacar que els mecanismes pels quals podria estar duent a terme aquesta funció no han estat estudiats.

Taula I5: Resum de l'expressió de LOXL2 en diferents teixits i cèl·lules tumorals. S'especifica el model, si l'estudi es basa en nivells d'ARN o proteics i quina és l'expressió comparativa.

Model	Tipus de mostra	Expressió i característiques
Línies cel·lulars tumorals adherents vs no adherents²¹¹	ARN	Baixos nivells en línies tumorals no adherents vs adherents.
Fibroblasts transformats amb RAS²⁷⁶	ARN	Baixos nivells vs cèl·lules normals.
Línies cel·lulars i teixits de carcinoma escamós de cap i coll²⁷⁷	ARN	Baixa expressió en les línies tumorals vs línies cel·lulars de queratinòcits / no detecten canvis en les mostres de teixits.
Línies cel·lulars i teixits de tumors d'ovari^{278,279}	ARN	Baixa expressió en teixits i línies tumorals d'ovari vs teixit normal.
Teixits de càncer de pròstata²⁸⁰	ARN i proteïna	Deleció d'una regió del cromosoma de LOXL2 (8p21-22)/ baixa expressió proteica en càncer de pròstata vs teixit sa.
Teixits d'adenocarcinoma de pulmó²⁸¹	ARN i proteïna	Baixa expressió en teixit de càncer de pulmó vs teixit sa del voltant. Significança clínica entre baixa expressió i pitjor pronòstic.

5.3.2. LOXL2 COM A PROMOTOR TUMORAL: MECANISMES D'ACCIÓ

D'altra banda, LOXL2 s'ha vist involucrat en molts processos relacionats amb la progressió tumoral: migració i invasió cel·lular, metàstasi, TEM, angiogènesi o proliferació^{232,282}. A més, majorment s'ha descrit una alta expressió dels nivells d'ARNm i proteïna de LOXL2 en diversos tumors, els quals es recullen en la Taula I6.

Taula I6: Resum de l'expressió de LOXL2 en diferents tumors. S'especifica el model (línies cel·lulars o teixit), si l'estudi es basa en nivells d'ARN o proteics i quina és l'expressió comparativa i les característiques clíniques i patològiques si s'escau.

Model	Tipus de mostra	Expressió i característiques clíniques i patològiques
Mama	ARN	L'expressió en teixit es correlaciona amb metàstasi i una menor supervivència dels pacients amb càncer de mama agressiu ²⁸³ .
	Proteïna	Una alta expressió en teixit es correlaciona amb pacients negatius pel receptor de l'estrogen, triple negatius i una baixa supervivència ²⁸⁴ .
	Proteïna	Alts nivells en pacients amb adenocarcinoma de mama i nodes limfàtics negatius s'associen amb una menor supervivència ²⁸⁵ .
	ARN	Elevada expressió en carcinomes basals (triple negatius) en comparació als no basals ²⁸⁶ .
	ARN i proteïna	Alts nivells en l'estroma tumoral vs l'estroma normal ²⁸⁷ .
Pulmó	Proteïna	Alts nivells en pacients amb carcinoma escamós de pulmó s'associen amb una menor supervivència ²⁸⁵ .
	ARN	Elevada expressió correlaciona amb un pitjor pronòstic ²⁸⁸ .
Cap i coll	Proteïna	Alts nivells en pacients amb carcinoma escamós de laringe s'associen amb una menor supervivència ²⁸⁵ .
	ARN i proteïna	Alts nivells en l'estroma tumoral de carcinoma escamós de laringe vs l'estroma normal ²⁸⁷ .
	Proteïna	Sobreexpressió en teixit de carcinoma d'esòfag es relaciona significativament amb tumors menys diferenciats ²⁵⁹ .
Còlon	Proteïna	La sobreexpressió en teixit es relaciona significativament amb tumors menys diferenciats ²⁵⁹ .
	ARN i proteïna	Alts nivells en l'estroma tumoral vs l'estroma normal. Correlació de l'expressió amb el grau d'agressivitat ²⁸⁷ .
Gàstric	Proteïna	La sobreexpressió s'associa a línies cel·lulars més invasives i a una major metàstasi i pitjor pronòstic en pacients ²⁸⁹ .
	Proteïna	L'expressió en les cèl·lules tumorals i de l'estroma correlació amb un pitjor pronòstic ²⁹⁰ .
Pancreàtic	ARN	Sobreexpressió en teixit i línies cel·lulars vs controls ^{291,292} .
	ARN i proteïna	Alts nivells en l'estroma tumoral vs l'estroma normal. Correlació de l'expressió amb el grau d'agressivitat ²⁸⁷ .
Carcinoma hepatocel·lular	Proteïna	Sobreexpressió en teixits de pacients amb carcinoma hepatocel·lular vs controls ²⁹³ .
Melanoma	ARN	Sobreexpressió associada amb un pitjor pronòstic ²⁹⁴ .

Degut a que molts càncers expressen alts nivells de LOXL2 i que aquesta expressió està associada en alguns casos amb un pitjor pronòstic, s'han establert diferents models genètics (silenciament o reintroducció) i químics (ús d'inhibidors), *in vitro* i *in vivo*, que han permès corroborar la funció d'aquesta proteïna com a promotor tumoral. En aquests models s'han descrit múltiples mecanismes d'acció promoguts per LOXL2, bioquímics i biomecànics, els quals s'especifiquen a continuació²⁸² i es resumeixen posteriorment en la Figura I11.

5.3.2.1. LOXL2 PROMOU LA TEM

Inicialment es va descriure en cèl·lules de carcinoma que LOXL2 promou la TEM a través de Snail. El factor de transcripció Snail controla la TEM, reprimint l'expressió del promotor de la E-cadherina (*CDH1*) i d'altres gens epitelials. GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) activa la degradació de Snail mitjançant fosforilació i ubiquitinització. L'expressió de LOXL2 estabilitza Snail prevenint aquesta degradació mitjançant una interacció directa i una possible oxidació. En aquest context, Snail pot translocar al nucli i reprimir el promotor *CDH1*, afavorint l'adquisició del fenotip mesenquimal²⁶⁹. A la vegada, LOXL2 en carcinoma de mama i LOXL2 sobreexpressat en HEK293T s'ha descrit que activa l'expressió de diferents factors de transcripció que regulen la TEM, com Snail i ZEB2 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*)²⁹⁵ mitjançant HSPA5 (*Heat Shock Protein Family A Member 5*). LOXL2 s'acumula en el reticle endoplasmàtic on interacciona amb HSPA5 activant la via de senyalització IRE1-XBP1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1 α -X-box Binding Protein 1*), la qual activa l'expressió de factors de transcripció que regulen la TEM²⁹⁵.

També s'ha descrit que LOXL2 regula la TEM per mecanismes independents a Snail. D'una banda, en carcinoma escamós de pell LOXL2 regula negativament la diferenciació epitelial²⁸⁵. Altrament, en carcinoma basal de mama LOXL2 manté el fenotip mesenquimal mitjançant la inhibició transcripcional de gens que participen en la formació de complexos de polaritat (*LGL2, Lethal Giant Larvae homologue 2*) i d'unions estretes (*CLDN1, Claudin1*)²⁸⁶. A més, un altre possible mecanisme independent de Snail que reprimeix el promotor *CDH1* és mitjançant la interacció i col·laboració de LOXL2 amb E47 (*E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47*), factor de transcripció involucrat en la TEM²⁹⁶.

Paral·lelament, s'ha demostrat un altre substrat de LOXL2 implicat en la TEM: la histona 3 (H3). LOXL2 desamina la lisina 4 trimetilada de la H3 (H3K4me3) *in vitro* i *in vivo* i aquesta oxidació està lligada amb la repressió de *CDH1*²⁹⁷. De fet, s'ha proposat

un mecanisme dual de la repressió del promotor *CDH1*: d'una banda, Snail és estabilitzat per LOXL2, de l'altra, aquesta estabilització afavoreix la localització de Snail-LOXL2 al promotor *CDH1* on LOXL2 pot oxidar la H3²⁹⁸. La H3 trimetilada està activa promovent la transcripció de *CDH1*, en canvi, la seva oxidació promou la pèrdua de metilació i, per tant, H3 queda reprimida²⁹⁷.

Finalment, en alguns d'aquests estudis s'ha analitzat el paper de l'activitat catalítica de LOXL2. Concretament, dos mutants de LOXL2 en l'activitat catalítica (un d'ells no secretable) indueixen la TEM igual que LOXL2 *wt*, suggerint que la funció és independent de l'activitat catalítica i de la forma secretada²⁷⁰. A més, LOXL2 reprimeix gens involucrats en polaritat cel·lular de forma també independent a l'activitat catalítica²⁸⁶. Contràriament, la funció de LOXL2 en H3 sí depèn de la seva activitat lisil oxidasa²⁹⁷.

5.3.2.2. LOXL2 ACTIVA LA VIA FAK/SCR

Un dels mecanismes pels quals LOXL2 promou la progressió tumoral és mitjançant l'activació de FAK/Src (*Focal Adhesion Kinase/Src*) i les seves cascades de senyalització *downstream*^{289,299}. En càncer gàstric, el silenciament de *LOXL2* inhibeix la invasió i l'adhesió cel·lular *in vitro* i el creixement tumoral i la formació de metàstasis espontànies *in vitro*. És més, mitjançant un anticòs anti-LOXL2 també van obtenir els mateixos resultats, confirmant el paper de LOXL2 secretat²⁸⁹. A nivell de senyalització, els autors van observar que la inhibició de LOXL2 reduïa la fosforilació de FAK (Tyr-576) lligada a l'activació de Src i també de fosfo-Src. A més, van demostrar com l'activació de FAK per LOXL2 extracel·lular és dependent de la producció de peròxid d'hidrogen alliberat en la reacció lisil oxidasa. Finalment, també van establir una correlació clínica entre una elevada expressió de LOXL2 i la fosforilació de Src en pacients amb càncer gàstric²⁸⁹.

Múltiples models donen suport a l'activació de FAK/Src per LOXL2. En càncer de mama, on s'ha demostrat el paper de LOXL2 en promoure invasió i metàstasi *in vitro* i *in vivo*²⁸³, s'ha descrit com LOXL2 secretat activa els CAFs mitjançant la via FAK/Src i les integrines, afavorint així el procés tumoral²⁹⁹. En un altre estudi en càncer de mama, corroboren que LOXL2 activa la via FAK/Src i que, a més, també incrementa la fosforilació de les vies *downstream* com AKT i PI3K³⁰⁰. En un altre article en càncer gàstric, descriuen que els CAFs promouen la invasió i la metàstasi mitjançant la secreció de LOXL2, el qual suggereixen que promou l'activació de la via FAK/Src en les cèl·lules tumorals²⁹⁰. En línies cel·lulars de càncer de mama basal, el silenciament

de *LOXL2* promou la reducció de fosfo-FAK i de les adhesions focals observades per microscòpia de fluorescència²⁸⁶, independentment de l'activitat catalítica²⁷⁰. Finalment, en càncer de pulmó també s'ha demostrat que *LOXL2* activa la via FAK/Scr²⁸⁸.

5.3.2.3. HIF-1 α I ANGIOGÈNESI

Diversos càncers contenen regions hipòxiques, on les cèl·lules tumorals s'adapten millor a aquest ambient que les cèl·lules normals³⁰¹. Sota aquestes condicions, el factor de transcripció HIF-1 α (*Hipoxia-Inducible Factor-1 α*) s'uneix al HRE (*Hipoxia Responsive Element*) de regions promotores de varis gens, com *LOXL2*³⁰²⁻³⁰⁴. A la vegada, la sobreexpressió de *LOXL2* incrementa l'expressió de HIF-1 α en condicions d'hipòxia, reforçant-se mútuament i promovent la progressió tumoral³⁰⁵.

L'ambient tumoral hipòxic condueix a *LOXL2* a participar en l'angiogènesi. HIF-1 α promou l'expressió de *LOXL2*, el qual reorganitza el col·lagen i la fibronectina durant el remodelatge de la MEC en l'angiogènesi³⁰⁶. Fins al moment, s'ha descrit en carcinoma d'ovari i de pulmó que la inhibició de *LOXL2* redueix la densitat vascular afectant parcialment la senyalització de VEGF, via essencial durant l'angiogènesi³⁰⁷. En cèl·lules endotelials, també s'ha descrit que *LOXL2* regula l'angiogènesi mitjançant el remodelatge del col·lagen³⁰⁶.

5.3.2.4. LOXL2 EN LA DIFERENCIACIÓ TUMORAL

Alguns autors han proposat que *LOXL2* contribueix en la progressió tumoral inhibint la diferenciació o incrementant la proliferació. En carcinoma escamós de pell, derivat de precursors de queratinòcits, *LOXL2* es troba sobreexpressat i el seu silenciament incrementa l'expressió de gens associats amb la diferenciació epidèrmica²⁸⁵. Aquesta funció s'ha vist que és independent de la seva activitat catalítica³⁰⁸. Tanmateix, en papil·lomes de ratolins *knock out* de *LOXL2* van observar un increment en els marcadors de diferenciació i una disminució de la progressió maligna, suggerint que *LOXL2* promou un fenotip desdiferenciat en lesions de la pell premalignes. A més, un possible mecanisme d'inhibició de la diferenciació és mitjançant la repressió de la via Notch1²³¹.

Altres autors donen suport al paper de *LOXL2* en la diferenciació en condicions fisiològiques. En els condrocits *LOXL2* promou la diferenciació cel·lular³⁰⁹. Certament, *LOXL2* mitjançant l'oxidació del factor de transcripció TAF10 (*TATA-Box Binding Protein Associated Factor 10*) regula el balanç entre pluripotència i diferenciació en cèl·lules mare embrionàries³¹⁰.

5.3.2.5. LOXL2 I MEC EN PROCESSOS TUMORALS

Tal i com s'ha comentat anteriorment, una major activitat de LOXL2 incrementa la rigidesa de la MEC, procés que afavoreix la progressió tumoral^{242,243}.

En càncer de mama s'ha relacionat una alta expressió de LOXL2 amb un increment de la fibrosi i un fenotip més maligne²⁸³. L'increment de la rigidesa de la MEC per part de LOXL2 promou l'activació dels CAFs²⁹⁹. Aquests, a la vegada, secreten LOXL2 afavorint el procés metastàtic²⁹⁰. La inhibició química o amb anticossos de LOXL2 resulta en una reducció dels CAFs, de la desmoplasia (MEC desorganitzada i amb excés de fibroblasts) i de la metàstasi^{283,287}.

Paral·lelament, s'ha descrit que LOXL2 pot regular altres factors de la MEC com TIMP1 (*Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1*) o l'enzim MMP9 (*Matrix MetalloProteinase-9*), els quals afavoreixen el procés metastàtic. Concretament, TIMP1 és un mediador *downstream* de LOXL2 en la invasió cel·lular en càncer de mama²⁸³. Així doncs, LOXL2 activa altres enzims involucrats en el remodelatge de la MEC col·laborant en la formació de metàstasis.

Finalment, s'ha proposat que LOXL2 secretat pel tumor primari s'acumula en el nínxol metastàtic de l'òrgan distant afavorint la metàstasi³¹¹. Concretament, s'ha descrit en càncer de mama³¹² i en carcinoma hepatocel·lular²⁹³ que LOXL2 promou el reclutament de cèl·lules derivades de la medul·la òssia^{293,312} i coopera amb E47 modulant l'expressió, a nivell transcripcional, de citocines i fibronectina²⁹⁶. A més, també s'ha descrit que aquest procés és estimulat per hipòxia²⁵².

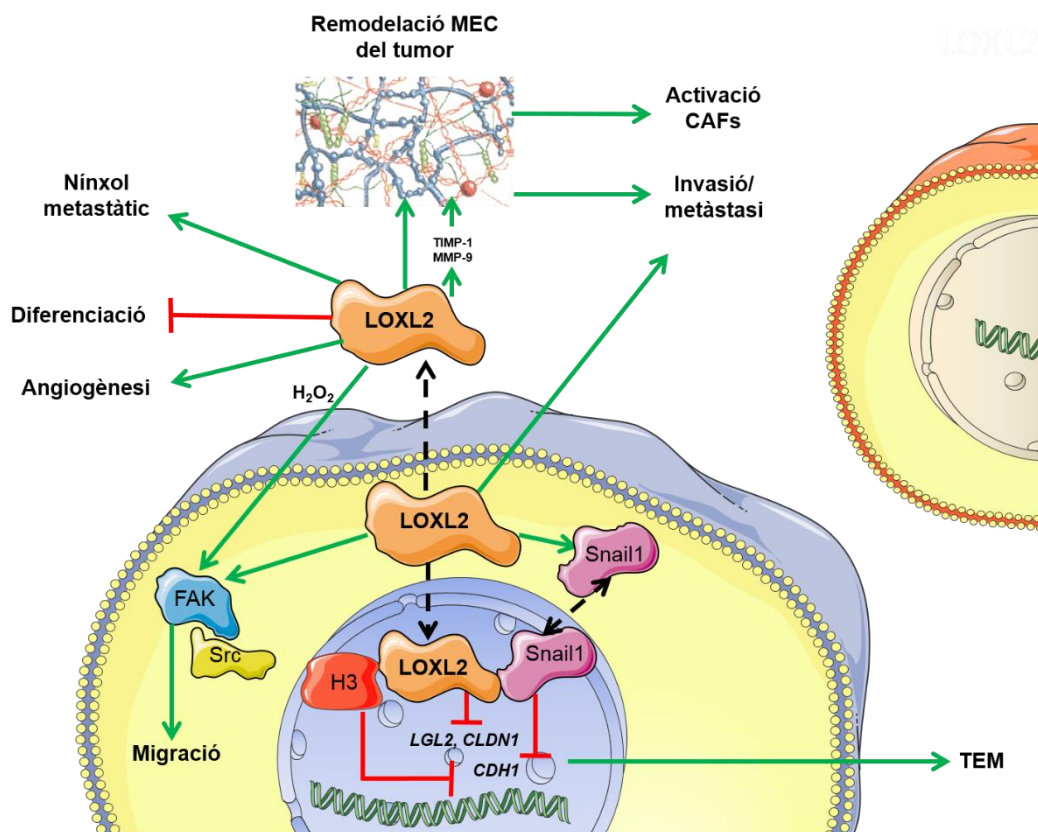


Figura I11: Esquema de les possibles funcions descrites, intra- i extracel·lulars, de LOXL2 en els processos tumorals. LOXL2 intracel·lular pot promoure la TEM (mitjançant la repressió de *CDH1* i gens involucrats amb adhesió i polaritat cel·lular), la migració (per activació de la via FAK/Src) i la invasió. LOXL2 extracel·lular remodela la MEC del tumor activant els CAFs i afavorint la invasió i metastasi. A més, LOXL2 extracel·lular pot participar en l'angiogènesi, la formació del nínxol metastàtic i la inhibició de la diferenciació. Les fletxes en verd representen activació, en vermell inhibició i les discontinües moviment.

5.4. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LOXL2

A continuació s'enumeren diversos factors que han estat descrits com a reguladors de *LOXL2*, molts d'ells implicats en càncer.

TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor β* 1) és una citocina clau en la regulació de la MEC que s'ha corroborat en varis estudis com a regulador de l'expressió dels membres de la família LOX. Més concretament, incrementa l'expressió de *LOXL2* així com la seva activitat catalítica³¹³⁻³¹⁶. A més, la regulació de *LOXL2* mitjançant TGF β 1 s'ha relacionat amb la progressió tumoral²³³ en carcinoma hepatocel·lular²⁷⁹ o en càncer de mama, on *LOXL2* estimulat per TGF- β 1 regula la senyalització de p38³¹⁷.

Paral·lelament, s'ha descrit miR-29 com repressor de *LOXL2* en diferents models on *LOXL2* es troba sobreexpressat i promou la progressió tumoral. En càncer de pròstata³¹⁸ i diversos carcinomes (escamós de pulmó^{319,320}, hepatocel·lular²⁹³ i renal³²⁰) miR-29 es troba reprimat i s'ha vist que l'expressió d'aquest ARNm inhibeix *LOXL2*. En càncer de pròstata, a més, miR-26 i miR-218 també regulen negativament *LOXL2*³¹⁸. Cal destacar que un mecanisme descrit de regulació de *LOXL2* mitjançant TGF- β 1 és a través del miR-29. Així, TGF- β 1 podria incrementar l'expressió de *LOXL2* inhibint miR-29³²¹.

Un altre factor descrit és ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*), el qual regula positivament la TEM i s'uneix al promotor de *LOXL2* activant la seva transcripció²⁸⁸. Aquest mecanisme incrementa la invasió cel·lular i la metastasi en càncer de pulmó²⁸⁸.

En carcinoma hepatocel·lular, el factor de transcripció FoxM1b (*forkhead box M1b*), sobreexpressat en varis càncers i correlacionat amb un pitjor pronòstic, s'uneix al promotor de *LOXL2* induint la seva expressió³²².

La hipòxia és un altre mecanisme que activa l'expressió de *LOXL2*, mitjançant el factor de transcripció HIF1a, el qual s'ha comentat prèviament que s'uneix al promotor de *LOXL2*³⁰⁴.

Pel que fa al *splicing* alternatiu, s'han identificat dues variants en carcinoma escamós d'esòfag. La primera isoforma és sense l'exó 13 i dona lloc a una proteïna truncada, *LOXL2 Δ 13*, sense activitat catalítica que igualment promou la invasió cel·lular³²³. L'altra variant presenta la pèrdua de 24 aminoàcids en l'exó 5 i s'anomena *LOXL2 Δ 72*. La proteïna truncada no té activitat enzimàtica i no és secretada. Aquesta isoforma també es troba sobreexpressada en carcinoma escamós d'esòfag i incrementa la migració i invasió cel·lular a uns nivells superior que *LOXL2 wt*. Els autors proposen un mecanisme d'acció diferent d'aquesta isoforma^{324,325}.

Pel que fa als mecanismes epigenètics, s'ha analitzat l'estat de metilació de les illes CpG i del promotor de *LOXL2* en càncer de còlon i d'esòfag. En l'estudi identifiquen una possible illa CpG metilada. El tractament amb l'agent desmetilant 5-aza-dC recupera l'expressió de *LOXL2* en línies cel·lulars que no l'expressen, plantejant a la metilació com a nou mecanisme regulador. A més, també identifiquen possibles factors de transcripció que s'uneixen al promotor de *LOXL2* com són AP1 (*Jun Proto-oncogene*), NF κ B i WT1 (*Wilms Tumor 1*)²⁵⁹. En relació, SMYD3 (*SET and MYND*

Domain-containing Protein 3) s'uneix al promotor de *LOXL2* incrementant la seva transcripció en carcinoma escamós d'esòfag³²⁶.

5.5. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER TAL D'INHIBIR LOXL2

Les múltiples evidències de la funció de LOXL2 en la progressió tumoral la converteix en una bona candidata a diana terapèutica. No obstant, hi ha certa controvèrsia pel que fa al seu mecanisme: s'han descrit funcions extra- i intracel·lulars, així com dependents o independents de la seva activitat catalítica. Degut a la complexitat de la proteïna, aquests aspectes són clau a l'hora de desenvolupar inhibidors eficients contra LOXL2.

Inicialment, la major evidència de la funció de LOXL2 era el seu paper catalític extracel·lular. Això ha portat a utilitzar inhibidors de l'activitat catalítica de LOXL2 o bé anticossos contra la forma secretada.

L'inhibidor inespecífic contra LOXL2 D-PEN (*D-penicillamine*) és un quelant de coure que inhibeix l'activitat oxidasa²³⁸. S'ha utilitzat prèviament en altres malalties com la cirrosis biliar o la malaltia de Wilson, amb varietat d'efectes adversos³²⁷. Un altre inhibidor utilitzat és el β -APN, el qual actua per competició de substrat. Tot i que inicialment es va utilitzar dirigit contra l'activitat catalítica de LOX, després s'ha vist que l'inhibidor també és funcional en LOXL2^{265,287}.

Posteriorment, s'han emprat diferents anticossos anti-LOXL2 que actuen com a inhibidors al·lostèrics, obtenint diferents resultats degut a la variació dels models i de les regions contra les que està produït cada anticòs. Un dels anticossos monoclonals contra LOXL2 testats és AB0023, dirigit contra el quart SRCR i que inhibeix l'activitat oxidasa²⁶⁵. AB0023 ha obtingut bons resultats en models murins de càncer de mama reduint el microambient tumoral (reducció dels CAFs, de la desmoplasia i de la producció de factors de creixement), el creixement tumoral i la formació de metastasis, a uns nivells majors que β -APN²⁸⁷. En concordança, un anticòs dirigit contra la regió C-terminal va reduir la capacitat invasiva i metastàtica de cèl·lules de carcinoma gàstric²⁸⁹. En canvi, en un altre estudi en càncer de mama amb un altre anticòs van obtenir una reducció de la capacitat metastàtica sense observar canvis en el creixement tumoral²⁸³.

La variant humanitzada de AB0023, AB0024 o també anomenada Simtuzumab, va entrar en fase I d'un assaig clínic (NCT01323933) per tal de valorar la tolerabilitat, seguretat, farmacocinètica i farmacodinàmica de l'anticòs en pacients amb tumors

sòlids en fase avançada. No hi ha disponibilitat dels resultats obtinguts³²⁸. També ha estat avaluat en pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica³²⁹ (NCT01362231), arribant a fase clínica II però sense obtenir l'eficàcia esperada (NCT01769196)³³⁰.

El desenvolupament d'inhibidors *small-molecule* presenten l'avantatge d'una major selectivitat. A més, poden estar dirigits contra LOXL2 intracel·lular, a diferència dels anticossos o quelants de coure. En aquest sentit s'estan realitzant *high throughput screenings* per tal de trobar noves molècules que inhibeixen l'activitat catalítica, les funcions intracel·lulars i que siguin selectius sobre LOXL2 en comparació als altres membres de la família LOX³³¹. Recentment, s'ha publicat el primer inhibidor *small-molecule* específic per a LOXL2 anomenat PSX-S2A, el qual inhibeix l'activitat enzimàtica. S'ha testat en càncer de mama en un model *in vivo* on s'ha observat una disminució del creixement tumoral, de l'angiogènesi, de l'activació dels CAFs però no de la metàstasi. En canvi, el silenciament genètic de *LOXL2* sí provoca una reducció dramàtica en la formació de metàstasi, suggerint que LOXL2 promou la metàstasi per mecanismes independents a l'activitat catalítica³³². Un altre inhibidor *small-molecule* específic per a LOXL2 també s'ha desenvolupat recentment tot i que fins al moment no s'ha testat en models cel·lulars ni *in vivo*²⁶¹.

Altres alternatives no explorades són: inhibir les funcions promogudes per LOXL2 (per exemple la via FAK/Src) o afectar els mecanismes que regulen l'expressió de LOXL2 (per exemple inhibint HIF1 α)²³³.

Finalment, degut a la complexitat i les múltiples funcions de LOXL2, són necessaris més estudis per tal d'entendre millor els mecanismes pels quals LOXL2 modula la progressió tumoral. A més, per tal d'obtenir una màxima inhibició terapèutica probablement serà necessària la combinació de múltiples estratègies²³³.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. HIPÒTESI

El principal risc del RMS és la baixa supervivència en pacients amb malaltia metastàtica²⁵. A més, els reguladors de la metastasi en aquest tumor estan poc estudiats, sobretot en el subtipus més agressiu ARMS²¹. Recentment, diferents membres de la família de proteïnes LOX han aparegut com importants reguladors de la progressió tumoral, i en particular, LOXL2 s'ha vist implicat en invasió cel·lular, metastasi i en la transformació oncogènica de diferents tumors sòlids²⁸².

Així, la hipòtesi que es proposa és que LOXL2 exerceix un paper oncogènic important durant la progressió del RMS.

2. OBJECTIUS

Els objectius que es plantegen en aquesta tesi doctoral són:

- I. Caracteritzar l'expressió i localització de LOXL2 en cèl·lules de RMS.
- II. Determinar per enginyeria genètica inversa el paper de LOXL2 en el fenotip neoplàstic de cèl·lules d'ARMS, *in vitro* i *in vivo*.
- III. Desxifrar els mecanismes moleculars associats a l'expressió de LOXL2 en cèl·lules d'ARMS:
 - A. Estudiar el paper de l'activitat catalítica lisil oxidasa de LOXL2.
 - B. Caracteritzar funcionalment LOXL2 intracel·lular.
 - C. Elucidar proteïnes que interaccionin amb LOXL2.
- IV. Explorar el rol de LOXL2 en un altre sarcoma pediàtric, el SE.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS 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, d'Esplugues de Llobregat. A més, periòdicament es realitzava test de micoplasma mitjançant tinció de l'ADN amb l'agent Hoechst 33342 per descartar contaminacions amb aquestes bactèries. Altrament, per tal de mantenir condicions d'esterilitat i evitar contaminacions es va treballar sota cabines de flux laminar.

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 que presenta. ^aGreehey Children's Cancer Research Institute, San Antonio, USA ; ^bLeibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemanya; ^cDepartment of Oncology and Children's Research Center, University Children's Hospital, Zurich, Suïssa; ^dNational Cancer Institute, Bethesda, MD, USA; ^eSt. Anna Kinderkrebsforschung, Viena, Àustria, ^fInstitut Curie, Paris, França; ^gDepartament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya.

Línia	Tipus tumor	Adquisició	Origen cel·lular	Cariotip
RH4	ARMS	Dr. Peter Houghton ^a	Pacient de 7 anys ³³³	t(2;13)(q35;q14): PAX3-FOXO1 ³³³
RH41	ARMS	Comprada a DSMZ ^b	Xenograft de metastasi pulmonar del mateix pacient del que deriva RH4 ³³³	t(2;13)(q35;q14): PAX3-FOXO1 ³³³
RH28	ARMS	Dr. Beat Schäfer ^c	Nòdul axil·lar metastàtic d'un pacient de 17 anys ³³³	t(2;13)(q35;q14): PAX3-FOXO1. Propera a la tetraploïdia ³³³
RMS13	ARMS	Dr. Beat Schäfer ^c	Es creu que prové d'un pacient de 16 anys ³³³	t(2;13)(q35;q14): PAX3-FOXO1 ³³³
RH30	ARMS	Dr. Peter Houghton ^a	Metàstasi medul·la òssia d'un pacient de 16 anys, es creu que del mateix que RMS13 ³³³	t(2;13)(q35;q14): PAX3-FOXO1. Propera a la triploïdia ³³³
CW9019	ARMS	Dr. Frederic Barr ^d	Desconegut ³³³	t(1;13)(p36;q14): PAX7-FOXO1 ³³³
RH36	ERMS	Dr. Beat Schäfer ^c	Relapse paratesticular d'un pacient de 15 anys ³³³	Desconegut ³³³
RD	ERMS	Comprada a DSMZ ^b	Massa pèlvica d'un pacient de 7 anys ³³³	Hiperploïdia ³³³

RUCH2	ERMS	Dr. Beat Schäfer ^c	Massa vaginal d'un pacient de 15 mesos ³³³	Reordenacions cromosòmiques múltiples ³³³
A204	Rabdoide	Comprada a DSMZ ^b	Pacient de 13 mesos ³³⁴	Població mixta: diploïdia i tetraploïdia ³³⁴
A673	SE	Dr. Heinrich Kovar ^e	Pacient de 15 anys d'edat ³³⁴	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1. Múltiples reordenacions cromosòmiques ³³⁵
EW7	SE	Dr. Olivier Delattre ^f	Efusió pleural d'un pacient de 20 anys ³³⁶	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³³⁶
RH1	SE	Dr. Peter Houghton ^a	Xenograft d'un pacient erròniament diagnosticat com RMS ³³⁷	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³³⁷
SK-N-MC	SE	Comprada a DSMZ ^b	Massa supraorbital d'un pacient de 14 anys ³³⁸	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³³⁶
STA-ET-1	SE	Dr. Heinrich Kovar ^e	Húmer d'un pacient de 13 anys ³³⁶	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³³⁶
TC252	SE	Dr. Heinrich Kovar ^e	Metàstasi pulmonar d'un pacient de 20 anys prèviament tractat ^{339,340}	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³⁵⁵
TC71	SE	Comprada a DSMZ ^b	Húmer d'un pacient de 22 anys ³³⁶	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³³⁶
RD-ES	SE	Comprada a DSMZ ^b	Húmer d'un pacient de 19 anys ³³⁶	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ^{336,338,341}
SK-ES1	SE	Comprada a DSMZ ^b	Os d'un pacient de 18 anys ³⁴¹	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ^{338,341}
A4573	SE	Dr. Santiago Ramón y Cajal ^g	Efusió pleural d'un pacient de 17 anys ³³⁶	t(11;22)(q24;q12): EWS-FLI1 ³⁴²
CADO-ES	SE	Dr. Heinrich Kovar ^e	Efusió pleural d'un pacient de 19 anys ³³⁶	t(21;22): EWS-ERG ³⁴¹

1.1. CONDICIONS DE CULTIU

Pel manteniment cel·lular, les cèl·lules es van cultivar en medi complet: RPMI 1640 (RPMI) complementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (FBS: *Fetal Bovine Serum*), prèviament inactivat a 56 °C, i un 1 % de penicil·lina/estreptomicina (P/S). Aquestes es van mantenir en un incubador HERAcCell humidificat a 37 °C amb una atmosfera al 5 % de CO₂. Per dividir les cèl·lules es va utilitzar 0,05 % tripsina-EDTA per desenganxar-les de la placa i posteriorment la tripsina es va bloquejar amb medi complet. Les

cèl·lules es van centrifugar durant 5 min a 1200 rpm i es va sembrar la dilució adequada en una nova placa segons l'experiment.

En 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. DESCONGELACIÓ I CRIOPRESERVACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS

Per a la descongelació de les cèl·lules els criotubs es van mantenir en agitació en el bany a 37 °C. Un cop descongelades es van centrifugar amb 10 mL de medi complet durant 5 min a 1200 rpm. Finalment es van sembrar en una placa de 100 mm (p100).

Per a la criopreservació, es van utilitzar passis curts de les cèl·lules recollint-les de forma normal amb tripsina i bloquejant l'activitat d'aquesta amb medi complet. 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, durant almenys 24 h, i posteriorment a -196 °C en nitrogen líquid.

1.3. 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.

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.

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 (*Phosphate Buffered Saline*) seguit d'una centrifugació de 10 min més a 1800 rpm. Aquests pèl·lets es van congelar a -80 °C o utilitzar frescos en la tècnica desitjada.

1.5. OBTENCIÓ I CONCENTRACIÓ DE MEDIS CONDICIONATS

L'anàlisi de proteïnes extracel·lulars es va realitzar mitjançant l'obtenció de medis condicionats (CM), que corresponen al medi de cultiu cel·lular crescut en una placa p100 sense FBS durant 48-72h. Aquests medis es van centrifugar durant 10 min a 1800 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars. Posteriorment, el sobrenedant es va recollir i concentrar 1:20 mitjançant varies centrifugacions en Centricons 10K, els quals consten d'una membrana que reté les molècules de més de 10 kDa.

2. TRACTAMENTS CEL·LULARS

Per tots els tractaments, si no s'indica el contrari, les cèl·lules van ser sembrades en medi complet.

2.1. TUNICAMICINA

La tunicamicina és un inhibidor de la N-glicosilació. 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 emprant diferents concentracions. El rang de concentracions en RH4 va ser de 20 a 100 ng/mL i en RH36 de 50 a 500 ng/mL. A les 48 h de tractament es van recollir els pèl·lets cel·lulars. Altrament, en el cas de voler obtenir CM de cèl·lules tractades amb tunicamicina l'experiment es va realitzar en absència de FBS.

Tanmateix, la tunicamicina a concentracions més elevades indueix mort cel·lular. En RH4 es va utilitzar a 250 ng/mL durant 48 h amb aquesta finalitat.

2.2. LOXL2 RECOMBINANT HUMÀ

LOXL2 recombinant humà (hLOXL2r) comercial prové de cèl·lules HEK293 transfectades amb LOXL2 juntament un *tag* de poli-His al C-terminal. Per tal de testar la seva estabilitat es va afegir a les cèl·lules RH28 o al medi complet durant diferents temps (de 6 a 168 h) a una concentració de 2 µg/mL, la mateixa que es va emprar en la resta d'experiments.

2.3. Z-VAD-FMK

Z-VAD-FMK (Z-VAD) és un inhibidor pan-caspases irreversible que bloqueja l'apoptosi³⁴³. 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 a 10 µM o 50 µM durant 48 h.

2.4. CALPEPTINA

La calpeptina és un inhibidor de calpaïnes, família de cisteïna proteases dependents de calci³⁴⁴. 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 a 25 µM o 50 µM durant 48 h.

3. AMPLIFICACIÓ DE PLASMIDIS

Els vectors utilitzats en aquesta tesi es van amplificar a partir de plasmidis comercials o cedits per un altre grup de recerca. El procés va consistir en transformar els bacteris, amplificar-los en cultiu i posteriorment aïllar l'ADN plasmídic.

3.1. TRANSFORMACIÓ BACTERIANA

Es van barrejar 50 µL dels bacteris competents de la soca DH5α d'*Escherichia 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. Després de 2 min de mantenir la reacció en gel es van afegir 250 µL de medi SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) i es van deixar créixer els bacteris 1 h a 37 °C en agitació. A continuació, es van sembrar 100 µL del cultiu en plaques de LB (Luria Broth)-agar amb l'antibiòtic corresponent: ampicil·lina 50-100 µg/mL o kanamicina 25 µg/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 d'incrementar la quantitat de material genètic plasmídic es van créixer les colònies transformades en cultiu líquid. De cada placa es va picar entre 1-5 colònies en un tub de polipropilè 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 NucleoSpin Plasmid*, 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, així com la qualitat de l'ADN (ràtio d'absorbància 260/280 nm entre 1,8-2).

En els casos on la concentració i puresa de la *miniprep* eren adients, es van inocular 0,5 mL del cultiu inicial restant en 200 mL de medi LB amb l'antibiòtic corresponent i es van 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*. Amb aquesta finalitat es va utilitzar el *kit EndoFree Plasmid Maxi* seguint les instruccions del fabricant. L'ADN purificat es va tornar a quantificar i mesurar la seva puresa amb el Nanodrop. A la vegada, 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 un enzim de tall únic per tal de linealitzar el vector i comprovar que tenia la mida que corresponia, així com també 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-Acetate-EDTA (TAE), emprant bromur d'etidi com a agent intercalant de l'ADN. Es va carregar tot el producte de la digestió afegint tampó de càrrega per densificar les mostres i visualitzar-les en el gel. Com a referència es va posar un marcador de pes molecular d'acord amb la mida del vector i de l'insert.

4. MUTAGÈNESI DIRIGIDA

Es van generar dos mutants de LOXL2 mitjançant la substitució dels residus potencialment glicosilables de LOXL2 per glutamines. Concretament, es va obtenir un mutant doble (Asn288 i Asn455) i un triple (Asn288, Asn455 i Asn644). Es va partir del vector pCDNA3-LOXL2wt/FLAG cedit per la Dra. S. Peiró del VHIO (Vall d'Hebron Institut d'Oncologia). Els *primers* emprats en cada residu es detallen en la Taula M2.

La mutagènesi es va realitzar amb el *kit* comercial *QuikChange Site-Directed Mutagenesis*. 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 d'Asn per Gln i per descartar altres possibles mutacions sorgides durant el procés. La seqüenciació es va realitzar en la Unitat de Genòmica del CCiTUB

(Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona). Els *primers* emprats en la seqüenciació, dos d'ells àmpliament utilitzats i un dissenyat en el nostre Grup, es detallen en la Taula M3.

Taula M2: *Primers* utilitzats durant la mutagènesi dirigida de *LOXL2*. S'indica el residu modificat i els *primers forward* i *reverse*.

Residu mutat	Seqüència dels <i>primers</i>
Asn288	5' CACTGGACCCCATGAAGCAGGTACCTGCGAGAATGG 3'
	5' CCATTCTCGCAGGTGACCTGCTTCATGGGGTCCAGTG 3'
Asn455	5' AGGTGCTGGTGGAGAGACAGGGGTCCTTGTGTGGGG 3'
	5' CCCCACACAAGGGACCCCTGTCTCTCCACCAGCACCT 3'
Asn644	5' CTATGACCTGCTGAACCTCCAGGGCACCAAGGTGGCAGAGG 3'
	5' CCTCTGCCACCTTGGTGCCCTGGAGGTTTCAGCAGGTCATAG 3'

Taula M3: *Primers* utilitzats en la seqüenciació de *LOXL2*. S'indica la seqüència *forward* i la *reverse*.

Primer	Seqüència
SP6	5' TTTAGGTGACACTATAG 3'
	5' CTATAGTGTCACCTAAA 3'
LOXL2	5' GCACCGGCACAGAGGCCACAT 3'
	5' ATGTGGGCCTCTGTGCCGGTGC 3'
T7	5' TACGACTCACTATAGGG 3'
	5' CCCTATAGTGAGTCGTA 3'

5. TRANSFECCIONS ESTABLES I SELECCIÓ DE CLONS

Per transfectar les línies cel·lulars de manera estable es van sembrar entre 300.000 i 1.000.000 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. Passats 20 min es van afegir els liposomes resultants a les cèl·lules amb medi sense antibiòtic. En les línies cel·lulars que eren més sensibles a la toxicitat de l'agent de transfecció es va realitzar un canvi de medi a les 6 h. 24 h després de la transfecció, les cèl·lules es van tripsinitzar i cultivar en una placa més gran. En el cas de realitzar selecció clonal, es van sembrar en una placa de 150 mm (p150). Alternativament, per tal d'obtenir un *pool* de cèl·lules transfectades es van cultivar en una p100. En els dos casos, al cap de 24 h es va afegir el medi de selecció amb l'antibiòtic corresponent per a cada vector.

La selecció clonal va tenir lloc durant 15-30 dies aproximadament, depenent de la línia cel·lular. El medi de selecció es va canviar dos cops per setmana. Després d'aquest període, es van aïllar clons individuals amb l'ajuda d'un escuradents estèril quan van arribar a una mida determinada i després es van amplificar. L'eficiència de la transfecció es va comprovar analitzant els nivells de la proteïna d'interès per *western blot* en els *pools* i en els clons aïllats, utilitzant com a referència la línia cel·lular transfectada amb el vector control.

La concentració d'antibiòtic necessària per a cada línia cel·lular es va determinar prèviament mitjançant una corba de resistència. 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 de *LOXL2*, la concentració de puromicina utilitzada va ser 0,6 µg/mL per RH4 i 0,25 µg/mL per CW9019. Pel model de reintroducció de *LOXL2* en la línia RH28, la concentració de neomicina emprada va ser 1200 µg/mL. Els plasmidis utilitzats es detallen en la taula M4.

Taula M4: Resum dels plasmidis utilitzats en les transfeccions estables. S'indica la seva aplicació, l'adquisició i la seva resistència. ^aVHIO (Vall d'Hebron Institut d'Oncologia), Barcelona, Espanya.

Vector	Aplicació	Adquisició	Resistència
pGFP-V-RS-shRNA SCR	Control	Origene #TR30013	Puromicina
pGFP-V-RS-shLOXL2 C	Silenciament de <i>LOXL2</i>	Origene #TG311699	Puromicina
pCDNA3-FLAG	Control	OriGene #PS100001	Neomicina
pCDNA3-LOXL2 wt/FLAG	Expressió de <i>LOXL2 wt</i>	Dra. S. Peiró ^a	Neomicina
pCDNA3-LOXL2 oxmut/FLAG	Expressió de <i>LOXL2 mutant d'oxidació (H626/628Q i Y689F)</i>	Dra. S. Peiró ^a	Neomicina
pCDNA3-LOXL2 secmut2x/FLAG	Expressió de <i>LOXL2 mutant doble de secreció (N455/644Q)</i>	Obtingut per mutagènesi dirigida	Neomicina
pCDNA3-LOXL2 secmut3x/FLAG	Expressió de <i>LOXL2 mutant triple de secreció (N288/455/644Q)</i>	Obtingut per mutagènesi dirigida	Neomicina
pRP-CMV/mCherry	Control	Vector Builder, disseny sota comanda #VB170923-1032hvf	Neomicina
pRP-CMV- LOXL2/mCherry	Expressió de <i>LOXL2 wt</i>	Vector Builder, disseny sota comanda #VB170628-1003vvp	Neomicina

6. FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING

La tècnica FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) permet separar les cèl·lules en funció del seu marcatge fluorescent. Després de transfectar de forma estable les cèl·lules amb els vectors *pRP-CMV/mCherry* i *pRP-CMV-LOXL2/mCherry*, aquestes es van duu al FACS amb l'objectiu de seleccionar les transfectades que contenen el *tag* fluorescent mCherry. Després de la transfecció les cèl·lules es van amplificar i se'ls hi va donar dos passis, mantenint-les en medi de selecció. Abans de ser analitzades en el *cell sorter* es van tripsinitzar i dur a 8 milions de cèl·lules per mL, resuspenent-les en

el *buffer* 2 mM EDTA - 0,5 % BSA en PBS. El FACS es va realitzar en el servei de Citometria del CCiTUB del Campus de Bellvitge i el làser utilitzat va ser el de 561 nm.

7. TRANSFECCIONS TRANSITÒRIES

Per transfectar les línies cel·lulars de manera transitòria, 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 es va afegir l'agent liposomal (en aquest cas DharmaFECT) i el ARNsi. La confluència cel·lular en la transfecció es va establir en funció de la línia cel·lular i el temps de transfecció, de forma que en el moment de finalitzar l'experiment les cèl·lules no haguessin arribat a la confluència. Per cada condició es van barrejar 200 µL de RPMI, 4 µL de DharmaFECT i la quantitat de 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. En les línies cel·lulars que eren més sensibles a la toxicitat de l'agent de transfecció es va realitzar un canvi de medi a les 6 h. Al cap de 6-72 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. Posteriorment, es van demanar a la casa comercial Sigma-Aldrich. Alternativament, en un cas concret es va comprar un *pool* amb diferents ARNsi. Com a control de les transfeccions transitòries es van transfectar les cèl·lules amb un ARNsi inespecífic (siNT: *non-targeting*). Les seqüències dels ARNsi utilitzats es recullen en la taula M5.

Taula M5: ARNsi utilitzats en les transfeccions transitòries amb les seves corresponents seqüències.

ARNsi	Seqüència
siNT	5' UAAGGCUAUGAGAGAUAC 3'
siLOXL2	5' AGUAAAGAAGCCUGCGUGGUC 3'
siVIM#1	5' ACGCCAUCAACACCGAGUUCA 3'
siVIM#2	5' ACCUUGAACGCAAAGUGGAAUCUUU 3'
siVIMpool	Seqüència desconeguda. ON-TARGETplus Human VIM siRNA SMARTpool #L-003551-00-0005.

8. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA (RT-qPCR)

8.1. EXTRACCIÓ D'ARNm I ARNs NO CODIFICANTS

L'ARN 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 el *kit NucleoSpin RNA* seguint les instruccions del fabricant. Els extractes obtinguts es van quantificar amb el Nanodrop, verificant al mateix temps la puresa de l'extracció. Finalment es van mantenir a -80 °C o es va seguir amb el procés.

8.2. OBTENCIÓ D'ADN COMPLEMENTARI PER RETROTRANSCRIPCIÓ

A partir de l'ARNm obtingut es va sintetitzar l'ADNc mitjançant una reacció de transcripció inversa. Es va utilitzar el sistema d'encebadors oligo-dT, que s'aparellen amb les cues poliA dels ARNs i permeten obtenir una representació 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 (ditiotretol) i 1 µL de la mescla 10 mM de nucleòtids. 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. L'ADNc es va conservar a 4 °C per a períodes curts de temps o a -20 °C per a períodes llargs.

8.3. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

Es va preparar la reacció amb 10 ng d'ADNc, 5 µL del tampó PCR MasterMix i 1 µL de les sondes TaqMan comercials 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. 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 aplicant el model matemàtic $\Delta\Delta CT$ de M.W. Pfaffl³⁴⁵.

Les sondes Taqman de la casa Life Technologies utilitzades van ser: *LOX* (Hs00942483_m1), *LOXL1* (Hs00935937_m1), *LOXL2* (Hs00158757_m1), *LOXL3* (Hs00261671_m1), *LOXL4* (Hs00260059_m1) i *β-actina* (Hs01060665_g1).

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

9.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

Els extractes proteics es van obtenir per lisi cel·lular partint de pèl·lets cel·lulars congelats a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o acabats d'obtenir. Es va utilitzar 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. Els pèl·lets es van resuspendre en un volum d'entre 50-150 μL del *buffer* amb els inhibidors 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 a 13.000 rpm durant 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es va recollir el sobrenedant que contenia l'extracte proteic total. Aquestes mostres es van conservar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o es va seguir amb el procés.

9.2. 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 1 μL de mostra proteica (prèviament diluïda 1:25 en aigua) amb 200 μL de la barreja dels reactius A:B (relació 1:50) del *kit*. Es va incubar 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i posteriorment es va llegir l'absorbància a 562 nm. La concentració es va determinar emprant una recta patró feta amb dilucions seriades d'albumina.

9.3. *WESTERN BLOT*

Per l'electroforesi de proteïnes es van mesclar 50 μg de proteïna amb 10 μL tampó de càrrega per *western blot* (Laemmli 2X suplementat amb un 5 % de 2-mercaptoetanol). Si el volum de proteïna era major de 10 μL es va barrejar amb el mateix volum de tampó de càrrega, per tal que com a mínim la proporció fos 1:1. Després les mostres es van desnaturalitzar durant 10 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es van carregar en gels d'acrilamida-SDS (dodecilsulfat sòdic). Com a referència es va carregar també un marcador de pes molecular pretenyit. El percentatge d'acrilamida en el gel separador era d'entre el 6-15 %, 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 80-120 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. Es va

realitzar per transferència humida i en fred durant 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 %) durant 1 h.

Els anticossos primaris es van utilitzar a les concentracions indicades a la Taula M6. La dilució es va preparar en solució de bloqueig i les membranes es van incubar durant tota la nit a 4 °C en agitació. Al dia següent, es van fer tres rentats de 5 min amb PBS-T i es van incubar durant 1 h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari, preparat també en solució de bloqueig. Els anticossos secundaris emprats van ser: anti-ratolí (Invitrogen #81-6520) i anti-conill (Invitrogen #G-21234), ambdós produïts en cabra i conjugats amb peroxidasa. Seguidament, es van fer tres rentats de 10 min amb PBS-T.

Pel procés de revelat, es van utilitzar els sistemes de quimioluminiscència Pierce ECL i ECL Prime, utilitzant aquest últim quan es requeria major sensibilitat. Es va incubar 1 mL de cada reactiu del *kit* al damunt de la membrana durant 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 d'AGFA, utilitzant els líquids de revelat i fixació recomanats pel fabricant. Alternativament, enlloc de revelar amb pel·lícules fotosensibles es va utilitzar l'aparell ChemiDoc Touch de Bio-Rad, el qual permet detectar la quimioluminiscència en temps real.

Finalment, les imatges obtingudes amb la màquina reveladora es van escanejar o bé les que van ser obtingudes amb l'aparell ChemiDoc Touch es van processar amb el software específic de Bio-Rad. Paral·lelament, en algunes imatges es va quantificar la intensitat de les bandes mitjançant el software Image J dels National Institutes of Health (NIH), concretament en els *western blots* on les diferències eren difícils d'apreciar.

Taula M6: Resum dels anticossos utilitzats per la tècnica *western blot*. S'indica la casa comercial, la referència, les dilucions del primari i del secundari i el pes molecular de les bandes detectades i mostrades a les figures. Mo: ratolí; Rb: conill.

Anticòs Primari	Casa comercial	Referència	Dilució primari	Dilució secundari	Pes molecular (kDa)
α -tubulina	Abcam	Ab28439	1/10.000	Mo 1/10.000	54
β -actina	Abcam	Ab49900	1/10.000	Mo 1/10.000	42
AKT	Cell Signalling	9272	1/2.000	Rb 1/5.000	60
p-AKT (Ser 473)	Cell Signalling	4060	1/2.000	Rb 1/2.000	60
Calpaïna-2	Abcam	Ab39165	1/1.000	Rb 1/2.000	80, 78, 50
Calreticulina	Abcam	Ab2907	1/1.000	Rb 1/2.000	46
mCherry	ThermoFisher	PA5-34974	1/1.000	Rb 1/2.000	-
Cleaved-caspase-3 (Asp175)	Cell Signalling	9661	1/1.000	Rb 1/2.000	17, 19
ERK1/2	Cell Signalling	4695	1/2.000	Rb 1/5.000	42-44
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling	4376	1/1.000	Rb 1/2.000	42-44
FLAG	Sigma-Aldrich	F1804	1/1.000	Mo 1/2.000	-
Histona-3	Abcam	Ab24834	1/10.000	Mo 1/10.000	18
Lamina A/C	Leica Biosystems	NCL-LAM-A/C	1/200	Mo 1/2.000	65, 70
LOXL2	Novus Biologicals	NBP1-32954	1/1.000	Rb 1/2.000	100, 60
PARP1	Cell Signaling	9542	1/1.000	Rb 1/2.000	89, 116
RBM10	ThermoFisher	PA5-40330	1/1.000	Rb 1/2.000	120
Vimentina	Sigma-Aldrich	V6630	1/10.000	Mo 1/10.000	54

10. SUBFRACCIONAMENT CEL·LULAR

Aquesta tècnica es va realitzar per tal d'extreure la proteïna de tres fraccions subcel·lulars: citoplasma, nucli i cromatina. El procediment alterna l'ús de diferents *buffers* per solubilitzar les fraccions d'interès seguit de diferents centrifugacions; tot es va duu a terme a 4 °C.

Es va partir de pèl·lets cel·lulars congelats a -80 °C o frescos. Aquests es van resuspendre en uns 100-150 μ L de *buffer* CE (10 mM HEPES, 60 mM KCl, 1 mM

EDTA, 0,075 % NP-40, 1 mM DTT i els inhibidors de proteases i fosfatases; pH final 7,6), es van vortejar durant 10 seg i es van incubar en gel 5 min, seguit d'una centrifugació a 1500 rpm durant 5 min més. El sobrenedant va ser l'extracte citoplasmàtic, el qual es va passar a un nou eppendorf. Els pèl·lets restants constaven del nucli cel·lular. Aquests es van rentar amb 100 µL de *buffer* CE sense detergent per eliminar al màxim la fracció citoplasmàtica contaminant: es van resuspendre suament, centrifugar a 1500 rpm 5 min i el sobrenedant es va descartar. Tot seguit, els pèl·lets es van resuspendre en 50-75 µL de *buffer* NE (la meitat del volum de *buffer* CE emprat inicialment). El *buffer* NE conté 10 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT i els inhibidors de proteases i fosfatases (pH final 8). Per tal de solubilitzar els nuclis aquests es van vortejar durant 10 min. Passat aquest temps, els dos extractes, citoplasmàtic i nuclear, es van centrifugar a 13.000 rpm durant 10 min i es va recollir el sobrenedant en un nou *eppendorf*, sent aquestes les fraccions del citoplasma i nucli definitives.

Finalment, els pèl·lets restants de l'extracte nuclear es van resuspendre en *buffer* CHR (2 % SDS, 50 mM Tris pH 7,5, 10 % glicerol, 1 mM DTT i els inhibidors de proteases i fosfatases), concretament, utilitzant el mateix volum que el *buffer* NE, 50-75 µL. En aquest punt la mostra es va tornar molt més densa, degut a la cromatina. Les mostres es van sonicar mitjançant 4 polsos de 7 seg a una amplitud del 100 %, amb un pas intermedi de 7 seg de refredament en gel entre cada pols. Es va realitzar l'última centrifuga a 13.000 rpm 10 min i el sobrenedant va ser la fracció cromatínica. Per acabar, totes les fraccions es van guardar a -80 °C o utilitzar immediatament per *western blot*.

Convé subratllar que com a control de l'enriquiment de cada fracció es van analitzar diferents proteïnes per *western blot*: α-tubulina per al citoplasma; calreticulina, marcador de reticle endoplasmàtic, per descartar contaminació d'òrgans citoplasmàtics al nucli; lamina A/C per al nucli i cromatina; histona-3 per a la fracció cromatínica.

11. ANÀLISI HISTOLÒGIC

La inclusió de les mostres en parafina i el posterior tall d'aquests blocs es van realitzar pel servei d'Histologia del CMRB (Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona), 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. Posteriorment, es van analitzar per immunohistoquímica o

immunofluorescència (es detallen en els següents apartats) o es va realitzar la tinció H&E, la qual permet la distinció entre nucli i citoplasma.

La tinció H&E va consistir en, primerament, incubar els talls tota la nit a 60 °C per facilitar l'eliminació de la parafina en la posterior bateria de desparafinat i hidratació (xilol, etanol 100 %, etanol 96 %, etanol 70 % i aigua destil·lada). Després es van tenyir els talls durant 5 min amb hematoxilina de Harris i 6 min més amb eosina, amb un rentat intermedi de 5 min amb aigua corrent. Finalment, els talls es van rentar amb aigua corrent uns 5 min més i es seguir la bateria de deshidratació (aigua destil·lada, etanol 70 %, etanol 96 %, etanol 100 % i xilol). Els talls es van muntar amb medi de muntatge DePeX i es van deixar secar abans d'analitzar-los al microscopi òptic. Les imatges es van analitzar amb el software Image J dels NIH i/o amb el programa Adobe Photoshop.

12. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Els talls de parafina es van incubar durant tota la nit a 60 °C per facilitar l'eliminació de la parafina en la posterior bateria de desparafinat. El desemmascarament dels epítops es va fer bullint les mostres durant 7 min a 240 °C en tampó citrat a pH 6 (1,81 mM àcid cítric i 0,82 mM citrat sòdic) en un olla a pressió. Un cop temperades es va realitzar dos rentats amb PBS de 5 min i es va inhibir l'activitat de la peroxidasa endògena amb una solució al 3 % de peròxid d'hidrogen en metanol durant 15 minuts. Passat aquest temps les mostres es van rentar amb aigua de l'aixeta i PBS, 5 min cadascun. Tot seguit, el bloqueig es va realitzar amb la solució *Antibody Diluent* i les mostres es van incubar tota la nit a 4 °C en una cambra humida amb l'anticòs primari desitjat diluït amb la solució *Antibody Diluent*. Els anticossos utilitzats s'especificaran posteriorment (veure Materials i mètodes secció 14. Anticossos testats en la detecció de LOXL2).

Al dia següent, després de temperar les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari biotinilit i la estreptavidina (conjugada a HRP, *Horseradish Peroxidase*), seguint les instruccions del *kit* del fabricant Biogenex. A continuació, els talls es van revelar amb diaminobencina (DAB), que en contacte amb la HRP genera un marcatge colorimètric. La reacció es va parar amb aigua destil·lada. Finalment, els talls es van tenyir amb H&E, deshidratar, muntar amb DePeX i deixar secar abans d'analitzar-los al microscopi òptic. Les imatges es van analitzar amb el software Image J dels NIH i/o amb el programa Adobe Photoshop.

13. IMMUNOFLUORESCÈNCIA

13.1. TEIXITS

La immunofluorescència es va realitzar en talls de tumors xenografts o bé en un *tissue microarray* (TMA: *microarray* amb mostres de teixit tumoral). El TMA va ser facilitat per l'Hospital Universitario Virgen el Rocío (Sevilla) i contenia mostres de 34 pacients amb RMS.

La immunofluorescència en ambdós casos es va realitzar en el servei d'Histologia del CMRB seguint el protocol habitual d'immunodetecció en teixits. L'anticòs primari utilitzat va ser LOXL2, #NBP1-32954 de la casa Novus Biological, a una dilució 1/50 i el secundari anti-*rabbit* a 1/200. A més, els talls es van teyir amb Sudan Black al 1 % per tal de reduir l'autofluorescència dels teixits. Finalment, les preparacions es van fotografiar al microscopi de fluorescència o al microscopi confocal. Les imatges es van analitzar amb el software Image J dels NIH i/o amb el programa Adobe Photoshop. En el TMA, la classificació de les mostres positives o negatives per a LOXL2 es va realitzar en comparació a mostres de xenografts positives o negatives per a LOXL2 analitzades en paral·lel.

13.2. LÍNIES CEL·LULARS

Aquesta tècnica es va utilitzar per estudiar la localització de proteïnes dins la cèl·lula. Es van sembrar entre 100.000 i 300.000 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 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 FBS 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 (Taula M7) 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 (Taula M7) 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 teyir els nuclis amb Hoechst 33342 durant 20 min, seguit de tres rentats més 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 NIH i/o amb el programa Adobe Photoshop.

Altrament, cal fer esment que en la detecció de mCherry, proteïna fluorescent, solament era necessari fixar les cèl·lules, tenyir-les amb Hoechst 33342 i muntar les preparacions.

Taula M7: Resum dels anticossos utilitzats per la tècnica d'immunofluorescència en línies cel·lulars. S'indica l'anticòs primari i el secundari, amb la casa comercial, la referència i les dilucions corresponents. Tots els anticossos secundaris són de la casa comercial Invitrogen. Mo: ratolí; Rb: conill.

Anticòs Primari	Casa comercial	Dilució primari	Anticòs secundari	Dilució secundari
LOXL2	Novus Biologicals # NBP1-32954	1/100	AlexaFluor 488 anti-Rb #A21441	1/300
Vimentina	Sigma-Aldrich # V6630	1/10.000	AlexaFluor 488 anti-Mo #A21202	1/10.000
Vinculina	Sigma-Aldrich # V9131	1/10.000	AlexaFluor 594 anti-Mo #A11032	1/10.000

14. ANTICOSSOS TESTATS EN LA DETECCIÓ DE LOXL2

En el transcurs d'aquesta tesi s'han testat varis anticossos comercials anti-LOXL2 a part de l'anticòs de Novus Biologicals #NBP1-32954, el qual hem considerat el més fiable. Quan no es detalla la casa comercial es fa referència a aquest anticòs. A continuació, s'especifiquen els anticossos provats en les tècniques de *western blot*, immunohistoquímica i immunofluorescència i les diferents dificultats tècniques presentades.

En els *westerns blots* amb l'anticòs de LOXL2 es va observar una banda de lleugerament menor pes molecular que la de 100 kDa. Aquesta banda en inhibir LOXL2 no desapareixia, confirmant així la seva inespecificitat (Figura M1). A més, l'aparició de la banda era dependent de cada *batch* d'anticòs.

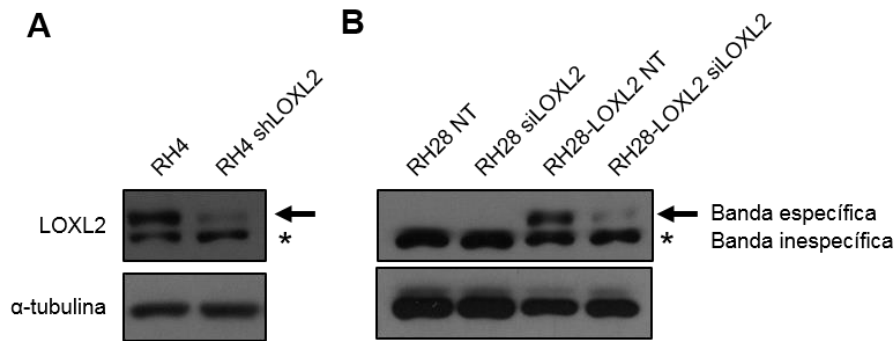


Figura M1: A) *Western blot* representatiu on es pot observar que en silenciar *LOXL2* (amb un ARNsh) la banda inferior inespecífica no disminueix (carril 2). **B)** *Western blot* representatiu on es pot observar cèl·lules que no expressen *LOXL2* amb la banda inferior inespecífica (carril 1 i 2) i, paral·lelament, en les mateixes cèl·lules quan se'ls hi reintrodueix *LOXL2* s'observa les dues bandes, específica i inespecífica (carril 3 i 4). A més, en silenciar *LOXL2* amb un ARNsi (siLOXL2) la banda específica disminueix (carril 4).

Per immunohistoquímica no es va aconseguir un marcatge específic amb cap dels tres anticossos testats, ja que talls de xenografts provinents de línies cel·lulars que no expressen *LOXL2* presentaven la mateixa intensitat de marcatge que les que expressen *LOXL2* (Figura M2). Es van provar diferents condicions i concentracions dels anticossos primaris i secundaris sense aconseguir millorar els resultats.

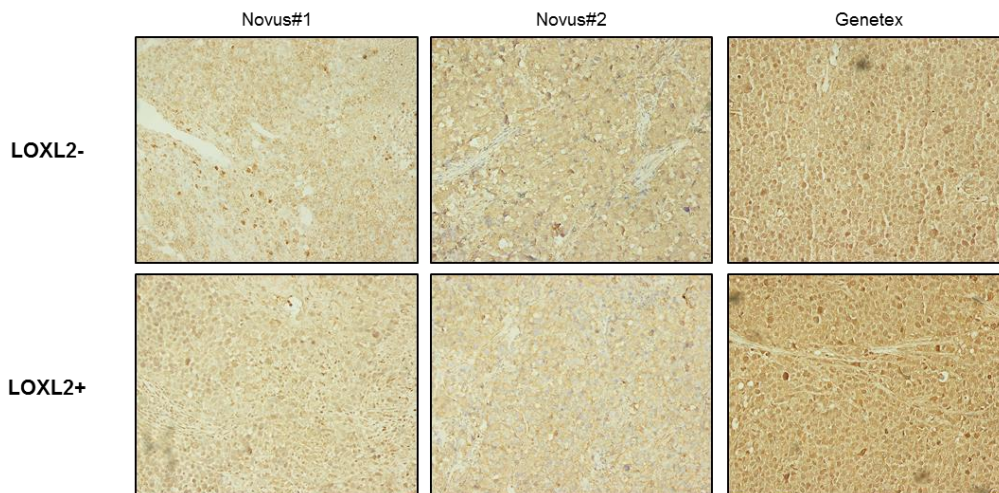


Figura M2: Imatges representatives de les immunohistoquímiques realitzades en mostres de xenografts de línies cel·lulars que expressen *LOXL2* (*LOXL2+*) i que no l'expressen (*LOXL2-*). Els anticossos provats van ser: Novus#1 correspon a #NBP1-32954; Novus#2 a un altre anticòs de la casa comercial Novus Biologicals específic per immunohistoquímica (#NBP2-45669) i *LOXL2* de la casa Genetex (#GTX105085).

Continuant amb la immunofluorescència, el principal problema va ser amb la línia RH28, la qual no expressa LOXL2. En una altra línia que no expressa LOXL2, A673, la qual donava un marcatge inespecífic per immunohistoquímica, per immunofluorescència no es va observar marcatge. La única que va presentar aquest problema va ser RH28. Concretament, en reintroduir LOXL2 es va observar el mateix marcatge que les cèl·lules no transfectades (Figura M3 Esquerra). L'anticòs de Genetex #GTX105085 també va donar lloc al mateix marcatge, així com en utilitzar anti-FLAG (Figura M3 Dreta), ja que les cèl·lules reintroduïdes expressaven LOXL2/FLAG. Es van testar diferents concentracions de l'anticòs primari i secundari, així com també es van provar els anticossos secundaris Alexa488 i Alexa594.

Per tant, en aquesta línia cel·lular es van descartar els resultats obtinguts per immunofluorescència i només es van donar com a vàlids els realitzats en teixits, on l'anticòs no presentava aquest problema.

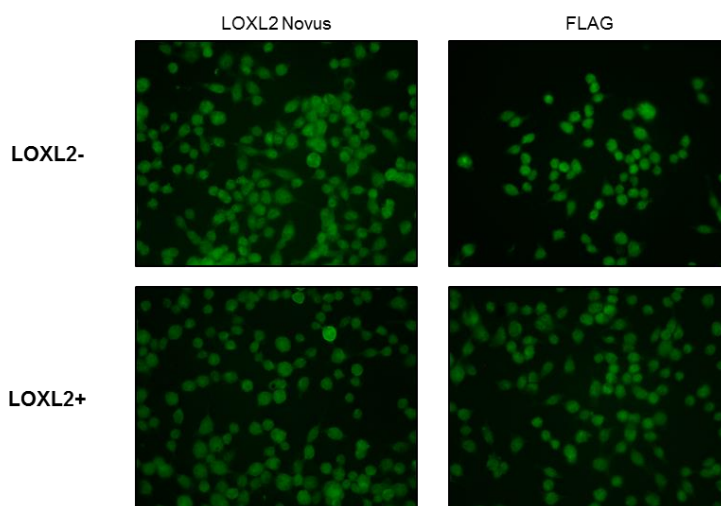


Figura M3: Imatges representatives de les immunofluorescències realitzades en la línia cel·lular RH28. **Esquerra)** Anticòs LOXL2. **Dreta)** Anticòs FLAG Sigma-Aldrich #F4049. Les mostres LOXL2- corresponent a cèl·lules RH28 i les LOXL2+ a cèl·lules RH28-LOXL2/FLAG. Els anticossos secundaris utilitzats en les imatges mostrades van ser AlexaFluor 488 anti-Rabbit #A21441 en LOXL2 i AlexaFluor 488 anti-Mouse #A21202 de la casa Invitrogen.

15. ANÀLISI D'INTERACCIÓ PROTEICA PER IMMUNOPRECIPITACIÓ

Aquesta tècnica va ser emprada per detectar proteïnes que interaccionaven directament o formant part del mateix complex proteic.

15.1. 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 obtinguts de plaques p150. Els extractes proteics es van obtenir per lisi cel·lular utilitzant entre 150-300 µL del tampó d'IP (150 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10 % glicerol; 0,8 % Igepal; Tris-HCl 50 mM pH 7,8) amb els inhibidors de proteases i fosfatases prèviament esmentats. Després de resuspendre els pèl·lets, es van incubar les mostres 30 min en gel i es van centrifugar 30 min a 13.000 rpm a 4 °C. El sobrenedant es va recollir en un tub nou i es va conservar a -80 °C o es va seguir amb el procés.

15.2. IMMUNOPRECIPITACIÓ

Després de quantificar els extractes proteics es van diluir 500 µg de proteïna en 500 µL de tampó d'IP. Aquí es va afegir l'anticòs corresponent a la dilució prèviament establerta (vimentina: Sigma-Aldrich #V6630 dilució 1:250, calpaïna-2 ThermoFisher #PA5-34974 dilució 1:100, mCherry Abcam #Ab39165 dilució 1:100) o una immunoglobulina control inespecífica (*mouse* Santa Cruz #sc-2025 o *rabbit* Santa Cruz #sc-2027). Aquesta reacció es va incubar 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 mesclar les boles magnètiques amb els complexos proteïna-anticòs incubats durant la nit i es van deixar 2 h en agitació a 4 °C. Transcorregut aquest temps, es van realitzar cinc 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 per *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*.

16. ANÀLISI D'INTERACCIÓ PROTEICA PER *PULL DOWN*

En un assaig per *pull down* la proteïna d'interès es troba marcada amb un *tag* i es captura per afinitat amb un lligand específic immobilitzat. Això permet detectar proteïnes que interaccionen directament o formen part del mateix complex. Concretament es va realitzar un *pull down* amb boles d'agarosa conjugades a anti-

FLAG. D'aquesta manera, es va purificar la proteïna d'interès LOXL2-FLAG amb les proteïnes que podia estar interaccionant.

16.1. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

L'obtenció dels extractes proteics es va realitzar a partir de pèl·lets cel·lulars prèviament congelats o recent recol·lectats obtinguts de plaques p150. Tots els passos es van realitzar en fred. En primer lloc, els pèl·lets cel·lulars es van resuspendre en 500 µL de *buffer* de lisi (250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Tritó, 0,05 % NP-40, 1 mM DTT, 10 % glicerol, 50 mM Tris pH 7,8 i els inhibidors de proteases i fosfatases). Els extractes es van incubar 4-6 h en agitació a 4 °C amb benzonasa (75 unitats d'activitat/mostra), una nucleasa que degrada ADN i ARN, per tal de degradar els àcids nucleics que fàcilment s'uneixen al suport. Tot seguit es van centrifugar a 13.000 rpm durant 10 min i el sobrenedant recollit va ser l'extracte proteic. Finalment, es van quantificar les mostres i es va continuar amb el procés.

16.2. PULL DOWN

En primer lloc es van equilibrar les boles d'agarosa amb *buffer* BC100 (100 mM KCl, 0,05 mM EDTA, 0,05 % NP-40, 10 % glicerol, 1 mM DTT i 10 mM Tris pH 7,8.) Per a cada mostra es van utilitzar 40 µL de boles d'agarosa, vortejades prèviament. Aquestes es van equilibrar amb tres rentats de 500 µL de BC100 centrifugant a 8.000 rpm 2 min i aspirant el sobrenedant amb cura. Després de l'últim rentat, les boles d'agarosa es van incubar amb l'extracte proteic obtingut prèviament durant tota la nit a 4 °C en agitació, ajustant la concentració de proteïna en funció de la mostra limitant.

Al dia següent es van centrifugar les boles a 8.000 rpm 2 min i els sobrenedants, que contenien les proteïnes no unides a les boles, es van descartar. A continuació es van fer tres rentats amb el *buffer* BC100 i tres rentats amb el *buffer* BC500 (500 mM NaCl, 0,05 mM EDTA, 0,05 % NP-40, 10 % glicerol, 1 mM DTT i 10 mM Tris pH 7,8.) Finalment es va procedir amb el pas d'elució. Per tal de recuperar les proteïnes unides a les boles es van incubar amb el pèptid FLAG, el qual per unió competitiva desplaça les proteïnes unides a l'anti-FLAG. Concretament es van fer dues elucions amb 40 µL de pèptid FLAG a 200 µg/mL. Un cop obtinguts els dos eluats es va afegir 10 µL de tampó de càrrega 5X i es van analitzar les mostres per *western blot*.

17. ESPECTROMETRIA DE MASSES

En l'espectrometria de masses (MS) es converteix els components d'una mostra en ions gasosos, els quals es mouen en presència d'un camp magnètic i es separen en funció de la seva relació massa/càrrega. La tècnica permet identificar múltiples pèptids d'una mostra proteica i, per tant, identificar les diferents proteïnes. En aquesta tesi la tècnica es va combinar amb una purificació per afinitat com és el *pull down* (AP-MS: *Affinity Purification coupled with Mass Spectrometry*), per tal d'identificar les proteïnes que interaccionen amb la nostra proteïna d'interès.

Inicialment es va realitzar el *pull down* seguint el mateix procediment explicat anteriorment a excepció del nombre de cèl·lules inicials, el qual es va incrementar a tres p150. A més, en tot el procés es va tenir especial cura per evitar la contaminació amb queratines, fàcilment detectables per MS.

Les mostres del *pull down* es van separar en un gel d'acrilamida en condicions desnaturalitzants a 120 V durant uns 90 min. Posteriorment, el gel es va incubar en solució de fixació (45 % metanol i 1 % d'àcid acètic) durant 1 h en agitació, es va rentar amb aigua destil·lada i es va incubar tota la nit en solució de tinció (17 % d'amoni sulfat, 0,1 % de Coomassie col·loïdal, 34 % de metanol i 0,5 % d'àcid acètic). Al dia següent es va rentar amb aigua destil·lada i es va duu a analitzar a la plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona.

En analitzar els resultats obtinguts es van comparar amb la base de dades pública CRAPome³⁴⁶, la qual recull molts estudis AP-MS. En la majoria d'estudis no s'identifiquen totes les proteïnes inespecífiques en el control i per això és de gran importància comparar els resultats amb aquesta base de dades. D'aquesta forma es van identificar proteïnes que en el nostre control negatiu no van aparèixer però de forma molt recurrent s'uneixen en els controls negatius.

18. TEST D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LOXL2

L'activitat enzimàtica de LOXL2 es va mesurar mitjançant un test d'oxidació amb un substrat específic de LOXL2, la benzilamina. LOXL2 en oxidar la benzilamina allibera peròxid d'hidrogen. La HRP converteix el reactiu amplex red en presència del peròxid d'hidrogen alliberat en un producte colorimètric i fluorescent, la resorufina, que pot ser quantificat amb un espectrofotòmetre. En absència d'activitat lisil oxidasa el peròxid d'hidrogen no es produeix i per tant tampoc hi ha activitat peroxidasa.

En primer lloc es va realitzar un *pull down* amb les boles anti-FLAG tal i com s'ha descrit anteriorment fins al pas previ a l'elució. Després de l'últim rentat es va afegir 50 µL de *buffer* de reacció (40 mM d'amplex red, 2 U/mL HRP, 4 mM de benzilamina i 50 mM de fosfat de sodi pH 7.4) i es va incubar durant 4 h a 37 °C. Passat aquest temps, es van centrifugar les boles (3.000 rpm 2 min) i passar els sobrenedants a una placa de 96 pous. L'absorbància es va mesurar a l'espectrofotòmetre a 560 nm. A més, les boles es van resuspendre en *buffer* de càrrega 5X per tal de comprovar posteriorment per *western blot* el *pull down*. Com a control negatiu es va utilitzar el *buffer* de reacció i com a control positiu 20 mM de peròxid d'hidrogen.

19. ASSAIG CLONOGÈNIC

Aquest assaig s'utilitza per valorar la capacitat de les cèl·lules de créixer a baixa densitat, concretament, l'habilitat d'una cèl·lula per formar una colònia. Per això, es van sembrar 500 o 5.000 cèl·lules per pou, en funció de la línia cel·lular, en plaques de 6 pous amb medi complet. Quan les colònies van ser visibles a ull nu (aproximadament uns 14 o 21 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 solució de cristall violeta (2 % cristall violeta i 20 % metanol en PBS). L'excés de cristall violeta es va rentar amb aigua. Finalment es van escanejar les plaques i es van comptar les colònies de forma manual amb el software Image J. 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.

20. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Per tal de determinar la capacitat proliferativa cel·lular es van sembrar entre 1.000 i 8.000 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 complet. El WST-1 (*water-soluble tetrazolium 1*) és una sal de tetrazole que mitjançant reductases mitocondrials es redueix a formazà, 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.

21. 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 quimioatracient que estimula les cèl·lules a migrar. En aquest cas es van separar els dos compartiments utilitzant *transwells*, que consten d'una membrana de policarbonat amb porus de 8 µm de diàmetre, i es va utilitzar FBS com a quimioatracient.

Primer es van tripsinitzar les cèl·lules i es va realitzar un rentat amb RPMI per eliminar el FBS. Es van sembrar a la part superior del *transwell*, en placa de 24 pous, 150.000 cèl·lules en 150 µL de medi RPMI sense FBS. D'altra banda, també en una placa de 24 pous, es van posar 500 µL de medi RPMI amb un 10 % de FBS per pou, utilitzat com a quimioatracient. Seguidament, es van passar els *transwells* a la placa de 24 pous amb RPMI i 10 % de FBS de manera que la part inferior dels mateixos estigués en contacte amb el medi amb FBS.

Passades de 6 a 48 h en el incubador, en funció de la línia cel·lular, es van recollir els *transwells* 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. Tot seguit es van rentar els *transwells* amb PBS, es van tallar les membranes i es van muntar en un portaobjectes. Les imatges es van obtenir en un microscopi òptic, fotografiant 5 camps de cada membrana. El comptatge manual de les cèl·lules es va realitzar 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.

22. ASSAIG D'INVASIÓ CEL·LULAR

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 -20 °C al·lucotat 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 1:10 o 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 en l'assaig de migració. Els temps d'incubació dels experiments d'invasió van ser entre 24-72 h.

23. ASSAIG *IN VIVO* AMB RATOLINS ATÍMICS

23.1. MANTENIMENT DELS ANIMALS

Pels experiments *in vivo* es van comprar femelles atímiques d'entre 6-7 setmanes d'edat a la casa comercial Envigo. Els animals es van mantenir estabulats en *racks*, amb gàbies apilades ventilades de manera individual. Els ratolins disposaven d'aigua i menjar *ad libitum*, consistent en pinso Teklad irradiat de la casa comercial Envigo i aigua filtrada i clorada. Els animals es trobaven en una sala SPF (*Specific Patogen 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 h 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. O. Martínez Tirado autoritzat pel Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya.

23.2. ASSAIG DE METÀSTASI ESPONTÀNIA ORTOTÒPIC

L'assaig de metàstasi espontània va consistir en injectar dos milions de cèl·lules tumorals RH28 resuspeses en 100 µL de PBS estèril en el múscul gastrocnemi dret de ratolins atímics. Cada 48 h els ratolins es van examinar, pesar i l'extremitat que contenia el tumor es va mesurar amb un 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 quan els animals despertaven de l'anestèsia conservaven total mobilitat i podien fer vida normal.

Passats 90 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 van analitzar els animals buscant metàstasis macroscòpiques als pulmons. Posteriorment, es va completar amb un anàlisi microscòpic dels talls dels pulmons. 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 H&E com s'ha descrit anteriorment.

24. 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 l'experiment *in vivo*, es va utilitzar el test exacte de Fisher. L'anàlisi estadística de la correlació de l'expressió d'un marcador amb la supervivència dels pacients (Corba Kaplan-Meier) es va fer mitjançant el test Mantel-Cox.

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.

25. CREACIÓ DE FIGURES

Les figures en les quals no s'indica la font bibliogràfica s'han creat a partir de la base d'imatges científiques i mèdiques SMART (*Servier Medical Art*), sota llicència de *Creative Commons Attribution 3.0* (<https://smart.servier.com/>).

26. EQUIPAMENT, MATERIAL FUNGIBLE I REACTIUS

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

26.1. 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

ChemiDoc Touch imaging System 6517, BioRad

Escàner perfection 4490 Photo, Epson

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

MATERIALS I MÈTODES

Microscopi invertit universal IX70, Olympus

Minicentrífuga Galaxy MiniStar, VWR

ND-100 Espectrofotòmetre, Nanodrop

Racks per a ratolins, Allentown

Sonicador UP50H Ultrasonic Processor, Hielscher

Suport magnètic PureProteome, Millipore

Termobloc analògic, VWR

Termociclador LightCycler 480 II, Roche

26.2. 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

Kova glasstic 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 150 mm, Cultek #430599

Plaques cultius cel·lulars 100 mm, Cultek #430167

Plaques cultius cel·lulars 6 pous, Jet Biofil #TCP011006

Plaques cultius cel·lulars 12 pous, Jet Biofil #TCP011012

Plaques cultius cel·lulars 24 pous, Jet Biofil #TCP011024

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

26.3. 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

Amoni sulfat, Sigma-Aldrich #A5132

Ampicil·lina, Sigma-Aldrich #A9518-5G

Amplex Red, Thermo Fisher #A12222

Antibody diluent Dako #52022

Anti-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich #A2220

Bacto-agar, Difco #0140-01

Benzonase, Sigma-Aldrich #E1014

Benzylamina, Sigma-Aldrich #185701

Blau de Coomassie, Sigma-Aldrich #B-0149

Blau tripa, Sigma-Aldrich #T8154

Boles magnètiques de proteïna G Pureproteome, Merck #LSKMAGN01

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

Calpeptin, Sigma-Aldrich #C8999

Cell Proliferation Reagent WST-1, Sigma-Aldrich #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

Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio Rad #161-0406

MATERIALS I MÈTODES

Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Sigma-Aldrich #11836170001

Cristall violeta, Sigma-Aldrich #C3886-25G

DharmaFECT 1 Transfection Reagent, Fisher Scientific #W9945D

Diaminobencidina, Dako #K3468

Dihidrogen fosfat de sodi, Merck #1.063.461.000

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

FLAG peptide, Sigma #F3290

FBS South American, Life Technologies #10270-106

Geneticina G-418 Sulfat, Life Technologies #11811-031

Glicerol 99 %, Sigma-Aldrich #G7757-500 mL

Hematoxilina de Harris, Sigma-Aldrich #HHS80-2'5L

Hoechst 33342, Life Technologies #H3570

Horseradish Peroxidase, Sigma-Aldrich #P8125

Igepal CA-630, Sigma-Aldrich #I3021

Immunoglobulina Mouse Santa Cruz #sc-2025

Immunoglobulina Rabbit Santa Cruz #sc-2027

Isopropanol, Merck #1.09634.2500

Kanamicina, Sigma-Aldrich #K4000

Kit EndoFree Plasmid Maxi, Qiagen #12362

Kit MultiLink + HRP label, Biogenex #QP900-9LE

Kit NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel #740588.250

Kit NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel #740955.520

Kit NucleoSpin miRNA, Macherey-Nagel #22740971.50

Kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis, Agilent Technologies #200519

LB Broth, Acumedia #7290A

Lipofectamina 2000, Life Technologies #11668030

Lysyl oxidase homolog 2 Protein (His Tag), Sino Biological #11664-H08H

Matrigel Basement Membrane Matrix, Cultek #354234

Medi muntatge DPX, Merck #100579

Medi muntatge ProLong Gold, Life Technologies #P-36931

Medi SOC, Life Technologies #46-0700

Membrana nitrocel·lulosa 0,2 µm, BioRad #162-0112

Metanol, Merck #106009

Metanol, Panreac #141091.1214

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

Ponceau S solution, Applichem A2935

Puromicina, Sigma-Aldrich #P8833

RPMI 1640 amb Glutamax, Life Technologies #61870044

SDS 10 %, Applichem #A0676

Subcloning Efficiency DH5α 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

MATERIALS I MÈTODES

TaqMan 2X Universal PCR MasterMix, Life Technologies #4324018

Tripsina-EDTA, Life Technologies #25300-054

Tris(hidroximetil)aminometà, Merck #1.08382.5000

Tritó X-100, Merck #1.086.031.000

Tunicamycin, Sigma-Aldrich #T7765

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

Xilol, Merck #1.08681.2500

Z-VAD-FMK, APEX BIO #A1902

2-mercaptoetanol, Merck #8.057.400.250

RESULTATS

1. ÀMPLIA EXPRESSIÓ DE LOXL2 EN LÍNIES CEL·LULARS DE RMS

En primer lloc, es va analitzar l'expressió de LOXL2 en línies cel·lulars de RMS mitjançant RT-qPCR i *western blot* en comparació a cèl·lules de SE. Així, es va observar uns nivells de *LOXL2* més elevats en totes les línies de RMS en comparació a les línies de SE (Figura R1A). La ràtio d'expressió es va calcular respecte la línia de RMS CW9019, a la qual se li va assignar el valor de 1. A més, aquestes dades coincidien amb els resultats obtinguts per *western blot* (Figura R1B), on LOXL2 tenia una alta expressió en la majoria de línies de RMS. En canvi, les línies de SE presentaven nivells gairebé indetectables de LOXL2, igual que la línia de RMS RH28.

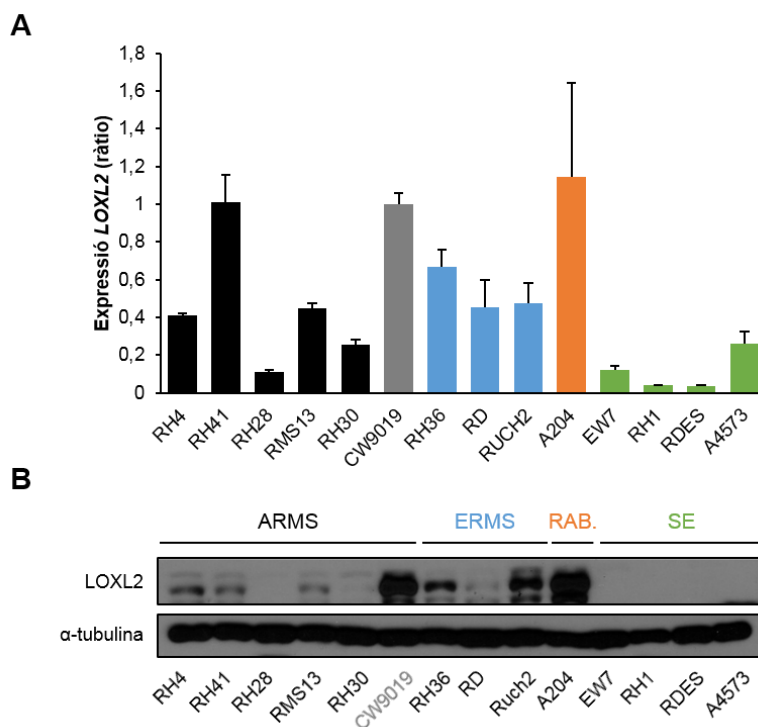


Figura R1: A) Expressió relativa (respecte a CW9019, en gris) del nivells de *LOXL2* mitjançant RT-qPCR en línies cel·lulars de RMS i SE. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en un panell de línies de RMS i SE. S'indiquen els grups de línies cel·lulars en colors: ARMS en negre, ERMS en blau, rabdoide (Rab.) en taronja i SE en verd. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

2. CORRELACIÓ ENTRE L'EXPRESSIÓ DE LOXL2 I LA SUPERVIVÈNCIA EN PACIENTS DE RMS

Per tal de comprovar l'expressió de LOXL2 en pacients de RMS, es va realitzar immunofluorescència en els tumors d'un cohort de 34 individus recollits en un TMA. Primerament, cal destacar com a limitació la baixa disponibilitat de mostres de pacients degut a la baixa incidència del RMS. A més, l'altra limitació va ser que d'aquest 34 pacients només es va disposar de dades clíniques completes de 25 d'ells, en la resta, es desconeixia el seu temps de supervivència. Concretament, en el total de pacients es va observar un 64,7 % que no expressaven LOXL2 i un 35,3 % que sí l'expressaven. Aquest percentatge d'expressió es mantenia constant en eliminar els pacients sense dades de supervivència (Taula R1).

Taula R1: Percentatge de pacients amb RMS que tenen una expressió negativa i positiva de LOXL2. S'especifica el percentatge en el total de pacients i en els pacients que es disposa de la informació pel que fa la seva supervivència. També s'indica el número de pacients en cada subgrup.

Expressió LOXL2	% pacients totals (n=34)	% pacients (informació supervivència; n=25)
Negativa	64,7 (22/34)	68,0 (17/25)
Positiva	35,3 (12/34)	32,0 (8/25)

Posteriorment, es va intentar establir una correlació entra la supervivència global dels pacients amb RMS i l'expressió de LOXL2. Tot i que el percentatge de pacients que expressaven LOXL2 va ser baix, en representar les dades mitjançant una corba de supervivència Kaplan-Meier es va observar que els pacients amb LOXL2 tendien a tenir una menor supervivència. No obstant, aquestes diferències no van ser estadísticament significatives (Figura R2). Cal fer esment que en l'Annex I es recullen les dades clíniques dels pacients del TMA.

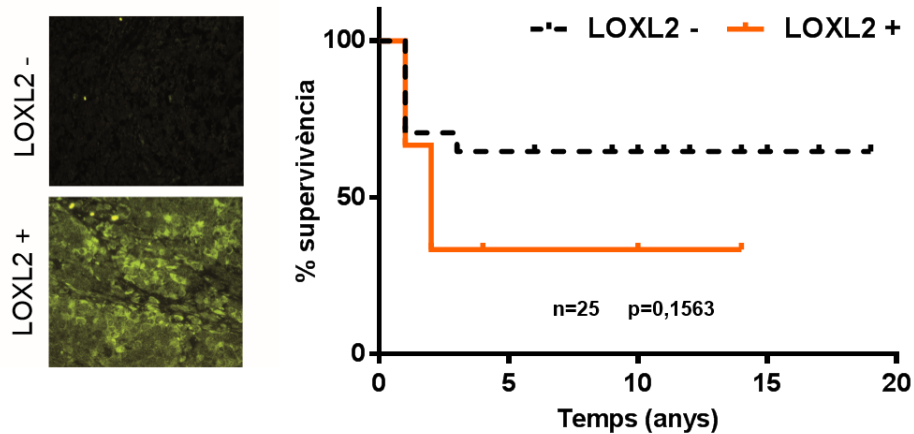


Figura R2: Correlació clínica entre la supervivència dels pacients de RMS i l'expressió de LOXL2 (corba de supervivència Kaplan-Meier). Càlcul estadístic Mantel-Cox. N=25. Es mostren també imatges representatives de les immunofluorescències que s'han considerat negatives o positives. Augment 40X.

3. LOXL2 LOCALITZA AL CITOPLASMA I NUCLI EN LÍNIES CEL·LULARS DE RMS I ES SECRETA AL MEDI EXTRACEL·LULAR ON ES PROCESSA PROTEOLÍTICAMENT

Després de detectar una alta expressió de LOXL2 en les línies de RMS, com que aquesta presenta múltiples funcions depenent de la seva localització, es va determinar la seva localització subcel·lular. Primerament, mitjançant microscòpia de fluorescència es va observar en les línies RH4 i CW9019 que LOXL2 localitzava al nucli i al citoplasma cel·lular, presentant una major intensitat en el nucli (Figura R3A). Tanmateix, es va dur a terme subfraccionament cel·lular en les mateixes línies cel·lulars corroborant la localització citoplasmàtica i nuclear de LOXL2, i a més, es va observar que LOXL2 també es trobava present en la fracció cromatínica (Figura R3B).

RESULTATS

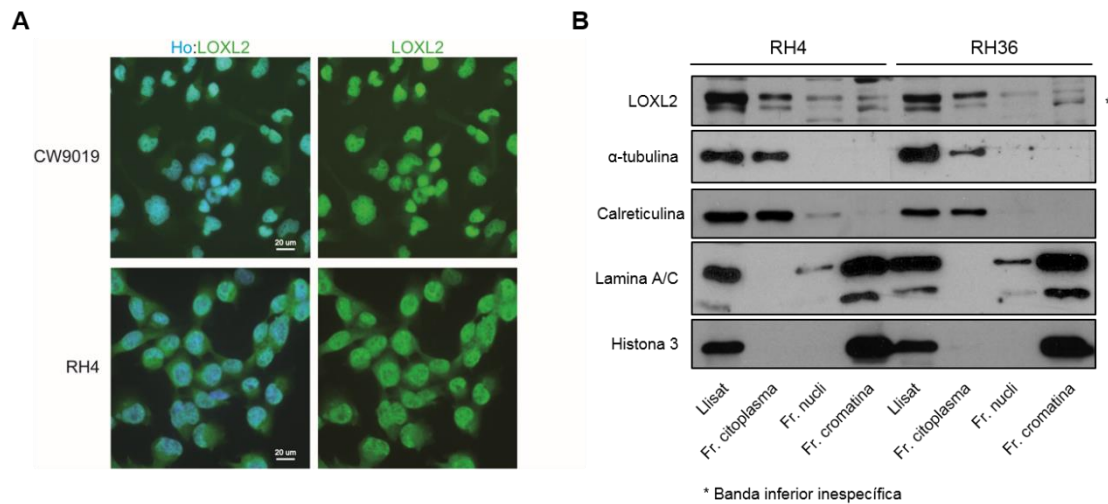


Figura R3: A) Imatges representatives de les immunofluorescències de LOXL2 en les línies RH4 i CW9019. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 µm. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en les subfraccions cel·lulars de les línies RH4 i RH36. Fr: fracció subcel·lular. Els controls emprats per a cada subfracció cel·lular són: α-tubulina (citoplasma); calreticulina (reticle endoplasmàtic); lamina A/C (nucli) i histona-3 (cromatina).

Tot seguit, es va dur a terme *western blot* dels CM de les diferents línies cel·lulars de RMS confirmant que LOXL2 es secreta al medi extracel·lular, així com que es processa proteolíticament en una forma d'aproxidament 65 kDa (Figura R4).

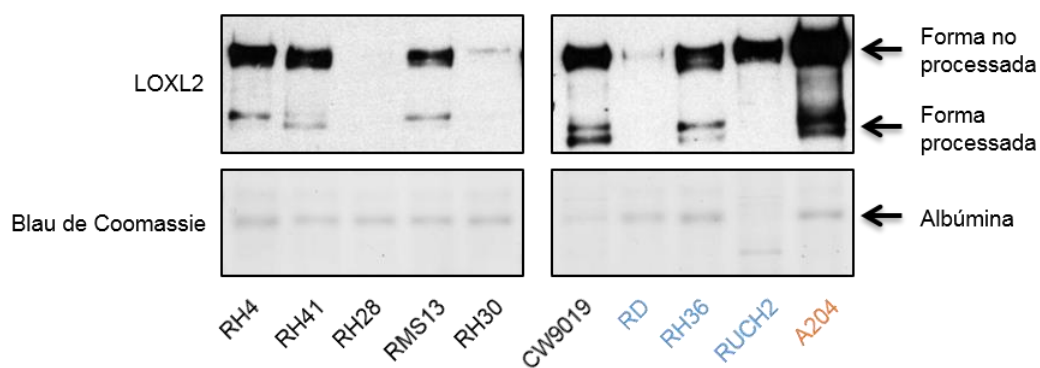


Figura R4: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en els CM (medis condicionats; 48 h en absència de FBS) en el panell de línies de RMS. S'indiquen les línies cel·lulars d'ARMS en negre, les d'ERMS en blau i la rabdoide en taronja. Com a control de càrrega es va utilitzar l'albumina (tinció amb blau de Coomassie).

4. LOXL2 ES TROBA N-GLICOSILAT, MODIFICACIÓ ESSENCIAL PER A LA SEVA SECRECIÓ

En la literatura s'ha descrit que LOXL2 presenta tres possibles llocs de N-glicosilació, els quals són essencials per a la seva secreció i processament²¹⁵. A fi de verificar la glicosilació de LOXL2 en les cèl·lules de RMS, es van tractar dues línies cel·lulars (RH4 i RH36) amb diferents concentracions de l'inhibidor de la N-glicosilació tunicamicina. En analitzar per *western blot* l'expressió de LOXL2 es va observar una disminució en el pes molecular (Figura R5A) que era proporcional a la concentració de tunicamicina. Aquesta disminució s'associa a una pèrdua de glicosilació, corroborant així la presència d'aquesta modificació post-traduccionals.

Altrament, tot i que LOXL2 segueix la via secretora on es modifica post-traduccionals i es secreta al medi extracel·lular, en els resultats anteriors es va confirmar que també localitza intracel·lularment al nucli i que està associat a la cromatina. És per això que es va determinar si LOXL2 es trobava N-glicosilat en les diferents localitzacions subcel·lulars. Amb aquesta finalitat, es van tractar cèl·lules RH4 amb la major concentració de tunicamicina testada (100 ng/mL) durant 48 h i a continuació es va realitzar subfraccionament dels pèl·lets cel·lulars. En analitzar per *western blot* l'expressió de LOXL2 en les diferents subfraccions cel·lulars tractades amb tunicamicina es va observar una disminució del pes molecular en totes elles (citoplasma, nucli i cromatina) en comparació a les cèl·lules no tractades (Figura R5B), de manera que LOXL2 es troba N-glicosilada en totes les fraccions subcel·lulars.

RESULTATS

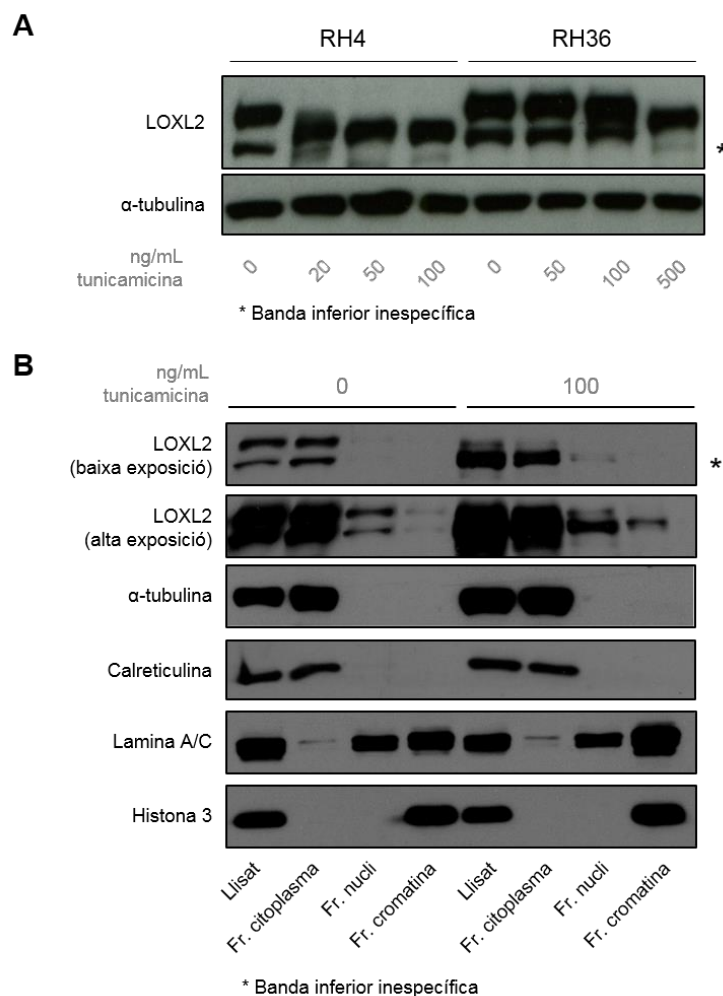


Figura R5: A) *Western blot* representatiu de l'expressió de LOXL2 en RH4 i RH36 després de 48 h de tractament emprant diferents concentracions de l'inhibidor de la N-glicosilació tunicamicina. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en les subfraccions de cèl·lules RH4 tractades durant 48 h amb tunicamicina (100 ng/mL). Fr: fracció subcel·lular. Els controls emprats per a cada subfracció cel·lular són: α -tubulina (citoplasma); calreticulina (reticle endoplasmàtic); lamina A/C (nucli) i histona-3 (cromatina).

Posteriorment, es va analitzar per *western blot* l'expressió de LOXL2 en CM de cèl·lules RH4 tractades amb tunicamicina (100 ng/mL durant 48 h). L'experiment va mostrar que la inhibició de la N-glicosilació inhibia la secreció extracel·lular de LOXL2 (Figura R6), confirmant la importància d'aquesta modificació post-traduccional per a la secreció de LOXL2.

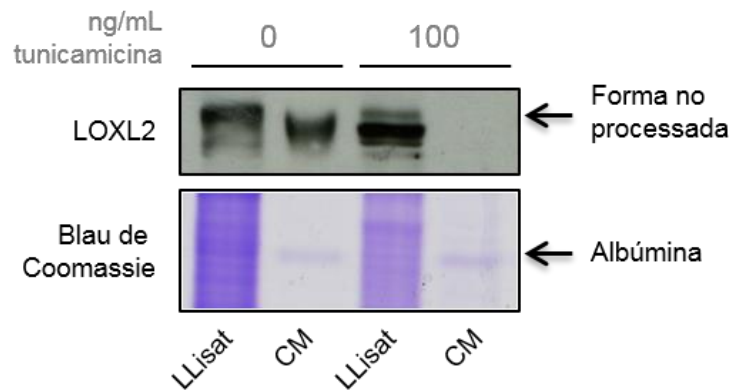


Figura R6: *Western blot* representatiu de l'expressió de LOXL2 en CM (medi condicionat) de RH4 després del tractament amb 100 ng/mL de tunicamicina durant 48 h en absència de FBS. Com a control de càrrega es va utilitzar l'albúmina (tinció amb blau de Coomassie).

5. EXPRESSIÓ DELS MEMBRES DE LA FAMÍLIA *LOX* EN LÍNIES CEL·LULARS DE RMS

LOXL2 pertany a la família de proteïnes *LOX*, la qual engloba *LOX* i quatre proteïnes *LOX-like* (*LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* i *LOXL4*). Així doncs, es va determinar els seus nivells d'ARNm, en referència als valors de *LOXL2*, en les diferents línies de RMS i una línia de SE, A673 (Figura R7A-K).

De forma general, tots els membres de la família *LOX* expressaven nivells més baixos o gairebé indetectables que *LOXL2*, a excepció de *LOX* en dues línies (CW9019 i A204) i *LOXL1*. *LOXL1* presentava nivells similars o més alts en totes les línies de RMS menys en RH30. En particular, cal remarcar que la única línia de RMS que presenta uns nivells de *LOXL2* gairebé indetectables, RH28, i una línia de SE que no expressa *LOXL2*, A673, també presenten uns nivells elevats de *LOXL1*.

RESULTATS

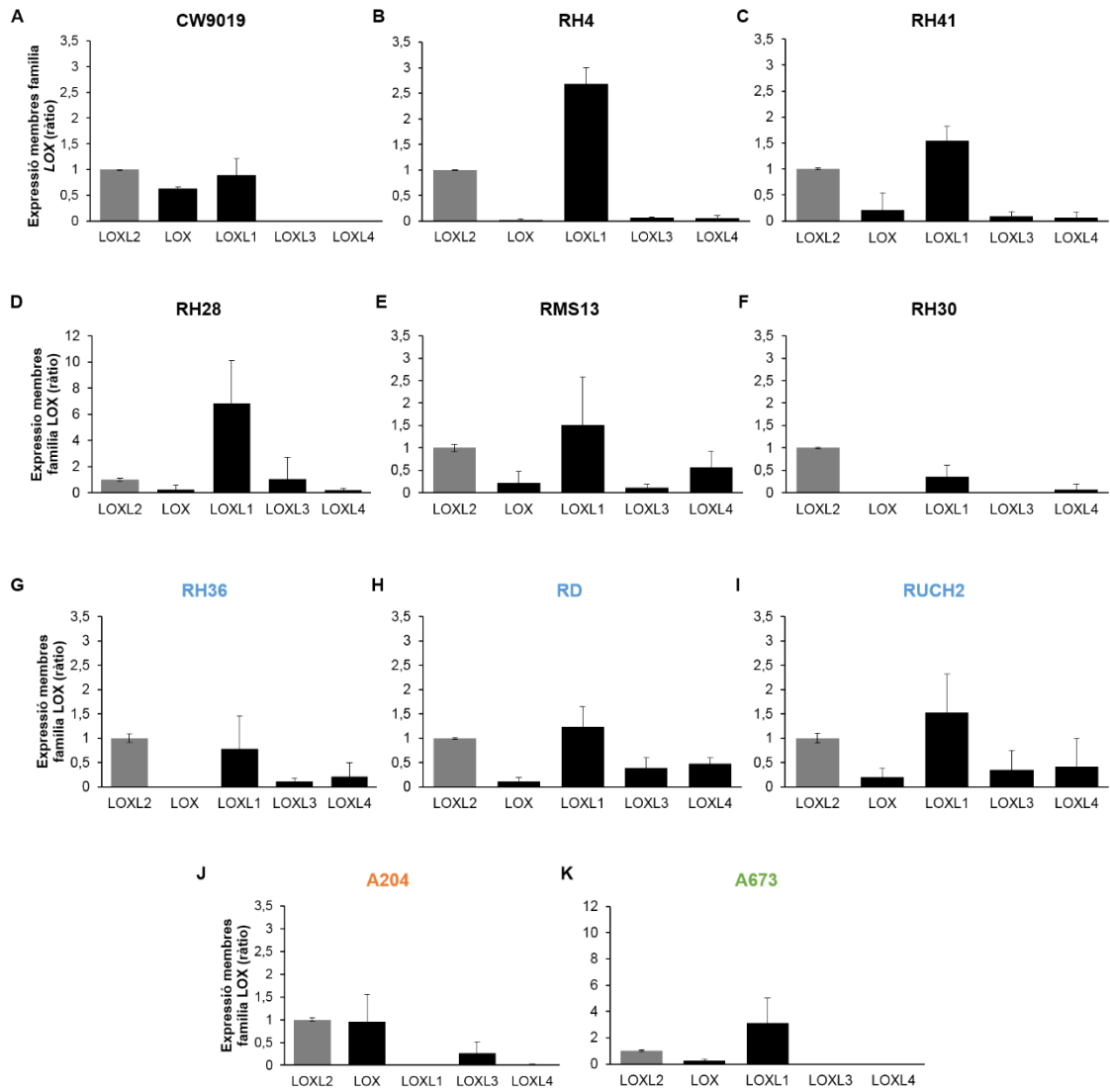


Figura R7: Expressió relativa (respecte a *LOXL2*) del nivells d'ARNm dels membres de la família *LOX* (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL3* i *LOXL4*) mitjançant RT-qPCR en les línies cel·lulars de RMS (A-J) i en la línia de SE A673 (K). S'indiquen les línies cel·lulars d'ARMS en negre, d'ERMS en blau, la rabdoide en taronja i la de SE en verd. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

6. EL SILENCIAMENT TRANSITORI DE *LOXL2* REDUEIX LA PROLIFERACIÓ I MIGRACIÓ CEL·LULAR EN LÍNIES D'ARMS

Per tal de determinar el rol de *LOXL2* en ARMS, en primer lloc es va silenciar transitòriament *LOXL2* mitjançant ARNsi (si*LOXL2*) en dues línies: RH4 i CW9019. Després de 24 h de transfecció es va observar una reducció molt elevada de l'expressió de *LOXL2* (Figura R8) en comparació a les cèl·lules transfectades amb un ARNsi control, siNT.

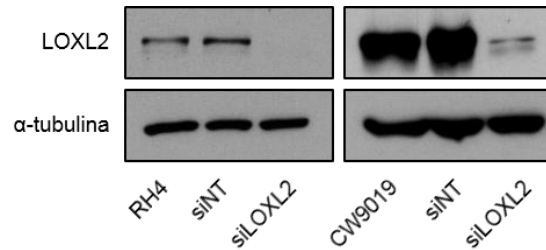


Figura R8: *Western blot* representatiu mostrant els nivells de *LOXL2* en les línies RH4 i CW9019 després de 24 h de transfecció amb un ARNsi control (siNT) o dirigit contra *LOXL2* (si*LOXL2*). Com a control de càrrega es va utilitzar la α-tubulina.

Tot seguit, en aquest model de silenciament transitori es van realitzar experiments de proliferació cel·lular mitjançant el reactiu WST-1. El silenciament transitori de *LOXL2* en comparació a les cèl·lules transfectades amb el siNT va resultar en una disminució significativa en la capacitat proliferativa, que es mantenia al llarg de 7 dies (Figura R9A-B). Cal comentar que en la línia CW9019 les cèl·lules transfectades amb el siNT també van presentar una disminució significativa en comparació a la seva línia parental, probablement degut al propi procés de transfecció.

RESULTATS

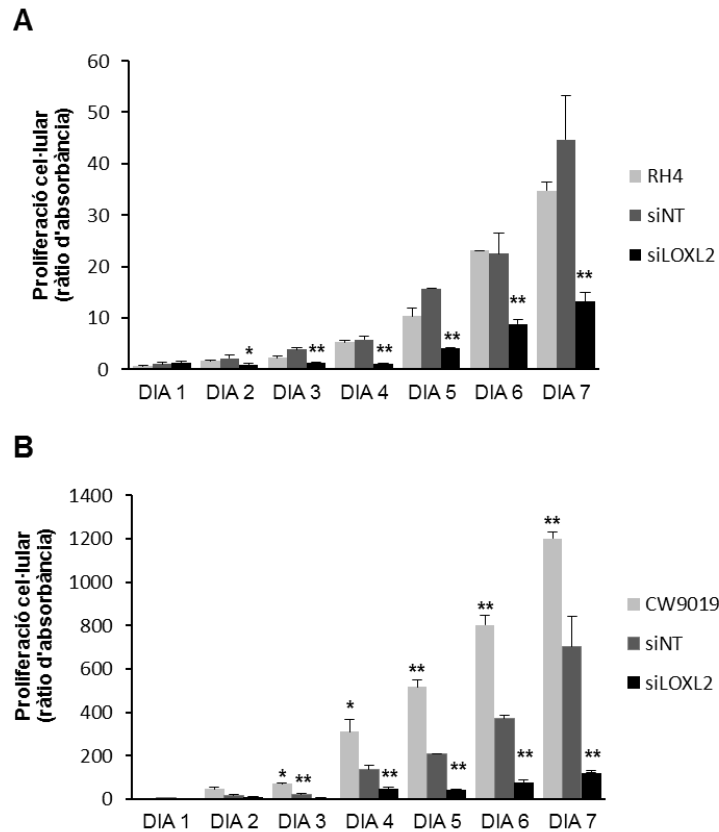


Figura R9: Assaig de proliferació sembrat 6 h després del silenciament transitori amb ARNsi control (NT) i ARNsi dirigit contra *LOXL2* en les línies RH4 (A) i CW9019 (B). L'absorbància es va mesurar cada 24 h durant 7 dies emprant el reactiu WST-1 i es va calcular la ràtio relativa als valors del siNT del dia 1. Prova *t* de Student (en relació a siNT): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

Paral·lelament, es van dur a terme experiments de migració cel·lular en càmera de Boyden i es va observar com la migració cel·lular també es veia dràsticament reduïda en les dues línies cel·lulars després de silenciar *LOXL2* (Figura R10A-B).

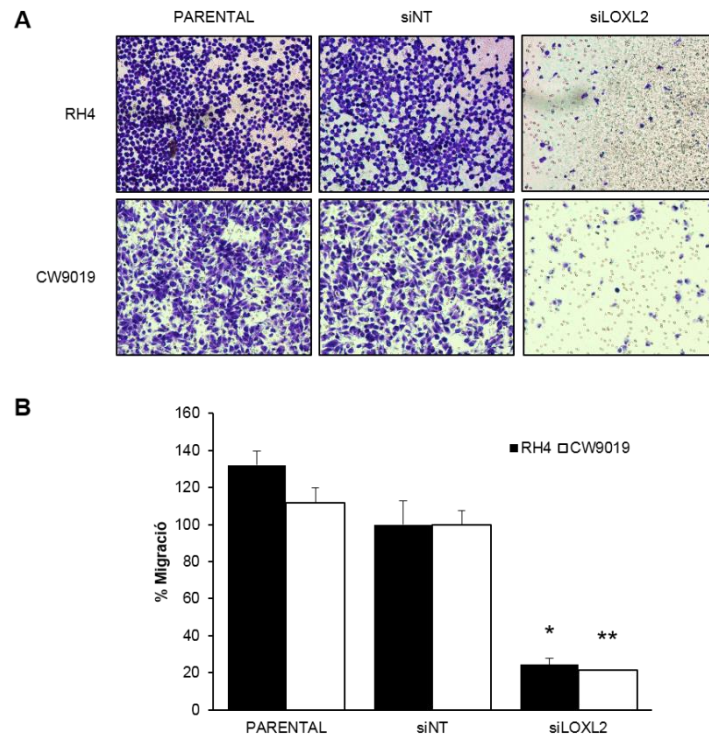


Figura R10: Assaig de migració en càmera de Boyden després del silenciament transitori amb ARNsi control (NT) i ARNsi dirigit contra *LOXL2* en les línies RH4 i CW9019. 6 h de migració i un temps total de transfecció de 24 h. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a siNT): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

Tanmateix, a més d'una disminució en la migració cel·lular també es va observar una disminució en les adhesions focals mitjançant marcatge immunofluorescent amb la proteïna de citoesquelet vinculina (Figura R11A-B). El silenciament transitori de *LOXL2* en ambdues línies va produir un canvi en la localització de la vinculina, la qual no es trobava agrupada en les adhesions focals. Així doncs, el conjunt de resultats mostren com *LOXL2* és important per a la proliferació i migració cel·lular en cèl·lules d'ARMS.

RESULTATS

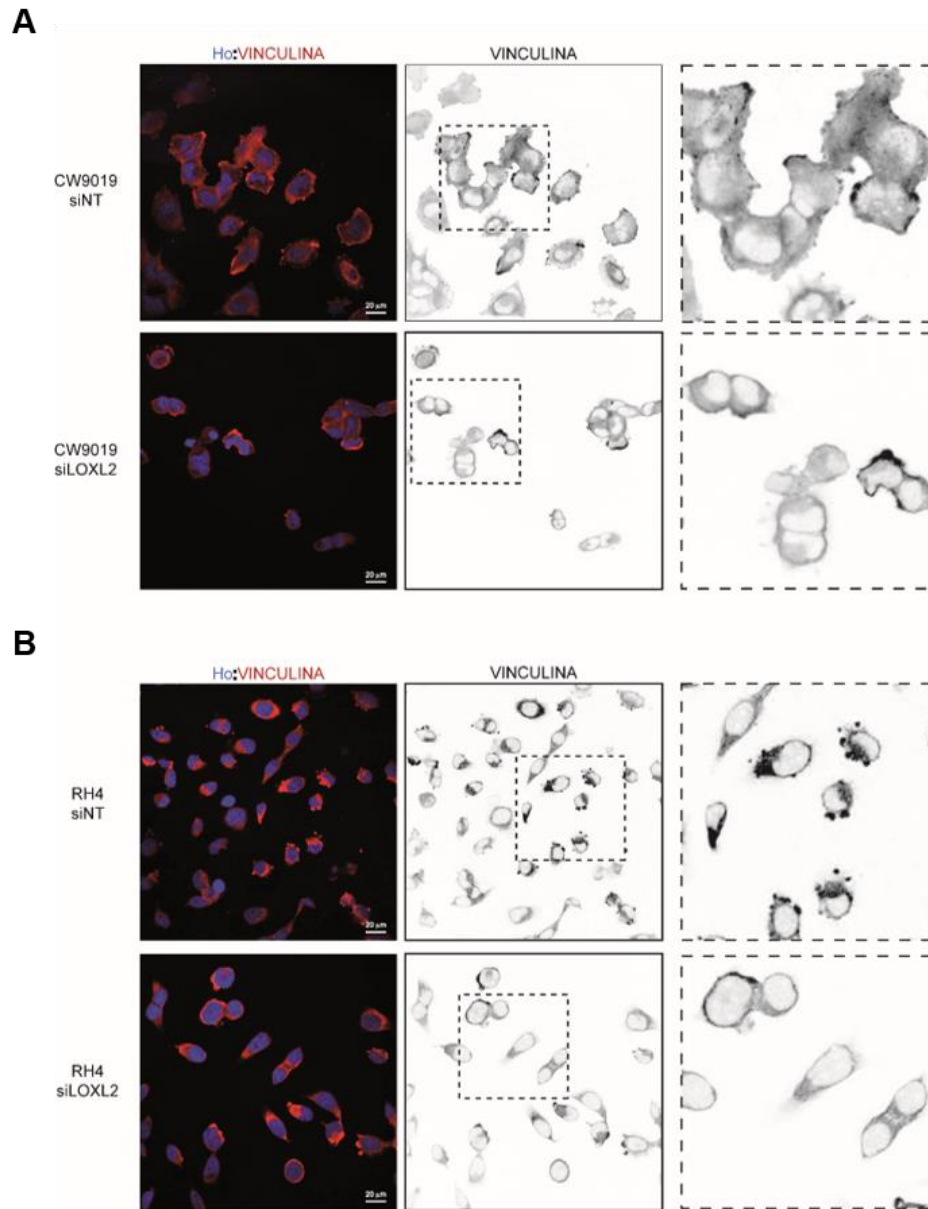


Figura R11: Imatges representatives de les immunofluorescències de vinculina en les línies d'ARMS RH4 **(A)** i CW9019 **(B)** transfectades transitòriament durant 24 h amb el ARNsi control NT i el ARNsi dirigit contra *LOXL2*. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 μ m.

7. EL SILENCIAMENT ESTABLE DE *LOXL2* REDUEIX EL FENOTIP NEOPLÀSTIC EN LÍNIES D'ARMS

Per tal de profunditzar en el paper de *LOXL2* en cèl·lules d'ARMS, i de forma complementària al model de silenciament transitori, es van generar dos models de silenciament gènic estable en les mateixes línies cel·lulars, RH4 i CW9019. Amb aquesta finalitat es van transfectar les cèl·lules amb un ARNsh dirigit contra *LOXL2*. Com a control es va utilitzar el mateix vector però amb una seqüència aleatòria (SCR: *scramble*).

A fi d'obtenir un major silenciament es van aïllar i amplificar diversos clons en els que es va comprovar el silenciament de manera individual per *western blot* (Figura R12). Posteriorment, es van seleccionar tres clons de treball de cada línia cel·lular que presentaven una baixa expressió de *LOXL2*. Tot seguit, es va caracteritzar el fenotip neoplàstic d'aquests clons en comparació a les cèl·lules transfectades amb el plasmidi control.

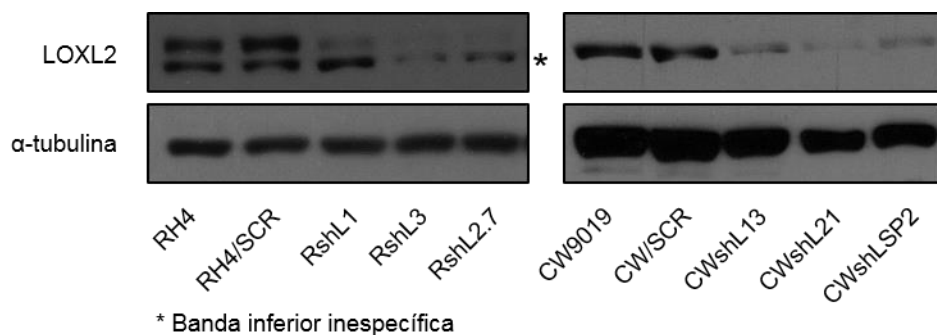


Figura R12: *Western blot* representatiu mostrant els clons seleccionats pel silenciament estable de *LOXL2* en les línies d'ARMS RH4 i CW9019. RshL# i CWshL# corresponen a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament de *LOXL2*. SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

RESULTATS

En primer lloc, es va realitzar un assaig clonogènic per comprovar si *LOXL2* intervenia en la capacitat de formar colònies a baixa densitat. Es va observar que tant en les cèl·lules RH4 com en les CW9019 el silenciament de *LOXL2* reduïa significativament la seva capacitat clonogènica (Figura R13A-B).

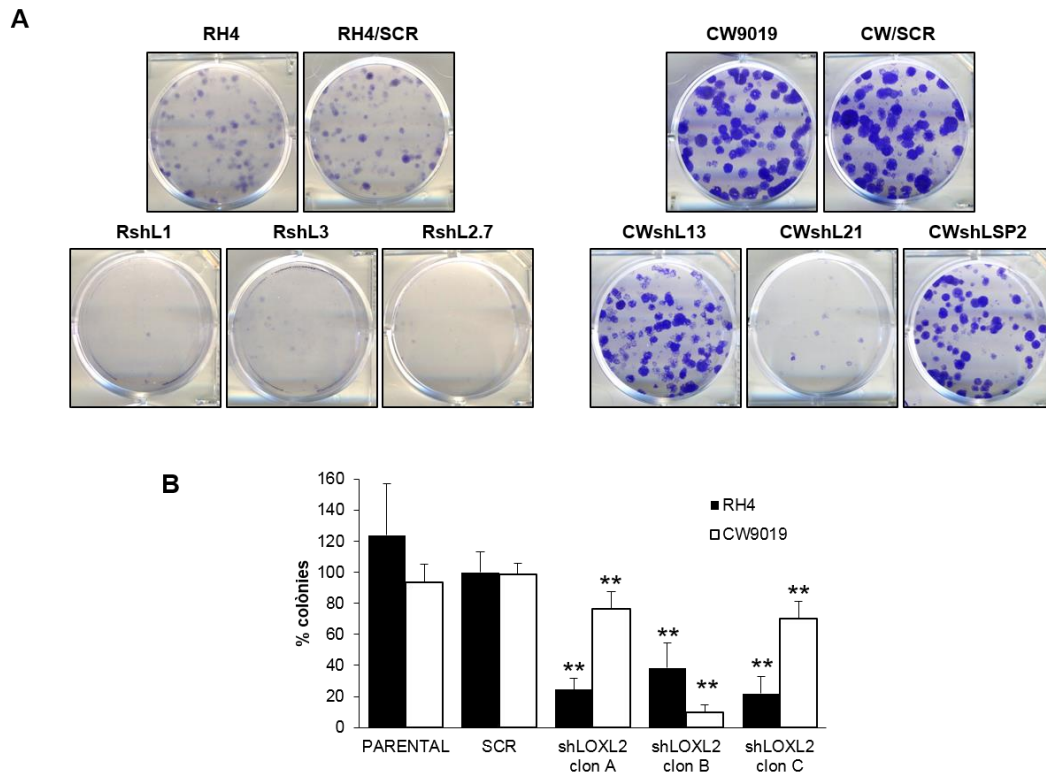


Figura R13: A) Imatges representatives d'un assaig clonogènic (15 dies de creixement) amb els models de silenciament estable de *LOXL2* en les línies RH4 i CW9019. **B)** Quantificació de l'assaig clonogènic. Es mostren els clons de RH4 i CW9019 agrupats com a clon A (RshL1 i CWshL13), B (RshL3 i CWshL21) i C (RshL2.7 i CWshLSP2). SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a SCR): ** $p \leq 0,005$.

Paral·lelament, i continuant amb la caracterització del fenotip neoplàstic, es van dur a terme experiments de proliferació amb el reactiu WST-1. Els clons de RH4 amb una baixa expressió de LOXL2 van presentar una disminució significativa, a les 72 i 96 h, en la seva capacitat proliferativa (Figura R14A). No obstant, pel que fa al model de silenciament en CW9019, no es van observar efectes significatius en comparació a les cèl·lules amb el plasmidi control, a excepció d'un dels tres clons a les 96 h (Figura R14B).

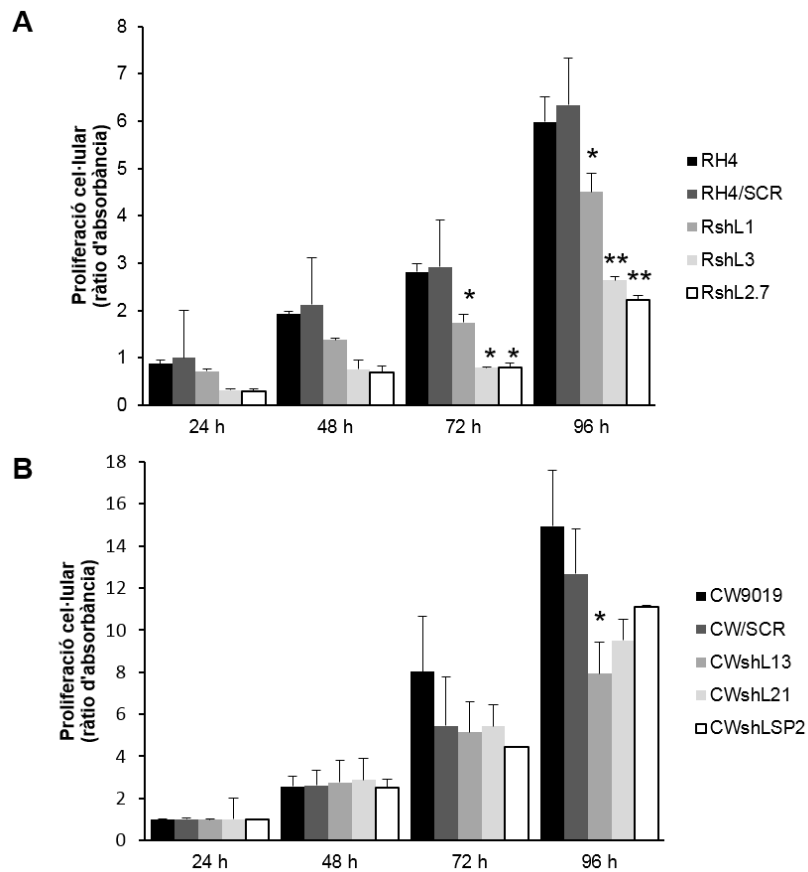


Figura R14: Assaig de proliferació dels models de silenciament estable de *LOXL2* en RH4 (A) i CW9019 (B) mitjançant el reactiu WST-1. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control (SCR) a les 24 h. RshL# i CWshL# corresponen a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament de *LOXL2*. Prova *t* de Student (en relació a SCR): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

RESULTATS

Altrament, amb el propòsit de determinar si LOXL2 està implicat en processos de motilitat cel·lular en les línies d'ARMS, es van fer assajos de migració en càmera de Boyden utilitzant FBS com a atraient. El resultat va ser que el silenciament de *LOXL2* disminuïa significativament, al voltant d'un 50 %, la capacitat migratòria de les cèl·lules RH4 i CW9019 (Figura R15A-B).

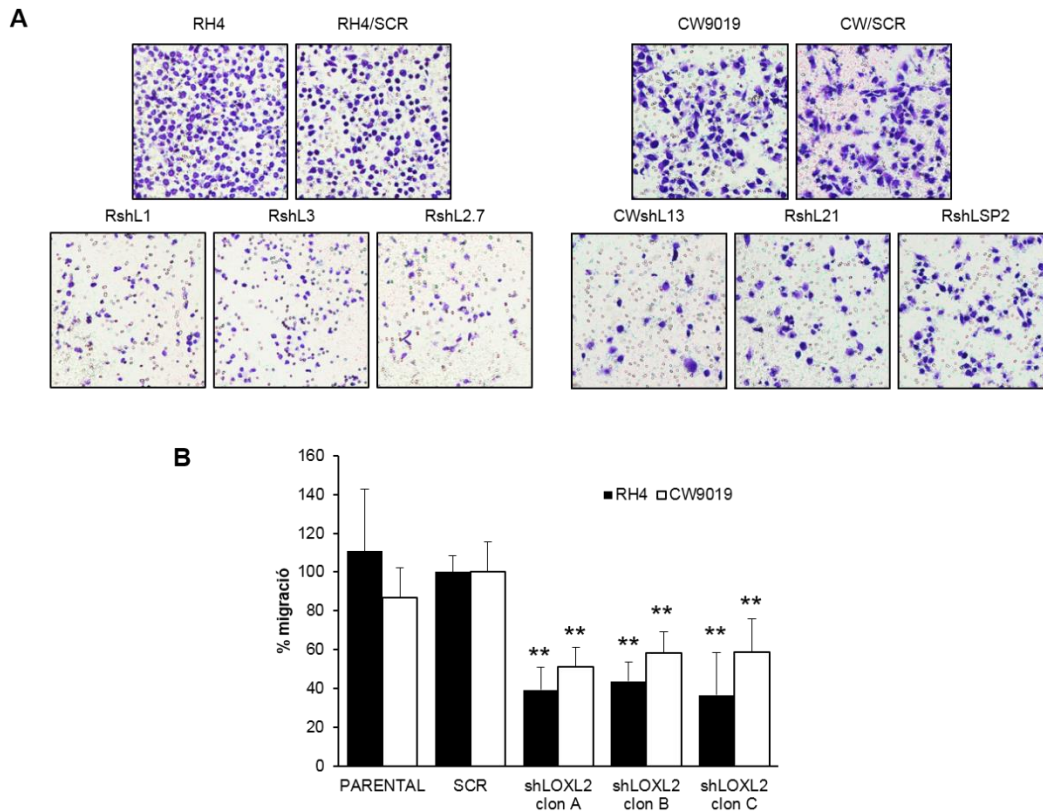


Figura R15: Assaig de migració (6 h) en càmera de Boyden dels models de silenciament estable de *LOXL2* en les línies RH4 i CW9019. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Es mostren els clons de RH4 i CW9019 agrupats com a clon A (RshL1 i CWshL13), B (RshL3 i CWshL21) i C (RshL2.7 i CWshLSP2). SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a SCR): ** $p \leq 0,005$.

A més, en aquests models es van realitzar assajos d'invasió en càmera de Boyden utilitzant Matrigel així com també FBS com a atractant. Els clons amb una baixa expressió de LOXL2 van mostrar una reducció significativa, del 50 % o més, en la seva capacitat invasiva en comparació a les cèl·lules control (Figura R16A-B).

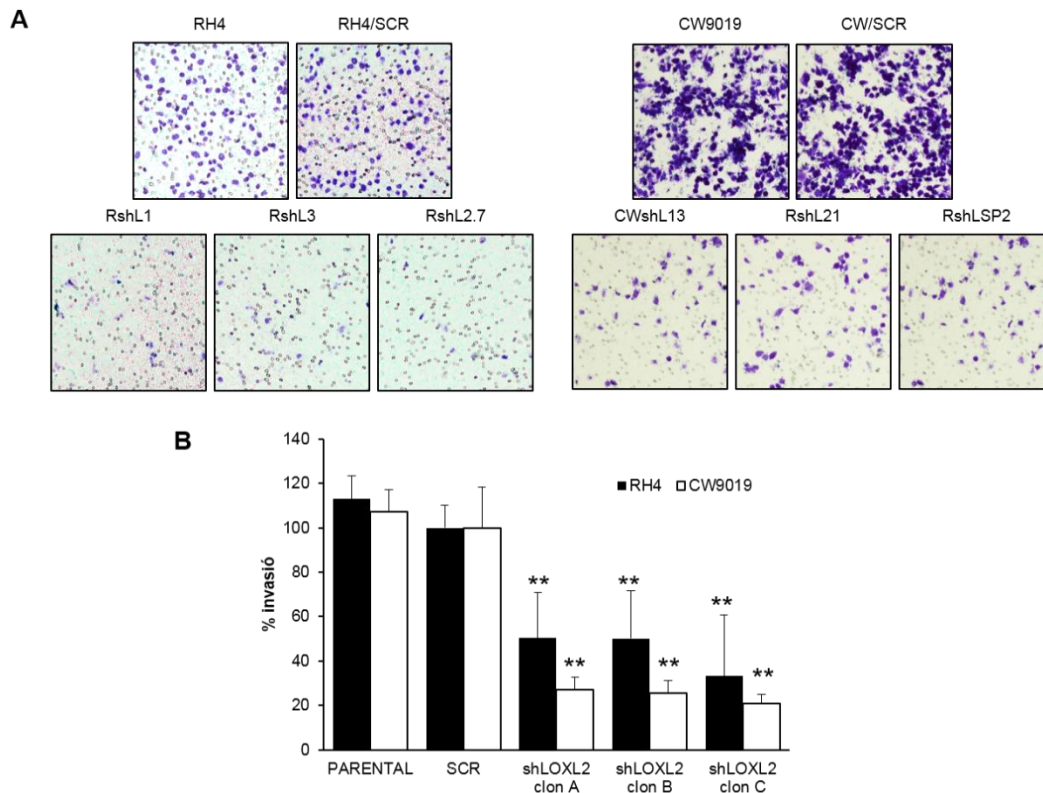


Figura R16: Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel (24 h) en els models de silenciament estable de *LOXL2* en les línies RH4 i CW9019. **A)** Imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Es mostren els clons de RH4 i CW9019 agrupats com a clon A (RshL1 i CWshL13), B (RshL3 i CWshL21) i C (RshL2.7 i CWshLSP2). SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a SCR): ** $p \leq 0,005$.

Tot seguit, es va analitzar el possible efecte del silenciament estable de *LOXL2* en algunes vies de senyalització cel·lular. Concretament, es va comprovar l'estat de fosforilació de les proteïnes ERK1/2 (*Extracellular Receptor Kinase*) i AKT (*Protein kinase B*; també coneguda com PKB), les dues àmpliament estudiades i implicades en múltiples processos cel·lulars, com ara proliferació i supervivència^{166,178}. Mitjançant *western blot* es va observar una disminució de la fosforilació d'ERK en els clons amb silenciament de *LOXL2* però no es van observar diferències en la fosforilació d'AKT (Figura R17).

RESULTATS

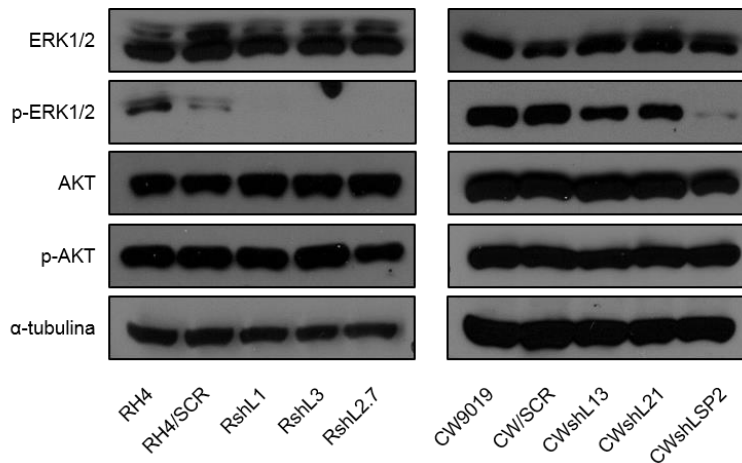


Figura R17: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió d'ERK1/2 i AKT i de les seves formes fosforilades en els models de silenciament estable de *LOXL2*. RshL# i CWshL corresponen a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector de silenciament de *LOXL2*. SCR: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Els extractes cel·lulars es van recollir 48 h després de l'absència de FBS. Com a control de càrrega es va utilitzar la α-tubulina.

8. EFECTES DEL GUANY D'EXPRESSIÓ DE *LOXL2* EN LA LÍNIA CEL·LULAR D'ARMS RH28: PAPER DE L'ACTIVITAT CATALÍTICA LISIL OXIDASA

Per tal de completar la caracterització funcional de *LOXL2* en ARMS, es va transfectar de forma estable un vector d'expressió *LOXL2 wt* en l'única línia d'ARMS analitzada que expressava uns nivells gairebé indetectables de *LOXL2*: RH28. Paral·lelament, també es van transfectar les cèl·lules RH28 amb un vector amb tres mutacions puntuals en el domini catalític de *LOXL2* que inactiva la seva activitat lisil oxidasa (Figura R18A). Les mutacions afecten el domini d'unió a Cu^+ i el cofactor LTQ. Ambdós vectors expressen *LOXL2* amb el *tag* FLAG i s'anomenen *LOXL2wt/FLAG* i *LOXL2oxmut/FLAG* respectivament. Com a control es va utilitzar el mateix vector amb el *tag* FLAG però amb una seqüència aleatòria (*CMV/FLAG*).

Partint dels diferents *pools* de cèl·lules transfectades, RLpoolwt i RLpooloxmut, es van aïllar i amplificar diversos clons en els que es va comprovar l'expressió de *LOXL2* i FLAG de forma individual per *western blot*. Posteriorment, es van seleccionar dos clons de treball *LOXL2wt/FLAG* i dos *LOXL2oxmut/FLAG*, anomenats RLwt# i RLoxmut# (Figura R18B). En els clons RLoxmut# es va comprovar l'absència d'activitat lisil oxidasa mitjançant un test enzimàtic específic. Primer, es va precipitar *LOXL2* amb boles d'agarosa conjugades a anti-FLAG. Després, es van incubar els extractes amb un substrat específic de *LOXL2* per tal de mesurar la seva activitat

enzimàtica sent quantificable per espectrofotometria. En quantitats equivalents de LOXL2 (*pull down* anti-FLAG; Figura R19A), els dos clons RLwt# van presentar els mateixos valors d'absorbància que el control positiu (peròxid d'hidrogen; Figura R19B). En canvi, els dos clons RLoxmut# van tenir els mateixos valors d'absorbància que les cèl·lules control sense LOXL2 (RH28 i RH28/FLAG). Per tant, es va confirmar que els clons RLoxmut# no tenien activitat lisil oxidasa.

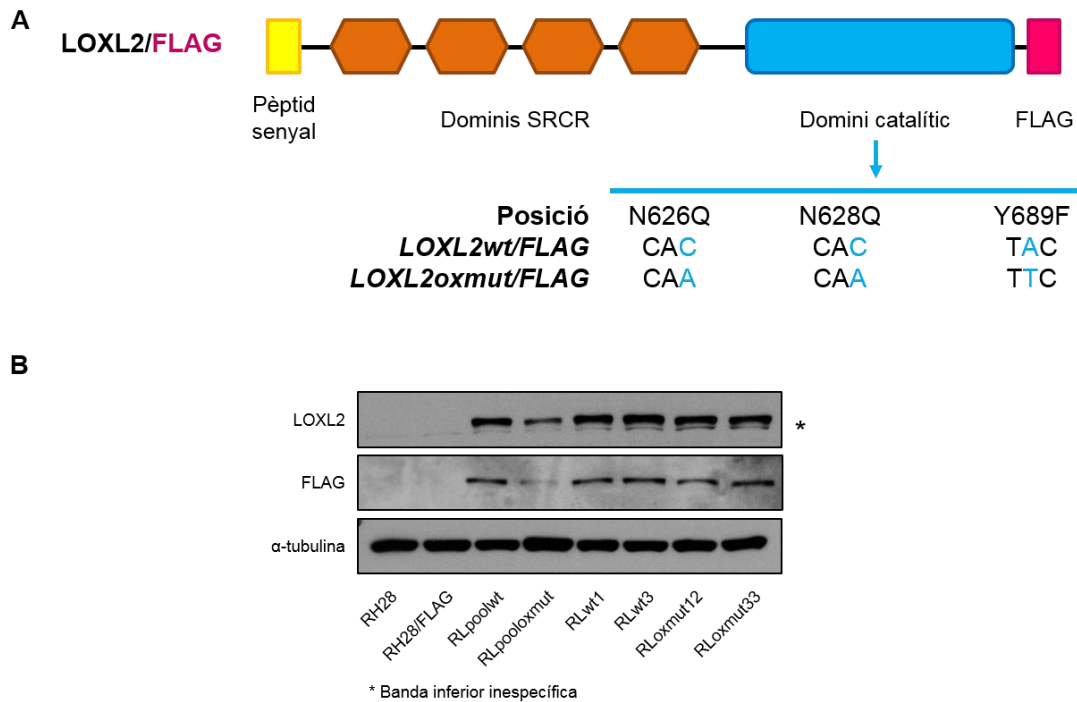


Figura R18: A) Esquema dels residus mutats en el domini catalític de LOXL2 per generar el mutant d'activitat lisil oxidasa (*LOXL2oxmut/FLAG*). L'esquema inclou l'estructura de LOXL2: pèptid senyal, dominis SRCR (receptors *scavenger* rics en cisteïna), domini catalític i *tag* FLAG. **B)** *Western blot* representatiu mostrant els nivells de LOXL2 i FLAG en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (RLwt#) i el *LOXL2* mutant d'activitat oxidasa (RLoxmut#) en la línia cel·lular RH28. RLwt# corresponen a cadascun dels clons de treball transfectats amb el vector *LOXL2wt/FLAG* i RLoxmut# corresponen als clons de treball transfectats amb el vector *LOXL2oxmut/FLAG*. RLpoolwt i RLpooloxmut són els *pools* de cèl·lules transfectades prèviament a la selecció de clons. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

RESULTATS

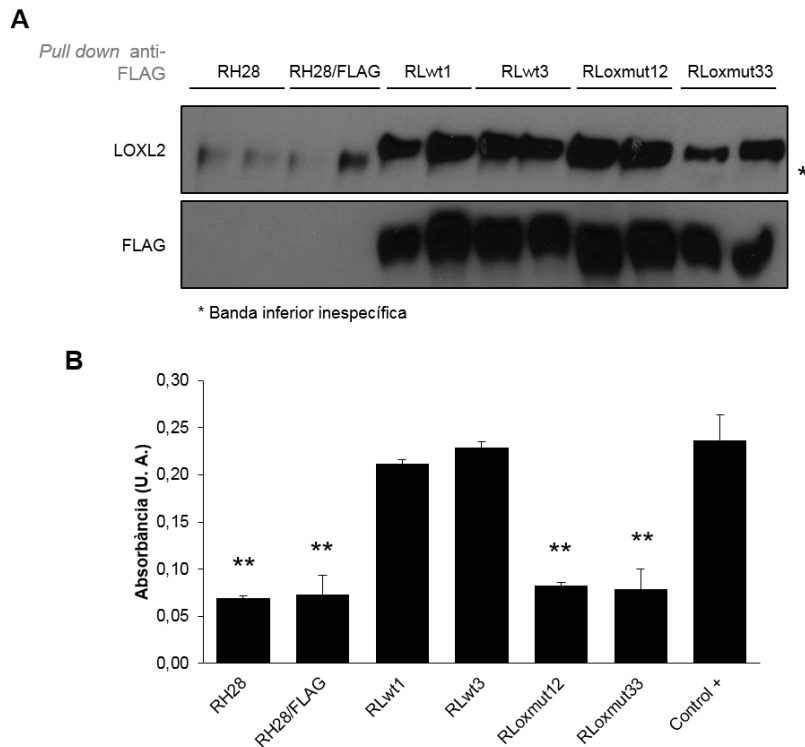


Figura R19: A) *Western blot* de comprovació de l'expressió de LOXL2 i FLAG en el *pull down* utilitzant les boles d'agarosa anti-FLAG. RLwt# corresponen als clons de treball LOXL2 *wt* i RLoxmut# corresponen als clons de treball LOXL2 mutants d'oxidació. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **B)** Assaig d'activitat lisil oxidasa de LOXL2 utilitzant el kit *Amplex Red* i un substrat específic de LOXL2 després del *pull down* anti-FLAG. Mesura de l'absorbància generada (U. A.) en el producte format en la reacció. Com a control positiu es va utilitzar el peròxid d'hidrogen. Prova *t* de Student (en relació a el control positiu): ** $p \leq 0,005$.

A continuació, es va caracteritzar la localització de LOXL2 en aquest model de reintroducció mitjançant immunofluorescència. No obstant, tal i com s'ha explicat en Materials i mètodes, secció 14, no es va aconseguir un marcatge específic, ni amb l'anticòs anti-LOXL2, anti-FLAG, ni amb altres anticòssos anti-LOXL2. Així doncs, es va dur a terme fraccionament subcel·lular. D'aquesta forma, es va observar que LOXL2 reintroduït localitzava al citoplasma, nucli i també estava associat a la cromatina, igual que el LOXL2 endogen en altres línies de RMS (Figura R20). A més, no es van observar diferències de localització entre la forma *wt* i mutada de LOXL2.

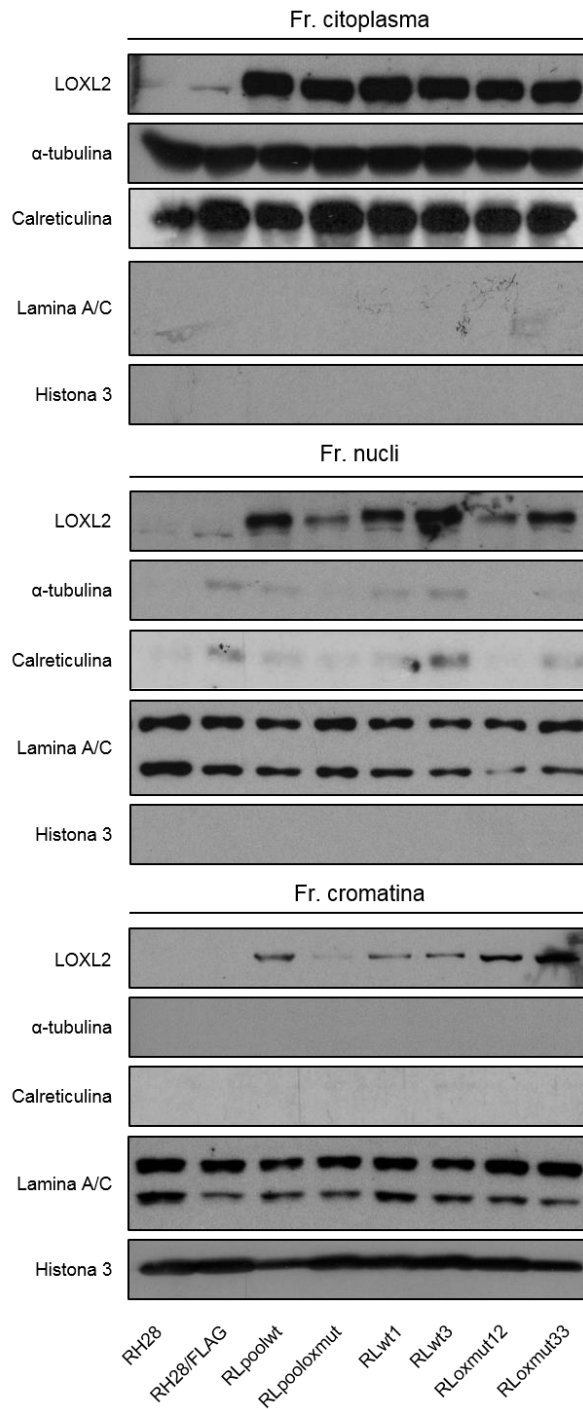


Figura R20: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en les subfraccions cel·lulars del model de reintroducció estable de *LOXL2* en la línia RH28. RLwt# corresponen als clons de treball LOXL2 *wt* i RLoxmut# corresponen als clons de treball LOXL2 mutants d'oxidació. RLpoolwt i RLpooloxmut són els *pools* de cèl·lules transfectades prèviament a la selecció de clons. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Fr: fracció subcel·lular. Els controls emprats per a cada subfracció cel·lular són: α -tubulina (citoplasma); calreticulina (reticle endoplasmàtic); lamina A/C (nucli) i histona-3 (cromatina).

RESULTATS

Tot seguit, es va dur a terme *western blot* dels CM del model de reintroducció. Així, es va confirmar que LOXL2 es secretava al medi extracel·lular i que es processava proteolíticament en una forma d'uns 65 kDa (Figura R21), de la mateixa forma que en cèl·lules de RMS que expressen LOXL2 endogen. De nou, no es van trobar diferències entre la forma *wt* i la forma mutada.

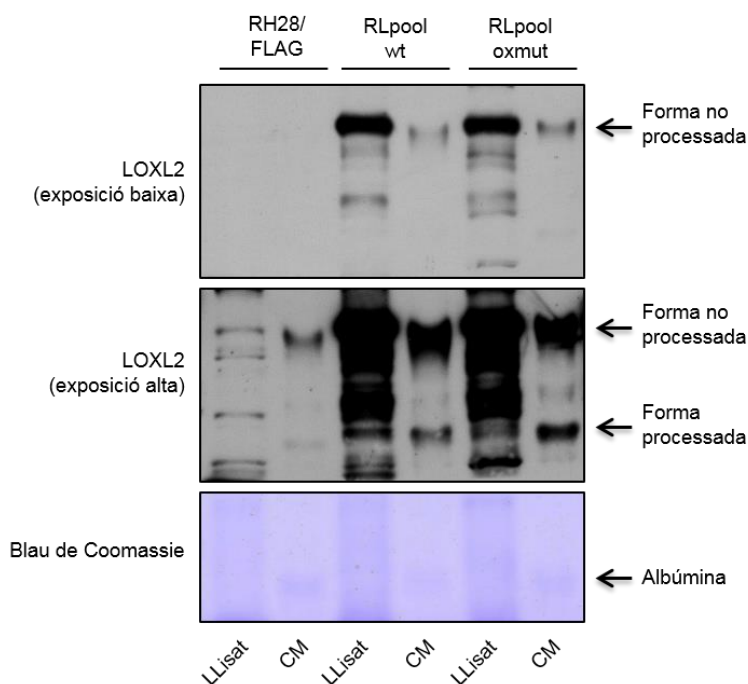


Figura R21: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 (forma total i forma processada) en els CM (medi condicionat; 48 h en absència de FBS) en el model de reintroducció estable de *LOXL2* en la línia RH28. RLpoolwt i RLpooloxmut són els *pools* de cèl·lules transfectades amb *LOXL2 wt* i *LOXL2* mutant d'oxidació prèviament a la selecció de clons. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar l'albúmina (tinció amb blau de Coomassie).

A continuació, amb la finalitat de confirmar el rol d'aquesta proteïna i a la vegada determinar el paper de l'activitat lisil oxidasa, es va analitzar el fenotip neoplàstic dels clons *LOXL2 wt* (RLwt#) i dels clons mutants d'oxidació (RLoxmut#) en comparació a les cèl·lules transfectades amb el plasmidi control RH28/FLAG.

Primerament, es va dur a terme un assaig clonogènic on es va observar que les úniques cèl·lules que eren capaces de formar colònies en sembrar-les a baixa densitat eren les transfectades amb *LOXL2* (Figura R22). Cal destacar que els clons *LOXL2* mutants d'oxidació van formar el mateix percentatge de colònies que els clons *LOXL2 wt*.

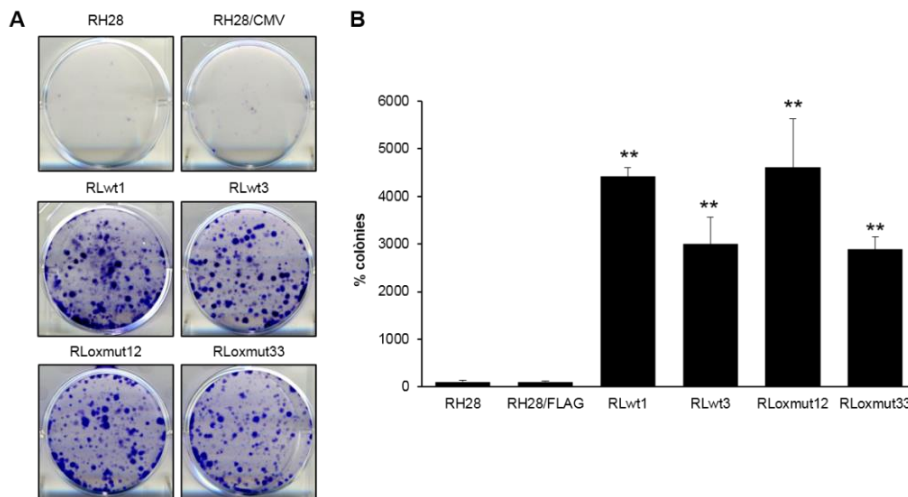


Figura R22: A) Imatges representatives d'un assaig clonogènic (21 dies de creixement) en el model de reintroducció de *LOXL2* wt (clons RLwt#) i del mutant d'oxidació (clons RLoxmut#) en la línia cel·lular RH28. B) Quantificació de l'assaig clonogènic. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

Tanmateix, es van realitzar experiments de proliferació mitjançant el reactiu WST-1. El resultat va ser que tant els clons *LOXL2* wt com els clons *LOXL2* mutants d'oxidació van presentar de forma significativa una major ràtio de proliferació que les cèl·lules control (Figura R23).

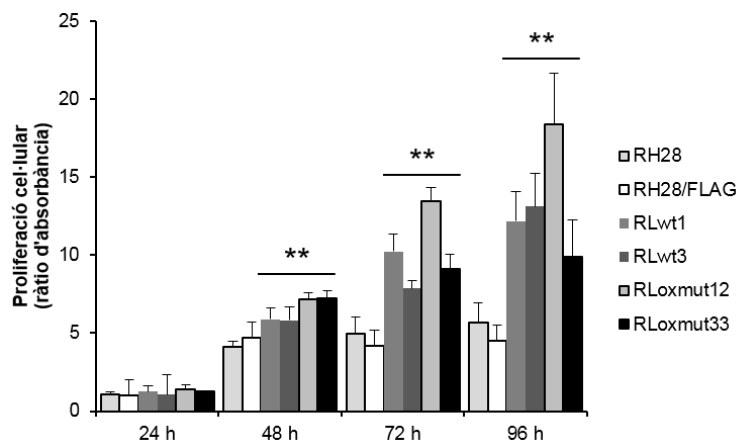


Figura R23: Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 en el model de reintroducció de *LOXL2* wt (clons RLwt#) i del mutant d'oxidació (clons RLoxmut#) en la línia cel·lular RH28. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control (RH28/FLAG) a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

RESULTATS

De manera paral·lela, es van dur a terme assajos de migració en càmera de Boyden. En tots els clons LOXL2, *wt* i mutants d'oxidació, hi havia un increment molt significatiu en la seva capacitat migratòria (Figura R24). El mateix es va observar en dur a terme assaig d'invasió en càmera de Boyden utilitzant Matrigel: tots els clons LOXL2 tenien una major capacitat invasiva (Figura R25). En definitiva, LOXL2 independentment de la seva capacitat catalítica lisil oxidasa incrementa la capacitat clonogènica, proliferativa, migratòria i invasiva de les cèl·lules d'ARMS RH28.

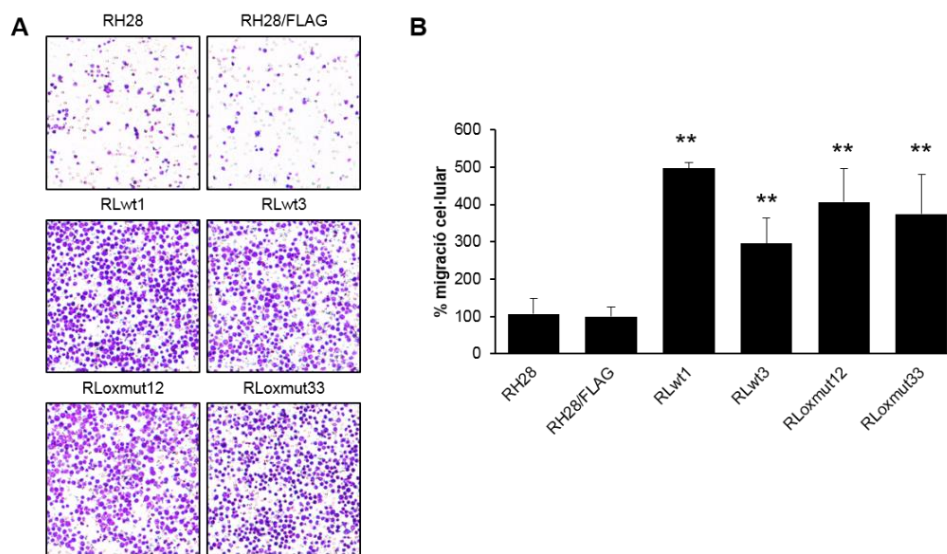


Figura R24: Assaig de migració en càmera de Boyden (48 h) en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (clons RLwt#) i del mutant d'oxidació (clons RLoxmut#) en la línia cel·lular RH28. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

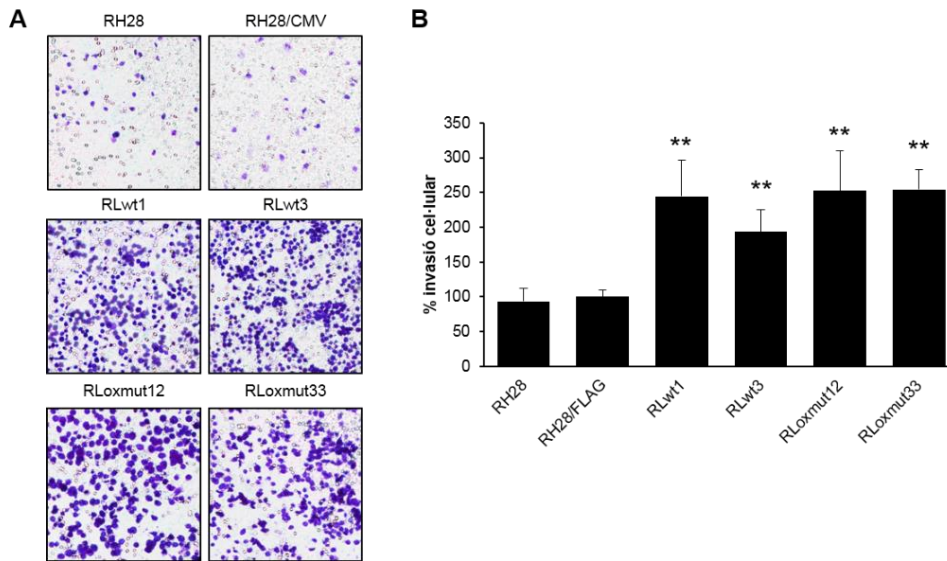


Figura R25: Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel (72 h) en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (clons RLwt#) i del mutant d'oxidació (clons RLoxmut#) en la línia cel·lular RH28. **A)** Imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

A continuació, com també es va dur a terme en els models estables de silenciament de *LOXL2* en RH4 i CW9019, es va analitzar l'estat de fosforilació de les proteïnes ERK1/2 i AKT en el model de reintroducció de RH28. Mitjançant *western blot* es va observar un increment de la fosforilació d'ERK1/2 en tots els clons que expressaven *LOXL2*, de forma independent a la seva activitat catalítica. En canvi, no es van observar diferències en la fosforilació d'AKT (Figura R26). Els resultats van indicar el mateix que en els models de silenciament de *LOXL2*: una afectació de la senyalització d'ERK1/2, però no en la senyalització d'AKT.

RESULTATS

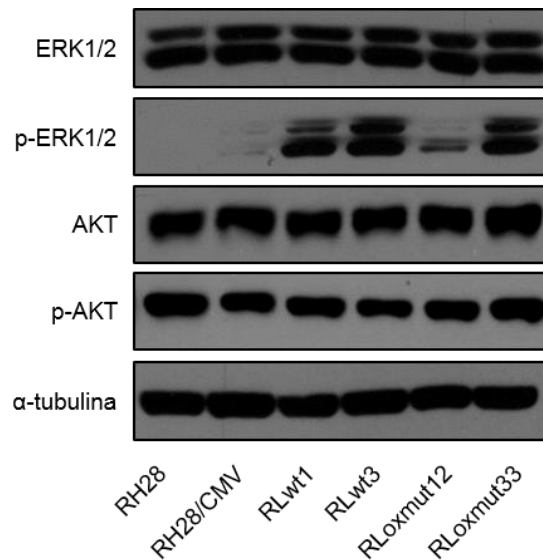


Figura R26: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió d'ERK1/2, AKT i de les seves formes fosforilades en el model de reintroducció de RH28 LOXL2 wt (clons RLwt#) i del mutant d'oxidació (clons RLoxmut#). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Els extractes cel·lulars es van recollir 48 h després de l'absència de FBS. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

A causa dels problemes tècnics en la immunofluorescència del model de reintroducció RH28 LOXL2, es va obtenir un altre model de reintroducció de *LOXL2* amb un *tag* fluorescent, mCherry. Les cèl·lules RH28 es van transfectar amb un vector *LOXL2/mCherry* i com a vector control *CMV/mCherry* i es van seleccionar les cèl·lules fluorescents mitjançant *cell sorter*. Els *pools* de cèl·lules mCherry es van anomenar RH28/mCherry, per al vector control, i RLMCherry per a les cèl·lules *LOXL2/mCherry*. En primer lloc, es va comprovar per *western blot* l'expressió de *LOXL2* i la seva secreció al medi extracel·lular en els extractes proteics i en els CM, respectivament (Figura R27).

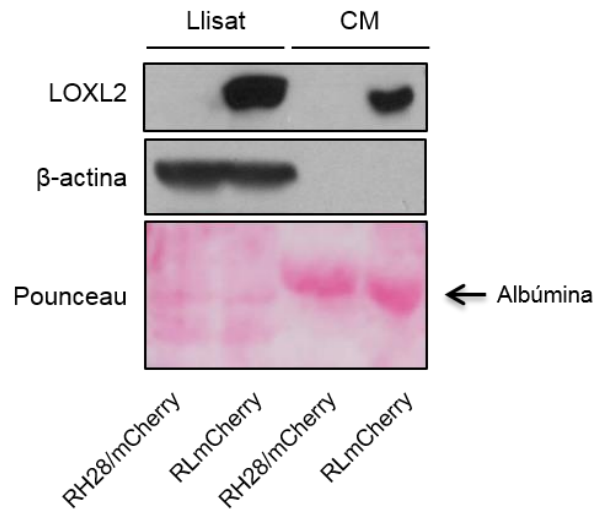


Figura R27: *Western blot* representatiu mostrant els nivells de LOXL2 (l·lisat cel·lular, carril 1 i 2, i CM, carril 3 i 4) en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la β -actina (per als l·lisats) i la tinció amb vermell de Ponceau (per als CM).

Posteriorment, per tal de caracteritzar la localització de LOXL2 en aquest model, es van observar les cèl·lules en un microscopi de fluorescència (Figura R28). En les cèl·lules control, mCherry s'expressa en el citoplasma i en el nucli. Pel que fa a LOXL2/mCherry, també es va observar una localització similar però amb zones citoplasmàtiques on el marcatge formava grups més intensos.

RESULTATS

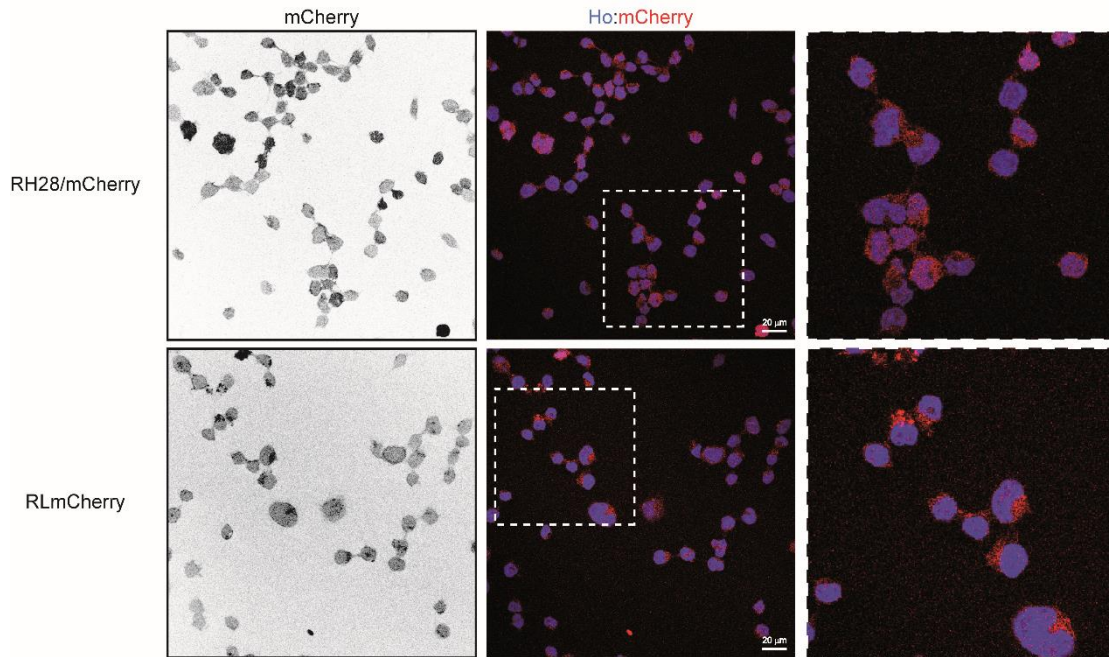


Figura R28: Imatges representatives de les immunofluorescències de mCherry en el model de reintroducció *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 µm.

Tot seguit, es va caracteritzar el fenotip neoplàstic en aquest model. De forma estranya, les cèl·lules control RH28/mCherry van formar colònies en sembrar-les a baixa densitat, a diferència de les RLMCherry (Figura R29A). En aquest cas, el vector control va causar un efecte en comparació a la línia parental RH28, la qual tal i com s'ha mostrat anteriorment, no forma colònies. Tanmateix, no es van observar diferències en els experiments de proliferació entre les cèl·lules RLMCherry i les cèl·lules control (Figura R29B).

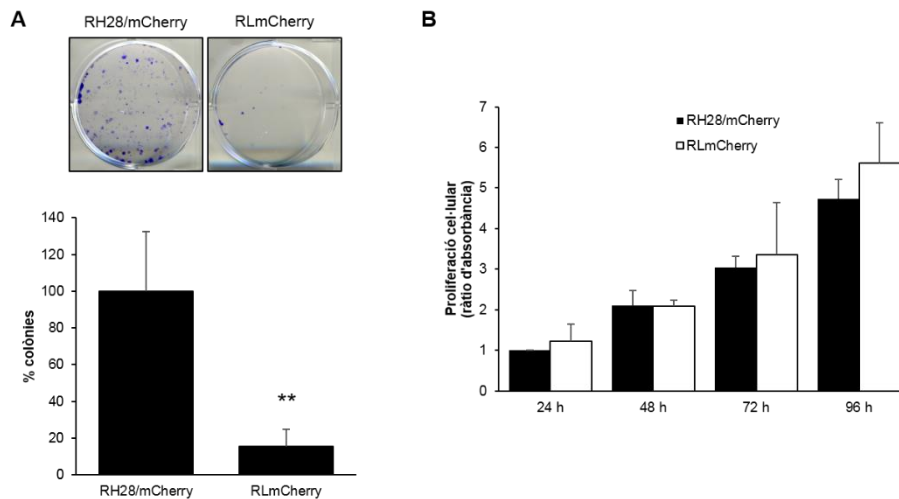


Figura R29: A) Assaig clonogènic (21 dies de creixement) en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Superior: imatges representatives; inferior: quantificació de l'assaig clonogènic. **B)** Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control (RH28mCherry) a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a RH28/mCherry): ** $p \leq 0,005$.

Posteriorment, es van dur a terme experiments de migració i invasió. Les cèl·lules RLmCherry van presentar una major ràtio de migració (Figura R30A) i invasió (Figura R30B) que les cèl·lules control RH28/mCherry. En conjunt, els resultats obtinguts en aquest model de reintroducció *LOXL2/mCherry* no presenten la mateixa robustesa que el model *LOXL2/FLAG*, observant canvis en migració i invasió cel·lular però a uns nivells inferiors que en el model anterior.

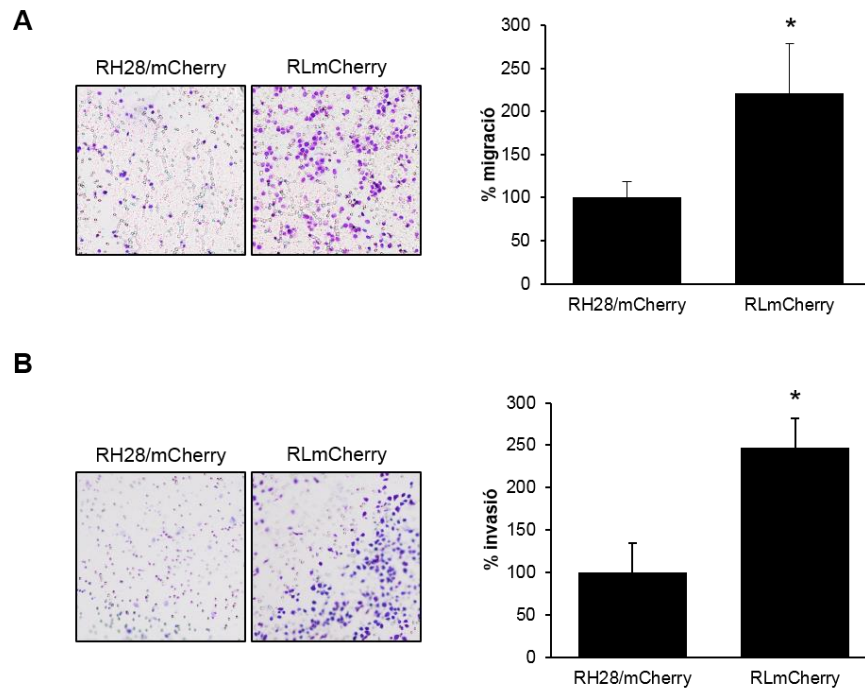


Figura R30: A) Assaig de migració en càmera de Boyden (48 h) en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Esquerra: imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X); dreta: representació gràfica de la quantificació. **B)** Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel (72 h) en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry) en la línia cel·lular RH28. RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Esquerra: imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X); dreta: representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a RH28/mCherry): * $p \leq 0,05$.

9. LA REINTRODUCCIÓ DE *LOXL2* EN LA LÍNIA RH28 INCREMENTA LA INCIDÈNCIA I EL NOMBRE DE METÀSTASIS ESPONTÀNIES *IN VIVO*

Després d'observar els efectes de silenciar o reintroduir *LOXL2 in vitro*, es va realitzar un experiment *in vivo* amb les cèl·lules del model de reintroducció *LOXL2/FLAG*.

El nostre grup de recerca ha desenvolupat prèviament un model de metàstasi ortotòpic que permet detectar la formació de metàstasis pulmonars espontànies³⁴⁷. El model consisteix en injectar dos milions de cèl·lules al múscul gastrocnemi dret de l'extremitat posterior de ratolins atímics. Concretament, es van injectar: cèl·lules control RH28 i RH28/FLAG; i cèl·lules transfectades amb *LOXL2/FLAG*: un clon *LOXL2 wt*, RLwt1, i un clon *LOXL2* mutant d'oxidació, RLoxmut12. Cada 48 h es va monitoritzar el creixement tumoral i quan els tumors van assolir la mida crítica (uns 800 mm³) es va

extreure el tumor primari. Cal destacar que l'extracció del tumor primari permet evitar l'eutanàsia dels animals i incrementar el temps per a la formació de metàstasis pulmonars. A més, després de la intervenció és important assenyalar que els animals mantenen l'extremitat completament funcional.

En l'experiment, l'extracció de tumors primaris va ser entre els dies 25 i 45 post-injecció. Es va observar una tendència: el percentatge de ratolins on el tumor va assolir la mida crítica era major en els que tenien tumors amb cèl·lules transfectades amb *LOXL2*, donant-los-hi cert avantatge tumorigènic (Figura R31). No obstant, les diferències no van ser significatives ja que el percentatge de ratolins operats a dies posteriors es va igualar entre els ratolins amb cèl·lules control i cèl·lules transfectades amb *LOXL2*.

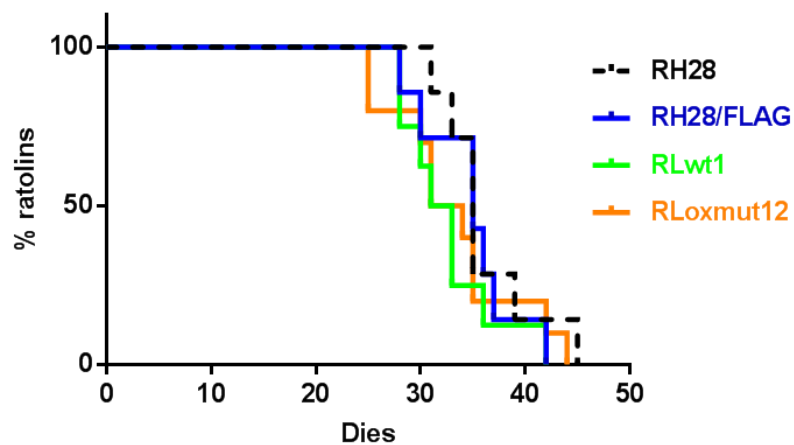


Figura R31: Gràfica que representa el percentatge de ratolins no operats al llarg dels diferents dies. RLwt1: clon *LOXL2 wt*; RLoxmut12: clon *LOXL2* mutant d'oxidació; RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Càlcul estadístic Mantel-Cox en relació a RH28/FLAG ($p > 0,05$).

Després de l'extracció de tumors, aquests van ser analitzats mitjançant tinció amb H&E (Figura R32A) i immunofluorescència (Figura R32B). En la tinció H&E no es van observar diferències entre els tumors. Pel que fa a la immunofluorescència anti-*LOXL2*, va mostrar com les cèl·lules transfectades amb *LOXL2* tenien una expressió variable d'aquesta proteïna, i a més, la localització de *LOXL2* era principalment citoplasmàtica. Al contrari que en el model cel·lular de RH28, sí es va poder optimitzar l'ús de l'anticòs per a immunofluorescència en teixit.

RESULTATS

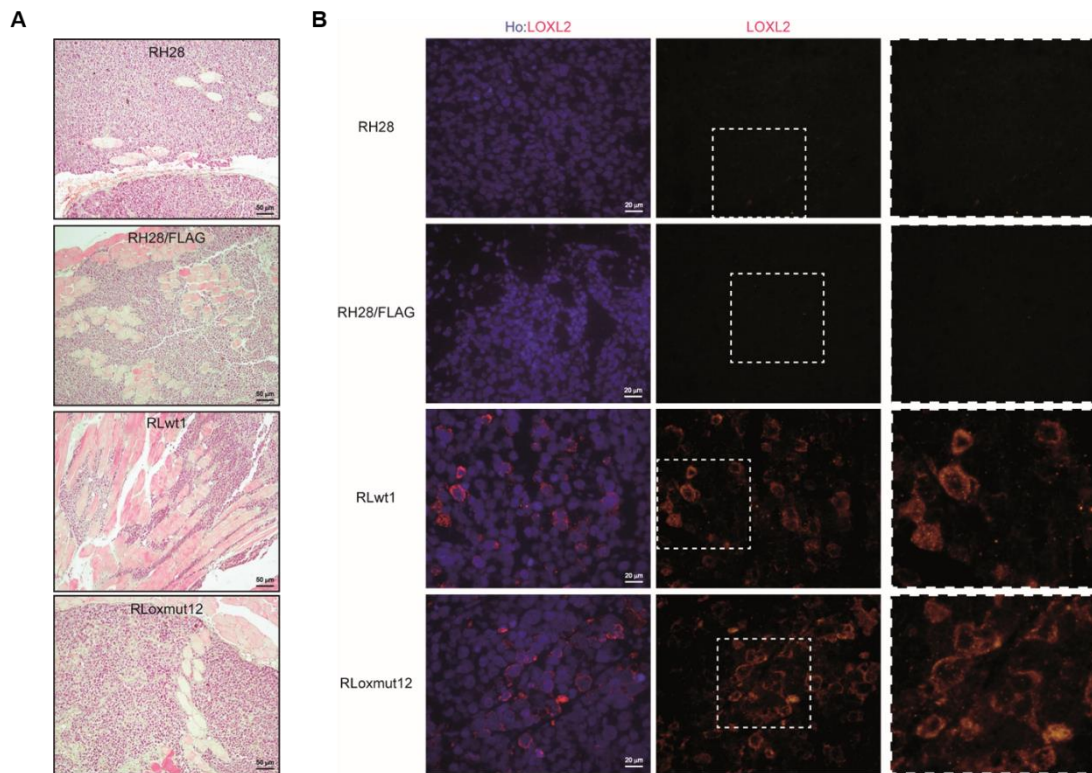


Figura R32: A) Fotografies representatives del teixit tumoral en l'assaig de metàstasi ortotòpic del model de reintroducció de *LOXL2 wt* (RLwt1) i del mutant d'oxidació (RLoxmut12). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Tinció hematoxilina i eosina (H&E). Escala: 50 µm. **B)** Imatges representatives de les immunofluorescències de LOXL2 en les mostres de tumors de l'assaig de metàstasi ortotòpic del model de reintroducció de *LOXL2 wt* (RLwt1) i del mutant d'oxidació (RLoxmut12). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 µm.

Passats 90 dies de la injecció inicial es va realitzar la eutanàsia dels animals i la necròpsia, buscant possibles metàstasis visibles a ull nu en tots els òrgans viscerals. Donat que no se'n van observar, i que els pulmons són el principal òrgan metastàtic del RMS, aquests es van extreure per posteriorment detectar l'existència de metàstasis visibles al microscopi (micrometàstasis). Histològicament es va trobar una incidència de metàstasis pulmonars d'entre un 20 i un 50 % en els ratolins amb les cèl·lules control. En canvi, aquest percentatge va ser del 100 i 90 % en els ratolins amb cèl·lules LOXL2, RLwt1 i RLoxmut12, respectivament (Figura R33A). Així doncs, les cèl·lules amb LOXL2, independentment de la seva capacitat catalítica, van presentar un increment en el percentatge d'incidència de metàstasis pulmonars espontànies. Paral·lelament, es va realitzar un recompte del nombre de

micrometàstasis en les seccions analitzades de cada ratolí. D'aquesta manera, es va observar un increment significatiu en el número de metàstasis per ratolí en aquells injectats amb cèl·lules que expressen LOXL2 *wt* i LOXL2 mutant d'oxidació. No obstant, la mitjana del nombre de metàstasis pulmonars per ratolí va ser superior en els LOXL2 *wt* (Figura R33B).

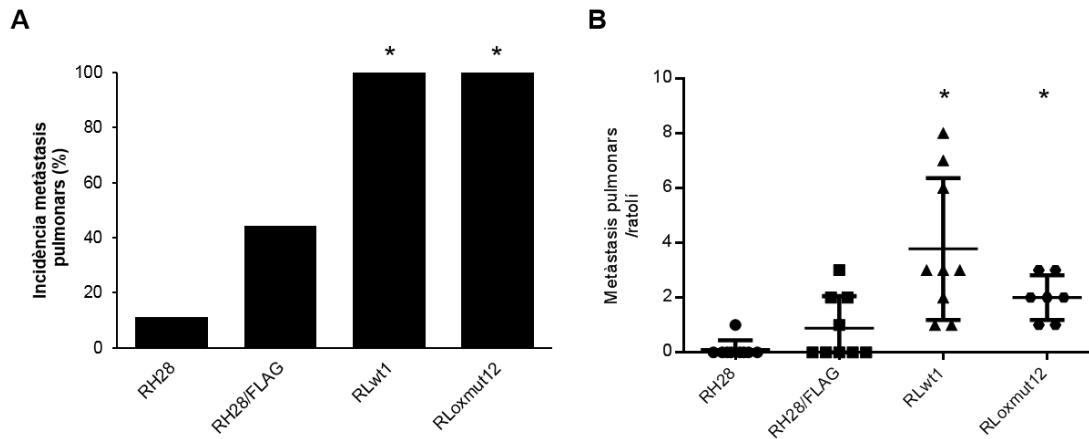


Figura R33: A) Incidència de metàstasis pulmonars en l'assaig de metàstasis espontànies en ratolins atímics. Injecció de cèl·lules tumorals al múscul gastrocnemi utilitzant el model de reintroducció de LOXL2 *wt* (RLwt1) i del mutant d'oxidació (RLoxmut12). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. n=9. Test exacte de Fisher (en relació a RH28/FLAG): * $p \leq 0,05$. **B)** Recompte del número de metàstasis pulmonars per ratolí en el mateix experiment. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): * $p \leq 0,05$.

Finalment, es mostren imatges representatives de la tinció H&E del teixit pulmonar dels ratolins injectats amb les cèl·lules tumorals controls o que expressen LOXL2, on es pot observar la presència de micrometàstasis (Figura R34). Tanmateix, aquests teixits es van analitzar per immunofluorescència i es va observar com les metàstasis en ratolins injectats amb cèl·lules LOXL2 mantenen l'expressió d'aquesta proteïna, tenint un marcatge citoplasmàtic igual que en el tumor primari (Figura R35). Aquest marcatge es veia molt més clar en metàstasis més grans i aïllades, ja que les cèl·lules de pulmó també expressen LOXL2 i això dificultava la distinció entre cèl·lules tumorals i pulmonars en les metàstasis més petites.

RESULTATS

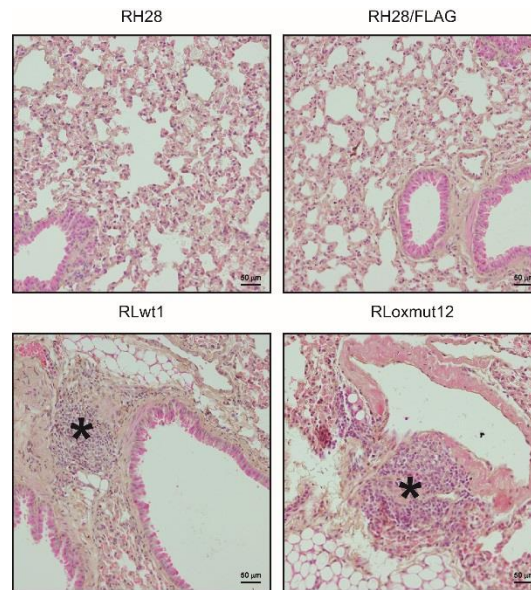


Figura R34: Imatges representatives (tinció H&E) del teixit pulmonar en l'assaig de metàstasi ortotòpic utilitzant el model de reintroducció de *LOXL2* wt (RLwt1) i del mutant d'oxidació (RLoxmut12). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Es marquen amb un asterisc les metàstasis pulmonars. Escala: 50 µm.

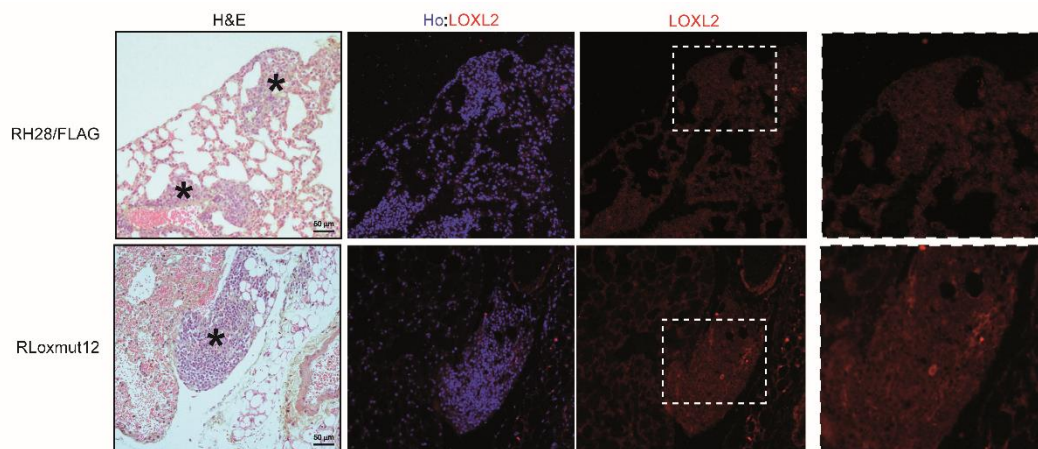


Figura R35: Imatges representatives obtingudes per immunofluorescència del teixit pulmonar en l'experiment de metàstasi ortotòpic. Es mostra la tinció hematoxilina i eosina (H&E) i la immunofluorescència anti-LOXL2 en un altre tall histològic de la mateixa secció. El teixit prové d'un ratolí on es van injectar cèl·lules RH28/FLAG o RLoxmut12, LOXL2 mutant d'oxidació. Es marquen amb un asterisc les metàstasis pulmonars. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 50 µm.

10. EL SILENCIAMENT O LA REINTRODUCCIÓ DE *LOXL2* EN LES LÍNIES D'ARMS NO ALTERA L'EXPRESSIÓ DELS ALTRES MEMBRES DE LA FAMÍLIA *LOX*

En resultats anteriors (veure Resultats, capítol 5) s'ha mostrat l'expressió dels diferents membres de la família *LOX* en les línies de RMS. Després de caracteritzar els models de silenciament i reintroducció de *LOXL2*, es va determinar si en silenciar o reintroduir *LOXL2* hi havia algun canvi en els altres membres de la família.

Així doncs, en les següents gràfiques (Figura R36A-E) es mostra la ràtio d'expressió de *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* i *LOXL4* obtinguda per RT-qPCR en el model de silenciament de RH4 i calculada en referència a les cèl·lules control RH4/SCR. En els clons de silenciament de *LOXL2*, RshL#, només es va observar una reducció significativa en els nivells de *LOXL2*, però no es van detectar canvis significatius en els altres membres de la família.

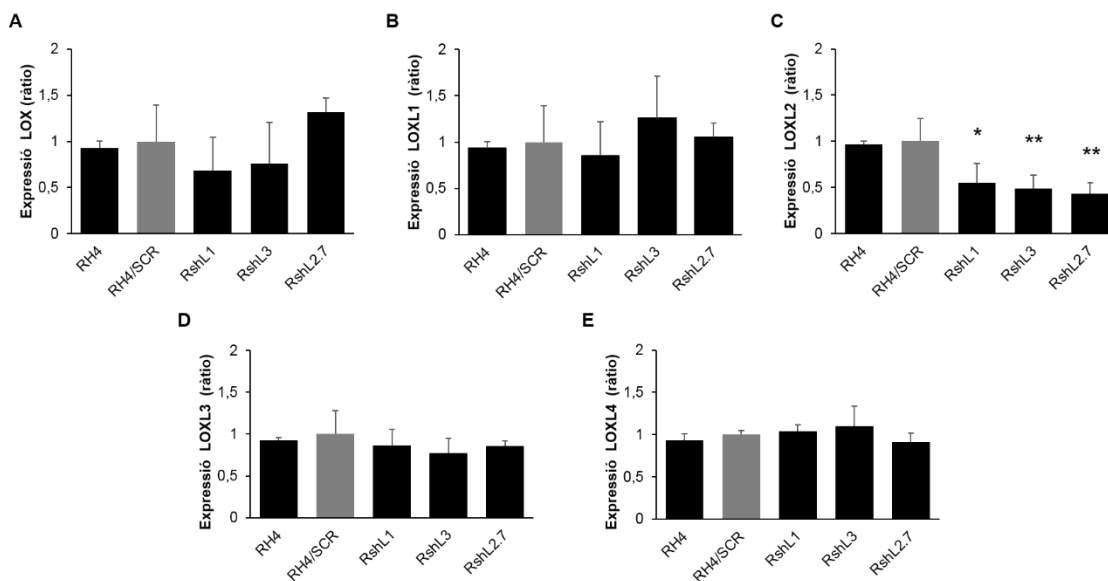


Figura R36: Expressió relativa (respecte a cèl·lules transfectades amb un plasmidi control: RH4/SCR) del nivells d'ARNm dels membres de la família *LOX* (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* i *LOXL4*) mitjançant RT-qPCR en els clons de silenciament de *LOXL2* del model RH4 (RshL#). Prova *t* de Student (en relació a RH4/SCR): * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$.

Altrament, també es va determinar l'expressió de *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* i *LOXL4* en el model de reintroducció de *LOXL2* en RH28. La ràtio d'expressió es va calcular en referència a les cèl·lules control RH28/FLAG (Figura R37A-F). La reintroducció de *LOXL2* no va provocar canvis significatius en els nivells d'ARNm dels

RESULTATS

altres membres de la família *LOX*. Només es va observar, tal i com s'esperava, un increment en els nivells de *LOXL2* de les cèl·lules transfectades amb *LOXL2 wt* o *LOXL2* mutant d'oxidació (Figura R37C i F). En conjunt, els resultats demostren com els canvis d'expressió en *LOXL2* no afecten els altres membres de la família *LOX*.

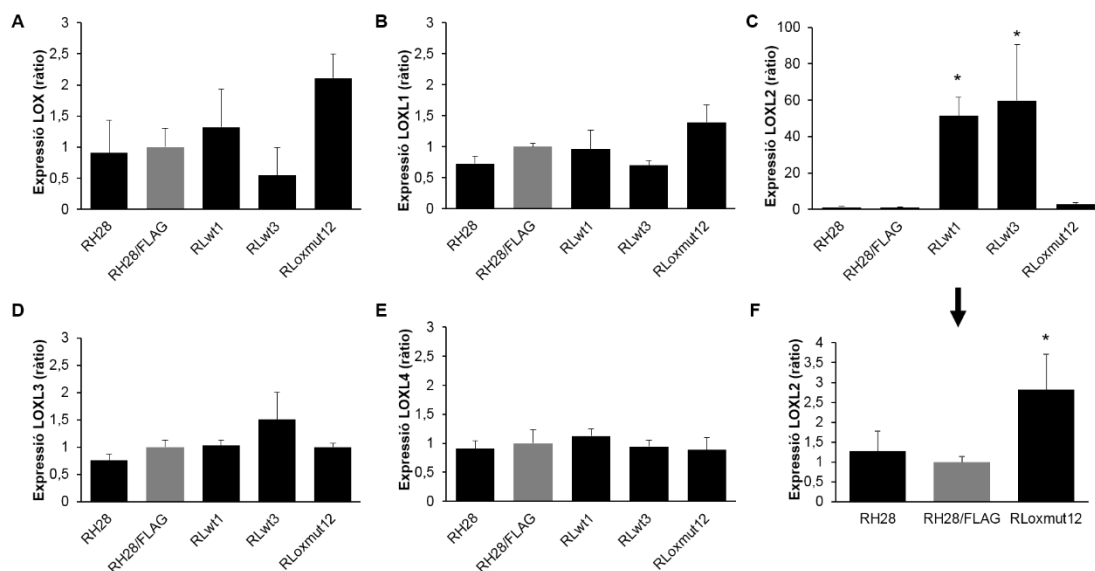


Figura R37: Expressió relativa (respecte a cèl·lules transfectades amb un plasmidi control: RH28/FLAG) del nivells d'ARNm dels membres de la família *LOX* (*LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* i *LOXL4*) mitjançant RT-qPCR en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (clons RLwt1 i RLwt3) i mutant d'oxidació (clon RLoxmut12). L'expressió de *LOXL2* (C) es torna a mostrar en la gràfica (F), eliminant els clons RLwt1 i RLwt3 els quals presenten uns nivells d'expressió molt més elevats. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): * $p \leq 0,05$.

11. LOXL2 SECRETAT NO ÉS INTERNALITZAT

Degut a les múltiples localitzacions de *LOXL2* (citoplasma, nucli, cromatina i secretat al medi extracel·lular) i que la seva funció varia depenent la seva localització, es va aprofundir en aquest aspecte i es va determinar si *LOXL2* extracel·lular podia ser internalitzat. Amb aquesta finalitat, l'experiment que es va plantejar és el següent: es van recollir CM de cèl·lules control, RH28 i RH28/FLAG, així com també de cèl·lules transfectades amb *LOXL2 wt* (clons RLwt#) i mutant d'oxidació (clons RLoxmut#). Posteriorment, les cèl·lules RH28 van ser tractades amb aquests CM durant 48 h i després es van recollir els pèl·lets cel·lulars i els CM. Finalment, l'expressió de *LOXL2* es va comprovar per *western blot* en els CM (Figura R38A) i en els extractes proteics (Figura R38B). En aquests últims no es va detectar *LOXL2*, suggerint que les cèl·lules no són capaces d'internalitzar-lo.

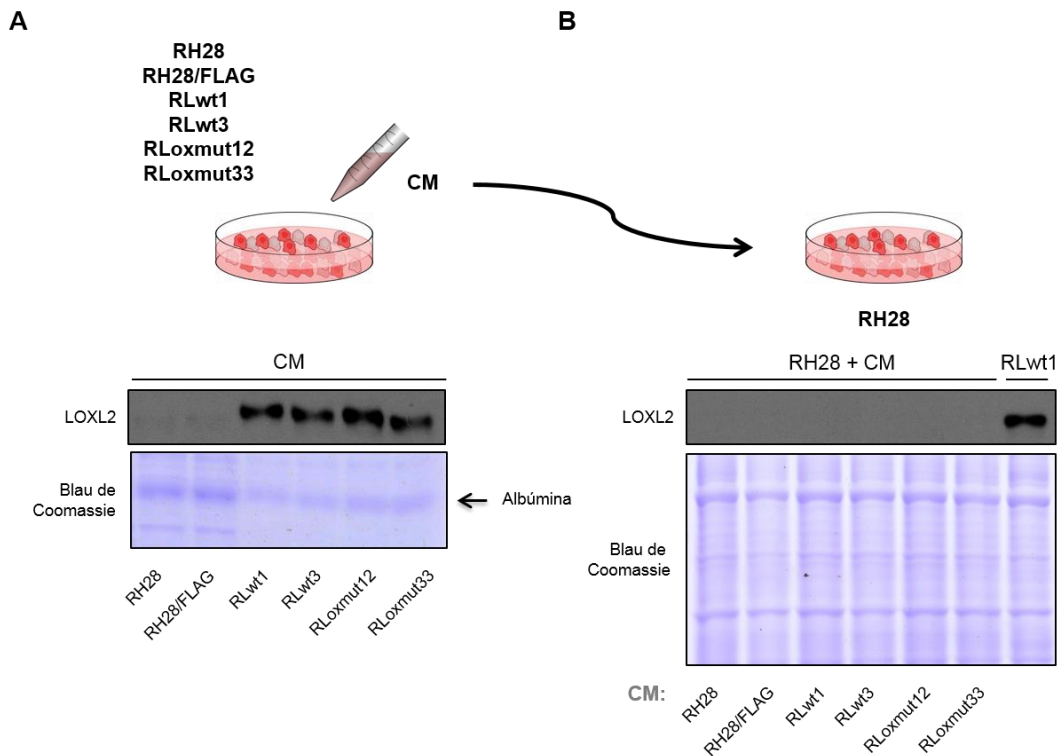


Figura R38: Les cèl·lules RH28 van ser tractades durant 48 h amb CM (medis condicionats) provinents del model de reintroducció de *LOXL2* wt (RLwt1 i RLwt3), mutant d'oxidació (RLoxmut12, RLoxmut33) i cèl·lules control (RH28 i RH28/FLAG) **A)** Comprovació per *western blot* de l'expressió de LOXL2 en els CM (48 h sense FBS) del model de reintroducció *LOXL2* wt (RLwt#) i mutant d'oxidació (RLoxmut#). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Control de càrrega: albúmina (tinció amb blau de Coomassie). **B)** Expressió per *western blot* de LOXL2 en cèl·lules RH28 tractades amb els diferents CM de A). Control de càrrega: tinció amb blau de Coomassie; control positiu: cèl·lules RLwt1.

12. UN MUTANT NO SECRETABLE DE LOXL2 INCREMENTA LA CAPACITAT MIGRATÒRIA I INVASIVA DE CÈL·LULES RH28 PERÒ NO LA PROLIFERATIVA I CLONOGÈNICA

Després de descartar que LOXL2 secretat s'internalitzi, es va obtenir mitjançant mutagènesi dirigida un mutant no secretable de LOXL2, per tal de distingir quines són les funcions intracel·lulars i extracel·lulars de LOXL2.

Amb la finalitat d'inhibir la secreció de LOXL2 es van dissenyar mutants en els residus N-glicosilats de LOXL2, modificació que ja s'ha comprovat anteriorment que és essencial per a la secreció d'aquesta proteïna (veure Figura R6). Concretament, s'han descrit tres residus potencialment N-glicosilats en LOXL2: N288, N455 i N644, no obstant, solament els dos darrers han estat comprovats per MS³⁴⁸. Tenint en compte

RESULTATS

això, es va dissenyar un mutant doble amb mutacions puntuals en els residus N455 i N644, per tal de mutar els residus d'asparagina pel residu no glicosilable glutamina: N455/644Q. A més, es va obtenir un mutant triple no secretable amb mutacions puntuals en els tres residus potencialment N-glicosilats, també mutant les asparagines per glutamines: N288/455/644Q. La mutagènesi dirigida es va dur a terme en el constructe *LOXL2wt/FLAG* (Figura R39A).

Els vectors resultants de la mutagènesi dirigida es van transfectar en cèl·lules RH28, anomenant RLsecmut2x al *pool* de cèl·lules amb el vector *LOXL2* mutant doble de secreció i RLsecmut3x al *pool* de cèl·lules amb el vector *LOXL2* mutant triple de secreció.

Inicialment, es va comprovar l'expressió de *LOXL2* per *western blot* en extractes proteics i CM d'ambdós mutants. En primer lloc, es va observar que *LOXL2* dels mutants de secreció és estable. A la vegada, per *western blot* dels CM es va poder veure com RLsecmut2x secretava menys *LOXL2* que el control positiu RLwt1. En canvi, RLsecmut3x no secretava *LOXL2* al medi extracel·lular. Així doncs, es va aconseguir inhibir majoritàriament la secreció de *LOXL2* en el mutant triple de secreció RLsecmut3x, i parcialment en el mutant doble de secreció RLsecmut2x (Figura R39B).

Posteriorment, es va caracteritzar el fenotip neoplàstic en els mutants no secretables de *LOXL2*. Pel que fa a la capacitat clonogènica, RLsecmut2x i RLsecmut3x no van formar colònies (Figura R40), igual que la línia parental RH28 i les cèl·lules control RH28/FLAG, i a diferència de cèl·lules amb *LOXL2 wt* o *LOXL2* mutant d'oxidació.

Paral·lelament, en assajos de proliferació es va observar que els mutants de secreció tenien les mateixes ràtios de proliferació que les cèl·lules control (Figura R41), amb un lleuger increment però de forma no significativa, a diferència de com s'havia observat prèviament en les cèl·lules transfectades amb *LOXL2*, *wt* o mutant de l'activitat catalítica, les quals proliferaven més.

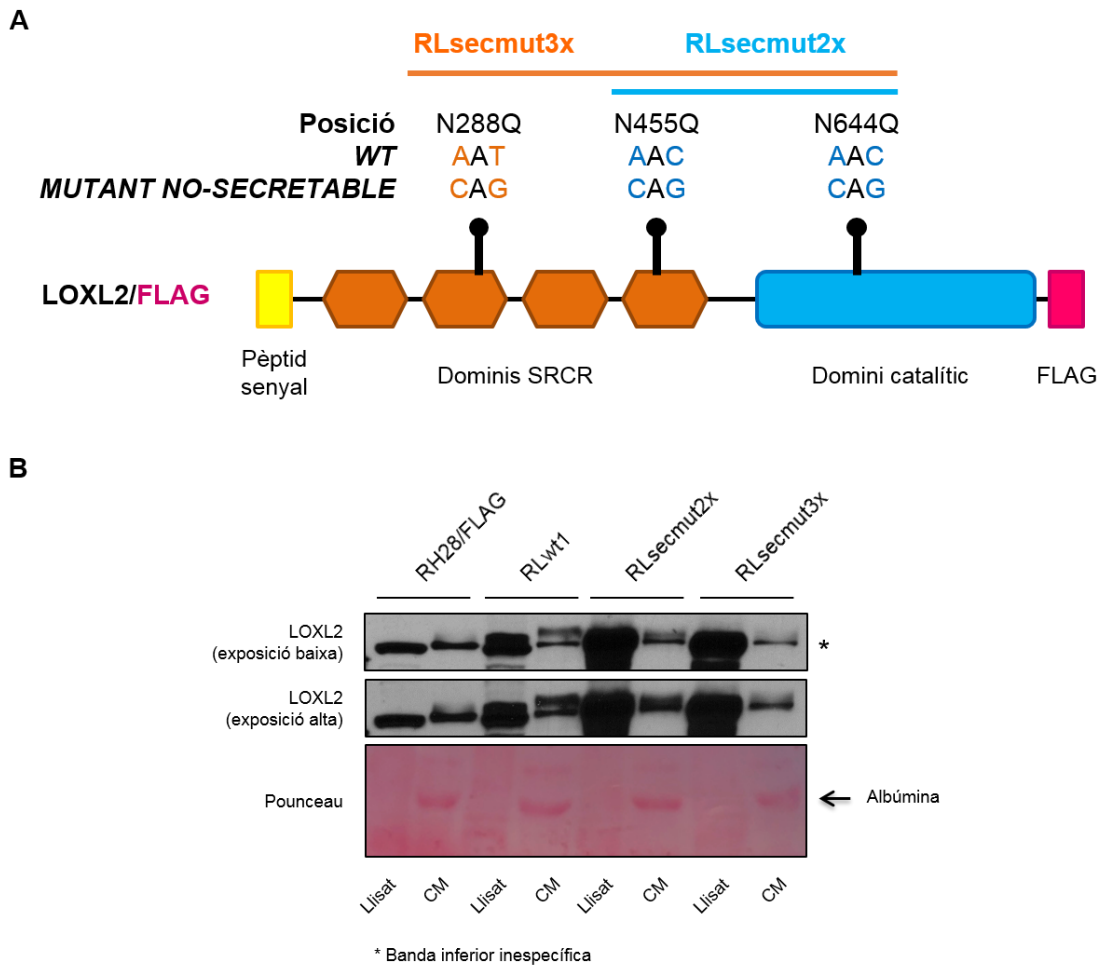


Figura R39: A) Esquema de la mutagènesi dirigida per canviar els residus d'asparagina potencialment N-glicosilats (N288, N455 i N644) per glutamina en LOXL2. El mutant doble de glicosilació (RLsecmut2x) inclou les mutacions N455Q i N644Q, mentre que el triple (RLsecmut3x) a més té la mutació N288Q. L'esquema inclou l'estructura de LOXL2: pèptid senyal, dominis SRCR (receptors *scavenger* rics en cisteïna), domini catalític i *tag* FLAG. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en extractes proteics i en els CM (medis condicionats; 48 h en absència de FBS) del model de reintroducció estable dels mutants de secreció de LOXL2. RLsecmut2x i RLsecmut3x corresponen als mutants de secreció de LOXL2 doble i triple respectivament. RLwt1: clon LOXL2 *wt* utilitzat com a control positiu; RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar l'albumina (tinció amb vermell de Ponceau).

RESULTATS

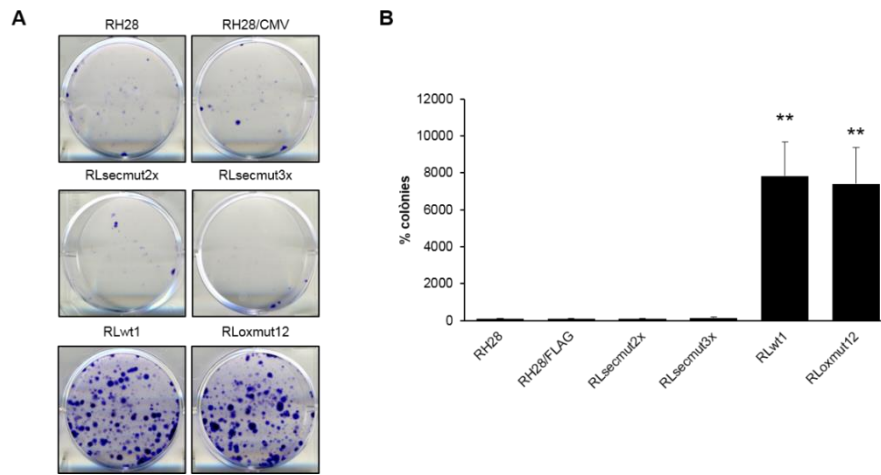


Figura R40: **A)** Imatges representatives d'un assaig clonogènic (21 dies de creixement) en el model de reintroducció estable dels mutants de secreció de LOXL2. **B)** Quantificació de l'assaig clonogènic. RLsecmut2x i RLsecmut3x corresponen als mutants de secreció de LOXL2 doble i triple respectivament. RLwt1 (clon LOXL2 *wt*) i RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) utilitzats com a controls positius; RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

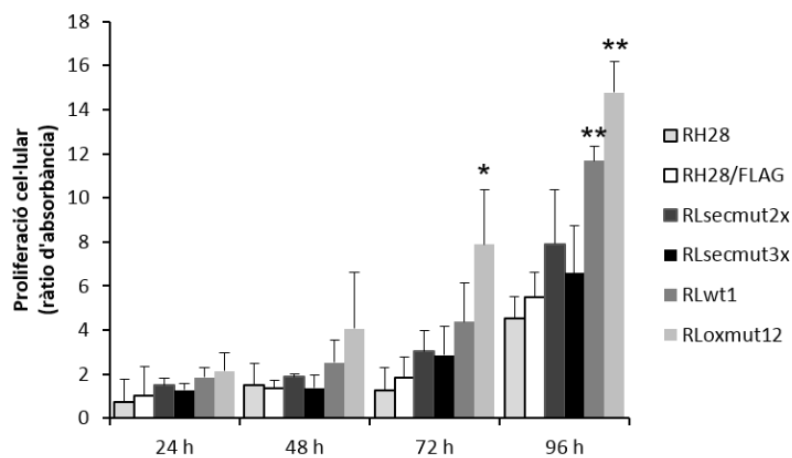


Figura R41: Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 en el model de reintroducció estable dels mutants de secreció de LOXL2. RLsecmut2x i RLsecmut3x corresponen als mutants de secreció de LOXL2 doble i triple respectivament. RLwt1 (clon LOXL2 *wt*) i RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) utilitzats com a controls positius. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control (RH28/FLAG) a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

A continuació, es van dur a terme assajos de migració i d'invasió. En ambdós mutants de secreció es va observar un increment significatiu en la migració (Figura R42) i en la invasió cel·lular (Figura R43), al mateix nivell que clons LOXL2 *wt* o mutant d'oxidació.

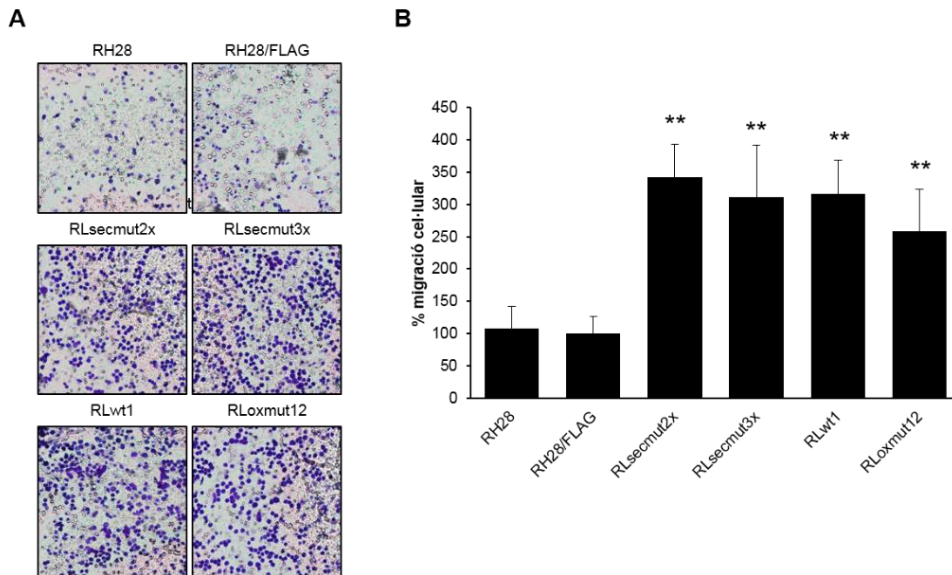


Figura R42: Assaig de migració en càmera de Boyden (48 h) en el model de reintroducció estable dels mutants de secreció de LOXL2. RLsecmut2x i RLsecmut3x corresponen als mutants de secreció de LOXL2 doble i triple respectivament. RLwt1 (clon LOXL2 *wt*) i RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) utilitzats com a controls positius; RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

RESULTATS

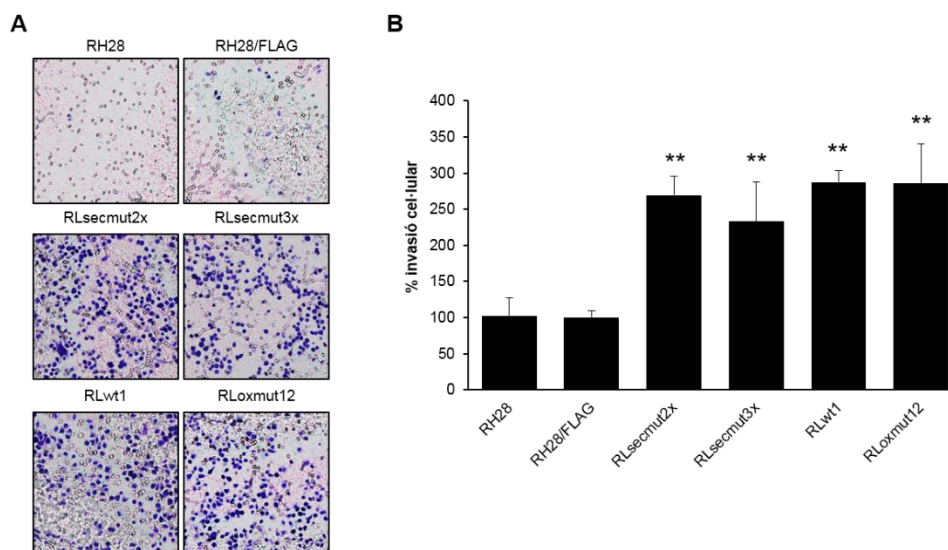


Figura R43: Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel (72 h) en el model de reintroducció estable dels mutants de secreció de LOXL2. RLsecmut2x i RLsecmut3x corresponen als mutants de secreció de LOXL2 doble i triple respectivament. RLwt1 (clon LOXL2 wt) i RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) utilitzats com a controls positius; RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **A)** Imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): ** $p \leq 0,005$.

En conjunt, els dos mutants de secreció RLsecmut2x i RLsecmut3x van presentar el mateix comportament *in vitro*, produint un increment en la migració i invasió cel·lular, igual que els clons del model de reintroducció *LOXL2/FLAG* en RH28. No obstant, aquests mutants no van ser capaços d'incrementar ni la capacitat clonogènica de les cèl·lules ni la proliferació cel·lular.

Després d'obtenir aquests resultats, ens vam plantejar dues hipòtesis: o bé LOXL2 secretat és necessari per incrementar la proliferació i la capacitat clonogènica de les cèl·lules, mentre que LOXL2 intracel·lular és suficient per promoure la migració i invasió cel·lular, o bé LOXL2 intracel·lular no glicosilat veu parcialment afectada la seva funció, produint un increment en la migració i invasió però no en la proliferació i la capacitat clonogènica.

Amb el propòsit d'explicar els resultats anteriors, es van tractar cèl·lules RH28 amb 2 µg/mL de LOXL2 recombinant humà (hLOXL2r) durant diferents temps (des de les 6h fins les 168 h). Paral·lelament, com a control es va incubar medi RPMI amb la mateixa concentració de hLOXL2r durant 72 h. En analitzar l'expressió de hLOXL2r

per *western blot* es va observar LOXL2 total i la banda de proteòlisi (Figura R44A), igual que LOXL2 endògena. Les dues formes es van detectar també en el medi RPMI, indicant que el processament no és dependent de les cèl·lules. A més, es va determinar que hLOXL2r es mantenia estable fins a l'últim temps analitzat, 168 h (Figura R44A).

Posteriorment, es va tractar el mutant triple de secreció RLsecmut3x i cèl·lules control RH28/FLAG amb la mateixa concentració de hLOXL2r. Es va dur a terme un assaig de proliferació amb WST-1 i no es van observar diferències en tractar amb hLOXL2r (Figura R44B). Per tant, es va confirmar que LOXL2 intracel·lular no glicosilat tenia una afectació parcial de les seves funcions sense poder promoure la proliferació i capacitat clonogènica cel·lular però sí la migració i invasió. Dit d'una altra manera, la glicosilació de LOXL2 no és solament important per a la seva secreció, sinó també per a la seva funció.

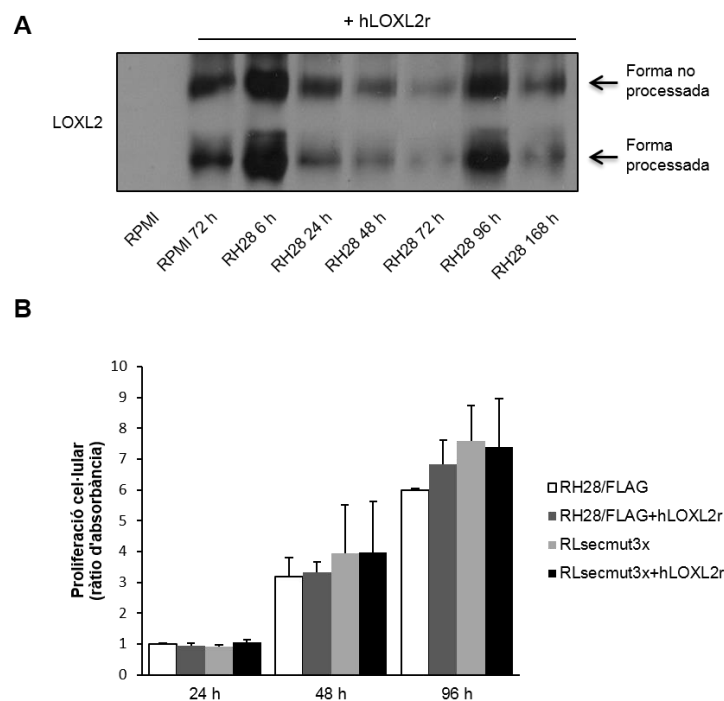


Figura R44: A) *Western blot* de l'expressió de LOXL2 (forma total i forma processada) en tractar amb 2 µg/mL de LOXL2 recombinant humà (hLOXL2r). hLOXL2r es va afegir en medi de cultiu sol (RPMI) o en cèl·lules que no expressen LOXL2 (RH28) i es va analitzar la seva estabilitat al llarg de diferents temps (de 6 a 168 h). **B)** Assaig de proliferació durant 96 h mitjançant el reactiu WST-1 en tractar cèl·lules RH28/FLAG i RLsecmut3x (mutant de secreció triple de LOXL2) amb 2 µg/mL de hLOXL2r. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules RH28/FLAG a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a RH28/FLAG): $p > 0,05$.

13. EL SILENCIAMENT TRANSITORI DE *LOXL2* EN EL MODEL DE REINTRODUCCIÓ RH28 *LOXL2/FLAG* REVERTEIX ELS EFECTES OBSERVATS

Amb l'objectiu de corroborar la funció oncogènica de *LOXL2* en ARMS i reforçar els resultats previs obtinguts, es va inhibir transitòriament *LOXL2* mitjançant ARNsi (siLOXL2) en el model de reintroducció en RH28. Concretament, es van transfectar un clon *LOXL2 wt* (RLwt1), un clon mutant d'oxidació (RLoxmut12), el mutant triple de secreció (RLsecmut3x) i cèl·lules control RH28/FLAG. Després de 48 h de transfecció es va observar una reducció de l'expressió de *LOXL2* (Figura R45) en comparació a les cèl·lules transfectades amb un ARNsi control (siNT).

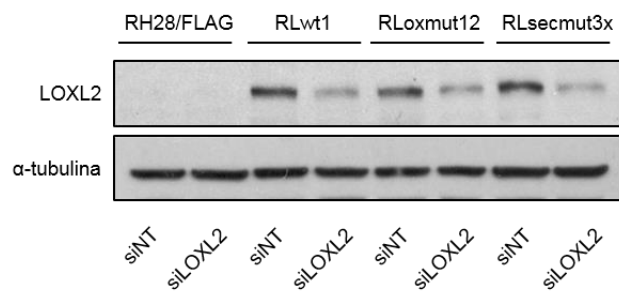


Figura R45: *Western blot* representatiu mostrant els nivells de *LOXL2* després de 48 h de la transfecció amb un ARNsi control (NT) o dirigit contra *LOXL2* (siLOXL2). RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (mutant de secreció triple de *LOXL2*) i RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

Tot seguit, es van realitzar experiments de proliferació, clonogenia, migració i invasió. Primer de tot, en l'assaig clonogènic el silenciament transitori de *LOXL2* no va tenir efectes en les cèl·lules control ni en el mutant triple de secreció, ja que tal i com hem vist prèviament no són capaces de formar colònies (Figura R46). No obstant, en els clons RLwt1 i RLoxmut12, on la capacitat clonogènica es veu augmentada, després de transfectar amb el siLOXL2 es va observar una disminució significativa en la formació de colònies, la qual va ser major en el clon RLwt1.

Pel que fa a la proliferació cel·lular, l'efecte va ser similar. No es van observar canvis en les cèl·lules control i el mutant de secreció triple, ja que no presenten una major ràtio de proliferació. En canvi, en els clons RLwt1 i RLoxmut12 es va detectar una lleugera reducció de la proliferació respecte les cèl·lules transfectades amb siNT: de forma significativa a les 24 h o 48 h, però no a majors temps (Figura R47).

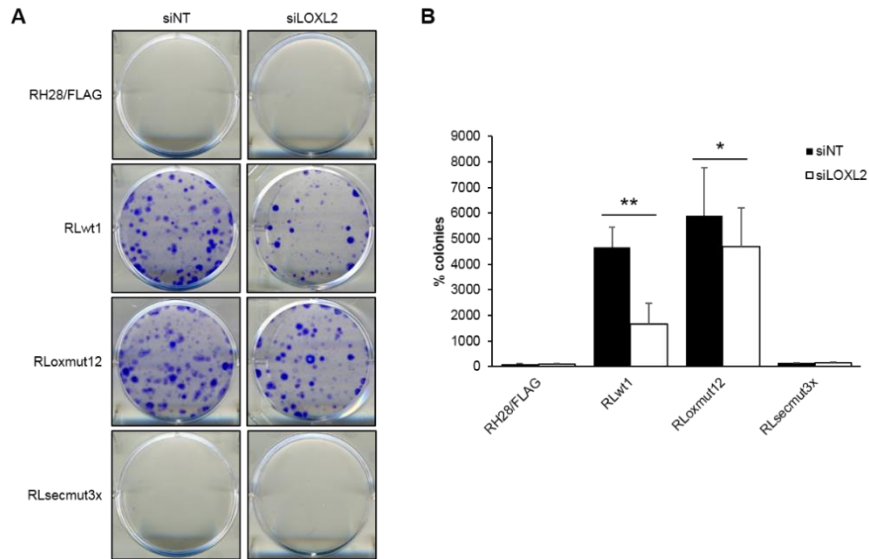


Figura R46: A) Imatges representatives d'un assaig clonogènic (21 dies de creixement) després de silenciar transitòriament *LOXL2* (siLOXL2) en els clons del model de reintroducció estable: RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (mutant de secreció triple de *LOXL2*) i en RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **B)** Quantificació de l'assaig clonogènic. Com a control de la transfecció es va utilitzar el siNT. Prova *t* de Student (en relació a siNT): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

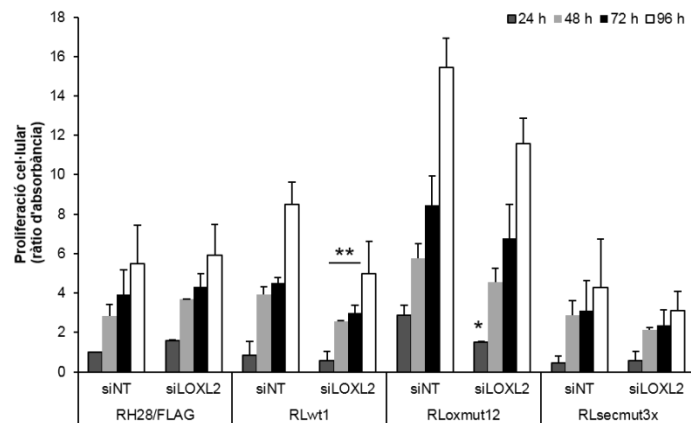


Figura R47: Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 després de silenciar transitòriament *LOXL2* (siLOXL2) en els clons del model de reintroducció estable: RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (mutant de secreció triple de *LOXL2*) i en RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules RH28/FLAG transfectades amb un ARNsi control (siNT) a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a siNT): ** $p \leq 0,05$.

RESULTATS

Seguidament, es van dur a terme assajos de migració. La inhibició transitòria de *LOXL2* en les cèl·lules on ja se'ls hi havia reintroduït va revertir significativament l'efecte (Figura R48). El mateix es va observar en els assajos d'invasió, on el silenciament de *LOXL2* reintroduït va revertir l'increment en la invasió a valors similars que les cèl·lules control (Figura R49).

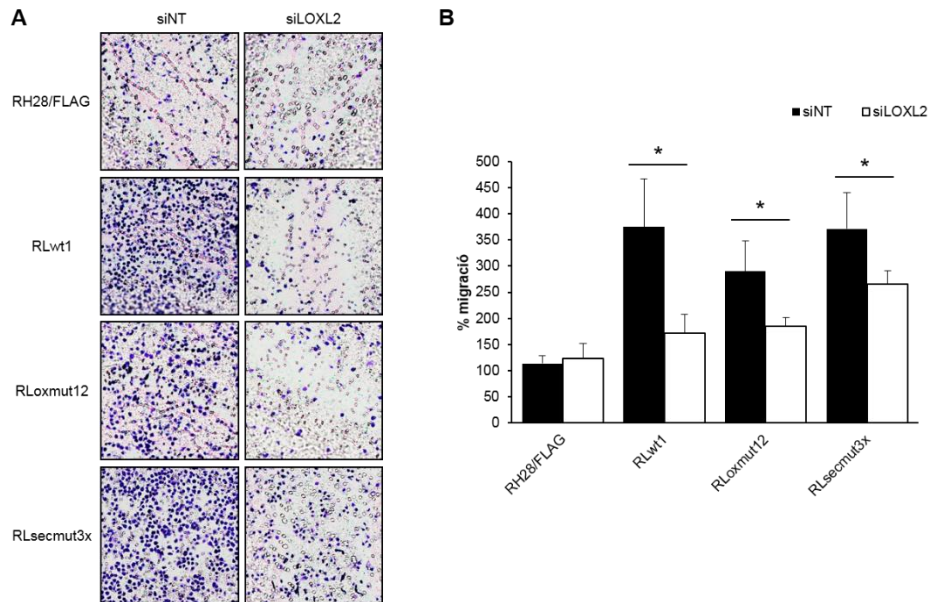


Figura R48: Assaig de migració en càmera de Boyden (48 h) després de silenciar transitòriament *LOXL2* (siLOXL2) en els clons del model de reintroducció estable: RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (mutant de secreció triple de *LOXL2*) i en RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **A**) Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B**) Representació gràfica de la quantificació. Com a control de la transfecció es va utilitzar el siNT. Prova *t* de Student (en relació a siNT): * $p \leq 0,05$.

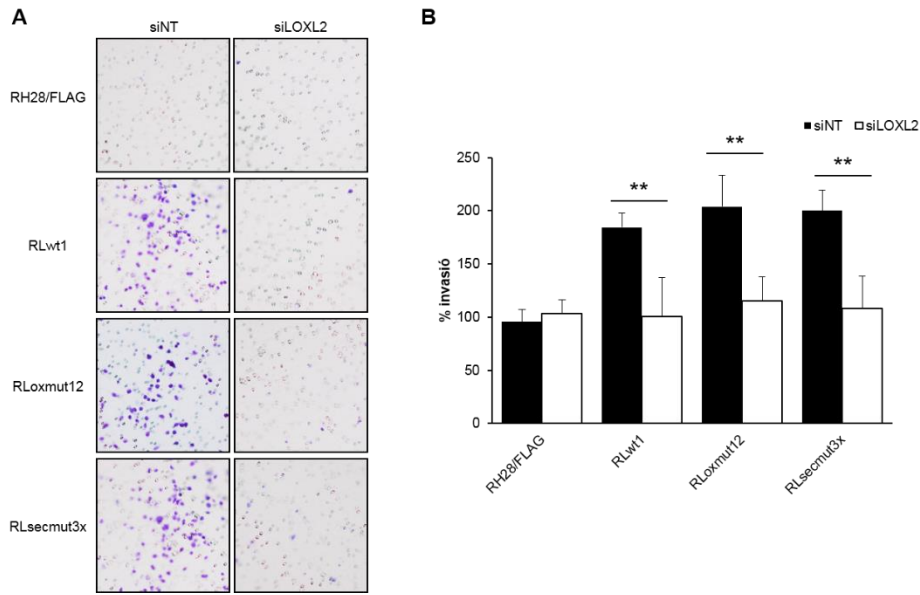


Figura R49: Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel (72 h) després de silenciar transitòriament *LOXL2* (siLOXL2) en els clons del model de reintroducció estable: RLwt1 (clon *LOXL2* wt); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (mutant de secreció triple de *LOXL2*) i en RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. **A)** Imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Com a control de la transfecció es va utilitzar el siNT. Prova *t* de Student (en relació a siNT): ** $p \leq 0,005$.

En conjunt, els efectes produïts per la reintroducció de *LOXL2* es van revertir parcialment mitjançant el silenciament transitori amb un ARNsi dirigit contra *LOXL2*. Més concretament, el principal efecte va ser en la migració i la invasió cel·lular, ja que en la proliferació i formació de colònies els canvis van ser molt menors.

14. IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES QUE PODEN INTERACCIONAR POTENCIALMENT AMB LOXL2: VIMENTINA COM A NOU PARTNER

Amb la finalitat d'identificar proteïnes que poden interaccionar amb LOXL2 es va dur a terme un estudi proteòmic. En primer lloc, es va realitzar un *pull down* utilitzant boles d'agarosa conjugades a anti-FLAG en un clon LOXL2 *wt*, RLwt1, un clon mutant d'oxidació, RLoxmut12, i en cèl·lules control RH28/FLAG. Mitjançant *western blot* es va comprovar la immunoprecipitació de LOXL2/FLAG (Figura R50), per posteriorment analitzar les mostres per MS.

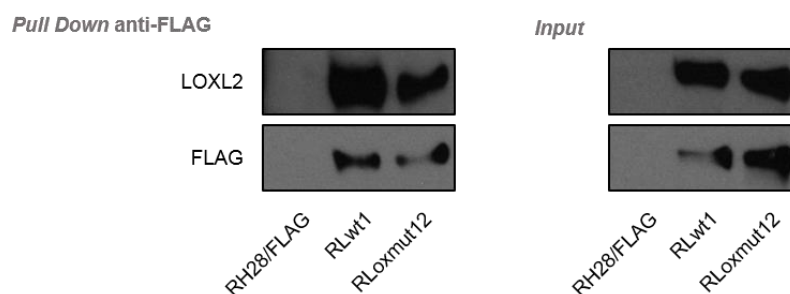


Figura R50: *Western blot* de l'expressió de LOXL2 i FLAG en el *pull down* anti-FLAG en dos clons del model de reintroducció de LOXL2: RLwt1 (LOXL2 *wt*) i RLoxmut12 (LOXL2 mutant d'oxidació). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. *Input*: extracte proteic emprat en el *pull down* anti-FLAG.

Els resultats ens van permetre elucidar proteïnes potencials d'interacció amb LOXL2. No obstant, la principal limitació de la tècnica és que moltes proteïnes es poden unir de forma inespecífica a les boles d'agarosa o al *tag*. A fi d'eliminar el màxim de contaminants, totes les proteïnes que eren en comú entre els clons LOXL2 i el control negatiu RH28/FLAG es van eliminar del llistat. A més, els resultats es van combinar amb els publicats a la base de dades pública CRAPome, eliminant altres proteïnes que en el nostre control negatiu no van aparèixer però de forma molt recurrent s'uneixen en els *pull down* anti-FLAG. Tot seguit es mostra la taula (Taula R2) on es recullen les proteïnes que es van trobar en comú en els clons RLwt1 i RLoxmut12, que a la vegada eren absents en el control negatiu, i després de comparar amb la base de dades CRAPome. La taula inclou el nom de la proteïna, el seu identificador, el % de *coverage* (% de seqüència identificada) i el nombre de pèptids identificats per MS. Cal destacar que LOXL2 es va detectar amb el *coverage* més alt i un total de 20-22 pèptids identificats. Cal fer esment que en l'Annex II s'inclou el llistat de totes les proteïnes obtingues.

Taula R2: Taula resum dels resultats obtinguts en l'anàlisi per MS de les mostres del *pull down* anti-FLAG. Es mostren proteïnes comuns en els clons RLwt1 i RLoxmut12 i absents en el control RH28/FLAG. La taula inclou el nom de la proteïna i el seu identificador. A més, s'especifica el % de *coverage* (COV.) i el nombre de pèptids identificats en LOXL2 wt i LOXL2 oxmut.

Identificador	Nom proteïna	% COV. LOXL2 wt	% COV. LOXL2 oxmut	Pèptids LOXL2 wt	Pèptids LOXL2 oxmut
LOXL2_HUMAN	Lysyl oxidase homolog 2	31,4	35,2	20	22
VIME_HUMAN	Vimentin	35,6	23	17	11
RBM10_HUMAN	RNA-binding protein 10	11,08	9,4	10	8
PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	11,14	16,1	8	8
PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	2,39	5,4	8	7
ARF3_HUMAN	ADP-ribosylation factor 3	24,2	21,7	4	6
SLAI2_HUMAN	SLAIN motif-containing protein 2	5,34	6	2	3

D'entre els diferents candidats d'unió a LOXL2, es va validar mitjançant *pull down* anti-FLAG i *western blot* (Figura R51) la interacció amb vimentina, RBM10 (*RNA-binding protein 10*) i PARP1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*). D'entre les proteïnes candidates d'interacció amb LOXL2, només es va confirmar la interacció específica amb vimentina, ja que la resta també presentaven interacció en el control negatiu RH28/FLAG.

RESULTATS

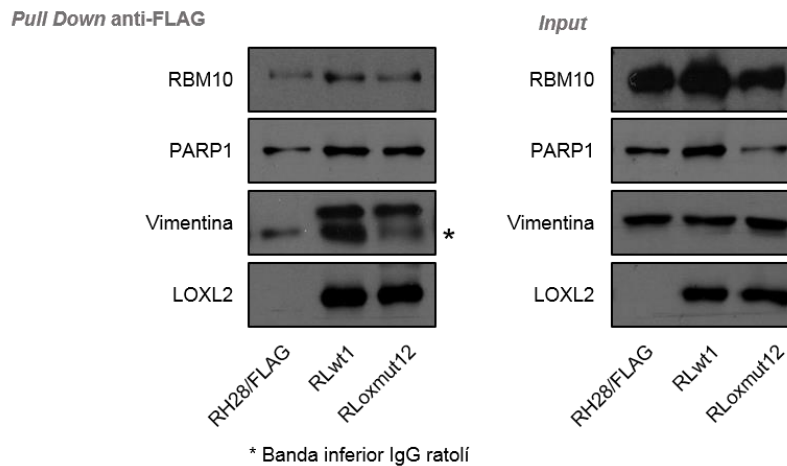


Figura R51: Validació dels resultats obtinguts en l'anàlisi per MS de les mostres del *pull down* anti-FLAG: *western blot* on es va comprovar la possible interacció de LOXL2 amb RBM10, PARP1 i vimentina. Mostres del model de reintroducció de LOXL2: RLwt1 (clon LOXL2 wt); RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) i RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control positiu del *pull-down* anti-FLAG les membranes es van incubar amb LOXL2. *Input*: extracte proteic emprat en el *pull down* anti-FLAG.

Amb l'objectiu de confirmar aquesta interacció LOXL2-vimentina, es va dur a terme l'aproximació contrària: es va immunoprecipitar amb anti-vimentina i es va comprovar la interacció amb LOXL2 per *western blot* (Figura R52). En aquest cas, es va immunoprecipitar vimentina en totes les mostres: en el control RH28/FLAG i en els dos clons LOXL2 (RLwt1 i RLoxmut12), però només es va observar interacció amb LOXL2 en els clons que l'expressen.

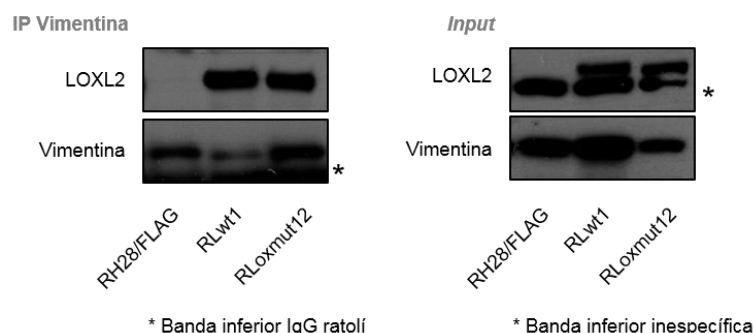


Figura R52: *Western blot* de la IP amb vimentina en dos clons del model de reintroducció de LOXL2: RLwt1 (clon LOXL2 wt); RLoxmut12 (clon LOXL2 mutant d'oxidació) i RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les membranes es van revelar amb l'anticòs LOXL2 i com a control positiu de la IP amb l'anticòs vimentina. *Input*: extracte proteic emprat en la IP Vimentina.

Tot seguit, es va comprovar la co-localització LOXL2-vimentina mitjançant immunofluorescència. Tot i així, no es va poder realitzar en el model de reintroducció *LOXL2/FLAG* degut als problemes tècnics comentats anteriorment. Així doncs es va dur a terme en el model de reintroducció *LOXL2/mCherry*, on LOXL2 està marcat amb el tag fluorescent mCherry. Primer de tot, es va realitzar de forma transitòria: es van transfectar les cèl·lules RH28 amb el vector *LOXL2/mCherry* o vector control *CMV/mCherry* i després de 48 h es va efectuar la co-immunofluorescència mCherry-vimentina (Figura R53). En la transfecció transitòria, mCherry va presentar una localització principalment nuclear en les cèl·lules control amb *CMV/mCherry*. Altrament, l'eficiència de transfecció amb *LOXL2/mCherry* va ser menor que en les cèl·lules control. Pel que fa a la seva localització, LOXL2/mCherry era principalment citoplasmàtica, igual que s'havia observat en teixit tumoral del model de reintroducció *LOXL2/FLAG* en RH28. A més a més, es va observar una co-localització parcial entre mCherry i vimentina, que no es va detectar en les cèl·lules control *CMV/mCherry* (Figura R53).

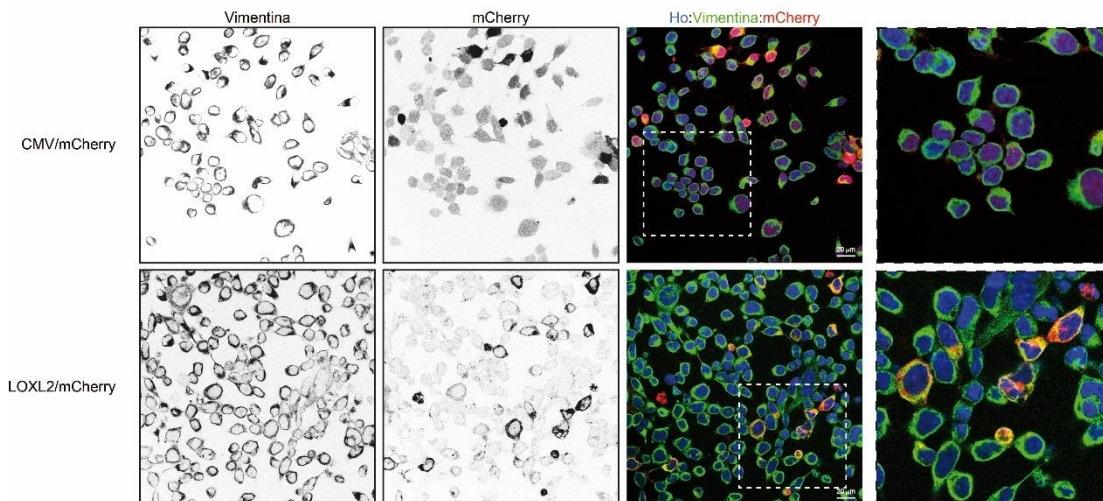


Figura R53: Imatges representatives de la co-immunofluorescència de vimentina (verd) i mCherry (vermell) en transfectar de forma transitòria les cèl·lules RH28 amb el vector control *CMV/mCherry* i *LOXL2/mCherry*. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 μ m.

Aquest experiment també es va realitzar en el model estable de reintroducció *LOXL2/mCherry*. En aquest model, LOXL2/mCherry tenia una distribució completament diferent, similar a les cèl·lules control, sent principalment nuclear (Figura R54, veure també Figura R28). A més, es va observar la formació d'agrupacions de

RESULTATS

major intensitat que podrien indicar problemes durant la síntesi, modificació i localització de LOXL2, a causa probablement del *tag* i de la integració del vector, ja que de forma transitòria la localització era diferent. Així doncs, en aquest model estable les cèl·lules RLmCherry no van presentar una co-localització LOXL2-vimentina. A més, en immunoprecipitar vimentina no es va veure interacció amb mCherry, i el mateix en la immunoprecipitació contrària amb mCherry, on no es va detectar LOXL2 (Figura R55). Considerant que la localització de LOXL2 és diferent, no és citoplasmàtica sinó principalment nuclear, això podria explicar la manca d'interacció amb vimentina així com discrepàncies observades prèviament en el seu fenotip.

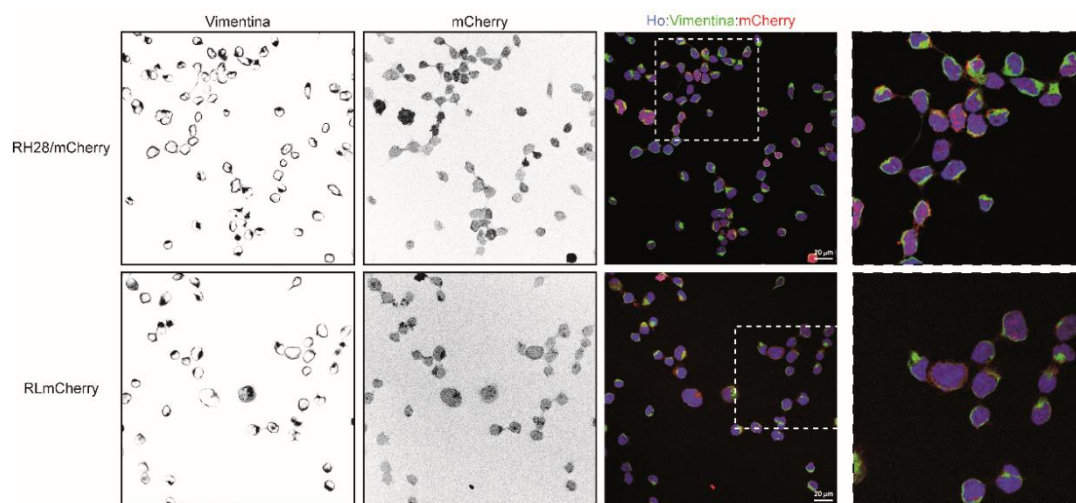


Figura R54: Imatges representatives de la co-immunofluorescència de vimentina (verd) i mCherry (vermell) en el model de reintroducció *LOXL2mCherry* (RLmCherry). RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 µm.

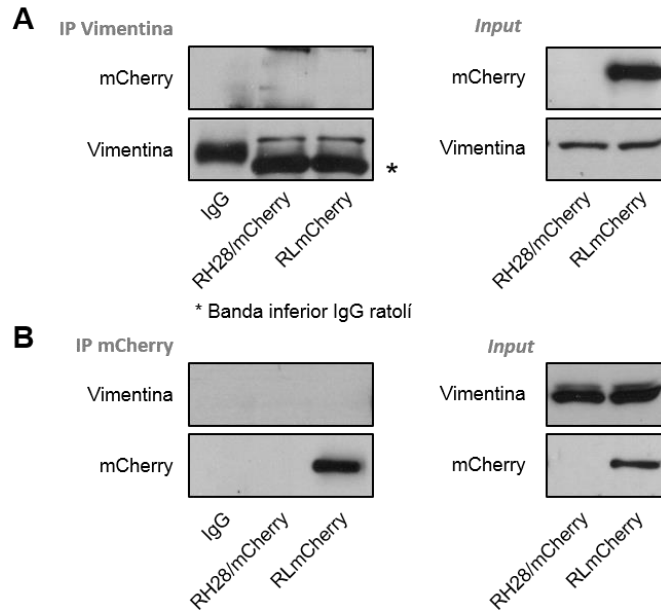


Figura R55: A) *Western blot* de la IP amb vimentina en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry). RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les membranes es van revelar amb l'anticòs mCherry i com a control positiu amb l'anticòs vimentina. Com a control negatiu es van utilitzar IgG de ratolí. **B)** *Western blot* de la IP amb mCherry en el model de reintroducció de *LOXL2mCherry* (RLmCherry). RH28/mCherry: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les membranes es van revelar amb l'anticòs vimentina i com a control positiu amb l'anticòs mCherry. Com a control negatiu es van utilitzar IgG de ratolí. *Inputs*: extracte proteic emprats en les IPs.

Seguidament, per corroborar la interacció LOXL2-vimentina es va efectuar un últim experiment en cèl·lules que expressen de forma endògena LOXL2. En la línia RH4 es va immunoprecipitar vimentina i es va confirmar per *western blot* la interacció amb LOXL2 (Figura R56A). Altrament, com a control de l'especificitat de la tècnica, es va immunoprecipitar vimentina en una línia de SE que no expressa LOXL2, com és A673, veient tal i com era d'esperar una manca d'interacció amb LOXL2 (Figura R56B). Cal comentar que en cap cas s'ha pogut realitzar la IP amb LOXL2 ja que l'anticòs no va funcionar per aquesta tècnica, però sí el *pull down* anti-FLAG en el model que expressa LOXL2/FLAG.

En definitiva, tot i no detectar interacció en el model LOXL2/mCherry, la qual s'atribueix a un canvi en la localització, la resta d'experiments permeten confirmar la interacció específica entre LOXL2 i vimentina.

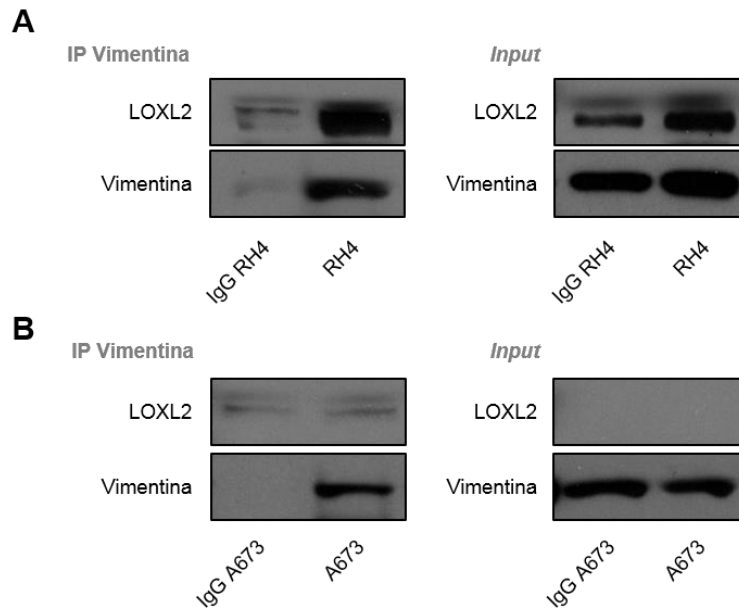


Figura R56: *Western blot* de la IP amb vimentina en la línia cel·lular d'ARMS RH4 (**A**) i en la línia de SE A673 (**B**) revelat amb LOXL2. Com a control positiu de la IP es va revelar amb vimentina i com a control negatiu es van utilitzar IgG de ratolí. *Input*: extracte proteic emprat en la IP Vimentina.

15. VIMENTINA ES TROBA SOBREEXPRESSADA EN LÍNIES CEL·LULARS DE RMS I EL SEU SILENCIAMENT TRANSITORI REDUEIX LA MIGRACIÓ I INVASIÓ CEL·LULAR EN LA LÍNIA RH4

Vimentina és el principal filament intermedi en cèl·lules mesenquimals, sent un marcador de la TEM³⁴⁹. És important per tal de mantenir la integritat cel·lular i la resistència a l'estrès. Tot i així, a part de la seva funció tradicional s'ha vist que vimentina està sobreexpressada en varis càncers i que és important per a la progressió tumoral³⁴⁹. Atès que els resultats anteriors mostren una interacció entre LOXL2-vimentina i que s'ha descrit que està involucrada en processos tumorals, es va voler profunditzar més en el paper de vimentina en RMS. Inicialment, es va determinar la seva expressió per *western blot* en un panell de línies de RMS. Els resultats van confirmar una alta expressió de vimentina en RMS, que de forma general era major que en les cèl·lules de SE analitzades (Figura R57).

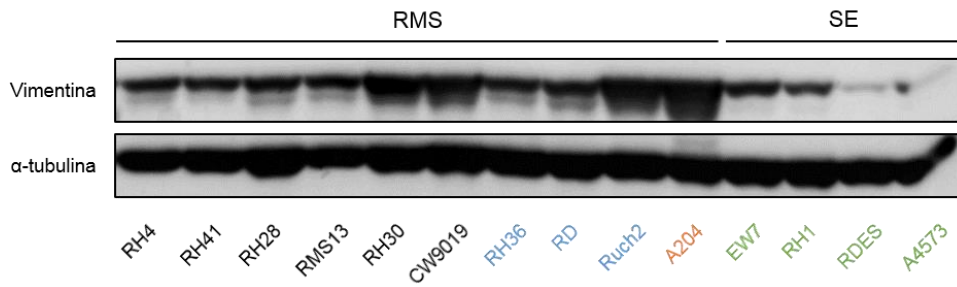


Figura R57: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de vimentina en un panell de línies de RMS i SE. S'indiquen les línies cel·lulars d'ARMS en negre, d'ERMS en blau, la rabdoide en taronja i les de SE en verd. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

Tot seguit, per tal de determinar la funció de vimentina en ARMS, es va silenciar transitòriament mitjançant dos ARNsi diferents (siVIM#1 i siVIM#2) en la línia RH4. Com a control de la transfecció es va utilitzar un ARNsi control, siNT. Després de 48 h de transfecció es va observar una reducció en vimentina total i en les seves formes de proteòlisi utilitzant ambdós ARNsi (Figura R58). El filaments de vimentina és formen per la interacció de múltiples tetràmers³⁵⁰. Vimentina és una proteïna altament regulada amb moltes modificacions post-traduccional que controlen el seu assemblatge i desassemblatge, com fosforilacions. A més, el seu desassemblatge depèn de varies proteases que proteolitzen la vimentina en fragments més petits³⁵⁰, com es pot observar en el *western blot*.

RESULTATS

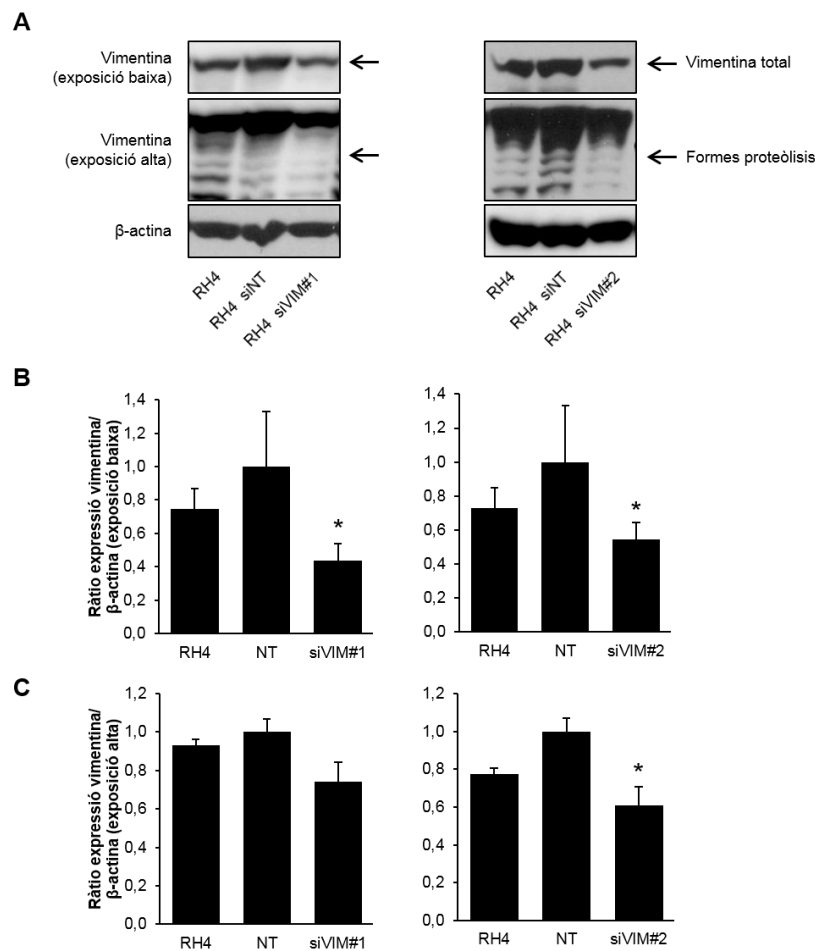


Figura R58: A) *Western blot* representatiu mostrant els nivells de vimentina en la línia RH4 després de 48 h de transfecció amb un ARNsi control (siNT) o dirigit contra *vimentina*, concretament, dues seqüències diferents: siVIM#1 i siVIM#2. Com a control de càrrega es va utilitzar la β -actina. **B)** Quantificació representativa de la ràtio d'expressió de vimentina respecte la β -actina dels *western blots* amb exposició baixa de A). **C)** Quantificació representativa de la ràtio d'expressió de vimentina respecte la β -actina dels *western blots* amb exposició alta de A). Prova *t* de Student (en relació a NT): * $p \leq 0,05$.

Tanmateix, en aquest model de silenciament transitori es van realitzar experiments de proliferació cel·lular. Primerament, el procés de transfecció en aquestes cèl·lules amb el siNT va reduir la seva proliferació en comparació a la línia parental RH4. A més, el silenciament transitori de *vimentina* es va traduir en una lleugera disminució no significativa de la capacitat proliferativa amb el siVIM#1, i de forma significativa amb el siVIM#2 (Figura R59).

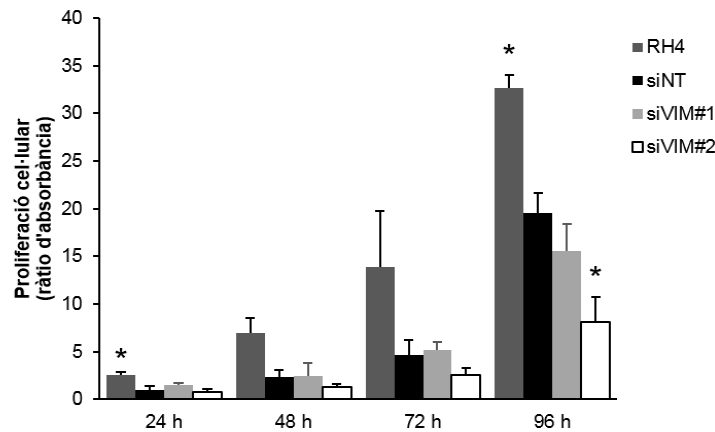


Figura R59: Assaig de proliferació sembrat 6 h després del silenciament transitòri amb ARNsi control (siNT) i ARNsi dirigit contra *vimentina* (siVIM#1 i siVIM#2) en la línia RH4. L'absorbància es va mesurar cada 24 h durant 4 dies emprant el reactiu WST-1 i es va calcular la ràtio relativa als valors del siNT a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a siNT): * $p \leq 0,05$.

Paral·lelament, es van realitzar experiments de migració i d'invasió. Els resultats mostren que el silenciament de *vimentina* va produir una disminució significativa tant en la migració (Figura R60) com en la invasió (Figura R61), concretament, més d'un 60 % i d'un 50 %, respectivament.

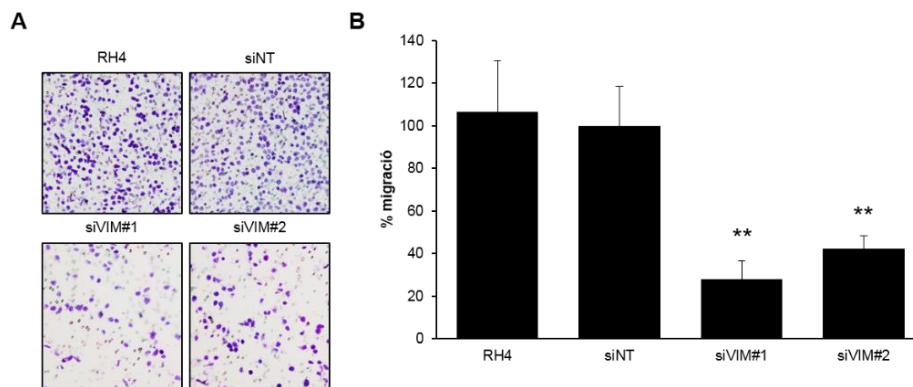


Figura R60: Assaig de migració en càmera de Boyden després del silenciament transitòri amb ARNsi control (siNT) i ARNsi dirigit contra *vimentina* (siVIM#1 i siVIM#2) en la línia RH4. 6 h de migració i un temps total de transfecció de 48 h. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a siNT): ** $p \leq 0,005$.

RESULTATS

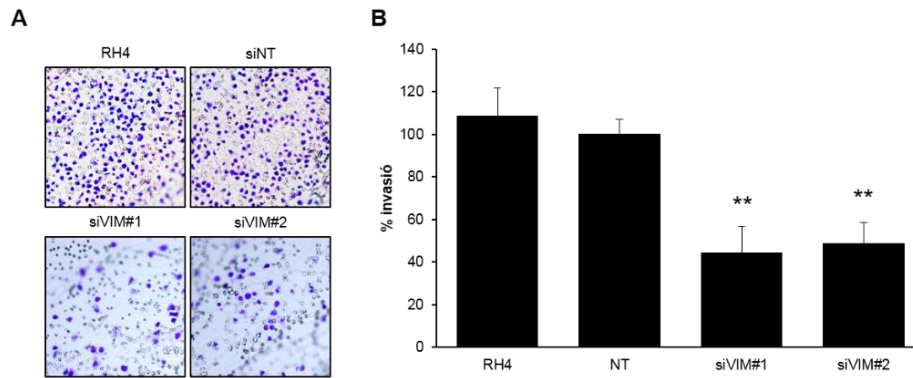


Figura R61: Assaig d'invasió en càmera de Boyden en presència de Matrigel, després del silenciament transitori amb ARNsi control (siNT) i ARNsi dirigit contra *vimentina* (siVIM#1 i siVIM#2) en la línia RH4. 24 h d'invasió i un temps total de transfecció de 48 h. **A)** Imatges representatives de l'assaig d'invasió (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a siNT): ** $p \leq 0,005$.

Els resultats en la línia RH4 demostren que vimentina és important per a la migració i invasió cel·lular. A fi de confirmar aquests resultats, es va intentar reproduir en altres línies d'ARMS, concretament en RMS13 i CW9019. En la línia RMS13 es va silenciar *vimentina* amb els dos mateixos ARNsi: siVIM#1 i siVIM#2, tot i que l'eficiència de silenciament va ser molt baixa (Figura R62). Pel que fa a la línia CW9019, una de les que expressa uns nivells més elevats de vimentina, els dos ARNsi dirigits contra *vimentina* no van funcionar (resultats no mostrats). Intentant optimitzar la transfecció, es va provar un *pool* que conté diferents ARNsi dirigits contra *vimentina* (siVIMpool). No obstant, tampoc es va obtenir una millor eficiència de silenciament (Figura R62).

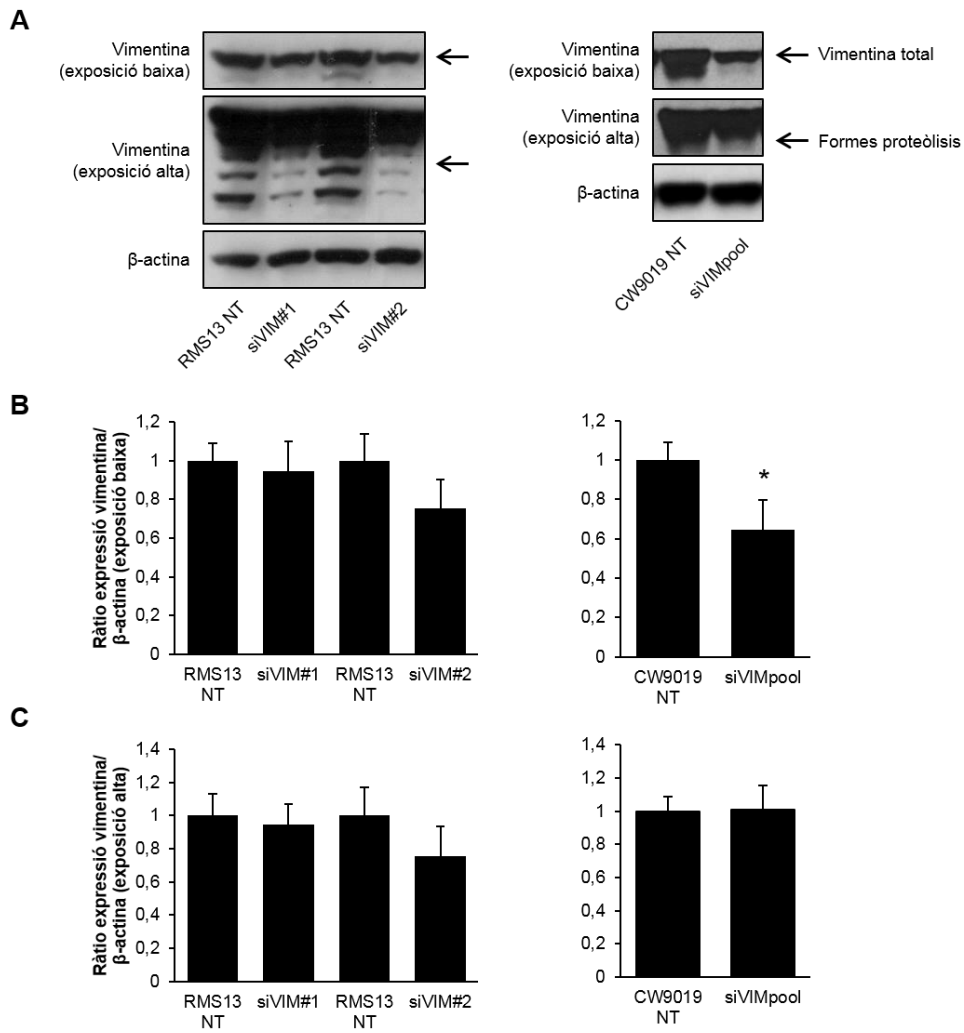


Figura R62: A) *Western blot* representatiu mostrant els nivells de vimentina en les línies RMS13 i CW9019 després de 48 h de transfecció amb un ARNsi control (siNT) o dirigit contra *vimentina*, concretament, dues seqüències diferents (siVIM#1 i siVIM#2) en RMS13 i un *pool* d'ARNsi (siVIMpool) en CW9019. Com a control de càrrega es va utilitzar la β-actina. **B)** Quantificació representativa de la ràtio d'expressió de vimentina respecte la β-actina dels *western blots* amb exposició baixa de A). **C)** Quantificació representativa de la ràtio d'expressió de vimentina respecte la β-actina dels *western blots* amb exposició alta de A). Prova *t* de Student (en relació a NT): * $p \leq 0,05$.

De tota manera, es van realitzar experiments de migració després de transfectar amb els ARNsi dirigits contra *vimentina*: siVIM#1 i siVIM#2 en RMS13, i siVIMpool en CW9019. Així és que amb el baix silenciament obtingut els resultats van ser negatius, sense observar diferències en la migració (Figura R63).

RESULTATS

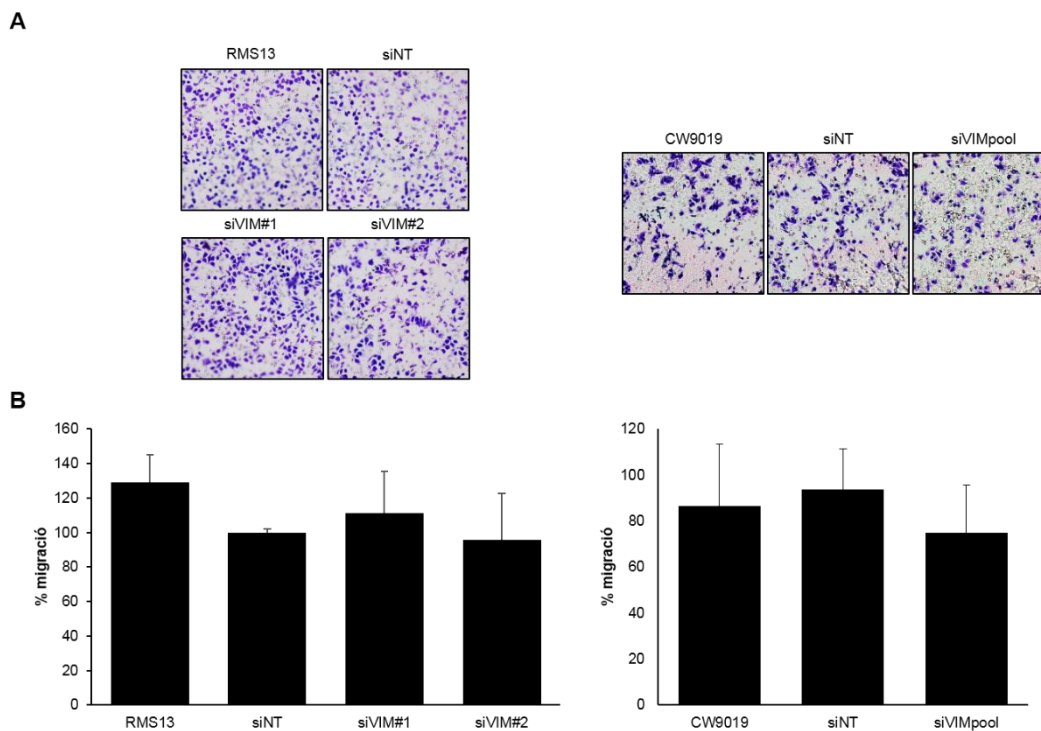


Figura R63: Assaig de migració en càmera de Boyden després del silenciament transitori amb ARNsi control (siNT) i ARNsi dirigit contra *vimentina*: siVIM#1 i siVIM#2 en RMS13 i siVIMpool en CW9019. 6 h de migració i un temps total de transfecció de 48 h. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. Prova *t* de Student (en relació a siNT): $p > 0,05$.

16. LA REINTRODUCCIÓ DE *LOXL2* EN LA LÍNIA CEL·LULAR RH28 INCREMENTA LA PROTEÒLISI DE VIMENTINA, LA QUAL ÉS PARCIALMENT DEPENDENT DE CALPAÏNA-2

Després de confirmar la interacció *LOXL2*-vimentina i determinar que vimentina és important en la migració i invasió de cèl·lules d'ARMS RH4, es va caracteritzar la seva expressió per *western blot* en el model de reintroducció *LOXL2/FLAG* en RH28. Curiosament, es va observar de forma molt clara un increment en les bandes de proteòlisi de vimentina en els clons RH28 on s'havia reintroduït *LOXL2* (Figura R64).

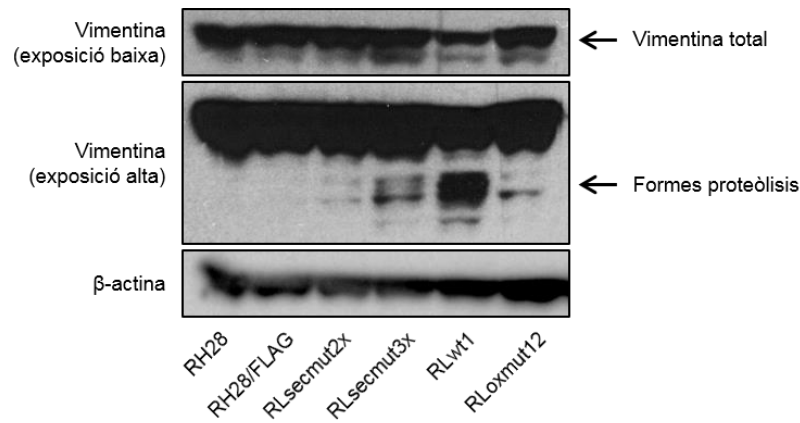


Figura R64: *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de vimentina total i les seves formes de proteòlisi en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (RLwt1), del mutant d'oxidació (RLoxmut12) i dels mutants de secreció (RLsecmut2x i RLsecmut3x). RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la β -actina.

L'increment de la proteòlisi de vimentina, associat al desassemblatge d'aquest filament intermedi, es pot donar principalment per dues proteases: caspases i calpaïnes. La proteòlisi de vimentina per part de caspases té lloc en resposta a senyals apoptòtiques. Altrament, la proteòlisi de vimentina per part de calpaïnes produeix la formació d'un *pool* soluble de vimentina que s'ha vist implicat en angiogènesi i mobilitat cel·lular^{350,351}. Per tant, per tal de determinar quines proteases estaven implicades en aquest increment de la proteòlisi de vimentina es van tractar les cèl·lules amb un inhibidor de caspases, Z-VAD, i amb un inhibidor de calpaïnes, calpeptina.

En primer lloc, es van tractar cèl·lules control RH28/FLAG i un clon *LOXL2 wt*, RLwt1, amb dues concentracions diferents de Z-VAD, 10 i 50 μ M. Posteriorment, es va realitzar *western blot* per tal de veure possibles canvis en la proteòlisi de vimentina. Després del tractament amb Z-VAD en RLwt1 no es van observar canvis en comparació a les cèl·lules tractades amb DMSO. Pel que fa a les cèl·lules control, RH28/FLAG, de forma inesperada el tractament produïa un increment en la proteòlisi de vimentina (Figura R65A). Tot i així, en cap cas no hi va haver una reducció de la seva proteòlisi, descartant així que les caspases en fossin les responsables. A més, a nivell microscòpic tampoc es va observar mort cel·lular. Cal remarcar que com a control de l'efecte inhibitori de Z-VAD sobre les caspases es van tractar les cèl·lules amb tunicamicina (250 ng/mL) per activar aquestes proteases i induir mort cel·lular, i a més, co-tractar amb Z-VAD (50 μ M) per revertir aquesta activació (Figura R65B).

RESULTATS

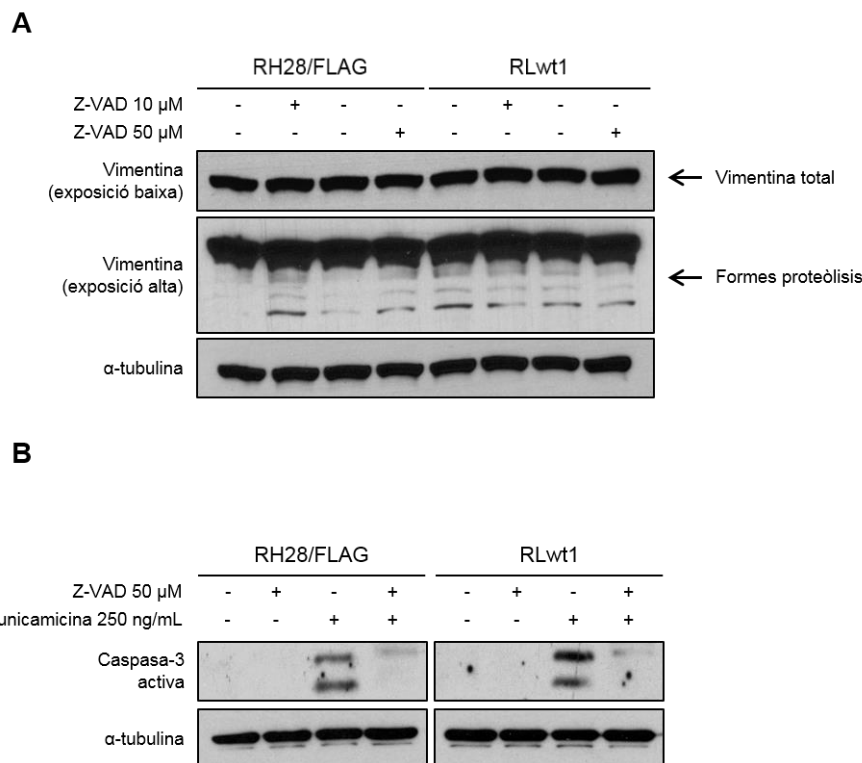


Figura R65: A) *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de vimentina total i les seves formes de proteòlisi després del tractament amb l'inhibidor pan-caspasa Z-VAD (10 i 50 μ M) i dimetil sulfòxid (DMSO) com a control (-). RLwt1 (clon LOXL2 *wt*) i RH28/FLAG (cèl·lules transfectades amb un plasmidi control). Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de caspasa-3 activa (formes de 19 i 17 kDa) en induir mort cel·lular amb el tractament tunicamicina 250 ng/mL. L'activació i tall de caspasa-3 es va revertir amb l'inhibidor de caspases Z-VAD a una concentració de 50 μ M. Com a control del tractament es va utilitzar DMSO (doble -) i com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

Tot seguit, es van tractar cèl·lules control RH28/FLAG i un clon LOXL2 *wt*, RLwt1, amb dues concentracions diferents de calpeptina, 25 i 50 μ M, i DMSO com a control del tractament. En aquest cas, el tractament amb calpeptina causava un canvi en les bandes de proteòlisi, el qual era molt més pronunciat en RLwt1 que en RH28/FLAG (Figura R66A). Concretament, la banda de proteòlisi de menor pes molecular es veia reduïda, mentre que a la vegada incrementava un altre fragment de proteòlisi de major pes molecular. A més, per tal de confirmar l'efecte inhibitori de la calpeptina en les calpaïnes es va analitzar per *western blot* l'expressió d'una d'elles, concretament de calpaïna-2, després dels tractaments (Figura R66B). Calpaïna-2 s'expressa de forma constitutiva, igual que l'altra forma majoritària calpaïna-1, i la seva activació té lloc per

autòlisis: la forma latent té uns 80 kDa, quan aquesta s'activa s'autoproteolitza i dóna lloc a la forma activa de 78 kDa³⁵². Un cop activa, es proteolitza³⁵³. En el *western blot* (Figura R66B) s'observa una reducció de les formes de proteòlisis en tractar amb calpeptina, principalment a 50 µM.

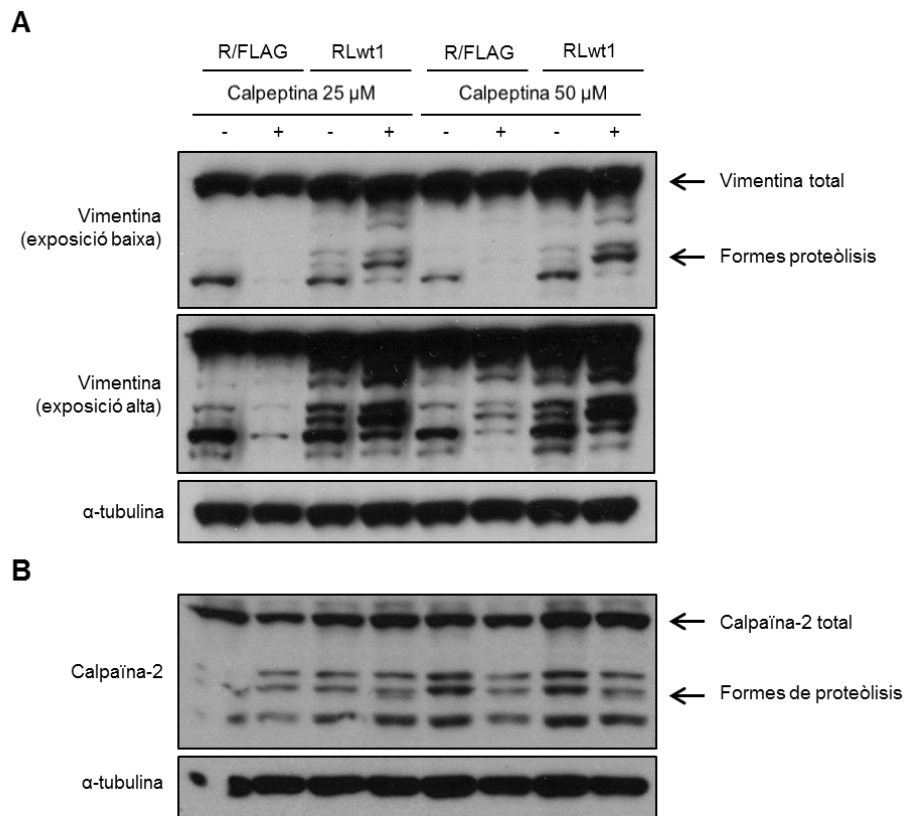


Figura R66: A) *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de vimentina total i les seves formes de proteòlisi després del tractament amb l'inhibidor de calpaïnes calpeptina (25 i 50 µM) o DMSO (-). RLwt1 (clon LOXL2 wt) i R/FLAG (cèl·lules RH28 transfectades amb un plasmidi control). Com a control de càrrega es va utilitzar la α-tubulina. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de calpaïna-2 total i les formes de proteòlisi després del tractament amb l'inhibidor calpeptina (25 i 50 µM) en les mateixes mostres que A). Com a control de càrrega es va utilitzar la α-tubulina.

Així doncs, el conjunt de resultats mostren com LOXL2 incrementa la proteòlisi de vimentina i que aquesta proteòlisi és parcialment dependent de calpaïnes. Tot seguit, ens vam plantejar si l'acció de les calpaïnes era degut a una interacció directa amb LOXL2 o era de forma indirecta. Conseqüentment, es va determinar si LOXL2 interacciona amb una de les dos calpaïnes expressades de forma constitutiva, calpaïna-2. Amb aquesta finalitat inicialment es va immunoprecipitar calpaïna-2 en el model de reintroducció de LOXL2 en RH28 (Figura R67). Aquesta IP es va revelar

RESULTATS

amb LOXL2 confirmant una interacció entre aquestes dues proteïnes. Encara més, també es va revelar amb l'anticòs calpaïna-2 com a control de la IP. Això va permetre determinar quines eren les bandes específiques de les formes de proteòlisi de calpaïna, ja que prèviament s'havia observat més d'una banda de pes molecular similar (Figura R66B).

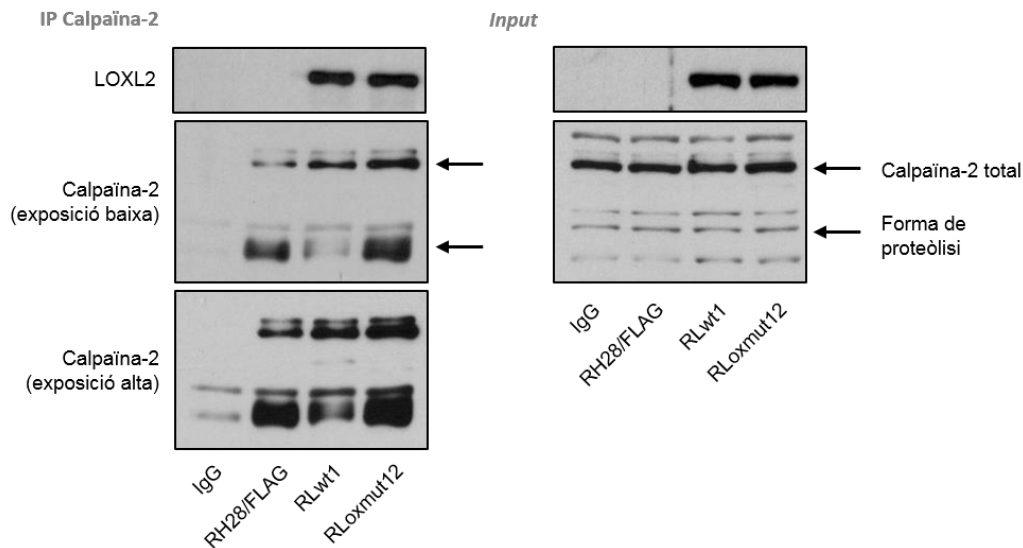


Figura R67: *Western blot* de la IP amb calpaïna-2 en el model de reintroducció de *LOXL2*: RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació) i RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les membranes es van revelar amb l'anticòs LOXL2 i com a control positiu de la IP amb l'anticòs calpaïna-2. Com a control negatiu es van utilitzar IgG de conill. *Input*: extracte proteic emprat en la IP calpaïna-2.

Per corroborar aquesta interacció, es va realitzar l'aproximació contrària: *pull down* anti-FLAG i es va revelar el *western blot* amb l'anticòs de calpaïna-2 (Figura R68). D'aquesta forma es va confirmar la interacció entre LOXL2 i la forma total i la proteolitzada de calpaïna-2. A més, en revelar amb l'anticòs LOXL2 es va comprovar la IP de LOXL2 en els tres clons.

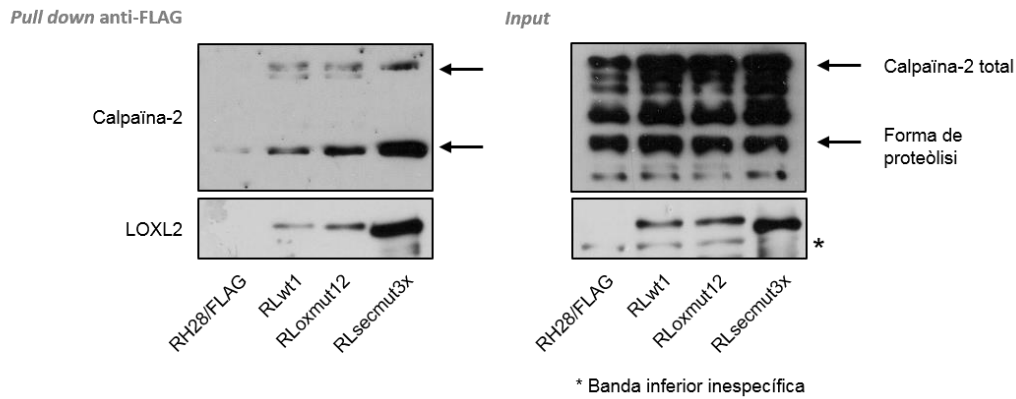


Figura R68: *Western blot* del *pull down* anti-FLAG en el model de reintroducció de *LOXL2*: RLwt1 (clon *LOXL2 wt*); RLoxmut12 (clon *LOXL2* mutant d'oxidació); RLsecmut3x (clon *LOXL2* mutant de secreció triple) i RH28/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les membranes es van revelar amb l'anticòs calpaina-2 i com a control positiu del *pull-down* amb l'anticòs *LOXL2*. *Input*: extracte proteic emprat en el *pull down* anti-FLAG.

En conjunt, els resultats mostren com vimentina i calpaina-2 formen part del complex de proteïnes que interaccionen amb *LOXL2*. A més, aquesta interacció incrementa la proteòlisi de vimentina, la qual és parcialment dependent de calpaïnes, ja que en tractar amb l'inhibidor de calpaïnes calpeptina la proteòlisi es veu parcialment reduïda.

17. EXPRESSIÓ DE *LOXL2* EN LÍNIES DE SE

Donada la baixa expressió *LOXL2* observada anteriorment en algunes línies de SE, ens vàrem preguntar quin seria el paper d'aquesta proteïna durant la progressió del SE. Així, primer es va ampliar el panell a 11 línies cel·lulars on es va analitzar l'expressió de *LOXL2* mitjançant RT-qPCR i *western blot* en comparació a dues línies de RMS, emprades com a control positiu.

Concretament, es va detectar uns nivells de *LOXL2* molt baixos en totes les línies de SE en comparació a les línies de RMS (Figura R69A). La ràtio d'expressió es va calcular respecte la línia de RMS CW9019, a la qual se li va assignar el valor de 1. A més, aquestes dades coincidien amb els resultats obtinguts per *western blot* (Figura R69B), on *LOXL2* tenia una expressió indetectable en les línies de SE en comparació a les dues línies de RMS.

RESULTATS

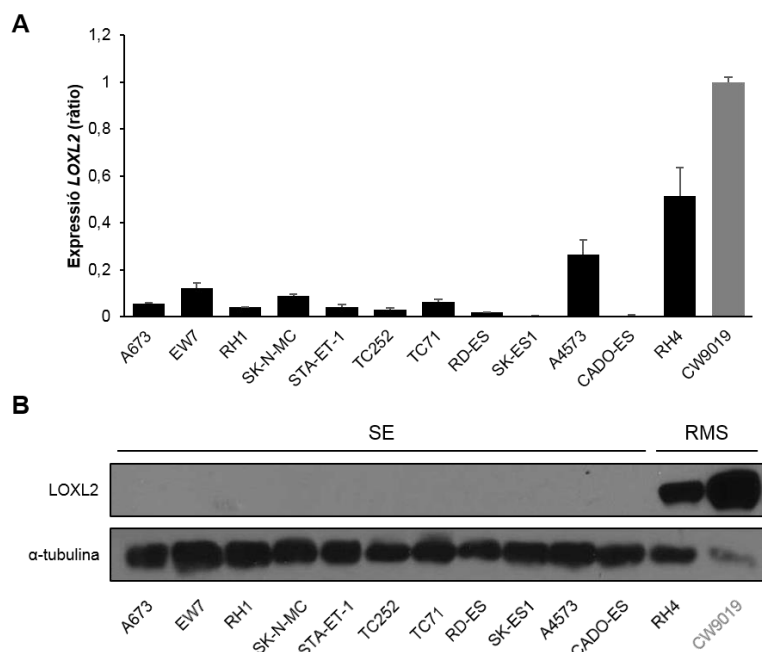


Figura R69: A) Expressió relativa (respecte a CW9019) del nivells d'ARNm de *LOXL2* mitjançant RT-qPCR en línies cel·lulars de SE. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de *LOXL2* en un panell de línies de SE. RH4 i CW9019: línies de RMS utilitzades com a control positiu. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina.

18. LOXL2 INHIBEIX EL FENOTIP NEOPLÀSTIC EN CÈL·LULES DE SE, INDEPENDENTMENT DE LA SEVA ACTIVITAT CATALÍTICA

Seguidament, després de confirmar que les línies de SE expressaven nivells gairebé indetectables de *LOXL2*, es va caracteritzar quina era la seva funció. Amb aquest propòsit, utilitzant els mateixos vectors control i de reintroducció que s'havien emprat en la línia d'ARMS RH28 (veure Figura R18A), es va generar un nou model de reintroducció estable en la línia de SE A673.

Primer de tot, les cèl·lules A673 es van transfectar amb els vectors *LOXL2wt/FLAG* i *LOXL2oxmut/FLAG* i, posteriorment, es van aïllar diversos clons en els que es va comprovar per *western blot* l'expressió de *LOXL2* i el tag FLAG (Figura R70A). Les cèl·lules també es van transfectar amb un vector control *CMV/FLAG*. D'entre els diferents clons positius que expressaven *LOXL2 wt* i *LOXL2* mutant d'oxidació, es van seleccionar els que tenien major expressió, treballant amb dos clons A6Lwt# i dos clons A6Loxmut#. Els clons de treball van ser: A6Lwt21, A6Lwt22, A6Loxmut1 i A6Loxmut19. Tanmateix, en aquests clons de treball es va comprovar, duent a terme *western blot* dels CM, que *LOXL2* es secretava al medi extracel·lular (Figura R70B).

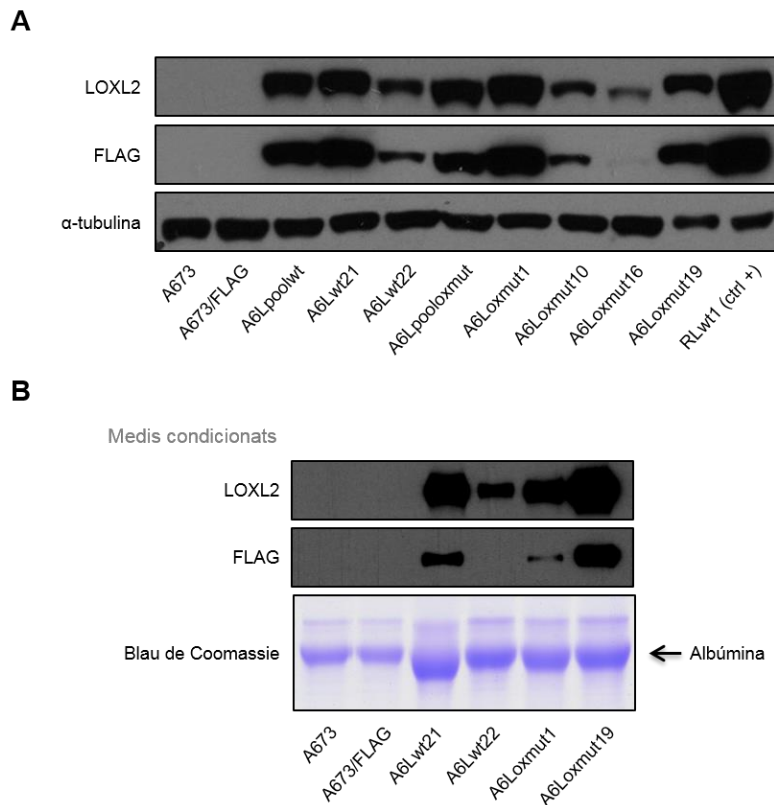


Figura R70: A) *Western blot* representatiu de l'expressió de LOXL2 i FLAG en els clons obtinguts en reintroduir de forma estable *LOXL2* en la línia de SE A673. A6Lwt# corresponen a cadascun dels clons transfectats amb el vector *LOXL2wt/FLAG* i RLoxmut# corresponen als clons transfectats amb el vector *LOXL2oxmut/FLAG*. A6Lpoolwt i A6Lpooloxmut són els *pools* de cèl·lules transfectades prèviament a la selecció de clons. A673/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Com a control de càrrega es va utilitzar la α -tubulina. **B)** *Western blot* representatiu que mostra l'expressió de LOXL2 en els CM (medis condicionats; 48 h en absència de FBS) en el model de reintroducció estable de LOXL2 en la línia A673. Es mostren els clons de treball seleccionats: LOXL2 wt (A6Lwt21 i A6Lwt22) i LOXL2 mutant d'oxidació (A6Loxmut1 i A6Loxmut19). Com a control de càrrega es va utilitzar l'albumina (tinció amb blau de Coomassie).

A més de confirmar la seva secreció al medi extracel·lular, es va determinar mitjançant immunofluorescència una localització principalment citoplasmàtica, igual que en el model de reintroducció *LOXL2/FLAG* en RH28 (Figura R71).

RESULTATS

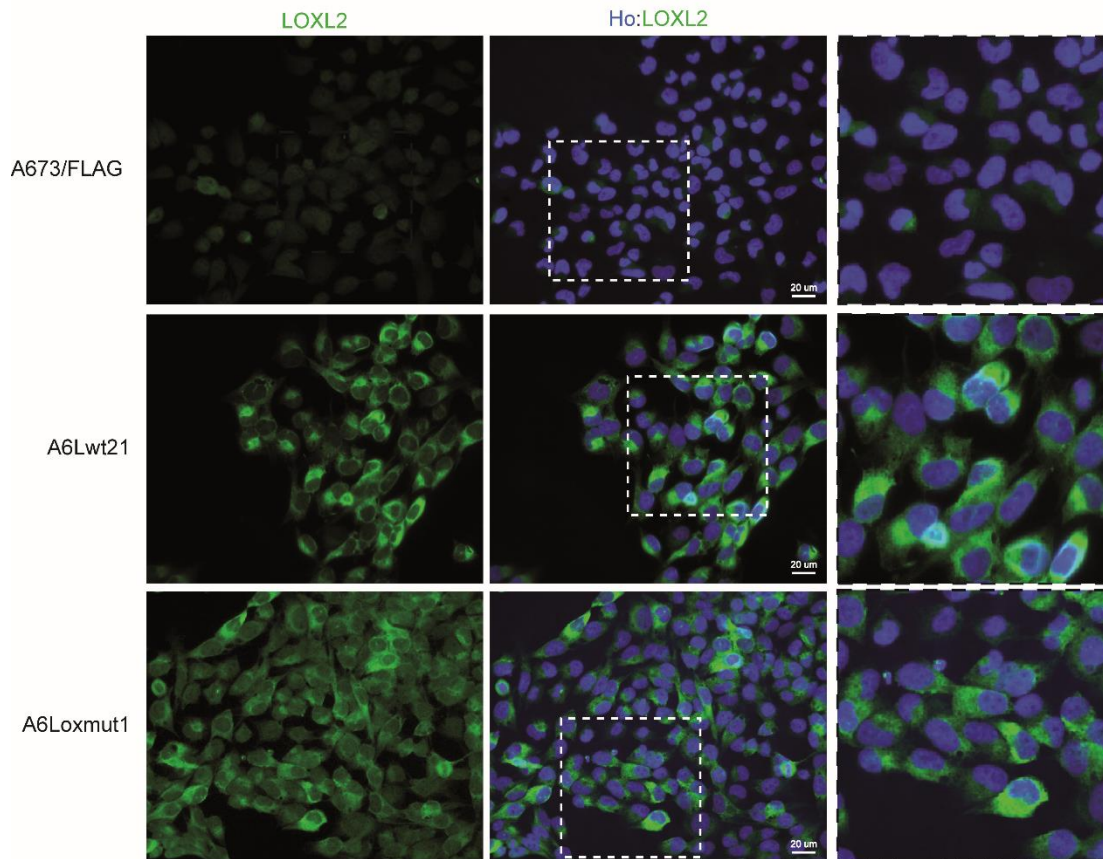


Figura R71: Imatges representatives de les immunofluorescències de LOXL2 en el model de reintroducció A673 LOXL2. Es mostra un clon LOXL2 *wt*, A6Lwt21, un clon LOXL2 mutant d'oxidació, A6Loxmut1, i A673/FLAG transfectades amb un vector control. Marcatge nuclear amb Hoechst 33342 (Ho, blau). Escala: 20 μm.

En aquest model de reintroducció es van realitzar assajos per determinar la implicació de LOXL2 en la capacitat clonogènica, proliferativa i migratòria. Així doncs, en l'assaig clonogènic es va observar una reducció significativa en el nombre de colònies en les cèl·lules que expressaven LOXL2 (Figura R72). Tot seguit, en els experiments de proliferació els clons A6Lwt# i A6Loxmut# van presentar unes ràtios de proliferació significativament menors que les cèl·lules control (Figura R73).

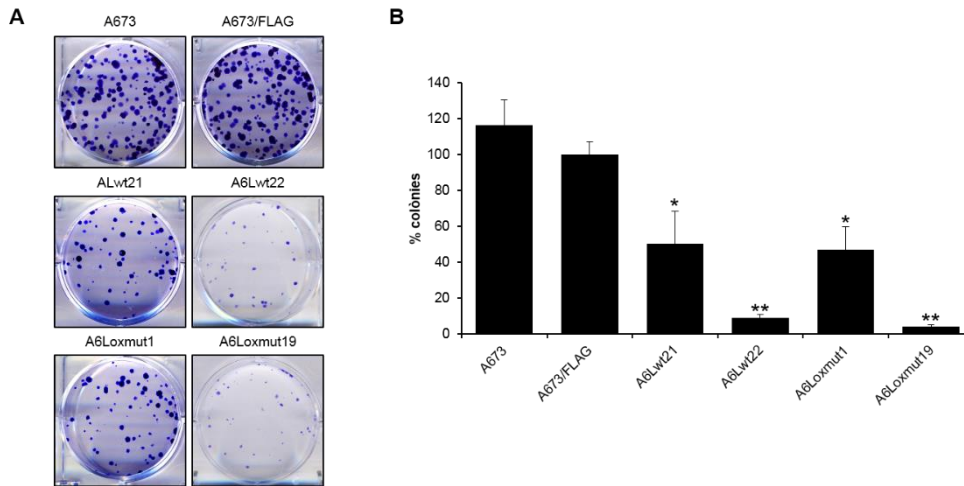


Figura R72: **A)** Imatges representatives d'un assaig clonogènic (21 dies de creixement) en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (clons A6Lwt#) i del mutant d'oxidació (clons A6Loxmut#) en la línia cel·lular A673. **B)** Quantificació de l'assaig clonogènic. A673/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a A673/FLAG): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

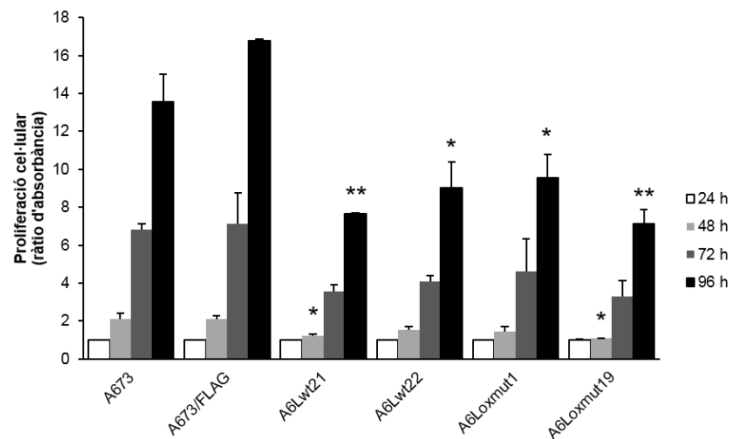


Figura R73: Assaig de proliferació mitjançant el reactiu WST-1 en el model de reintroducció de *LOXL2 wt* (clons A6Lwt#) i del mutant d'oxidació (clons A6Loxmut#) en la línia cel·lular A673. La ràtio d'absorbància es va obtenir respecte el valor de les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control (A673/FLAG) a les 24 h. Prova *t* de Student (en relació a A673/FLAG): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

Finalment, es va determinar que tots els clons A673 *LOXL2*, *wt* i mutants d'oxidació, presentaven una reducció significativa en la seva capacitat migratòria en comparació a les cèl·lules control (Figura R74).

RESULTATS

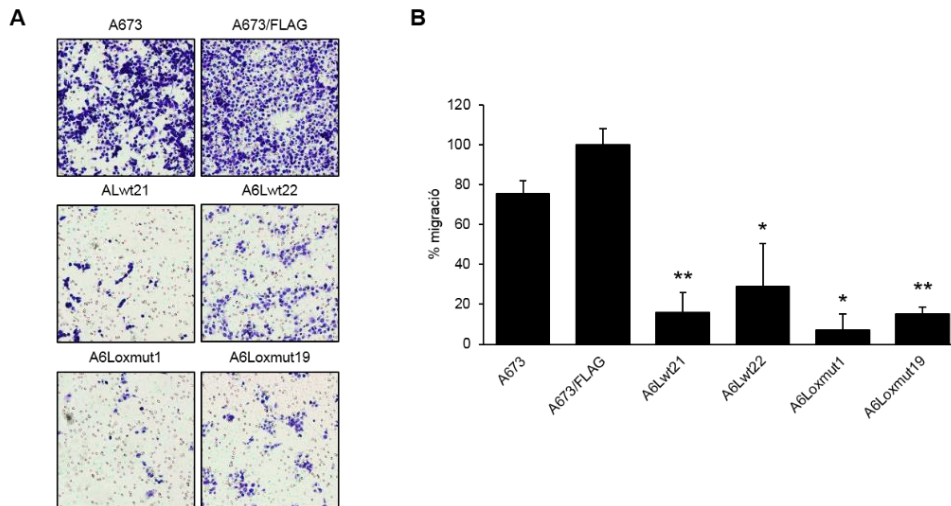


Figura R74: Assaig de migració en càmera de Boyden (24 h) en el model de reintroducció de *LOXL2* wt (clons A6Lwt#) i del mutant d'oxidació (clons A6Loxmut#) en la línia cel·lular A673. **A)** Imatges representatives de l'assaig de migració (augment 10X) i **B)** Representació gràfica de la quantificació. A673/FLAG: cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Prova *t* de Student (en relació a A673/FLAG): * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$.

En conjunt, els resultats obtinguts en el model de reintroducció de *LOXL2* en A673 indiquen que les cèl·lules de SE presenten uns nivells gairebé indetectables de *LOXL2* i mostren que la reintroducció d'aquesta proteïna en redueix les seves capacitats oncogèniques. A més, els efectes observats són independents de la seva activitat catalítica, igual que es va observar en les cèl·lules d'ARMS RH28.

DISCUSSIÓ

1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DE LOXL2 EN RMS

En el RMS, la recerca de reguladors del procés metastàtic és de gran rellevància: en pacients amb metàstasi la supervivència lliure de malaltia als 5 anys cau dràsticament d'un 70 % a un 20-29 %^{24,25}, sent la metàstasi el principal factor que limita el pronòstic. LOXL2 ha sorgit com un important regulador de la progressió tumoral i el procés metastàtic, esdevenint un fort candidat per tal de desenvolupar inhibidors i teràpies dirigides en diferents càncers^{232,233,282}. Degut a que LOXL2 s'ha descrit com un factor clau en la progressió tumoral vam decidir caracteritzar la seva expressió i funció en el RMS.

En la literatura, segons el nostre coneixement, no s'ha descrit res en relació a LOXL2 en RMS. Solament uns autors han proposat LOXL2 com a possible promotor de la malignitat en els sarcomes. Concretament, van realitzar un *high-throughput screening* de gens candidats potencialment associats amb la tumorigènesi i la metàstasi en la base de dades pública GEO (*Gene Expression Omnibus*)³⁵⁴. En analitzar les dades d'un centenar de mostres de diferents sarcomes, incloent RMS, van identificar tres candidats que es correlacionaven amb la malignitat: LOXL2, PARP1 i AZGP1 (*Zinc Alpha2 Glycoprotein 1*). D'aquests, es van centrar en el que presentava una major correlació amb la metàstasi, AZGP1³⁵⁴.

En aquesta tesi, inicialment es va avaluar l'expressió de LOXL2 en línies cel·lulars de RMS en comparació a línies de SE. D'aquesta manera, es va trobar una àmplia expressió de LOXL2 en les línies de RMS, tot i que a nivells variables, en comparació a les línies de SE que expressaven uns nivells gairebé indetectables de LOXL2. A més, en la línia de RMS RH28 tampoc es va detectar expressió de LOXL2. El pes molecular de LOXL2 observat per *western blot* era d'uns 100 kDa, igual que en altres models^{215,260}. Aquest pes molecular és major que el predit degut a les diferents modificacions post-traduccionals que presenta, com les N-glicosilacions. A la vegada, aquests resultats es van voler corroborar en mostres de pacients, on LOXL2 es va detectar en aproximadament un 35 % dels tumors. Tot i que no es va establir una correlació significativa entre els pacients que expressaven LOXL2 i un pitjor pronòstic, sí es va observar una tendència: els pacients positius per LOXL2 presentaven una menor supervivència. En aquest punt cal destacar, d'una banda, les limitacions del TMA, i de l'altra, les limitacions de l'anticòs. El RMS és una malaltia poc freqüent i el nombre de mostres de pacients del que es disposava era molt baix. A més, no es coneixien les dades clíniques de tots els pacients, fet que encara reduïa més el nombre de mostres, i per tant, la potència estadística. En referència a l'anticòs,

DISCUSSIÓ

l'expressió de LOXL2 es va detectar per immunofluorescència enlloc de per IHC, ja que en aquesta última tècnica no vàrem aconseguir obtenir uns resultats específics. A més, resultats no mostrats suggereixen que l'anticòs té una baixa sensibilitat: en tumors xenografts de ratolins es va detectar per immunofluorescència expressió de LOXL2 en la línia RH4, que presenta alts nivells de LOXL2, però no en la línia RH30, on l'expressió és més baixa (resultats no mostrats). En conjunt, seria interessant disposar d'un anticòs amb major sensibilitat, així com tenir un cohort més gran de tumors per tal d'avaluar LOXL2 com a marcador pronòstic. Amb tot, cal comentar que a dia d'avui el pronòstic del RMS encara es basa més en variables clíniques com la detecció de metàstasis, afectació de nòduls limfàtics, mida i localització del tumor, que en alteracions moleculars, a excepció de l'expressió de la proteïna de fusió PAX3-FOXO1 que sí que és un factor pronòstic negatiu^{23,28}.

El desconeixement de la cèl·lula d'origen del RMS es tradueix en una manca de base de comparació pel que fa a l'expressió de LOXL2 en aquests tumors. El RMS s'origina probablement per una diferenciació aberrant de les cèl·lules del múscul esquelètic^{50,127}. En la literatura s'ha descrit una baixa expressió, a nivell d'ARN i proteic, de LOXL2 en múscul esquelètic³⁵⁵⁻³⁵⁸. Per tant, probablement la regulació de LOXL2 en RMS és diferent de la regulació en múscul o en la hipotètica cèl·lula d'origen.

Diferents mecanismes poden estar regulant els alts nivells transcripcionals i proteics de LOXL2 en RMS. PAX3/7-FOXO1 és el principal esdeveniment promotor dels RMS fusió positius, tot i això, segons el nostre coneixement cap estudi ha proposat a *LOXL2* com a diana transcripcional de la proteïna de fusió^{48,100}. De tota manera, cal comentar un article on investiguen els llocs d'unió de PAX3-FOXO1 a *enhancers* actius. Un *enhancer* potencial de *LOXL2* apareix com a lloc d'unió de PAX3-FOXO1 en 1 de les 3 línies cel·lulars de RMS analitzades i en diferents mostres tumorals¹⁸². Això suggereix que la proteïna de fusió sí podria estar regulant l'expressió de *LOXL2* genèticament. Altrament, podria haver una regulació epigenètica, mecanisme que s'ha descrit com important en la regulació de varis sarcomes³⁵⁹. De fet, resultats no publicats del nostre grup mostren una regulació epigenètica de *LOXL2*. Mitjançant un *array* de metilació es va observar una hipometilació d'un *enhancer* potencial de *LOXL2* en RMS en comparació a SE i teixit sa. La pèrdua de metilació dels *enhancers* s'associa a un increment de l'expressió gènica^{181,360}. Així, la hipometilació de l'*enhancer* potencial de *LOXL2* podria explicar l'alta expressió en RMS en comparació a l'expressió indetectable en SE. No obstant, la localització dels dos *enhancers* detectats no coincideix i, a més, més estudis serien necessaris per confirmar els *enhancers*

potencials i corroborar la hipòtesi que l'expressió de *LOXL2* es regula epigenèticament, podent PAX3-FOXO1 tenir un paper rellevant.

Altres mecanismes podent estar regulant l'expressió de *LOXL2* en RMS. En alguns models s'han descrit diferents proteïnes i mecanismes que la regulen i que podrien tenir un paper en RMS. En primer lloc, l'expressió de TGF- β 1 s'ha associat amb la progressió tumoral regulant el creixement i inhibint la diferenciació del RMS, on TGF- β 1 i les molècules *downstream* de la via de senyalització es troben sobreexpressades³⁶¹⁻³⁶³. En altres models s'ha vist que *LOXL2* és estimulat per TGF- β 1³¹³⁻³¹⁶. En conseqüència, l'elevada expressió d'aquesta citocina en RMS podria incrementar l'expressió de *LOXL2*.

La hipòxia és un altre mecanisme que activa l'expressió de *LOXL2* mitjançant la unió del factor de transcripció HIF1 α al seu promotor³⁰⁴. En RMS, HIF1 α s'ha identificat com un factor important que confereixen resistència a l'apoptosi^{364,365} i també podria estar regulant l'expressió de *LOXL2*.

Un altre mecanisme regulador de *LOXL2* podria ser mitjançant microARNs. Per exemple miR-26, el qual participa en la miogènesi, està desregulat en RMS³⁶⁶ i regula negativament *LOXL2* en càncer de pròstata³¹⁸. Un altre ARNm important en RMS i durant el procés miogènic és miR-29. miR-29 es troba reprimat en diferents càncers i la seva expressió inhibeix *LOXL2*^{293,318-320}. NF- κ B inhibeix la diferenciació muscular mitjançant alguns dels seus gens diana, com *YY1* (*Ying Yang 1*). Durant la miogènesi, la baixa expressió de NF- κ B i *YY1* promou que miR-29 no estigui reprimat, accelerant així la diferenciació¹⁵². En canvi, en cèl·lules de RMS i tumors primaris miR-29 està silenciada epigenèticament per l'activació de la via NF- κ B-*YY1*. L'expressió de miR-29 en RMS inhibeix el creixement tumoral en ratolins i estimula la diferenciació, suggerint que actua com a supressor tumoral¹⁵². Tenint en comte això, els baixos nivells de miR-29 descrits en RMS poden estar afavorint una alta expressió de la seva diana *LOXL2*. És més, resultats no mostrats del nostre laboratori també confirmen una baixa expressió de miR-29 en les línies de RMS en comparació a cèl·lules mesenquimals humanes. En canvi, en múscul on l'expressió de miR-29 és elevada s'esperaria una baixa expressió de *LOXL2*. Tanmateix, cal remarcar que s'ha proposat que TGF- β 1 incrementa l'expressió de *LOXL2* inhibint miR-29 en cèl·lules luteíniques de la granulosa³²¹, podent-se donar també aquest mecanisme en RMS. A més, NF- κ B podria promoure l'expressió de *LOXL2* no solament mitjançant la repressió de miR-29, sinó també a nivell transcripcional unint-se al seu promotor, ja que s'ha descrit com a putatiu factor de transcripció de *LOXL2* en càncer de còlon i d'esòfag²⁵⁹. En conjunt,

DISCUSSIÓ

els mecanismes que poden regular *LOXL2* en RMS són múltiples i semblen ser diferencials respecte a múscul.

A banda de la regulació transcripcional de *LOXL2*, també és important la seva regulació espacial, la qual està lligada a la seva funció. *LOXL2* és secretada al medi extracel·lular i s'ha detectat en varies localitzacions intracel·lulars: nucli, perinucli, citoplasma i reticle endoplasmàtic^{215,260,297}. A més, la seva localització també s'ha vist que pot ser diferencial entre teixit tumoral i teixit sa i pot estar lligada a un pitjor pronòstic en pacients. Per exemple, cèl·lules epitelials d'esòfag tenen un marcatge nuclear, mentre que en carcinoma escamós d'esòfag l'expressió de *LOXL2* és més variable. Curiosament, els pacients amb carcinoma escamós d'esòfag amb un marcatge menys nuclear i més citoplasmàtic es correlacionen amb una menor supervivència i un major nombre de metàstasis³⁶⁷. El mateix en càncer de mama, on demostren una localització alterada entre teixit i cèl·lules tumorals vs teixit mamari normal, havent una localització més citoplasmàtica en les línies i teixit tumoral²⁶⁰. Uns altres autors també en càncer de mama basal han establert una correlació entre els pacients amb tumors amb localització de *LOXL2* més citoplasmàtica intensa i perinuclear amb un major nombre de metàstasis²⁸⁶. Finalment, en carcinoma escamós de laringe un marcatge intens citoplasmàtic i perinuclear en comparació a un marcatge citoplasmàtic més difús està associat a una menor supervivència²⁸⁵.

Degut a la importància de la localització de *LOXL2* per a la seva funció, aquesta es va determinar analitzant els CM i realitzant immunofluorescència i/o subfraccionament cel·lular. Primer, tant en les línies de RMS com en el model de reintroducció de *LOXL2* en RH28, es va confirmar la secreció de *LOXL2* al medi extracel·lular en una forma de 100 kDa i un fragment proteolític d'uns 65 kDa. Els resultats són en concordança amb altres articles on detecten la forma total i la banda de proteòlisi del mateix pes molecular^{238,260,272,285,286}.

Pel que fa a *LOXL2* intracel·lular, mitjançant subfraccionament cel·lular es va detectar *LOXL2* en el citoplasma, nucli i també associat a la cromatina en les línies d'ARMS i en el model de reintroducció de *LOXL2* en RH28. Aquesta tècnica no permet comparar quantitativament els nivells d'expressió entre diferents línies cel·lulars ja que les proporcions entre les diferents fraccions no tenen perquè ser les mateixes, per exemple, unes cèl·lules poden tenir el nucli més gran que unes altres. Tampoc ens permet quantificar si hi ha més expressió en una fracció o una altra, degut a el que es comenta, que cada subfracció cel·lular té una mida diferent. Per tant, solament ens permet confirmar la presència de *LOXL2* en cada fracció enriquida. El fet que *LOXL2*

es trobi associat a la cromatina suggereix que pot estar regulant la transcripció. En realitat, LOXL2 està enriquit en la cromatina en diferents línies cel·lulars de carcinomes on s'ha relacionat bàsicament amb promoure la TEM^{269,286,297}. No obstant, les cèl·lules de RMS ja presenten característiques mesenquimals i, per tant, LOXL2 pot estar regulant altres processos.

Continuant amb la localització de LOXL2, la immunofluorescència solament es va realitzar en les línies d'ARMS no modificades, no en el model de RH28, ja que l'anticòs va donar un marcatge inespecífic. En ARMS es va observar una localització citoplasmàtica i nuclear, tot i que més intensa en el nucli. Posteriorment, també es va analitzar per immunofluorescència la localització de LOXL2 en mostres de pacients amb RMS i en mostres de tumors xenografts (derivats de les línies RH4 i RH28-LOXL2). En totes les mostres la localització era clarament citoplasmàtica. Aquests resultats posen en dubte els resultats obtinguts per immunofluorescència en les línies d'ARMS on es veia un marcatge nuclear molt intens. Això, sumat al fet que en la línia RH28 que no expressa LOXL2 es detectava marcatge, qüestionen l'especificitat de l'anticòs en utilitzar-lo per immunofluorescència en línies cel·lulars. No obstant, no es pot descartar que la localització en les línies cel·lulars sigui diferent que en els tumors. De fet, les línies cel·lulars cancerígenes, tot i ser el sistema més utilitzat en investigació, presenten varies limitacions, essent la més important que el seu manteniment en cultiu produeix un canvi en les seves característiques que les diferencien dels tumors³⁶⁸. En darrer terme, la localització citoplasmàtica en RMS es relacionaria amb la interacció potencial que es demostra en aquesta tesi: LOXL2 i la proteïna de citoesquelet vimentina, la qual es discutirà posteriorment.

Finalment, en relació a la localització de LOXL2 cal comentar el model de reintroducció *LOXL2/mCherry* en RH28. Degut a les dificultats tècniques comentades prèviament en RH28, el principal propòsit de l'obtenció d'aquest model era poder localitzar LOXL2 per fluorescència. LOXL2 localitzava principalment al nucli, a diferència de les mostres dels tumors xenografts RH28-LOXL2, on era majorment citoplasmàtica. En canvi, en transfectar de forma transitòria les cèl·lules RH28 amb *LOXL2/mCherry* la localització era com en les mostres tumorals, principalment citoplasmàtica. Les diferències observades entre el model estable i transitori, sumat al fet que el fenotip neoplàsic del model RH28 *LOXL2/mCherry* no tenia la mateixa robustesa que el model *LOXL2/FLAG* (amb discordances en els resultats de l'assaig clonogènic, sense efectes en la proliferació i un increment en la migració i invasió cel·lular però menor) apunta que en el model estable *LOXL2/mCherry* hi ha un canvi en la localització i funció de LOXL2 degut probablement al *tag*. En la bibliografia es descriu com el *tag* d'una

proteïna pot alterar remarcablement la seva funció i estabilitat^{369,370}. A més, una major expressió de proteïna recombinant pot tenir un efecte major en la localització i funció³⁷¹. És a dir, és important expressar la proteïna a uns nivells similars als fisiològics, ja que una sobreexpressió molt elevada probablement resultarà en una interacció amb altres proteïnes i una localització inadequada³⁷². En el nostre cas, es van seleccionar les cèl·lules amb major expressió de mCherry mitjançant *cell sorter*, fet que podria potenciar aquest efecte. Altrament, també cal comentar que en les immunofluorescències es poden observar punts de major intensitat, com si la proteïna formés agregats, confirmant els possibles problemes durant la síntesi, modificació i localització de la proteïna.

2. LOXL2 ESTÀ IMPLICAT EN LA CAPACITAT PROLIFERATIVA, CLONOGÈNICA, MIGRATÒRIA I INVASIVA DE LES CÈL·LULES DE RMS I INCREMENTA LA FORMACIÓ DE METÀSTASIS *IN VIVO*, INDEPENDENTMENT DE LA SEVA CAPACITAT CATALÍTICA

LOXL2 presenta un paper dual i complex en la progressió tumoral, depenent de la histologia del tumor. Alguns autors suggereixen a LOXL2 com a supressor tumoral, ja que presenta una baixa expressió en certs càncers com ovari²⁷⁸ o carcinoma de cèl·lula no petita de pulmó²⁸¹, tot i que no hi ha cap estudi del seu mecanisme d'acció. No obstant, hi ha un gran nombre d'evidències que associen una alta expressió de LOXL2 amb tumors més agressius, baixa supervivència i pitjor pronòstic. LOXL2 és un promotor del procés invasiu en tumors com mama³⁷³, pàncrees³⁷⁴ o fetge^{293,375}, per citar alguns. Així doncs, per tal d'analitzar la funció de LOXL2 en el RMS es van generar diferents models mitjançant enginyeria genètica inversa. D'una banda, es va silenciar *LOXL2* en dues línies d'ARMS, de forma estable i de forma transitòria, i de l'altra, es va reintroduir *LOXL2* en la línia de RH28. A més de determinar el seu fenotip neoplàstic *in vitro*, també es va realitzar un experiment *in vivo* amb el model de reintroducció.

Els resultats demostren que LOXL2 participa en la proliferació cel·lular i la capacitat clonogènica de les cèl·lules. No obstant, no es va observar una major tumorigenicitat *in vivo*, on no va haver diferències en el creixement tumoral. La finalitat de l'experiment de metàstasi ortotòpic és observar la formació de metàstasis espontànies, però també permet mesurar el creixement tumoral. Tot i això, el seguiment del tumor sol ser més complicat, ja que per exemple en aquest model els tumors creixen i s'infiltraen al teixit adjacent de forma diferent entre ratolins. Com a avantatge, el creixement és en un ambient més fisiològic, però seria més fàcil de seguir en un model subcutani³⁷⁶. En

l'experiment no es van observar diferències significatives en el creixement tumoral. En comparar els resultats amb la literatura, diversos estudis observen una disminució de la proliferació en inhibir *LOXL2*, com en càncer de mama^{300,377} o de pulmó de cèl·lula no petita³⁷⁸, així com una disminució del creixement tumoral en càncer de mama³⁷⁷, gàstric²⁸⁹ o carcinoma escamós²⁶⁹. Per contra, en carcinoma renal el silenciament de *LOXL2* no afecta la proliferació, però sí la migració i invasió cel·lular³⁷⁹, i en un altre estudi de càncer de mama tampoc veuen efectes en proliferació i creixement tumoral però sí en invasió i metàstasi²⁸³.

Malgrat que *LOXL2* va afectar a diversos processos cel·lulars, l'efecte més pronunciat que vam observar va ser en la migració i invasió *in vitro* i en la progressió metastàtica *in vivo*. Val a dir que en el model de silenciament transitori, on l'eficiència d'inhibició de la expressió va ser molt alta, la inhibició de la migració i la invasió va ser d'un 80 %. En el model de reintroducció RH28-*LOXL2*, l'expressió de *LOXL2* va incrementar la migració de 4 a 5 vegades i de 2 a 3 la invasió. Ambdós processos són essencials durant el procés metastàtic. Així, aquests resultats es van corroborar en l'experiment de metàstasi espontani, on es va observar una major incidència i un major nombre de metàstasis en els ratolins injectats amb les cèl·lules que expressaven *LOXL2*. De fet, diversos autors han demostrat la funció de *LOXL2* en la migració i invasió cel·lular i en el procés metastàtic. En reintroduir o silenciar *LOXL2*, genèticament o mitjançant inhibidors, s'ha vist un efecte en migració i invasió cel·lular en carcinoma renal³⁸⁰, gàstric²⁸⁹, prostata³¹⁸ i pàncrees³⁷⁴, així com en la incidència de metàstasis en càncer de mama³⁷⁷, gàstric²⁸⁹ i pulmó²⁸⁸. Per tant, sembla ser que *LOXL2* en RMS té un paper més rellevant en els processos de migració, invasió i metàstasi, igual que suggereixen resultats d'altres grups on no veuen efectes en el creixement tumoral però sí en invasió, migració i metàstasi^{283,379}.

A la vegada, és interessant comentar els avantatges i inconvenients del model de metàstasi espontani ortotòpic al múscul gastrocnemi. El principal avantatge en comparació a la clàssica injecció intravenosa és que engloba tot el procés i es realitza en unes condicions més fisiològiques^{376,381}. Inclou des del creixement de les cèl·lules per formar el tumor primari, a intravasari, circular en el torrent sanguini, extravasari i colonitzar el nou teixit. En canvi, el model d'injecció intravenosa només engloba les darreres etapes del procés. D'altra banda, s'han establert altres models més agressius basats en l'amputació^{382,383}. El model desenvolupat al nostre laboratori suposa una disminució de la severitat del protocol³⁴⁷. No obstant, s'ha de continuar perfeccionant la tècnica per tal de reduir el percentatge de ratolins amb recidives locals. Per últim, una altra limitació és que només es pot mesurar la formació de metàstasis en el punt final.

DISCUSSIÓ

Si les cèl·lules estiguessin marcades, per exemple amb luciferina, es podria monitoritzar el procés abans de l'eutanàsia dels animals.

Després de descriure el fenotip neoplàstic associat a l'expressió de LOXL2, per tal de corroborar-lo es va silenciar transitòriament *LOXL2* reintroduït en RH28. Els efectes produïts per la reintroducció de *LOXL2* es van revertir parcialment mitjançant un ARNsi dirigit contra *LOXL2*. Més concretament, el major efecte es va observar en la migració i la invasió cel·lular, confirmant altre cop la importància de LOXL2 sobre aquests processos. En canvi, en la proliferació i formació de colònies els canvis van ser molt menors. Això es podria atribuir a que els experiments de proliferació i assajos clonogènics són més llargs en el temps (4 i 21 dies respectivament) i l'efecte de l'ARNsi no es manté. El temps màxim que s'ha estudiat i comprovat l'efecte de l'ARNsi és a les 72 h. Per tant, s'hipotetitza que l'efecte inicial del silenciament produeix un retard en la proliferació i formació de colònies, però amb el temps es recupera l'expressió de LOXL2 i, per tant, no es reverteix completament el fenotip.

Un dels principals mecanismes descrits pels quals LOXL2 actua sobre la proliferació, migració, invasió i metastasi és la via FAK/Src. En diferents tumors com gàstric²⁸⁹, mama³⁰⁰ o pulmó²⁸⁸ s'ha correlacionat una inhibició de LOXL2 amb una menor activació de la via FAK/Src. FAK és una tirosina quinasa que localitza a les adhesions focals i controla un gran nombre de vies de senyalització involucrades en migració, invasió, proliferació i supervivència³⁸⁴. La seva activació té lloc per integrines i resulta en la fosforilació de FAK i la unió de les quinases Src³⁸⁴. S'han proposat diferents mecanismes pels quals LOXL2 activa FAK, com la formació de peròxid d'hidrògen²⁸⁹ o mitjançant la regulació d'integrines³⁸⁰. A més, l'activació de FAK a través de LOXL2 també activa les seves vies de senyalització *downstream* com AKT, PI3K i mTOR³⁰⁰. Una hipòtesi és que LOXL2 estigui activant la via FAK en RMS. En realitat, en RMS FAK s'expressa, està fosforilat i la seva inhibició resulta en una disminució de la proliferació, migració i invasió *in vitro* i del creixement tumoral *in vivo*³⁸⁵. La via PI3K/AKT/mTOR també és important en la progressió del RMS, malgrat que la seva inhibició requereix de la combinació amb altres inhibidors com la via RAS/MEK/ERK per evitar un efecte compensatori³⁸⁶. A fi de determinar l'activació de FAK en els nostres models, es va intentar determinar el seu estat de fosforilació per western blot sense èxit. Així doncs, es va analitzar la formació d'adhesions focals per immunofluorescència mitjançant marcatge amb vinculina, proteïna que s'hi troba enriquida³⁸⁷. Es va observar que la inhibició aguda de *LOXL2* produïa una disminució de les adhesions focals. Altres autors també han suggerit el mateix efecte: el silenciament de *LOXL2* en càncer de mama²⁸⁶ i carcinoma renal³⁸⁰ contribueix a la

pèrdua dels contactes focals. Finalment, una altra hipòtesi seria que LOXL2 participa en la diferenciació aberrant miogènica, ja que s'ha proposat un paper de LOXL2 en la inhibició de la diferenciació epidèrmica²⁸⁵, però es desconeixen completament els mecanismes pels quals duu a terme aquesta funció.

El següent punt a considerar és l'activitat catalítica de LOXL2. El model de reintroducció en RH28 ens va permetre obtenir mutants sense activitat lisil oxidasa i estudiar-ne així el paper enzimàtic en la funció de LOXL2. Els mutants d'oxidació presentaven dos mutacions puntuals en el domini d'unió a coure de LOXL2, His626 i His628, i una mutació puntual en la Tyr689 que forma el cofactor LTQ, confirmant en RMS la importància d'aquests dominis en l'activitat catalítica, igual com es va demostrar en reintroduir *LOXL2* en cèl·lules HEK293²⁷⁰. En caracteritzar el fenotip neoplàstic, els resultats ens permeten afirmar que les funcions promogudes per LOXL2 (proliferació, capacitat clonogènica, migració, invasió i metàstasi) són independents de la seva activitat catalítica. Si l'activitat lisil oxidasa no és necessària per a la funció de LOXL2, això suggereix que altres dominis com els SRCR podrien ser importants. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, seria necessari obtenir mutants de deleció dels diferents dominis SRCR, permetent així desxifrar quina part de l'estructura de LOXL2 està involucrada en el fenotip neoplàstic de les cèl·lules de RMS.

L'activitat catalítica de LOXL2 és un aspecte de gran interès i controvèrsia en la literatura ja que, per un costat, s'han descrit funcions dependents de la seva activitat catalítica, però a la vegada, altres estudis afirmen funcions independents. De la mateixa manera, altres enzims causen respostes biològiques per mecanismes que no requereixen de la seva activitat enzimàtica, com per exemple la heparanasa³⁸⁸ o la fosfoglucosa isomerasa³⁸⁹. Particularment, en diferents carcinomes la utilització d'un anticòs monoclonal, el qual només inhibeix LOXL2 secretat, va reduir el creixement tumoral i la metàstasi *in vivo*, posant de manifest la possible rellevància de l'activitat catalítica extracel·lular i sobretot en el remodelatge de la MEC^{283,390}. Altres funcions de LOXL2 dependents de l'activitat catalítica són l'oxidació de la histona 3²⁹⁷ o del factor de transcripció TAF10³¹⁰, o l'activació de FAK/Src mitjançant la producció de peròxid d'hidrogen²⁸⁹. De tota manera, tal i com s'ha comentat també es proposen funcions independents de l'activitat lisil oxidasa. Per exemple, la inhibició de la diferenciació de queratinòcits³⁰⁸ o l'activació de gens que regulen la polaritat cel·lular²⁸⁶. A la vegada, hi ha resultats contradictoris en quan a la mateixa funció de LOXL2 segons el model cel·lular. Un és el cas de Snail: d'una banda s'ha descrit que l'activitat catalítica de LOXL2 és necessària per tal d'estabilitzar Snail i promoure la TEM²²⁶, però altrament, s'ha descrit que mutants catalítics estabilitzen Snail i indueixen la TEM igual que

LOXL2 *wt*²⁷⁰. L'altre exemple és en FAK: inicialment es va descriure que la seva activació era dependent de la formació de peròxid d'hidrogen^{288,289}, producte de la reacció lisil oxidasa, però després s'ha proposat que és independent de l'activitat enzimàtica²⁷⁰. En els resultats obtinguts en aquesta tesi no s'observen diferències en el fenotip *in vitro* entre LOXL2 *wt* i el mutant d'oxidació. En l'experiment *in vivo*, la incidència de ratolins amb metàstasi és la mateixa, tot i que la mitjana del nombre de metàstasis en els ratolins amb cèl·lules LOXL2 *wt* és major que en els mutants d'oxidació. Per tant, no es pot descartar que en l'ambient tumoral, on la MEC té una funció clau durant el procés metastàtic, l'activitat catalítica de LOXL2 sí contribueixi parcialment en la progressió tumoral. No obstant, per tal de confirmar aquesta hipòtesi seria necessari realitzar l'experiment amb més d'un clon LOXL2 *wt* i mutant.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que LOXL2 és important en la progressió tumoral i metastàtica del RMS, de forma independent a l'activitat catalítica i en concordança al que té lloc en altres càncers, on l'expressió de LOXL2 s'ha associat a una menor supervivència^{283,285,289}. A més, el fet que LOXL2 sigui rellevant en el procés metastàtic del RMS i que la metàstasi sigui el principal factor pronòstic dels pacients amb RMS li dona molta rellevància al fenotip que es descriu en aquesta tesi.

3. FUNCIÓ DE LOXL2 EN UN ALTRE SARCOMA PEDIÀTRIC

L'ARMS és un sarcoma pediàtric poc comú. Amb la idea d'esbrinar si LOXL2 pot ser un component important en la progressió d'altres sarcomes pediàtrics vam analitzar el seu paper en el SE. 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. Tradicionalment, aquest tumor s'ha englobat dins la família de tumors del SE, que també inclou altres neoplàsies com els tumors neuroectodèrmics primitius perifèrics o els tumors d'Askin³⁹¹.

A més, una característica comuna en ambdós sarcomes pediàtrics és la presència d'una translocació cromosòmica. En el SE la majoritària és entre el domini d'unió a l'ADN d'EWS i el gen que codifica per al factor de transcripció FLI1, donant lloc a la proteïna de fusió EWS/FLI1. Aquesta actua com un factor de transcripció aberrant, desregulant els seus gens diana i causant la transformació oncogènica³⁹². Una altra característica en comú és la baixa supervivència dels pacients que presenten metàstasi^{24,25,393,394}. En els pacients amb SE la supervivència als 5 anys és del 65-75 % en malaltia localitzada en el moment del diagnòstic, no obstant, cau al 30 % en la malaltia metastàtica^{393,394}.

En el SE s'ha demostrat la implicació d'un altre membre de la família, concretament LOX³⁹⁵. En l'estudi identifiquen LOX com a diana reprimida per EWS/FLI1³⁹⁵, proteïna de fusió que actua com el principal promotor de la transformació tumoral en el SE. En conseqüència, LOX no s'expressa en cèl·lules ni tumors de SE. En reintroduir LOX en les cèl·lules de SE observen que específicament el propèptid actua com a supressor tumoral, reduint la proliferació, migració cel·lular i la formació de tumors *in vivo*. De fet, el paper supressor tumoral específicament del propèptid LOX també s'ha descrit en altres tumors^{249,250}.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren una expressió indetectable de LOXL2 en SE. Per tal d'estudiar-ne la seva funció, es va obtenir un model de reintroducció estable. LOXL2 reintroduït localitza en el citoplasma de les cèl·lules de SE i es secreta al medi extracel·lular en una forma d'uns 100 kDa. En caracteritzar-ne el fenotip es va observar una disminució de la capacitat clonogènica, proliferativa i migratòria de les cèl·lules, suggerint un paper supressor tumoral. El paper supressor de LOXL2 s'ha proposat en altres tumors, on s'ha establert una correlació entre una baixa expressió i un pitjor pronòstic^{276-278,280}. No obstant, no hi ha estudis en més detall sobre la funció supressora de LOXL2 i quins poden ser els mecanismes involucrats. En els resultats obtinguts també s'ha observat que el paper supressor tumoral de LOXL2 en SE és independent de la capacitat catalítica, tal i com s'ha corroborat en RMS.

Un altre aspecte a comentar és com LOXL2 pot estar silenciada en el SE. La primera hipòtesi, la qual es basa en resultats previs del nostre grup, és que la proteïna de fusió EWS/FLI1 reprimeix LOXL2, igual que LOX. Específicament, s'ha observat com el silenciament transitori d'*EWS/FLI1* restaura l'expressió de LOXL2 en SE. A més, en un article publicat, en silenciar *EWS/FLI1* i analitzar el perfil d'expressió gènica per tal d'identificar dianes de la proteïna de la fusió, un dels gens que es troba incrementat és LOXL2³⁹⁶, donant suport a la hipòtesi que la proteïna de fusió l'està reprimint. Un altre possible mecanisme seria epigenètic. Tal i com s'ha comentat anteriorment, resultats no publicats del nostre grup han desxifrat el perfil de metilació del RMS i el SE en comparació a teixit sa, suggerint un *enhancer* potencial de LOXL2 que en el SE estava diferencialment hipermetilat, procés que s'associaria a la repressió gènica. Finalment, altres mecanismes també podrien participar en la repressió de LOXL2, com ARNmi o altres factors de transcripció.

Així doncs, el SE seria una de les entitats tumorals on LOXL2 sembla actuar com a supressor tumoral i no com a oncogen, de forma independent a l'activitat lisil oxidasa. No obstant, per tal de confirmar aquesta funció cal remarcar que seria necessari

reproduir els resultats en una altra línia cel·lular de SE. Aquest rol oposat en comparació al RMS posa de manifest la complexitat d'aquesta proteïna i les seves múltiples funcions dependents del tipus tumoral.

4. FAMÍLIA DE PROTEÏNES LOX EN RMS

Els membres de la família LOX presenten un domini C-terminal conservat, mentre que difereixen en el N-terminal. La seqüència del domini C-terminal té una elevada homologia (d'un 65 % a un 80 %) i identitat (més d'un 50 %) entre els diferents membres de la família²¹⁵. Seqüència i estructura s'utilitzen per tal de predir la funció d'una proteïna, tot i que compartir una alta similitud o identitat en la seqüència o estructura no necessàriament implica la mateixa funció³⁹⁷. De fet, totes elles comparteixen l'activitat catalítica lisil oxidasa sent capaces d'oxidar proteïnes de la MEC com el col·lagen o l'elastina²¹⁵. No obstant, les evidències obtingudes fins al moment no proposen un efecte compensatori entre elles. A part de compartir el domini C-terminal conservat, el fet que el domini N-terminal sigui altament variable entre elles també pot jugar un paper important. És més, en LOXL1, LOXL2, LOXL3 i LOXL4 s'ha plantejat que són els dominis SRCR els responsables d'interaccionar amb altres proteïnes i determinar-ne la funció²²⁴.

Un exemple de la manca d'efecte compensatori és en models animals de pèrdua de funció²²⁹⁻²³¹. La inhabilitat dels altres membres de la família LOX per compensar l'absència d'una d'elles, tot i compartir el mateix domini catalític conservat, a part de reafirmar que no hi ha un efecte compensatori suggereix que durant el desenvolupament les proteïnes presenten una distribució temporal o espacial diferent, i/o que les seves funcions són diferents.

Altres membres de la família LOX també s'han vist implicats en processos tumorals i més especialment LOX²⁰⁸. Tenint en compte el possible paper de les proteïnes LOX en càncer, es va analitzar la seva expressió per RT-qPCR. Els resultats obtinguts ens van permetre descartar un efecte compensatori, ja que no es va detectar un canvi en l'expressió dels gens *LOX* en silenciar o reintroduir *LOXL2*.

En la literatura alguns autors mostren que el silenciament de *LOXL2* no afecta l'expressió dels altres membres de la família en cèl·lules tumorals^{283,398}, tot i que en alguns models sí s'ha observat un canvi sobretot en *LOX*. És el cas d'un treball en càncer de mama²⁸³, on en una de les dues línies cel·lulars analitzades en silenciar genèticament *LOXL2* no veuen efectes en el creixement tumoral i ho atribueixen a un increment de *LOX*. En l'altra línia cel·lular aquest fenomen no té lloc. Uns altres autors

també observen en càncer de mama un lleuger increment de *LOX* en silenciar *LOXL2*, però sense alterar els efectes³⁹⁸. És més, en un tercer estudi també en càncer de mama el silenciament de *LOXL2* indueix un increment en *LOX* i *LOXL3* però sense compensar l'efecte de la pèrdua de *LOXL2*²⁹⁶. En aquest punt cal remarcar que en càncer de mama s'ha descrit un paper promotor tumoral de *LOXL2* i també de *LOX*³¹¹ i, per tant, en aquest model les dues proteïnes sí podrien funcionar coordinades. Tanmateix, en carcinoma escamós s'ha proposat que l'expressió de *LOX* i *LOXL2* es troba inversament regulada: *LOXL2* inhibeix gens importants per a la diferenciació dels queratinòcits, en canvi, en la diferenciació epidèrmica l'expressió de *LOXL2* s'inhibeix i la de *LOX* s'indueix, la qual és necessària per al procés de diferenciació³⁹⁹.

Amb tot plegat, els resultats suggereixen una funció específica de *LOXL2* en RMS que no és compensada pels altres membres de la família *LOX*.

5. PAPER DE LA N-GLICOSILACIÓ DE *LOXL2*

LOXL2 presenta múltiples modificacions post-traduccionals, entre les quals la N-glicosilació és de gran importància per a la seva localització i funció. S'han predit tres possibles llocs de N-glicosilació en h*LOXL2*: Asn-288, Asn-455 i Asn-644. Els dos últims s'ha confirmat per MS i s'ha descrit que són essencials, de forma independent, per a la secreció al medi extracel·lular²²⁵, tot i que amb certa controvèrsia. En cèl·lules de *Drosophila* s'ha vist que a més de ser importants per a la secreció també insolubilitzen la proteïna²²⁵, en canvi, en cèl·lules MCF-7 els dos residus són essencials per a la secreció però no per a l'estabilitat de la proteïna, ja que els mutants es trobaven en la fracció soluble intracel·lular²²⁶.

Una forma àmpliament utilitzada per tal de confirmar la N-glicosilació de les proteïnes és mitjançant el tractament amb l'inhibidor de la N-glicosilació tunicamicina. En observar una disminució en el pes molecular de *LOXL2* després del tractament es va confirmar aquesta modificació en cèl·lules de RMS. A més, en concordança amb la literatura^{225,226}, en inhibir la N-glicosilació *LOXL2* no es secretava al medi extracel·lular.

La distribució espacial de *LOXL2* pot determinar la varietat de les proteïnes amb que interacciona i les diferents funcions que contribueixen a la progressió tumoral i la metastasi. Per aquest motiu, és de rellevància distingir entre les funcions intracel·lulars i extracel·lulars, fet que seria més complicat en cas que *LOXL2* secretat fos internalitzat. En les línies cel·lulars MCF-7 i MDA-MB-231²²⁶ i en la línia HaCaT³⁰⁸, transformada i no tumorigènica derivada de la pell d'adult, detecten *LOXL2* intracel·lular amb un pes molecular de 75 kDa, suggerint una possible internalització de *LOXL2*

DISCUSSIÓ

secretat. En el primer estudi, proposen que una part de LOXL2 no es glicosilat i per tant no es secreta. No obstant, en aquest cas la massa molecular predita seria d'uns 84 kDa, així doncs, a la vegada proposen que es processa intracel·lularment²²⁶. Altrament, en HaCaT suggereixen la internalització de LOXL2. En incubar les cèl·lules amb LOXL2 recombinant detecten per *western blot* LOXL2 internalitzat i, a més, aquest procés pot ser inhibït amb l'anticòs anti-LOXL2 AB0023. Així, suggereixen la presència d'un receptor de LOXL2 que sigui capaç d'internalitzar-lo³⁰⁸, sent els primers i únics autors en proposar-ho. Basant-nos en la possibilitat que LOXL2 s'internalitzés, vam investigar aquesta hipòtesi. Enlloc d'utilitzar LOXL2 recombinant es van tractar les cèl·lules RH28 amb medis condicionants de cèl·lules RH28-LOXL2 i no es va detectar internalització de LOXL2. Després de descartar aquest procés, es va obtenir un mutant no secretable de LOXL2 amb l'objectiu de distingir entre les funcions intra- i extracel·lulars.

Per tal d'obtenir el mutant no secretable es van mutar els residus Asn potencialment N-glicosilats de LOXL2 a Gln. Concretament, RLsecmut2x són cèl·lules RH28 transfectades amb el vector LOXL2 que conté dos residus mutats, N455G i N644G, mentre que RLsecmut3x conté els tres residus mutats, N288G, N455G i N644G. La N-glicosilació de les proteïnes pot ser un procés important per a la seva estabilitat i secreció al medi extracel·lular^{400,401}. En aquests dos mutants es va descartar que la N-glicosilació dels residus fos essencial per a l'estabilitat de la proteïna, ja que LOXL2 es va detectar en la fracció soluble intracel·lular, igual que el que s'ha descrit en els mutants de secreció de LOXL2 en cèl·lules MCF-7²²⁶. En el RLsecmut2x es va detectar menys LOXL2 secretat i la banda corresponent era de menor pes molecular que LOXL2 *wt*, posant de manifest la pèrdua de les dues N-glicosilacions en N455 i N644. No obstant, per tal d'inhibir la seva secreció va ser necessari mutar els tres residus potencialment N-glicosilables, tal i com es va observar en el RLsecmut3x. Aquest resultat demostra, a diferència del que està de forma més extensa descrit en la literatura^{226,308,348}, que N288 sí és N-glicosilat i que aquesta modificació sí és important per a la secreció de LOXL2 en RMS. També cal comentar que la nostra aproximació ens permet dir, contràriament a la literatura, que N455 i N644 no són independentment necessaris per la secreció de LOXL2, sinó que ho són els tres a la vegada.

Un cop obtingudes cèl·lules que no secreten LOXL2 (RLsecmut3x) o que en secreten nivells baixos (RLsecmut2x) es va caracteritzar el seu fenotip neoplàstic. Curiosament, ambdós mutants no van ser capaços de formar colònies, igual que les cèl·lules control sense LOXL2. En els assajos de proliferació, els mutants de secreció també es comportaven com les cèl·lules control, tot i que RLsecmut2x presentava una major

ràtio que aquestes però menor que les RLwt. Contràriament, els mutants de secreció incrementaven les capacitats migratòries i invasives de les cèl·lules al mateix nivell que RLwt. Aquests resultats suggereixen que els dos mutants no són capaços d'incrementar la proliferació i la capacitat clonogènica de les cèl·lules, presentant un comportament molt similar. Solament es diferencien en que el RLsecmut2x presenta una lleugera major proliferació. Això pot ser degut a que LOXL2 secretat és necessari per incrementar la proliferació i la capacitat clonogènica de les cèl·lules, o bé que LOXL2 intracel·lular no glicosilat veu parcialment afectada la seva funció. Tot seguit, en tractar els mutants amb hLOXL2r no es van observar diferències en la proliferació. Si LOXL2 extracel·lular fos necessari per promoure l'increment en la proliferació cel·lular, s'esperaria que en afegir hLOXL2r les cèl·lules proliferessin més. En no observar aquest efecte, la justificació més probable és que les N-glicosilacions són importants per algunes de les funcions de LOXL2, com són la proliferació i la capacitat clonogènica. Contràriament, no ho són en la migració i en la invasió. A més, també es descarta un paper de LOXL2 secretat en aquests dos processos. No obstant, per tal de descartar que LOXL2 intra- i extracel·lular col·laborin en la proliferació i la capacitat clonogènica de les cèl·lules, seria necessari bloquejar d'una altra manera la secreció de LOXL2 sense afectar la seva N-glicosilació.

En la literatura hi ha un parell de treballs on obtenen mutants de secreció de LOXL2. El primer utilitzen la mateixa estratègia, mutacions en els residus N-glicosilables²²⁶. En cèl·lules MCF-7 observen com el mutant no secretable, que només localitza intracel·lularment, és el responsable de promoure la TEM, establir Snail, incrementar la invasió i activar MT1-MMP, a diferència de LOXL2 *wt* (el qual sí es secreta) que presenta un fenotip epitelial²²⁶. Altrament, en cèl·lules HEK293 s'expressa un mutant amb la deleció d'una regió del domini catalític que inclou el domini d'unió a Cu⁺, el residu Lys655 que forma el LTQ i el residu N-glicosilable N644²⁷⁰. Aquest mutant no és secretat, no presenta activitat lisil oxidasa i igualment és capaç de promoure la TEM, reprimint el promotor *CDH1* i activant l'expressió de marcadors mesenquimals²⁷⁰. Així doncs, en ambdós casos descriuen que la funció de LOXL2 depèn de la forma intracel·lular. Altres funcions intracel·lulars de LOXL2 descrites que participen en la progressió tumoral són l'oxidació de la histona 3²⁹⁷, la regulació transcripcional de gens involucrats en polaritat cel·lular^{269,286} o la inhibició de la diferenciació epitelial²⁸⁵. De forma contrària, també s'ha proposat funcions promogudes per LOXL2 extracel·lular. Principalment, s'ha descrit que en inhibir LOXL2 extracel·lular mitjançant un anticòs anti-LOXL2 es reverteixen els efectes. N'és un exemple en càncer gàstric o de mama, on s'inhibeix la invasió, el creixement tumoral i

DISCUSSIÓ

la formació de metàstasis^{287,289}, o en HaCaT, on la inhibició de LOXL2 amb AB0023 promou la diferenciació epitelial³⁰⁸.

Mentre que la majoria de proteïnes es reconeixen per les seves múltiples funcions, el sucres als que estan units poques vegades reben atenció. En aquest treball es destaca la importància de la N-glicosilació de LOXL2 en la seva funció. La N-glicosilació és una de les modificacions post-traduccionals més importants i complexes en les cèl·lules⁴⁰². Nombrosos experiments han revelat que la glicosilació altera la termodinàmica, cinètica i estructura, conferint una informació addicional a la que ve donada per la seva seqüència. Aquesta modificació proteica s'ha vist implicada en molts processos biològics com són el plegament, l'estabilitat, l'oligomerització, l'agregació, el control de qualitat en el reticle endoplasmàtic, el tràfic proteic, les interaccions proteiques i la modulació de l'activitat enzimàtica⁴⁰². Tenint en compte això, la manca de glicosilació en LOXL2 no sembla que afecti la seva síntesi ni en promogui la seva degradació, ja que sí que es detecta intracel·lularment, però es desconeix si la seva conformació es veu afectada. D'entrada la glicosilació sí afecta el plegament de les proteïnes, tot i això, algunes d'elles poden adquirir la seva conformació nativa independentment de la glicosilació, mentre que altres en són parcialment dependents⁴⁰³. Els nostres resultats només ens permeten concloure que la seva funció es veu parcialment afectada. La hipòtesi que es planteja és que LOXL2 no glicosilat canvia la seva conformació o estructura, de forma que no pot interaccionar amb els seus *targets* potencials importants per a la proliferació i la capacitat clonogènica de les cèl·lules. En canvi, els mecanismes pels quals incrementa la migració i invasió cel·lular en serien independents ja que no es veuen afectats. Tot i que no es vegi una afectació en aquestes dues funcions, no es pot descartar que la conformació de LOXL2 estigui alterada, tal i com s'ha vist en altres proteïnes on en eliminar els N-glicans no s'han vist efectes en la seva funció però sí en el seu plegament^{403,404}. En definitiva, serien necessaris estudis més acurats per tal de determinar l'afectació en l'estabilitat i plegament de la proteïna i determinar a la vegada quins són els mecanismes que es veuen afectats en inhibir la N-glicosilació.

Finalment, si la localització de LOXL2 és important per a la seva funció, un altre punt a considerar és com es regula aquesta localització. Al ser una proteïna secretada, LOXL2 es tradueix a la vegada que es transloca en el reticle endoplasmàtic, on es sotmet a diferents processos de maduració abans de ser exportat⁴⁰⁵. Entre aquests processos es troben la formació de ponts disulfur, l'adició dels tres N-glicans, la coordinació del Cu⁺ i la formació autocatalítica del LTQ. Tots són essencials per a la maduració de l'enzim i, per tant, per poder sortir del reticle endoplasmàtic^{215,225}. Si

LOXL2 segueix la via secretora, la seva localització esperada seria citoplasmàtica i secretada al medi extracel·lular. No obstant, també localitza al nucli i regió perinuclear^{295,297}. Certament, es desconeix quins són els mecanismes que regulen la localització de LOXL2. S'ha hipotetitzat que en condicions de sobreexpressió LOXL2 es pot acumular al reticle endoplasmàtic i donar lloc a la localització perinuclear. De fet, en carcinoma escamós de laringe i carcinoma basal de mama LOXL2 presenta una localització perinuclear, que s'ha proposat que està associada amb l'activació de la resposta UPR (*Unfolded Protein Response*)²⁹⁵. També es desconeix com LOXL2 localitza al nucli. Podria ser que des del RE fos exportada al citosol i d'allí es transloqués al nucli, tot i que no s'ha descrit que presenti una seqüència de localització nuclear. Una altra possibilitat seria l'existència d'un transcrit alternatiu que no fos glicosilat i localitzés al nucli. Per intentar entendre els mecanismes que regulen la seva localització en RMS es van tractar les cèl·lules amb tunicamicina i posteriorment es va realitzar subfraccionament cel·lular. Aquest experiment va permetre observar que totes les subfraccions intracel·lulars de LOXL2 estan glicosilades. Això suggereix que LOXL2 N-glicosilat en el reticle endoplasmàtic és el que es transportarà a la seva localització destí, descartant la hipòtesi del transcrit alternatiu.

6. LOXL2 INTERACCIONA AMB VIMENTINA I CALPAÏNA-2, PARTICIPANT EN LA REGULACIÓ DELS FILAMENTS DE VIMENTINA

Tot i la gran evidència del paper múltiple de LOXL2 en la tumorigènesi i la progressió metastàtica, els mecanismes pels quals actua no s'han establert completament. La recerca de molècules que interaccionin amb LOXL2 pot ser clau per entendre el funcionament d'aquesta proteïna. Amb aquesta finalitat es va realitzar un estudi de purificació per afinitat, concretament un *pull down*, combinat amb l'anàlisi proteòmic per MS. En aquest punt val la pena destacar les limitacions que presenta la tècnica. Principalment, distingir entre les proteïnes d'unió específiques i les contaminants pot ser una tasca complicada, ja que moltes proteïnes es poden unir de forma inespecífica al suport físic (boles d'agarosa) o al *tag*. A més, unes proteïnes poden emascarar la senyal d'unes altres perquè són més abundants o degut a les seves propietats fisicoquímiques, inclús alguns pèptids s'ionitzen i es fraccionen millor que altres, sent fàcilment caracteritzats. Per tant, algunes proteïnes són fàcilment més detectables que altres³⁴⁶. A part de contaminants que són falsos positius, la tècnica també presenta com a limitació els falsos negatius. Hi ha múltiples raons per les quals una proteïna pot no ser identificada. Entre elles, les proteïnes poden no haver interaccionat en aquelles condicions, el *tag* pot afectar a la interacció o les condicions de l'assaig de purificació

DISCUSSIÓ

per afinitat poden haver estat massa astringents per mantenir la interacció. Tot i això, normalment la manca d'interacció sol ser per un problema d'abundància relativa en la mostra³⁷².

Per tal d'eliminar el màxim de contaminants és de gran importància utilitzar els controls adequats. En el nostre model, ja que les cèl·lules transfectades amb LOXL2 tenien el *tag* FLAG, com a control negatiu es van utilitzar les mateixes cèl·lules amb el mateix vector buit i el *tag* FLAG. Tot i així, no totes les proteïnes que s'uneixen inespecíficament al suport o al *tag* es detecten en el control negatiu, ni tenen perquè ser reproduïbles entre dues rèpliques. Això es deu a que al ser proteïnes poc abundants la seva detecció és menys fiable³⁴⁶. Ja que analitzar una o més mostres que siguin control negatiu no garanteix una bona caracterització dels possibles contaminants, de forma complementària es van comparar els resultats amb la base de dades pública CRAPome³⁴⁶. Tal i com s'ha comentat, la base de dades recull molts estudis AP-MS. Aquesta base de dades ens va permetre eliminar altres proteïnes que en el nostre control negatiu no van aparèixer però de forma molt recurrent s'uneixen en els *pull down* anti-FLAG. Alguns contaminants freqüentment abundants són proteïnes del citoesquelet com actines o tubulines, proteïnes *heat-shock*, histones i proteïnes ribosomals^{346,372}. Tot i això, no es pot descartar una interacció de LOXL2 amb aquestes proteïnes, ja que, per exemple, LOXL2 regula l'expressió de gens importants per als complexos de polaritat i unions estretes promovent la motilitat cel·lular²⁸⁶, per tant, podria estar participant en la reorganització del citoesquelet. En la literatura, segons el nostre coneixement, s'han publicat tres estudis de purificació per afinitat de LOXL2 analitzats per MS. En el primer d'ells, analitzen per TAP (*Tandem Affinity Purification*)-MS lisats de cèl·lules HEK293 transfectades establement amb *LOXL2*. Concretament, validen la interacció LOXL2-histona 3²⁹⁷. Un altre estudi en cèl·lules HEK293T transfectades amb *LOXL2-FLAG* purifiquen les proteïnes potencials d'interacció amb boles d'agarosa conjugades amb anti-FLAG²⁹⁵, igual que la nostra aproximació. En aquest treball validen la interacció de LOXL2 amb la proteïna *heat shock* HSPA5. En ambdós treballs validen interaccions amb proteïnes que tot i ser contaminants comuns, són *partners* específics de LOXL2^{295,297}. Finalment, en l'últim estudi purifiquen mitjançant el sistema estreptavidina-biotina proteïnes oxidades en cèl·lules HEK293T transfectades amb *LOXL2* i les analitzen per MS. Aquí descriuen que LOXL2 interacciona i és responsable de la oxidació del factor de transcripció TAF10³¹⁰.

En analitzar els resultats obtinguts en aquest treball per MS, es van seleccionar les proteïnes que es van trobar en comú en els clons RLwt1 i RLoxmut12, ja que

prèviament no s'havien observat diferències a nivell fenotípic entre LOXL2 *wt* i els mutants d'oxidació. A la vegada, es van seleccionar les que eren absents en el control negatiu i després es van comparar amb la base de dades CRAPome. El llistat de proteïnes després d'aquest anàlisi va ser força reduït i moltes de les proteïnes que van aparèixer eren possibles contaminants freqüents de la tècnica. Considerant que en els resultats del MS es va detectar un gran nombre de proteïnes que de forma habitual actuen com a contaminants i poques proteïnes candidates a ser *partners* de la nostra proteïna d'interès, es podria intentar millorar realitzant una altra aproximació anomenada TAP. Aquesta tècnica consisteix en dues purificacions per afinitat i seria una bona alternativa ja que com a principal avantatge disminueix considerablement el nombre de contaminants i incrementa la confiança de les interaccions³⁷².

En les proteïnes obtingudes per MS, LOXL2 va ser la que es va identificar amb un major nombre de pèptids, confirmant el enriquiment en el *pull down*. D'entre els *targets* possibles de LOXL2, tres estaven implicats en motilitat cel·lular: vimentina, SLAIN2 (*SLAIN Motif Family Member 2*) i ARF3 (*ADP-ribosylation factor 3*). SLAIN2 s'uneix a l'extrem positiu dels microtúbuls i regula la seva dinàmica i organització, per tant, és important en la regulació del citoesquelet⁴⁰⁶. Igual que vimentina, ens va semblar de gran interès degut al fenotip migratori i invasiu que promou LOXL2, tot i que a causa de la baixa disponibilitat d'anticossos no vam validar-la. En quant a ARF3 (*ADP-ribosylation factor 3*) és un proteïna d'unió a GTPasa que pertany a la família ARF, família de proteïnes que regulen el transport de membrana i l'organització del citoesquelet⁴⁰⁷. A més, algunes d'elles s'han vist implicades en migració i invasió, trobant una expressió alterada en càncer⁴⁰⁸, tot i que ARF3 ha estat poc caracteritzada. Curiosament, en un treball publicat proposen que ARF3 en cèl·lules epitelials de mama interacciona amb histona 3 acetilada⁴⁰⁹. Per tant, no es pot descartar una funció nuclear de LOXL2.

Entre les proteïnes d'unió a ADN i ARN es va trobar PARP1 i RBM10, respectivament. PARP1 afecta múltiples processos biològics, entre els quals es troben les vies *DNA Damage Response* (DDR), *Base-Excision Repair* (BER) i *DNA Double-Strand Break* (DSB). També és important per mantenir la integritat genòmica i la regulació transcripcional⁴¹⁰. S'ha vist implicat en la progressió tumoral i la seva inhibició en RMS indueix toxicitat i sensibilitza les cèl·lules a altres agents quimioterapèutics⁴¹¹. RBM10 és una proteïna d'unió a l'ARN i un regulador de *splicing*, en la qual s'han detectat mutacions que afecten la seva funció supressora tumoral en alguns càncers com pulmó i carcinoma colorectal^{412,413}. Per tant, degut a la funció proposada de LOXL2 com a regulador transcripcional, ambdues proteïnes ens van semblar de gran interès.

DISCUSSIÓ

En validar-les per *pull down* i *western blot* es va observar que es tractava d'una interacció inespecífica, ja que també es van trobar en el control negatiu. Les proteïnes d'unió a l'ADN i a l'ARN són contaminants freqüents en els estudis AP-MS, ja que l'ADN i l'ARN s'uneixen amb facilitat durant el procés de purificació. Per aquest motiu, en el protocol es tracta amb benzonasa, una nucleasa que degrada ADN i ARN sense presentar activitat proteolítica. Malgrat tot, aquestes dues proteïnes contaminants no es van detectar en el control negatiu en el MS però sí en comprovar-ho per *pull down* i *western blot*.

Una altra proteïna d'interès va ser PGBM (*Basement Membrane-specific Heparan Sulfate Proteoglycan Core Protein*). PGBM, també anomenat perlecan, és un proteoglicà que s'uneix i participa en el *crosslinking* de diferents components de la MEC i de proteïnes de la membrana. Joga un paper en adhesió, proliferació i diferenciació cel·lular, i en la unió a factors de creixement. A més, s'ha vist alterat en càncer i altres malalties com Alzheimer i diabetis⁴¹⁴. De tota manera no va ser validat, ja que en RMS havíem observat que les funcions de LOXL2 en els processos prometastàtics eren independents de l'activitat catalítica i independents de LOXL2 secretat. De fet, podria ser que perlecan interaccionés amb LOXL2 durant el *crosslinking* de la MEC.

Cal esmentar que SLAIN2, PGBM i ARF3 apareixen en un percentatge molt baix en els estudis del CRAPome, SLAIN2 i PGBM menys d'un 10 % i ARF3 un 20 %. En canvi, vimentina, PARP1 i RBM10 es troben en un 50 % dels estudis. Igualment, la base de dades CRAPome ens dona de forma orientativa amb quina freqüència es troba una proteïna en els controls negatius, tot i que això, tal i com hem comentat, no necessàriament implica que sigui un fals positiu, com és el cas de la vimentina. En canvi, que una proteïna aparegui amb una freqüència molt baixa en la base de dades CRAPome sí dona certa confiança a la interacció.

Amb tot plegat, es va decidir aprofundir en la possible interacció LOXL2-vimentina, la única que es va validar com a específica de les tres analitzades. Aquesta interacció es va confirmar en el model RH28-LOXL2/FLAG per *pull down* anti-FLAG així com per IP anti-vimentina. En el model RH28-LOXL2/mCherry d'expressió transitòria mitjançant immunofluorescència es va detectar una colocalització parcial entre LOXL2 i vimentina. Finalment, la interacció també es va confirmar per IP anti-vimentina en la línia de RMS RH4. Així doncs, múltiples evidències donaven suport a aquesta interacció.

Vimentina és un dels filaments intermedis (IF: *Intermediate Filament*) de tipus III més abundants i conservats. És important en el manteniment de la integritat cel·lular, la resistència a l'estrès i també s'ha vist involucrada en processos tumorals³⁴⁹. Vimentina s'expressa principalment en cèl·lules d'origen mesenquimal i s'utilitza com a marcador de la TEM³⁵⁰. A nivell estructural consta d'una regió N-terminal amb el cap, una regió C-terminal amb la cua i un domini central α -hèlix *rod*. L'estructura del domini central permet la formació de dímers *coiled-coil*. Dos dímers s'associen de forma antiparal·lela per formar un tetràmer, la subunitat fonamental dels IFs. Finalment, múltiples tetràmers s'associen per formar un IF elongat, anomenat VIF (*Vimentin Intermediate Filament*)³⁵⁰. La sobreexpressió de vimentina s'ha associat amb la progressió tumoral, la TEM, la metastasi i un pitjor pronòstic^{349,415,416}. Es troba sobreexpressada en nombrosos càncers, com pròstata, gastrointestinals, del sistema nerviós central, mama, melanoma o pulmó. No obstant, són necessaris més estudis per tal d'entendre els mecanismes i les vies de senyalització afectades per vimentina en els processos tumorals.

Les cèl·lules de RMS expressen nivells alts de vimentina. L'alta expressió de vimentina s'ha descrit que pot estar regulada per NF- κ B i TGF- β 1³⁴⁹, igual que en LOXL2. A part de la banda de vimentina total d'uns 57 kDa, també expressen bandes de menor pes molecular. Aquestes bandes s'originen per proteòlisi i provoquen el desassemblatge dels VIFs³⁵⁰. A més de ser modificades per proteòlisi, hi ha múltiples modificacions post-traduccionals que regulen el seu assemblatge i desassemblatge, com la fosforilació, la sumoilació o la glicosilació, les quals són específiques de cada teixit i model cel·lular³⁴⁹.

Per tal de corroborar si vimentina té un paper en les cèl·lules de RMS, es va silenciar transitòriament en la línia RH4. El seu silenciament va reduir considerablement la migració i invasió cel·lular. En concordança amb la literatura, s'ha descrit que vimentina promou la migració i invasió cel·lular en diferents tumors^{415,417}, participant en la formació dels *lamellipodis*⁴¹⁸ i l'elongació dels *invadipodis*⁴¹⁹, protusions cel·lulars importants durant aquests dos processos cel·lulars. En canvi, la proliferació cel·lular només es va veure afectada en un dels dos ARNsi emprats, suggerint un paper més important en la motilitat cel·lular que en la proliferació. Aquest resultat es va intentar reproduir en altres línies de RMS. Tot i això, al presentar una elevada expressió de vimentina no es va aconseguir un bon silenciament que permetés observar canvis en el fenotip.

Tot seguit, en caracteritzar l'expressió de vimentina en el model RH28-LOXL2/FLAG es va observar un increment en les bandes de proteòlisi de vimentina en els clons

DISCUSSIÓ

RH28 on s'havia reintroduït *LOXL2*. La proteòlisi de vimentina es pot donar per dues proteases: caspases⁴²⁰ i calpaïnes⁴²¹. La proteòlisi per part de caspases té lloc en resposta a senyals apoptòtiques. La seva inhibició no va produir una disminució de la proteòlisi de vimentina, a més, tampoc s'havia observat mort cel·lular en reintroduir *LOXL2*. Paral·lelament, en inhibir les calpaïnes sí es va observar una reducció de les bandes de proteòlisi de vimentina.

Les calpaïnes són una família de cisteïna proteases intracel·lulars activades per calci que proteolitzen una gran varietat de substrats, degradant-los o modulant-los funcionalment⁴²². Les calpaïnes estan implicades en la progressió tumoral, promovent la proliferació, els mecanismes de supervivència, la migració i la invasió, i la seva expressió aberrant s'ha detectat en diversos càncers⁴²².

Un dels múltiples substrats de les calpaïnes és la vimentina. L'alta especificitat de substrat controla la regulació, distribució i recanvi dels VIFs. Calpaïna talla específicament en sis posicions del domini N-terminal de vimentina, donant lloc a fragments de proteòlisi de menor pes molecular, concretament, 40, 42, 27, 22, 16 i 15 kDa³⁵⁰. Les cèl·lules RH28 presenten múltiples bandes de proteòlisis de vimentina, entre 57 i uns 40 kDa. Les bandes de proteòlisi de menor pes molecular no van ser detectades. En tractar-les amb l'inhibidor de calpaïnes calpeptina es va observar la desaparició d'una d'elles i l'increment d'una altra forma de menor pes molecular. Això ens indica que la proteòlisi de vimentina és, almenys, parcialment dependent de calpaïnes. Potser és necessària una concentració més alta per tal d'inhibir la proteòlisi o bé altres proteases estan involucrades.

Després de confirmar que l'increment en la proteòlisi de vimentina es devia, almenys parcialment, a l'acció de les calpaïnes, ens vam plantejar si era per una interacció directa o no amb *LOXL2*. La família engloba calpaïnes d'expressió constitutiva i altres associades a un teixit específic. Les dues calpaïnes d'expressió constitutiva més abundants són calpaïna-1 i -2, també anomenades μ -calpaïna i m-calpaïna per la concentració de calci que requereixen per ser activades, micromolar o milimolar respectivament. Ambdues presenten una alta identitat de seqüència (aproximadament un 60 %) i s'activen per autòlisi⁴²². Estan formades per un proenzim heterodimèric que consisteix en la subunitat catalítica de 80 kDa i la subunitat reguladora de 30 kDa. La seva activació requereix la conversió autoproteolítica de 80 kDa a 76 kDa en la calpaïna-1⁴²³ i l'autòlisi de 80 kDa a 78 kDa en la calpaïna-2³⁵². L'activació de les calpaïnes genera la dissociació de la subunitat catalítica i la reguladora³⁵². No sempre és fàcil detectar per *western blot* la seva activació, ja que la diferència de pes

molecular és molt baixa, així doncs, també s'utilitza com a evidència indirecta de la seva activació la presència de la banda o les bandes de degradació, degut a que després de l'activació es proteolitzen³⁵³. Inicialment, es va investigar el paper de calpaïna-2 mitjançant *pull down* anti-FLAG i IP anti-calpaïna-2, confirmant una interacció específica entre LOXL2 i la forma total i de degradació d'uns 50 kDa de calpaïna-2. Per tant, es va corroborar que LOXL2 interacciona amb calpaïna-2, tot i que es desconeix com aquesta interacció afavoreix la proteòlisi de vimentina. Per manca de temps no s'ha pogut determinar si calpaïna-1 també està interaccionant amb LOXL2, però és de gran rellevància ja que en alguns models comparteixen la mateixa funció o col·laboren, però en altres poden tenir funcions independents i inclús oposades^{422,424}.

L'activació de calpaïna-2 és altament regulada per múltiples mecanismes, tot i que el més estudiat és l'activació per calci⁴²⁵. Altres mecanismes alternatius són la fosforilació, la unió a altres proteïnes o l'alliberació del seu inhibidor endogen calpastatina⁴²⁶. En referència a la fosforilació, s'ha descrit que FAK afavoreix la formació del complex ERK-calpaïna-2 de forma que ERK la fosforila, modificació que l'activa i està relacionada amb un increment en la migració cel·lular⁴²⁵. La calpastatina és un inhibidor endogen que s'uneix a les calpaïnes inactives. Tot i que l'alliberament d'aquesta unió es correlaciona amb l'activitat, no és suficient per a l'activació *per se*. Altrament, s'ha proposat que la interacció amb certes proteïnes pot modular l'activitat de les calpaïnes. S'ha suggerit que la dissociació de la subunitat catalítica de la reguladora és un mecanisme d'activació, tot i que és un tema de controvèrsia. Algunes proteïnes s'han proposat com a coactivadores, com per exemple ACBP (*Acyl-CoA-Binding Protein*). No obstant, no s'han confirmat *in vivo* i es desconeix per quin mecanisme podrien estar actuant. Tenint en compte això, alguna de les possibles hipòtesis és que LOXL2 podria estar activant calpaïna-2 directa o indirectament, com per exemple afavorint algunes modificacions de la proteïna que l'activin o facilitant la interacció amb vimentina.

Més de 100 proteïnes diferents han estat identificades com a substrats de calpaïnes. Aquestes proteolitzen generant fragments peptídics grans que tenen funcions diferents de les seves formes totals⁴²⁵. Una evidència de la funció de calpaïna en la motilitat cel·lular és que molts dels seus substrats són proteïnes del citoesquelet, que formen part de complexos d'adhesió o que estan relacionades amb la migració. Algunes d'elles són FAK, α -espectrina, talina, paxilina, E-cadherina, vinculina, vimentina, RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) o integrines⁴²⁵.

DISCUSSIÓ

En RMS uns altres autors han d'escrit un paper clau de les calpaïnes en la migració i invasió cel·lular. Cèl·lules de RMS presenten una major activitat de calpaïnes en comparació a mioblasts humans. A més, s'ha establert una correlació entre l'expressió de calpaïna i la capacitat migratòria de les cèl·lules. La inhibició de l'activitat de calpaïna en cèl·lules de RMS redueix la migració i invasió cel·lular, induint una morfologia rodona amb poques protusions i alterant l'organització del citoesquelet d'actina⁴²⁷.

La proteòlisi de vimentina per part de calpaïnes resulta en un *pool* de fragments que s'ha vist implicat en l'angiogènesi i en la invasió cel·lular³⁵⁰. Una de les hipòtesis que es proposen es basa en el mecanisme descrit en cèl·lules endotelials, on calpaïna promou la invasió en el procés angiogènic³⁵⁰. Concretament, calpaïna talla vimentina, les formes solubles de les quals poden interaccionar amb MT1-MMP (*Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase*). Aquesta metal·loproteïnasa unida a vimentina soluble pot translocar a la membrana i afavorir el *sprouting* i la invasió³⁵⁰. Aquest mecanisme s'ha proposat en altres tipus de càncer i també podria tenir lloc en el RMS. Alternativament, enlloc d'interaccionar amb MT1-MMP, es proposa que vimentina soluble pot d'interaccionar amb altres proteïnes promovent la migració i invasió cel·lular.

Altres autors també proposen que la vimentina que participa en els processos de migració i invasió està lliure i no formant VIFs. Per exemple, en fibroblasts migrant la localització de la vimentina és polaritzada, estenent-se per la part posterior i al voltant del nucli, però solament les partícules de vimentina són les que es troben presents en els fronts de migració o *lamellipodis*. En canvi, en fibroblasts que no estan migrant els VIFs estan distribuïts per tota la cèl·lula i no es detecta vimentina aïllada. Aquest procés s'ha vist que està regulat per la fosforilació de vimentina, modificació que promou el desassemblatge dels VIFs⁴¹⁸.

Si com a conseqüència de la interacció LOXL2-calpaïna-2 hi ha un increment en la seva proteòlisi i vimentina soluble és la que participa en la migració i invasió cel·lular, és d'especial importància determinar per immunofluorescència la seva distribució. De fet, en aquesta tesi s'hi ha estat treballant sense obtenir resultats conclusius. No obstant, els experiments que s'han realitzat han estat en cèl·lules fixades. Per això, el següent pas seria monitoritzar per immunofluorescència la localització de vimentina *in vivo* durant el procés de migració, per exemple mitjançant l'assaig de la ferida. És durant els processos de motilitat cel·lular que s'esperaria observar canvis en la distribució de vimentina.

Finalment, una connexió que s'ha observat entre les tres proteïnes relacionat amb la motilitat cel·lular és FAK i les adhesions focals. D'una banda, s'ha descrit que vimentina interacciona amb FAK regulant les adhesions focals³⁵⁰. Altrament, calpaïna-2 requereix de la interacció amb FAK per tal de ser fosforilada per ERK i promoure la migració cel·lular⁴²⁵. Finalment, LOXL2 s'ha vist involucrat en l'activació de la via FAK i la seva inhibició afecta la formació de les adhesions focals^{289,299}. En aquesta tesi, s'ha observat que la inhibició aguda de LOXL2 redueix dràsticament les adhesions focals i, conseqüentment, la capacitat migratòria i invasiva de les cèl·lules de RMS. És per tot això que LOXL2, vimentina i calpaïna-2 podrien estar regulant la motilitat cel·lular a través de FAK i les adhesions focals.

7. RESUM GENERAL

El conjunt de resultats d'aquest treball evidencien per primer cop que LOXL2 és important en la progressió tumoral i metastàtica del RMS (Figura D1). Aquest fet és de gran rellevància en els pacients amb aquesta malaltia, on la metastasi és el principal factor pronòstic. A més, el mecanisme pel qual LOXL2 promou el fenotip neoplàstic en el RMS és independent de la seva activitat catalítica. Un altre tema de gran importància és la caracterització de LOXL2 intra- i extracel·lular. En aquesta tesi s'ha confirmat que LOXL2 es troba N-glicosilada (Asn288, Asn455 i Asn644) i que aquesta modificació és essencial per a la seva secreció i per duu a terme algunes de les seves funcions. Concretament, LOXL2 intracel·lular no glicosilat és capaç d'incrementar la capacitat migratòria i invasiva de les cèl·lules, descartant un paper de LOXL2 extracel·lular en aquestes funcions. D'altra banda, aquest mutant no glicosilat i no secretat no és capaç de promoure la capacitat clonogènica i proliferativa de les cèl·lules, ni tampoc amb el tractament amb hLOXL2r extracel·lular, suggerint que les N-glicosilacions de LOXL2 afecten aquestes dues funcions.

La identificació de nous *partners* de LOXL2 és de gran significació per tal d'incrementar el coneixement de la funció de LOXL2. Per primer cop s'ha descrit la interacció de LOXL2 amb vimentina, proteïna important durant la migració i invasió en el RMS. A més, LOXL2 regula aquesta proteïna del citoesquelet incrementant la seva proteòlisi parcialment deguda a calpaïna-2, proteasa que també interacciona amb LOXL2. Aquests resultats suggereixen que LOXL2 té un paper important en la regulació del citoesquelet en les cèl·lules de RMS promovent la migració, invasió i metastasi. No obstant, el mecanisme pel qual la interacció LOXL2-vimentina-calpaïna-2 és important s'ha d'examinar amb més detall en el futur.

DISCUSSIÓ

Finalment, els resultats suggereixen que la inhibició de LOXL2 podria ser una nova aproximació terapèutica en els pacients amb RMS. En el cas que el tumor sobreexpressi LOXL2, la inhibició directa podria ser efectiva. Tot i això, és necessari el desenvolupament de nous inhibidors efectius contra LOXL2 els quals no estiguin dirigits contra la seva activitat catalítica. Tanmateix, degut a les múltiples funcions de LOXL2 dependents de la seva localització i teixit, és d'especial importància entendre el mecanisme pel qual està actuant en el RMS i poder desenvolupar estratègies terapèutiques dirigides per tal de bloquejar-lo.

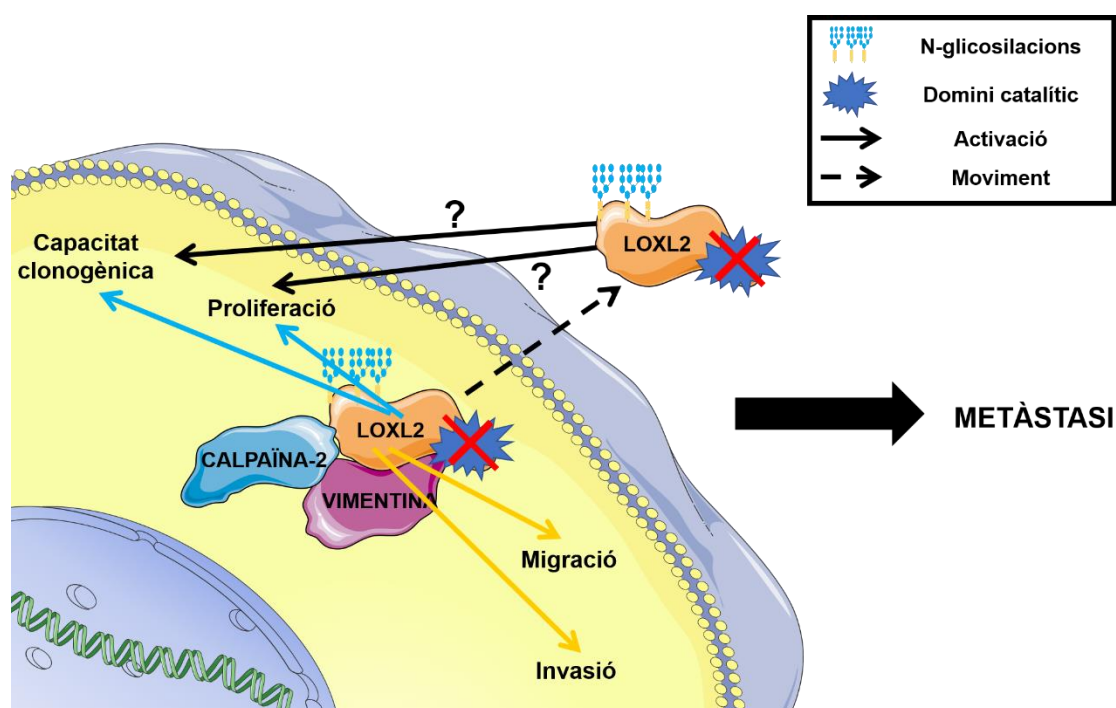


Figura D1: Esquema resum de les funcions de LOXL2 en la progressió tumoral i metastàsica del RMS, totes elles independents de l'activitat catalítica. Els nous *partners* intracel·lulars de LOXL2 són vimentina i calpaïna-2. LOXL2 intracel·lular no glicosilat promou la migració i invasió cel·lular conjuntament amb vimentina. En canvi, la proliferació i capacitat clonogènica de les cèl·lules és dependent de LOXL2 intracel·lular glicosilat i es desconeix si també de LOXL2 extracel·lular. Les fletxes en blau representen les funcions dependents de LOXL2 glicosilat i les fletxes en groc les funcions independents de la glicosilació de LOXL2.

CONCLUSIONS

- I. LOXL2 es troba àmpliament expressada en línies de RMS.
- II. Els pacients amb RMS que expressen LOXL2 presenten una menor supervivència.
- III. LOXL2 localitza intracel·lularment i es secreta al medi extracel·lular.
- IV. LOXL2 es troba N-glicosilada en Asn-288, Asn-455 i Asn-644. La modificació en els tres residus és essencial per a la seva secreció i el seu processament.
- V. Els membres de la família *LOX*, a excepció de *LOXL1*, estan infraexpressats en les línies de RMS en comparació a *LOXL2*. A més, els canvis en l'expressió de *LOXL2* no afecta l'expressió dels altres membres de la família.
- VI. LOXL2 promou la capacitat clonogènica, proliferativa, migratòria i invasiva de les cèl·lules d'ARMS.
- VII. La reintroducció de *LOXL2* en RH28 incrementa la incidència i el nombre de micrometàstasis espontànies en un model ortotòpic *in vivo*.
- VIII. LOXL2 promou el fenotip neoplàstic en ARMS independentment de la seva activitat catalítica.
- IX. LOXL2 secretat no s'internalitza i no és necessari en els processos de migració i invasió cel·lular en ARMS.
- X. LOXL2 intracel·lular no glicosilat és suficient per incrementar la migració i invasió cel·lular però no és capaç de promoure la capacitat clonogènica i proliferativa de les cèl·lules d'ARMS.
- XI. LOXL2 interacciona amb vimentina, proteïna altament expressada en cèl·lules de RMS i important en la migració i invasió cel·lular.
- XII. La reintroducció de *LOXL2* en la línia RH28 incrementa la proteòlisi de vimentina, la qual és parcialment dependent de calpaïna-2, proteïna que també interacciona amb LOXL2.
- XIII. LOXL2 es troba infraexpressat en SE i la seva reintroducció reverteix el fenotip neoplàstic independentment de l'activitat catalítica.

BIBLIOGRAFIA

1. Doyle, L. A. Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer* **120**, 1763–1774 (2014).
2. Elizabeth G. Demicco and Alexander J. Lazar. Clinicopathologic Considerations: How Can We Fine Tune Our Approach to Sarcoma? *Semin Oncol* **38**, 3–18 (2011).
3. von Mehren, M. *et al.* Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **16**, 536–563 (2018).
4. Zhu, L., McManus, M. M. & Hughes, D. P. M. Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front. Oncol.* **3**, 230 (2013).
5. Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L. & Schiffman, J. D. The Epidemiology of Sarcoma. *Clin. Sarcoma Res.* **2**, 1–16 (2012).
6. Daniel Osuna and Enrique de Álava. Molecular Pathology of Sarcomas. *Recent Clin. Trials* **4**, 12–26 (2009).
7. Bovée, J. V. M. G. & Hogendoorn, P. C. W. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch.* **456**, 193–199 (2010).
8. Amankwah, E. K., Conley, A. P. & Reed, D. R. Epidemiology and therapies for metastatic sarcoma. *Clin. Epidemiol.* **5**, 147–162 (2013).
9. Nakano, K. & Takahashi, S. Current Molecular Targeted Therapies for Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 739 (2018).
10. Potter, J. W., Jones, K. B. & Barrott, J. J. Sarcoma—The standard-bearer in cancer discovery. *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.* **126**, 1–5 (2018).
11. Martín Liberal, J. *et al.* Targeted Therapies in Sarcomas: Challenging the Challenge. *Sarcoma* 1–13 (2012).
12. Anderson, J. L., Denny, C. T., Tap, W. D. & Federman, N. Pediatric sarcomas: translating molecular pathogenesis of disease to novel therapeutic possibilities. *Pediatr. Res.* **72**, 112–121 (2012).
13. American Cancer Society: Rhabdomyosarcoma. Available at: <http://www.cancer.org/Cancer/Rhabdomyosarcoma/DetailedGuide/rhabdomyosarcoma>.
14. Sun, X. *et al.* Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma* 1–14 (2015).
15. Stout, A. Rhabdomyosarcoma of the Skeletal Muscles. *Ann. Surg.* **123**, 447–471 (1946).
16. Horn, R. C. & Enterline, H. T. Rhabdomyosarcoma: A clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* **11**, 181–199 (1958).
17. Wang-Wuu, S., Soukup, S., Ballard, E., Gotwals, B. & Lampkin, B. Chromosomal Analysis of Sixteen Human Rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* **48**, 983–987 (1988).

BIBLIOGRAFIA

18. Douglass, E. C. *et al.* A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet. Genome Res.* **45**, 148–155 (1987).
19. Galili, N. *et al.* Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* **5**, 230–235 (1993).
20. Davis, R., D’Cruz, C., Lovell, M., Biegel, J. & Barr, F. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **54**, 2869–2872 (1994).
21. Marshall, A. D. & Grosveld, G. C. Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skelet. Muscle* **2**, 1–14 (2012).
22. Dasgupta, R. & Rodeberg, D. A. Update on rhabdomyosarcoma. *Semin. Pediatr. Surg.* **21**, 68–78 (2012).
23. 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**, 4218–4226 (2009).
24. Huh, W. W. & Skapek, S. X. Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment. *Curr. Oncol. Rep.* **12**, 402–10 (2010).
25. Davicioni, E. *et al.* Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children’s Oncology Group. *Am. J. Pathol.* **174**, 550–64 (2009).
26. Smith, M. A., Altekruse, S. F., Adamson, P. C., Reaman, G. H. & Seibel, N. L. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* **120**, 2497–2506 (2014).
27. Sultan, I., Qaddoumi, I., Yaser, S., Rodriguez-Galindo, C. & Ferrari, A. Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3391–7 (2009).
28. Yang, L., Takimoto, T. & Fujimoto, J. Prognostic model for predicting overall survival in children and adolescents with rhabdomyosarcoma. *BMC Cancer* **14**, 654 (2014).
29. Parham, D. M. & Ellison, D. A. Rhabdomyosarcomas in Adults and Children: An Update. *Arch Pathol Lab Med* **130**, 1454–1465 (2006).
30. Egas-bejar, D. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolesc. Health. Med. Ther.* **5**, 115–125 (2014).
31. Editorial, P. P. T. Childhood Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. (2002). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389361>. (Accessed: 21st June 2018)
32. Crist, W. *et al.* The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J. Clin. Oncol.* **13**, 610–630 (1995).
33. Maurer, H. M. *et al.* The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II. *Cancer* **71**, 1904–1922 (1993).
34. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, P. P. T. E. *Childhood*

- Rhabdomyosarcoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2018).
35. Xia, S. J., Pressey, J. G. & Barr, F. G. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 97–104 (2002).
 36. Trahair, T., Andrews, L. & Cohn, R. J. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **48**, 345–348 (2007).
 37. Berner, J.-M. *et al.* Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes, Chromosom. Cancer* **17**, 254–259 (1996).
 38. Basu, T. N. *et al.* Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* **356**, 713–715 (1992).
 39. Ramzi Dagher, L. H. Rhabdomyosarcoma : An Overview. *Pediatr. Oncol.* **4**, 34–44 (1999).
 40. Wright, S. *et al.* The role of sentinel lymph node biopsy in select sarcoma patients: a meta-analysis. *Am. J. Surg.* **204**, 428–433 (2012).
 41. Federico, S. M. *et al.* Comparison of PET-CT and conventional imaging in staging pediatric rhabdomyosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **60**, 1128–1134 (2013).
 42. Parida, L. *et al.* Role of lymphoscintigraphy and sentinel lymph node biopsy in the management of pediatric melanoma and sarcoma. *Pediatr. Surg. Int.* **28**, 571–578 (2012).
 43. Van Rijn, R. R. *et al.* Imaging findings in noncraniofacial childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatr. Radiol.* **38**, 617–634 (2008).
 44. Barr, F. G. *et al.* Examination of Gene Fusion Status in Archival Samples of Alveolar Rhabdomyosarcoma Entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III Trial. *J. Mol. Diagnostics* **8**, 202–208 (2006).
 45. Kelly, K. M., Womer, R. B. & Barr, F. G. Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Cancer* **78**, 1320–1327 (1996).
 46. Sebire, N. J. & Malone, M. Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *J. Clin. Pathol.* **56**, 412–6 (2003).
 47. Williamson, D. *et al.* Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2151–2158 (2010).
 48. Wachtel, M. *et al.* Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res.* **64**, 5539–45 (2004).
 49. Davicioni, E. *et al.* Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res.* **66**, 6936–6946 (2006).
 50. De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Lollini, P.-L. & Nanni, P. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Futur. Oncol.* **5**, 1449–1475 (2009).

BIBLIOGRAFIA

51. Mercado, G. & Barr, F. Fusions Involving PAX and FOX Genes in the Molecular Pathogenesis of Alveolar Rhabdomyosarcoma: Recent Advances. *Curr. Mol. Med.* **7**, 47–61 (2007).
52. Thway, K. *et al.* The comparative utility of fluorescence in situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction in the diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Virchows Arch.* **467**, 217–224 (2015).
53. Buckingham, M. & Relaix, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **44**, 115–125 (2015).
54. Fletcher CDM, Bridge JA, H. P. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.* IARC Press (2013).
55. Dehner, L. P., Jarzembowski, J. A. & Hill, D. A. Embryonal rhabdomyosarcoma of the uterine cervix: a report of 14 cases and a discussion of its unusual clinicopathological associations. *Mod. Pathol.* **25**, 602–614 (2012).
56. Barr, F. G. *et al.* Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* **3**, 113–117 (1993).
57. Barr, F. G. The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **59**, 1711–1715 (1999).
58. Tallini, G. *et al.* Myogenic Regulatory Protein Expression in Adult Soft Tissue Sarcomas A Sensitive and Specific Marker of Skeletal Muscle Differentiation. *Am. J. Pathol.* **144**, (1994).
59. Gaffney, E. F., Dervan, P. A. & Fletcher, C. D. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adulthood. Analysis of 11 cases with definition of diagnostic criteria. *Am. J. Surg. Pathol.* **17**, 601–9 (1993).
60. Mertens, F. *et al.* Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. Chromosomes and Morphology. *Genes. Chromosomes Cancer* **22**, 16–25 (1998).
61. Ruiz-Mesa, C., Goldberg, J. M., Coronado Munoz, A. J., Dumont, S. N. & Trent, J. C. Rhabdomyosarcoma in Adults: New Perspectives on Therapy. *Curr. Treat. Options in Oncol* **16**, 1–12 (2015).
62. Leuschner, I. Spindle Cell Rhabdomyosarcoma : Histologic Variant of Embryonal Rhabdomyosarcoma with Association to Favorable Prognosis. *Curr. Top. Pathol.* **89**, 261–271 (1995).
63. Parham, D. M. & Barr, F. G. Classification of Rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv. Anat. Pathol.* **20**, 387–397 (2013).
64. Sorensen, P. H. B. *et al.* PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2672–2679 (2002).
65. Barr, F. G. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **20**, 5736–5746 (2001).
66. Jostes, B., Walther, C. & Gruss, P. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular

- system. *Mech. Dev.* **33**, 27–37 (1990).
67. Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. & Gruss, P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* **10**, 1135–1147 (1991).
 68. Accili, D. & Arden, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**, 421–426 (2004).
 69. Davis, R. J. *et al.* Structural characterization of the FKHR gene and its rearrangement in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2355–2362 (1995).
 70. Bennicelli, J. L., Edwards, R. H. & Barr, F. G. Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5455–5459 (1996).
 71. Davis, R. J. & Barr, F. G. Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8047–8051 (1997).
 72. del Peso, L., González, V. M., Hernández, R., Barr, F. G. & Núñez, G. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene* **18**, 7328–7333 (1999).
 73. Breneman, J. C. *et al.* Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma—a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J. Clin. Oncol.* **21**, 78–84 (2003).
 74. Barr, F. G. *et al.* Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Res.* **62**, 4704–4710 (2002).
 75. Hosoi, H. *et al.* A novel PAX3 rearrangement in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **189**, 98–104 (2009).
 76. Meloni-Ehrig, A. *et al.* Translocation (2;8)(q35;q13): a recurrent abnormality in congenital embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **191**, 43–45 (2009).
 77. Fredericks, W. J. *et al.* The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1522–35 (1995).
 78. Du, S. *et al.* Co-expression of alternatively spliced forms of PAX3, PAX7, PAX3-FKHR and PAX7-FKHR with distinct DNA binding and transactivation properties in rhabdomyosarcoma. *Int. J. Cancer* **115**, 85–92 (2005).
 79. Mercado, G. E. *et al.* Identification of PAX3-FKHR-regulated genes differentially expressed between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma: Focus on MYCN as a biologically relevant target. *Genes, Chromosom. Cancer* **47**, 510–520 (2008).
 80. Driman, D., Thorner, P. S., Greenberg, M. L., Chilton-MacNeill, S. & Squire, J. MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Cancer* **73**, 2231–2237 (1994).
 81. Tomescu, O. *et al.* Inducible short-term and stable long-term cell culture systems reveal that the PAX3-FKHR fusion oncoprotein regulates CXCR4, PAX3 and

BIBLIOGRAFIA

- PAX7 expression. *Lab. Investig.* **84**, 1060–1070 (2004).
82. Nabarro, S. *et al.* Coordinated oncogenic transformation and inhibition of host immune responses by the PAX3-FKHR fusion oncoprotein. *J. Exp. Med.* **202**, 1399–1410 (2005).
 83. Epstein, J. A., Lam, P., Jepeal, L., Maas, R. L. & Shapiro, D. N. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 11719–11722 (1995).
 84. Lam, P. Y., Sublett, J. E., Hollenbach, A. D. & Rousset, M. F. The oncogenic potential of the Pax3-FKHR fusion protein requires the Pax3 homeodomain recognition helix but not the Pax3 paired-box DNA binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 594–601 (1999).
 85. Libura, J. *et al.* CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* **100**, 2597–2606 (2002).
 86. Jankowski, K. *et al.* Both Hepatocyte Growth Factor (HGF) and Stromal-Derived Factor-1 Regulate the Metastatic Behavior of Human Rhabdomyosarcoma Cells, But Only HGF Enhances Their Resistance to Radiochemotherapy. *Cancer Res.* **63**, 7926–7935 (2003).
 87. Khan, J. *et al.* cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13264–13269 (1999).
 88. Yu, Y., Davicioni, E., Triche, T. J. & Merlino, G. The homeoprotein six1 transcriptionally activates multiple protumorigenic genes but requires ezrin to promote metastasis. *Cancer Res.* **66**, 1982–1989 (2006).
 89. Onisto, M. *et al.* Expression and activity of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **27**, 791–798 (2005).
 90. Ayyanathan, K. *et al.* Hormone-dependent tumor regression in vivo by an inducible transcriptional repressor directed at the PAX3-FKHR oncogene. *Cancer Res.* **60**, 5803–5814 (2000).
 91. Merlino, G. & Helman, L. J. Rhabdomyosarcoma – working out the pathways. *Oncogene* **18**, 5340–5348 (1999).
 92. Crose, L. E. S. *et al.* FGFR4 Blockade Exerts Distinct Antitumorigenic Effects in Human Embryonal versus Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3780–3790 (2012).
 93. Marshall, A. D., van der Ent, M. A. & Grosveld, G. C. PAX3-FOXO1 and FGFR4 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Mol. Carcinog.* **51**, 807–815 (2012).
 94. Vi, J. G. T. *et al.* Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J. Clin. Invest.* **119**, 3395–3407 (2009).
 95. Graf Finckenstein, F., Shahbazian, V., Davicioni, E., Ren, Y.-X. & Anderson, M. J. PAX-FKHR function as pangenes by simultaneously inducing and inhibiting myogenesis. *Oncogene* **27**, 2004–2014 (2008).

96. Scheidler, S. *et al.* The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9805–9809 (1996).
97. Anderson, J., Ramsay, A., Gould, S. & Pritchard-Jones, K. PAX3-FKHR induces morphological change and enhances cellular proliferation and invasion in rhabdomyosarcoma. *Am. J. Pathol.* **159**, 1089–1096 (2001).
98. Xia, S. J. & Barr, F. G. Analysis of the transforming and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR oncoprotein. *Oncogene* **23**, 6864–6871 (2004).
99. Olanich, M. E. & Barr, F. G. A call to ARMS: targeting the *PAX3-FOXO1* gene in alveolar rhabdomyosarcoma. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 607–623 (2013).
100. Linardic, C. M. PAX3-FOXO1 fusion gene in rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett.* **270**, 10–18 (2008).
101. Hettmer, S. & Wagers, A. J. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat. Med.* **16**, 171–3 (2010).
102. Iolascon, A. *et al.* Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes, Chromosom. Cancer* **15**, 217–222 (1996).
103. Harada, K. *et al.* Deregulation of Caspase 8 and 10 Expression in Pediatric Tumors and Cell Lines. *Cancer Res.* **62**, 5897–5901 (2002).
104. Ren, Y.-X. *et al.* Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Res.* **68**, 6587–6597 (2008).
105. Weber-Hall, S. *et al.* Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **56**, 3220–3224 (1996).
106. Ragazzini, P. *et al.* Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histol. Histopathol.* **19**, 401–411 (2004).
107. Dias, P. *et al.* N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int. J. Cancer* **45**, 593–596 (1990).
108. Hachitanda, Y., Toyoshima, S., Akazawa, K. & Tsuneyoshi, M. N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization: its correlation with histologic features. *Mod. Pathol.* **11**, 1222–1227 (1998).
109. Gordon, A. T. *et al.* A novel and consistent amplicon at 13q31 associated with alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **28**, 220–226 (2000).
110. Williamson, D. *et al.* Role for Amplification and Expression of *Glypican-5* in Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **67**, 57–65 (2007).
111. Cho, W. C. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol. Cancer* **6**, 60 (2007).
112. Scrabble, H. *et al.* A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that

BIBLIOGRAFIA

- involves genome imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7480–7484 (1989).
113. Visser, M. *et al.* Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **15**, 1309–1314 (1997).
 114. Pedone, P. V. *et al.* Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1117–1121 (1994).
 115. Zhan, S., Shapiro, D. N. & Helman, L. J. Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Invest.* **94**, 445–8 (1994).
 116. Smith, A. C., Choufani, S., Ferreira, J. C. & Weksberg, R. Growth Regulation, Imprinted Genes, and Chromosome 11p15.5. *Pediatr. Res.* **61**, 43R–47R (2007).
 117. Bridge, J. A. *et al.* Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: An Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Genes, Chromosom. Cancer* **27**, 337–344 (2000).
 118. Kikuchi, K., Rubin, B. P. & Keller, C. Developmental origins of fusion-negative rhabdomyosarcomas. *Curr. Top. Dev. Biol.* **96**, 33–56 (2011).
 119. Keleti, J., Quezado, M. M., Abaza, M. M., Raffeld, M. & Tsokos, M. The MDM2 oncoprotein is overexpressed in rhabdomyosarcoma cell lines and stabilizes wild-type p53 protein. *Am. J. Pathol.* **149**, 143–151 (1996).
 120. Taylor, A. C. *et al.* P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 96–103 (2000).
 121. Kohashi, K. *et al.* Alterations of RB1 gene in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: special reference to utility of pRB immunoreactivity in differential diagnosis of rhabdomyosarcoma subtype. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1097–1103 (2008).
 122. Chen, Y. *et al.* Mutations of the PTPN11 and RAS genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies. *Genes, Chromosom. Cancer* **45**, 583–591 (2006).
 123. Langenau, D. M. *et al.* Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Dev.* **21**, 1382–1395 (2007).
 124. Ganti, R. *et al.* Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod. Pathol.* **19**, 1213–1220 (2006).
 125. Taniguchi, E. *et al.* PDGFR-A is a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **27**, 6550–6560 (2008).
 126. Shern, J. F. *et al.* Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov.* **4**, 216–231 (2014).
 127. Keller, C. & Guttridge, D. C. Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma. *FEBS J.* **280**, 4323–4334 (2013).
 128. Yokoyama, S. & Asahara, H. The myogenic transcriptional network. *Cell Mol Life*

- Sci.* **68**, 1843–1849 (2011).
129. Buckingham, M. & Montarras, D. Skeletal muscle stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 330–336 (2008).
 130. Charytonowicz, E., Cordon-Cardo, C., Matushansky, I. & Ziman, M. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Lett.* **279**, 126–136 (2009).
 131. Linardic, C. M., Downie, D. L., Qualman, S., Bentley, R. C. & Counter, C. M. Genetic modeling of human rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **65**, 4490–4495 (2005).
 132. Keller, C. *et al.* Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. *Genes Dev.* **18**, 2614–2626 (2004).
 133. Keller, C. & Capecchi, M. R. New genetic tactics to model alveolar rhabdomyosarcoma in the mouse. *Cancer Res.* **65**, 7530–7532 (2005).
 134. Galindo, R. L., Allport, J. A. & Olson, E. N. A *Drosophila* model of the rhabdomyosarcoma initiator PAX7-FKHR. *PNAS* **103**, 13439–13444 (2006).
 135. Tonin, P. N. *et al.* Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer Res.* **51**, 5100–5106 (1991).
 136. Rubin, B. P. *et al.* Evidence for an Unanticipated Relationship between Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma and Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* **19**, 177–191 (2011).
 137. Merlino, G. & Khanna, C. Fishing for the origins of cancer. *Genes Dev.* **21**, 1275–1279 (2007).
 138. Zibat, A. *et al.* Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional Ptch knockouts. *Carcinogenesis* **30**, 918–926 (2009).
 139. Hatley, M. E. *et al.* A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. *Cancer Cell* **22**, 536–546 (2012).
 140. Drummond, C. J. *et al.* Hedgehog Pathway Drives Fusion-Negative Rhabdomyosarcoma Initiated From Non-myogenic Endothelial Progenitors. *Cancer Cell* **33**, 108–124 (2018).
 141. Tapscott, S. J., Thayer, M. J. & Weintraub, H. Deficiency in Rhabdomyosarcomas of a Factor Required for MyoD Activity and Myogenesis. *Sci. New Ser.* **259**, 1450–1453 (2016).
 142. Yang, Z. *et al.* MyoD and E-protein heterodimers switch rhabdomyosarcoma cells from an arrested myoblast phase to a differentiated state. *Genes Dev.* **23**, 694–707 (2009).
 143. Lee, M. H., Jothi, M., Gudkov, A. V. & Mal, A. K. Histone methyltransferase KMT1A restrains entry of alveolar rhabdomyosarcoma cells into a myogenic differentiated state. *Cancer Res.* **71**, 3921–3931 (2011).
 144. Engert, J. C., Berglund, E. B. & Rosenthal, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J. Cell Biol.* **135**, 431–40 (1996).

BIBLIOGRAFIA

145. Miekus, K. *et al.* The decreased metastatic potential of rhabdomyosarcoma cells obtained through MET receptor downregulation and the induction of differentiation. *Cell Death Dis.* **4**, 1–10 (2013).
146. Walters, Z. S. *et al.* JARID2 is a direct target of the PAX3-FOXO1 fusion protein and inhibits myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene* **33**, 1148–1157 (2014).
147. Hosoyama, T. *et al.* IL-4R Drives Dedifferentiation, Mitogenesis, and Metastasis in Rhabdomyosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2757–2766 (2011).
148. Puri, P. L. *et al.* Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev.* **14**, 574–584 (2000).
149. Cam, H. *et al.* p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell* **10**, 281–293 (2006).
150. Rossi, S., Stoppani, E., Puri, P. L. & Fanzani, A. Differentiation of human rhabdomyosarcoma RD cells is regulated by reciprocal, functional interactions between myostatin, p38 and extracellular regulated kinase signalling pathways. *Eur. J. Cancer* **47**, 1095–1105 (2011).
151. Subramanian, S. *et al.* MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* **27**, 2015–2026 (2008).
152. Wang, H. *et al.* NF- κ B-YY1-miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* **14**, 369–381 (2008).
153. Beverly Raney, R. *et al.* The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG): major lessons from the IRS-I through IRS-IV studies as background for the current IRS-V treatment protocols. *Sarcoma* **5**, 9–15 (2001).
154. Weiss, A. R. *et al.* Histologic and Clinical Characteristics Can Guide Staging Evaluations for Children and Adolescents With Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group Soft Tissue Sarcoma Committee. *J Clin Oncol* **31**, 3226–3232 (2013).
155. Raney, R. B. *et al.* Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **23**, 215–220 (2001).
156. Arndt, C. A. S. *et al.* Vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide compared with vincristine, actinomycin, and cyclophosphamide alternating with vincristine, topotecan, and cyclophosphamide for intermediate-risk rhabdomyosarcoma: children’s oncology group study D9803. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5182–5188 (2009).
157. Arndt, C. A. S. *et al.* Comparison of Results of a Pilot Study of Alternating Vincristine/Doxorubicin/ Cyclophosphamide and Etoposide/Ifosfamide With IRS-IV in Intermediate Risk Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* **50**, 33–36 (2008).
158. Weigel, B. J. *et al.* Intensive Multiagent Therapy, Including Dose-Compressed Cycles of Ifosfamide/Etoposide and Vincristine/Doxorubicin/Cyclophosphamide, Irinotecan, and Radiation, in Patients With High-Risk Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **34**, 117–122 (2016).

159. Cecchetto, G. *et al.* Complete second look operation and radiotherapy in locally advanced non-alveolar rhabdomyosarcoma in children: A report from the AIEOP soft tissue sarcoma committee. *Pediatr. Blood Cancer* **51**, 593–597 (2008).
160. Eaton, B. R. *et al.* Radiation therapy target volume reduction in pediatric rhabdomyosarcoma. *Cancer* **119**, 1578–1585 (2013).
161. Kikuchi, K. *et al.* Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 568–574 (2008).
162. Xia, S. J., Holder, D. D., Pawel, B. R., Zhang, C. & Barr, F. G. High expression of the PAX3-FKHR oncoprotein is required to promote tumorigenesis of human myoblasts. *Am. J. Pathol.* **175**, 2600–2608 (2009).
163. Bernasconi, M., Remppis, A., Fredericks, W. J., Rauscher Iii, F. J. & Schfer, B. W. Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins. *Med. Sci.* **93**, 13164–13169 (1996).
164. Sekyi-Otu, A. *et al.* Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res.* **55**, 129–134 (1995).
165. Martins, A. S., Olmos, D., Missiaglia, E. & Shipley, J. Targeting the Insulin-Like Growth Factor Pathway in Rhabdomyosarcomas: Rationale and Future Perspectives. *Sarcoma* 1–11 (2011).
166. Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P. & Helman, L. J. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* **26**, 1932–1940 (2007).
167. Kurmasheva, R. T. *et al.* The IGF-1 Receptor Targeting Antibody, CP-751,871, Suppresses Tumor-Derived VEGF and Synergizes with Rapamycin in Models of Childhood Sarcoma. *Cancer Res* **69**, 7662–7671 (2009).
168. Renshaw, J. *et al.* Dual Blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) Pathways Synergistically Inhibits Rhabdomyosarcoma Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5940–5951 (2013).
169. Guenther, M. K., Graab, U. & Fulda, S. Synthetic lethal interaction between PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK pathway inhibition in rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett.* **337**, 200–209 (2013).
170. Li, S. Q. *et al.* Targeting Wild-Type and Mutationally Activated FGFR4 in Rhabdomyosarcoma with the Inhibitor Ponatinib (AP24534). *PLoS One* **8**, e76551–e76551 (2013).
171. Taulli, R. *et al.* Validation of Met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **66**, 4742–4749 (2006).
172. Miyoshi, K. *et al.* Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum. Pathol.* **45**, 1900–1909 (2014).
173. Brekken, R. A. *et al.* Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* **60**, 5117–5124 (2000).

BIBLIOGRAFIA

174. Gerber, H. P., Kowalski, J., Sherman, D., Eberhard, D. A. & Ferrara, N. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **60**, 6253–6258 (2000).
175. Walter, D. *et al.* CD133 Positive Embryonal Rhabdomyosarcoma Stem-Like Cell Population Is Enriched in Rhabdospheres. *PLoS One* **6**, e19506–e19506 (2011).
176. Marampon, F. *et al.* MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 543–551 (2009).
177. Marampon, F., Ciccarelli, C. & Zani, B. M. Down-regulation of c-Myc following MEK/ERK inhibition halts the expression of malignant phenotype in rhabdomyosarcoma and in non muscle-derived human tumors. *Mol. Cancer* **5**, 1–17 (2006).
178. Marampon, F. *et al.* MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 159–168 (2011).
179. Tonelli, R. *et al.* Antitumor activity of sustained N-myc reduction in rhabdomyosarcomas and transcriptional block by antigene therapy. *Clin. Cancer Res.* **18**, 796–807 (2012).
180. Wachtel, M. & Schäfer, B. W. PAX3-FOXO1: Zooming in on an “undruggable” target. *Semin. Cancer Biol.* **50**, 115–123 (2018).
181. Shen, H. & Laird, P. W. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* **153**, 38–55 (2013).
182. Gryder, B. E. *et al.* PAX3-FOXO1 Establishes Myogenic Super Enhancers and Confers BET Bromodomain Vulnerability. *Cancer Discov.* **7**, 884–899 (2017).
183. van Erp, A. E. M. *et al.* Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) in Rhabdomyosarcoma (RMS) with the Second-Generation ALK Inhibitor Ceritinib. *Target. Oncol.* **12**, 815–826 (2017).
184. Megiorni, F. *et al.* Crizotinib-induced antitumour activity in human alveolar rhabdomyosarcoma cells is not solely dependent on ALK and MET inhibition. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 1–16 (2015).
185. Perut, F. *et al.* V-ATPase as an effective therapeutic target for sarcomas. *Exp. Cell Res.* **320**, 21–32 (2014).
186. Ireneusz Dziuba, Paweł Kurzawa, Michał Dopierała, A. B. L. & Danuta Januszkiewicz-Lewandowska. Rhabdomyosarcoma in children – current pathologic and molecular classification. *Pol J Pathol.* **69**, 20–32 (2018).
187. Merchant, M. S. *et al.* Adjuvant Immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3182–3191 (2016).
188. ClinicalTrials.gov. A Pilot Study of Autologous T-Cell Transplantation With Vaccine Driven Expansion of Anti-Tumor Effectors After Cytoreductive Therapy in Metastatic Pediatric Sarcomas. (2012). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00001566>. (Accessed: 16th July 2018)
189. ClinicalTrials.gov. A Pilot Study of Tumor Vaccination and R-hIL-7 Following

- Standard Multimodality Therapy in Patients With High Risk Pediatric Solid Tumors. (2012). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00923351?term=NCT00923351&rank=1>. (Accessed: 16th July 2018)
190. ClinicalTrials.gov. Tumor Associated Antigen (TAA)-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Administered to Patients With Solid Tumors. (2018). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239861?term=NCT02239861&rank=1>. (Accessed: 16th July 2018)
 191. Hosoi, H. Current status of treatment for pediatric rhabdomyosarcoma in the USA and Japan. *Pediatr. Int.* **58**, 81–87 (2016).
 192. Rengaswamy, V., Kontny, U. & Rössler, J. New approaches for pediatric rhabdomyosarcoma drug discovery: targeting combinatorial signaling. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 1103–1125 (2011).
 193. Steeg, P. S. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* **12**, 895–904 (2006).
 194. Sugarbaker, P. H. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J. Surg. Oncol. Suppl.* **3**, 158–160 (1993).
 195. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).
 196. Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 737–749 (2007).
 197. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 274–284 (2009).
 198. Ringer, P., Colo, G., Fässler, R. & Grashoff, C. Sensing the mechano-chemical properties of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* **64**, 6–16 (2017).
 199. Sedlmeier, G. & Sleeman, J. P. Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 173–181 (2017).
 200. Bissell, M. J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 46–54 (2001).
 201. Bhowmick, N. A. & Moses, H. L. Tumor–stroma interactions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 97–101 (2005).
 202. Tlsty, T. D. & Coussens, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 119–150 (2006).
 203. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
 204. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
 205. Al-Mehdi, A. B. *et al.* Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.* **6**, 100–102 (2000).
 206. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors

- initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).
207. Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1011–1027 (2005).
 208. Xiao, Q. & Ge, G. Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis. *Cancer Microenviron.* **5**, 261–273 (2012).
 209. Kenyon, K., Modi, W. S., Contente, S. & Friedman, R. M. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *J. Biol. Chem.* **268**, 18435–18437 (1993).
 210. Kim, Y., Boyd, C. D. & Csiszar, K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 7176–7182 (1995).
 211. Saito, H., Papaconstantinou, J., Sato, H. & Goldstein, S. Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J. Biol. Chem.* **272**, 8157–8160 (1997).
 212. Mäki, J. M. & Kivirikko, K. I. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem. J.* **355**, 381–387 (2001).
 213. Jourdan-Le Saux, C. *et al.* The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J. Biol. Chem.* **274**, 12939–12944 (1999).
 214. Asuncion, L. *et al.* A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol.* **20**, 487–491 (2001).
 215. Moon, H.-J., Finney, J., Ronnebaum, T. & Mure, M. Human lysyl oxidase-like 2. *Bioorg. Chem.* **57**, 231–241 (2014).
 216. Wang, S. X. *et al.* A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science* **273**, 1078–1084 (1996).
 217. Lopez, K. M. & Greenaway, F. T. Identification of the copper-binding ligands of lysyl oxidase. *J. Neural Transm.* **118**, 1101–1109 (2011).
 218. Csiszar, K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **70**, 1–32 (2001).
 219. Cronshaw, A. D., Fothergill-Gilmore, L. A. & Hulmes, D. J. The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem. J.* **306**, 279–84 (1995).
 220. Thomassin, L. *et al.* The Pro-regions of Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-like 1 Are Required for Deposition onto Elastic Fibers. *J. Biol. Chem.* **280**, 42848–42855 (2005).
 221. Grimsby, J. L., Lucero, H. A., Trackman, P. C., Ravid, K. & Kagan, H. M. Role of Lysyl Oxidase Propeptide in Secretion and Enzyme Activity. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1231–1243 (2010).
 222. Borel, A. *et al.* Lysyl Oxidase-like Protein from Bovine Aorta. *J. Biol. Chem.* **276**, 48944–48949 (2001).

223. Csiszar, K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **70**, 1–32 (2001).
224. Martinez, V. G., Moestrup, S. K., Holmskov, U., Mollenhauer, J. & Lozano, F. The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacol. Rev.* **63**, 967–1000 (2011).
225. Xu, L. *et al.* Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2 (rhLOXL2) secreted from drosophila S2 cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 5357–5363 (2013).
226. Moon, H. J. *et al.* MCF-7 cells expressing nuclear associated lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) exhibit an epithelial-to-Mesenchymal transition (EMT) phenotype and are highly invasive in Vitro. *J. Biol. Chem.* **288**, 30000–30008 (2013).
227. Handorf, A. M., Zhou, Y., Halanski, M. A. & Li, W.-J. Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis* **11**, 1–15 (2015).
228. Smith-Mungo, L. I. & Kagan, H. M. Lysyl Oxidase: Properties, Regulation and Multiple Functions in Biology. *Matrix Biol.* **16**, 387–398 (1998).
229. Mäki, J. M. *et al.* Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* **106**, 2503–9 (2002).
230. Liu, X. *et al.* Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* **36**, 178–182 (2004).
231. Martin, A. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 represses Notch1 expression in the skin to promote squamous cell carcinoma progression. *EMBO J.* **34**, 1–20 (2015).
232. Cano, A., Santamaría, P. G. & Moreno-Bueno, G. LOXL2 in epithelial cell plasticity and tumor progression. *Future Oncol.* **8**, 1095–1108 (2012).
233. Barker, H. E., Cox, T. R. & Erler, J. T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 540–552 (2012).
234. Kuivaniemi, H., Peltonen, L. & Kivirikko, K. I. Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am. J. Hum. Genet.* **37**, 798–808 (1985).
235. Mäki, J. M. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol. Histopathol.* **24**, 651–660 (2009).
236. Khakoo, A. *et al.* Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin. Genet.* **51**, 109–114 (1997).
237. Remus, E. W. *et al.* The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **303**, H1067–H1075 (2012).
238. Vadasz, Z. *et al.* Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J. Hepatol.* **43**, 499–507 (2005).
239. Kagan, H. M., Raghavan, J. & Hollander, W. Changes in Aortic Lysyl Oxidase

BIBLIOGRAFIA

- Activity in Diet-Induced Atherosclerosis in the Rabbit. *Arteriosclerosis* **1**, 287–291 (1981).
240. Chanoki, M. *et al.* Increased expression of lysyl oxidase in skin with scleroderma. *Br. J. Dermatol.* **133**, 710–715 (1995).
241. Kagan, H. M. Lysyl Oxidase: Mechanism, Regulation and Relationship to Liver Fibrosis. *Pathol. - Res. Pract.* **190**, 910–919 (1994).
242. Paszek, M. J. *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241–254 (2005).
243. Paszek, M. J. & Weaver, V. M. The Tension Mounts: Mechanics Meets Morphogenesis and Malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **9**, 325–342 (2004).
244. Payne, S. L., Hendrix, M. J. C. & Kirschmann, D. A. Paradoxical Roles for Lysyl Oxidases in Cancer-A Prospect. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1338–1354 (2007).
245. Kenyon, K. *et al.* Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science* **253**, 802 (1991).
246. Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D. & Friedman, R. M. Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science* **249**, 796–798 (1990).
247. Giampuzzi, M. *et al.* Down-regulation of Lysyl Oxidase-induced Tumorigenic Transformation in NRK-49F Cells Characterized by Constitutive Activation of Ras Proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* **276**, 29226–29232 (2001).
248. Palamakumbura, A. H. *et al.* The Propeptide Domain of Lysyl Oxidase Induces Phenotypic Reversion of Ras-transformed Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 40593–40600 (2004).
249. Min, C. *et al.* The Tumor Suppressor Activity of the Lysyl Oxidase Propeptide Reverses the Invasive Phenotype of Her-2/neu-Driven Breast Cancer. *Cancer Res.* **67**, 1105–1112 (2007).
250. Sanchez-Morgan, N., Kirsch, K. H., Trackman, P. C. & Sonenshein, G. E. The Lysyl Oxidase Propeptide Interacts with the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase Kappa and Inhibits β -Catenin Transcriptional Activity in Lung Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3286–3297 (2011).
251. Wu, M. *et al.* Repression of BCL2 by the Tumor Suppressor Activity of the Lysyl Oxidase Propeptide Inhibits Transformed Phenotype of Lung and Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* **67**, 6278–6285 (2007).
252. Erler, J. T. *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nat. Lett.* **440**, 1222–1226 (2006).
253. Stassar, M. J. J. G. *et al.* Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br. J. Cancer* **85**, 1372–1382 (2001).
254. Young, A. N. *et al.* Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.* **158**, 1639–1651 (2001).

255. Kirschmann, D. A. *et al.* A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res.* **62**, 4478–4483 (2002).
256. Baker, A. M. *et al.* The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 407–424 (2011).
257. Baker, A.-M., Bird, D., Lang, G., Cox, T. R. & Eler, J. T. Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK. *Oncogene* **32**, 1863–1868 (2013).
258. Lapointe, J. *et al.* Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 811–816 (2004).
259. Fong, S. F. T. *et al.* Lysyl Oxidase-Like 2 Expression Is Increased in Colon and Esophageal Tumors and Associated with Less Differentiated Colon Tumors. *Genes, Chromosom. Cancer* **46**, 644–655 (2007).
260. Hollosi, P., Yakushiji, J. K., Fong, K. S. K., Csiszar, K. & Fong, S. F. T. Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int. J. Cancer* **125**, 318–327 (2009).
261. Hutchinson, J. H. *et al.* Small Molecule Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Inhibitors: The Identification of an Inhibitor Selective for LOXL2 over LOX. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 423–427 (2017).
262. Zhang, X. *et al.* Crystal structure of human lysyl oxidase-like 2 (hLOXL2) in a precursor state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 3828–3833 (2018).
263. Kim, Y.-M., Kim, E.-C. & Kim, Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 145–149 (2011).
264. Tang, S. S., Trackman, P. C. & Kagan, H. M. Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile. *J. Biol. Chem.* **258**, 4331–4338 (1983).
265. Rodriguez, H. M. *et al.* Modulation of Lysyl Oxidase-like 2 Enzymatic Activity by an Allosteric Antibody Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **285**, 20964–20974 (2010).
266. Hirsch, C., Blom, D. & Ploegh, H. L. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J.* **22**, 1036–1046 (2003).
267. Gacheru, S. N. *et al.* Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19022–19027 (1990).
268. Tang, C. & Klinman, J. P. The catalytic function of bovine lysyl oxidase in the absence of copper. *J. Biol. Chem.* **276**, 30575–30578 (2001).
269. Peinado, H. *et al.* A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *Embo J.* **24**, 3446–3458 (2005).
270. Cuevas, E. P. *et al.* LOXL2 catalytically inactive mutants mediate epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol. Open* **3**, 129–137 (2013).
271. Tu, B. P. & Weissman, J. S. Oxidative protein folding in eukaryotes. *J. Cell Biol.* **164**, 341–346 (2004).
272. López-Jiménez, A. J., Basak, T. & Vanacore, R. M. Proteolytic Processing of Lysyl Oxidase like-2 in the Extracellular Matrix is Required for Crosslinking of

- Basement Membrane Collagen IV. *J. Biol. Chem.* **292**, 16970–16982 (2017).
273. Panchenko, M. V, Stetler-Stevenson, W. G., Trubetskoy, O. V, Gacheru, S. N. & Kagan, H. M. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 7113–7119 (1996).
274. Uzel, M. I. *et al.* Multiple Bone Morphogenetic Protein 1-related Mammalian Metalloproteinases Process Pro-lysyl Oxidase at the Correct Physiological Site and Control Lysyl Oxidase Activation in Mouse Embryo Fibroblast Cultures. *J. Biol. Chem.* **276**, 22537–22543 (2001).
275. Okada, K. *et al.* PACE4 proteolytically processes LOXL2 with little impact on its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 1–10 (2017).
276. Zuber, J. *et al.* A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat. Genet.* **24**, 144–152 (2000).
277. Rost, T. *et al.* Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* **23**, 1565–1573 (2003).
278. Hough, C. D. *et al.* Large-Scale Serial Analysis of Gene Expression Reveals Genes Differentially Expressed in Ovarian Cancer 1. *Cancer Res.* **60**, 6281–6287 (2000).
279. Ono, K. *et al.* Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* **60**, 5007–5011 (2000).
280. Schmidt, H. *et al.* Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **91**, 302–307 (2007).
281. Zhan, P. *et al.* Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas. *Med. Oncol.* **29**, 648–655 (2012).
282. Wu, L. & Zhu, Y. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* **36**, 1200–1204 (2015).
283. Barker, H. E. *et al.* LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res.* **71**, 1561–1572 (2011).
284. Ahn, S. G. *et al.* LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 89–99 (2013).
285. Peinado, H. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **68**, 4541–4550 (2008).
286. Moreno-Bueno, G. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol. Med.* **3**, 528–544 (2011).
287. Barry-Hamilton, V. *et al.* Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* **16**, 1009–1017 (2010).
288. Peng, D. H. *et al.* ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **36**, 1925–1938 (2016).

289. Peng, L. *et al.* Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis* **30**, 1660–1669 (2009).
290. Kasashima, H. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Lett.* **354**, 438–446 (2014).
291. Grützmann, R. *et al.* Gene expression profiles of microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Virchows Arch.* **443**, 508–517 (2003).
292. Rückert, F., Peer, J., Saeger, H.-D., Grützmann, R. & Pilarsky, C. Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 303–311 (2010).
293. Wong, C. C. L. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **60**, 1645–1658 (2014).
294. Abourbih, D. A. *et al.* Lysyl oxidase expression and inhibition in uveal melanoma. *Melanoma Res.* **20**, 97–106 (2010).
295. Cuevas, E. P. *et al.* LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Nat. Publ. Gr.* **7**, 44988 (2017).
296. Canesin, G. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene* **34**, 951–964 (2015).
297. Herranz, N. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) oxidizes trimethylated lysine 4 in histone H3. *FEBS J.* **283**, 4263–4273 (2016).
298. Iturbide, A., García de Herreros, A. & Peiró, S. A new role for LOX and LOXL2 proteins in transcription regulation. *FEBS J.* **282**, 1768–1773 (2015).
299. Barker, H. E., Bird, D., Lang, G. & Epler, J. T. Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1425–1436 (2013).
300. Kim, B. R. *et al.* Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1. *Cell. Signal.* **26**, 1765–1773 (2014).
301. Cassavaugh, J. & Lounsbury, K. M. Hypoxia-mediated biological control. *J. Cell. Biochem.* **112**, 735–744 (2011).
302. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514 (1995).
303. Postovit, L.-M. *et al.* Hypoxia/reoxygenation: A dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1369–1378 (2008).
304. Schietke, R. *et al.* The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia. *J. Biol. Chem.* **285**, 6658–6669 (2010).
305. Pez, F. *et al.* Molecular and Cellular Pathobiology The HIF-1-Inducible Lysyl Oxidase Activates HIF-1 via the Akt Pathway in a Positive Regulation Loop and

BIBLIOGRAFIA

- Synergizes with HIF-1 in Promoting Tumor Cell Growth. *Cancer Res.* **71**, 1647–1657 (2011).
306. Bignon, M. *et al.* Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* **118**, 3979–3989 (2011).
307. Zaffryar-Eilot, S. *et al.* Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours. *Carcinogenesis* **34**, 2370–2379 (2013).
308. Lugassy, J. *et al.* The enzymatic activity of lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is not required for LOXL2-induced inhibition of keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **287**, 3541–3549 (2012).
309. Mussadiq Iftikhar *et al.* Lysyl Oxidase-like-2 (LOXL2) Is a Major Isoform in Chondrocytes and Is Critically Required for Differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 909–918 (2011).
310. Iturbide, A. *et al.* LOXL2 Oxidizes Methylated TAF10 and Controls TFIIID-Dependent Genes during Neural Progenitor Differentiation. *Mol. Cell* **58**, 755–766 (2015).
311. Erler, J. T. *et al.* Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. *Cancer Cell* **15**, 35–44 (2009).
312. Wong, C. C.-L. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16369–16374 (2011).
313. Hong, H. H., Uzel, M. I., Duan, C., Sheff, M. C. & Trackman, P. C. Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF- β 1 and detection in human gingiva. *Lab. Invest.* **79**, 1655–67 (1999).
314. Uzel, M. I., Hsi-Hong, H., Sheff, M. C. & Trackman, P. C. TGF- β 1 Regulation of Gingival Lysyl Oxidase and Connective Tissue Growth Factor. in *Biochemistry and Molecular Biology of Vitamin B6 and PQQ-dependent Proteins* (eds. Iriarte, A., Martinez-Carrion, M. & Kagan, H. M.) 77–82 (Birkhäuser Basel, 2000).
315. Sethi, A., Mao, W., Wordinger, R. J. & Clark, A. F. Transforming growth factor- β induces extracellular matrix protein Cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5240–5250 (2011).
316. Feres-Filho, E. J., Choi, Y. J., Han, X., Takala, T. E. S. & Trackman, P. C. Pre- and Post-translational Regulation of Lysyl Oxidase by Transforming Growth Factor- β 1 in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 30797–30803 (1995).
317. Taylor, M. A., Amin, J. D., Kirschmann, D. A. & Schiemann, W. P. Lysyl oxidase contributes to mechanotransduction-mediated regulation of transforming growth factor- β signaling in breast cancer cells. *Neoplasia* **13**, 406–418 (2011).
318. Kato, M. *et al.* Regulation of metastasis-promoting LOXL2 gene expression by antitumor microRNAs in prostate cancer. *J. Hum. Genet.* **62**, 123–132 (2017).
319. Kamikawaji, K. *et al.* Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor

- microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Hum. Genet.* **61**, 985–993 (2016).
320. Mizuno, K. *et al.* Tumor-suppressive microRNA-29 family inhibits cancer cell migration and invasion directly targeting LOXL2 in lung squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **48**, 450–460 (2016).
321. Fang, Y. *et al.* Transforming growth factor- β 1 increases lysyl oxidase expression by downregulating MIR29A in human granulose lutein cells. *Reproduction* **152**, 205–213 (2016).
322. Park, H. J. *et al.* Deregulation of FoxM1b leads to tumour metastasis. *EMBO Mol. Med.* **3**, 21–34 (2011).
323. Lv, G. *et al.* Identification of a novel lysyl oxidase-like 2 alternative splicing isoform, LOXL2 e13, in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem. Cell Biol.* **389**, 379–389 (2014).
324. Wu, B.-L. *et al.* Protein-protein Interaction Network Analyses for Elucidating the Roles of LOXL2-delta72 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **15**, 2345–2351 (2014).
325. Zou, H. Y. *et al.* A truncated splice variant of human lysyl oxidase-like 2 promotes migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **75**, 85–98 (2016).
326. Zhu, Y. *et al.* SMYD3 stimulates EZR and LOXL2 transcription to enhance proliferation, migration, and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **52**, 153–163 (2016).
327. Stein, H. B., Chalmers, A., Schroeder, M. L. & Dillon, A. Selected adverse reactions of D-penicillamine. *Clin. Invest. Med.* **7**, 73–76 (1984).
328. ClinicalTrials.gov. First-in-human Study of AB0024 to Evaluate Safety and Tolerability in Adults With Advanced Solid Tumors. (2012). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01323933>. (Accessed: 27th July 2018)
329. ClinicalTrials.gov. Study to Evaluate the Safety and Efficacy of GS-6624 (Formerly AB0024) in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. (2015). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01362231?cond=AB0024&rank=2>. (Accessed: 27th July 2018)
330. ClinicalTrials.gov. Study to Assess the Efficacy and Safety of Simtuzumab (GS-6624) in Adults With Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01769196?cond=Simtuzumab&rank=2>. (Accessed: 27th July 2018)
331. Emayan, K. *et al.* Identification of novel small-molecule LOXL2 inhibitors by high throughput screening. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 2014–2020 (2014).
332. Chang, J. *et al.* Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer. *Oncotarget* **8**, 26066–26078 (2017).
333. Hinson, A. R. P. *et al.* Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front. Oncol.* **3**, 1–12 (2013).

BIBLIOGRAFIA

334. 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**, 1417–1423 (1973).
335. Martínez-Ramírez, A. *et al.* Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet. Cytogenet.* **141**, 138–142 (2003).
336. Beverly, T. A. *Human Cell Culture*. **1**, (Springer Netherlands, 1999).
337. Smith, M. A. *et al.* SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr. Blood Cancer* **50**, 703–706 (2008).
338. 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**, 3258–3265 (2001).
339. 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**, 1233–1238 (1988).
340. Noguera, R., Navarro, S. & Triche, T. J. Translocation (11;22) in small cell osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **45**, 121–124 (1990).
341. Ottaviano, L. *et al.* Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: A trans-European EuroBoNet effort. *Genes, Chromosom. Cancer* **49**, 40–51 (2010).
342. 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).
343. Slee, E. A. *et al.* Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem. J.* **315**, 21–24 (1996).
344. Tsujinaka, T. *et al.* Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1201–1208 (1988).
345. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
346. Mellacheruvu, D. *et al.* the CRaPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat. Methods* **10**, 730–740 (2013).
347. Lagares-Tena, L. *et al.* Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK / ERK pathway. *Oncotarget* **35**, 56889–56903 (2016).
348. Xu, L. *et al.* Post-translational modifications of recombinant human lysyl oxidase-like 2 (rhLOXL2) secreted from drosophila S2 cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 5357–5363 (2013).
349. Satelli, A. & Li, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3033–3046 (2011).
350. Dave, J. M. & Bayless, K. J. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation* **21**, 333–344 (2014).

351. Kwak, H.-I. *et al.* Calpain-mediated vimentin cleavage occurs upstream of MT1-MMP membrane translocation to facilitate endothelial sprout initiation. *Angiogenesis* **15**, 287–303 (2012).
352. Hongqi Li, Valery F. Thompson, D. E. G. Effects of autolysis on properties of μ - and m-calpain. *Biochim. Biophys. Acta* **1691**, 91–103 (2004).
353. Nakajima, T., Shearer, T. R. & Azuma, M. Loss of calpastatin leads to activation of calpain in human lens epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 5278–5283 (2014).
354. Liu, J. *et al.* AZGP1 inhibits soft tissue sarcoma cells invasion and migration. *BMC Cancer* **18**, 89 (2018).
355. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 397–406 (2014).
356. Lindskog, C. *et al.* The human cardiac and skeletal muscle proteomes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *BMC Genomics* **16**, 475 (2015).
357. The Human Protein Atlas. LOXL2. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134013-LOXL2/tissue>. (Accessed: 31st July 2018)
358. National Center for Biotechnology Information. LOXL2 lysyl oxidase like 2. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4017>. (Accessed: 31st July 2018)
359. Soini, Y. Epigenetic and genetic changes in soft tissue sarcomas: a review. *APMIS* **124**, 925–934 (2016).
360. Aran, D., Sabato, S. & Hellman, A. DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol.* **14**, R21 (2013).
361. Wang, H. *et al.* Systematic analysis of the TGF- β /Smad signalling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Int. J. Exp. Pathol.* **84**, 153–63 (2003).
362. Wang, S. *et al.* TGF- β 1 signal pathway may contribute to rhabdomyosarcoma development by inhibiting differentiation. *Cancer Sci.* **101**, 1108–1116 (2010).
363. Bouché, M. *et al.* TGF- β autocrine loop regulates cell growth and myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J.* **14**, 1147–1158 (2000).
364. Kilic, M., Kasperczyk, H., Fulda, S. & Debatin, K.-M. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* **26**, pages 2027–2038 (2007).
365. El-Naggar, A. M. *et al.* Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell* **27**, 682–697 (2015).
366. Ciarapica, R. *et al.* Deregulated expression of miR-26a and Ezh2 in Rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle* **8**, 172–175 (2009).
367. Li, T. Y. *et al.* Reduced nuclear and ectopic cytoplasmic expression of lysyl oxidase-like 2 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **43**, 1068–1076 (2012).

BIBLIOGRAFIA

368. Ertel, A., Verghese, A., Byers, S. W., Ochs, M. & Tozeren, A. Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol. Cancer* **5**, 55 (2006).
369. Snapp, E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Curr. Protoc. cell Biol.* **Chapter 21**, 1–17 (2005).
370. Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 581–597 (2014).
371. Jensen C. Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations. *Anat. Rec.* **295**, 2031–2036 (2012).
372. Gingras, A.-C., Gstaiger, M., Raught, B. & Aebersold, R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 645–654 (2007).
373. Ahn, S. G. *et al.* LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 89–99 (2013).
374. Park, J. S. *et al.* Emerging role of LOXL2 in the promotion of pancreas cancer metastasis. *Oncotarget* **7**, 42539–42552 (2016).
375. Ninomiya, G. *et al.* Significance of Lysyl oxidase-like-2 gene expression on the epithelial-mesenchymal status of hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **39**, 2664–2672 (2018).
376. Walrath, J. C., Hawes, J. J., Dyke, T. Van & Reilly, K. M. Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Research. *Adv. Cancer Res.* **106**, 113–164 (2010).
377. Chang, J. *et al.* Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer. *Oncotarget* **8**, 26066–26078 (2017).
378. Ye, M., Zhang, J., Guo, T. & Pan, X. MiR-504 inhibits cell proliferation and invasion by targeting LOXL2 in non small cell lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **97**, 1289–1295 (2018).
379. Nishikawa, R. *et al.* Tumour-suppressive microRNA-29s directly regulate LOXL2 expression and inhibit cancer cell migration and invasion in renal cell carcinoma. *FEBS Lett.* **589**, 2136–2145 (2015).
380. Hase, H. *et al.* LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1807–1817 (2014).
381. Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis. Model. Mech.* **10**, 1061–1074 (2017).
382. 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**, 703–715 (2015).
383. Sottnik, J. L., Duval, D. L., J. Ehrhart, E. & Thamm, D. H. An orthotopic, postsurgical model of luciferase transfected murine osteosarcoma with

- spontaneous metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **27**, 151–160 (2010).
384. Gabarra-Niecko, V., Schaller, M. D. & Dunty, J. M. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 359–374 (2003).
385. Waters, A. M. *et al.* Targeting Focal Adhesion Kinase Suppresses the Malignant Phenotype in Rhabdomyosarcoma Cells. *Transl. Oncol.* **9**, 263–273 (2016).
386. 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).
387. Peng, X., Nelson, E. S., Maiers, J. L. & DeMali, K. A. New insights into vinculin function and regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **287**, 191–231 (2011).
388. Fux, L. *et al.* Structure-function approach identifies a COOH-terminal domain that mediates heparanase signaling. *Cancer Res.* **69**, 1758–1767 (2009).
389. Tsutsumi, S. *et al.* The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function. *FEBS Lett.* **534**, 49–53 (2003).
390. Barry-Hamilton, V. *et al.* Allosteric inhibition of lysyl oxidase–like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* **16**, 1009–1017 (2010).
391. Ross, K. A., Smyth, N. A., Murawski, C. D. & Kennedy, J. G. The Biology of Ewing Sarcoma. *ISRN Oncol.* **2013**, 1–7 (2013).
392. Delattre, O. *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**, 162–165 (1992).
393. Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R. B. Changes in Incidence and Survival of Ewing Sarcoma Patients Over the Past 3 Decades. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 425–430 (2008).
394. 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**, 189–195 (2015).
395. 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* **8**, e66281 (2013).
396. 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**, 7275–7283 (2004).
397. Loewenstein, Y. *et al.* Protein function annotation by homology-based inference. *Genome Biol.* **10**, 207 (2009).
398. Salvador, F. *et al.* Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res.* **77**, 5846–5859 (2017).
399. Fujimoto, E. & Tajima, S. Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 91–98 (2009).

BIBLIOGRAFIA

400. Petrecca, K., Atanasiu, R., Akhavan, A. & Shrier, A. N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. *J. Physiol.* **515**, 41–8 (1999).
401. Bence, M. & Sahin-Tóth, M. Asparagine-linked glycosylation of human chymotrypsin C is required for folding and secretion but not for enzyme activity. *FEBS J.* **278**, 4338–4350 (2011).
402. Lee, H. S., Qi, Y. & Im, W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Sci. Rep.* **5**, 1–7 (2015).
403. Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C. & Surolia, A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *TRENDS Biochem. Sci.* **31**, 156–163 (2006).
404. Waetzig, G. H. *et al.* N-linked glycosylation is essential for the stability but not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer glycoprotein 130. *J. Biol. Chem.* **285**, 1781–1789 (2010).
405. Ellgaard, L. & Helenius, a. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181–191 (2003).
406. van der Vaart, B. *et al.* SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J. Cell Biol.* **193**, 1083–1099 (2011).
407. Casalou, C., Faustino, A. & Barral, D. C. Arf proteins in cancer cell migration. *Small GTPases* **7**, 270–282 (2016).
408. Xie, X. *et al.* Suppression of breast cancer metastasis through the inactivation of ADP-ribosylation factor 1. *Oncotarget* **7**, 58111–58120 (2016).
409. Feng Li, Mahitosh Mandal, Sandip K. Mishra, Christopher J. Barnes, R. K. Heregulin promotes expression and subcellular redistribution of ADP-ribosylation factor 3. *FEBS Lett.* **524**, 49–53 (2002).
410. Schiewer, M. J. & Knudsen, K. E. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1069–1080 (2014).
411. Fam, H. K. *et al.* TDP1 and PARP1 Deficiency Are Cytotoxic to Rhabdomyosarcoma Cells. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1179–1192 (2013).
412. Hernández, J. *et al.* Tumor suppressor properties of the splicing regulatory factor RBM10. *RNA Biol.* **13**, 466–472 (2016).
413. Zhao, J. *et al.* Functional analysis reveals that RBM10 mutations contribute to lung adenocarcinoma pathogenesis by deregulating splicing. *Sci. Rep.* **7**, 40488 (2016).
414. Jiang, X. & Couchman, J. R. *Perlecan and Tumor Angiogenesis. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **51**, (2003).
415. Kidd, M. E., Shumaker, D. K. & Ridge, K. M. The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1–6 (2014).
416. Lahat, G. *et al.* Vimentin Is a Novel Anti-Cancer Therapeutic Target; Insights from In Vitro and In Vivo Mice Xenograft Studies. *PLoS One* **5**, e10105 (2010).

417. Zhu, Q.-S. *et al.* Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene* **30**, 457–470 (2011).
418. Helfand, B. T. *et al.* Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1274–1289 (2011).
419. Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D. & Vignjevic, D. M. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J. Cell Biol.* **189**, 541–556 (2010).
420. Byun, Y. *et al.* Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**, 443–450 (2001).
421. Yoshida, H., Murachi, T. & Tsukahara, I. Degradation of actin and vimentin by calpain II, a Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, in bovine lens. *FEBS Lett.* **170**, 259–262 (1984).
422. Moretti, D., Bello, B. Del, Allavena, G. & Maellaro, E. Calpains and cancer: Friends or enemies? *Arch. Biochem. Biophys.* **564**, 26–36 (2014).
423. Schoenwaelder, S. M. *et al.* Distinct substrate specificities and functional roles for the 78- and 76-kDa forms of mu-calpain in human platelets. *J. Biol. Chem.* **272**, 24876–24884 (1997).
424. Baudry, M. & Bi, X. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **39**, 235–245 (2016).
425. Franco, S. J. & Huttenlocher, A. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* **118**, 3829–3838 (2005).
426. Glading, A., Lauffenburger, D. A. & Wells, A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* **12**, 46–54 (2002).
427. Roumes, H. *et al.* Calpains: Markers of tumor aggressiveness? *Exp. Cell Res.* **316**, 1587–1599 (2010).

ANNEX I

Taula A1: Dades clíniques de les mostres de pacients amb RMS del TMA. Llegenda: D (difunt), V (viu), L (localitzat), M (metàstasi), ND (no disponible).

Pacient	Localització	Supervivència des del diagnòstic (anys)	Estat	Estadi	Tipus	Expressió LOXL2
1	Úter	<1	D	L	Pleomòrfic	No
2	Paret abdominal	12	V	L	Pleomòrfic	No
3	Ull	12	V	M	ERMS	No
4	Ovari i úter	<1	D	L	Anaplàstic	No
5	Paratesticular	11	V	L	ND	No
6	Cuixa	3	D	L	Pleomòrfic	No
7	Bufeta urinària i pulmó	2	D	M	ERMS	Sí
8	Ós cranial etmoides	<1	D	L	ARMS	Sí
9	Peritoneu	6	V	L	ERMS	No
10	Glutis	<1	D	L	ARMS	No
11	Bessó	ND	D	L	ARMS	Sí
12	Parts toves esquena	11	V	M	ARMS	No
13	Fosses nasals	2	D	L	ARMS	Sí
14	Maxil·lar superior	<1	D	M	ERMS	No
15	Testicle	10	V	L	ERMS	No
16	Pulmó	10	V	M	ERMS	Sí
17	Cèrvix-vagina	9	V	L	ERMS	No
18	Paranasal	ND	ND	L	ERMS	Sí
19	Ganglis i músculs de la masticació	4	V	M	ERMS	Sí
20	Cuixa	ND	ND	L	Pleomòrfic	Sí
21	Parascapular	ND	ND	L	Pleomòrfic	No
22	Extremitat	<1	D	M	Pleomòrfic	Sí
23	Pelvis i bufeta urinària	19	V	M	ERMS	No
24	ND	2	D	M	Pleomòrfic	Sí
25	Regió inguinal	17	V	L	Pleomòrfic	No

ANNEX I

26	Pulmó	ND	ND	M	ARMS	No
27	Abdomen i cervell	ND	ND	M	ERMS i ARMS	Sí
28	Pectoral	ND	ND	L	Anaplàsic	No
29	Parts toves braç i pit	ND	ND	M	ERMS i ARMS	No
30	Retroperitoneu i intracranial	ND	ND	M	ERMS	No
31	Maxil·lar i zona orbital	15	V	L	ERMS	No
32	Regió paravertebral	<1	D	M	Pleomòrfic	No
33	Abdomen	14	V	L	ARMS	Sí
34	Coll	14	V	L	ERMS	No

ANNEX II

Taula A2: Llistat de proteïnes comuns en els clons RLwt1 i RLoxmut12 i absents en el control RH28/FLAG, identificades per MS en el *pull down* anti-FLAG. La taula inclou el nom de la proteïna i el seu identificador. A més, s'especifica el % de *coverage* (COV.) i el nombre de pèptids identificats en LOXL2 wt (RLwt1) i LOXL2 oxmut (RLoxmut12).

Identificador	Nom proteïna	% COV. LOXL2 wt	% COV. LOXL2 oxmut	Pèptids LOXL2 wt	Pèptids LOXL2 oxmut
LOXL2_HUMAN	Lysyl oxidase homolog 2	31,4	35,2	20	22
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	47,1	38,1	17	13
VIME_HUMAN	Vimentin	35,6	23	17	11
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	43,1	31,2	15	10
RBM10_HUMAN	RNA-binding protein 10	11,08	9,4	10	8
PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	11,14	16,1	8	8
PGBM_HUMAN	Basement membrane- specific heparan sulfate proteoglycan core protein	2,39	5,4	8	7
ARF3_HUMAN	ADP-ribosylation factor 3	24,2	21,7	4	6
SLAI2_HUMAN	SLAIN motif-containing protein 2	5,34	6	2	3
HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	4,5	3,5	2	1
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	3	7,2	1	4
CK084_HUMAN	Uncharacterized protein C11orf84	4,7	4,7	1	1
TMM56_HUMAN	Transmembrane protein 56	2,7	2,7	1	1

Taula A3: Llistat de proteïnes específiques del clon RLwt1 i absents en el control RH28/FLAG, identificades per MS en el *pull down* anti-FLAG. La taula inclou el nom de la proteïna, el seu identificador, el % de *coverage* (COV.) i el nombre de pèptids identificats.

Identificador	Nom proteïna	% COV.	Pèptids
LOXL2_HUMAN	Lysyl oxidase homolog 2	31,4	20
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	47,1	17
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	43,1	15
VIME_HUMAN	Vimentin	35,6	17
TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain	27,9	10
TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain	27,9	10
RBM10_HUMAN	RNA-binding protein 10	11,08	10
PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	11,14	8
PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	2,39	8
FSCN1_HUMAN	Fascin	9,3	4
ARF3_HUMAN	ADP-ribosylation factor 3	24,2	4
SLAI2_HUMAN	SLAIN motif-containing protein 2	5,34	2
F263_HUMAN	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	5,4	2
PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	7,3	2
HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	4,5	2
RL4_HUMAN	60S ribosomal protein L4	2,6	1
CK084_HUMAN	Uncharacterized protein C11orf84	4,7	1
KI26A_HUMAN	Kinesin-like protein KIF26A	0,6	1
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM	3	1
TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta	2,8	1
TMM56_HUMAN	Transmembrane protein 56	2,7	1
S14L1_HUMAN	SEC14-like protein 1	1,1	1
GBG7_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7	16,2	1
G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	2,7	1
PCY1A_HUMAN	Choline-phosphate cytidyltransferase A	2,7	1
PRP31_HUMAN	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	2,2	1
AL1B1_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	2,1	1

Taula A4: Llistat de proteïnes específiques del clon RLoxmut12 i absents en el control RH28/FLAG, identificades per MS en el *pull down* anti-FLAG. La taula inclou el nom de la proteïna, el seu identificador, el % de *coverage* (COV.) i el nombre de pèptids identificats.




Identificador	Nom proteïna	% COV.	Pèptids
LOXL2_HUMAN	Lysyl oxidase homolog 2	35,2	22
TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain	38,1	13
VIME_HUMAN	Vimentin	23	11
TBB4B_HUMAN	Tubulin beta-4B chain	31,2	10
RBM10_HUMAN	RNA-binding protein 10	9,4	8
PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	16,1	8
PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	5,4	7
ARF3_HUMAN	ADP-ribosylation factor 3	21,7	6
SLAI2_HUMAN	SLAIN motif-containing protein 2	6	3
TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain	12,2	5
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase	7,2	4
PTBP1_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 1	4,9	2
LAP2B_HUMAN	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	4,4	2
TITIN_HUMAN	Titin	0	2
HORN_HUMAN	Hornerin	0,6	1
HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	3,5	1
PAIRB_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	3,9	1
CK084_HUMAN	Uncharacterized protein C11orf84	4,7	1
PPM1B_HUMAN	Protein phosphatase 1B	3,5	1
IMDH2_HUMAN	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	2,3	1
SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2,1	1
CRNS1_HUMAN	Carnosine synthase 1	1,1	1
HCD2_HUMAN	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	6,5	1
TMM56_HUMAN	Transmembrane protein 56	2,7	1
CC113_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 113	2,4	1
TPD53_HUMAN	Tumor protein D53	6,9	1
DIDO1_HUMAN	Death-inducer obliterator 1	0,4	1
GRK5_HUMAN	G protein-coupled receptor kinase 5	1,9	1

ANNEX III

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

- I. Garcia-Monclús S, López-Alemany R*, Almacellas-Rabaiet O*, Herrero-Martín D, Huertas-Martínez J, Lagares-Tena L, Alba-Pavón P, Hontecillas-Prieto L, Mora J, de Álava E, Rello-Varona S, Giangrande PH, Tirado OM. **EphA2 receptor is a key player in the metastatic onset of Ewing sarcoma.** *Int J Cancer*, 143:1188–1201. Mar 26 (2018). Research article. *Aquests autors van contribuir per igual.
- II. Huertas-Martínez J, Court F, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Almacellas-Rabaiet O, Sáinz-Jaspeado M, Garcia-Monclús S, Lagares-Tena L, Buj R, Hontecillas-Prieto L, Sastre A, Azorin D, Sanjuan X, López-Alemany 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*, 386:196-207. Feb 1 (2017). Research Article.
- III. Lagares-Tena L, García-Monclús S, López-Alemany R, Almacellas-Rabaiet 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* 7:56889-56903. Jul 28 (2016). Research article.

EphA2 receptor is a key player in the metastatic onset of Ewing sarcoma

Silvia Garcia-Monclús¹, Roser López-Alemaný^{1†}, Olga Almacellas-Rabaiget^{1†}, David Herrero-Martín^{1,2}, Juan Huertas-Martínez¹, Laura Lagares-Tena¹, Piedad Alba-Pavón¹, Lourdes Hontecillas-Prieto ^{2,3}, Jaume Mora⁴, Enrique de Álava^{2,3}, Santi Rello-Varona ¹, Paloma H. Giangrande⁵ and Oscar M. Tirado ^{1,2,6}

¹Sarcoma Research Group, Oncobell Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

²CIBERONC, Carlos III Institute of Health (ISCIII), Madrid, Spain

³Laboratory of Molecular Pathology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

⁴Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

⁵Department of Internal Medicine, University of Iowa, Iowa City, IO

⁶Institut Català d'Oncologia (ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Ewing sarcoma (ES) is the second most common bone malignancy affecting children and young adults with poor prognosis due to high metastasis incidence. Our group previously described that EphA2, a tyrosine kinase receptor, promotes angiogenesis in Ewing sarcoma (ES) cells via ligand-dependent signaling. Now we wanted to explore EphA2 ligand-independent activity, controlled upon phosphorylation at S897 (p-EphA2^{S897}), as it has been linked to metastasis in several malignancies. By reverse genetic engineering we explored the phenotypic changes after EphA2 removal or reintroduction. Gene expression microarray was used to identify key players in EphA2 signaling. Mice were employed to reproduce metastatic processes from orthotopically implanted engineered cells. We established a correlation between ES cells aggressiveness and p-EphA2^{S897}. Moreover, stable overexpression of EphA2 in low EphA2 expression ES cells enhanced proliferation and migration, but not a non-phosphorylatable mutant (S987A). Consistently, silencing of EphA2 reduced tumorigenicity, migration and invasion *in vitro*, and lung metastasis incidence in experimental and spontaneous metastasis assays *in vivo*. A gene expression microarray revealed the implication of EphA2 in cell signaling, cellular movement and survival. ADAM19 knockdown by siRNA technology strongly reproduced the negative effects on cell migration observed after EphA2 silencing. Altogether, our results suggest that p-EphA2^{S897} correlates with aggressiveness in ES, so blocking its function may be a promising treatment.

Key words: EphA2, Ewing sarcoma, metastasis, ADAM19

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

†R.L.-A. and O.A.-R. contributed equally to this work

Conflict of interest: Authors declare no conflicts of interests.

Grant sponsor: Fundación Alba Pérez lucha contra el cáncer infantil; **Grant sponsor:** Instituto de Salud Carlos III; **Grant numbers:** CES12/021, PI11/00038, PI15/00025, AC14/00026; **Grant sponsor:** Co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-“a Way to Build Europe”; **Grant sponsor:** Fundación Científica de la AECC; **Grant sponsor:** National Institutes of Health; **Grant number:** R01CA138503; **Grant sponsor:** Mary Kay Foundation; **Grant numbers:** 9033-12, 001-09; **Grant sponsor:** The Roy J Carver Charitable Trust; **Grant number:** RJCCT 01-224

DOI: 10.1002/ijc.31405

History: Received 24 Aug 2017; Accepted 15 Mar 2018; Online 26 Mar 2018

Correspondence to: Oscar M. Tirado, Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals – 3^a Planta Gran Via 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, Tel.: 34-932607402, Fax: 34-932607426, E-mail: omartinez@idibell.cat

Introduction

Generally, Ewing sarcoma (ES) tumors, the second most frequent bone tumors among children and adolescents, are very aggressive and, although chemosensitive, tend to recur and metastasize. The survival of ES patients presenting with metastasis at diagnosis is poor (20%).¹ The lack of knowledge regarding the molecular mechanisms that regulate the metastatic process is the main reason for the lack of efficient therapeutics for these patients.

Ephrin (Eph) receptors are the most extensive subfamily of receptor tyrosine-kinases (RTKs) involved in several processes, including angiogenesis, tissue-border formation, cell migration and cell plasticity.² These receptors are well-established mediators in cell-cell interactions and motility and are expressed in human cancers, including melanoma, prostate, breast, colon, lung and esophageal carcinomas.³ Among these receptors, EphA2 plays important roles in oncogenesis, metastasis and treatment resistance.⁴ In ES, we demonstrated the involvement of EphA2 in tumor progression by promoting angiogenesis in a ligand-dependent manner.⁵ Moreover, EphA2 has been previously implicated in vascular mimicry, an important process that contributes to

What's new?

Ewing sarcoma (ES) tumors, the second most frequent bone tumors among children and adolescents, are very aggressive and tend to recur and metastasize. Lack of knowledge regarding the molecular mechanisms that regulate this metastatic process is the main reason for the lack of efficient therapeutics. Here, by using gain- and loss-of-function experiments and *in vitro* and *in vivo* assays, the authors established a correlation between ES aggressiveness and phosphorylation of the tyrosine kinase receptor EphA2. Altogether, the findings suggest that blocking EphA2 expression or its function with drugs or genetic tools may be of use for the treatment of ES.

ES malignancy and worse prognosis.⁶ However, EphA2 also exhibit tumor progression properties by acting in a ligand-independent fashion, promoting metastasis in several types of tumors.^{7–9}

Caveolin-1 (CAV1), a structural protein responsible for the formation of caveolae, plays a crucial role in the development of metastasis in melanomas, prostate, breast and colon cancer.¹⁰ Our group also demonstrated the implication of CAV1 in the development of ES metastasis.^{11,12} In addition, we also showed that CAV1 interacts with EphA2 in ES cells to promote angiogenesis in a kinase-dependent manner,⁵ underscoring the importance of this receptor in the complex signaling pathways that control metastasis through, perhaps, kinase-independent activities.

Here, we show that EphA2 is indeed phosphorylated at S897 in most ES cell lines. CAV1 knockdown results in a significant loss of S897 phosphorylation, demonstrating a clear relationship between both proteins. Furthermore, using site-directed mutagenesis and gain- and loss-of-function experiments, we demonstrated that EphA2 is essential for the aggressive properties of ES in a kinase-independent manner. Therefore, blocking EphA2 expression or its function with drugs or genetic tools may be of therapeutic use for the treatment of ES.

Materials and Methods**Cell culture and transfection**

Ewing sarcoma cell lines: A673, STA-ET-1, TC252 and CADO-ES (gifts from Dr. Heinrich Kovar), EW7 (gift from Dr. Olivier Delattre), RH1 (gift from Dr. Peter Houghton), A4573 (gift from Dr. Santiago Ramón y Cajal), SK-N-MC, TC71, RD-ES and SK-ES-1 (bought from Leibniz Institute DSMZ). Cell lines were cultured in RPMI 1640-GlutaMAX (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) and 1% penicillin–streptomycin (Life Technologies). 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 were used for all experiments.

Cells were stably transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. RH1 transfected cells stably expressing pCMV6-EphA2 Myc-DKK tagged vector (Origene #RC205725, Rockville,

Maryland, USA) were selected with 0.6 mg/mL of neomycin (Life Technologies). A673 and TC252 cells stably transfected with pRS-shEphA2 vector (Origene #TR320327) were selected with 0.5 µg/mL and 0.2 µg/mL of puromycin (Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, USA), respectively, for 14 days. Antibiotic-resistant pools and individual clones were isolated for further analysis and maintained in the presence of antibiotics.

For transient gene silencing, cells were transfected using Dharmafect (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) using 100 nM customized siRNA for ADAM19 (5'-GCUCCUUC-CUACACAGAAA-3').

Clinical material

For testing the expression of EphA2 and p-EphA2^{S897} in Tissue Micro Arrays (TMAs), tumor samples from a recent published study were used.¹³ Written informed consent was obtained from each patient at the *Hospital Universitario Virgen del Rocío*, Seville, Spain. Staining of EphA2 and p-EphA2^{S897} in the TMA was scored by a blinded trained pathologist on a positive–negative scale. EphA2 staining at endothelia was considered as an internal positive control. Immunohistochemical (IHC) techniques were done as previously described.¹¹ Expression of EphA2 and p-EphA2^{S897} in TMA's was analyzed using the same antibodies used for western blotting.

Cell treatments

For MEK and Akt inhibitors treatments, cells were seeded and incubated with the corresponding drug 24 hr later. MEK inhibitors: 20 µM U0126 (LC Laboratories, Woburn, Massachusetts, USA) for 24–48 hr and 50 nM Trametinib (LC Laboratories) for 24 hr. Akt inhibitors: BKM-120 (Selleckchem, Houston, Texas, USA) and MK22-06 (Selleckchem) for 24 hr.

Site-directed mutagenesis

Mutagenesis was performed using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) following the manufacturer's protocol. pCMV6-EphA2 Myc-DKK tagged vector was used as a template. To prevent residue phosphorylation, EphA2 serine (S) 897 residue was changed into alanine (A), using the following forward (5'-GTGTCTATCCGGCTCCCCGCCACGAGCGGCTC GGAGG-3') and reverse (5'-CCTCCGAGCCGCTCGTGGC

GGGAGCCCGATAGACAC-3') primers. After mutagenesis, the full cDNA was sequenced to verify the S897 to A897 mutation and to confirm the absence of other possible unspecific mutations in the coding sequence. The mutant vector was named S897A.

Clonogenic assay

For clonogenic assays, 500 cells were seeded in the wells of a six-well plate. When colonies reached saturation, approximately 14 days after seeding, cells were fixed with cold methanol for 10 min, washed with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Biowest, Riverside, Missouri, USA), stained with crystal violet (Sigma-Aldrich) for 20 min and washed with water. The total colony number was manually counted using ImageJ. In some cases, colonies were discolored with a 10% glacial acetic acid solution and crystal violet was quantified by spectrometry.

Proliferation assay

For proliferation assays, 5,000 cells were seeded in the wells of a 96-well plate. At 24, 48, 72 and 96 hr after seeding, the culture medium was removed and 100 μ L of a 1:10 dilution of Water Soluble Tetrazolium (WST-1, Roche, Basel, Switzerland) in the medium was added to each well. After 60 and 120 min, cell viability was quantified by spectrometry and extrapolated as a measure of cell proliferation.

Transwell migration assay

Cells were harvested as usual. After an additional wash with RPMI, 1.5×10^5 cells in 150 μ L serum-free medium were added to the top chamber of 8- μ m pore polycarbonate transwells (Transwell Permeable Supports – Corning, Corning, New York, USA). Meanwhile, in the bottom chamber, 500 μ L of complete medium (10% FBS) were added. For the migration assays in the presence of 50 nM Trametinib, cells were pre-treated with the drug the 24 hr prior seeding and Trametinib was added to both chambers. For the migration assays in the presence of siRNA, cells were transfected 6 hr prior trypsinization and seeding. After 24 hr for A673, 48 hr for TC252, 72 hr for RH1 and 48 hr for the cellular panel comparison, cells on the upper chamber were removed with a cotton swab. Migrating cells still attached on the membrane's underside were fixed for 30 min using 70% ethanol and stained with crystal violet. Transwell membranes were collected and 5 pictures of each transwell were acquired by optical microscopy (100 \times). Generally, membranes were discolored with a 10% glacial acetic acid solution and crystal violet was quantified by spectrometry. In some instances we opted for a direct manual counting of the number of migrating cells in the membrane using ImageJ. Results are presented as the percentage of a designated control condition.

Matrigel invasion assay

The procedure was the same to the migration assay, but transwells were previously coated with 50 μ L of cold Matrigel

(BD Biosciences, East Rutherford, New Jersey, USA) diluted 1:20 in RPMI and placed in a 37°C incubator for 6 hr. After Matrigel polymerization, cells were seeded, stained and counted as in the migration assay. The reaction was stopped after 48 hr for A673 and 72 hr for TC252 and RH1. For the assays in the presence of 50 nM Trametinib, cells were pre-treated with the drug the 24 hr prior seeding and Trametinib was added to both chambers. For the assays in the presence of siRNA, cells were transfected 6 hr prior trypsinization and seeding.

Real-time cell analysis of invasive behavior

Cell invasion was also analyzed using RTCA (Real-Time Cell Analysis) xCELLigence system (ACEA Biosciences, San Diego, California, USA). Cells (4×10^4) in 100 μ L RPMI medium (FBS-free) were seeded onto CIM (cell invasion and migration) plates (ACEA Biosciences) previously coated with 30 μ L of cold Matrigel (BD Biosciences) diluted 1:20 in RPMI. One hundred microliters of RPMI containing a 10% FBS were added to the bottom chamber.

CIM plates consist of Boyden chambers coupled to micro-electronic sensors in the bottom part of the membrane that measure electrical impedance. Results are reported as cell index, a dimensionless parameter correlated with cell migration. Continuous measures were taken every 15 min, allowing monitoring of the cell invasion status of different cell lines simultaneously over time.

Western blot

Cells were lysed with RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) containing protease inhibitors (Complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (PhosStop, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) for 30 min on ice. Lysates were sonicated, centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 30 min, and supernatants recovered. Samples (50 μ g) were resolved by 8, 10 or 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (0.2 μ m, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Membrane blocking was performed with 5% skimmed milk in PBS containing 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 hr. Next, membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (EphA2 1:1,000 #6997, Phospho-EphA2 Ser897 1:1,000 #6347, ERK1/2 1:2,000 #4695, Phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204 1:1,000 #4376, Akt 1:2,000 #9272, Phospho-Akt Ser473 1:1,000 #4060 from Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA; CAV1 1:10,000 #610059 from BD Transduction Lab; and ADAM19 1:500 #ab104800 from Abcam, Cambridge, UK). Blots were then incubated at room temperature for 1 hr with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit and goat anti-mouse, Life Technologies) and the peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Immunodetection of α -tubulin (#ab28439) or β -actin (#ab49900) from Abcam was used as a loading control.

RNA extraction and reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Total RNA (2 µg), extracted by using the NucleoSpin RNA or the NucleoSpin miRNA (for Microarray purpose) from Macherey-Nagel, Düren, Germany, was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies).

Gene expression analysis-microarray

Gene expression microarray was performed at *Servei d'Anàlisi de Microarrays (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain)*. Amplification, labeling and hybridization were performed according to the GeneChip WT PLUS Reagent kit protocol, and then the samples were hybridized to GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) in a GeneChip Hybridization Oven 640. Washing and scanning were performed using the Expression Wash, Stain and Scan Kit and the GeneChip System of Affymetrix (GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 3000 7G). After quality control of raw data, they were background corrected, quantile-normalized and summarized to a gene-level using the robust multi-chip average (RMA)¹⁴ obtaining a total of 48,144 transcript clusters, excluding controls, which roughly correspond to genes or other mRNAs as miRNAs or lincRNAs. Linear Models for Microarray (limma),¹⁵ a moderated t-statistics model, was used for detecting differentially expressed genes between the conditions. Correction for multiple comparisons was performed using false discovery rate (FDR).¹⁶ Genes with a *p*-values <0.05 with an absolute fold change above 1.5 were selected as significant. Functional analyses were performed with Ingenuity Pathway Analysis v 9.0 (Ingenuity® Systems, www.qiagenbioinformatics.com) and Gene Set Enrichment Analysis^{17,18} with collections C2, C4 and C7. All analyses were performed in R (v 3.1.1, <http://www.R-project.org/>) with packages *aroma.affymetrix*,¹⁹ *Biobase*²⁰ and *limma*.²¹

Quantitative real-time PCR

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed under universal cycling conditions on LightCycler 480 II instrument (Roche) using TaqMan PCR Mastermix and TaqMan probes from Life Technologies (*ACTB* 4333762F, *ADAM19* Hs00224960_m1, *CCL2* Hs00234140_m1, *LUM* Hs00929860_m1, *PCDH8* Hs04187285_g1, *PI3KCG* Hs00277090_m1 and *PTPN21* Hs00234784_m1). Cycle threshold (CT) values were normalized to that of *β-actin*. Relative expression level of the target gene among the different samples was calculated using the $\Delta\Delta CT$ method.²²

Subcutaneous tumor induction

In vivo tumors were induced with subcutaneous injections of 5×10^6 A673 wild type or EphA2 silenced cells, resuspended in 100 µL of RPMI. Injections were performed in the hind legs of 6-week-old female athymic Balb/c^{nu/nu} nude mice (Harlan). In each mouse, control cells were injected in the

left flank and EphA2 silenced cells in the right one. Tumor volumes were measured three times per week and calculated according to the following equation: volume = $1/2 \times (\text{length} \times \text{width}^2)$. When tumors reached a volume of 1 cm³, mice were euthanized and tumors were recovered for further analysis. Tumors were cut in half and one half was frozen, while the other half was fixed in paraformaldehyde at 4% and embedded in paraffin. Animals were cared for according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Ethics approval was provided by local appointed ethics committee from IDIBELL, Barcelona, Spain. *n* = 8 for each condition.

Experimental metastasis assay

A673 wild type or EphA2 silenced cells (2×10^6), resuspended in 100 µL of PBS were injected intravenously in the tail vein of 6-week-old female athymic BALB/c^{nu/nu} nude mice (Harlan). The presence of morbidity symptoms was checked every 48 hr. Sixty days after injection, mice were euthanized and lungs were recovered to examine the presence of metastasis. Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Lung sections were stained with hematoxylin & eosin and metastases were counted under an optical microscope. Animal care procedures were followed as described above. *n* = 10 for each condition.

Orthotopic xenograft metastasis assay

This assay was performed as previously described.¹² Briefly, 2×10^6 cells resuspended in 100 µL of PBS were injected into the gastrocnemius muscles of 6-week-old female athymic nude mice (BALB/c^{nu/nu}) from Harlan. Once primary tumor-bearing limbs reached a volume of 800 mm³, the gastrocnemius muscles were surgically resected. At Day 60 after injection, mice were euthanized and lungs were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Lung sections were stained with hematoxylin & eosin and metastases were counted under an optical microscope. *n* = 7 for each condition.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, data were analyzed for statistical significance using Student's *t*-test. Fisher's exact test was used for evaluating differences in lung metastasis incidence in mice. Experiments were performed thrice; *p* ≤ 0.05 was regarded as significant.

Results

Phosphorylation of EphA2 at serine 897 correlates with the migratory capacity of ES cells

Phosphorylation of EphA2 on S897 (p-EphA2^{S897}) has been linked to a higher migratory capacity of cancer cells.²³ This property is independent of ligand binding to the receptor.⁷⁻⁹ Our group previously showed that CAV1 promotes metastasis in ES¹¹ and demonstrated its relationship with EphA2, promoting angiogenesis.⁵ Indeed, CAV1 silencing resulted in de-phosphorylation of EphA2 in three previously published

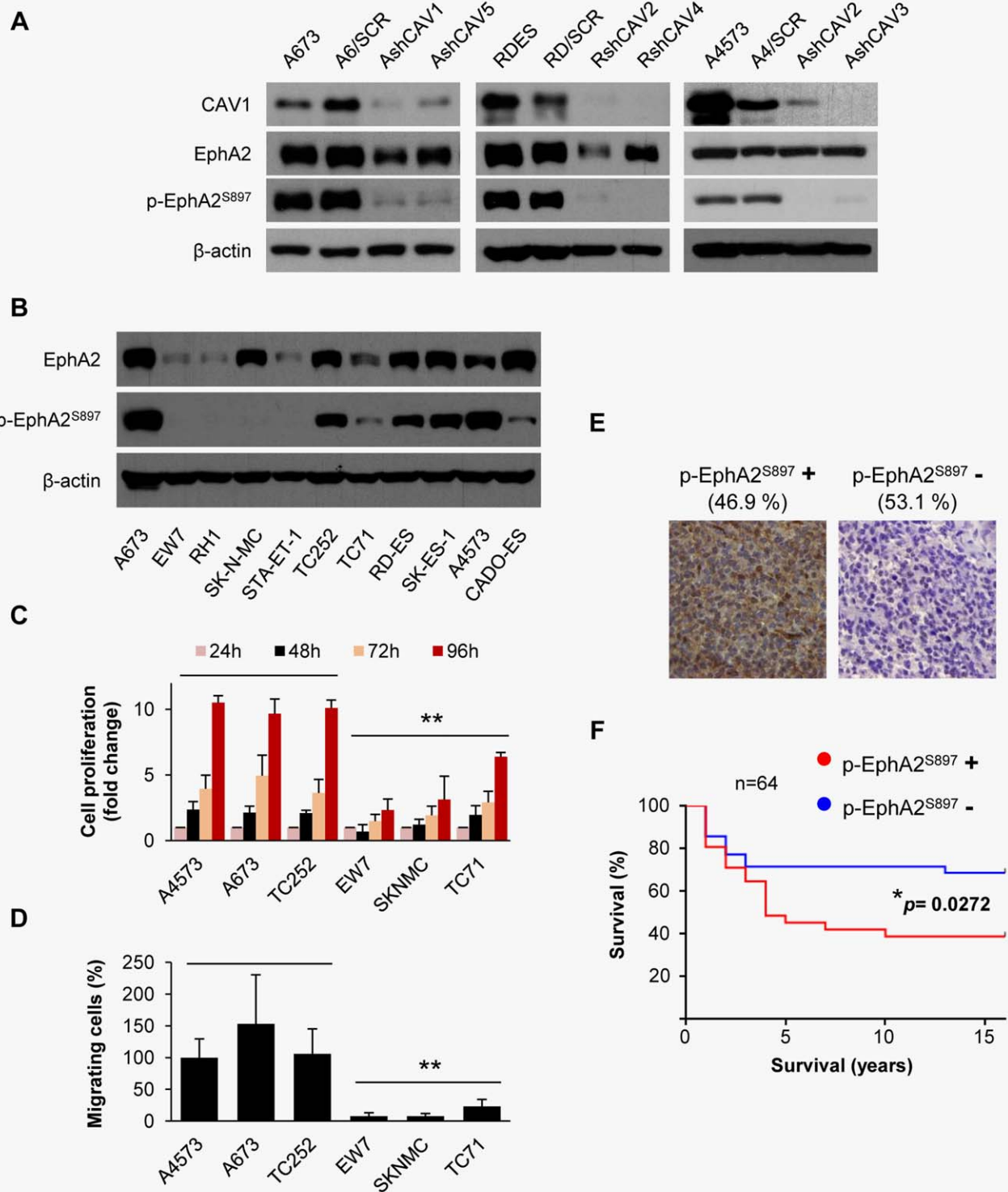


Figure 1. EphA2 receptor phosphorylation on S897 correlates with aggressiveness. (a) Representative western blot showing EphA2 phosphorylation in caveolin-1 (CAV1) silenced clones of A673, RDES and A4573 cells. SCR = control scrambled sequence. (b) Representative western blot showing total EphA2 expression and its phosphorylation at S897 residue in a panel of ES cell lines. (c) WST1 tetrazolium-based proliferation assay comparing cell lines with high levels of p-EphA2^{S897} (A4573, A673 and TC252) vs. those with low p-EphA2^{S897} (EW7, TC71 and SK-N-MC). (d) Migration assay in Boyden chambers in the selected panel of high or low p-EphA2^{S897} expression cell lines. A4573 cell line was set as reference. (e) Sample micrographs from the Ewing sarcoma tissue microarray showing differential expression pattern of p-EphA2^{S897}. Magnification: $\times 40$. Data are presented as means \pm SD. Statistical significance was achieved by the Student's *t*-test from at least three different experiments: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. (f) Kaplan-Meier curve comparing differential survival of Ewing sarcoma patients in function of p-EphA2^{S897} expression. Long-rank (Mantel-Cox test) analysis was used to generate *p*-values. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

models (Fig. 1a). Moreover, EphA2 phosphorylation levels at S897 were high in a panel of ES cell lines (Fig. 1b). We compared the proliferation and migration abilities between three ES cell lines with highly phosphorylated EphA2 and three ES cell lines with lower levels of phosphorylation, showing that cells with high levels of p-EphA2^{S897} proliferated and migrated significantly more than those with lower phosphorylation levels (Figs. 1c and 1d), suggesting that p-EphA2^{S897} confers advantage toward a more aggressive phenotype in ES. We further used IHC on TMAs to analyze the expression and phosphorylation status of EphA2 in a panel of 86 ES patients (Supporting Information Fig. S1a and Fig. 1e). Most of the evaluable ES samples (73) expressed EphA2 (90.4%). However, only 46.9% of the 64 evaluable samples were positive for p-EphA2^{S897}. Interestingly, Kaplan-Meier method compared by Long-rank (Mantel-Cox test) analysis showed only lower overall survival in patients that were positive for p-EphA2^{S897}, $p = 0.0272$ (Supporting Information Fig. S1b and Fig. 1f). Moreover, 14 out of 64 evaluated patients presented metastasis. Of those patients, 71.4% died because of disease and 60% of them (10) were positive for p-EphA2^{S897}. In contrast, 75% of the patients with metastasis and still alive (3 out of 4) were negative for p-EphA2^{S897}. To further demonstrate the relationship between p-EphA2^{S897} and a more aggressive phenotype, we stably transfected RH1 cells with a wild type (wt) EphA2 construct (REph WT) and a non-phosphorylatable S897A EphA2 mutant construct (REph S897A) (Supporting Information Fig. S2a). Indeed, only cells transfected with the EphA2 wt construct gained significant proliferation and migration abilities (Figs. 2b and 2c).

EphA2 silencing results in decreased cell viability, clonogenic capacity and tumor growth

To confirm the involvement of EphA2 in the progression of ES, we established two silenced models of EphA2 using A673 and TC252 cells by transfecting them with a shRNA against EphA2 or a shRNA control (Fig. 3a). EphA2 knockdown in both cell lines significantly reduced both cell proliferation, as measured by the WST1 tetrazolium-based assay, and clonogenic capacity (Figs. 3b and 3c). Furthermore, EphA2 silencing resulted in reduced tumor growth in nude mice (Fig. 3d). EphA2 knockdown in the resulting tumors was demonstrated by western blot (Supporting Information Fig. S3).

EphA2 silencing results in decreased cell migration, invasion and metastasis *in vivo*

As observed with CAV1 silencing,⁵ EphA2 knockdown resulted in a significant reduction of the migratory and invasive capacity of ES cells *in vitro* (Figs. 4a and 4b and Supporting Information Fig. S4a). Moreover, we performed an experimental metastasis assay, injecting tumor cells through the tail vein of nude mice and observed a reduction in the incidence of lung metastasis when EphA2 silenced cells were injected (Fig. 4c). To further study this process, we used a

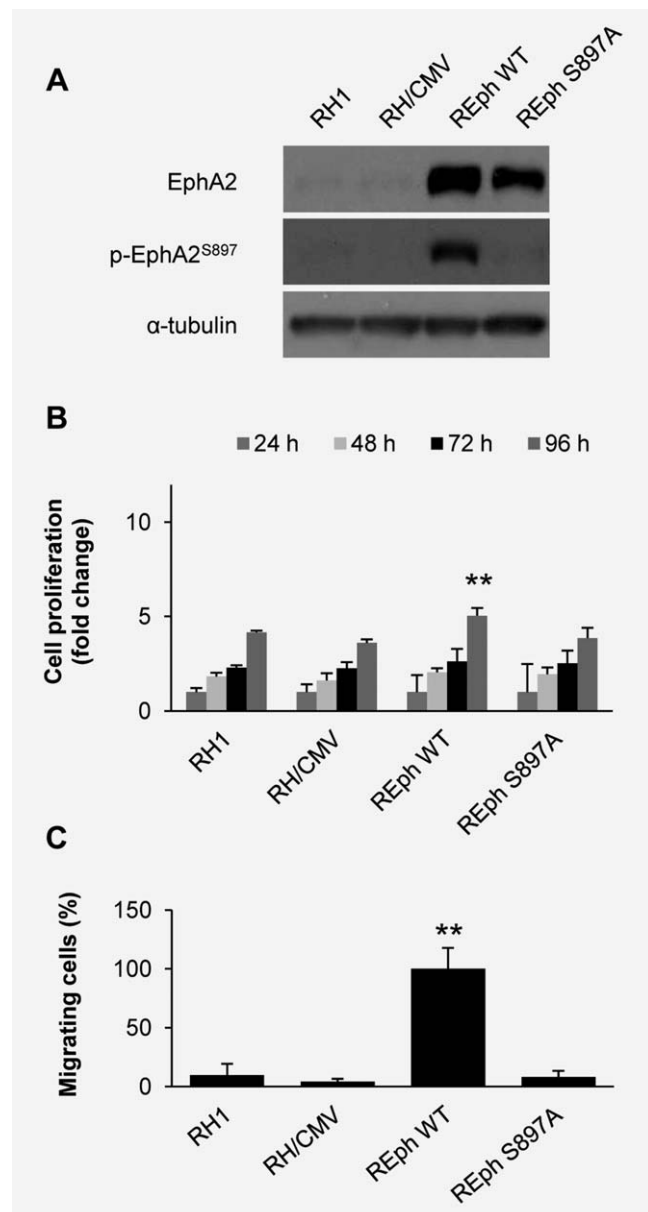


Figure 2. Only reintroduction of a phosphorylatable form of EphA2 is able to promote aggressiveness in RH1 cells. (a) Western blot showing EphA2 expression and its phosphorylation at S897 in RH1 reintroduction model. CMV = empty vector. (b) WST1 tetrazolium-based proliferation assay for the RH1 EphA2 reintroduction model. (c) Migration assay in Boyden chambers for the RH1 EphA2 reintroduction model. REphWT was set as reference. Data are presented as means \pm SD. Statistical significance was achieved by the Student's *t*-test from at least three different experiments: ** $p \leq 0.01$.

previously described orthotopic model,¹² in which tumor cells were injected in the gastrocnemius muscle. Consistently, a significant decrease in the incidence of lung metastasis (Fig. 4d and Supporting Information Fig. S4b) and in the number of metastasis per mice was observed (Supporting Information Fig. S4c). These results strongly suggest that aggressive progression of ES cells highly depends on EphA2 signaling.

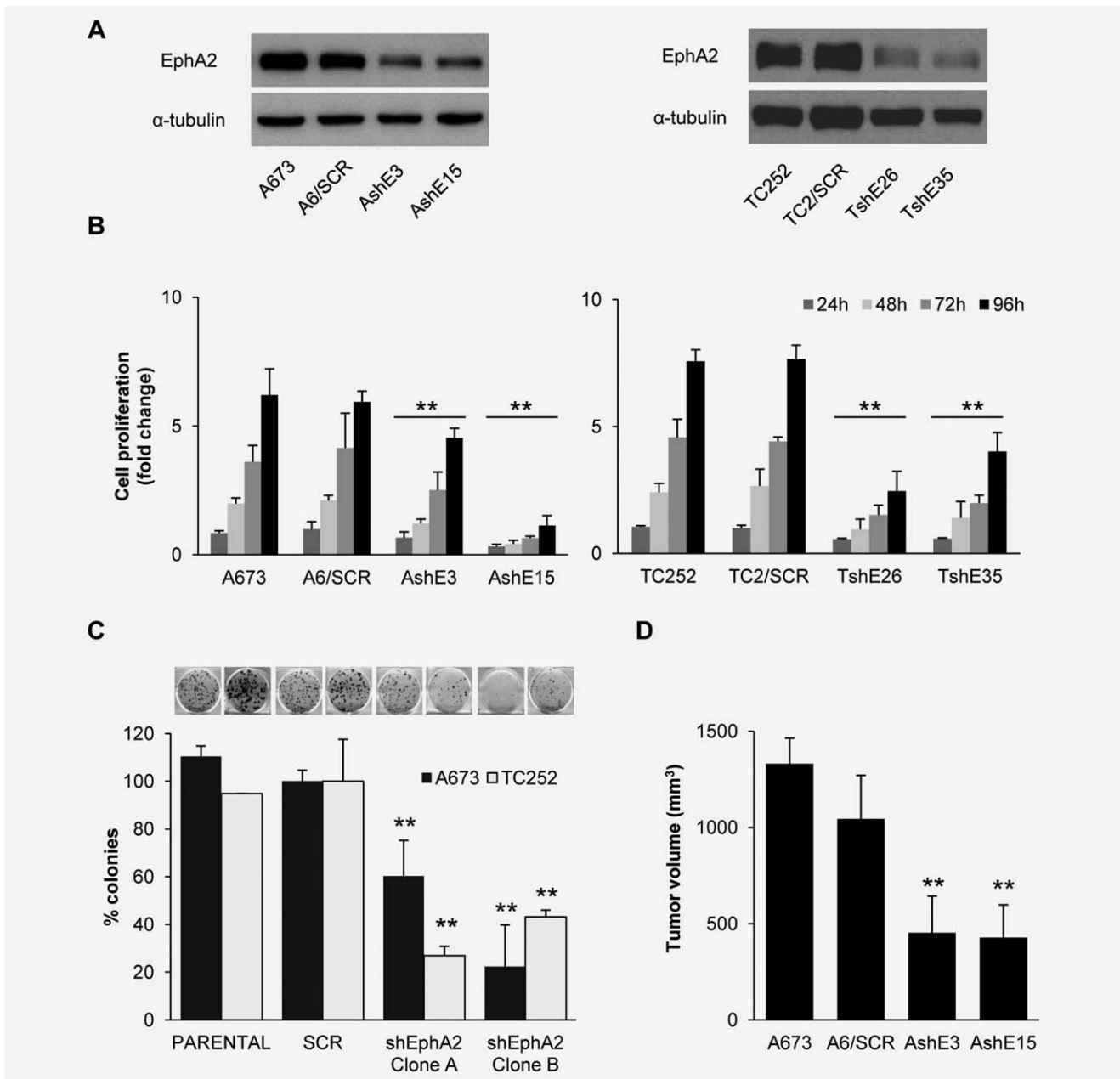


Figure 3. EphA2 knockdown reduces ES cell viability. (a) Representative western blot showing EphA2 expression in silencing models generated from A673 and TC252 cell lines. (b) Proliferation assay using the WST1 tetrazolium-based assay. (c) Quantification of clonogenic assay. Representative images are shown above the bars. "Clone A" and "B" denote clones AshE3 and TshE26 and AshE15 and TshE35, respectively. (d) *In vivo* tumor growth in immunodepressed mice after subcutaneous injection of cells. Tumor size at the time of euthanasia is shown; $n = 8$. SCR = control scrambled sequence. AshE#/TshE# = EphA2 silenced selected clones. Data are presented as means \pm SD. Statistical significance was achieved by the Student's *t*-test from at least three different experiments: $**p \leq 0.01$.

EphA2 ligand-independent signaling induces a reciprocal regulatory feedback loop involving the ERK signaling pathway

The EphA2 receptor, through its ligand-independent signaling, induces a reciprocal regulatory feedback loop involving the Akt kinase. This loop leads to a tumor progressive phenotype due to activation of the RAS/ERK and PI₃K/Akt signaling pathways.⁸ To test whether this was the case in our model, we screened for changes in either Akt or ERK kinase

pathway after EphA2 knockdown. Results showed that Akt expression was altered and so its phosphorylation. However, in the case of ERK, only the phosphorylation was affected by the loss of EphA2 (Fig. 5a). To verify the possibility of a reciprocal regulatory feedback loop involving ERK and/or Akt kinases, we treated A673 and TC252 cells with two MEK inhibitors (known for decreasing ERK phosphorylation, U0126 and Trametinib) and two Akt inhibitors (MK-2206 and BKM120). Inhibition of the MAPK pathway by both

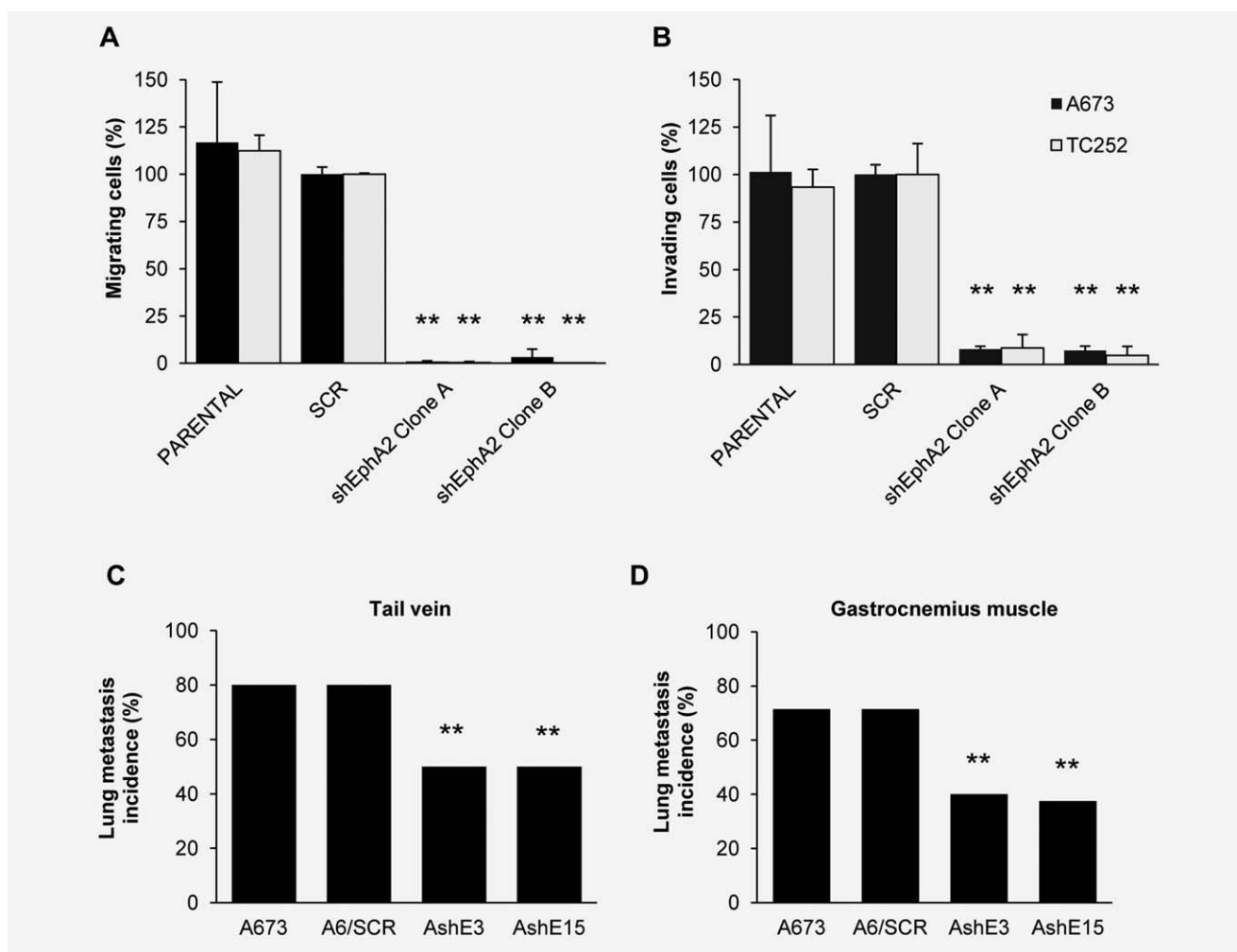


Figure 4. EphA2 knockdown reduces ES cells motility. (a) Migration assay in Boyden chambers using EphA2 silenced models. “Clone A” and “B” denote clones AshE3 and TshE26 and AshE15 and TshE35, respectively. SCR models were set as reference. (b) Invasion assay in Matrigel-coated Boyden chambers using EphA2 silenced models. “Clone A” and “B” denote clones AshE3 and TshE26 and AshE15 and TshE35, respectively. SCR models were set as reference. (c) Lung metastasis incidence in immunodepressed mice after tail-vein injection of control or EphA2 silenced A673 cells; $n = 10$. (d) Lung metastasis incidence in immunodepressed mice after injection of tumor cells in the gastrocnemius; $n = 7$. SCR = control scrambled sequence. Data are presented as means \pm SD. Statistical significance was achieved by the Student’s t -test from at least three different experiments. Fisher’s exact test was used for evaluating differences in lung metastasis incidence in mice: $**p \leq 0.01$.

inhibitors greatly reduced the phosphorylation of EphA2 at S897 (Figs. 5b and 5c). In contrast, only in TC252 some effect was observed in cells treated with BKM120 (Supporting Information Figs. S5a and S5b). In addition, only REph WT cells exhibited an increase in ERK phosphorylation (Fig. 5d) that correlated with their augmented aggressive behavior depicted in Figure 1. No such clear increase was observed in AKT phosphorylation (Supporting Information Fig. S5c). Moreover, Trametinib treatment abrogates both motility and invasive capacity either in EphA2 naturally expressing cell lines (Figs. 5e and 5f) or in the EphA2 knock-in RH1 model (Figs. 5g and 5h). Taken together, these results strongly suggest the presence of a relevant reciprocal regulatory loop between EphA2 and ERK, with non-ligated EphA2 functioning as a downstream substrate and effector of ERK kinase.

Microarray analysis confirms an implication of EphA2 in cell signaling, cellular movement and survival

To gain insight into the molecular mechanism of EphA2-mediated tumorigenesis and metastasis, we identified EphA2 regulated genes by microarray profiling comparing A673 and TC252 control cells with EphA2 silenced cells (Fig. 6a). Sixty genes that commonly overlapped between both cell lines were differently expressed in EphA2 silenced cells (Fig. 6b and Supporting Information Table S1). To test whether EphA2 silencing *in silico* reproduces the phenotypic effects on motility and invasion, we used gene set enrichment analysis (GSEA). Genes that positively correlated with metastasis were associated with EphA2 expression (Fig. 6c). Of note, a strong correlation with EGFR signaling was observed (Supporting Information Fig. S6), suggesting a

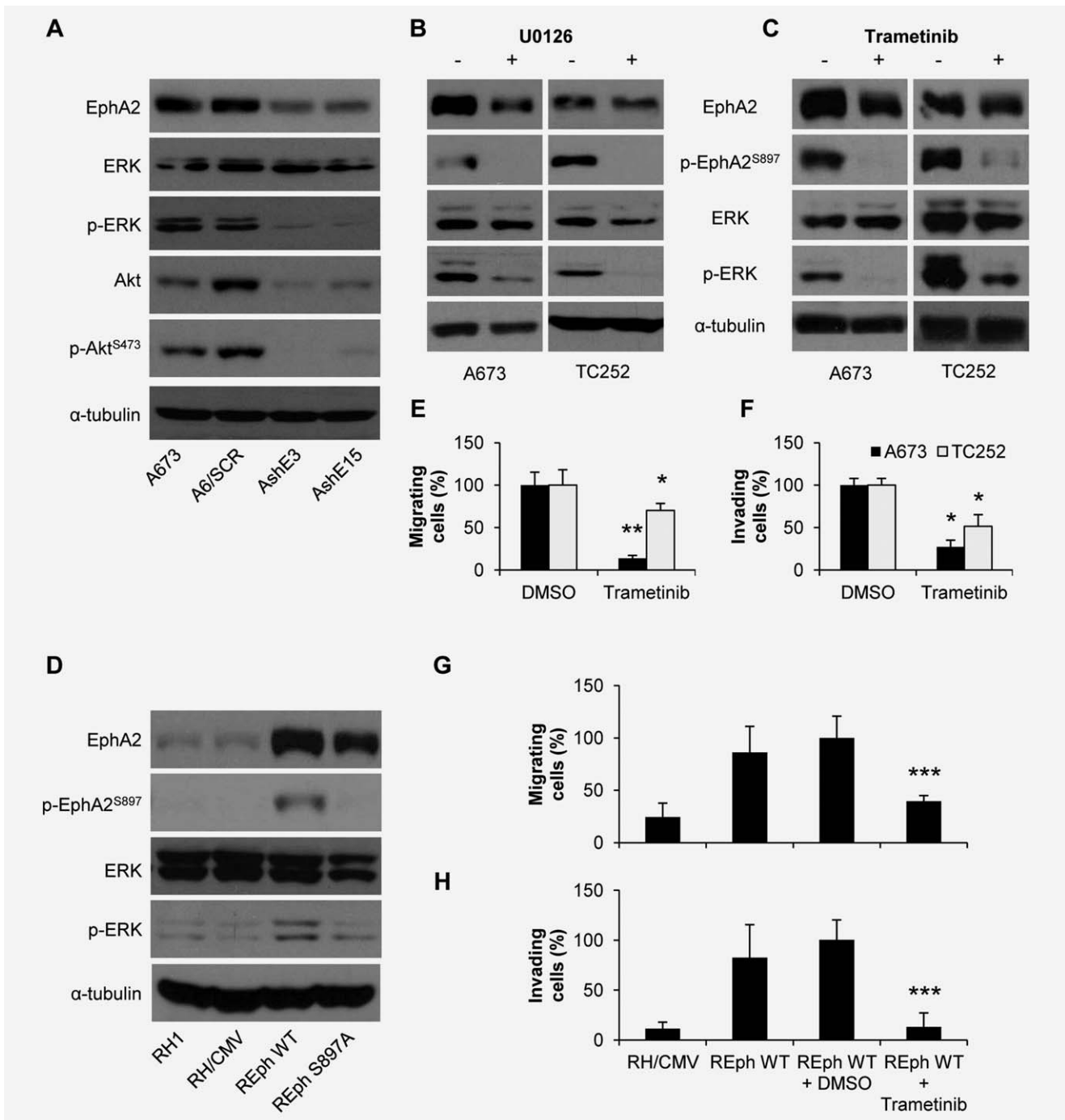


Figure 5. EphA2 has a reciprocal regulatory phosphorylation feed-back loop with ERK, independent of the presence of the ligand. (a) Representative western blot showing ERK, p-ERK, Akt and p-Akt^{S473} levels in EphA2 silenced clones of the A673 cell line. SCR = control scrambled sequence. AshE#/TshE# = EphA2 silenced selected clones. (b and c) Representative western blots showing EphA2 and p-EphA2^{S897} levels after U0126 (b) and Trametinib (c) treatments in A673 and TC252 cell lines. Phosphorylation of ERK (b and c) is shown as a control of treatment efficiency. (d) Representative western blot showing EphA2, p-EphA2^{S897}, ERK and p-ERK in the RH1 reintroduction model. CMV = empty vector. (e) Migration assay in Boyden chambers for A673 and TC252 cell lines after 50 nM Trametinib treatment. DMSO (vehicle) conditions were set as reference. (f) Invasion assay in Matrigel-coated Boyden chambers for A673 and TC252 cell lines after 50 nM Trametinib treatment. DMSO (vehicle) conditions were set as reference. (g) Migration assay in Boyden chambers in the RH1 EphA2 reintroduction model. REphWT plus DMSO (vehicle) condition was set as reference. (h) Invasion assay in Matrigel-coated Boyden chambers in the RH1 EphA2 reintroduction model. REphWT plus DMSO (vehicle) condition was set as reference. Data are presented as means ± SD. Statistical significance was achieved by the Student's *t*-test from at least three different experiments. Fisher's exact test was used for evaluating differences in lung metastasis incidence in mice: **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001.

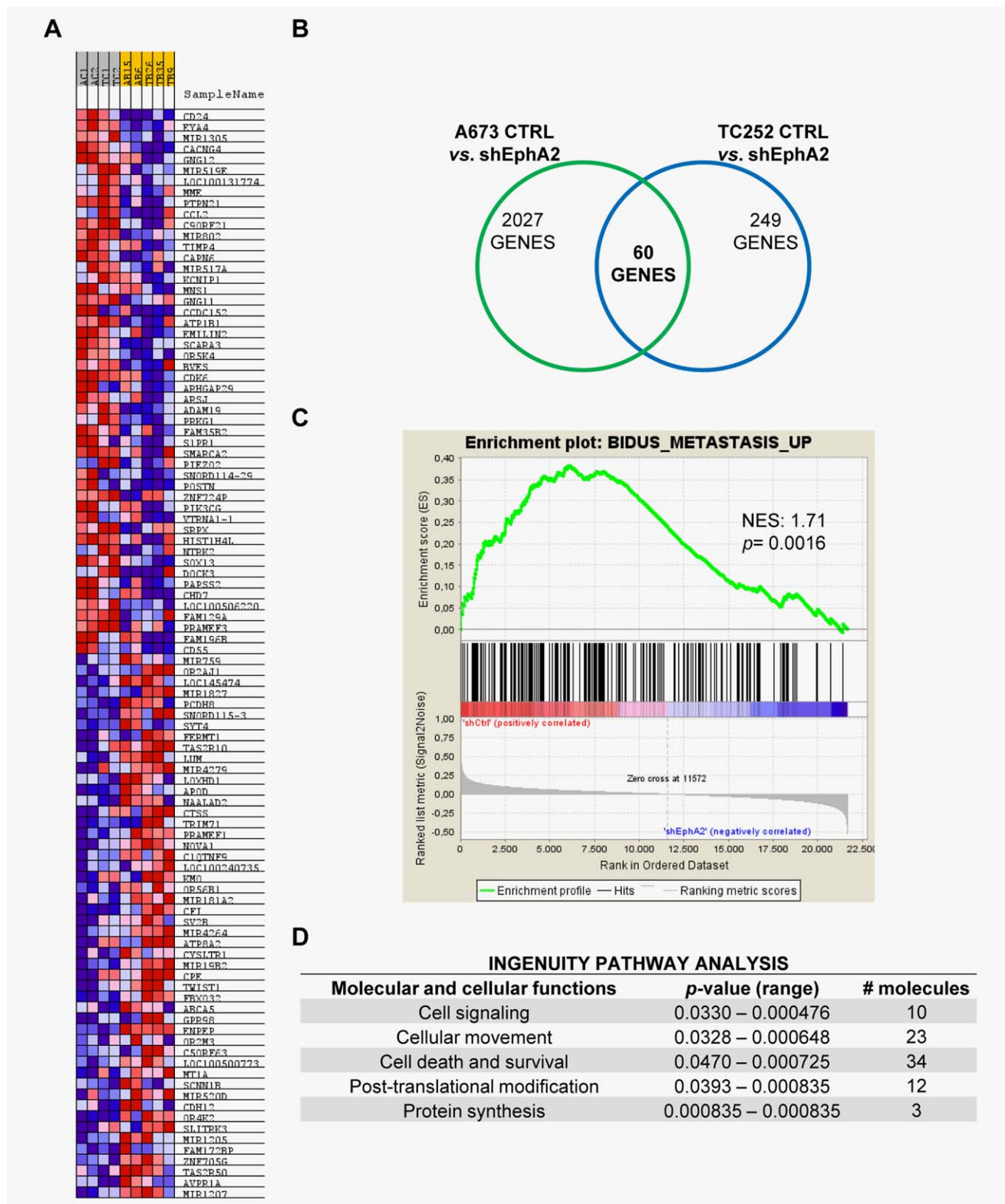


Figure 6. EphA2 participates in several regulatory pathways linked to metastasis. (a) Heatmap of upregulated (red) and downregulated (blue) genes in control cells vs. EphA2 silenced cells. (b) Venn Diagram showing the number of common genes differentially expressed after EphA2 knockdown in A673 and TC252 cell lines. (c) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showing a correlation between genes differentially expressed after EphA2 silencing and those involved in metastasis. NES = Normalized Enrichment Score. (d) Ingenuity pathway analysis showing cellular processes significantly altered by EphA2 knockdown. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

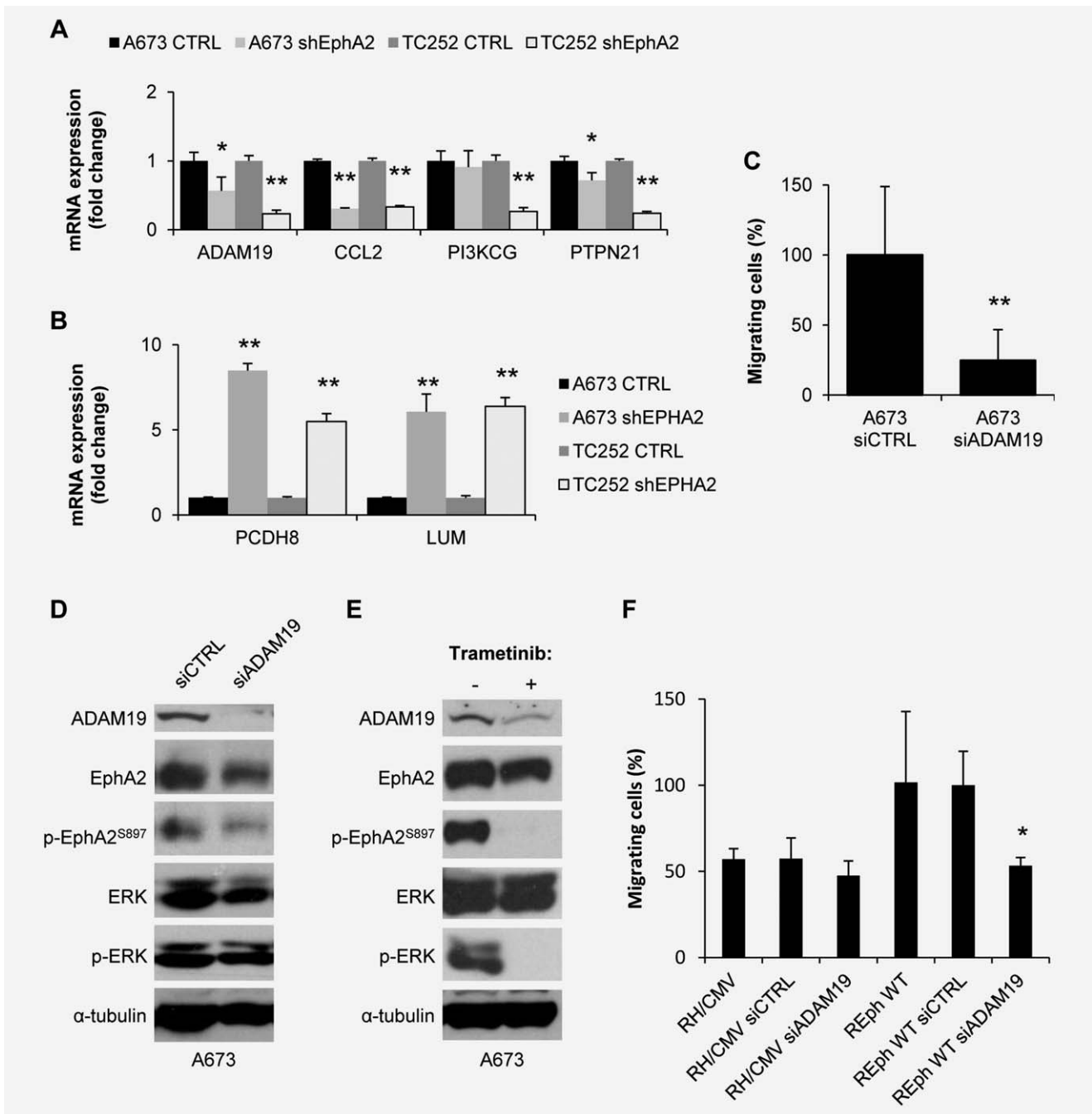


Figure 7. ADAM19 participates in the migratory behavior induced by EphA2 in ES cells. (a and b) Validation of upregulated (a) and downregulated (b) targets after EphA2 silencing by RT-qPCR in A673 and TC252 models. CTRL represents the mean from both the parental and the control vector transfected pool. shEphA2 represents the mean from the two representative clones employed through the previous experiments. (c) Migration assay in Boyden chambers after ADAM19 silencing in A673 cell line. siCTRL (= non-targeting siRNA) was set as reference. (d) Representative western blot showing ADAM19 expression and phosphorylation of EphA2 and ERK after siRNA silencing in A673 cell line. siCTRL = non-targeting siRNA. (e) Representative western blot showing ADAM19 expression and EphA2 phosphorylation after treatment with 50 nM Trametinib in the A673 cell line. ERK and p-ERK are shown as treatment efficiency controls. (f) Migration assay in Boyden chambers after ADAM19 silencing in RH1 EphA2 reintroduction model. REphWT plus siCTRL (= non-targeting siRNA) was set as reference. Data are presented as means \pm SD. Statistical significance was achieved by the Student's *t*-test from at least three different experiments: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

possible crosstalk between the EphA2 and EGFR pathways. By using another network/pathway enrichment analysis, the Ingenuity Pathway Analysis (IPA), we observed that genes

downregulated after EphA2 inhibition were mainly enriched in cell signaling, cellular movement and survival categories (Fig. 6d).

We validated a subset of these genes with quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) following EphA2 knockdown (Figs. 7a and 7b). This gene set included four downregulated genes (*CCL2*, *ADAM19*, *PIK3CG* and *PTPN21*) and 2 upregulated genes (*PCDH8* and *LUM*). We focused our attention on the metalloproteinase disintegrin, ADAM19, which is associated with invasiveness in several types of cancer and has not been studied in ES. ADAM19 knockdown by siRNA technology strongly reproduced the negative effects on cell migration observed after EphA2 silencing in A673 cells (Fig. 7c and Supporting Information Fig. S7a) but it had no significant effects on ERK and EphA2 phosphorylation (Fig. 7d). However, inhibition of the MAPK pathway by Trametinib resulted in ADAM19 downregulation in A673 cells (Fig. 7e and Supporting Information Fig. S7b). Furthermore, ADAM19 knockdown also reversed the aggressive phenotype induced by wild type EphA2 in the RH1 model (Fig. 7f and Supporting Information Fig. S7c). Again, this phenotype occurs without changes on ERK and EphA2 phosphorylation. Taking together, these results suggest that ADAM19 is critical for Ewing sarcoma aggressiveness and that EphA2 promotes its expression through MAPK signaling.

Discussion

Our study demonstrates that EphA2-expressing cells are essential for tumor propagation in ES, highlighting the importance of ligand-independent kinase activity of EphA2 in this process. Interestingly, our findings also indicate that EphA2 is reciprocally regulated by a feedback loop involving the ERK signaling pathway. The involvement of ERK in this feedback loop is novel and relevant to sarcomas. Transcriptome profiling revealed that EphA2 signaling activates a specific subset of genes that promote cell migration. EphA2 downregulation leads to a significant delay in ES onset and progression. Altogether, our findings suggest a rationale for inhibiting EphA2 expression and/or activity to block ES growth and migration. Our data represent a proof of principle for targeting EphA2-expressing cells for anti-metastatic therapy.

RTKs are known as key regulators of cancer cell proliferation, migration, invasion and metastatic spread. Ligand-binding to the extracellular domain triggers canonical activation of the intracellular tyrosine-kinase domain. In contrast, it has become evident that RTKs are also regulated by non-canonical tyrosine-kinase independent mechanisms via phosphorylation of their serine/threonine residues.²⁴ Here, we report, for the first time, the ligand-independent function of the EphA2 receptor during ES tumor progression. Indeed, ES cells with a more aggressive nature showed higher levels of EphA2 phosphorylation on S897 under the same culture conditions. Moreover, exogenous introduction of a wild type EphA2 construct, but not a S897A mutant, into low expressing cells increased their malignant phenotype. This phosphorylation site has been directly associated with aggressive

progression in other cancer types^{7,8,25} and is phosphorylated by activation of either the MAPK or Akt signaling pathway.⁸ In our models, EphA2 phosphorylation on S897 depends mostly on the MEK/ERK pathway as only MEK inhibitors were able to greatly block phosphorylation on this site. To further demonstrate the role of EphA2 in ES tumor progression, we established a low expressing model in two ES cell lines (A673 and TC252). Although widely affecting the behavior of ES cells, EphA2 silencing affected more prominently migration and invasion *in vitro* and tumor growth and metastasis spread *in vivo*. Consistently, the most relevant effect associated with the tumor progression properties of EphA2 in cancer cells is higher metastatic capacity.²⁶ Furthermore, this trait has been linked to the ligand-independent activity associated with p-EphA2^{S897}.⁷ Interestingly, EphA2 silencing in ES cells resulted in the dephosphorylation of ERK1/2, suggesting the existence of a reciprocal regulatory feed-back loop involving the ERK signaling pathway. We recently showed that MAPK signaling is important for the migration of ES cells in a model linking CAV1 expression and phosphorylation of ERK1/2.¹² Here, p-EphA2^{S897} was significantly reduced in CAV1-silenced models underscoring the relationship between these proteins in the progression of ES.

To gain insights into the molecular mechanisms related to the EphA2 properties during ES progression, we performed expression arrays comparing EphA2 high expressing cells with EphA2 silenced cells. GSEA showed a strong correlation between EphA2 and EGFR signaling pathways, consistent with several studies that indicated a relationship between these two pathways in which EphA2 promotes survival of cancer cells resistant to EGFR inhibition.^{27,28} There is no data about EGFR signaling during the progression of ES. Nevertheless, ErbB4, a member of the epidermal growth factor receptor subfamily, confers metastatic capacity to ES cells.^{29,30} Therefore, one could speculate that a crosstalk exists between EphA2 and ErbB4 during the progression of ES. GSEA and IPA also confirmed a correlation between EphA2 and molecular traits related to metastasis progression. One of the top processes detected in the IPA was axonal guidance. The axonal guidance pathway plays an important role in neuronal extension and location during embryo development.³¹ Recently, accumulating evidence indicates that the axonal guidance pathway is also involved in tumor development and progression by regulating tumor cell migration, cell death and angiogenesis in various cancers.³²

Of a common set of 60 genes, we selected 6 of them for validation purposes. Four genes (*CCL2*, *ADAM19*, *PIK3CG* and *PTPN21*), associated with tumor progression, were downregulated in EphA2 silenced cells, and 2 genes (*PCDH8* and *LUM*), considered as tumor suppressors, were upregulated in EphA2 silenced cells. PCDH8 is a member of the cadherin family and is known to function as a candidate tumor suppressor, which is inactivated in many cancers.^{33,34} LUM is a member of the small leucine-rich proteoglycan

(SLRP) family and significantly decreases cell migration, invasion and anchorage-independent growth *in vitro* and metastasis *in vivo*.³⁵ CCL2 is an inflammatory chemokine closely connected with tumor associated macrophage (TAM) infiltration and cancer progression. CCL2 is overexpressed in various cancer types such as lung, breast and prostate cancer.³⁶ CCL2 secreted by tumor cells can recruit monocytes and TAMs. These tumor-infiltrating inflammatory cells form a tumor-protective microenvironment, thus enhancing tumor growth and metastasis. PIK3CG and PTPN21 are cell signaling-associated proteins with roles in tumor progression.^{37,38} We focused on ADAM19, a member of the disintegrin and metalloproteinase family of proteins (ADAMs), which are involved in various biological functions such as fertilization, embryonic development, cell adhesion, cell migration, cell signaling, proteolytic shedding and proteolysis.³⁹ Loss of function experiments demonstrated that ADAM19 knockdown reproduced the effects of EphA2 silencing on cell migration but not on cellular signaling. Our results suggest that ADAM19 participates in the metastatic progression of ES and is a downstream effector of the EphA2 ligand-independent signaling. In fact, deregulation of many ADAM proteins has been observed in the regulation of growth factor activities and integrin functions, leading to the promotion of cell growth and invasion in human tumors.⁴⁰

Our data suggest that EphA2 expression is necessary for ES metastatic spread. Interestingly, we demonstrated that EphA2 function is mediated via its ligand-independent kinase activity and that EphA2 is mostly reciprocally regulated by a feedback loop involving the ERK signaling pathway. Although, in our study, we focused on demonstrating that ADAM19 is a downstream effector of the EphA2 ligand-independent signaling in the metastatic progression of ES, we cannot disregard the involvement of other genes identified in

the EphA2-dependent GSEA dataset. In fact, our data suggest a crosstalk between EphA2 and EGFR signaling pathways. In addition, CCL2 might be critical for promoting an ideal niche for metastatic progression. These results highlight the need for additional studies to ascertain the contribution of CCL2 in the metastatic process using humanized models and suggest the potential role of the immune system in metastatic progression. These findings suggest targeting of EphA2 and EphA2-mediated events as novel targets for ES therapy, opening an opportunity to test EphA2 small molecule agonists⁴¹ alone or in combination with either antiangiogenic agents or targeted therapy against EGFR-related components overexpressed in the most aggressive forms of ES.

Acknowledgements

The authors thank Giselle Blanco for her assistance editing the manuscript.

Author Contributions

OMT conceived and supervised the study. SG-M designed and performed the main experiments and coordinated the data analysis. SG-M and RL-A conceived and developed the orthotopic metastasis model. RL-A, OA-R, DH-M, JH-M, LL-T, PA-P and SR-V contributed to the design and conduct of experiments. LH-P and EdA provided the TMA and contributed to the analysis. JM and EdA provided expertise and feedback. SG-M, SR-V, PHG and OMT wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Availability of Data and Material

Additional data are presented as Supplementary Figures and Spreadsheets. The datasets supporting the conclusions of this article are available in the GEO repository; accessible as GSE106480.

References

- Williams RF, Fernandez-Pineda I, Gosain A. Pediatric Sarcomas. *Surg Clin North Am* 2016;96:1107–25.
- Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin–Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:240–56.
- Shiuan E, Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in tumor immunity. *Cancer Res* 2016;76:6452–7.
- Heinzlmeir S, Kudlinzki D, Sreeramulu S, et al. Chemical proteomics and structural biology define EPHA2 inhibition by clinical kinase drugs. *ACS Chem Biol* 2016;11:3400–11.
- Sáinz-Jaspeado M, Huertas-Martínez J, Lagares-Tena L, et al. EphA2-induced angiogenesis in Ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent on caveolin-1. *PLoS One* 2013;8:e71449.
- van der Schaft DWJ, Hillen F, Pauwels P, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005;65:11520–8.
- Paraiso KHT, Thakur MD, Fang B, et al. Ligand-independent EPHA2 signaling drives the adoption of a targeted therapy-mediated metastatic melanoma phenotype. *Cancer Discov* 2015;5:264–73.
- Miao H, Li D-Q, Mukherjee A, 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* 2009;16:9–20.
- Taddei ML, Parri M, Angelucci A, et al. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* 2009;174:1492–503.
- Núñez-Wehinger S, Ortiz RJ, Díaz N, et al. Caveolin-1 in cell migration and metastasis. *Curr Mol Med* 2014;14:255–74.
- Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, et al. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res* 2010;8:1489–500.
- Lagares-Tena L, García-Monclús S, López-Alemán R, et al. Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway. *Oncotarget* 2016;7:56889–903.
- Huertas-Martínez J, Court F, Rello-Varona S, 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* 2017;386:196–207.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e15.
- Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:1. Article 3.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 1995;57:289–300.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545–50.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately

- downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003;34:267–73.
19. Bengtsson H, Simpson K, Bullard J, et al. aroma. affymetrix: a generic framework in R for analyzing small to very large Affymetrix data sets in bounded memory. Tech Report #745, Department of Statistics, University of California, Berkeley, February 2008. <http://statistics.berkeley.edu/tech-reports/745>.
 20. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015;12:115–21.
 21. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47.
 22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
 23. Zhou Y, Yamada N, Tanaka T, et al. Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2. *Nat Commun* 2015;6:7679.
 24. Chen M-K, Hung M-C. Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases. *FEBS J* 2015;282:3693–721.
 25. Tawadros T, Brown MD, Hart CA, et al. Ligand-independent activation of EphA2 by arachidonic acid induces metastasis-like behaviour in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2012;107:1737–44.
 26. Dunne PD, Dasgupta S, Blayney JK, et al. EphA2 expression is a key driver of migration and invasion and a poor prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:230–42.
 27. Amato KR, Wang S, Tan L, et al. EPHA2 blockade overcomes acquired resistance to EGFR kinase inhibitors in lung cancer. *Cancer Res* 2016;76:305–18.
 28. Koch H, Busto MEDC, Kramer K, et al. Chemical proteomics uncovers EPHA2 as a mechanism of acquired resistance to small molecule EGFR kinase inhibition. *J Proteome Res* 2015;14:2617–25.
 29. Kang H-G, Jenabi JM, Zhang J, 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.
 30. Mendoza-Naranjo A, El-Naggar A, Wai DH, et al. ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. *EMBO Mol Med* 2013;5:1087–34.
 31. Nugent AA, Kolpak AL, Engle EC. Human disorders of axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 2012;22:837–43.
 32. Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chédotal A. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 2011;11:188–97.
 33. Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, et al. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2011;30:1390–401.
 34. Yu JS, Koujak S, Nagase S, et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer. *Oncogene* 2008;27:4657–65.
 35. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, et al. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* 2008;60:818–23.
 36. Borsig L, Wolf MJ, Roblek M, et al. Inflammatory chemokines and metastasis – tracing the accessory. *Oncogene* 2014;33:3217–24.
 37. Subramaniam PS, Whye DW, Efimenko E, et al. Targeting nonclassical oncogenes for therapy in T-ALL. *Cancer Cell* 2012;21:459–72.
 38. Warabi M, Nemoto T, Ohashi K, et al. Expression of protein tyrosine phosphatases and its significance in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol* 2000;68:187–95.
 39. Giebler N, Zigrino P. A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. *Toxins (Basel)* 2016;8:122.
 40. Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, et al. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin Cancer Res* 2009;15:1140–4.
 41. Petty A, Idippily N, Bobba V, et al. Design and synthesis of small molecule agonists of EphA2 receptor. *Eur J Med Chem* 2018;143:1261–76.



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.

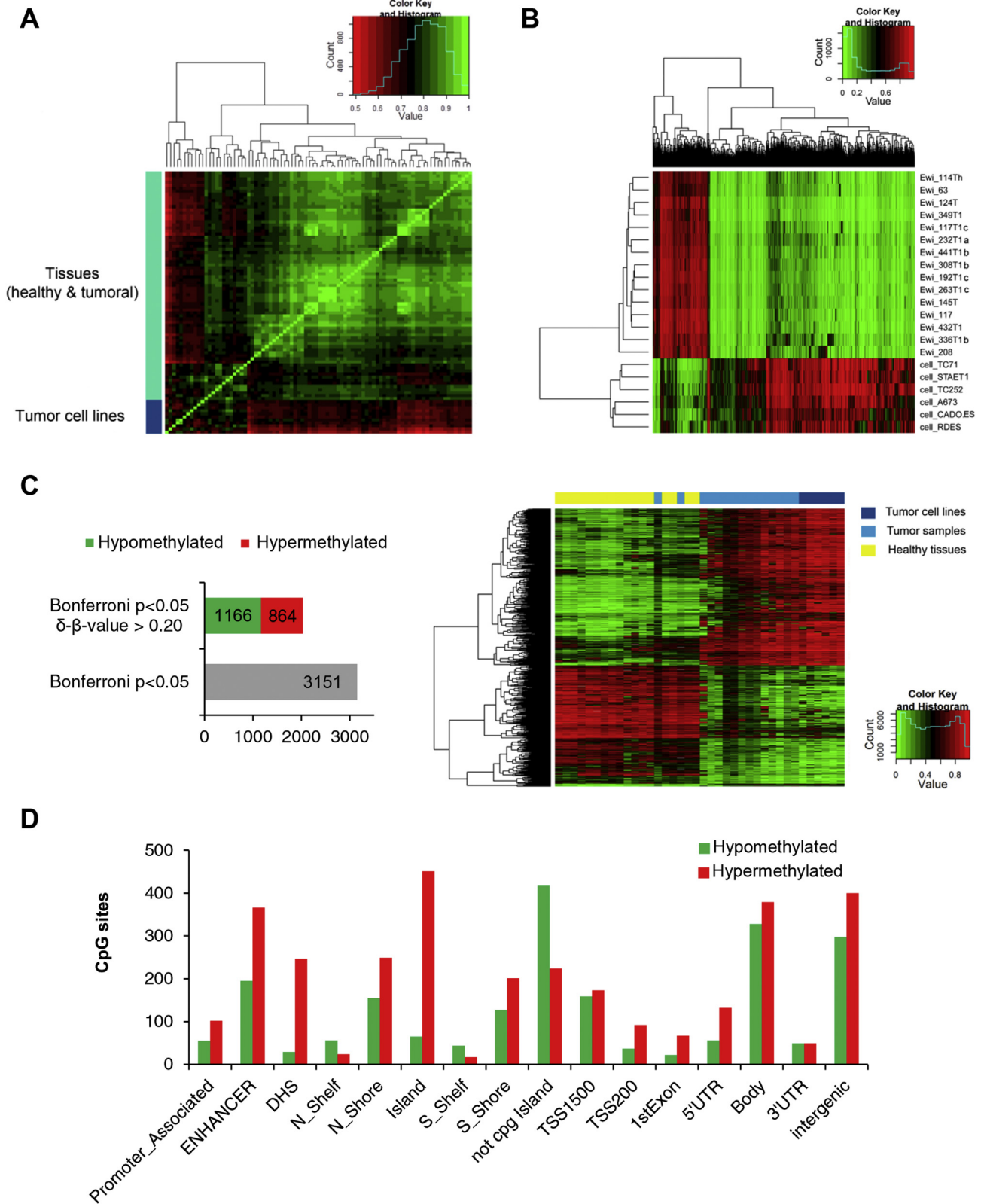
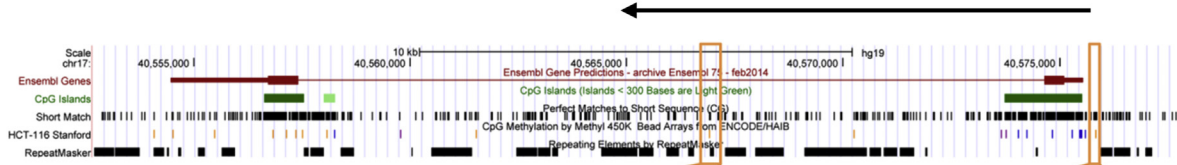
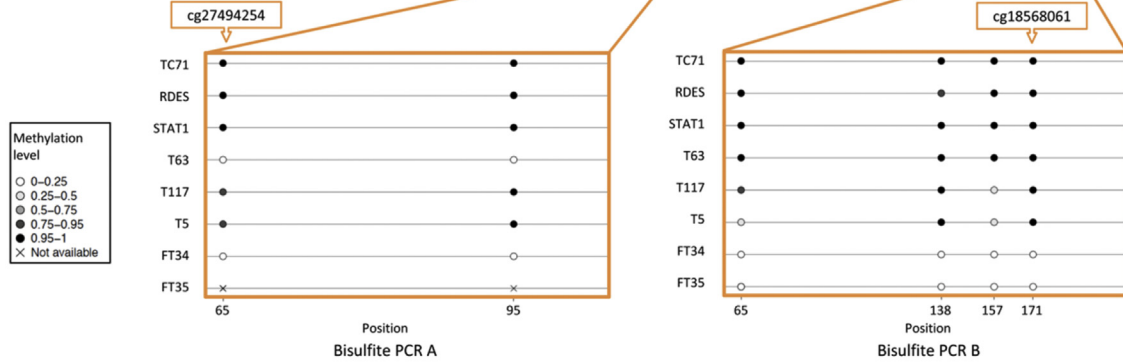


Fig. 1. Methylation profile of ES. (A) Pearson correlation matrix for the methylomes of our samples. (B) Heatmap illustrating the difference of methylation between ES tumors samples and cells. (C) Results for the differential methylation analysis of healthy tissues vs. ES samples (tumor samples and cell 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.

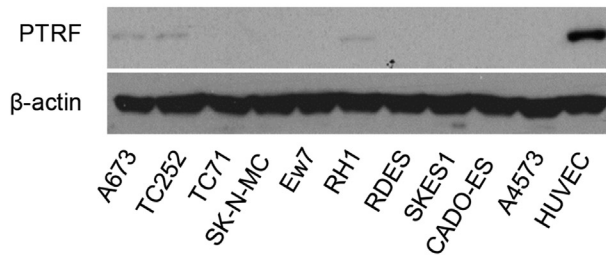
A



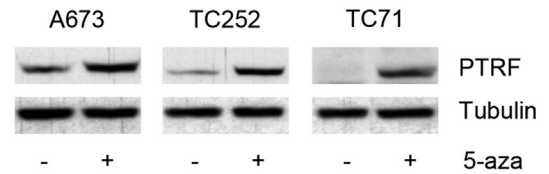
B



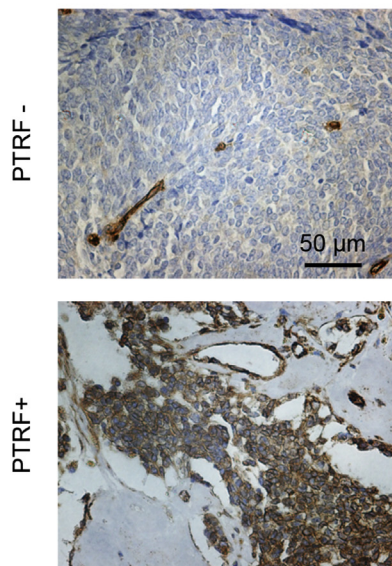
C



D



E



F

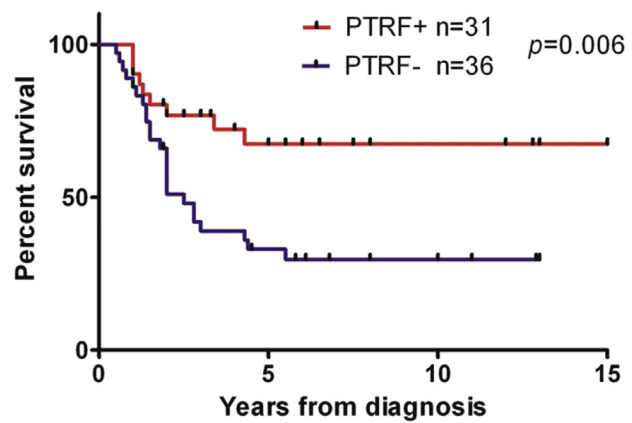


Fig. 2. PTRF repression by methylation is linked to tumorigenicity. (A) Representation of the *PTRF* gene in the UCSC Genome Browser. The tracks indicate the CpG islands, the position of CpG sites (short match) and the location of Infinium 450K methylation arrays probes (HCT-116 Stanford). The boxes 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.

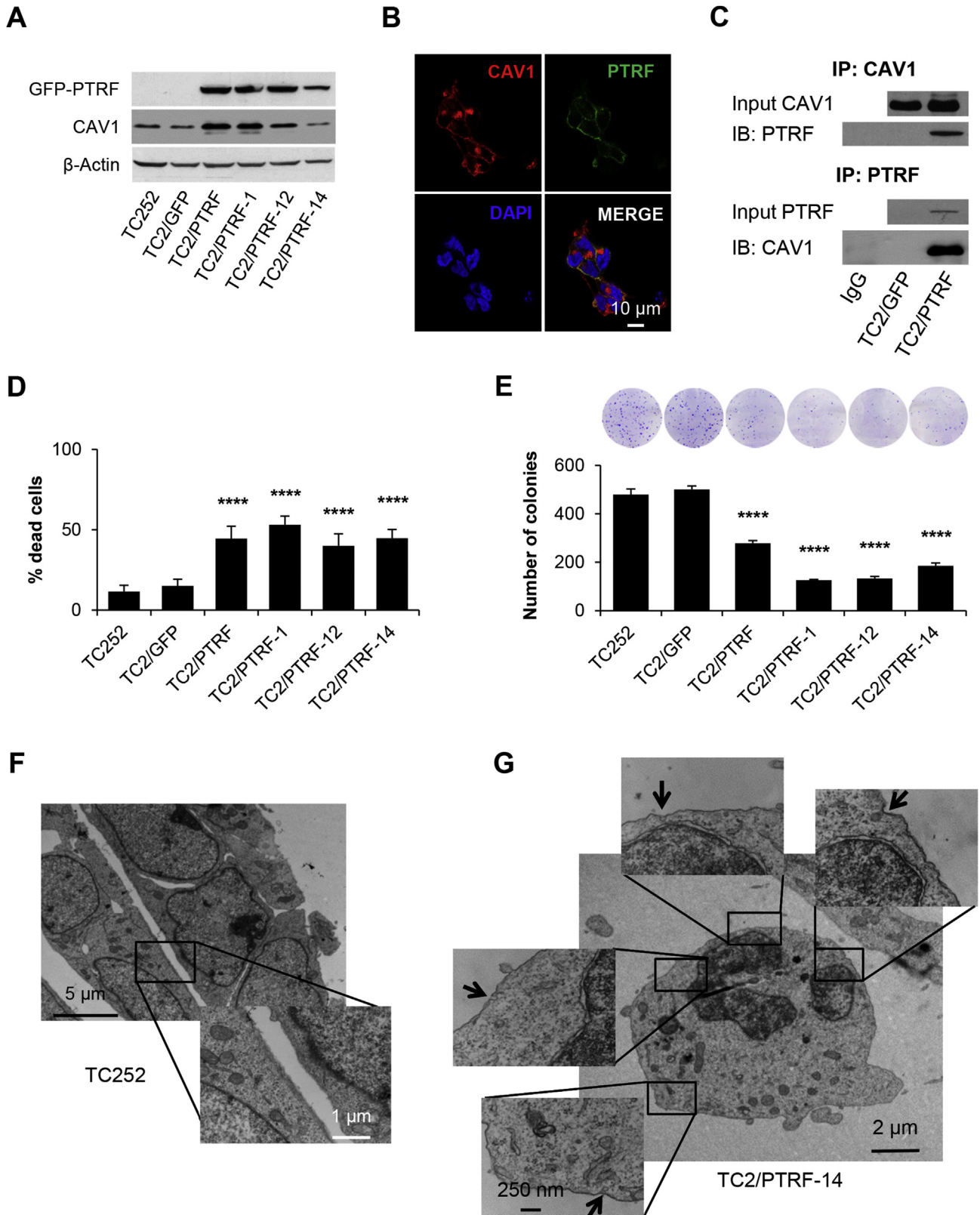


Fig. 3. PTRF re-expression in TC252 decreases cell viability. (A) Immunoblot of cell lysates from TC252 cells stably transfected with GFP-empty vector (TC2/GFP) or GFP-tagged PTRF (TC2/PTRF). Both pool population and selected clones (numbered) are shown. (B) Representative immunofluorescence images of CAV1 (red) on selected clone TC2/PTRF-1, PTRF is labeled in green (GFP). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 10 μm. (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 μm and 1 μm. (G) TEM images from selected clone TC2/PTRF-14. Arrows indicate the presence of caveolae in the plasma membrane. Scale bars, 2 μm and 250 nm. In (D) and (E): mean ± 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.)

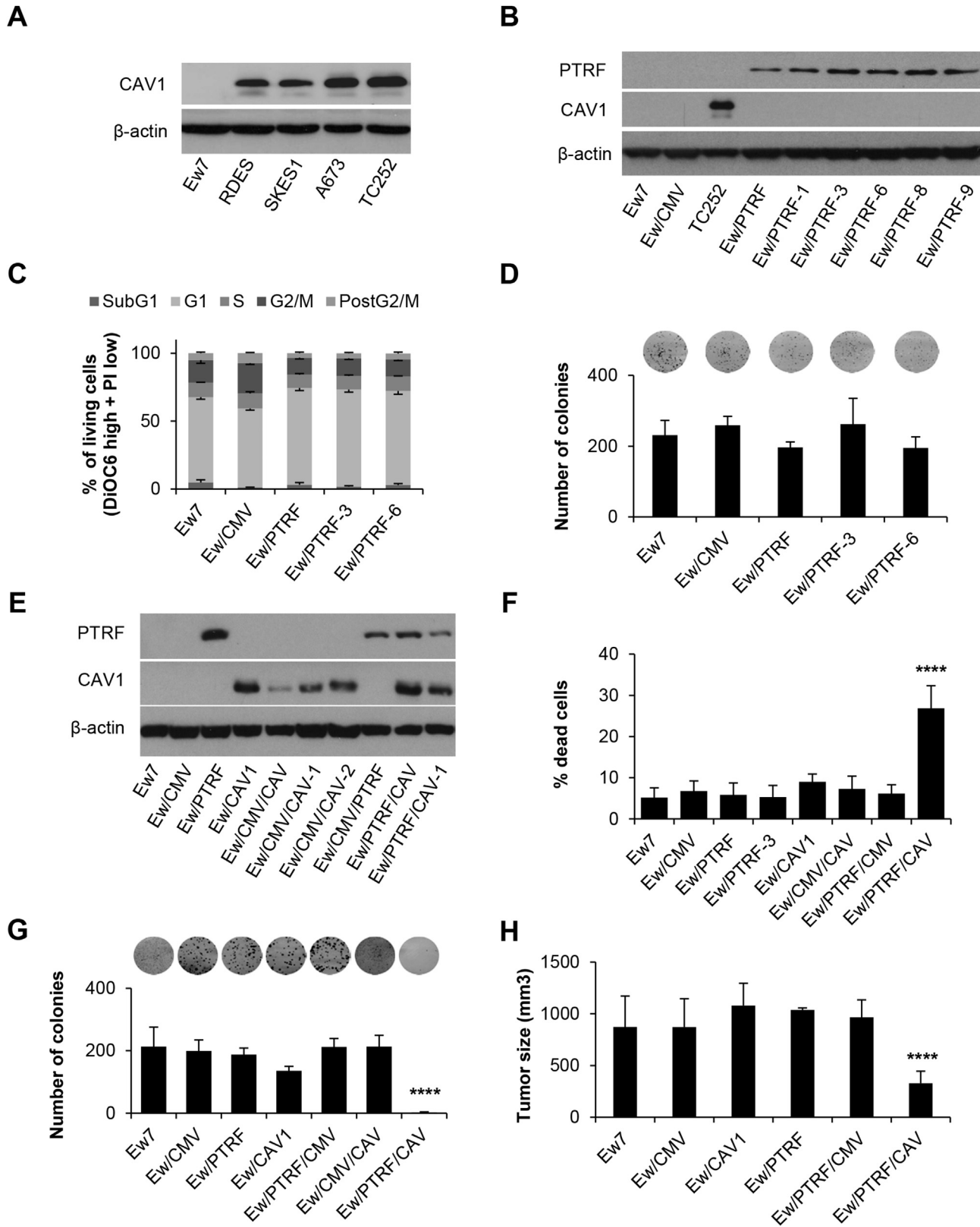


Fig. 4. PTRF induces cell death when co-transfected with CAV1 in Ew7 model. (A) Immunoblots showing CAV1 expression in selected ES cell lines. (B) Ew7 cell line was transfected with the empty-vector (Ew/CMV) or PTRF-expressing vector (Ew/PTRF). Both pool population and selected clones (numbered) are 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.

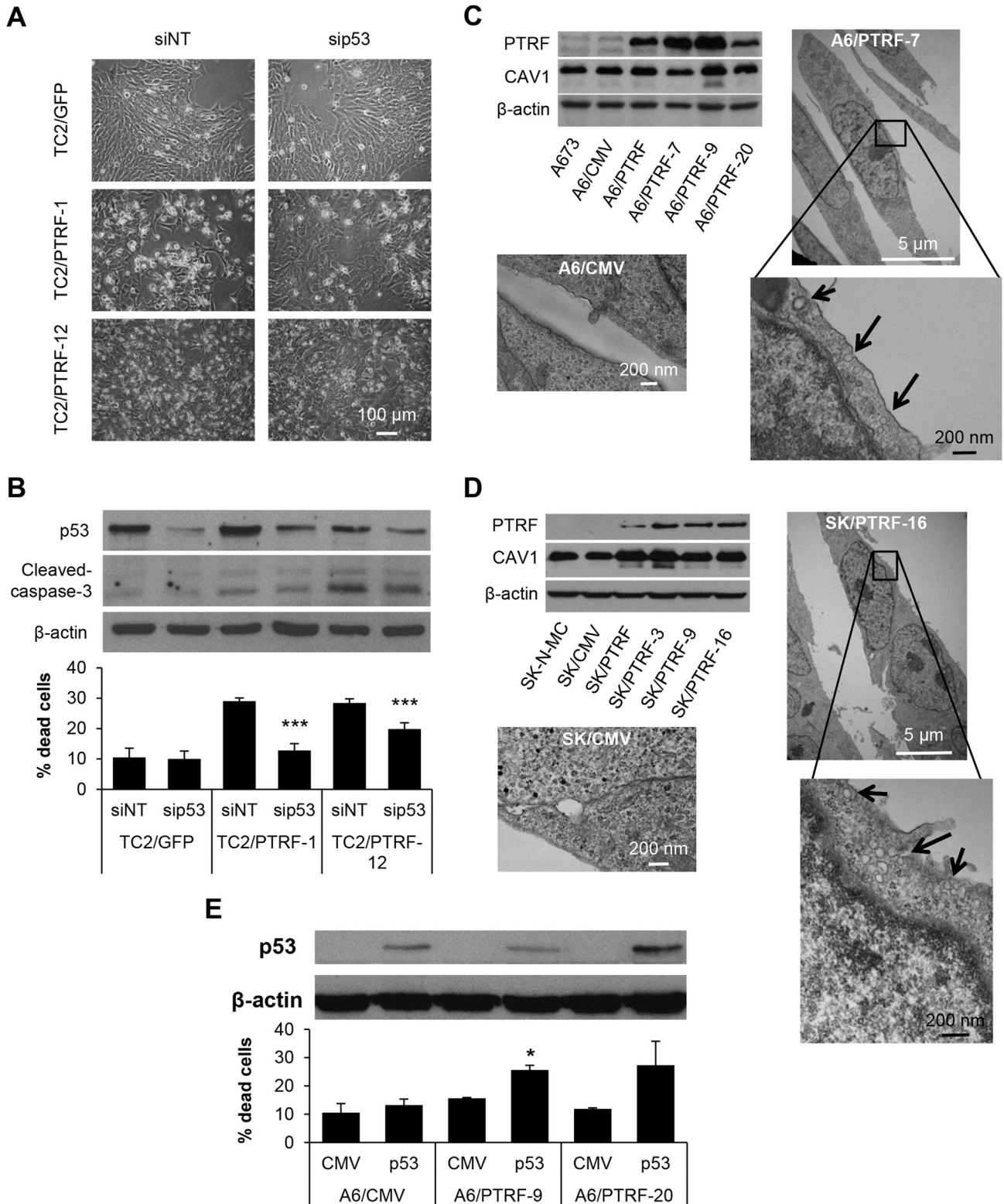


Fig. 5. PTRF promotes p53-dependent cell death. (A and B) TC252 GFP tagged PTRF-expressing model treated either with NT siRNA or *TP53* siRNA: representative images from treatment. Scale bar, 100 μ m; representative immunoblots and trypan blue exclusion assay for cell death quantification. (C) Generation 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 μ m 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 μ m 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 \pm SD. Student's *t* test was used to generate *p* values. The * and *** indicate *p* < 0.05 and *p* \leq 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].

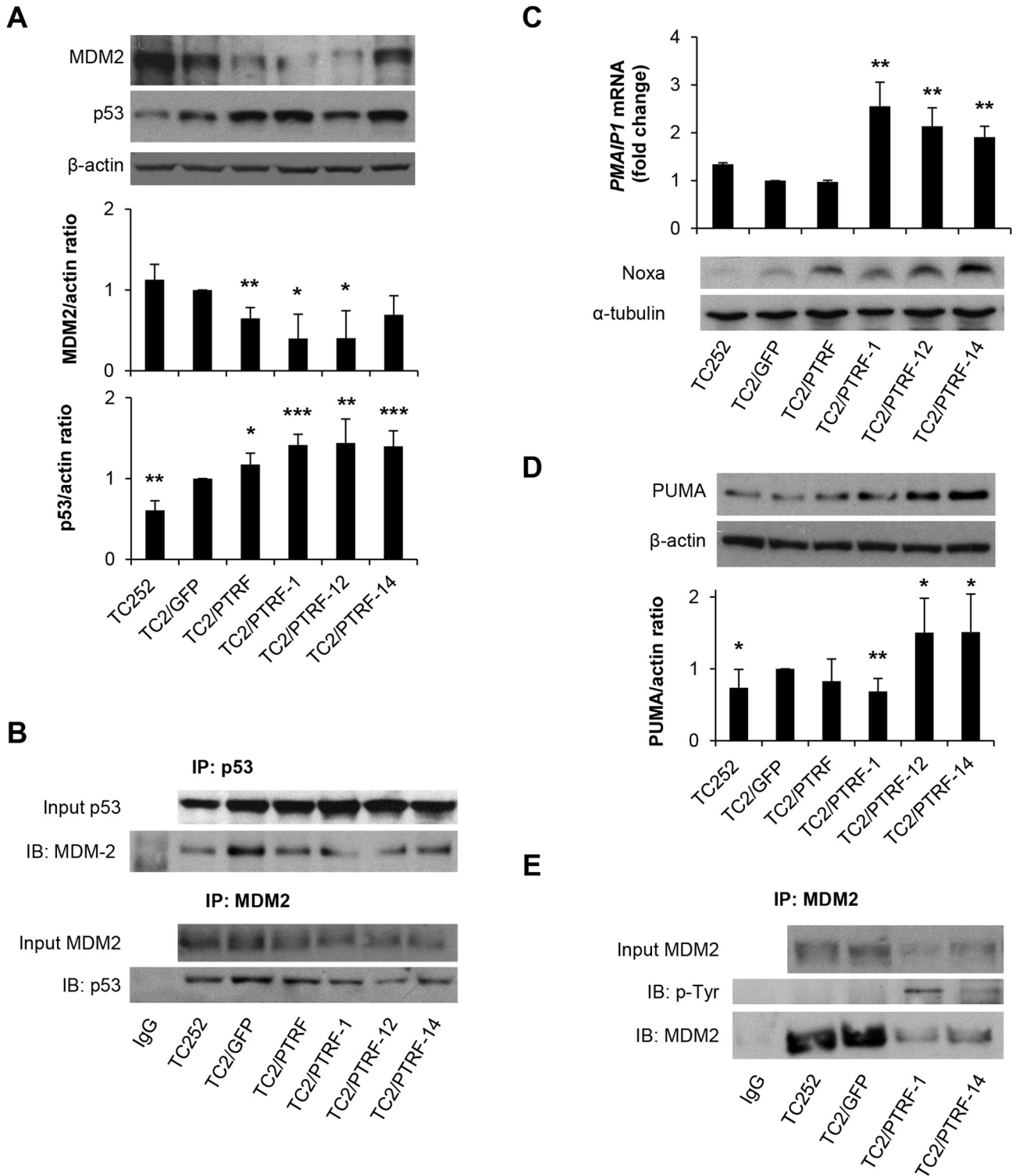


Fig. 6. Caveolae induces phosphorylation of MDM2 leading to p53 activation. (A) Representative immunoblots and quantification from in TC252 GFP tagged PTRF-transfected model cell lysates incubated with MDM2 and p53 antibodies. (B) p53 and MDM2 IP in TC252 GFP tagged PTRF-transfected model, western blot 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

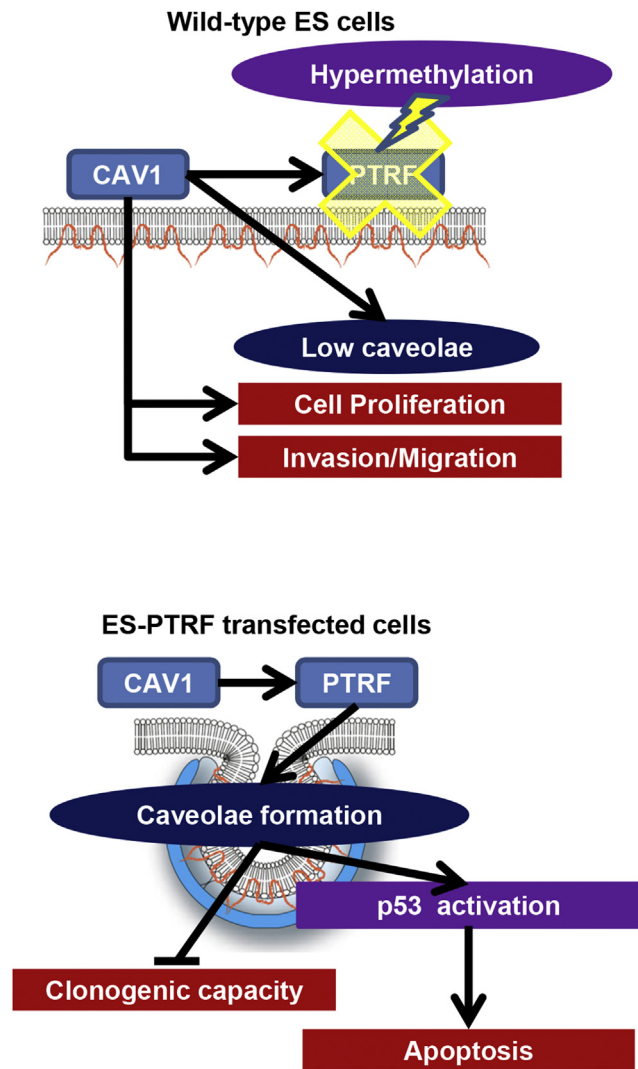


Fig. 7. Graphic summary of experimental conclusions. Caveola and flatten plasma membrane graphics are both adapted from reference [7].

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-Beatriu 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. Diez-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, 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., Tumor 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, Caveolae 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 metalloprotease 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 caveolae 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-Alemaný¹, 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

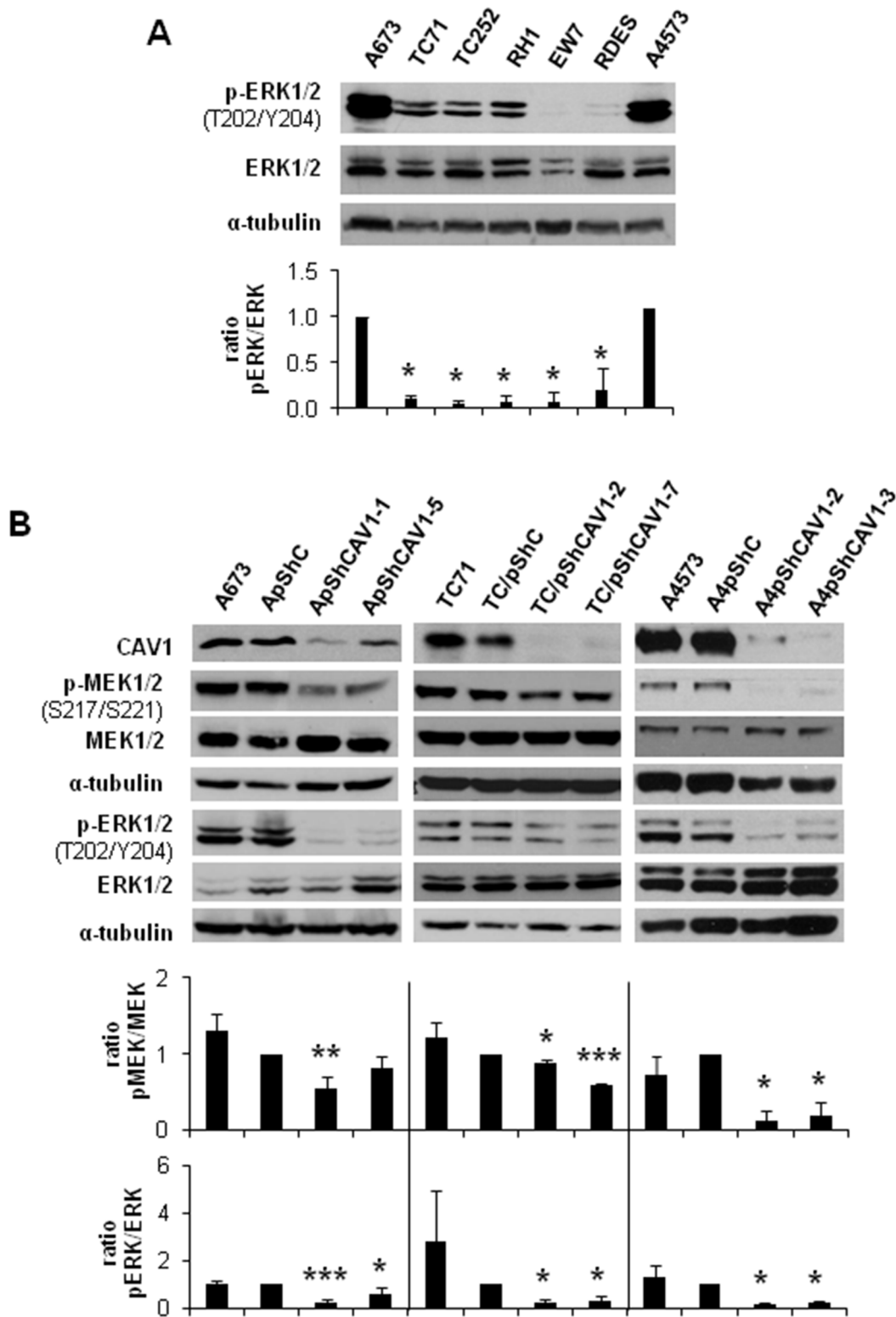


Figure 1: MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation is reduced in CAV1-knockdown cells. A. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of ERK1/2 in different ES cell lines. B. Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in A673, TC71 and A4573 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

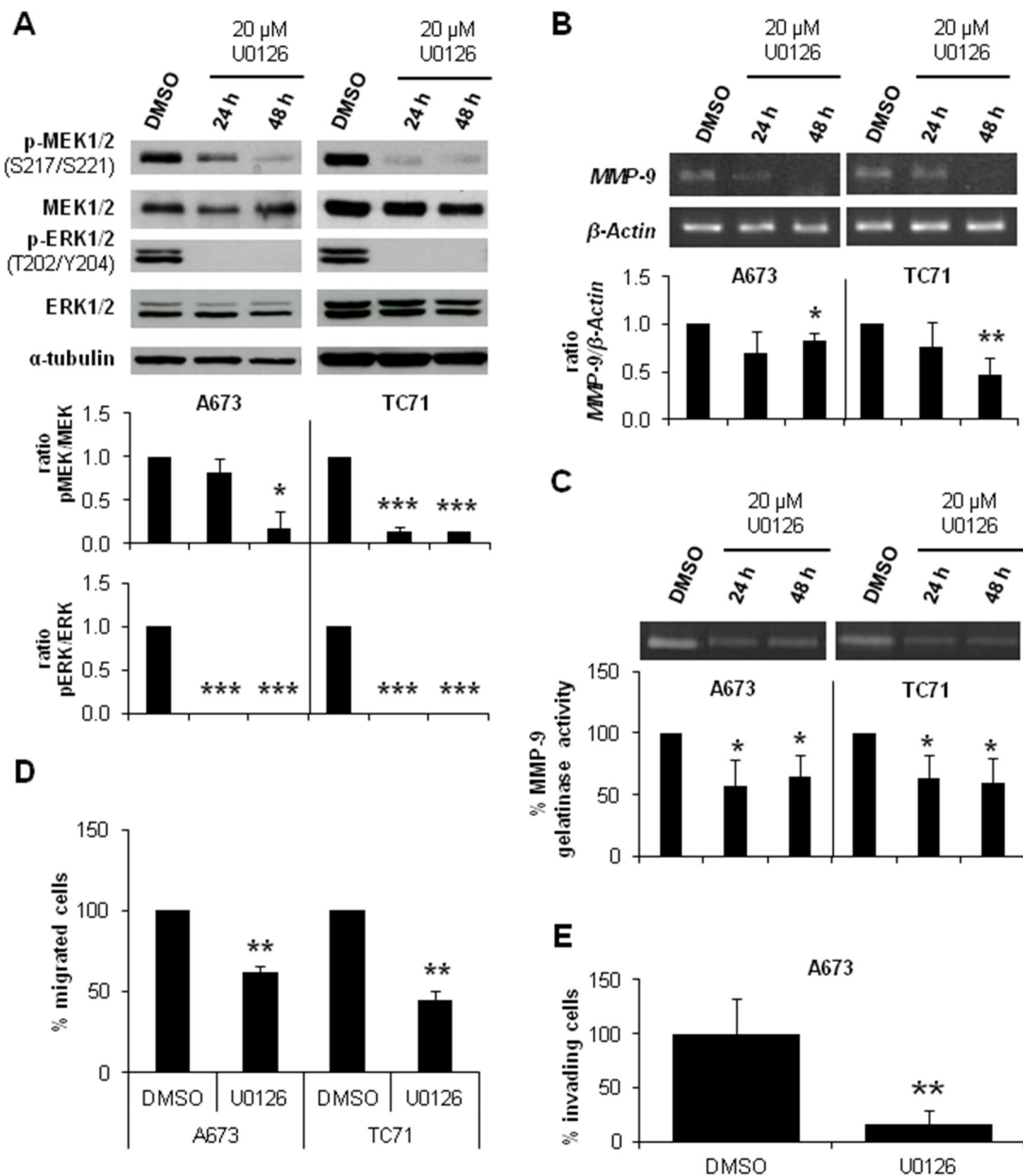


Figure 2: MEK1/2 inhibitor U0126 reduced *MMP-9* expression and activity and diminished migration and invasion in ES cell lines. **A.** Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in A673 and TC71 cell lines treated with vehicle (DMSO) or 20 μ M U0126. Quantification of 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

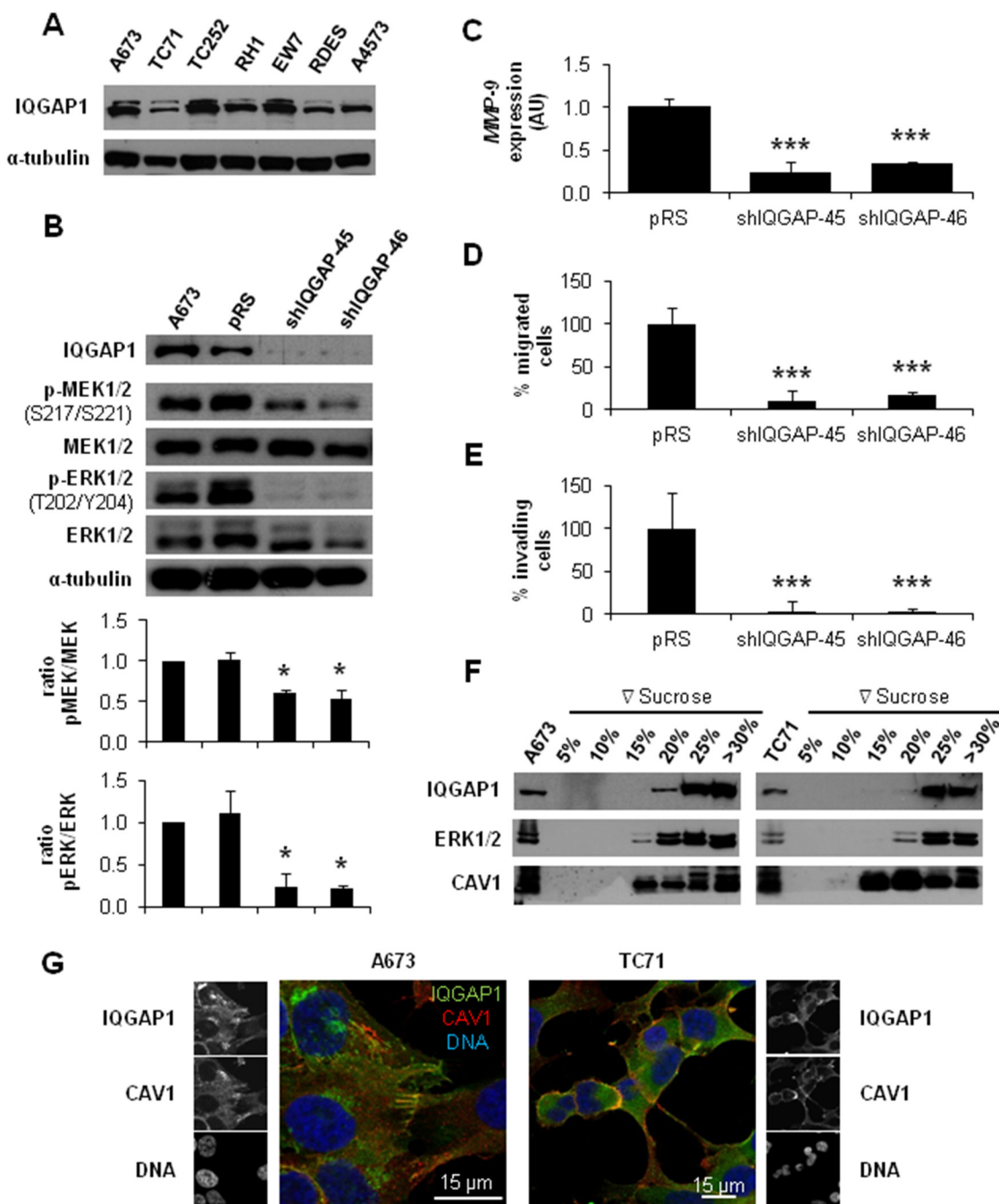


Figure 3: IQGAP1 intermediates in CAV1-regulation of migratory and invasive capacity of ES cells. **A.** Representative western blot showing the expression levels of IQGAP1 in different ES cell lines. **B.** Representative blots of MEK1/2 and ERK1/2, either total or phosphorylated, in IQGAP1-interfered 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,

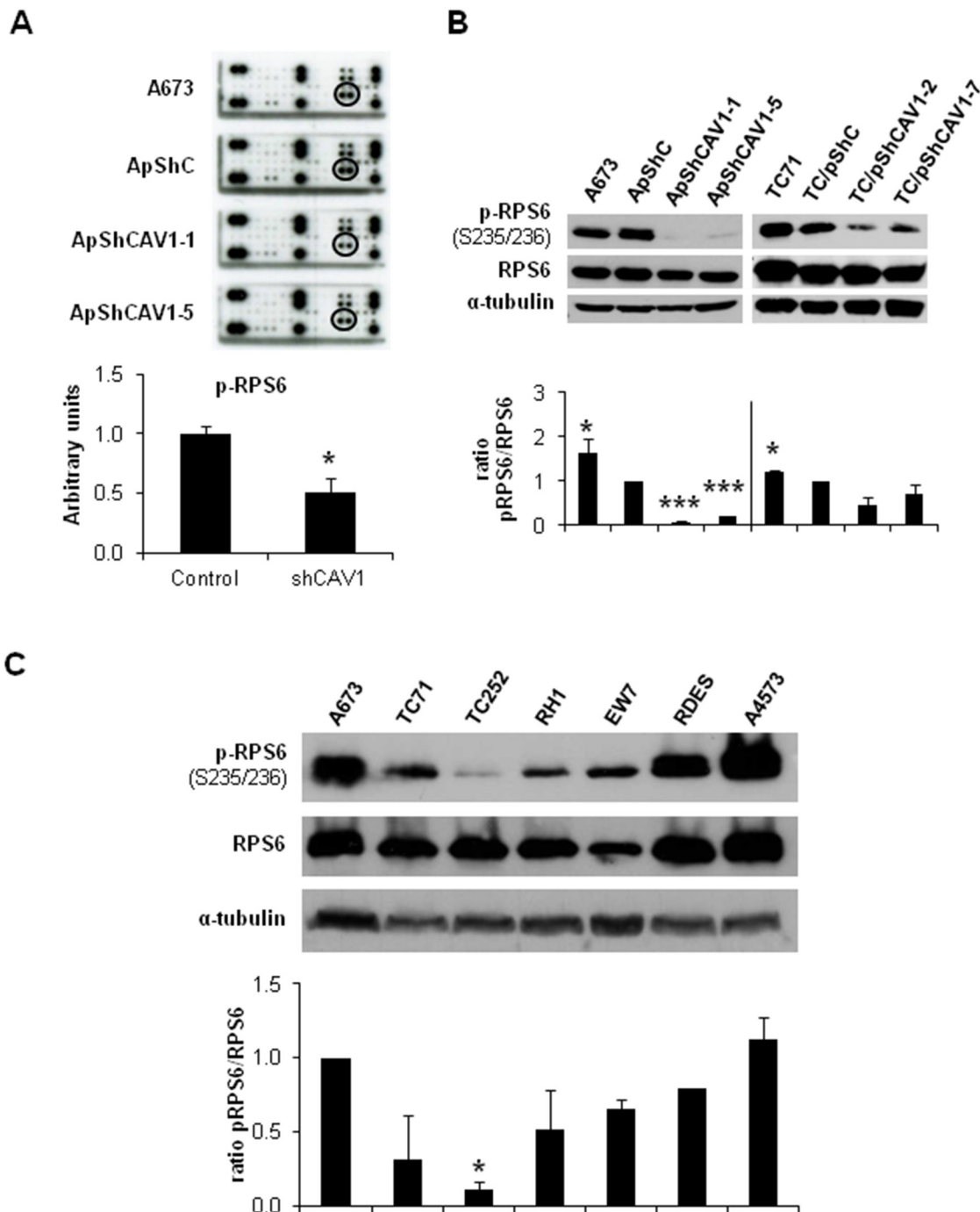


Figure 4: RPS6 phosphorylation is decreased in CAV1-silenced cells. A. RTK Signaling Antibody Array performed with A673 CAV1-knockdown model. Quantification data of p-RPS6 expression corresponds to the circled spots. B. Representative blots of RPS6, either total or phosphorylated, in shCAV1 models. α -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.

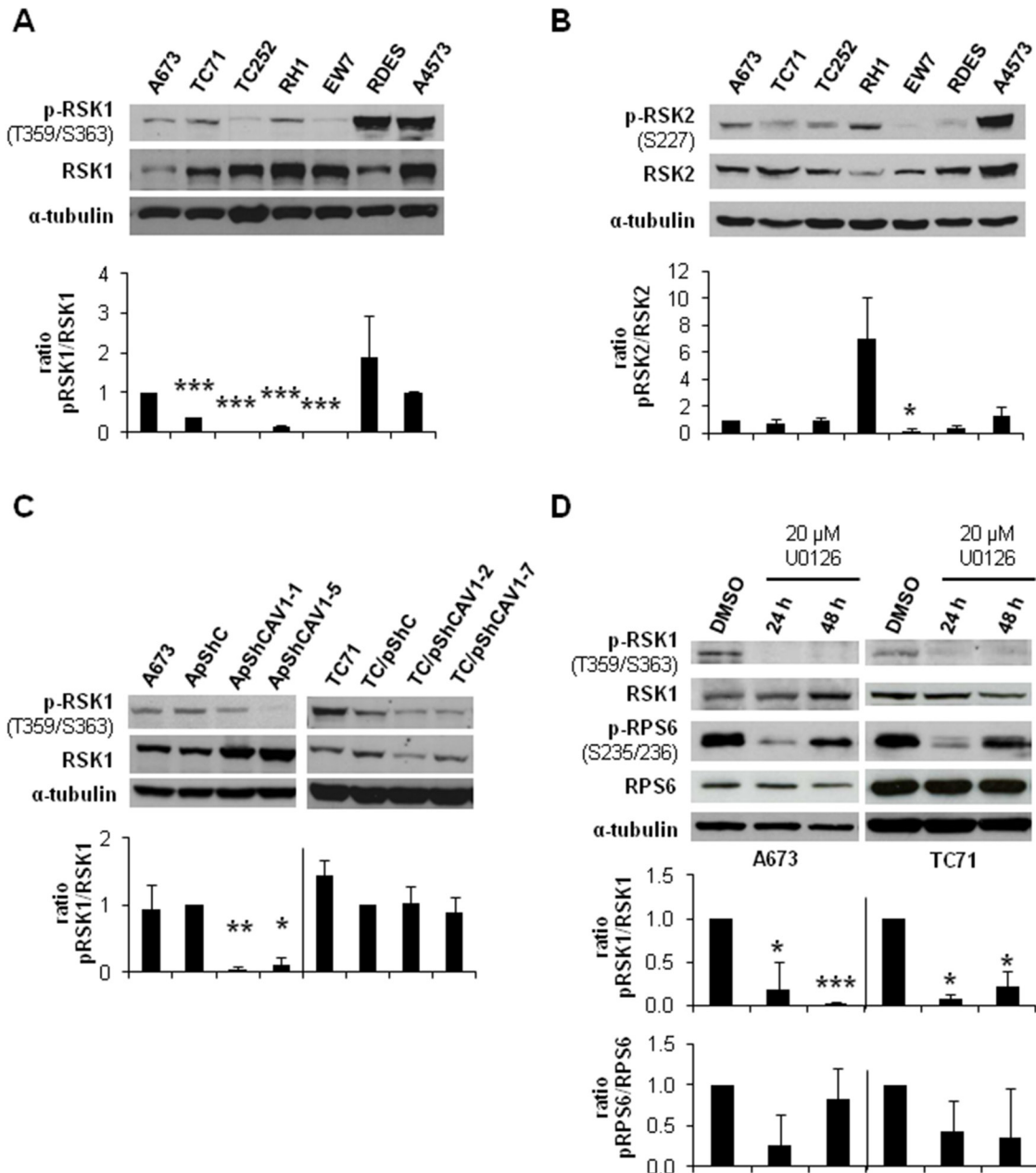


Figure 5: CAV1-knockdown and MEK1/2 inhibition reduced RSK1 phosphorylation levels. A. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of RSK1 in different ES cell lines. B. Representative western blot showing the phosphorylation and expression levels of RSK2 in different 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: * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$ *** $p \leq 0.0001$.

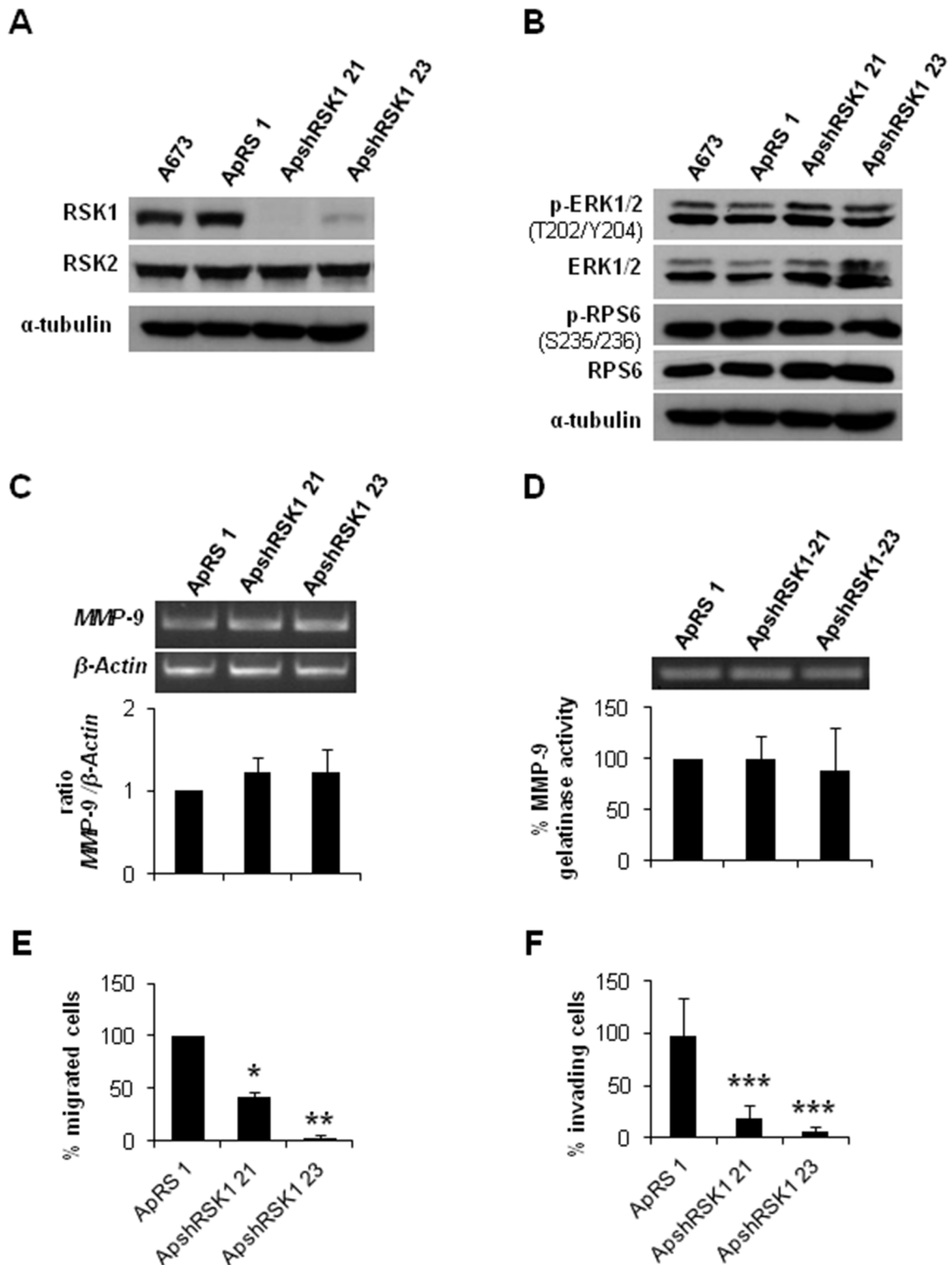


Figure 6: RSK1 silencing did not affect *MMP-9* expression but abrogate both migration and invasion of ES cells. A. Immunoblot of RSK1 expression levels in A673 shRSK1. **B.** Representative blots of RSK1 and RPS6, either total or phosphorylated, in RSK1-silenced cells. α -tubulin was used as loading 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.

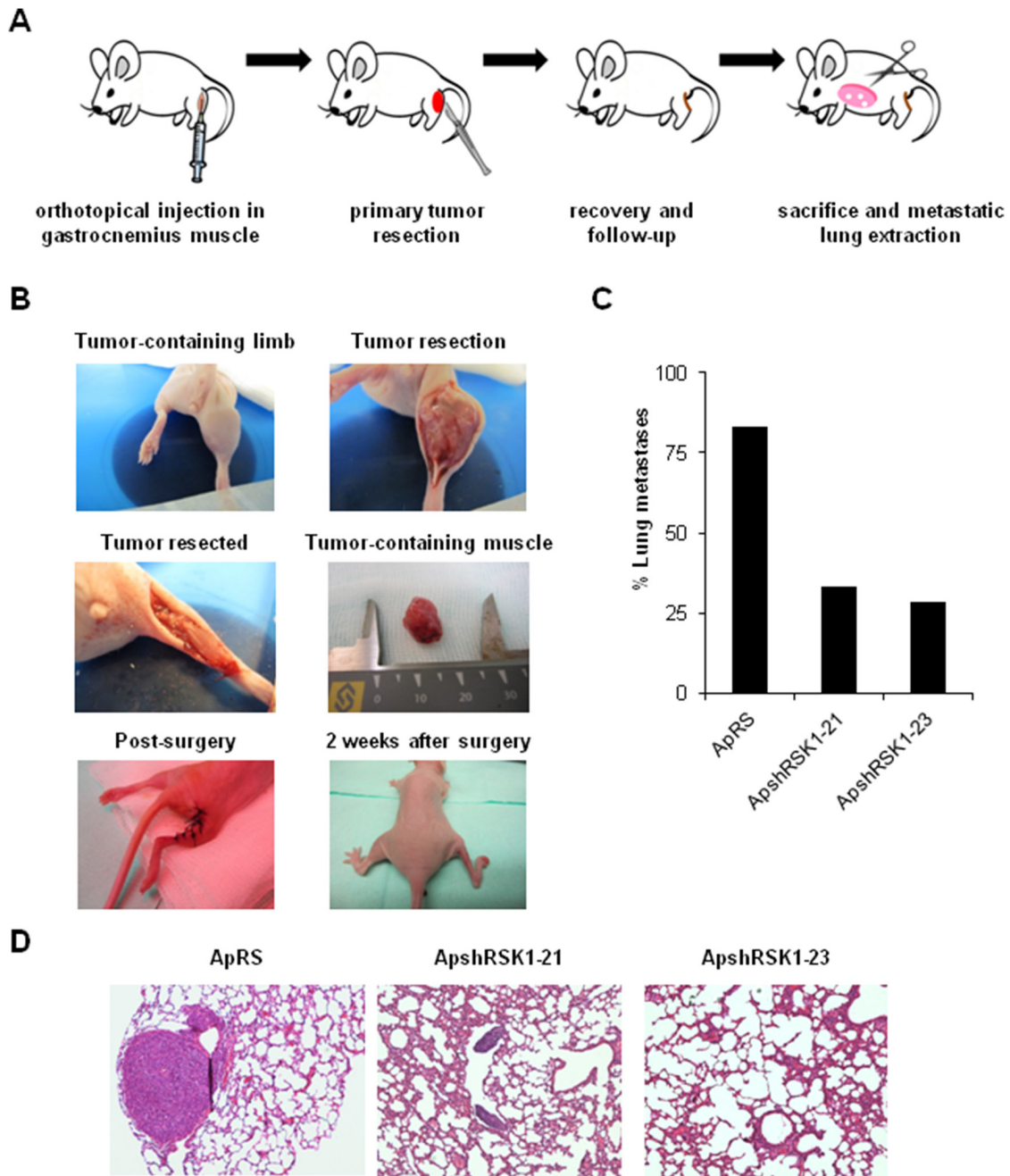


Figure 7: RSK1 silencing reduced the incidence of metastases *in vivo* in an ES orthotopic xenograft model. A and B. Scheme and pictures depicting A673 RSK1-knockdown model after orthotopic implantation inside gastrocnemius muscle and removal of muscle after primary tumor growth. **C.** Lung metastasis 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 protrusions 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

1.5×10^5 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 Luitgaarden 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.