



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESI DOCTORAL**

**2020**

**ESTUDI DE LA VIA DE WNT COM A DIANA TERAPÈUTICA  
EN TUMORS SÒLIDS I IDENTIFICACIÓ DE NOUS  
MARCADORS PRONÒSTICS I PREDICTIUS**

**Esther Martinez Font**



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESI DOCTORAL**

**2020**

**Programa de Doctorat de Biotecnologia Biomèdica i  
Evolutiva**

**ESTUDI DE LA VIA DE WNT COM A DIANA TERAPÈUTICA  
EN TUMORS SÒLIDS I IDENTIFICACIÓ DE NOUS  
MARCADORS PRONÒSTICS I PREDICTIUS**

**Esther Martinez Font**

**Directora: Antònia Obrador Hevia**

**Directora: Regina Alemany Alonso**

**Tutora: Regina Alemany Alonso**

**Doctora per la Universitat de les Illes Balears**

## Agraïments

A la meva mentora i directora de tesi, la Dra Antònia Obrador per estar sempre al meu costat, per donar-me la oportunitat de formar part del seu equip, per tot el que m'ha ensenyat durant aquests anys (i els que vindran!) i per tot el seu suport, que ha fet possible la finalització d'aquesta tesi.

A la meva co-directora de tesi, la Dra Regina Alemany per ensenyar-me junt amb la Dra Antònia Obrador tot el que sé sobre la via de senyalització Wnt i pel seu suport durant la realització de la tesi.

Al servei d'Anatomia Patològica i al servei d'Oncologia Mèdica de l'Hospital Universitari Son Espases en especial a la Dra Terrasa, pel seu suport i a la Dra Garcías de España juntament amb la Dra González del Alba per no deixar-me perdre dins la clínica dels sarcomes i el càncer de pròstata.

Als pacients que amb la seva generositat i col·laboració en els projectes han fet possible aquesta tesi.

Als companys de l'Institut d'Investigació (IdISBa), a tots, i especialment a n'Amanda, moltíssimes gràcies per fer aquest viatge molt més fàcil!

Als amics, a la Laura i a l'Esther. A les famílies: als de casa; a la família Mallorquina; a la família que, com diu en Miquel, es tria (Miquel, Jandro, Lluís, Joan, Nico, Helena i Mar) i especialment a en Marc. Gràcies per ser-hi sempre, pels ànims, per les birres i les rialles. Gràcies per tot!

## Llistat de publicacions derivades de la tesi:

Martinez-Font, E., Felipe-Abrio, I., Calabuig-Fariñas, S., Ramos, R., Terrasa, J., Vögler, O., Alemany, R., Martín-Broto, J., & Obrador-Hevia, A. (2017). Disruption of TCF/ $\beta$ -Catenin Binding Impairs Wnt Signaling and Induces Apoptosis in Soft Tissue Sarcoma Cells. *Molecular cancer therapeutics*, 16(6), 1166–1176. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0585>

Bertucci, F., Finetti, P., & Birnbaum, D. (2017). Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas-Letter. *Molecular cancer therapeutics*, 16(10), 2324. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0491>

Martinez-Font, E., Vögler, O., Alemany, R., & Obrador-Hevia, A. (2017). Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas-Response. *Molecular cancer therapeutics*, 16(10), 2325. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0567>

Martinez-Font, E., Pérez-Capó, M., Ramos, R., Felipe, I., Garcías, C., Luna, P., Terrasa, J., Martín-Broto, J., Vögler, O., Alemany, R., & Obrador-Hevia, A. (2020). Impact of Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibition on Cell Proliferation through *CDC25A* Downregulation in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers*, 12(9), E2556. <https://doi.org/10.3390/cancers12092556>

## Llistat d'abreviatures

ADT	<i>Androgen Deprivation Therapy</i> (teràpia de deprivació androgènica)
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
AR	<i>Androgen Receptor</i> (receptor d'andrògens)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCR	<i>Biochemical Recurrence</i> (recurrència bioquímica)
BRCA2	<i>Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	<i>cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein</i>
CC	Càncer Colorectal
CCND1	<i>Cyclin D1</i> (Ciclina D1)
CDC25A	<i>Cell division cycle 25 homolog A</i>
CEIC	Comitè Ètic d'Investigació Clínica
CI	<i>Combination Index / Cell Index</i>
CK1 $\alpha$	<i>Casein Kinase 1<math>\alpha</math></i>
CNA	<i>Copy Number Alterations</i> (alteracions en el nombre de còpies)
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CRPC	<i>Castration Resistant Prostate Carcinoma</i> (càncer de pròstata hormonoresistent)
CTNNB1	<i><math>\beta</math>-catenin</i> ( $\beta$ -catenina)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DMSO	Dimetilsulfòxid.
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Àcid desoxiribonucleic).
DVL	Dishevelled
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (sèrum fetal boví)
fdr	<i>False Discovery Rate</i>
FNCLCC	<i>Fédération Nationale des Centers de Lutte Contre Cancer</i>
FS	Fibrosarcoma
FZD	Frizzled
GEIS	Grupo Español de Investigación en Sarcomas
GIST	<i>Gastrointestinal Stromal Tumours</i> (tumors de l'estroma gastrointestinal)
GSK-3 $\beta$	<i>Glycogen Synthase Kinase 3<math>\beta</math></i>
HSPC	<i>Hormone-Sensitive Prostate Cancer</i> (càncer de pròstata avançat hormonosenible)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IdISBa	Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears
IP	Iodur de Propidi
IRS	<i>Immunoreactive Score</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
IWP1/4	<i>Inhibitors of Wnt Production 1/4</i> (inhibidors de la producció de lligands Wnt 1/4)
IWR1/5	<i>Inhibitor of Wnt Response 1/5</i> (inhibidors de resposta a Wnt 1/5)
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (LB agar)
Lgr4/Lgr5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5</i>

LHRH	<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i>
LMS	Leiomioma
LPS	Liposarcoma
LRP5/6	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6</i>
MF	Mixofibrosarcoma
miRNA	<i>micro RNA</i>
MVB	<i>Multivesicular Body</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	<i>normal fat</i> (teixit gras normal)
NF1	Neurofibromatosi de tipus 1
OMS	Organització Mundial de la Salut
p300	<i>E1A-binding protein 300 kDa</i>
PAF	Poliposis Adenomatosa Familiar
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerases</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
PORCN	<i>Porcupine</i> (Porcupina)
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> (antigen específic de la pròstata)
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PVDF	Difluorur de polivinilidè
QT	Quimioteràpia
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Àcid ribonucleic)
RNF43	<i>Ring Finger Protein 43</i>
ROR	<i>Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptors</i>
RSPO1-4	R-spondin 1-4
RT	Radioteràpia
RTUs	Reseccions Transuretrals de la Pròstata
RYK	<i>Related to Receptor Tyrosine Kinase</i>
SBRT	<i>Stereotactic Body Radiation Therapy</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (desviació estàndard)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (error estàndard de la mitjana)
SFRP1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> (medi de cultiu SOC)
SPT	Sarcomes de Parts Toves
SS	Sarcoma Sinovial
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCF/LEF	<i>T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
Tnks	enzims Tankirasa
TP53	<i>Tumour protein 53</i> (proteïna tumoral 53)
Wls	Wntless/Evi
ZNRF3	<i>Zinc and Ring Finger 3</i>

# Índex

I.	INTRODUCCIÓ.....	8
1.	La via de senyalització Wnt .....	8
1.1.	Producció i secreció de lligands Wnt .....	10
1.2.	L'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43.....	11
1.3.	Translocació de $\beta$ -catenina al nucli.....	12
1.4.	Activació de la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina .....	12
2.	La via de senyalització Wnt en càncer .....	13
2.1.	Inhibidors de la via Wnt en càncer.....	14
3.	Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomes .....	20
3.1.	Els sarcomes .....	20
3.2.	La via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomes.....	28
4.	Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer de pròstata .....	29
4.1.	El càncer de pròstata.....	29
4.2.	La via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer de pròstata.....	32
II.	OBJECTIUS .....	35
III.	MATERIALS I MÈTODES .....	37
1.	Cultiu cel·lular i mostres tumorals de pacients.....	38
1.1.	Característiques de les línies cel·lulars.....	38
1.2.	Característiques de les línies cel·lulars primàries .....	39
1.3.	Característiques de les línies cel·lulars i mostres de pacients utilitzades per l'estudi de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors.....	40
2.	Inhibidors i tractaments .....	42
3.	Plasmidis.....	42
3.1.	Amplificació i purificació de plasmidis .....	43
4.	Transfecció cel·lular.....	44
4.1.	Silenciament de l'expressió gènica: transfecció inversa.....	45
4.1.1.	siRNAs .....	45
4.2.	Expressió de plasmidis: transfecció directa .....	46
4.2.1.	Sistema TCF reporter .....	46
4.2.2.	Plasmidis d'expressió.....	48
5.	Immunofluorescència.....	49
6.	Anàlisi de l'expressió gènica.....	51
6.1.	Extracció d'RNA .....	51
6.2.	Quantificació i determinació de la puresa de l'RNA .....	52
6.3.	Reacció de transcripció inversa: rt-PCR .....	52

6.4.	Reacció d'amplificació del cDNA: PCR a temps real.....	53
7.	Anàlisi de l'expressió de proteïnes.....	55
7.1.	Preparació de les mostres .....	55
7.2.	Extracció de proteïnes.....	55
7.3.	Separació de la fracció nucleica i citoplasmàtica .....	56
7.4.	Quantificació de proteïnes .....	57
7.5.	Western Blot .....	57
7.5.1.	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS.....	57
7.5.2.	Transferència a membrana de nitrocel·lulosa.....	59
7.5.3.	Detecció immunològica de proteïnes.....	60
8.	Avaluació de la viabilitat cel·lular.....	62
8.1.	Anàlisi de la viabilitat cel·lular: Mètode del MTS tetrazolium (MTT) .....	62
8.2.	Combinació de tractaments .....	62
8.3.	Monitoratge a temps real del creixement cel·lular: RTCA (Real Time Cell Analyzer).....	67
9.	Anàlisi del cicle cel·lular .....	69
10.	<i>Microarrays</i> d'expressió.....	71
10.1.	<i>Microarrays</i> d'expressió de miRNAs i mRNAs.....	71
7.5.4.	Anàlisi dels <i>microarrays</i> d'expressió .....	73
10.2.	<i>Microarrays</i> d'expressió: dades obtingudes del TCGA ( <i>The Cancer Genome Atlas</i> ) .....	74
11.	Anàlisi estadístic.....	74
12.	Figures .....	75
IV.	RESULTATS.....	76
	Capítol 1 Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomagènesi .....	77
	Capítol 2 Inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a nova estratègia terapèutica en sarcomes de parts toves.....	97
	Capítol 3 Components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors predictius .....	106
	Capítol 4 Components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors en càncer de pròstata avançat.....	119
V.	DISCUSSIÓ.....	129
VI.	CONCLUSIONS .....	143
VII.	BIBLIOGRAFIA .....	145



# Índex de figures

Figura I1. Representació de l'estructura de $\beta$ -catenina.	9
Figura I2. Esquema de la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina.	10
Figura I3. Esquema de la síntesi i secreció dels lligands Wnt.	11
Figura I4. Esquema de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43.	12
Figura I5. Esquema dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer.	14
Figura I6. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina LGK974 en tumors amb mutacions en <i>RNF43/ZNRF3</i> .	15
Figura I7. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina LGK974 en tumors amb translocacions en <i>RSPO2/RSPO3</i> .	16
Figura I8. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina XAV939.	17
Figura I9. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina PKF118-310.	18
Figura I10. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina PRI-724.	19
Figura I11. Percentatge de casos de SPT registrats a l'Hospital Universitari Son Espases (Palma de Mallorca) entre el 2015 – 2020	20
Figura I12. Esquema del maneig terapèutic dels SPT.	28
Figura I13. Esquema del maneig terapèutic del càncer de pròstata.	32
Figura I14. Esquema del model proposat de la relació entre les vies de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina i AR en càncer de pròstata avançat.	33
Figura M1. Composició del medi SOC utilitzat en l'amplificació dels plasmidis.	43
Figura M2. Esquema del procés de preparació de la solució de transfecció pel protocol de transfecció inversa.	46
Figura M3. Plasmidis TOPFlash i FOPFlash del sistema <i>TCF reporter</i> .	47
Figura M4. Vector pRL-TK Renilla.	47
Figura M5. Esquema del procés de preparació de la solució de transfecció pel protocol de transfecció directa.	48
Figura M6. Plasmidi pCMV-CDC25A (HG11291-M-N).	49
Figura M7. Màster mix utilitzada per retrotranscriure 64 ng d'RNA a cDNA.	53
Figura M8. Màster mix emprada per retrotranscriure 300 ng d'RNA a cDNA.	53
Figura M9. Programa utilitzat per les reaccions d'rt-PCR.	53
Figura M10. Màster mix emprada per les reaccions de PCR a temps real.	54
Figura M11. Preparació del tampó de lisis RIPA <i>buffer</i> .	56
Figura M12. Composició del <i>sample buffer</i> utilitzat per la preparació de les mostres per l'electroforesi.	58
Figura M13. Preparació dels gels de poliacrilamida.	58
Figura M14. Preparació del tampó d'electroforesi.	59
Figura M15. Composició del tampó de transferència utilitzat pel <i>western blot</i> .	60
Figura M16. Muntatge de la transferència de les proteïnes a la membrana de PVDF.	60
Figura M17. Preparació de la solució salina TBS-T 1X usada pels rentats entre anticossos.	61
Figura M18. Representació gràfica d'un isoblograma.	67

Figura M19. Representació gràfica de les parts del citòmetre.	69
Figura M20. Composició de la solució de tinció del DNA usada en la citometria de flux.	71
Figura M21. Esquema del protocol per l'anàlisi de miRNAs.	72
Figura M22. Esquema del protocol per l'anàlisi d'expressió de mRNAs.	73
Figura R1.1. Localització subcel·lular de $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	79
Figura R1.2. Expressió de $\beta$ -catenina i p-Ser552- $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	80
Figura R1.3. Nivells basals intrínsecs de l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	81
Figura R1.4. Expressió a nivell de mRNA de diferents gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	82
Figura R1.5. Anàlisi de correlacions de les dades moleculars estudiades en sarcomes de parts toves.	83
Figura R1.6. Efecte de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina sobre la viabilitat cel·lular de les línies cel·lulars de sarcomes de parts toves.	85
Figura R1.7. Monitoratge a temps real del creixement cel·lular de cèl·lules de sarcoma de parts toves tractades amb l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina.	86
Figura R1.8. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les diferents fases del cicle cel·lular de les línies cel·lulars de sarcomes de parts toves.	87
Figura R1.9. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a la localització subcel·lular de $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	89
Figura R1.10. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina sobre l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	90
Figura R1.11. Avaluació de l'especificitat de les molècules PKF118-310 i XAV939 per inhibir la via Wnt/ $\beta$ -catenina.	91
Figura R1.12. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a l'expressió de gens diana de la via a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	93
Figura R1.13. Efectes del silenciament de l'expressió del gen <i>CDC25A</i> sobre la proliferació cel·lular i a la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	95
Figura R1.14. Comparativa dels nivells d'expressió de <i>CDC25A</i> en una sèrie de pacients de sarcomes de parts toves obtinguda a través del TCGA.	96
Figura R1.15. Model proposat a partir dels resultats obtinguts al capítol 1: Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomagènesi.	96
Figura R2.1. Efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina amb PRI-724 sobre la viabilitat i la proliferació cel·lular en les línies de sarcomes de parts toves.	99
Figura R2.2. Efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre la fracció subG1 de les cèl·lules de sarcomes de parts toves.	100
Figura R2.3. Efectes de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre l'activitat transcripcional, l'expressió de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina i la localització subcel·lular de $\beta$ -catenina.	102

Figura R2.4. Combinació dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb els agents quimioterapèutics convencionals en sarcomes de parts toves.	104
Figura R2.5. Esquema resum del model proposat amb els resultats obtinguts durant el capítol 2.	105
Figura R3.1. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en línies cel·lulars de sarcomes de parts toves.	108
Figura R3.2. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	109
Figura R3.3. Expressió a nivell de mRNA del gen <i>RNF43</i> en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	110
Figura R3.4. Expressió a nivell de mRNA del gen <i>ZNRF3</i> en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	111
Figura R3.5. Expressió a nivell de mRNA del gen <i>RSPO2</i> en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	111
Figura R3.6. Expressió a nivell de mRNA del gen <i>RSPO3</i> en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	112
Figura R3.7. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.	113
Figura R3.8. Efecte de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la Porcupina sobre la viabilitat cel·lular a les línies de sarcomes de parts toves.	114
Figura R3.9. Avaluació dels efectes <i>off-target</i> de l'inhibidor de Porcupina, LGK974, a la línia de liposarcoma SW872.	115
Figura R3.10. Monitoratge en temps real del creixement cel·lular en la línia de liposarcoma SW872 tractada amb l'inhibidor de Porcupina LGK974.	116
Figura R3.11. Esquema resum del model proposat amb els resultats obtinguts durant el capítol 3.	117
Figura R3.12. Representació global de les alteracions moleculars analitzades i la sensibilitat als inhibidors de la via per a cada mostra de SPT.	118
Figura R4.1. Visió general dels mRNAs diferencialment expressats en la comparació CRPC vs HSPC.	121
Figura R4.2. Interpretació biològica dels resultats de l'anàlisi d' <i>arrays</i> d'expressió de mRNAs per la comparació CRPC vs HSPC.	123
Figura R4.3. Relació entre les vies implicades resultants de l'anàlisi d' <i>arrays</i> d'expressió de mRNAs per la comparació CRPC vs HSPC.	124
Figura R4.4. Visió global del miRNAs diferencialment expressats en la comparació CRPC vs HSPC.	125
Figura R4.5. Expressió dels miRNAs: hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p.	127
Figura R4.6. Resum esquemàtic del model proposat amb els resultats obtinguts al capítol 4.	128
Figura R4.7. Esquema de la recollida prospectiva de mostres de biòpsia líquida en pacients de càncer de pròstata avançat.	128
Figura D1. Model proposat a partir de l'estudi de la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi i la seva inhibició com a possible estratègia terapèutica en sarcomes de parts toves.	138
Figura D2. Model proposat a partir de l'estudi de la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi i de l'ús d'alguns dels seus components com a biomarcadors predictius en sarcomes de parts toves.	139

Figura D3. Model proposat a partir de l'estudi de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a possibles biomarcadors predictius i/o pronòstics en càncer de pròstata avançat.

## Índex de taules

Taula I1. Classificació dels SPT segons l'OMS (2013).	22-24
Taula I2. Translocacions associades a subtipus de sarcomes de parts toves.	25
Taula I3. Estadi i grup histològic pronòstics pels SPT localitzats al tronc i les extremitats segons l'AJCC.	26
Taula I4. Estadi i grup histològic pels SPT localitzats al retroperitoneu segons l'AJCC.	26
Taula I5. Classificació segons el risc en càncer de pròstata.	30
Taula M1. Característiques de les línies cel·lulars.	38-39
Taula M2. Característiques dels medis de les línies cel·lulars.	39
Taula M3. Característiques de les línies cel·lulars primàries.	40
Taula M4. Característiques de les línies cel·lulars cedides.	40
Taula M5. Característiques de les mostres de pacients de sarcomes de parts toves.	41
Taula M6. Característiques de les mostres de pacients amb càncer de pròstata avançat.	42
Taula M7. Seqüències dels siRNAs de <i>CDC25A</i> (L-003226-00-0005).	45
Taula M8. Sondes TaqMan utilitzades.	54
Taula M9. Perfil de concentracions utilitzat per fer la recta patró.	57
Taula M10. Característiques dels anticossos primaris.	61
Taula M11. Composició de les combinacions de PKF118-310 amb trabectedina.	63
Taula M12. Composició de les combinacions de PKF118-310 amb doxorubicina.	64
Taula M13. Composició de les combinacions de PRI-724 amb trabectedina.	65
Taula M14. Composició de les combinacions de PRI-724 amb doxorubicina.	66
Taula R1.1. Índex d'immunoreactivitat (IRS) per a cada línia cel·lular de sarcomes de parts toves.	80
Taula R4.1. Parelles de miRNAs-mRNAs relacionades amb la via Wnt/ $\beta$ -catenina.	126
Taula R4.2. Parelles miRNAs-mRNAs relacionades amb la via del receptor d'andrògens.	126
Taula R4.3. Correlació entre les dues tècniques per detectar l'expressió de miRNAs.	127



## Resum

La via de senyalització Wnt està implicada en la regulació de processos importants en la progressió del càncer com: el creixement tumoral, la senescència, la diferenciació i la metastasi. El seu estudi ha contribuït tant per a millorar la comprensió de la carcinogènesi, sent el càncer colorectal el millor paradigma de l'estudi de la progressió tumoral iniciada en gran part per alteracions en aquesta via de senyalització, com pel desenvolupament d'inhibidors de la via per tal de millorar les estratègies terapèutiques actuals. En aquesta tesi es va estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en dos tipus de tumors sòlids diferents, els sarcomes de parts toves i el càncer de pròstata avançat.

Els sarcomes de parts toves (SPT) són un grup de tumors poc freqüents i molt heterogeni. L'etiologia d'aquests tumors segueix sent desconeguda i malgrat la seva heterogeneïtat se'ls considera com una sola entitat respecte a diagnòstic i estratègies terapèutiques. En aquest sentit, estudis enfocats a comprendre millor el procés pel qual s'originen aquests tipus de neoplàsies i la identificació de possibles dianes terapèutiques que aportin millores en el maneig d'aquests pacients són essencials. Dins aquest context, en aquesta tesi es va estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi i la seva inhibició com a possible estratègia terapèutica. S'ha demostrat que la via de senyalització Wnt està activada en línies cel·lulars i cultius primaris representatius de sarcomes de parts toves, promovent l'expressió de gens diana de la via, importants per la proliferació cel·lular, en concret del gen *CDC25A*. La inhibició de la via, quan s'actua per sota de  $\beta$ -catenina (proteïna clau de la via) en la cascada de senyalització, redueix la proliferació cel·lular provocant que les cèl·lules entrin en apoptosi, a través de la inhibició dels nivells d'expressió de *CDC25A*. De manera interessant, la combinació d'aquests inhibidors amb els agents quimioterapèutics convencionals millora el seu efecte antitumoral d'una manera sinèrgica, obrint les portes a la realització d'estudis en models experimentals *in vivo*.

Per altra banda, l'estudi de biomarcadors predictius i/o pronòstics de resposta o progressió a determinats tractaments, s'ha convertit en un tema recurrent en la investigació contra el càncer. En primer lloc, perquè permeten la identificació de noves dianes terapèutiques per a les quals desenvolupar fàrmacs que millorin els tractaments actuals. En aquest sentit, els resultats obtinguts en aquesta tesi en mostres tumorals de pacients amb SPT, estableixen les bases per identificar alteracions moleculars de la via Wnt/ $\beta$ -catenina per a ser usades com a biomarcadors de resposta a determinats inhibidors en assaigs clínics, com és el cas del paper clau de *CDC25A* en la proliferació cel·lular. I en segon lloc, perquè durant el tractament apareixen mecanismes de resistència que provoquen la progressió cap una forma de la malaltia més avançada, com en el cas del càncer de pròstata avançat. En aquests tipus de tumors s'ha descrit que la via Wnt/ $\beta$ -catenina hi juga un paper important, però encara es desconeix, en gran mesura, el mecanisme amb què ho fa. En relació amb això en aquest treball, s'han identificat determinats miRNAs (*hsa-miR-205-5p* i *hsa-miR-1301-3p*) que podrien estar regulant a components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina durant la progressió de la malaltia. Aquests resultats constitueixen la base per avaluar en futurs estudis si la determinació d'aquests nous biomarcadors, en biòpsia líquida i de forma prospectiva, podrien complementar o millorar el test del PSA (de l'anglès, *prostate specific antigen*) en sang, el biomarcador utilitzat actualment en càncer de pròstata.

## Resumen

La vía de señalización Wnt está implicada en la regulación de procesos importantes para la progresión del cáncer como: el crecimiento tumoral, la senescencia, la diferenciación y la metástasis. Su estudio ha contribuido a mejorar la comprensión de la carcinogénesis, siendo el cáncer de colon, el mejor paradigma tanto para el estudio de la progresión tumoral iniciada en gran parte por alteraciones en esta vía de señalización, así como al desarrollo de inhibidores de la vía con el objetivo de mejorar las estrategias terapéuticas actuales. En la presente tesis se estudió la implicación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en dos tipos de tumores diferentes, los sarcomas de partes blandas y el cáncer de próstata avanzado.

Los sarcomas de partes blandas (SPB) son un grupo muy heterogéneo, de tumores poco frecuentes. La etiología de estos tumores sigue siendo desconocida y a pesar de su heterogeneidad se los considera como una sola entidad en cuanto al diagnóstico y estrategias terapéuticas. En este sentido, estudios enfocados en mejorar la comprensión del proceso por el cual se originan este tipo de neoplasias y la identificación de posibles dianas terapéuticas que aporten mejoras en el manejo de estos pacientes son esenciales. Dentro de este contexto, en esta tesis se estudió la implicación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagénesis y su inhibición como posible estrategia terapéutica. Se ha demostrado que la vía de señalización Wnt está activada en líneas celulares y cultivos primarios representativos de sarcomas de partes blandas, promoviendo la expresión de genes diana de la vía importantes para la proliferación celular, en concreto, de *CDC25A*. La inhibición de la vía, actuando por debajo de  $\beta$ -catenina (proteína clave de la vía) en la cascada de señalización, reduce la proliferación celular haciendo que las células entren en apoptosis, a través de la inhibición de los niveles de expresión de *CDC25A*. De manera interesante, la combinación de estos inhibidores con los quimioterapéuticos convencionales mejora su efecto antitumoral, de forma sinérgica, abriendo las puertas a la realización de nuevos experimentos en modelos *in vivo*.

Por otro lado, el estudio de biomarcadores predictivos y/o pronósticos de respuesta o progresión a determinados tratamientos, se ha convertido en un tema recurrente en la investigación contra el cáncer. En primer lugar, porque permiten la identificación de nuevas dianas terapéuticas, para las cuales desarrollar nuevos fármacos que mejoren los tratamientos actuales. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis en muestras tumorales de pacientes con SPB, sirven de base para identificar alteraciones moleculares de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina que podrían ser usadas como biomarcadores de respuesta a determinados inhibidores en ensayos clínicos, como en el caso del papel clave de *CDC25A* en la proliferación celular. Y en segundo lugar, porque durante el tratamiento aparecen mecanismos de resistencia que provocan la progresión a una forma de la enfermedad más avanzada, como en el caso del cáncer de próstata avanzado. En este tipo de tumores se ha descrito que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina juega un papel importante, aunque todavía se desconoce, en gran medida, la manera en que lo hace. En línea con esto en este trabajo, se han identificado determinados miRNAs (hsa-miR-205-5p y hsa-miR-1301-3p) que podrían estar regulando a componentes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina durante la progresión de la enfermedad. Estos resultados sirven de base para evaluar en futuros estudios si la detección de estos nuevos biomarcadores,



en biopsia líquida de forma prospectiva, pudiera complementar o mejorar el test de PSA en sangre, el biomarcador usado actualmente en cáncer de próstata.

## Abstract

Wnt signalling pathway regulates various processes that are important for cancer progression, including: tumor initiation, tumor growth, cell senescence, cell death, differentiation and metastasis. The study of this pathway has improved the understanding of carcinogenesis, especially in colon cancer, the paradigm of studies about tumor progression initiated through alterations in Wnt signalling pathway. Moreover, it has contributed to improving current therapeutic strategies by the development of small inhibitors targeting this pathway. In this thesis, we evaluate the role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in two different types of tumours: soft tissue sarcoma and advanced prostate cancer.

Soft tissue sarcomas (STS) are a group of rare and heterogeneous tumours. The aetiology of these tumours is still unknown and despite their heterogeneity they are considered as a single entity in their diagnosis and therapeutic approach. In this context, research focusing on the study of new molecular pathways that provide a better understanding of sarcomagenesis and identification of potential therapeutic targets to improve the management of these patients are a primordial necessity. In this thesis, we evaluated the role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in sarcomagenesis and its inhibition as a potential therapeutic strategy. We demonstrated that Wnt signalling pathway is activated in a representative panel of STS cell lines and tumour-derived cells, promoting the expression of target genes mediators of cell proliferation, such as *CDC25A*. Inhibition of the pathway,  $\beta$ -catenin-downstream, reduced cell proliferation by inducing apoptosis, through downregulation of *CDC25A* expression. Interestingly, the combination of these inhibitors with conventional chemotherapeutic agents enhances their antitumor effect in a synergistic manner, opening the door for further experiments using in vivo models.

On the other hand, identification of predictive/prognostic biomarkers of response or treatment progression has become a recurring topic in cancer research. First, because it serves as the basis of studies related to the identification of new therapeutic targets for the improvement of current treatments. In line with this, the results presented in this thesis, by analyzing tumor samples of patients with STS, serve as a basis for further studies to evaluate the role of molecular alterations of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as predictive biomarkers of response to inhibitors which are in clinical trials, as in the case of the key role of *CDC25A* in cell proliferation. And secondly, due to the treatment resistance that all patients eventually develop, as in advanced prostate cancer. It has been suggested that Wnt/ $\beta$ -catenin pathway plays an important role, during androgen deprivation therapy progression, although the mechanics behind it is still unknown. In line with this we identified certain miRNAs (hsa-miR-205-5p and hsa-miR-1301-3p) that could be implicated in the disease progression by regulating components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Further studies will evaluate whether the detection of these new biomarkers, in liquid biopsy, could complement or improve the currently used biomarker in prostate cancer (PSA).

# I. INTRODUCCIÓ

## INTRODUCCIÓ

### 1. La via de senyalització Wnt

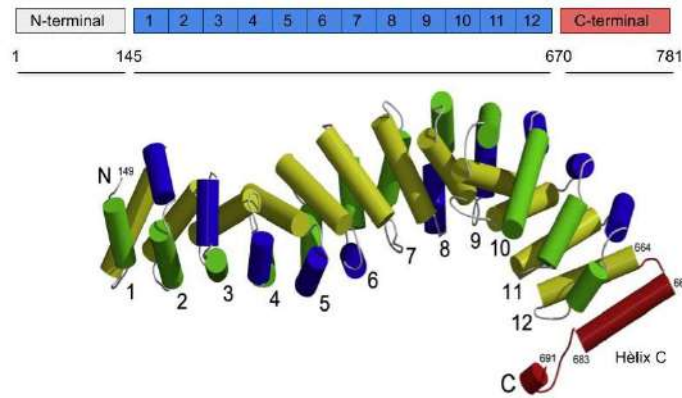
La via de senyalització Wnt està involucrada en diversos processos fonamentals pel desenvolupament embriogènic, incloent-hi la regulació de les cèl·lules mare mesenquimals, la migració cel·lular, així com el manteniment de l'homeòstasi en teixits adults com per exemple la pell o l'intestí [1,2].

El nom Wnt sorgeix de la unió dels noms de dos gens, el primer *Int-1*, identificat l'any 1982 per Nusse i Varmus com a un proto-oncogen murí [3] i el segon *wingless (wg)*, descobert com el seu homòleg (5 anys més tard) en *Drosophila melanogaster* el qual va ser identificat per Nüsslein-Volhard i Wieschaus l'any 1980 com un regulador de la polaritat segmental [4]. Avui en dia es coneix que la família de lligands Wnt (altament conservada evolutivament [5,6]) està formada per 19 glicoproteïnes riques en cisteïnes que s'uneixen a més de 15 receptors o coreceptors [7].

La via de senyalització Wnt és una via altament estudiada per la seva implicació en diverses malalties, com per exemple: algunes malalties neurològiques com la discapacitat intel·lectual, l'Alzheimer o els trastorns bipolars; la síndrome d'osteoporosis pseudoglioma o l'osteoporosi; la fibrosi pulmonar o hepàtica i l'artritis reumatoide, així com en diferents tipus de càncer: el colorectal o la leucèmia, entre d'altres [8–16].

Tradicionalment la via de senyalització es classifica segons sigui dependent de  $\beta$ -catenina (canònica) o independent de  $\beta$ -catenina (no canònica) [17]. La via canònica està implicada en la proliferació i la supervivència cel·lular, mentre que la via no canònica s'associa amb la diferenciació, la migració i la polaritat cel·lular. La via no canònica, a la vegada, es diferencia en dues vies de senyalització: la dependent de calci i la de polaritat cel·lular planar i s'activa a través de la unió de lligands Wnt amb els receptors de membrana Frizzleds (FZD), així com amb els receptors tirosina quinasa RYK (de l'anglès, *related to receptor tyrosine kinase*) i ROR (de l'anglès, *receptor tyrosine kinase-like orphan receptors*). Malgrat existeix aquesta diferenciació, teòrica, entre via canònica i no canònica la realitat és que ambdues vies interaccionen per regular de manera coordinada processos complexos com el desenvolupament embrionari, el manteniment de les cèl·lules mare, l'homeòstasi dels teixits o la cicatrització de ferides, i la seva regulació aberrant s'associa a la tumorigènesi, la metàstasi i a altres malalties com s'ha comentat anteriorment.

Aquesta tesi es centra en l'estudi de la via canònica o dependent de  $\beta$ -catenina, denominada també via Wnt/ $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) és una proteïna membre de la família de catenines ( $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina,  $\delta$ -catenina i  $\gamma$ -catenina) que va ser descrita l'any 1989, juntament amb  $\gamma$ -catenina, com a una proteïna que s'uneix a les cadherines transmembrana localitzades a la membrana plasmàtica [18], unint-les al citoesquelet [19,20]. L'estructura de  $\beta$ -catenina es caracteritza pels seus dominis N- i C-terminals flexibles i el seu domini central format per 12 repeticions de tipus "armadillo" altament conservades. Cada una d'aquestes repeticions està formada per 42 aminoàcids formant una triple hèlix, i a la vegada les 12 repeticions "armadillo" formen una superhèlix amb un solc carregat positivament, important per la interacció de  $\beta$ -catenina amb altres proteïnes (Figura I1) [21,22].



**Figura I1. Representació de l'estructura de  $\beta$ -catenina.** A la part superior, esquema dels tres dominis de  $\beta$ -catenina: l'extrem N-terminal, el domini central de tipus "armadillo" i l'extrem C-terminal. A la part inferior, estructura del fragment de  $\beta$ -catenina (residus 138-781) on es mostra en més detall el domini central format per 12 repeticions de 42 aminoàcids cada una. Cada una d'aquestes repeticions forma una hèlix de tipus: h1 (en blau, hèlix curta de dues voltes), h2 (en verd, hèlix de tres voltes) o h3 (en groc, hèlix de 4 voltes) i l'extrem C-terminal, conegut pel nom d'hèlix C (en vermell). Imatge modificada de [22].

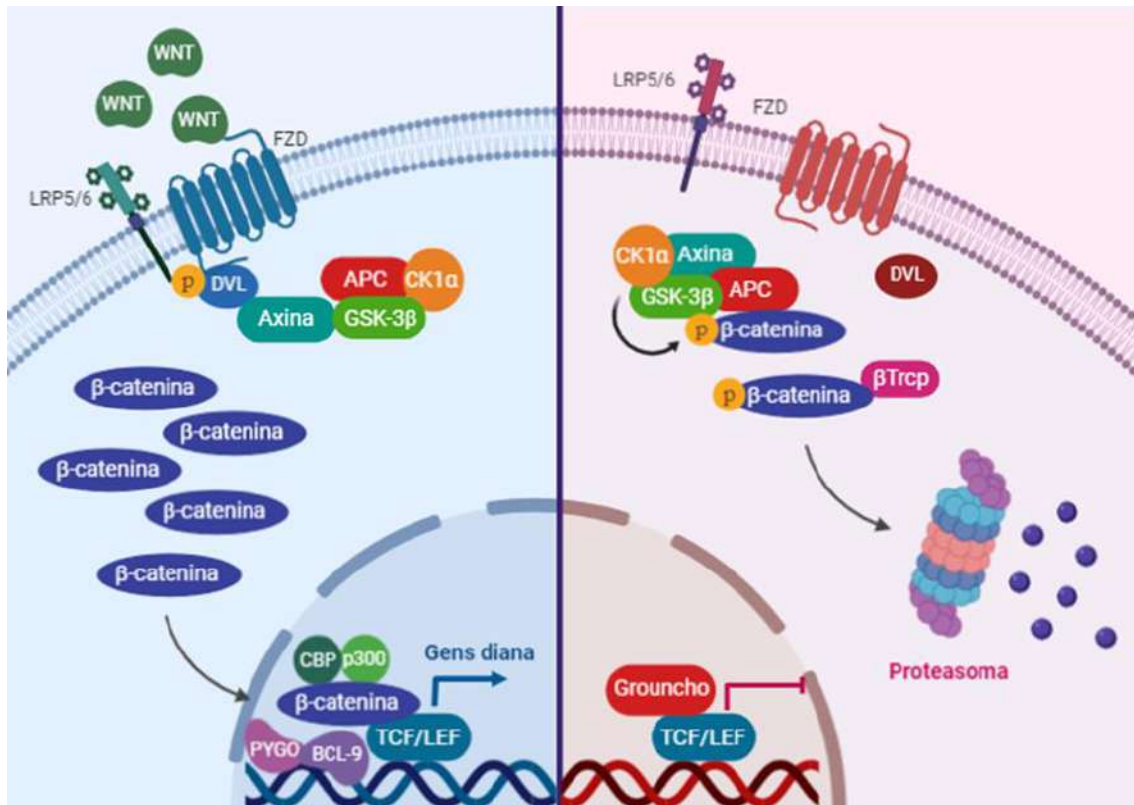
L'expressió i distribució cel·lular, així com les funcions, de  $\beta$ -catenina es regulen per modificacions postranscripcionals, predominantment als dominis N- i C-terminals, com fosforilacions, ubiquitinacions o acetilacions.  $\beta$ -catenina per una banda contribueix a l'adhesió cel·lular estabilitzant el contacte entre cèl·lules i per altra, és responsable de la transducció de senyals de la via canònica a través de la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, actuant com a coactivador transcripcional.

La via Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura I2) s'activa quan els lligands Wnt s'uneixen als receptors de membrana FZD, família de proteïnes de set dominis transmembrana, i als seus coreceptors LRP5/6 (de l'anglès, *low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*), provocant la fosforilació d'una proteïna anomenada Dishevelled (DVL) i així la unió d'aquesta amb la proteïna Axina, de manera que l'anomenat complex de destrucció de  $\beta$ -catenina queda inhibit, i com a conseqüència  $\beta$ -catenina s'acumula al citoplasma fins que acaba translocant-se al nucli [14,15,23,24].

El complex de destrucció de  $\beta$ -catenina està format pel supressor tumoral APC (de l'anglès, *Adenomatous Polyposis Coli*), el qual afavoreix l'afinitat del complex de destrucció per  $\beta$ -catenina, i per la proteïna Axina que té una funció estructural i s'encarrega de mantenir unit al complex i dos enzims: CK1 $\alpha$  (de l'anglès, *casein kinase 1 $\alpha$* ) i GSK-3 $\beta$  (de l'anglès, *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), els quals fosforilen  $\beta$ -catenina a la serina 45 (CK1 $\alpha$ ) i a la treonina 41, la serina 33 i la serina 37 (GSK-3 $\beta$ ) [25–27] del seu extrem N-terminal. Un cop fosforilada,  $\beta$ -catenina és reconeguda per la lligasa d'ubiquitines  $\beta$ -Trcp E3 la qual acaba provocant la degradació de  $\beta$ -catenina al proteasoma [25].

Com s'ha mencionat anteriorment, quan la via està activada la funció del complex de destrucció queda inhibida de tal manera que  $\beta$ -catenina no es degrada, s'acumula al citoplasma i acaba translocant-se al nucli. Un cop al nucli,  $\beta$ -catenina desplaça Groucho del complex de transcripció TCF/LEF (de l'anglès, *T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*) activant la transcripció de gens diana de la via [14,15,23,24,28–32]. En absència de lligands Wnt, Groucho interacciona amb el complex de transcripció TCF/LEF inhibint la transcripció de gens diana de la via.

## INTRODUCCIÓ



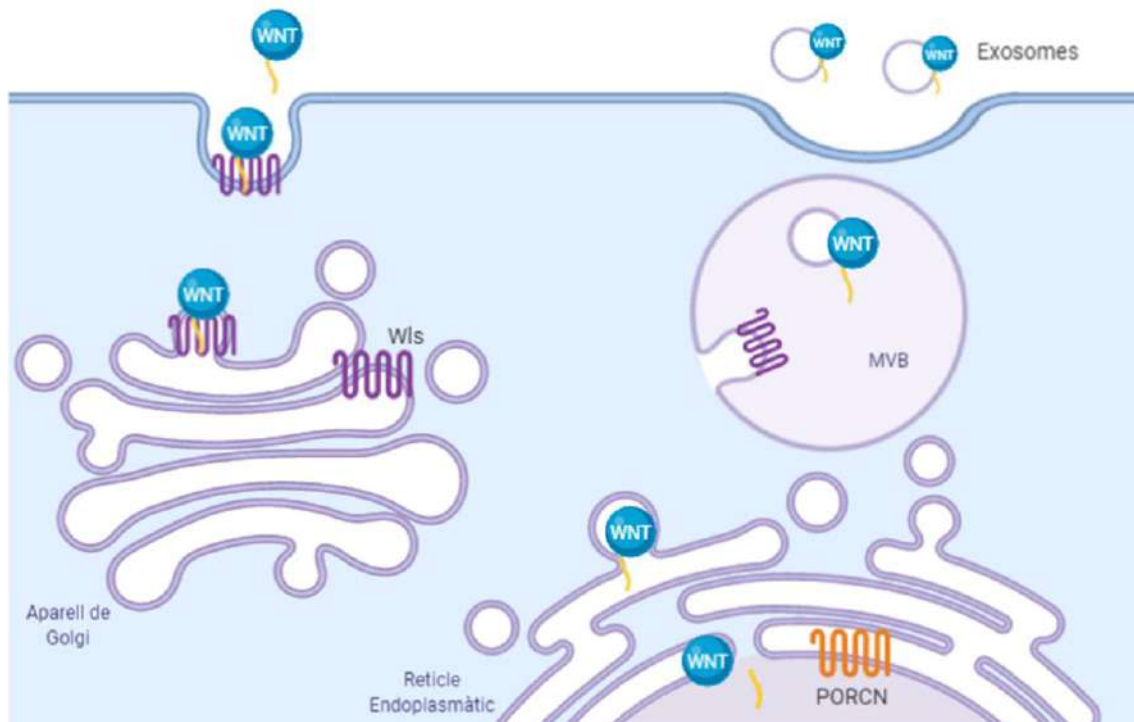
**Figura I2. Esquema de la via de senyalització Wnt/β-catenina.** A l'esquerra, la via s'activa quan els lligands Wnt s'uneixen als receptors FZD i LRP5/6, activant a DVL la qual inactiva al complex de destrucció de β-catenina format per: Axina, APC, CK1α i GSK-3β. Com a conseqüència, β-catenina s'acumula al citoplasma i acaba translocant-se al nucli on s'uneix a diferents coactivadors i al complex de transcripció TCF/LEF per activar la transcripció de gens diana de la via. A la dreta, en absència de lligands Wnt, el complex de destrucció fosforila β-catenina per ser reconeguda per la ligasa βTrcp, la qual marca β-catenina per ser degradada a través del proteasoma.

### 1.1. Producció i secreció de lligands Wnt

Hi ha diversos estudis relacionats amb el mecanisme pel qual es produeixen els lligands Wnt i són secretats fora la cèl·lula, però avui en dia encara hi ha molts aspectes que es desconeixen. Durant la síntesi dels lligands, aquests són modificats per l'addició d'un grup acil, anomenat àcid palmític [33–36], per la proteïna Porcupina (PORCN) al reticle endoplasmàtic. Durant la maduració dels lligands Wnt, les proteïnes transmembrana Wntless/Evi (Wls) s'uneixen a ells i els transfereixen cap a la membrana plasmàtica on seran secretats [37–41]. La manera en què aquests lligands Wnt secretats arriben a les cèl·lules veïnes per tal d'unir-se als receptors de membrana encara està per determinar. Hi ha estudis que suggereixen que els lligands Wnt són transportats per vesícules extracel·lulars com els exosomes [42–44], de manera que el lligand Wnt es troba a la superfície d'aquestes vesícules i es pot unir al receptor de membrana d'altres cèl·lules per activar la via. Altres, proposen un model basat en el contacte directe entre les cèl·lules productores de lligands Wnt i les cèl·lules receptores, on els receptors Frizzleds i les ligases transmembrana Rnf43/Znrf3 desenvolupen un paper important [45,46] (Figura I3).

Malgrat la síntesi de lligands Wnt és un procés comú per tots els lligands Wnt, històricament se'ls ha classificat com a lligands de la via canònica (WNT-1, WNT-3A, WNT-8 i WNT-8B) i lligands de la via no canònica (WNT-4, WNT-5A i WNT-11). Estudis

recents han demostrat que aquesta classificació de lligands Wnt de la via canònica i lligands Wnt de la via no canònica no és del tot correcte, ja que l'activació d'una via o altra depèn del tipus de cèl·lula i dels receptors que expressen aquestes, més que dels lligands Wnt [47,48].

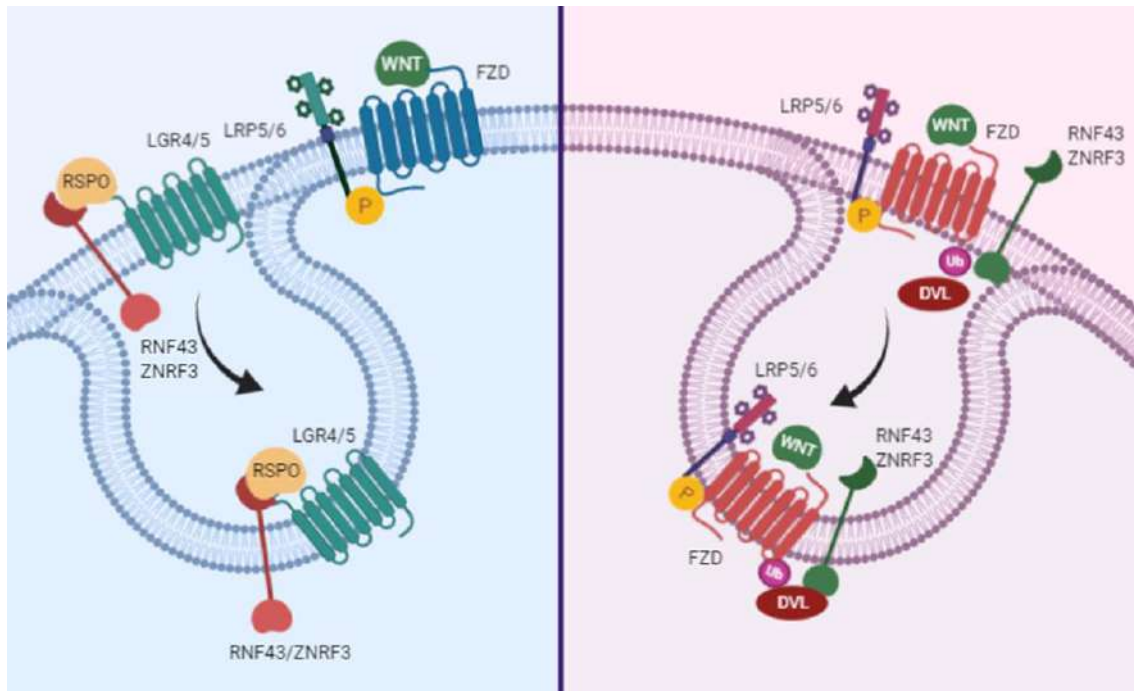


**Figura I3. Esquema de la síntesi i secreció dels lligands Wnt.** Al reticle endoplasmàtic, Porcupina palmotila als lligands Wnt per tal que les proteïnes Wls els puguin guiar cap a la seva secreció a través de la membrana cel·lular. A la dreta, es mostra un dels mecanismes de secreció de lligands Wnt proposat a la literatura, la secreció de lligands Wnt a través d'exosomes o vesícules extracel·lulars formades als MVB (de l'anglès, *multivesicular body*).

## 1.2. L'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43

Recentment s'ha descrit un mecanisme d'activació, tant de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com de la via no canònica, regulat per unes altres proteïnes secretades, les R-spondin (RSPO1-4) [49,50] (Figura I4). Aquestes proteïnes s'uneixen als receptors de membrana Lgr4 i Lgr5 (de l'anglès, *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*) a la vegada que als dominis extracel·lulars de les proteïnes homòlogues RNF43 (de l'anglès, *Ring finger protein 43*) i ZNRF3 (de l'anglès, *Zinc and ring finger 3*), provocant l'autoubiquitinació d'aquestes. Com a resultat, augmenta la presència de receptors Frizzleds a la membrana cel·lular i per tant potencia l'activació de la via [51]. Això s'explica perquè, com també s'ha descobert recentment, existeix un mecanisme de regulació de l'activitat de la via a través del control dels nivells de receptors Frizzled a la membrana cel·lular. Aquest mecanisme ve regulat per les mencionades proteïnes RNF43 i ZNRF3, que són unes E3 ubiquitina lligases que inhibeixen la via Wnt promovent la ubiquitinació i degradació dels receptors Frizzled [51–53]. El mecanisme pel qual RNF43 i ZNRF3 reconeixen als receptors Frizzled es dona a través de la proteïna Dishevelled (DVL). Estudis publicats recentment han demostrat que durant aquest mecanisme de regulació negatiu DVL té una funció, diferent de la comentada a l'apartat 1, la d'unir-se a les proteïnes RNF43 i ZNRF3 per tal d'afavorir la degradació dels receptors de membrana Frizzleds [54].

## INTRODUCCIÓ



**Figura 14. Esquema de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43.** A l'esquerra, mecanisme de regulació de les proteïnes RSPO2/3, les quals a través de la unió amb els receptors Lgr4/5 i RNF43/ZNRF3 provoquen la seva autoubiquitinació i augmenten la presència de receptors FZD a la membrana cel·lular. A la dreta, mecanisme de regulació negatiu de la via Wnt, les proteïnes RNF43/ZNRF3 reconeixen als receptors FZD, a través de DVL, provocant la seva degradació.

### 1.3. Translocació de $\beta$ -catenina al nucli

L'entrada i sortida de proteïnes del nucli se sol donar a través d'uns complexos anomenats porus nuclears, de manera que proteïnes petites (< 50 kDa) difonen lliurement a través d'aquests porus i proteïnes de mida més gran (> 50 kDa) són transportades selectivament, només si presenten unes determinades seqüències de senyal de transport nuclear [55].  $\beta$ -catenina és una proteïna amb una mida de 90 kDa que no presenta cap d'aquestes seqüències de transport nuclear, la qual cosa fa pensar que hi ha d'haver algun mecanisme, pràcticament encara desconegut, que reguli aquest transport de  $\beta$ -catenina al nucli [56,57]. Alguns dels mecanismes proposats suggereixen la interacció de  $\beta$ -catenina amb determinades nucleoporines (Nup358, Nup62, Nup98 i Nup153) per tal d'entrar al nucli a través d'aquests complexos de porus nuclears [58–61]. Altres, involucren a diferents factors de transcripció, ja que aquests contenen seqüències de senyal de transport nuclear i s'uneixen a  $\beta$ -catenina, per tant podrien guiar l'entrada d'aquesta al nucli a través dels mecanismes convencionals [56,62–64]. Com és el cas del factor de transcripció LEF-1, el qual s'ha vist que en determinades circumstàncies s'uneix a  $\beta$ -catenina al citoplasma regulant la seva entrada al nucli [65]. És més, hi ha estudis que demostren que la unió de  $\beta$ -catenina amb el complex transcripcional TCF/LEF-1 estableix la presència de  $\beta$ -catenina al nucli inhibint la seva sortida cap al citoplasma [66–68]. De forma similar també ho farien les proteïnes pygopus (Pygo) o Legless (BCL-9) [69–71].

### 1.4. Activació de la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina

Com ja s'ha comentat anteriorment, un cop al nucli,  $\beta$ -catenina desplaça la proteïna inhibidora Groucho del complex de transcripció TCF/LEF-1 per tal d'activar la



transcripció de gens diana de la via. Un cop unida al complex de transcripció TCF/LEF-1,  $\beta$ -catenina s'uneix a un dels dos coactivadors transcripcionals, CBP (de l'anglès, *cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein*) o p300 (*E1A-binding protein 300 kDa*). Degut al seu grau d'homologia, des de fa temps que es creu que aquests dos coactivadors tenen funcions redundants. Recentment s'ha demostrat que això no és així i que aquests dos coactivadors tenen diferents funcions, tant en el creixement com, en la diferenciació cel·lular i el desenvolupament [72–76]. Així, sembla ser que la unió CBP/ $\beta$ -catenina iniciaria la transcripció de gens relacionats amb el manteniment de la pluripotència i la proliferació cel·lular, mentre que la unió p300/ $\beta$ -catenina activaria un programa transcripcional relacionat amb la diferenciació cel·lular [77,78]. L'activació de gens diana de la via inclou: factors de transcripció com C-MYC, LEF-1 o TCF, reguladors del cicle cel·lular com CCND1 o CDC25A, factors de creixement com VEGF o TGF- $\beta$ , proteïnes de la matriu extracel·lular com la fibronectina, enzims i citoquines proinflamàtores com IL-8 o COX-2, així com proteïnases com MMP-2 o MMP-7 [47].

## 2. La via de senyalització Wnt en càncer

La implicació de la via de senyalització Wnt en càncer ve donada, pràcticament, des del moment que es va identificar per primer cop l'activació del gen murí *int-1* durant el creixement tumoral en models de ratolí amb càncer de mama [3]. Més tard es va descobrir, ja en càncer humà, que APC interaccionava amb  $\beta$ -catenina [79,80], en aquell moment ja s'havia descrit que mutacions en *APC* donaven lloc a un tipus de càncer de colòn hereditari (síndrome de poliposi adenomatosa familiar, PAF) [81,82], i que la pèrdua de la funcionalitat d'APC afavoria la interacció de  $\beta$ -catenina amb el factor de transcripció TCF [80]. Tot això va acabar de constatar la implicació d'aquesta via en càncer [83,84]. Més tard, també es va veure que tant, mutacions en *APC* com en *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina) eren molt freqüents en càncer colorectal no associats a PAF i que l'activació constitutiva de la via Wnt/ $\beta$ -catenina estava implicada en la carcinogènesi colorectal [85–88]. I és en aquest tipus de càncer en què la via ha estat àmpliament estudiada, malgrat això la implicació de la via Wnt s'ha descrit en diversos tipus de tumors com: melanoma, fetge, pròstata, càncer de mama triple negatiu, entre d'altres [89].

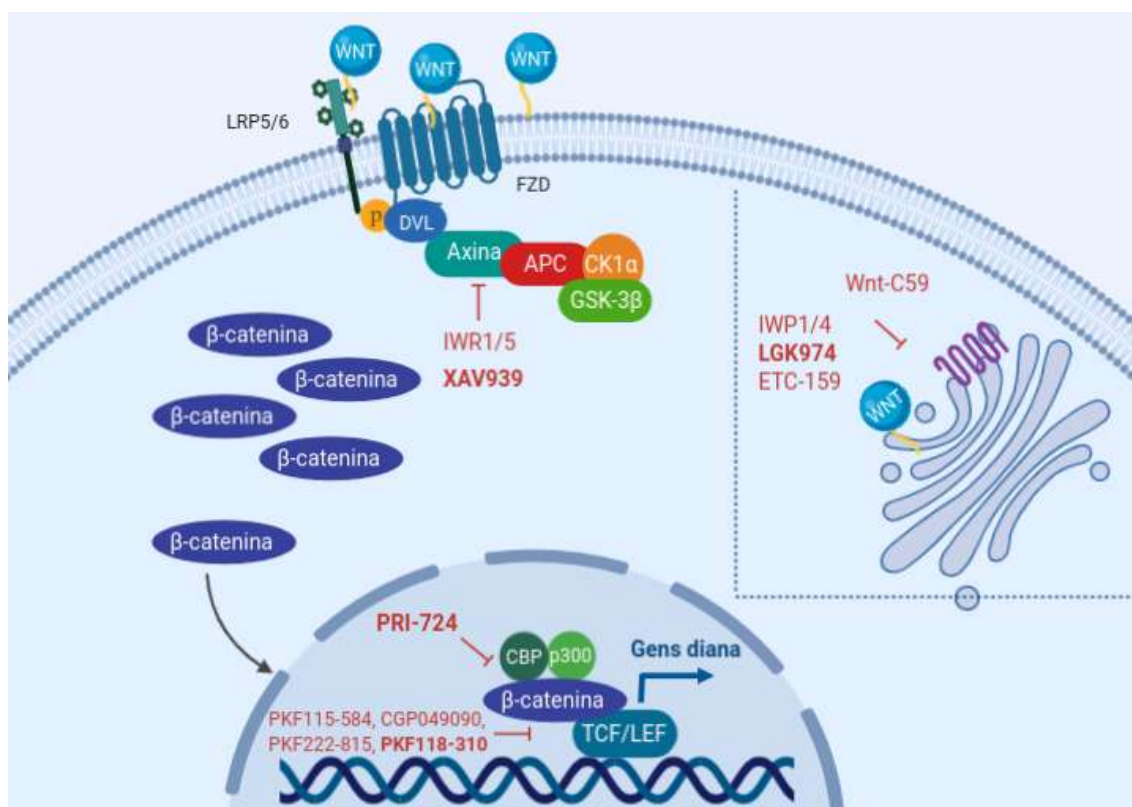
Així com, mutacions en *APC* és l'alteració de la via Wnt més freqüent en càncer també n'hi ha d'altres que provoquen l'activació aberrant de la via i la conseqüent carcinogènesi [83]. Entre aquestes destaquen alteracions en l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43, les quals han estat descrites fa relativament poc temps (2011) [90,91]. Aquestes inclouen mutacions en *RNF43* i *ZNRF3* que provoquen una pèrdua de funció de les respectives proteïnes i translocacions en *RSPO2* i *RSPO3* degudes a fusions amb els gens *EIF3E* i *PTPRK*, en concret: EIF3E(exó1)-RSPO2(exó2), PTPRK(exó1)-RSPO3(exó2) i PTPRK(exó7)-RSPO3(exó2), que provoquen una sobreexpressió de les proteïnes RSPO2 i RSPO3. En tots dos casos, aquestes alteracions semblen ser excloents amb les mutacions anteriorment descrites en *APC* i *CTNNB1*. I així com mutacions en *RNF43* i/o *ZNRF3* s'han identificat en diferents tipus de càncers on la via Wnt es troba alterada com per exemple: càncer colorectal, endometri [92], ovari [93], pàncrees [94,95] i càncer gàstric [96,97] amb unes freqüències d'entre un 4,0% i un 18,9% [53], translocacions en els gens *RSPO2* i *RSPO3* han estat descrites en

## INTRODUCCIÓ

càncer de còlon, amb una freqüència d'entre un 3,0% i un 8,0% [91,98,99]; en càncer de pròstata [100,101], Schwannoma (un subtipus de sarcoma de parts toves benigne) [102] i en càncer de pulmó no microcític escatós [53].

### 2.1. Inhibidors de la via Wnt en càncer

Degut a la implicació de la via Wnt en diferents tipus de càncer, des de fa temps s'investiga per desenvolupar molècules inhibidores de la via, que puguin contribuir a millorar les estratègies terapèutiques pel tractament d'aquests càncers en què la via està implicada. Els diferents d'inhibidors de la via descrits es poden classificar en dos grups segons a quin punt de la via actuen així, es troben inhibidors per sobre o per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització (Figura 15).

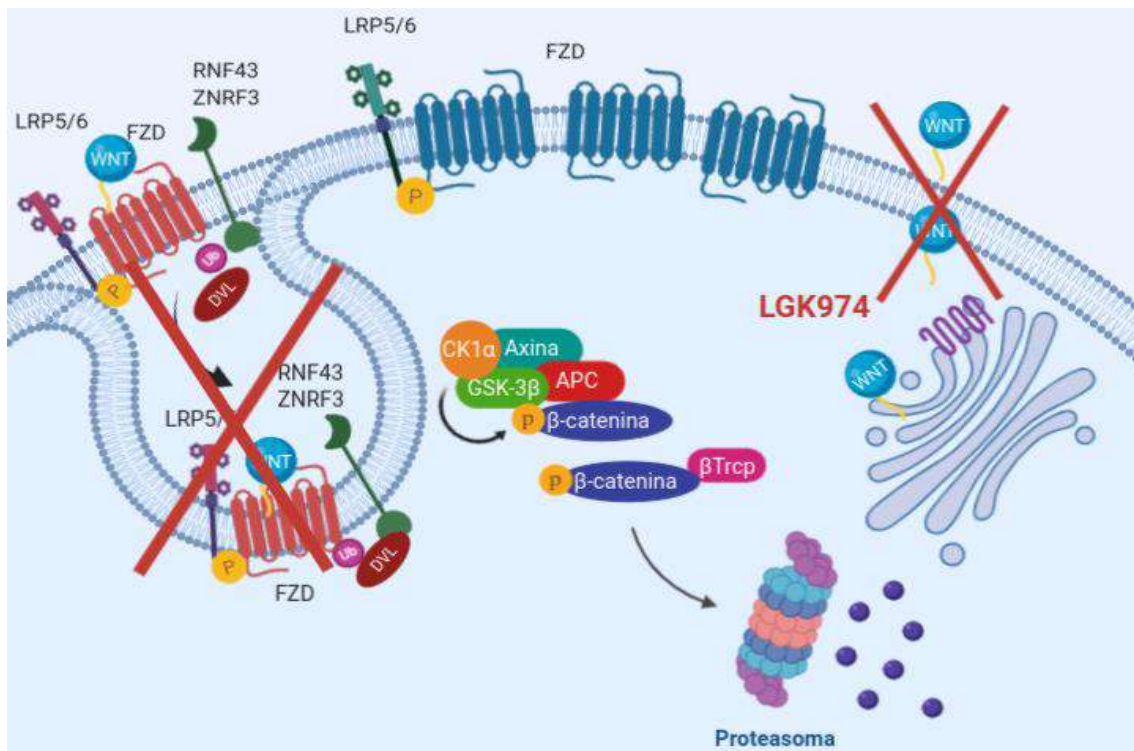


**Figura 15. Esquema dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer.** Esquema de la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina activada. En vermell es mostren les molècules inhibidores a les quals es fa referència al text, indicant a quin punt de la via actuen. En negra i vermell es mostren els inhibidors utilitzats en aquesta tesi.

#### *Inhibidors per sobre de $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització*

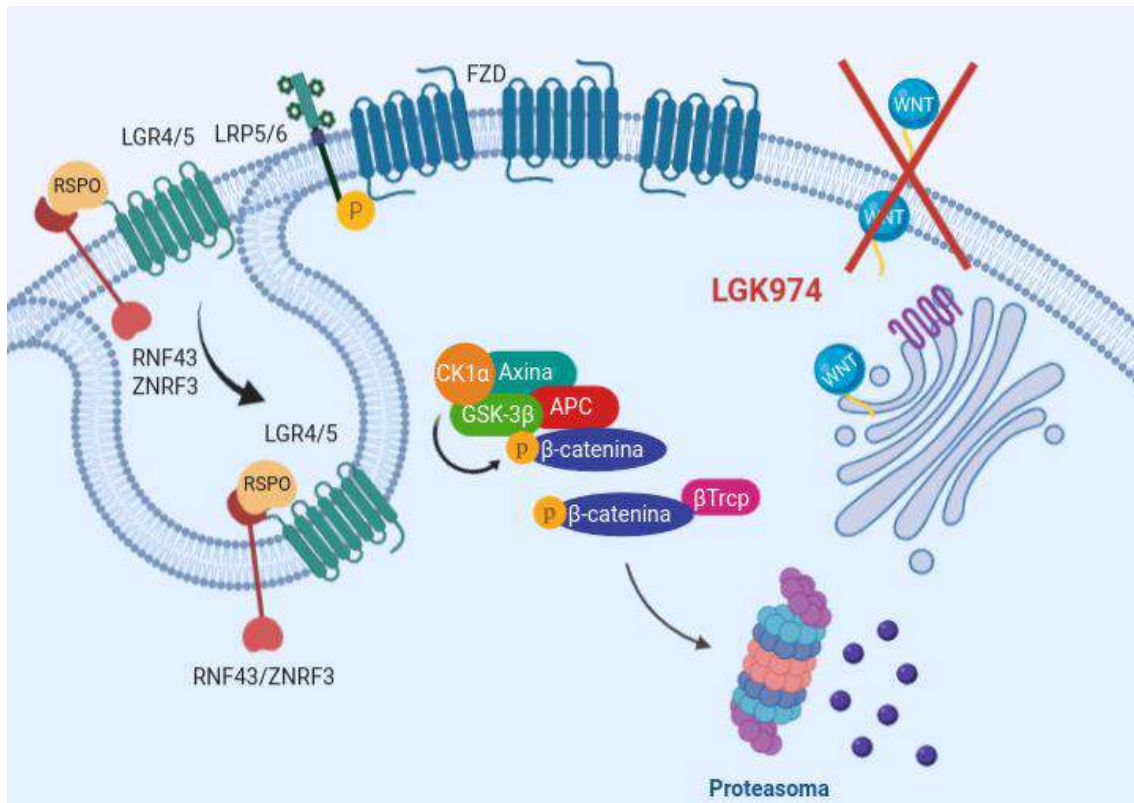
Com s'ha comentat a l'apartat 1, l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina s'inicia amb la unió dels lligands Wnt als receptors de membrana Frizzled i LRP5/6 per tant, una primera opció per inhibir la via és evitar la producció i secreció dels lligands Wnt. Els inhibidors IWP1/4 (de l'anglès, *inhibitors of Wnt production*) inhibeixen l'activitat enzimàtica de Porcupina, responsable de la palmitilació dels lligands Wnt per a poder ser secretats [103], mentre que l'inhibidor Wnt-C59 inhibeix la secreció de lligands Wnt [47].

Altres inhibidors que actuen de forma semblant es troben en fases d'assaig clínic, com és el cas de l'inhibidor de Porcupina LGK974 desenvolupat per Novartis [104–107]. En estudis preclínic, s'ha vist que l'inhibidor és altament efectiu en tumors portadors de mutacions en *RNF43/ZNRF3* o translocacions en *RSPO2/RSPO3* [106,108–110]. Com s'ha comentat a l'apartat 1.2, les proteïnes RNF43 i ZNRF3 són unes E3 ubiquitina lligases que regulen la degradació dels receptors Frizzled, formant part d'un mecanisme de regulació negatiu de la via Wnt. Les mutacions descrites en *RNF43/ZNRF3* provoquen la pèrdua de funció d'aquestes proteïnes, de manera que augmenta la presència de receptors Frizzled a la membrana cel·lular, fent que les cèl·lules tumorals presentin una alta dependència de la producció dels lligands Wnt. Per una altra banda, les translocacions en *RSPO2/RSPO3* provoquen un augment en l'activitat d'aquestes proteïnes, les quals s'encarreguen de regular la degradació de RNF43 i ZNRF3, de manera que la presència de receptors Frizzleds a la membrana cel·lular es veu augmentada, provocant el mateix efecte que el comentat anteriorment. I és per això que els tumors portadors d'aquestes alteracions són més sensibles als inhibidors de Porcupina com LGK974 (Figures I6 i I7). Actualment, aquest inhibidor es troba en assaig clínic fase I pel tractament de pacients amb càncer de pàncrees, pell, mama, cap i coll (escatós) o càncer de pulmó (escamós), tant en monoteràpia com en combinació amb un anti-PD-1 (PDR001) desenvolupat per Norvatis també. La fase de reclutament de pacients va finalitzar durant el mes de gener del 2020 (NCT01351103).



**Figura I6. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/β-catenina LGK974 en tumors amb mutacions en *RNF43/ZNRF3*.** Les mutacions descrites en *RNF43/ZNRF3* provoquen la pèrdua de funció d'aquestes proteïnes, i en conseqüència la regulació de la degradació dels receptors Frizzled, de manera que augmenta la presència d'aquests receptors a la membrana cel·lular, fent que les cèl·lules tumorals presentin una alta dependència de la producció dels lligands Wnt i fent-les més sensibles a la inhibició de la producció de lligands Wnt.

## INTRODUCCIÓ



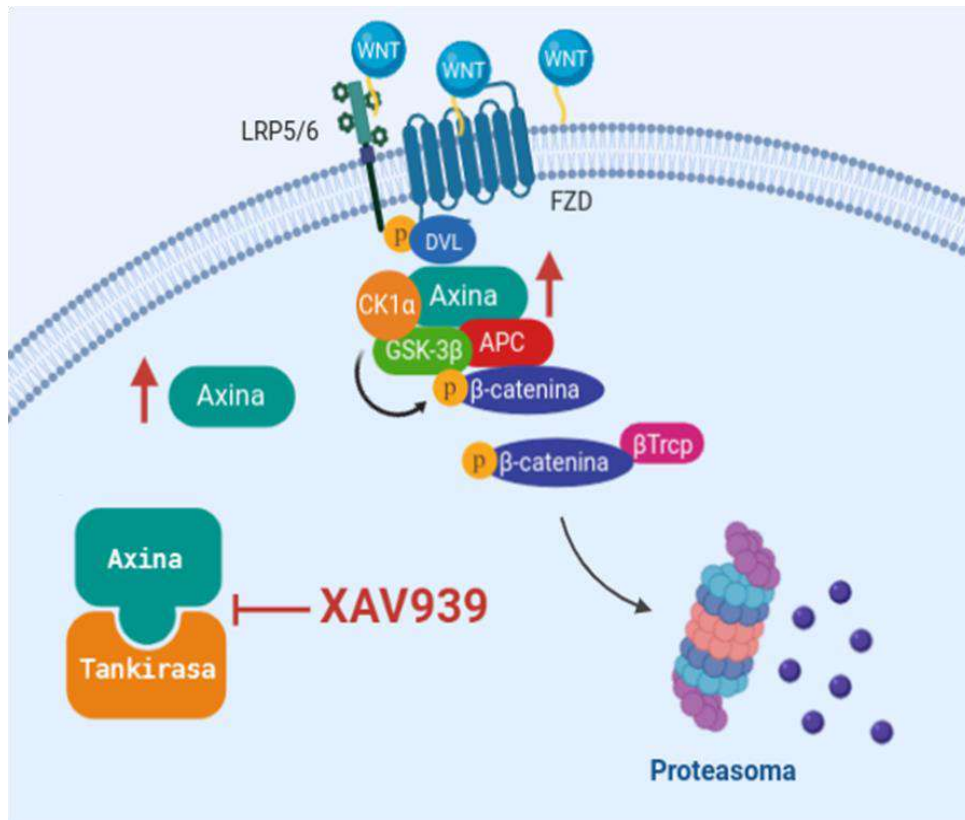
**Figura 17. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina LGK974 en tumors amb translocacions en *RSPO2/RSPO3*.** Les translocacions en *RSPO2/RSPO3* provoquen un augment en l'activitat d'aquestes proteïnes, les quals s'encarreguen de regular la degradació de RNF43 i ZNRF3, de manera que augmenta la presència de receptors Frizzleds a la membrana cel·lular. Això fa que les cèl·lules tumorals presentin una alta dependència de la producció dels lligands Wnt i les fa més sensibles a la inhibició de la producció de lligands Wnt.

Un altre inhibidor de Porcupina, ETC-159 (Singapore State D3 consortium), també es troba en fase I d'assaig clínic per a pacients amb tumors sòlids en estadis avançats [109,111,112]. En estadis preclínic, s'ha vist l'alta eficàcia de l'inhibidor en càncer colorectal amb translocacions en *RSPO2/RSPO3* [109,113]. Ja en assaig clínic, aquest inhibidor ha demostrat una tolerància acceptable, tant en monoteràpia com en combinació amb un anti-PD-1 (Pembrolizumab) (NCT02521844). Per aquests motius, es té previst començar una segona etapa de l'assaig.

Un dels principals desavantatges d'aquests inhibidors és la poca especificitat que presenten, ja que poden inhibir tant la via canònica com la no canònica.

Un altre punt clau de la via és el complex de destrucció de  $\beta$ -catenina. S'han identificat molècules dirigides als diferents components del complex per inhibir l'activació de la via. Una de les dianes ha estat la proteïna Axina que, com ja s'ha comentat, té una funció estructural, mantenint units a la resta de components (APC, CK1 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ ) per la qual cosa resulta ser el factor limitant. De manera que s'han desenvolupat molècules inhibidores de la via, a través de l'estabilització d'aquesta proteïna, els inhibidors dels enzims Tankirasa (Tnks) 1 i 2, els quals s'uneixen a Axina 1 i Axina 2 inhibint la seva degradació. Entre aquests es troben els inhibidors IWR1/5 (de l'anglès, *inhibitor of Wnt response*) i XAV939 [114,115].

XAV939 és una molècula inhibidora de la via Wnt identificada el 2009 per Huang et al. [114] que augmenta els nivells de les proteïnes Axina 1 i 2 a través de la inhibició dels enzims Tankirasa. En el treball realitzat per Huang et al. es va observar que la línia de càncer colorectal SW480 (la qual presenta una mutació en *APC*, que provoca l'expressió de la proteïna truncada) en ser tractada amb l'inhibidor XAV939 presentava un augment en els nivells d'expressió de les proteïnes Axina 1 i 2, així com, del complex axina-GSK3 $\beta$  afavorint la fosforilació de  $\beta$ -catenina (S33/S37/T41) i la seva degradació via proteasoma (Figura I8).



**Figura I8. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina XAV939.** XAV939 és un inhibidor dels enzims Tankirasa (Tnks) 1 i 2, que inhibeix la degradació de la proteïna Axina 1 i 2, estabilitzant els nivells d'Axina al complex de destrucció de  $\beta$ -catenina. Com a conseqüència, afavoreix la fosforilació de  $\beta$ -catenina (S33/S37/T41) i la seva degradació via proteasoma.

Altres estudis realitzats en càncer colorectal suggereixen que augmentar els nivells d'Axina poden compensar la pèrdua de funció del supressor tumoral APC, la qual cosa resulta molt interessant en aquest tipus de càncer on aproximadament un 80% dels pacients presenten mutacions en *APC* [116,117]. Malgrat els esforços per obtenir inhibidors dels enzims Tankirasa més selectius i potents, avui en dia aquest tipus de molècules no han entrat encara en fases d'assaig clínic. Un aspecte que cal tenir en compte sobre aquests inhibidors, és que la inhibició dels enzims Tankirasa no afecta exclusivament a la via Wnt/ $\beta$ -catenina, sinó que també inhibeix altres vies de senyalització com la de PI3K, YAP, PTEN entre d'altres [118,119].

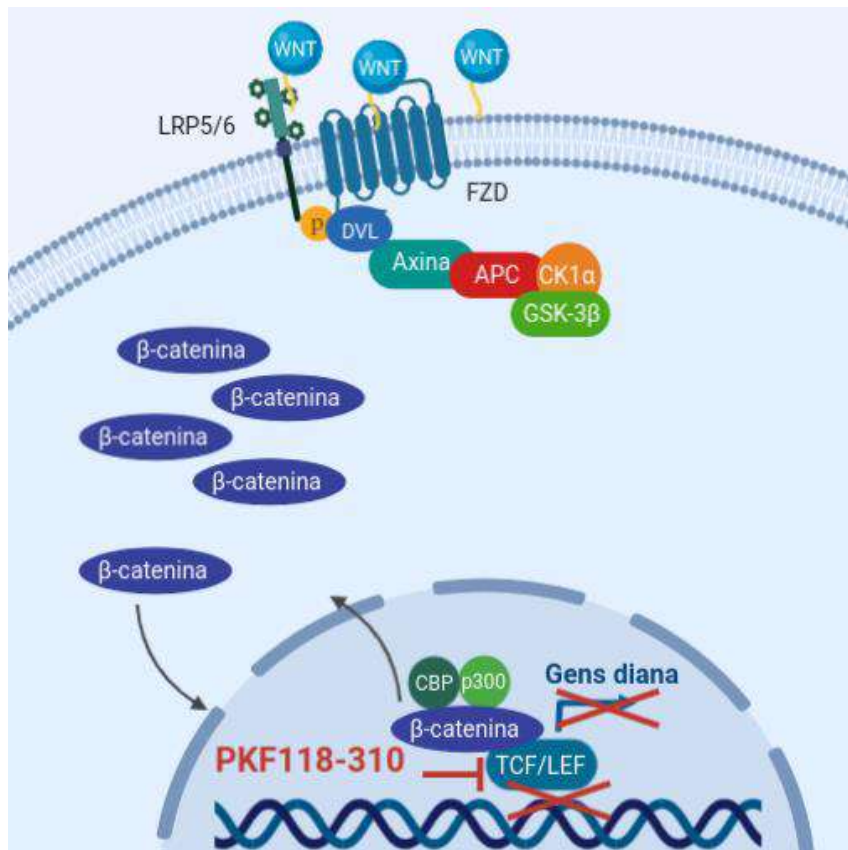
### *Inhibidors per sota de $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització*

Un cop al nucli,  $\beta$ -catenina s'uneix a un dels coactivadors CBP o p300 i al complex de transcripció TCF/LEF-1. La inhibició d'aquestes unions per tant, inactiva la transcripció

## INTRODUCCIÓ

de gens diana de la via. S'ha descrit, que dins el nucli, el complex format per TCF/LEF/ $\beta$ -catenina pot interaccionar amb més de 30 proteïnes activant diferents programes transcripcionals [120], per això es creu que la inhibició d'aquest tipus d'interaccions pot tenir grans avantatges a l'hora d'inhibir la transcripció de gens diana de la via.

La disrupció de la interacció TCF/ $\beta$ -catenina amb molècules inhibidores com PKF115-584, CGP049090, PKF222-815 o PKF118-310 ha demostrat ser molt eficaç en la inhibició de la transcripció de gens diana de la via en càncer de còlon [121,122] i en altres tipus de càncer on la via Wnt/ $\beta$ -catenina està implicada [123–125].

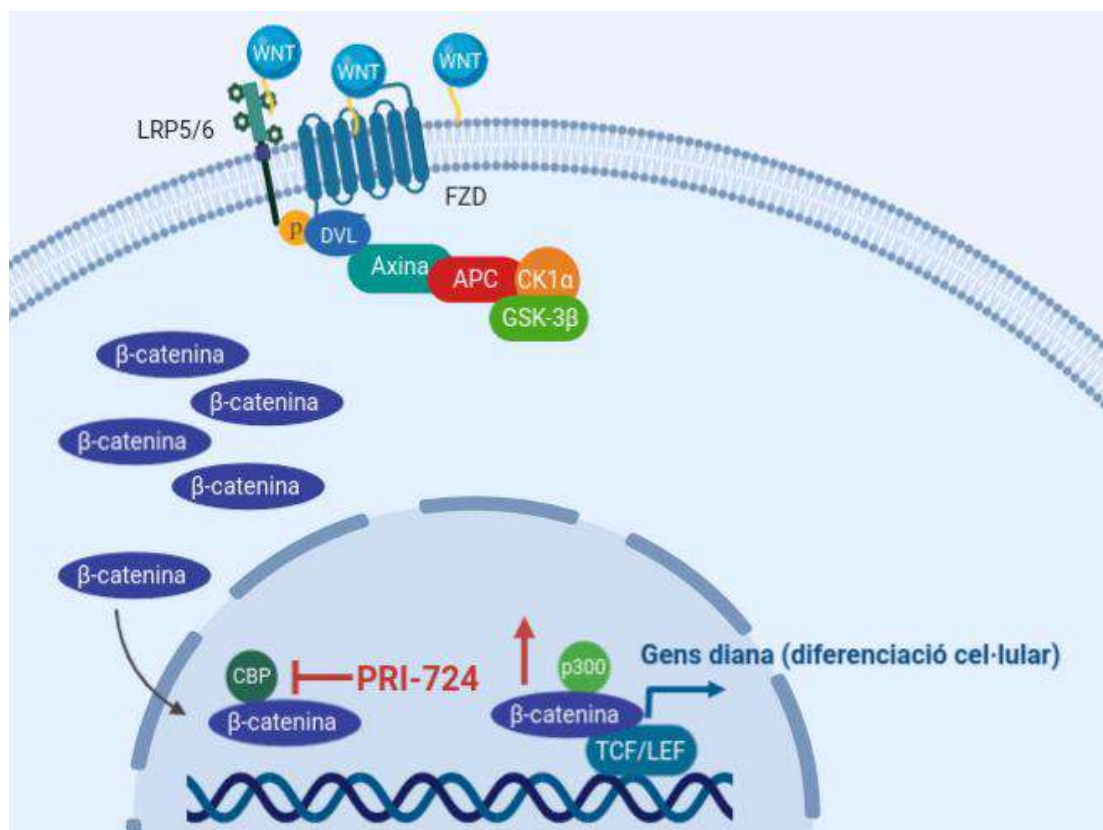


**Figura I9.** Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina PKF118-310. PKF118-310 és una toxina produïda per bacteris, coneguda pel nom de Toxoflavin [124], que impedeix la unió de  $\beta$ -catenina amb el factor de transcripció TCF, inhibint així l'expressió de gens diana de la via.

Malauradament, cap d'aquestes molècules ha passat dels estadis preclínic i encara tenen pendent l'avaluació *in vivo* d'aspectes relacionats amb la seva eficàcia i els possibles efectes secundaris derivats del seu ús. Recentment, s'ha publicat un estudi identificant un mecanisme d'acció alternatiu a la disrupció de la interacció TCF/ $\beta$ -catenina de la molècula PKF118-310 [126]: com a inhibidor epigenètic, tant en tumors sòlids com hematològics, reobrint la porta a la realització de nous estudis dissenyats per optimitzar el tractament d'aquests tumors amb l'inhibidor.

Així com els inhibidors de la interacció TCF/ $\beta$ -catenina, per ara, no han anat més enllà d'estadis preclínic, els inhibidors de la interacció de  $\beta$ -catenina amb algun dels seus coactivadors han avançat més en aquest sentit. Com és el cas de PRI-724, que impedeix la unió de  $\beta$ -catenina amb CBP, i que ha estat avaluat en 3 assaigs clínics fase I, en pacients amb tumors sòlids en estat avançat (NCT01302405), amb leucèmia

mieloide aguda i crònica (NCT01606579) i amb càncer de pàncrees (NCT01764477). PRI-724 s'uneix de manera selectiva a CBP, en concret al lloc d'unió d'aquest amb  $\beta$ -catenina, de manera que aquesta no s'hi pot unir. D'aquesta manera, inhibeix la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina relacionats amb la proliferació cel·lular i el manteniment de la pluripotència i a la vegada afavoreix la unió de  $\beta$ -catenina amb l'altre coactivador, p300, de manera que promou la transcripció de gens relacionats amb la diferenciació cel·lular (Figura 110). Aquesta inducció de la diferenciació de les cèl·lules mare tumorals augmenta la sensibilitat d'aquestes als agents citotòxics utilitzats normalment [127,128]. Aquests resultats, observats en estadis preclínic, s'han acabat traslladant a un assaig clínic fase Ib, on es tracta a pacients amb càncer de pàncrees metastàtic que han progressat al tractament en primera línia (FOLFIRINOX o FOLFOX) amb una segona línia de tractament basada en la combinació de PRI-724 amb l'agent quimioterapèutic gemcitabina (NCT01764477). Els resultats obtinguts amb aquest fase Ib conclouen que la combinació de PRI-724 amb el quimioterapèutic és segura i mostra una activitat antitumoral moderada que s'haurà de seguir estudiant en posteriors fases [129].



**Figura 110. Esquema del mecanisme d'acció de l'inhibidor de la via Wnt/ $\beta$ -catenina PRI-724.** L'inhibidor PRI-724 s'uneix de manera selectiva a CBP, impeding la unió del coactivador amb  $\beta$ -catenina. D'aquesta manera, afavoreix la unió de  $\beta$ -catenina amb l'altre coactivador, p300, de manera que promou la transcripció de gens relacionats amb la diferenciació cel·lular a la vegada que inhibeix la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina relacionats amb la proliferació cel·lular i el manteniment de la pluripotència.

## INTRODUCCIÓ

### 3. Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomes

#### 3.1. Els sarcomes

Els sarcomes són un grup molt heterogeni de tumors poc freqüents, amb una incidència molt baixa, representant menys d'un 1% de tots els tumors malignes [130]. Aquests tipus de tumors s'originen al teixit mesenquimal, és a dir, al teixit d'origen no epitelial que prové del mesoderm embrionari. Això fa que puguin aparèixer a qualsevol part del cos on hi hagi teixit mesenquimal com ara el múscul estriat o llis, el teixit fibrós o el teixit adipós, així com al cartílag o als ossos. Històricament aquests tipus de tumors es classifiquen, segons la localització del tumor, en dos grans grups: els sarcomes ossis (10%) i els sarcomes de parts toves (SPT) (90% dels quals, aproximadament un 15% són tumors de l'estroma gastrointestinal, GIST (de l'anglès, *gastrointestinal stromal tumours*)) [131] (Figura I11).

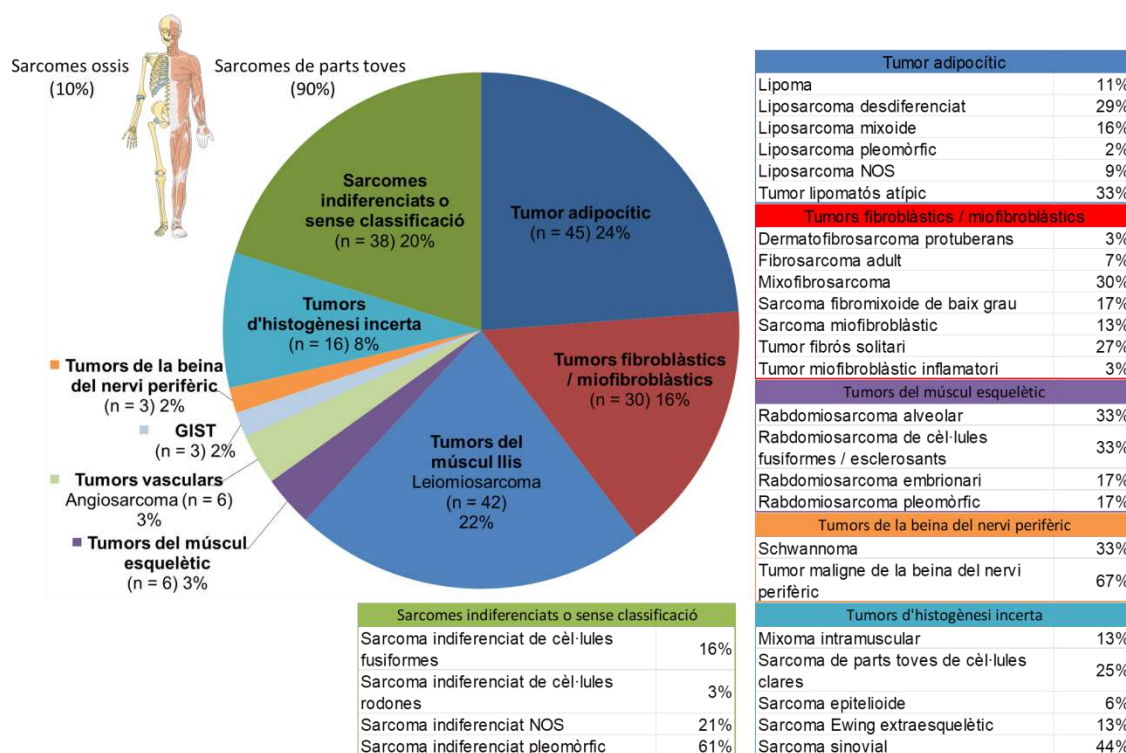


Figura I11. Percentatge de casos de SPT registrats a l'Hospital Universitari Son Espases (Palma de Mallorca) entre el 2015 - 2020. En total es varen registrar 189 casos.

#### ***Els sarcomes de parts toves***

Aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi dels sarcomes de parts toves, dels quals s'estima que la incidència a Europa és de 5 casos nous a l'any per cada 100.000 habitants [132]. Segons l'última classificació de l'OMS (Organització Mundial de la Salut), del 2013 [130], els SPT comprenen més de 50 subtipus histològics diferents. Així com els sarcomes, els SPT poden sorgir a qualsevol part del cos, fent-ho un 50% a les extremitats, un 40% al retroperitoneu i un 10% al cap i al coll [133].



*Factors de risc*

L'etiologia dels SPT es desconeix. La majoria solen aparèixer *de novo* sense que se'n conegui la causa. En alguns casos s'ha descrit l'associació de factors com l'exposició a radioteràpia o a alguns agents químics (el clorur de vinil o l'arsènic, per exemple), fins i tot alguna infecció vírica (VIH en el cas del sarcoma de Kaposi), amb el desenvolupament d'alguns subtipus de SPT. Sembla ser, que ocorren amb una major freqüència en casos de síndromes hereditaris com la síndrome de Gardner (mutació en *APC*), de Li-Fraumeni (mutació en *TP53*) o la neurofibromatosi de tipus 1 (mutació en *NF1*), entre d'altres [130,134]. Malgrat això, aquests són casos molt poc freqüents i comprenen un nombre de tumors pràcticament insignificant.

*Característiques clíniques i diagnòstic*

La simptomatologia i les característiques clíniques que duen al diagnòstic dels SPT varien en funció del lloc on es trobin. Generalment, són indolors i se solen presentar en forma de massa tova que va creixent lentament (en general el creixement dels sarcomes és expansiu i rarament infiltrant com sol passar en altres tipus de neoplàsies). Per això, la presentació de dolor es deu a la pressió que fa la massa sobre estructures adjacents com nervis o ossos. En el cas de trobar-se en el retroperitoneu els pacients poden notar lleugeres molèsties abdominals o gastrointestinals tot i que, no és fins que la massa tumoral és prou gran, que comencen a aparèixer símptomes locals [130,135]. Al voltant d'un 10% dels SPT són diagnosticats en estadis metastàtics, sent el pulmó el principal lloc d'aparició d'aquestes metàstasis. Aproximadament un 25% dels pacients amb SPT, malgrat un bon maneig del tumor primari, presenten recidives a distància (principalment pulmonars) i al voltant del 33% de pacients acaben morint a causa d'aquestes recidives pulmonars [130,136].

El principal problema en el diagnòstic dels SPT es deu al fet que la massa tumoral, inicialment, no presenta símptomes (és indolora) i a la confusió amb la patologia benigna (la incidència de tumors benignes és 100 vegades més que la de tumors malignes). Els criteris descrits per referir un pacient a un centre de referència davant la sospita de SPT són els següents: presència d'una massa de teixit tova dolorosa, amb una mida major als 5 cm o que va en augment i que estigui situada sota la fàscia profunda [137]. La complexitat del diagnòstic i el maneig dels SPT fa que sigui altament recomanable la derivació a centres de referència als pacients amb sospita de SPT. Aquests centres tenen equips multidisciplinaris formats per cirurgians, patòlegs, radiòlegs, radioterapeutes i oncòlegs especialitzats en el maneig d'aquestes neoplàsies [130–132,135,137].

En ells, se sol realitzar un diagnòstic basat en la morfologia i la immunohistoquímica, seguint la classificació publicada per l'OMS en 2013 [130]. En alguns casos, també està indicat l'estudi molecular per tal de detectar translocacions, fusions o mutacions en gens clau. L'informe realitzat als serveis d'anatomia patològica sol incloure la següent informació: tipus histològic, grau histològic i resultats de les proves moleculars o immunohistoquímica [132].

## INTRODUCCIÓ

### Classificació

#### Subtipus histològics

La majoria de SPT es classifiquen segons la seva histologia en funció del suposat teixit d'origen i, en alguns casos, en funció de la morfologia de les cèl·lules. La darrera classificació de l'OMS del 2013 [130] classifica als SPT tal com es mostra a la taula I1:

**Taula I1. Classificació dels SPT segons l'OMS (2013).**

Tumors adipocítics	Tumors fibroblàstics / miofibroblàstics
<b>Benignes</b>	<b>Intermedis (rarament metastàtics)</b>
Lipoma	Dermatofibrosarcoma protuberans
Lipomatosi	Tumor fibrós solitari
Lipomatosi del nervi	Tumor miofibroblàstic inflamatori
Lipoblastoma / Lipoblastomatosi	Sarcoma miofibroblàstic / tumor fibroblàstic
Angiolipoma	mixoinflamatori atípic
Miolipoma	Fibrosarcoma infantil
Lipoma condroide	<b>Malignes</b>
Lipoma de cèl·lules fusiformes / Lipoma pleomòrfic	<b>Fibrosarcoma adult</b>
Hibernoma	Mixofibrosarcoma
<b>Intermedis (localment agressius)</b>	Sarcoma fibromixoide de baix grau /
Tumor lipomatós atípic / <b>Liposarcoma ben diferenciat</b>	tumor de cèl·lules fusiformes hialinitzant
<b>Malignes</b>	Fibrosarcoma epiteloide esclerosant
<b>Liposarcoma desdiferenciat</b>	<b>Tumors fibrohistiocítics</b>
Liposarcoma mixoide	<b>Benignes</b>
Liposarcoma pleomòrfic	Tumor de cèl·lules gegants tenosinovial:
<b>Liposarcoma NOS</b> (de l'anglès, not otherwise specified)	tipus localitzat / difús / maligne
<b>Tumors fibroblàstics / miofibroblàstics</b>	Histiocitoma fibrós benigne profund
<b>Benignes</b>	<b>Intermedis (rarament metastàtics)</b>
Fasciïtis nodular / proliferativa / Miositis proliferativa	Tumor fibrohistiocític plexiforme
Miositis ossificant	Tumor de cèl·lules gegants de parts toves
Elastofibroma	<b>Tumors pericítics (perivasculars)</b>
Hamartoma fibrós de la infància	<b>Benignes</b>
Fibromatosi cervical o colli	Tumor glòmic (i variants)
Fibromatosi hialina juvenil múltiple	Miopericitoma
Fibroma de les beines tendinoses	Miofibroma
Fibroblastoma desmoplàstic	Miofibromatosi
Miofibroblastoma mamari	Angioleiomioma
Fibroma aponeuròtic calcificant	<b>Tumors del múscul esquelètic</b>
Angiomiofibroblastoma	<b>Benignes</b>
Angiofibroma cel·lular	Rabdomioma (adult / fetal / genital)
Fibroma de Gardner	<b>Malignes</b>
Tumor fibrós calcificant	Rabdomiosarcoma embrionari
<b>Intermedis (localment agressius)</b>	Rabdomiosarcoma alveolar
Fibromatosi superficial	Rabdomiosarcoma pleomòrfic

Taula I1. Classificació dels SPT segons l'OMS (2013) (continuació).

Fibromatosi de tipus desmoide	Rabdomiosarcoma de cèl·lules fusiformes / esclerosants
Lipofibromatosi	
Fibroblastoma de cèl·lules gegants	Tumors del teixit cartilaginós
Tumors del múscul llis	Benignes
Benignes	condroma de parts toves
Leiomioma profund	Malignes
Malignes	condrosarcoma mesenquimàtic
<b>Leiomiosarcoma</b>	condrosarcoma extraesquelètic
Tumors vasculars	Tumors d'histogènesi incerta
Benignes	Benignes
Hemangioma:	Fibromixoma acral / digital
arterial	Mixoma intramuscular / juxtaarticular
venós	Angiomixoma agressiu
sinovial	Tumor pleomòrfic angiectàtic hialinitzant
Hemangioma epitelioid	Timoma hamartomatós ectòpic
Angiomatosi	Intermedis (localment agressius)
Limfoangioma	Tumor fibrolipomatós hemosideròtic
Intermedis (localment agressius)	Intermedis (rarament metastàtics)
Hemangioendotelioma kaposiforme	Fibroxioma atípic
Intermedis (rarament metastàtics)	Tumor mesenquimal fosfatúric
Hemangioendotelioma retiforme	Histiocitoma fibrós angiomaide
Angioendotelioma papil·lar intralimfàtic	Tumor fibromixoid ossificant (inclouent: l'atípic i el maligne)
Hemangioendotelioma mixte	Tumor mixte / mioepitelioma
Hemangioendotelioma pseudomiogènic	Malignes
Sarcoma de Kaposi	<b>Sarcoma sinovial</b>
Malignes	Sarcoma epitelioid
Hemangioendotelioma epitelioid	Sarcoma alveolar de parts toves
Angiosarcoma de parts toves	Sarcoma de parts toves de cèl·lules clares
Tumors de l'estroma gastrointestinal (GIST)	Condrosarcoma mixoid extraesquelètic
Benignes / Potencial malignitat incerta / Malignes	Sarcoma Ewing extraesquelètic
Tumors de la beina del nervi perifèric	Tumor desmoplàstic de cèl·lules petites rodones
Benignes	Tumor rabdoide extrarenal
Schwannoma (i variants)	Mesenquimoma maligne
Schwannoma melanòtic	Tumors de cèl·lules epitelioides perivasculars (PEComa)
Neurofibroma (i variants)	Sarcoma intimal
Perineuroma	Sarcomes indiferenciats o sense classificació
Perineuroma intermedi maligne	Sarcoma indiferenciat de cèl·lules fusiformes
Tumor de cèl·lules granular	Sarcoma indiferenciat pleomòrfic
Mixoma de la beina nerviosa dèrmica	Sarcoma indiferenciat de cèl·lules rodones
Neuroma solitari circumscriu	Sarcoma indiferenciat epitelioid
Meningioma ectòpic	

## INTRODUCCIÓ

**Taula I1. Classificació dels SPT segons l'OMS (2013) (continuació).**

Heterotòpia glial nasal	Sarcoma indiferenciat NOS (de l'anglès, not otherwise specified)
Tumor tritó benigne	
Tumors de la beina nerviosa híbrids	
Malignes	
Tumor maligne de la beina del nervi perifèric	
Tumor maligne de la beina del nervi perifèric epitelioides	
Tumor tritó maligne	
Tumor de cèl·lules granular maligne	
Ectomesenquimoma	

Taula adaptada de [130]. En blau i negreta s'indiquen els subtipus de SPT utilitzats en la present tesi.

Malgrat que és complicat determinar quin és el subtipus més freqüent, degut en part a què les classificacions segons la histologia han anat canviant amb el temps, es pot dir que els liposarcomes (tumors adipocítics) i els leiomiomes (tumors del múscul llis) són els més freqüents amb una incidència, cada un d'ells, menor a 1 cas per cada 100.000 habitants cada any [131].

Segons la mateixa classificació de l'OMS, els SPT es poden dividir en 4 categories segons el seu creixement i la seva capacitat invasiva:

- benignes: no solen ser recurrents i el tractament amb cirurgia completa sol ser curatiu.
- intermedis (localment agressius): solen presentar recurrències locals.
- intermedis (rarament metastàtics): són localment agressius i presenten metastasis a distància en menys d'un 2% dels casos.
- malignes: en funció del subtipus i grau histològic presenten un percentatge menor o major de presentar metastasis a distància (20% - 100%). A part són els que creixen més ràpidament i presenten majors recurrències.

### Subtipus moleculars

Una altra classificació dels SPT és la basada en les seves característiques genètiques moleculars, així també es classifiquen en dos grups: els que tenen cariotips quasi diploides i alteracions genètiques senzilles (com translocacions o mutacions activadores específiques) i els que tenen cariotips complexos i desequilibrats.

Els SPT amb alteracions genètiques senzilles representen una tercera part dels sarcomes i presenten majoritàriament translocacions, les quals són específiques de cada subtipus. Aquestes translocacions solen jugar un paper fonamental, actuant com a factors de transcripció que regulen l'expressió de gens i vies de senyalització, afavorint la carcinogènesi d'aquests [138–140]. A la taula I2 es mostren les translocacions més representatives juntament amb el subtipus de SPT.

**Taula I2. Translocacions associades a subtipus de sarcomes de parts toves.**

Translocació	Gens afectats
Sarcoma de cèl·lules clares	
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
Tumor desmoplàstic de cèl·lules rodones	
t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1
Liposarcoma mixoide	
t(12;16)(q13;p11)	FUS-DDIT3
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3
Rabdomiosarcoma alveolar	
t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1A
t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FOXO1A
Sarcoma sinovial	
t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX
Tumor miofibroblàstic inflamatori	
2p23 reordenaments	TMP3-ALK; TMP4-ALK
Sarcoma alveolar de parts toves	
t(X; 17)(p11;q25)	ASPL-TFE3

Taula adaptada de [139].

Per altra banda, els SPT amb cariotips complexos presenten majoritàriament alteracions en el nombre de còpies CNA (de l'anglès, *copy number alterations*) somàtiques i amplificacions que afecten gens com: *MDM2*, *CDK4*, *JUN* i *TERT* o delecions que afecten l'expressió de coneguts gens supressors tumorals com per exemple: *CDKN2A*, *PTEN*, *RB1*, *NF1* i *TP53*. Sembla que, en la majoria de subtipus, les delecions són més prominents que les amplificacions i que les mutacions més freqüents són les que afecten supressors tumorals i no a oncogens [139,141,142].

#### *Factors pronòstics*

Existeixen diferents factors que afecten el pronòstic dels SPT com són:

- l'edat: presenten pitjor pronòstic els pacients majors de 60 anys [143]
- el subtipus histològic: subtipus associats a graus histològics alts o amb comportaments agressius presenten pitjor pronòstic [144]
- marges després de la cirurgia: les reseccions amb marges positius solen tenir més risc de recaiguda local o a distància i menors taxes de supervivència [145]
- la localització: els SPT localitzats al retroperitoneu solen tenir pitjor pronòstic que els localitzats en les extremitats, ja que el seu diagnòstic s'aconsegueix en estadis més avançats i és més complicat aconseguir marges amplis durant la cirurgia [130]
- la mida del tumor: tumors de mida superior als 5 cm tenen pitjor pronòstic que tumors més petits [146]
- l'estadi i el grau histològic: són els factors pronòstics més importants. Els SPT amb estadis més avançats tenen menors taxes de supervivència a 5 anys [147]. La supervivència a 5 anys és del 40% en SPT en els d'alt grau, mentre que en SPT de baix grau és del 75%. En SPT el grau histològic s'inclou dins l'estadi, el qual en altres tipus de neoplàsies només inclou els paràmetres TNM (T: mida i

## INTRODUCCIÓ

profunditat del tumor, N: afectació ganglionar i M: presència de metàstasis), les taules I3 i I4 mostren la darrera actualització de l'AJCC (de l'anglès, *American Joint Committee on Cancer*) pel que fa a la classificació segons l'estadi en SPT [148].

**Taula I3. Estadi i grup histològic pronòstics pels SPT localitzats al tronc i les extremitats segons l'AJCC.**

Estadi	T (Tumor primari)	N (Nòduls limfàtics)	M (Mestàstasis)	G (Grau histològic)
IA	T1	N0	M0	G1, GX
IB	T2, T3, T4	N0	M0	G1, GX
II	T1	N0	M0	G2, G3
IIIA	T2	N0	M0	G2, G3
IIIB	T3, T4	N0	M0	G2, G3
IV	qualsevol T	N1	M0	qualsevol G
	qualsevol T	qualsevol N	M1	qualsevol G

**Taula I4. Estadi i grup histològic pels SPT localitzats al retroperitoneu segons l'AJCC.**

Estadi	T (Tumor primari)	N (Nòduls limfàtics)	M (Mestàstasis)	G (Grau histològic)
IA	T1	N0	M0	G1, GX
IB	T2, T3, T4	N0	M0	G1, GX
II	T1	N0	M0	G2, G3
IIIA	T2	N0	M0	G2, G3
IIIB	T3, T4	N0	M0	G2, G3
	qualsevol T	N1	M0	qualsevol G
IV	qualsevol T	qualsevol N	M1	qualsevol G

Els paràmetres de l'estadi TNM indicats a les taules I.3 i I.4 es defineixen de la següent manera:

T (Tumor primari):

T1: mida del tumor < 5 cm

T2: 5 cm < mida del tumor ≤ 10 cm

T3: 10 cm < mida del tumor ≤ 15 cm

T4: mida del tumor > 15 cm

N (Nòduls limfàtics):

N0: absència de metàstasis als nòduls limfàtics o desconegudes

N1: presència de metàstasis als nòduls limfàtics

M (Metàstasis):

M0: absència de metàstasis a distància

M1: presència de metàstasis a distància

Per l'avaluació del grau histològic, l'OMS recomana seguir el sistema FNCLCC (del francès, *Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre Cancer*) que determina el grau histològic en funció de 3 paràmetres: la diferenciació tumoral, l'índex mitòtic i el percentatge de necrosi. Aquest sistema classifica el grau histològic en 3 grups: grau 1 (baix grau) i graus: 2 i 3 (alt grau), els quals es defineixen de la següent manera:

GX: no es pot determinar el grau histològic

G1: diferenciació tumoral total, índex mitòtic i percentatge de necrosis amb puntuació 2 o 3

G2: diferenciació tumoral total, índex mitòtic i percentatge de necrosis amb puntuació 4 o 5

G3: diferenciació tumoral total, índex mitòtic i percentatge de necrosis amb puntuació 6, 7 o 8

### *Tractament*

Els SPT requereixen una aproximació terapèutica multidisciplinària realitzada en centres de referència, la figura I12 mostra l'esquema de l'abordatge terapèutic realitzat en aquests centres.

### Malaltia localitzada

El principal tractament pels SPT localitzats és la cirurgia conservadora. Només en aquells casos on, no és possible aconseguir marges amplis o la reconstrucció funcional del membre, es planteja l'amputació. Per tal d'optimitzar el control local de la malaltia es recomana complementar la cirurgia amb radioteràpia (radioteràpia adjuvant) en pacients amb alt grau histològic (graus 2 i 3), tumors profunds i més grans de 5 cm, marges després de la cirurgia menors o iguals a 1 cm i pacients amb recidiva local i alt grau histològic que no hagin rebut prèviament radioteràpia. Pel que fa al paper de la quimioteràpia adjuvant no hi ha resultats concloents sobre el seu benefici, per la qual cosa només es recomana considerar-la una opció en casos molt seleccionats, no podent substituir mai a la radioteràpia adjuvant quan aquesta estigui indicada [131,132,137].

### Malaltia metastàtica

Amb el maneig adequat, el control local de la malaltia s'aconsegueix en un 80% - 90% dels pacients. Malgrat això, un 50% dels pacients amb SPT d'alt grau histològic acaben desenvolupant metàstasis i acaben morint a causa d'aquestes [132,137].

Els pacients que només presenten metàstasis pulmonars poden beneficiar-se de la cirurgia com a primera opció de tractament. En aquest escenari, la selecció de pacients es fa seguint els següents criteris: un interval lliure de malaltia inferior a 1 any i l'existència de no més de 3 nòduls pulmonars. Pels pacients que no puguin optar a cirurgia de les metàstasis pulmonars es recomana l'avaluació per part d'un equip multidisciplinari expert, de l'ús de la radioteràpia SBRT (de l'anglès, *stereotactic body radiation therapy*), la qual ha demostrat un bon control de les metàstasis pulmonars (superior al 80% a 5 anys) amb nivells de toxicitat acceptables [149].

Tot i això, el tractament sistèmic de la malaltia metastàtica és la quimioteràpia. El tractament estàndard en primera línia és la doxorubicina (75 mg/m<sup>2</sup>). La ifosfamida (6 g/m<sup>2</sup>- 12 g/m<sup>2</sup>) tant pot ser una alternativa en cas que la doxorubicina estigui

## INTRODUCCIÓ

contraïndicada, o una opció com a segona línia de tractament després de la progressió a la doxorubicina.

El tractament de la malaltia metastàtica inoperable amb segones línies sempre és pal·liatiu. Entre les diferents opcions (gemcitabina, dacarbacina, docetaxel, paclitaxel, entre d'altres) destaca la trabectedina, aprovada el 2007 per l'Agència Europea del Medicament com a segona línia de tractament en SPT que progressen (o que no són susceptibles a rebre) a la doxorubicina i ifosfamida [131,132,137].

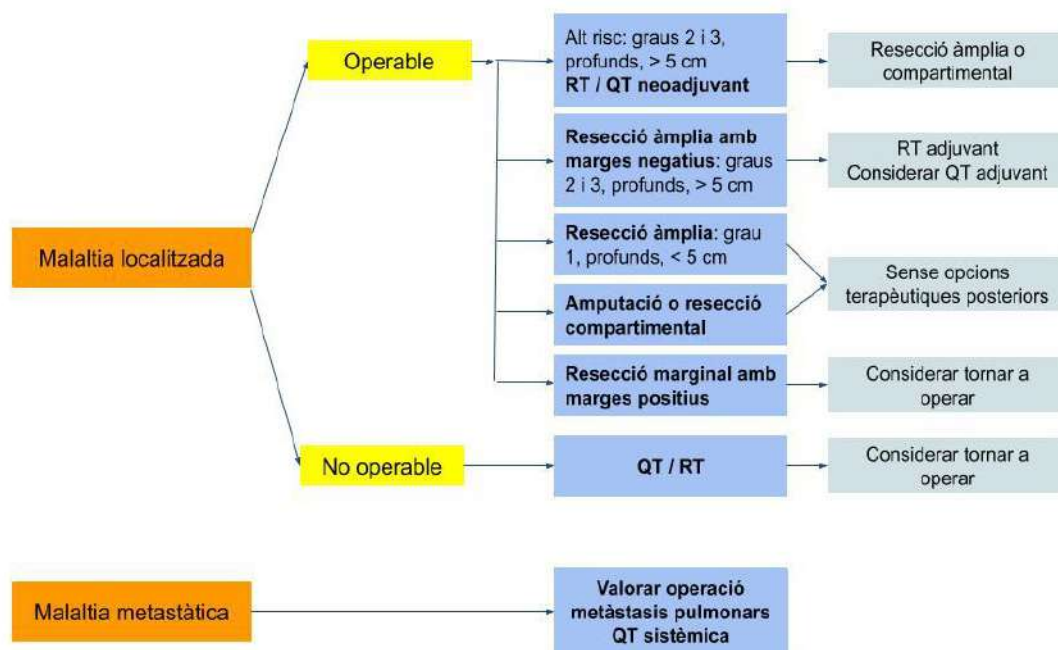


Figura I12. Esquema del maneig terapèutic dels SPT. Figura adaptada de [137].

### 3.2. La via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomes

El paper de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la carcinogènesi colorectal, així com en altres neoplàsies d'origen epitelial, ha estat àmpliament descrit a la literatura, no sent així per neoplàsies d'origen mesenquimal com els SPT. La implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en processos com l'autorenovació i la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals ha dut a la publicació de diferents estudis on es discuteix la implicació de la via en la sarcomagènesi, sent els osteosarcomes, els sarcomes d'Ewing i els sarcomes sinovials els subtipus de sarcomes més estudiats [150–154]. Destaquen diversos estudis que han demostrat una forta associació entre la via Wnt/ $\beta$ -catenina i els sarcomes sinovials on la proteïna de fusió SYT-SSX2 (SS18-SSX) provoca l'activació constitutiva de la via [151,155–157].

L'any 2011, Vijayakumar *et. al* [158], estudiant una sèrie de 12 subtipus diferents de sarcomes, van publicar que aproximadament un 50% dels tumors analitzats presentaven activació aberrant de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, promovent l'estudi de la implicació de la via en altres subtipus de SPT com els leiomiomes o els tumors malignes de la beina del nervi perifèric [159,160].

Per altra banda, l'estudi de les alteracions genètiques presents en SPT, amb l'objectiu d'identificar possibles dianes terapèutiques que millorin el maneig d'aquests pacients,



realitzats durant els últims 10 anys [141,142,161–164], han demostrat la implicació en la sarcomagènesi de vies relacionades amb la supervivència i proliferació cel·lular, la regulació de les fases del cicle cel·lular o la resposta cel·lular en condicions d'estrès [165], entre les quals destaquen la via del TP53, AKT/mTOR a través del supressor tumoral PTEN i la via de senyalització Wnt, curiosament la relació entre aquestes dues vies és coneguda i s'ha descrit la seva rellevància en càncer [166,167].

Tots aquests resultats, obren les portes a l'ús d'alguns inhibidors de la via, en assaigs clínics, per tal de millorar les teràpies actuals dels SPT. Així com existeixen diversos assaigs clínics avaluant l'ús d'inhibidors de la via Wnt en diferents tumors sòlids (NCT03447470, NCT02521844, NCT02020291, NCT02655952 entre d'altres), en SPT només n'hi ha un. És el cas de, l'assaig clínic fase I on s'avaluava la seguretat i la dosi òptima recomanada d'un anticòs monoclonal contra FZD10 en pacients amb sarcoma sinovial (NCT01469975).

## 4. Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer de pròstata

### 4.1. El càncer de pròstata

El càncer de pròstata és el més freqüent en homes a Europa, i s'estima que el 2018 es van diagnosticar 450.000 nous casos [168]. La IARC (de l'anglès, *International Agency for Research on Cancer*) prediu pel 2020 la detecció de 455.732 casos nous a Europa i 33.000 a Espanya. Aproximadament un 30% dels pacients amb càncer de pròstata els quals reben tractament hormonal acabarà progressant a un estadi més avançat de la malaltia, conegut com a càncer de pròstata hormono-resistent, CRPC (de l'anglès, *castration resistant prostate carcinoma*) [169]. Només un 4% del total de pacients amb càncer de pròstata es diagnostiquen en estadis metastàtics.

#### *Factors de risc*

L'etiologia del càncer de pròstata ha estat objecte de nombrosos estudis, tal com recull Prashanth Rawla en una revisió publicada en 2019 [168]. Els factors de risc més ben coneguts inclouen:

- l'edat: majors de 50 anys
- l'ètnia: major incidència en Afroamericans
- els antecedents familiars: un 20% pels pacients amb càncer de pròstata presenten historial familiar [170–174], en concret, al voltat d'un 9% dels càncers de pròstata són hereditaris, sent l'edat d'aparició (entre 6 i 7 anys abans) l'única diferència amb el càncer de pròstata esporàdic. Amb l'excepció dels pacients amb mutació germinal en *BRCA2* que sembla que a més, de presentar major risc de patir càncer de pròstata a edats menors als 50 anys, també ho fan amb un comportament més agressiu de la malaltia [175–177].

#### *Característiques clíniques i diagnòstic*

La simptomatologia, en les primeres fases de la malaltia, pot ser la mateixa que presenta la hiperplàsia benigna, els símptomes obstructius: interrupcions durant la

## INTRODUCCIÓ

micció, augment de la freqüència d'aquesta durant la nit o dificultat per orinar, el més habitual però és que els pacients no presentin cap símptoma. En tumors localment avançats els símptomes obstructius són més evidents, en alguns casos (poc freqüents) també presenten sang a l'orina o infeccions. Per altra banda, els tumors avançats solen presentar edemes o inflamació de les cames, dolor als ossos (a causa de les metàstasis) o inclús debilitat a les cames a causa d'una compressió de la medul·la espinal.

El diagnòstic del càncer de pròstata es basa en un examen de la mida de la pròstata, a través d'un tacte rectal i la determinació dels nivells del PSA (de l'anglès, *prostate specific antigen*) en sang. El diagnòstic definitiu es realitza en funció de les característiques histopatològiques determinades mitjançant la biòpsia.

L'ús del PSA com a test de cribratge sistemàtic en la població ha provocat una gran controvèrsia des de la seva implementació, a finals del 1990, ja que s'associa a un sobrediagnòstic de la malaltia provocant la realització de nombroses biòpsies innecessàries o el tractament de pacients quan realment no és necessari [178].

### *Classificació*

El càncer de pròstata es classifica segons la seva histologia seguint la classificació de l'OMS del 2016 [179]. El grup histològic es determina en funció del grau Gleason establert per la ISUP (de l'anglès, *International Society of Urological Pathology*) el 2014 [180–182]. Així es troben els següents grups histològics:

- Grup 1: Gleason  $\leq 6$
- Grup 2: Gleason:  $3 + 4 = 7$
- Grup 3: Gleason:  $4 + 3 = 7$
- Grup 4: Gleason:  $4 + 4, 3 + 5, 5 + 3 = 8$
- Grup 5: Gleason =  $9 - 10$

El càncer de pròstata localitzat es classifica en risc baix, intermedi i alt, tal com es recull a la taula I5.

**Taula I5. Classificació segons el risc en càncer de pròstata.**

Risc	T (Tumor primari)	Gleason	PSA (ng/ml)
Baix	T1, T2a	$\leq 6$	$\leq 10$
Intermedi	T2b	7	10 – 20
Alt	$\geq T2c$	8 -10	> 20

Pel que fa a la classificació segons els estadis es segueix l'actualització de l'AJCC del 2010 [183].

### *Tractament*

El tractament del càncer de pròstata té en compte l'estadi del tumor així com les característiques del pacient (edat, comorbiditats entre d'altres), a la figura I13 es mostra de forma resumida les opcions terapèutiques.

El tractament de la malaltia localitzada és curatiu i es basa en la prostatectomia radical o la radioteràpia junt amb el tractament hormonal en funció de cada cas. En pacients seleccionats es contempla una alternativa denominada vigilància activa, en la qual es va fent un seguiment de la malaltia amb repetides determinacions del PSA en sang i biòpsies. D'aquesta manera es reserva el tractament curatiu per més endavant [184].

En el cas de la malaltia avançada el tractament en primera línia és la teràpia de deprivació androgènica, ADT (de l'anglès, *androgen deprivation therapy*) [169]. La deprivació androgènica es pot aconseguir mitjançant la cirurgia (orquiectomia, consisteix a extirpar els testicles per tal de suprimir la secreció d'andrògens), antagonistes de l'hormona LHRH (de l'anglès, *Luteinizing hormone-releasing hormone*) o antiandrògens que competeixen amb els andrògens per la unió amb el receptor.

Basant-se en els resultats obtinguts en dos assaigs clínics fase III, CHAARTED [185] i STAMPEDE [186], es va demostrar que en pacients amb càncer de pròstata avançat hormonosensible la combinació de la quimioteràpia (amb docetaxel) amb la teràpia de deprivació androgènica suposava un benefici pel que fa a la supervivència global en comparació al tractament amb deprivació androgènica en monoteràpia. En un altre assaig clínic fase III, LATITUDE [187], la combinació d'abiraterona-prednisona amb la teràpia de deprivació androgènica en comparació amb la deprivació androgènica en monoteràpia també va resultar ser millor respecte a la supervivència global dels pacients. El tractament en primera línia del càncer de pròstata avançat hormonosensible es basa en la combinació de la teràpia de deprivació androgènica amb quimioteràpia basada en docetaxel o amb l'inhibidor de la síntesi d'andrògens abiraterona. L'abiraterona és un fàrmac que inhibeix a l'enzim responsable de la síntesi extragonadal i testicular d'andrògens (Cyp17). El fàrmac s'administra juntament amb prednisona per evitar l'aparició d'hipertensió, edemes i hiperpotasèmia produïdes per l'abiraterona.

Malauradament, la majoria de pacients amb malaltia avançada acaben generant resistència al tractament ADT, progressant a un estat de la malaltia anomenat càncer de pròstata hormonosensible (o càncer de pròstata resistent a la castració). En aquest escenari, el tractament en primera línia és la quimioteràpia amb docetaxel, per aquells pacients que no han rebut abans quimioteràpia i abiraterona o enzalutamida (antiandrogen de nova generació que inhibeix la via de senyalització del receptor d'andrògens impedit la translocació del receptor d'andrògens al nucli i la seva unió al DNA), en aquells pacients que han progressat al tractament amb quimioteràpia durant l'escenari hormonosensible [169,188,189].

## INTRODUCCIÓ

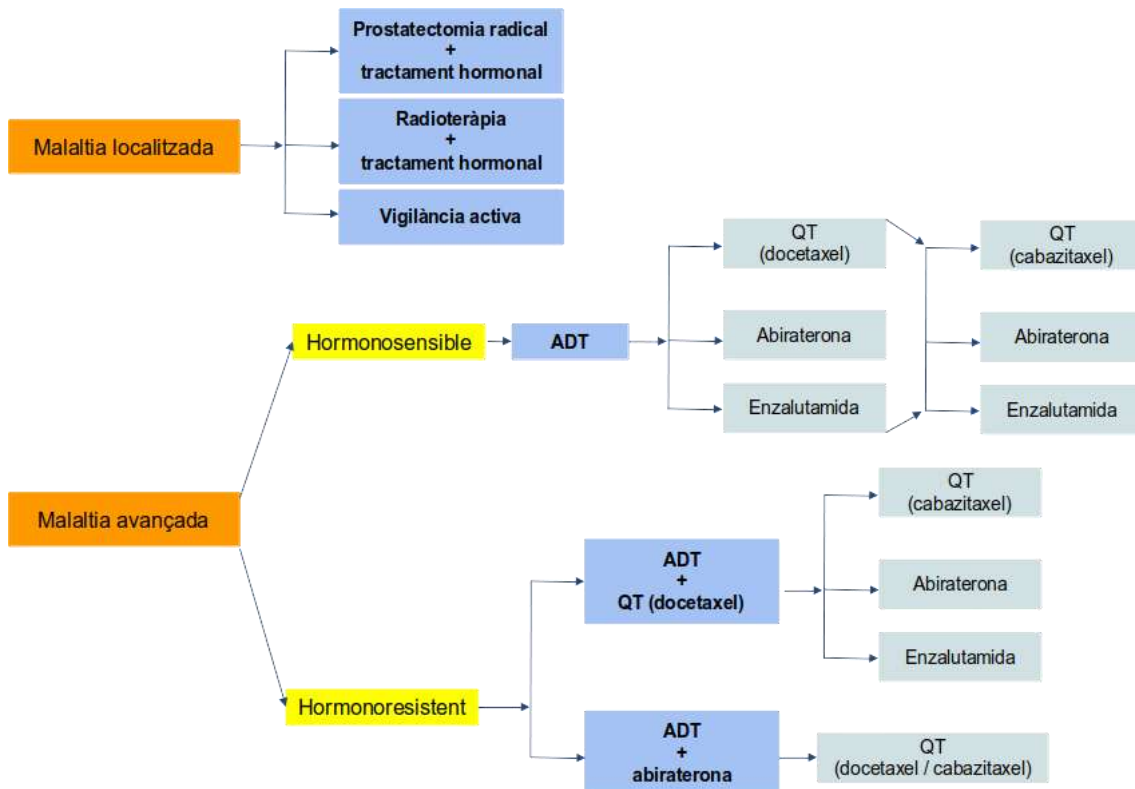


Figura I13. Esquema del maneig terapèutic del càncer de pròstata. Figura adaptada de [189,190].

### 4.2. La via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer de pròstata

Des de finals del 1990 principis del 2000, s'ha estudiat la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en càncer de pròstata, així com en altres tipus de càncer. Així, en els darrers 10 anys, s'han detectat diferents alteracions de la via implicades sobretot en la malaltia avançada hormonoresistent, CRPC.

En 2015, l'estudi multicèntric publicat per Robinson *et. al* [100], on estudiaven les alteracions genètiques de 150 mostres de CRPC, va revelar que la majoria de les mostres presentaven alteracions en el gen *AR* (de l'anglès, *androgen receptor*), així com mutacions en *CTNNB1* o *APC* (en un 18% de les mostres) i altres alteracions moleculars en components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina.

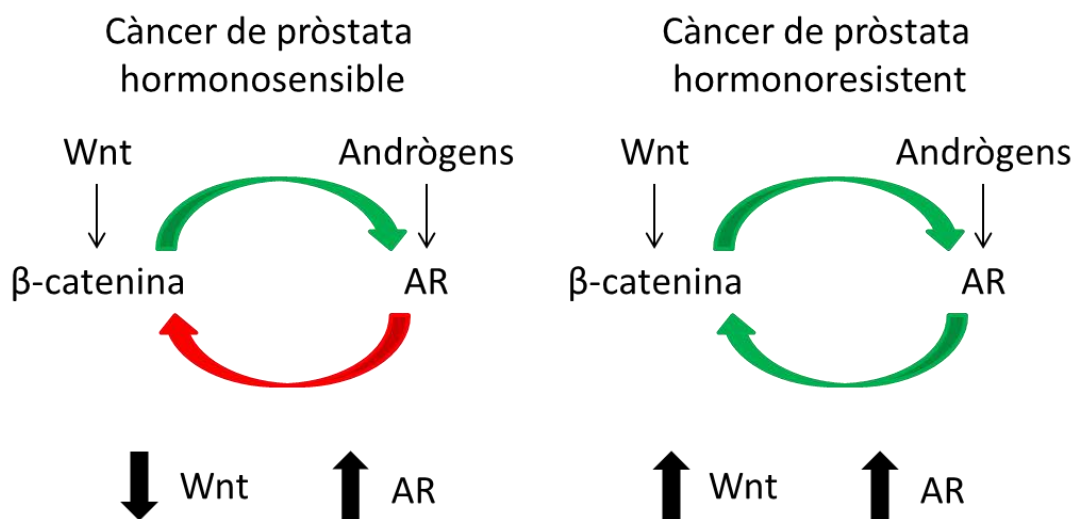
Altres estudis també han descrit vàries alteracions de la via en CRPC com per exemple, la sobreexpressió de lligands Wnt: WNT-5A, WNT-7B, WNT-11 i WNT-16B [191–195] i receptors de la via: FZD2, FZD4, FZD5, FZD8 i ROR1 [196–199], mutacions inactivadores en *RNF43* i *ZNRF3*, així com translocacions en *RSPO2* [200].

A la literatura s'ha descrit que un dels possibles mecanismes pels quals  $\beta$ -catenina es transloca al nucli és a través de la unió amb AR. Encara que aquesta unió ha estat àmpliament estudiada [201–203] i es coneix que hi ha una interacció entre la via de l'AR i la via Wnt, encara hi ha molts aspectes d'aquesta relació per aclarir.

Un article, publicat el 2000 [204] va demostrar, en cèl·lules de càncer de pròstata dependent d'andrògens (LNCaP), que  $\beta$ -catenina unint-se l'AR, augmentava l'activitat transcripcional de la via AR. En un altre article, publicat el 2015 [205], es va observar com, fent servir la mateixa línia cel·lular (LNCaP), l'estimulació amb andrògens inhibia

l'expressió de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, mentre que la inhibició de l'AR n'activava la transcripció. Per altra banda, a la mateixa sublínia cel·lular independent d'andrògens (LNCaP-abl), la inhibició de l'AR provocava un augment important de l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, suggerint el paper de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la progressió del càncer de pròstata cap a hormonosensible. Aquest mateix any, Bauman *et. al* van publicar els resultats d'un estudi suggerint que la transcripció de gens regulats pel complex  $\beta$ -catenina/TCF/LEF-1 té un paper important en la metastasi en càncer de pròstata [206]. Com s'ha comentat a l'apartat 1.3, la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina es produeix per la unió de  $\beta$ -catenina amb el complex de transcripció TCF/LEF, *LEF-1* a la vegada és un gen diana de la via. Per altra banda, s'ha descrit que LEF-1 regula l'expressió de l'AR en CRPC [207]. Tots aquests resultats, reafirmen la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la progressió de la malaltia hormonosensible cap a la malaltia hormonosensible.

En resum, sembla que en fases inicials de la malaltia (hormonosensible), hi podria haver una relació de competència entre el complex de transcripció TCF/LEF i l'AR, per la unió amb  $\beta$ -catenina [201,208]. Això fa que, mentre la via Wnt/ $\beta$ -catenina potencia l'activació de la transcripció de gens regulats per la via AR, la via de l'AR inhibeix l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. Per això, teràpies com ADT o l'ús d'antiandrògens com l'enzalutamida, en reduir els nivells d'andrògens, afavoreixen l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina [205] i la transcripció dels seus gens diana (Figura I14). De manera que la teràpia combinada d'inhibidors de la via Wnt amb antiandrògens podria millorar l'eficàcia dels tractaments actuals [209].



**Figura I14. Esquema del model proposat de la relació entre les vies de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina i AR en càncer de pròstata avançat.** En càncer de pròstata hormonosensible, la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina activa la transcripció de gens regulats per la via AR, mentre que la via de senyalització AR inactiva l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. En càncer de pròstata hormonosensible, les dues vies de senyalització s'activen l'una a l'altra promovent la transcripció de gens relacionats amb el creixement i la progressió tumoral en un ambient independent d'andrògens.

## INTRODUCCIÓ

Per altra banda, tot i que la implementació del PSA com a test diagnòstic ha suposat una millora significativa en la detecció precoç del càncer de pròstata, aquest biomarcador ha demostrat no ser fiable per les altes taxes de falsos positius [210,211]. A més, el seu ús com a biomarcador de la progressió de la malaltia, la predicció de l'agressivitat tumoral, la supervivència o la resposta als tractaments, també ha estat qüestionat [212,213].

## **II. OBJECTIUS**

## OBJECTIUS

Tot i els grans avanços en els tractaments i coneixement molecular del càncer durant els darrers anys, tal i com ha quedat recollit a la introducció resulta evident la necessitat de cercar nous biomarcadors predictius i/o pronòstics en la progressió tant dels sarcomes de parts toves com del càncer de pròstata. Estudis enfocats en millorar la comprensió sobre el paper de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la progressió d'aquestes neoplàsies, com els relacionats amb la descripció d'alteracions moleculars de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que puguin ser rellevants en aquest escenari, permetran identificar nous biomarcadors predictius de resposta a tractaments o pronòstics de la malaltia complementaris als existents així com millorar les opcions terapèutiques actuals, especialment en el cas dels sarcomes de parts toves.

L'**objectiu principal** a assolir amb aquesta tesi doctoral va ser estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la tumorigènesi i/o la progressió tumoral en sarcomes de parts toves i càncer de pròstata, per tal d'avaluar la seva inhibició com a potencial diana terapèutica i per cercar biomarcadors predictius i pronòstics.

Per això, es van establir els següents **objectius específics**:

1. Estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi, analitzant l'expressió de components clau de la via en un panell de línies cel·lulars i cultius primaris de sarcomes de parts toves.
2. Avaluar l'efecte de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a estratègia terapèutica en sarcomes de parts toves, utilitzant noves molècules inhibidores en monoteràpia o en combinació amb els agents quimioterapèutics convencionals.
3. Estudiar el paper de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la identificació de possibles biomarcadors predictius i/o pronòstics, a partir de mostres tumorals de pacients amb sarcomes de parts toves i càncer de pròstata avançat.



# **III. MATERIALS I MÈTODES**

## MATERIALS I MÈTODES

### 1. Cultiu cel·lular i mostres tumorals de pacients

Les línies cel·lulars utilitzades provenen de mostres humanes representatives de diferents tipus de tumors sòlids. Els estocs de les línies cel·lulars utilitzades es van mantenir en nitrogen líquid, i quan va ser necessari aquests estocs es van descongelar seguint un protocol estàndard de descongelació de línies cel·lulars. Totes les línies cel·lulars es van mantenir sota les mateixes condicions: dins un incubador a 37 °C, al 5% de CO<sub>2</sub>, i al 95% d'humitat. Durant la realització dels experiments els cultius cel·lulars es van mantenir a una confluència del voltant del 70% – 80%, duent a terme les pertinents dilucions setmanalment. Cada 3 mesos es va fer el control de contaminació per micoplasma a través de la plataforma científicotècnica de Citometria i Cultius Cel·lulars de l'IdISBa. El micoplasma és un microorganisme paràsit intracel·lular molt comú en la contaminació dels cultius cel·lulars. Aquest paràsit provoca alteracions en el creixement cel·lular i pot alterar els resultats dels experiments, motiu pel qual és important dur-ne un control periòdic.

#### 1.1. Característiques de les línies cel·lulars

Durant la tesi es va fer servir línies cel·lulars, tal com es mostra a la taula M1, de diferents subtipus de sarcomes de parts toves (SPT). Com a control positiu per a determinats experiments es van utilitzar 3 línies cel·lulars de càncer colorectal.

Les línies cel·lulars de sarcomes de parts toves: SK-UT-1 (HTB-114™), HT-1080 (CCL-121™) i SW982 (HTB-93™) es van adquirir a l'*American type culture collection* (ATCC®, Manassas VA; USA); les línies cel·lulars SW684 (HTB-91™) i SW872 (HTB-92™) van ser cedides per la companyia PharmaMar S.A (2011). La línia cel·lular 93T449 prové de l'Hospital Universitari de Niça (França) i va ser cedida per la Dra. Pedeutour (2012). La línia AW va ser establerta al CNIO (Madrid) i cedida pel Dr. Amancio Carnero (2011). Les línies cel·lulars de càncer colorectal: HT-29 (HTB-38™), HCT-116 (CCL-247™) i SW480 (CCL-228™) van ser cedides per la Dra. Gwendolyn Barceló de l'IdISBa (Palma) (2016).

Cada línia cel·lular es va fer créixer en el corresponent medi de cultiu (veure taula M2).

**Taula M1. Característiques de les línies cel·lulars.**

Tipus	Línia cel·lular	Sexe/Edat	Mutacions	
			APC	CTNNB1
Leiomioma	SK-UT-1	Dona/75	Sí (c.4666delA) (c.3286C>T)	No
Fibrosarcoma	HT-1080	Home/35	No	No
Fibrosarcoma	SW684	Home/68	Sí (c.5460C>T)	Sí (c.1213C>T)
Liposarcoma desdiferenciat	SW872	Home/36	No	No
Liposarcoma ben diferenciat	93T449	Dona/68	ND	ND
Liposarcoma NOS	AW	ND	ND	ND
Sarcoma sinovial	SW982	Dona/25	No	No

Taula M1. Característiques de les línies cel·lulars (continuació).

Càncer colorectal				
Tipus	Línia cel·lular	Sexe/Edat	Mutacions	
			APC	CTNNB1
Adenocarcinoma	HT-29	Dona/44	Sí (c.2557G>T) (c.4666_4667insA)	No
Carcinoma	HCT-116	Home/48	No	Sí (c.131_133delCTT)
Adenocarcinoma	SW480	Home/50	Sí (AAs1338)*	No

(Informació obtinguda dels webs: (www.atcc.org i http://cancer.sanger.ac.uk)). ND: no disponible. \* [214].

Taula M2. Característiques dels medis de cultiu de cada línia cel·lular.

Línia cel·lular	Medi	Suplements
SK-UT-1	DMEM High Glucose * amb L-Glutamina (0,584 g/l), D-glucosa (4,5 g/l) i sense Piruvat de sodi	10% Sèrum fetal boví Premium * 100 unitats/ml penicil·lina ** 100 µg/ml estreptomicina ** HEPES (1 mM) + Piruvat de sodi (1 mM) + 1x MEM-non-essential aminoàcids +
HT-1080	MEM w/Earle's Salts * i L-Glutamina (0,292 g/l)	10% Sèrum fetal boví Premium * 100 unitats/ml penicil·lina** 100 µg/ml estreptomicina** HEPES (1 mM) +
SW684 SW872 SW982	Leibovitz's L-15 ^ amb L-Glutamina (0,3 g/l) i L-aminoàcids	10% Sèrum fetal boví * L-Glutamina (2 mM) * 100 unitats/ml penicil·lina** 100µg/ml estreptomicina** HEPES (1 mM) +
93T449 AW	RPMI 1640 * sense L-Glutamina	10% Sèrum fetal boví Premium * L-Glutamina (2 mM) * 100 unitats/ml penicil·lina ** 100 µg/ml estreptomicina ** 1% Ultrosor G ** 0,5% Fungizone ^
HT-29	MEM w/Earle's Salts * i L-Glutamina (0,292 g/l)	10% Sèrum fetal boví Premium * 100 unitats/ml penicil·lina ** 100 µg/ml estreptomicina ** 1x MEM-non-essential aminoàcids +
HCT-116	McCoy's 5A * amb L-Glutamina (0,219 g/l)	10% Sèrum fetal boví Premium * 100 unitats/ml penicil·lina ** 100 µg/ml estreptomicina ** 1x MEM-non-essential aminoàcids +
SW480	DMEM High Glucose * amb L-Glutamina (0,584 g/l), D-glucosa (4,5 g/l) i sense Piruvat de sodi	10% Sèrum fetal boví Premium * 100 unitats/ml penicil·lina ** 100 µg/ml estreptomicina ** 1x MEM-non-essential aminoàcids +

\*Biowest, SAS; França, +Sigma-Aldrich, St. Louis CO; USA, ^Gibco®Invitrogen, Waltham MA; USA, \*\* PAA Laboratories Inc (GE Healthcare Bio-Science GmbH, Àustria).

## 1.2. Característiques de les línies cel·lulars primàries

Les línies cel·lulars obtingudes a partir de cultius primaris, que es mostren a la taula M3, es van obtenir de biòpsies realitzades a diferents pacients de l'Hospital Universitari Son Espases (CP0024 (2012) i CP0038 (2013)). Durant tot el procés

## MATERIALS I MÈTODES

d'obtenció de les cèl·lules es va comptar sempre amb el consentiment informat signat per part del pacient i amb l'aprovació del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de les Illes Balears (Annex 1). El cultiu primari ICP020 es va establir a l'Hospital Virgen del Rocío (2015) i va ser cedida gràcies a una col·laboració amb el Dr. Martín Broto.

Les cèl·lules obtingudes es varen cultivar en medi RPMI 1640 (Biowest) amb suplementes de: 20% sèrum fetal boví premium, FBS (de l'anglès, *Fetal Bovine Serum*) (Biowest), 100 unitats/ml de penicil·lina (PAA), 100 µg/ml d'estreptomicina (PAA) i L-glutamina (2 mM) (Biowest).

**Taula M3. Característiques de les línies cel·lulars primàries.**

	Línia cel·lular	Origen	Morfologia	Sexe/Edat
Leiomioma	CP0024	Cama	Epitelial	Dona/88
Leiomioma	CP0038	Cuixa	Epitelial	Dona/76
Liposarcoma	ICP020	Retroperitoneu	Epitelial	Dona/45

### 1.3. Característiques de les línies cel·lulars i mostres de pacients utilitzades per l'estudi de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors

Per l'estudi de la implicació de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en SPT explicat al capítol 3 de la secció Resultats, es va ampliar el nombre de línies cel·lulars de SPT gràcies a una col·laboració amb el Dr. Martín Broto de l'Hospital Virgen del Rocío. A la taula M4 es mostra les característiques de les 10 línies cel·lulars de SPT cedides.

**Taula M4. Característiques de les línies cel·lulars cedides.**

Histologia	Línia cel·lular
Leiomioma	AA
Liposarcoma	AX
Fibrosarcoma	BG
Fibrosarcoma	AZ
Sarcoma sinovial	BP
Sarcoma Ewing	BD
Sarcoma Ewing	A673
Osteosarcoma	Saos-2
Tumor Maligne de la Beina del Nervi Perifèric	BC
Rabdomiosarcoma	CE

Pel que fa a les mostres de pacients utilitzades, aquestes es van aconseguir a través del servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Son Espases i de diferents estudis del Grup Espanyol d'Investigació en Sarcomes (GEIS), la taula M5 mostra l'estadística descriptiva per a aquestes mostres de SPT agrupades per subtipus histològic, juntament amb el p-valor (test exacte de Fisher).

Taula M5. Característiques de les mostres de pacients de sarcomes de parts toves.

Variable		LMS N (%)	LPS N (%)	SS N (%)	Altres N (%)	p-valor
Sexe	Dona	2 (33,3%)	26 (42,6%)	2 (50,0%)	7 (46,7%)	0,94
	Home	4 (66,7%)	35 (57,4%)	2 (50,0%)	8 (53,3%)	
Localització	Extremitats	5 (83,3%)	16 (26,2%)	4 (100%)	9 (60,0%)	<0,001
	Retroperitoneu	1 (16,7%)	26 (42,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	Tronc	0 (0,0%)	6 (9,8%)	0 (0,0%)	5 (33,3%)	
	Altres	0 (0,0%)	13 (21,3%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	
Metàstasi	Sí	0 (0,0%)	19 (31,1%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	<0,001
	No	0 (0,0%)	33 (54,1%)	0 (0,0%)	3 (20,0%)	
	Desconegut	6 (100%)	9 (14,8%)	4 (100%)	11 (73,3%)	
Estudi	GEIS20	0 (0,0%)	12 (19,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	GEIS27	0 (0,0%)	11 (18,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	GEIS30	0 (0,0%)	35 (57,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	HUSE	6 (100%)	3 (4,9%)	4 (100%)	15 (100%)	
Progressió	Sí	2 (33,3%)	46 (75,4%)	2 (50,0%)	6 (40,0%)	
	No	3 (50,0%)	14 (22,9%)	2 (50,0%)	7 (46,7%)	
	Desconegut	1 (16,7%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	
Exitus	Sí	1 (16,7%)	31 (50,8%)	1 (25,0%)	0 (0,0%)	
	No	4 (66,7%)	19 (31,1%)	3 (75,0%)	8 (53,3%)	
	Desconegut	1 (16,7%)	11 (18,0%)	0 (0,0%)	7 (46,7%)	

Abreviatures: LMS: Leiomiocarcoma, LPS: Liposarcoma i SS: Sarcoma sinovial.

Per l'estudi de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors en càncer de pròstata avançat explicat al capítol 4 de la secció Resultats, es van seleccionar 20 pacients. Mitjançant *microarrays* d'expressió es van analitzar les diferències en l'expressió de miRNAs i mRNAs en mostres tumorals de pacients amb càncer de pròstata avançat hormonosensibles (HSPC) i hormonoinsensibles (CRPC). Per això es va fer servir 20 mostres tumorals: procedents de prostatectomia radical en el cas del grup de pacients HSPC i de reseccions transuretrals de la pròstata (RTUs) en el cas del grup de pacients CRPC. Les característiques dels dos grups de pacients estudiats, juntament amb els p-valors obtinguts (test de Wilcoxon) es mostren a la taula M6.

## MATERIALS I MÈTODES

Taula M6. Característiques del pacients amb càncer de pròstata avançat.

Variable	HSPC	CRPC	p-valor
Edat (diagnòstic)	63,5 (46 – 74)	60,5 (50 – 76)	0,520
PSA (diagnòstic) (ng/ml)	14,11 (7,25 – 27,80)	30,75 (1,41 – 314)	0,012
Gleason (diagnòstic)	7 (5 – 9)	8 (5 – 10)	0,300
Metàstasi	Sí	4 (40%)	9 (90%)
	No	6 (60%)	1 (10%)
Metàstasi (mesos)	67,5 (11 – 219)	NA	
BCR	Sí	6 (60%)	NA
	No	3 (30%)	NA
BCR (mesos)	42 (7 – 146)	NA	
Exitus	Sí	3 (30%)	6 (60%)
	No	7 (70%)	3 (30%)
Exitus (mesos)	87,5 (32 – 220)	68 (22 – 290)	0,984

PSA (de l'anglès, *Prostate specific antigen*), BCR (de l'anglès, *Biochemical recurrence*)

Tant les mostres procedents de prostatectomia radical com les procedents d'RTUs es troben al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Son Espases. Amb l'ajuda dels patòlegs es va seleccionar, de cada bloc parafinat, les zones corresponents a teixit tumoral. D'aquestes es van fer talls de 3 µm de gruix, 3 dels quals es van fer servir per a l'extracció d'RNA total seguint les instruccions del kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Thermo Fisher Scientific), tal com es detalla als apartats 6.1 i 6.2 d'aquesta secció.

### 2. Inhibidors i tractaments

Els inhibidors es van dissoldre seguint les recomanacions del fabricant. En el cas de: XAV939 (0,1 µM – 50 µM) (Sigma-Aldrich), PKF118-310 (0,1 µM – 50 µM) (Sigma-Aldrich), LGK974 (0,1 µM – 100 µM) (Novartis Pharma AG, Basel; Suïssa), PRI-724 (0,1 µM – 50 µM) (Selleckchem, Houston; USA) i de la trabectedina (0,1 nM – 10 nM) (PharmaMar S.A) el dissolvent emprat va ser el dimetil sulfòxid, DMSO (Sigma-Aldrich). Les solucions estoc es varen preparar amb DMSO al 100% a: 1,3 mM per la trabectedina i 20 mM per la resta.

La doxorubicina (Aurovitas) (0,1 µM – 100 µM) va ser proporcionada pel servei de farmàcia de l'Hospital Universitari Son Espases, a una concentració de 3,68 mM.

Les cèl·lules es van sembrar a la densitat desitjada per dur a terme cada experiment i van ser tractades amb diferents concentracions dels compostos durant els temps indicats per a cada tècnica. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle sota les mateixes condicions que les cèl·lules tractades.

### 3. Plasmidis

Els plasmidis són molècules de DNA circulars que es repliquen i transmeten independentment del DNA cromosòmic. Aquest fet, entre d'altres, fa que s'utilitzin

com a vectors de clonació en el camp de l'enginyeria genètica. Altres motius pels quals s'empren són la seva facilitat en el maneig i en la inserció de seqüències genètiques noves.

Els plasmidis són comuns en organismes procariotes encara que també es poden trobar presents en alguns organismes eucariotes com ara els llevats. La informació que contenen no sol ser essencial per la cèl·lula, sinó que atorga avantatges a la cèl·lula hoste en determinades condicions. Els plasmidis utilitzats en enginyeria genètica contenen gens que els fan resistents a determinats antibiòtics, de manera que es puguin seleccionar els clons recombinants.

Excepte el plasmidi d'expressió del gen *CDC25A*, pCMV-CDC25A (HG11291-M-N), que es va adquirir a Abyntek Biopharma, S.L (Biscaia), la resta dels plasmidis utilitzats en aquesta tesi doctoral van ser amablement cedits pel Dr. Gabriel Capellà (IDIBELL).

### 3.1. Amplificació i purificació de plasmidis

L'amplificació dels plasmidis es va fer mitjançant una transformació bacteriana seguida d'una purificació. D'aquesta manera, es va aconseguir tenir la quantitat suficient de plasmidis per a dur a terme tots els experiments i mantenir l'estoc del laboratori. La transformació bacteriana es va dur a terme seguint el protocol següent:

1. En un tub de 15 ml afegir 25 µl de bacteris (*XL-1 Blue Supercompetent Cells*, Agilent, Santa Clara CA; USA).
2. Afegir 0,425 µl de β-mercaptoetanol (Scharlab S.L., Barcelona; Espanya).
3. Incubar 10 minuts en gel. Cada 2 minuts agitar manualment.
4. Afegir 2,5 µl de plasmidi (Ci = 25 ng/µl) i remoure.
5. Incubar 30 minuts en gel, cada 5 minuts agitar manualment.
6. Fer un xoc tèrmic traient el tub del gel i posant-lo durant 45 segons en un bany a 42 °C i tornant-lo a posar en gel durant 2 minuts.
7. Afegir 225 µl de medi SOC (de l'anglès, *Super Optimal broth with Catabolite repression*) preparat tal com es mostra a la figura M1.

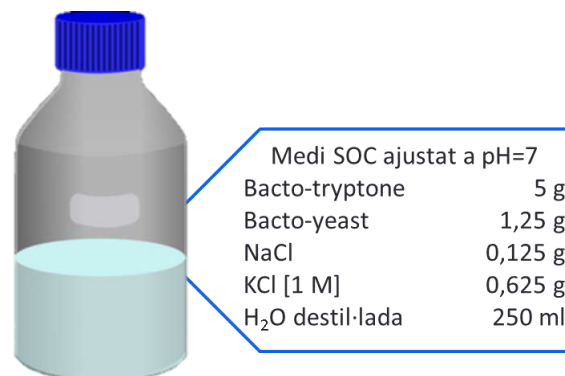


Figura M1. Composició del medi SOC utilitzat en l'amplificació dels plasmidis.

## MATERIALS I MÈTODES

8. Incubar durant 1 hora a 37 °C en agitació.
9. Afegir 25 µl i 50 µl del preparat de bacteris a cada placa de 10 on hi ha LB (de l'anglès, *Lysogeny Broth*) agar (preparat amb 17,5 g d'LB agar (Sigma-Aldrich) i 500 ml d'aigua destil·lada) amb ampicil·lina (Sigma-Aldrich) (Cf = 100 µg/ml) (es fa duplicat de cada condició).
10. Incubar les plaques cap per avall (per evitar condensació) durant tota la nit a 37 °C. Els bacteris que hagin incorporat el plasmidi creixeran formant colònies a les plaques, ja que seran resistents a l'ampicil·lina.
11. Per a cada placa preparar un tub de 15 ml amb 5 ml de medi líquid *LB Broth* (preparat amb 12,5 g d'LB agar i 500 ml d'aigua destil·lada) juntament amb 5 µl d'ampicil·lina (Cf = 100 µg/ml).
12. Amb una punta de pipeta, estèril, es pica una colònia aïllada de cada placa i es posa dins el tub de 15 ml corresponent.
13. Incubar durant tota la nit a 37 °C en agitació.
14. De cada condició triar el tub més tèrbol (aquest és el tub amb més creixement bacterià) i agafar 50 µl i afegir-los dins un tub de 50 ml on hi ha 25 ml de medi líquid *LB Broth* juntament amb 25 µl d'ampicil·lina (Cf = 100 µg/ml).
15. Incubar durant tota la nit a 37 °C en agitació.
16. Centrifugar 15 minuts a 4 °C i 6000 xg i aspirar el sobrenedant. El pèl·let es pot congelar a -20 °C.

L'extracció i purificació dels plasmidis es va dur a terme mitjançant el kit *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Venlo; Holanda). Aquest kit es basa en la purificació dels plasmidis a partir d'una lisi alcalina dels bacteris, seguida de la unió del plasmidi a una resina sota unes condicions salines i de pH adequades. L'RNA i les proteïnes junt amb les impureses s'eliminen mitjançant rentats i el DNA s'elueix junt amb un tampó d'alta concentració en sals el qual es concentra i dessala per precipitació amb isopropanol. Per últim, el pèl·let es va resuspendre en aigua lliure de RNases/DNases (Cf = 1,5 µg/µl – 3 µg/µl).

### 4. Transfecció cel·lular

La transfecció és el procés pel qual s'introdueix dins la cèl·lula eucariota material genètic extern com per exemple: una molècula petita d'RNA o siRNA (de l'anglès, *small interfering RNA*) o bé un DNA forà o plasmidi. Aquest procés pot ser estable o transitori. Es parla de transfeccions estables quan el DNA introduït dins la cèl·lula s'integra dins el genoma i per tant és transmès a les cèl·lules descendents. Pels experiments duts a terme en aquesta tesi, no va fer falta aquest tipus de transfecció, sinó que amb una transfecció transitòria ja va ser suficient. La transfecció transitòria és aquella en què el material genètic introduït no s'incorpora dins el genoma, sinó que només hi és per un període de temps limitat i per tant no es transmet amb la divisió cel·lular.



Existeixen diferents mètodes per dur a terme les transfeccions, en aquesta tesi es va optar per fer servir un mètode químic, utilitzant pels plasmidis el kit *Lipofectamine®3000 transfection kit* (Invitrogen, Waltham MA; USA) i pels siRNAs el kit *Lip Lipofectamine®RNAiMAX Reagent* (Invitrogen). La lipofectamina és un reactiu que permet la formació de liposomes en solució aquosa de manera que els plasmidis o siRNAs que es volen transfectar queden “atrapats” dins els liposomes, aquests permeten que el plasmidi o siRNA entri a la cèl·lula a través de la membrana cel·lular, a més també facilita l’entrada del plasmidi al nucli.

#### 4.1. Silenciament de l’expressió gènica: transfecció inversa

La transfecció inversa és un mètode de transfecció d’alta eficiència que se sol triar perquè és un mètode ràpid que requereix poca quantitat de l’àcid nucleic que es vol transfectar. En aquesta tesi es va optar per fer servir aquest mètode de transfecció per a fer el silenciament de l’expressió gènica amb siRNAs, ja que el protocol permet que les cèl·lules que es volen transfectar estiguin amb la solució de transfecció durant 24 – 96 hores.

##### 4.1.1. siRNAs

Els siRNAs són molècules petites d’RNA, d’entre 20 – 30 nucleòtids que participen en processos de regulació gènica i que són àmpliament utilitzats pel silenciament de l’expressió de gens d’interès. En aquest mecanisme de silenciament post-transcripcional, petites molècules d’RNA de doble cadena després de patir tot un seguit de processos passen a tenir una única cadena antisentit la qual s’uneix per complementaritat de bases a el mRNA diana, provocant la seva degradació. Aquest silenciament es produeix de manera específica per a cada gen, ja que cada siRNA és altament específic per la seqüència de nucleòtids diana al que degrada. En aquesta tesi es va fer el silenciament de l’expressió del gen *CDC25A* mitjançant el kit *ON-TARGETplus siRNA Reagents* (Thermo Scientific Dharmacon), el qual conté un *pool* de 4 siRNAs dissenyats pel mateix mRNA diana que reconeixen i s’uneixen a llocs diferents de la seqüència de mRNA. Concretament el kit *ON-TARGETplus Human CDC25A (993) siRNA-SMARTpool* 5 nmol conté 4 siRNAs de *CDC25A* les seqüències dels quals es mostren a la taula M7.

**Taula M7. Seqüències dels siRNAs de *CDC25A* (L-003226-00-0005).**

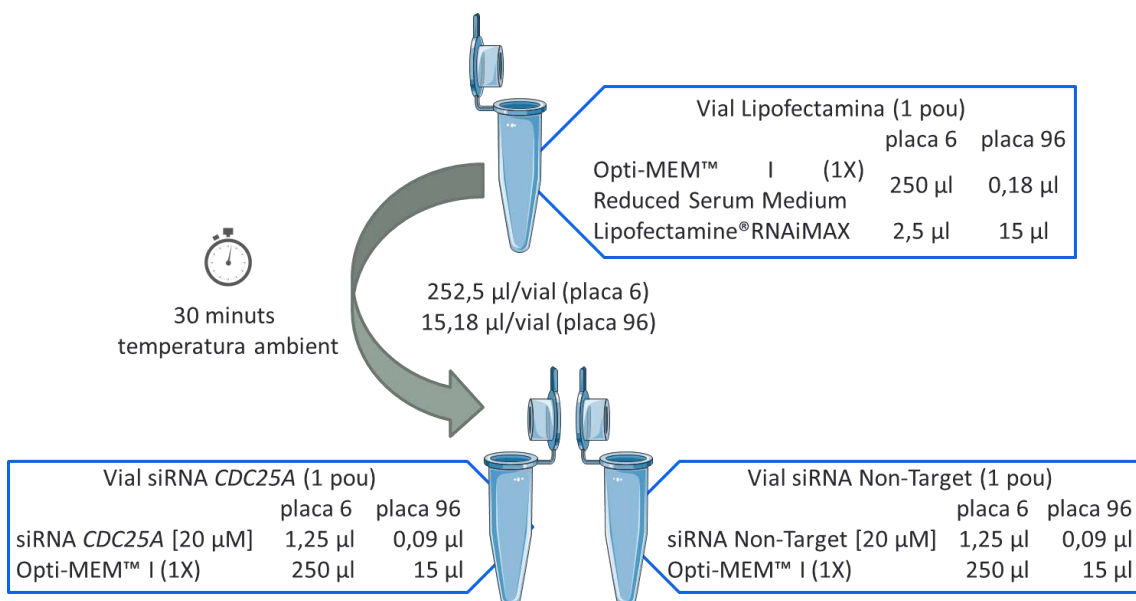
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA <i>CDC25A</i>	Seqüència
J-003226-10	GGGCAGUGAUUAUGAGCAA
J-003226-11	UCAGGUUUCUGUCUAGAUU
J-003226-12	GCAAGCGUGUCAUUGUUGU
J-003226-13	CAUGACAUCUUUCAGCUCA

En aquest cas com a control es va fer servir un *pool* de siRNA *Non-target* (D-001810-10-05), que és un *pool* de siRNAs que contenen com a mínim 4 desaparellaments amb qualsevol gen humà.

El protocol que es va seguir es detalla a continuació:

1. Preparar la solució de transfecció tal com es detalla en la figura M2.

## MATERIALS I MÈTODES



**Figura M2.** Esquema del procés de preparació de la solució de transfecció pel protocol de transfecció inversa.

- Durant els 30 minuts, tripsinitzar i contar les cèl·lules que s'han de sembrar.
- A cada pou afegir: 500 µl (placa de 6) / 30 µl (placa de 96) de la solució de transfecció.
- A cada pou afegir: 2 ml (placa de 6) / 150 µl (placa de 96) del medi corresponent sense antibiòtic amb les cèl·lules que es vol transfectar (Ci = 50000 cèl·lules/ml) (placa de 6) / (Ci = 13500 cèl·lules/ml) (placa de 96).

### 4.2. Expressió de plasmidis: transfecció directa

La transfecció directa és el mètode estàndard de transfecció que s'utilitza quan es treballa amb cèl·lules adherents, les quals es sembren 24 hores abans de ser transfectades per tal de tenir les cèl·lules dividint-se de forma activa en el moment de la transfecció. En aquesta tesi es va optar per aquest tipus de transfecció per l'anàlisi de l'activitat transcripcional de la via de Wnt mitjançant el sistema *TCF reporter*, per la co-transfecció dels plasmidis pCMV-APC amb el sistema *TCF reporter* durant l'avaluació de l'especificitat d'algun dels inhibidors de la via de Wnt i per l'experiment de rescat de la proliferació cel·lular durant l'avaluació de l'efecte del silenciament de *CDC25A* en la proliferació cel·lular.

#### 4.2.1. Sistema *TCF reporter*

El sistema *TCF* (de l'anglès, *T cell factor*) *reporter* acoblat a luciferasa permet l'anàlisi de l'activitat transcripcional de la via de Wnt. El sistema consta de dos plasmidis el TOPFlash i el FOPFlash, aquests es mostren en detall a la figura M3. El primer, el TOPFlash, conté dos llocs d'unió a TCF (sense mutar) abans del gen de la luciferasa. De manera que quan la via de Wnt està activada i  $\beta$ -catenina es troba dins el nucli aquesta s'uneix al complex de transcripció TCF/LEF per activar la transcripció de gens diana de la via, com que el plasmidi conté el gen de la luciferasa, en donar-se això, s'observa un augment en l'activitat de la luciferasa el qual es pot mesurar amb el kit *Dual-*

*Luciferase*<sup>®</sup> Reporter Assay (Promega, Madison WI; USA). Mentre que el segon, el FOPFlash, es fa servir com a control negatiu, ja que conté mutacions en els llocs d'unió a TCF, abans del gen de la luciferasa, de manera que encara que  $\beta$ -catenina s'uneixi al factor de transcripció TCF/LEF l'activitat de la luciferasa no es veu afectada.

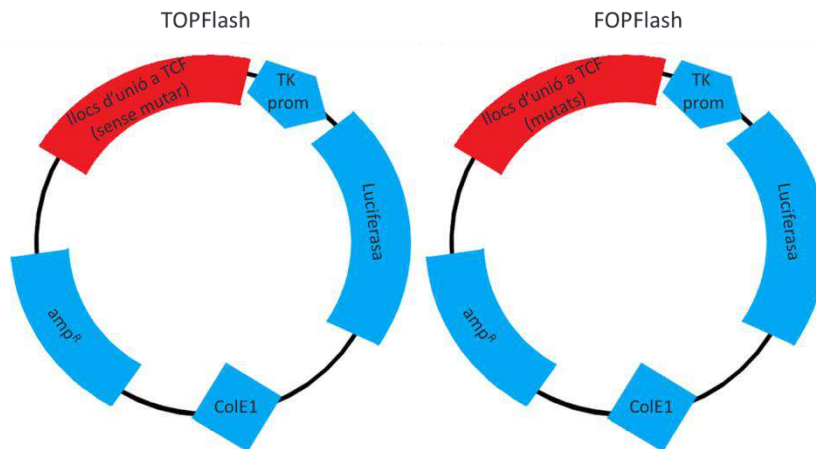


Figura M3. Plasmidis TOPFlash i FOPFlash del sistema TCF reporter.

Per normalitzar l'expressió de l'activitat luciferasa es fa servir el vector pRL-TK *Renilla*. Aquest vector es co-transfecta juntament amb el TOPFlash i el FOPFlash i serveix de control intern, per mesurar el *background* de la transfecció, a la figura M4 es mostra el vector en detall.

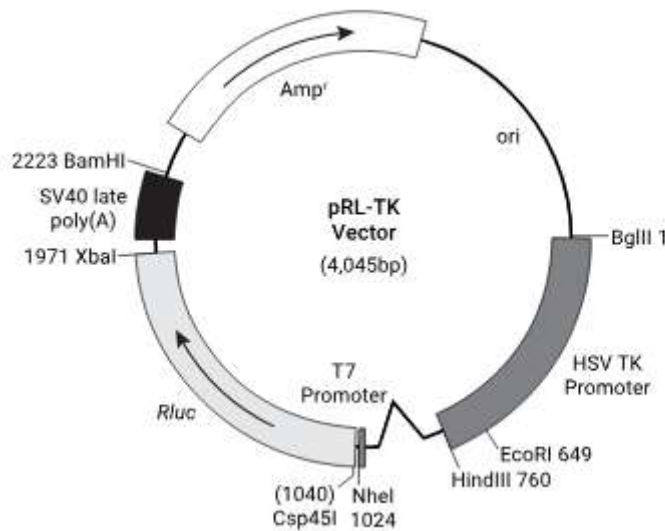
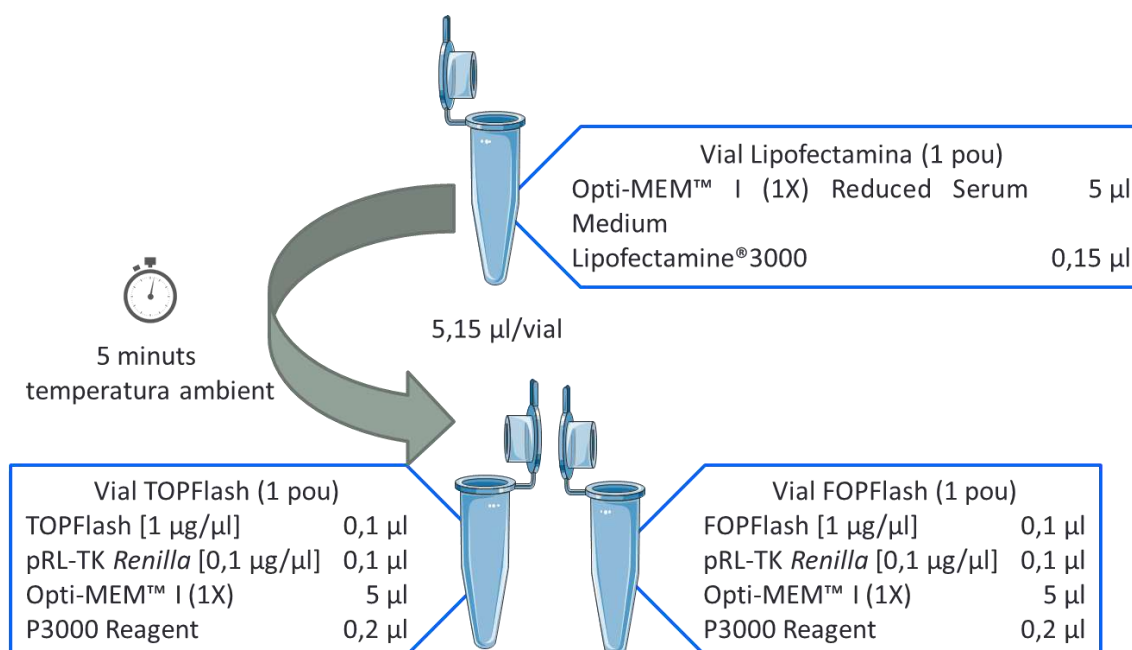


Figura M4. Vector pRL-TK *Renilla*. Imatge obtinguda de la web [www.promega.com](http://www.promega.com).

El protocol que es va seguir es detalla a continuació:

1. Sembrar les cèl·lules (200000 cèl·lules/ml) en plaques *Corning*<sup>®</sup> 96 Well White Polystyrene Microplate (CLS3610, Sigma-Aldrich). Les cèl·lules es sembren en el medi corresponent però sense antibiòtic.
2. Passades 24 hores, canviar el medi per 100  $\mu$ l/pou de medi nou (sense antibiòtic) i transfectar les cèl·lules amb 10  $\mu$ l/pou de solució de transfecció, preparada tal com es mostra a la figura M5.

## MATERIALS I MÈTODES



**Figura M5.** Esquema del procés de preparació de la solució de transfecció pel protocol de transfecció directa.

3. Passades 24 hores, mesurar l'activitat de la luciferasa amb un lector de plaques del tipus SYNERGY *microplate reader* (Biotek, Winooski VT; USA) i seguint les instruccions del kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega).

Quan es va voler avaluar l'efecte d'un inhibidor sobre l'activitat transcripcional de la via de Wnt, es va tractar les cèl·lules amb l'inhibidor en medi sense antibiòtic passades 24 hores de la sembra de les cèl·lules, just abans de fer la transfecció.

### 4.2.2. Plasmidis d'expressió

Per avaluar l'especificitat d'algun dels inhibidors utilitzats per la via de Wnt les cèl·lules es van co-transfectar amb els plasmidis TOP/FOPFlash i pRL-TK *Renilla*, juntament amb els plasmidis d'expressió: pCMV-APC WT i pCMV-APC 1309Δ així com amb el plasmidi pcDNA3.1, un vector buit que serveix de control negatiu.

El plasmidi pCMV-APC WT és un plasmidi que conté el gen sencer d'*APC*, de manera que cèl·lules que tenen la via de Wnt activada per mutacions en *APC* en ser transfectades amb aquest plasmidi redueixen dràsticament l'activitat transcripcional de la via en recuperar la funcionalitat de la proteïna APC.

El plasmidi pCMV-APC 1309Δ és un plasmidi que conté el gen d'*APC* amb una mutació que fa que la proteïna no sigui funcional al 100%.

El protocol que es va seguir és el mateix que es mostra en la figura M5, amb la modificació següent: al vial TOPFlash (i al vial FOPFlash) se li va afegir el plasmidi pCMV-APC WT, el pCMV-APC 1309Δ o el pcDNA3.1 (tots tres a una concentració de 3 µg/µl) i del reactiu P3000 es va afegir 0,4 µl en comptes de 0,2 µl.

Per avaluar el paper de CDC25A en la proliferació cel·lular es va fer un experiment de rescat en el qual passades 24 hores del silenciament de l'expressió del gen *CDC25A*, les

cèl·lules es varen co-transfectar amb el plasmidi pCMV-CDC25A (figura M6), seguint el protocol mostrat a la figura M5, amb la següent modificació: al vial TOPFlash (ara vial pCMV-CDC25A) se li va afegir el plasmidi pCMV-CDC25A (a una concentració de 0,5 µg/µl).

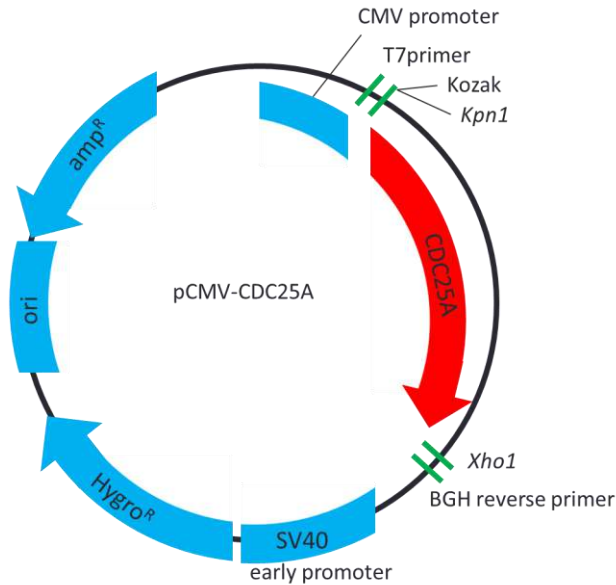


Figura M6. Plasmidi pCMV-CDC25A (HG11291-M-N). Imatge obtinguda de la web de Sino Biological Inc.

## 5. Immunofluorescència

La immunofluorescència és una tècnica d'immuno-marcatge que utilitza anticossos als quals se'ls ha unit una substància fluorescent per detectar la presència d'una molècula en concret. En aquest cas, la tècnica es va fer servir per a la localització, dins la cèl·lula, de la proteïna β-catenina en línies cel·lulars comercials i línies cel·lulars primàries de sarcomes de parts toves.

Per a la realització d'aquesta tècnica es va seguir el següent protocol:

1. Sembrar les cèl·lules en una cambra *Lab-Tek II Chamber Slide w/Cover* (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA; USA). Deixar-les créixer en un incubador fins a tenir un 80% de confluència.
2. Un cop obtinguda la confluència desitjada, fer 3 rentats (amb pipeta Pasteur) amb PBS (de l'anglès, *Phosphate Buffer Saline* (Biowest)) 1X fred (4 °C).
3. Fixar les cèl·lules amb 100 µl/pou d'una solució de metanol:acetona (1:1), aquesta solució s'afegeix en fred (20 °C). Incubar 10 minuts a temperatura ambient.
4. Eliminar la solució de fixació amb una pipeta Pasteur i fer 3 rentats amb PBS 1X fred.
5. Bloquejar les cèl·lules usant 300 µl/pou de solució BSA (de l'anglès, *Bovine Serum Albumin* (Sigma-Aldrich)) al 5% durant 30 minuts a temperatura ambient o durant tota la nit a 4 °C.

## MATERIALS I MÈTODES

6. Fer 3 rentats amb una solució de PBS 1X + 0,2% BSA (amb pipeta Pasteur).
7. Eixugar la cambra i posar-la dins una cambra humida fosca. La cambra humida fosca permet la incubació amb els anticossos en condicions d'humiditat i foscor adequades.
8. Afegir 100 µl/pou de la solució amb l'anticòs primari ( $\beta$ -Catenin (D10A8) XP®Rabbit mAb #8480 Cell Signaling Technology, Beverly MA; USA) preparada amb BSA al 0,2% (dilució 1:250). Incubar durant 1 hora a temperatura ambient i en cambra humida fosca.
9. Fer 3 rentats amb la solució de PBS 1X + 0,2% BSA.
10. Afegir 100 µl/pou de solució amb l'anticòs secundari (Alexa Fluor 488 Goat a-R A11008, Invitrogen) preparada amb BSA al 0,2% (dilució 1:150). Incubar durant 1 hora a temperatura ambient i en cambra humida fosca.
11. Fer 3 rentats amb la solució de PBS 1X + 0,2% BSA.
12. Per marcar els nuclis s'utilitza 100 µl/pou d'una solució de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Thermo Fisher Scientific) preparada amb BSA al 0,2% (dilució 1:10000). Incubar 1 minut a temperatura ambient.
13. Fer 3 rentats amb la solució de PBS 1X + 0,2% BSA.
14. Afegir una gota de *Fluorescent Mounting Media* (S3023 Dako, Carpinteria CA; USA). Tapar amb un cobreobjectes i deixar eixugar a 4 °C a les fosques.

Quan es va aplicar un determinat tractament, aquest es va fer 24 hores després d'haver sembrat les cèl·lules. En aquests casos, les cèl·lules es van rentar i fixar un cop es va decidir aturar l'experiment (normalment al cap de 48 hores de tractament).

Mitjançant un microscopi confocal (equip ZEISS LSM 710 (ZEISS, Oberkochen; Alemanya)) i l'objectiu 40X es va visualitzar la localització dins la cèl·lula de la proteïna d'interès, la  $\beta$ -catenina. Amb el software ZEN2011 (black edition 64bit) es va quantificar la intensitat del senyal de  $\beta$ -catenina. Segons aquesta intensitat, el senyal es va classificar en 4 categories:

0:= intensitat negativa; 1:= intensitat <90; 2:= intensitat entre 90 - 100 i 3:= intensitat >100.

El tant per cent de cèl·lules que van mostrar senyal d'intensitat per  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -catenina positives) també es va classificar en 4 categories:

1:= cèl·lules  $\beta$ -catenina positives entre 0% - 25%; 2:= 26% - 50%; 3:= 51% - 75% i 4:= 76% - 100%.

Amb tot això es va calcular un índex d'immunoreactivitat mitjana per a cada línia cel·lular (IRS de l'anglès, *immunoreactive score*) multiplicant els valors obtinguts amb

les dues classificacions [215]. D'aquesta manera en funció de l'IRS es van poder classificar les línies cel·lulars estudiades segons el seu perfil d'immunofluorescència en: negatiu (IRS = 0); lleu (IRS = 1 - 4); moderat (IRS = 5 - 8) i fort (IRS = 9 - 12).

### 6. Anàlisi de l'expressió gènica

L'estudi de l'expressió dels gens d'interès (gens diana de la via de Wnt) es va fer a partir de l'RNA missatge present en les diferents mostres. Per això, es va fer una extracció d'RNA total de les mostres, després es va quantificar aquest RNA, es va retrotranscriure a cDNA i finalment es va fer una PCR quantitativa.

#### 6.1. Extracció d'RNA

L'extracció d'RNA es va fer seguint diferents protocols en funció del tipus de mostra de la qual es disposava. Per a les mostres de teixit parafinat es va utilitzar el kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific), mentre que en el cas de línies cel·lulars en cultiu es va fer servir el kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific). Per a les mostres de les quals es partia de teixit tumoral congelat es va fer servir el següent protocol:

1. Pesar entre 50 mg - 100 mg de teixit congelat.
2. Dins un tub M-tube (*gentleMACS™ Tubes*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach; Alemanya) afegir el tros de teixit congelat i 1 ml de *TRIzol® Reagent* (Thermo Fisher Scientific).
3. Homogeneïtzar amb l'ajuda de l'homogeneïtzador i el programa MACS program: *RNA\_02\_M-tube*.
4. Centrifugar 3 minuts a 4 °C i 2000xg.
5. Passar el sobrenedant a un tub *eppendorf* i afegir 100 µl de cloroform.
6. Vortejar durant 15 segons i incubar 15 minuts a temperatura ambient.
7. Centrifugar durant 15 minuts a 4 °C i 18000 xg. D'aquesta manera es fa la separació de fases: a la fase aquosa s'hi troba l'RNA, a la fase orgànica les proteïnes i a la interfase s'hi troba el DNA.
8. Transferir la fase aquosa a un tub *eppendorf* nou. Aquest pas s'ha de fer amb molta cura per no contaminar la mostra agafant part de la interfase.
9. Afegir 500 µl d'isopropanol, així es fa precipitar l'RNA.
10. Vortejar durant 10 segons i incubar 10 minuts a temperatura ambient.
11. Centrifugar durant 8 minuts a 4 °C i 18000 xg.
12. Eliminar el sobrenedant i afegir 1 ml d'etanol al 75%.

## MATERIALS I MÈTODES

13. Centrifugar durant 5 minuts a 4 °C i 7000 xg.
14. Eliminar el sobrenedant, arrossegant totes les gotes que puguin quedar enganxades a la paret del tub *eppendorf*.
15. Deixar eixugar el pèl·let a l'aire durant 3 - 5 minuts.
16. Resuspendre el pèl·let amb 30 µl d'aigua lliure d'RNases. Guardar a -80 °C.

### 6.2. Quantificació i determinació de la puresa de l'RNA

Per quantificar l'RNA es va fer servir l'espectrofotòmetre *NanoVue plus* (GE Healthcare). L'espectrofotòmetre permet mesurar, en funció d'una longitud d'ona, la quantitat de llum que és absorbida per cada mostra i relacionar-la amb la seva concentració. Els àcids nucleics tenen el pic de màxima absorció a una longitud d'ona de 260 nm, així es determina la concentració d'RNA present en 2 µl de mostra.

Les proteïnes tenen el pic de màxima absorció a una longitud d'ona de 280 nm, la ràtio de valors d'absorció a 260 nm i 280 nm indica la quantitat d'RNA amb relació a la quantitat de proteïna. Aquesta ràtio és per tant un indicador de la puresa de l'RNA obtingut durant l'extracció. L'extracció d'RNA es considera correcte quan la ràtio pren valors al voltant de 2.

En el cas dels arrays d'expressió es va determinar la puresa d'aquest RNA mitjançant el Bioanalyzer (Agilent), el qual avalua la qualitat de l'RNA en funció del paràmetre RIN (de l'anglès, *RNA Integrity Number*). Es va considerar que la qualitat de l'RNA era l'adequada pels arrays d'expressió quan el paràmetre RIN va prendre valors majors o igual a 3.

### 6.3. Reacció de transcripció inversa: rt-PCR

Un cop aïllat, l'RNA es va retrotranscriure a DNA complementari (cDNA) mitjançant la reacció de transcripció inversa (rt-PCR) i utilitzant el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen). En funció de la quantitat d'RNA disponible, se'n va retrotranscriure una quantitat o una altra, això va afectar la proporció de reactius emprats per dur a terme la reacció d'rt-PCR.

Per a mostres amb poc RNA es va intentar obtenir el màxim de cDNA, per això es van retrotranscriure 64 ng d'RNA fent servir la proporció de reactius per mostra que es mostra a la figura M7.



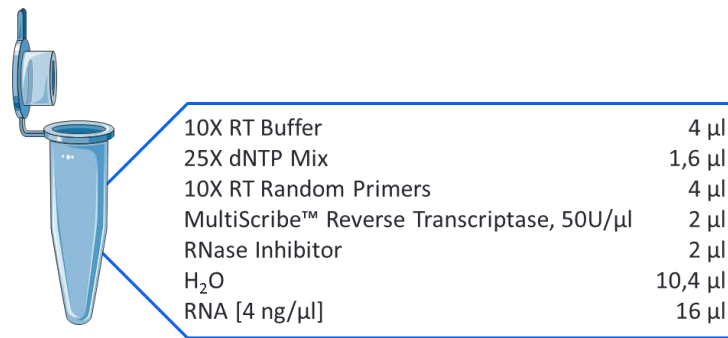


Figura M7. Màster mix utilitzada per retrotranscriure 64 ng d'RNA a cDNA.

Per a la resta de mostres es van retrotranscriure 300 ng d'RNA fent servir la proporció de reactius indicada a la figura M8.

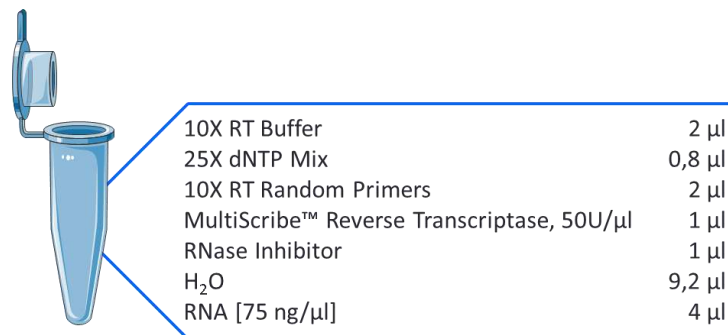


Figura M8. Màster mix emprada per retrotranscriure 300 ng d'RNA a cDNA.

Aquestes reaccions d'rt-PCR es van dur a terme amb el termociclador 2720 Thermal Cycler (Invitrogen) fent servir el programa detallat a la figura M9.

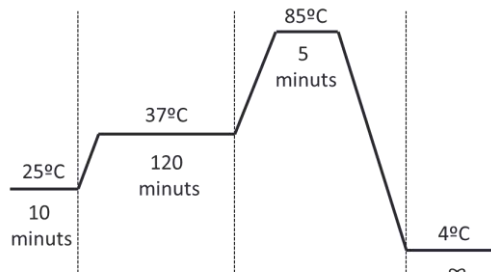


Figura M9. Programa utilitzat per les reaccions d'rt-PCR.

#### 6.4. Reacció d'amplificació del cDNA: PCR a temps real

L'expressió de l'RNA corresponent als gens d'interès es va quantificar a través d'una PCR quantitativa. La PCR quantitativa o PCR a temps real, utilitza fluorocroms durant la reacció d'amplificació de seqüència per a poder monitorar en temps real els diferents cicles d'amplificació. Els dos mètodes més usats són: el SYBR Green, en el qual els dNTPs estan marcats amb el fluorocrom i el mètode de Sondes TaqMan (Thermo Fisher Scientific), el qual utilitza sondes dissenyades que s'uneixen a seqüències determinades del cDNA. En aquesta tesi, es va realitzar la PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan utilitzant el *KAPA PROBE FAST qPCR Kit* (Sigma-Aldrich). La reacció de PCR quantitativa es va fer amb un volum final de 10 µl/pou en una placa *Hard-Shell® PCR Plates 96-well, thin wall* (Bio-Rad, Hercules, CA; USA) afegint 9 µl de la màster mix que es mostra a la figura M10 i 1 µl de cDNA a cada pou.

## MATERIALS I MÈTODES

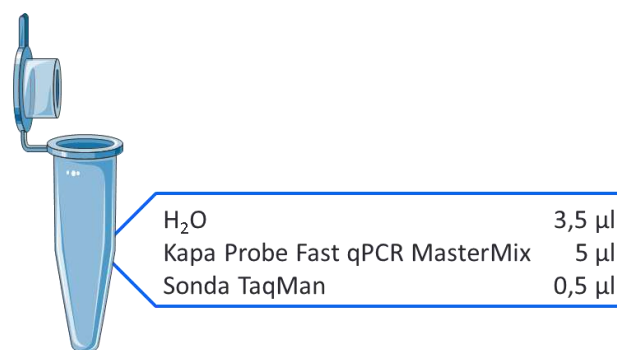


Figura M10. Màster mix emprada per les reaccions de PCR a temps real.

Un cop preparada la placa de 96 pous, aquesta es va tapar amb un film òptic *Microseal 'B' Adhesive Sealing Films* (Bio-Rad) i es va centrifugar 2 minuts a 800 xg. La reacció es va dur a terme al termociclador *CFX96 Real-Time System, C1000 Touch™ Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguint el programa detallat a la figura M9.

A la taula M8 es mostren les sondes TaqMan utilitzades.

**Taula M8. Sondes TaqMan utilitzades.**

Sonda	Referència
β2-microglobulina	HS99999907
CDC25A	HS00947994
C-MYC	HS01067802
AXIN2	HS00610344
CCND1	HS00765553
RNF43	HS00214886
ZNRF3	HS00393094
RSPO2	HS00379983
RSPO3	HS00262176

Per quantificar els canvis en el nivell d'expressió de l'RNA es va fer servir l'equació 1 [216]:

$$\text{Expressió relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (1)$$

on:

$C_q$  és el valor de *Crossing point* (cicle de la reacció a partir del qual es fa exponencial el senyal de fluorescència, quan comença l'amplificació del cDNA)

$\Delta\Delta C_q$  es va determinar emprant l'equació 2:

$$\Delta\Delta C_q = C_{q \text{ gen interès}}(\text{control} - \text{mostra}) - C_{q \text{ referència}}(\text{control} - \text{mostra}) \quad (2)$$

Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la β-2-microglobulina. Com a control es va fer servir les línies cel·lulars de càncer colorectal, la línia cel·lular de cèl·lules mare mesenquimals humanes (hMSCs), un *pool* universal d'RNA de referència humà (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA, 750500, Agilent*) o les mateixes cèl·lules utilitzades a cada experiment tractades amb vehicle i sota les mateixes condicions que les cèl·lules tractades (mostra).

## 7. Anàlisi de l'expressió de proteïnes

L'anàlisi de l'expressió de proteïnes es va fer servir per quantificar l'expressió de les proteïnes d'interès en diferents situacions: per comparar l'expressió d'una proteïna en concret entre les diferents línies cel·lulars o per determinar la presència subcel·lular (nucli o citoplasma) de la proteïna.

### 7.1. Preparació de les mostres

Per l'extracció de proteïnes de línies cel·lulars, les quals no havien estat sotmeses a cap tractament, es van sembrar les cèl·lules en plaques de 10 i es van deixar créixer fins a assolir una confluència del 70% - 80%, llavors quan es van recollir les cèl·lules.

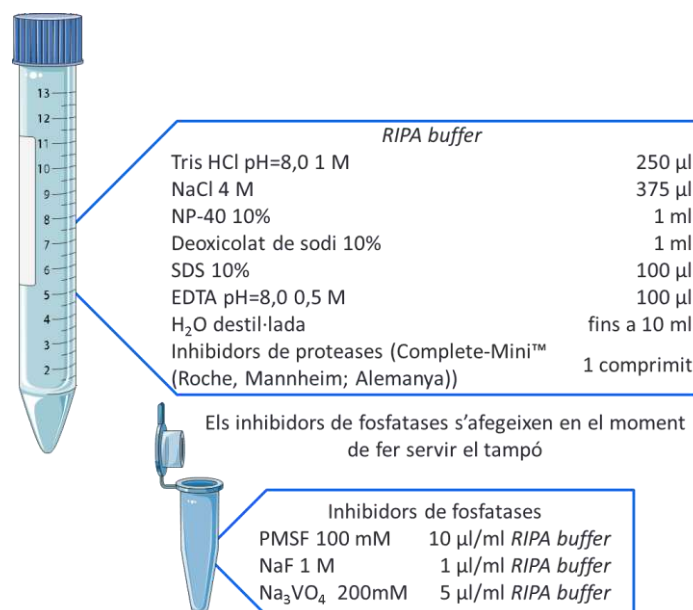
Quan es va voler fer l'extracció de proteïnes de línies cel·lulars tractades amb algun dels inhibidors, les cèl·lules es van sembrar (35000 cèl·lules/ml) en plaques de 6 pous. Per cada condició es van sembrar dos pous i passat el temps establert per a cada experiment es van recollir les cèl·lules seguint el següent protocol:

1. Eliminar el medi i fer un rentat amb PBS 1X (37 °C).
2. Tripsinitzar les cèl·lules (3 minuts a l'incubador) i afegir medi per neutralitzar la tripsina a cada pou/placa de 10.
3. Recollir tot el volum en un tub falcon de 15 ml. En el cas de les plaques de 6 pous es recullen els 2 pous per cada condició en el mateix tub.
4. Centrifugar 4 minuts a 500 xg.
5. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let amb 1 ml de PBS 1X (4 °C), tot el volum es traspasa a un tub *ependorf*.
6. Centrifugar 8 minuts a 4 °C i 450 xg.
7. Aspirar el sobrenedant i guardar el pèl·let a -80 °C.

### 7.2. Extracció de proteïnes

Per poder extreure les proteïnes de les cèl·lules primer cal lisar-les, això s'aconsegueix amb l'ajuda d'un tampó de lisi. Existeixen diferents versions de tampons de lisi, en aquesta tesi es va fer servir un tampó anomenat RIPA *buffer* (de l'anglès, *Radioimmunoprecipitation assay buffer*), a la figura M11 es mostra en detall la composició del tampó. Aquest tipus de tampó conté detergents iònics que faciliten la lisi de la membrana nuclear.

## MATERIALS I MÈTODES



**Figura M11. Preparació del tampó de lisis RIPA buffer.**

En funció de la mida del pèl·let es va fer servir un volum o altre de tampó de lisi (3 vegades el volum del pèl·let). El protocol que es va seguir es detalla a continuació:

1. Resuspendre el pèl·let (congelat a -80 °C) amb el volum de tampó de lisi adient en cada cas.
2. Incubar 10 minuts a la sala freda (4 °C) utilitzant un agitador que va donant voltes (Programa F4 i 25 rpm).
3. Sonicar 4 vegades durant 5 segons utilitzant una amplitud del 40%.
4. Centrifugar 10 minuts a 4 °C i 18000 xg.
5. Passar el sobrenedant a un tub *eppendorf*.

### 7.3. Separació de la fracció nucleica i citoplasmàtica

La separació de la fracció nucleica i la fracció citoplasmàtica ens permet determinar l'expressió de diferents proteïnes junt amb la seva localització dins la cèl·lula. Ja que en aquest cas s'obtenen dos lisats proteics per separat, un amb les proteïnes presents al nucli i l'altre amb les proteïnes presents al citoplasma. En aquesta tesi es va utilitzar el kit *Nuclear Extract Kit* (Active Motif, Bèlgica). Aquest parteix d'un primer pas on les cèl·lules es recullen en una solució freda de PBS en presència d'inhibidors de fosfatases. Després les cèl·lules es resuspenen en una solució hipotònica per tal que la membrana cel·lular es torni més fràgil. S'afegeix detergent perquè les proteïnes citoplasmàtiques s'alliberin al sobrenedant, i aquest es recull com a fracció de proteïnes citoplasmàtiques. Llavors es fa la lisi del nucli, i les proteïnes nuclears se solubilitzen en un tampó de lisi (el qual no conté detergent) que conté inhibidors de proteases. La quantificació de proteïnes es va fer de la mateixa manera que per l'extracció de proteïnes totals.

## 7.4. Quantificació de proteïnes

Per determinar la concentració de proteïnes presents en les mostres es va fer servir el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad). Aquest kit es basa en una combinació de reaccions així com l'anomenat mètode de Lowry, el qual combina la reacció d'ions coure amb els enllaços peptídics de les proteïnes en un medi alcalí amb la reducció del reactiu Folin-Ciocalteu, el qual torna de color blau fosc. Els avantatges d'aquest kit respecte al mètode mencionat són: que en 15 minuts s'aconsegueix el canvi de color desitjat i que aquest canvi de color es manté estable durant un període d'una hora aproximadament. Aquest canvi de color es pot mesurar amb un espectrofotòmetre, llegint l'absorbància entre 405 i 750 nm i aquesta absorbància es relaciona amb la concentració de proteïnes presents a la mostra mitjançant una corba patró.

La recta patró es prepara amb BSA i RIPA *buffer* tal com es mostra a la taula M9.

**Taula M9. Perfil de concentracions utilitzat per fer la recta patró.**

Concentració final [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	BSA [1 mg/ml]	RIPA <i>buffer</i>
0	0 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
200	2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
400	4 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
600	6 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
800	8 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
1000	10 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$

## 7.5. Western Blot

Per la detecció de les proteïnes d'interès es va fer servir la tècnica d'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE). Aquesta tècnica permet veure la proteïna d'interès a partir d'una separació de les proteïnes presents en la mostra en funció de la seva mida. La tècnica es basa en la diferència, en funció de la mida de les proteïnes, en la velocitat de migració de les diferents proteïnes quan se'ls hi aplica una electroforesi en un gel d'acrilamida-bis-acrilamida.

### 7.5.1. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

Les mostres es van preparar en *sample buffer* 4X, la composició del qual es detalla a la figura M12, fent servir el volum de lisat necessari per carregar 50  $\mu\text{g}$  de proteïna, quan les mostres no havien estat sotmeses a cap tractament, i 30  $\mu\text{g}$  de proteïna, quan les mostres havien estat tractades. El volum de *sample buffer* 4X que cal afegir és una tercera part del volum de lisat proteic. Un cop preparades les mostres, aquestes es van fer bullir durant 5 - 10 minuts a 95  $^{\circ}\text{C}$  en un bloc tèrmic amb la finalitat de desnaturalitzar les proteïnes.

## MATERIALS I MÈTODES

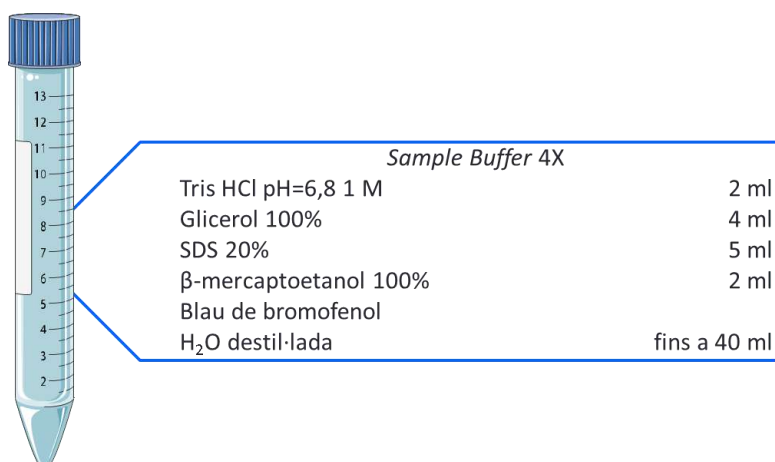


Figura M12. Composició del *sample buffer* utilitzat per la preparació de les mostres per l'electroforesi.

Els gels es van preparar utilitzant el sistema *Mini-Protean Tetra Cell Electrophoresis System* (Bio-Rad), on la polimerització dels gels es du a terme entre dos vidres que determinen l'espessor del gel (1 mm). Els gels estan formats per dues zones clarament diferenciades per la seva composició, la zona de l'*stacking*, que es troba a la part superior, és la zona del gel on es concentren les mostres abans d'entrar totes a la vegada a la zona del *running* o zona de separació, que és la zona on les proteïnes són separades en funció del seu pes molecular. A la figura M13 es mostra en detall la composició de les dues zones dels gels d'acrilamida-bis-acrilamida.

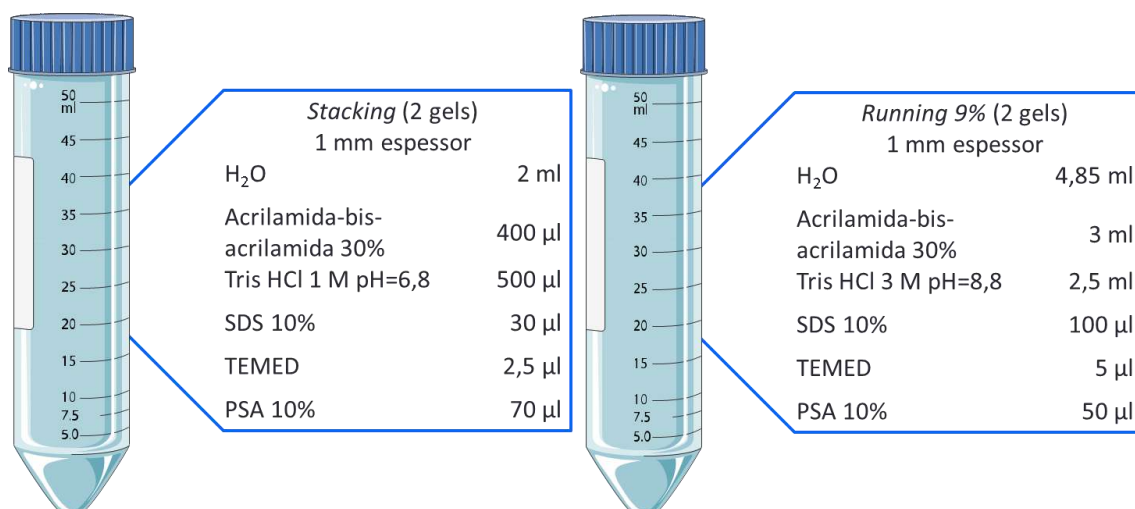


Figura M13. Preparació dels gels de poliacrilamida.

El muntatge es va fer seguint els següents passos:

1. Rentar els vidres amb etanol abans de muntar-los als suports per preparar els gels.
2. Afegir aigua i fer una marca amb un retolador per comprovar que no hi ha pèrdues. Treure l'aigua per decantació i eixugar els vidres amb paper de filtre.
3. Preparar el *running* i afegir-lo amb cura entre els dos vidres fins a la primera línia verda. Afegir unes gotes, amb l'ajuda de la pipeta Pasteur, d'isopropanol per eliminar bombolles d'aire.

4. Un cop polimeritzat afegir amb cura l'*stacking* i abans que aquest polimeritzi posar les pintes que fan de motlle pels pous de càrrega de mostres.
5. Quan l'*stacking* ha polimeritzat, col·locar els vidres dins el suport de plàstic (anar amb compte de posar el vidre petit mirant cap endins del suport) que serveix per posar-los dins la cubeta d'electroforesi on s'aplicarà el corrent elèctric.
6. Omplir la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi 1X, el qual es prepara tal com es mostra a la figura M14.

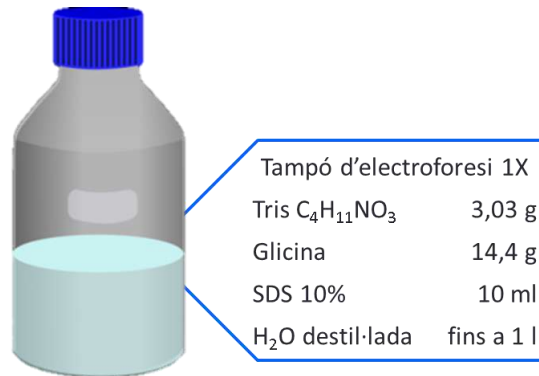


Figura M14. Preparació del tampó d'electroforesi.

El tampó d'electroforesi ha de cobrir tant la part interior del suport de plàstic que conté els vidres amb els gels com tota la cubeta d'electroforesi, d'aquesta manera s'assegura el pas del corrent elèctric dins la cubeta.

7. Un cop tretes les pintes que fan de motlle pels pous de càrrega, rentar les possibles restes d'acrilamida amb l'ajuda d'una pipeta afegint tampó d'electroforesi de la mateixa cubeta.
8. Afegir el volum de les mostres, una a cada pouet, reservar un dels pous per afegir 5  $\mu$ l del marcador de pes molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Bio-Rad).
9. Començar l'electroforesi a 70 V, un cop les mostres han entrat al *running* canviar el voltatge a 130 V i mantenir-lo durant 2 hores aproximadament, fins que la línia marcada pel blau del *sample buffer* arriba al final del gel.

### 7.5.2. Transferència a membrana de nitrocel·lulosa

Acabada l'electroforesi, s'ha de transferir les proteïnes a una membrana que serveix de suport sòlid on poder fer la detecció immunològica. En aquesta tesi es va fer servir membranes de difluorur de polivinilidè (PVDF) (Millipore, Bellerica, MA; USA) i el sistema de transferència *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). La transferència de proteïnes del gel cap a la membrana es va fer seguint els següents passos:

## MATERIALS I MÈTODES

1. Preparar el tampó de transferència 1X, tal com es mostra en la figura M15.

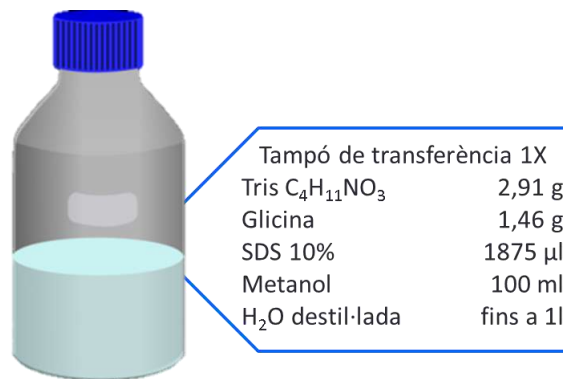


Figura M15. Composició del tampó de transferència utilitzat pel *western blot*.

2. Remullar les membranes de PVDF en metanol durant uns segons.
3. Treure el suport de plàstic de la cubeta d'electroforesi, desmuntar els vidres i eliminar el tros de gel corresponent a l'*stacking*.
4. Preparar dues cubetes amb tampó de transferència, en una s'hi submergeixen els gels i a l'altre les membranes i 12 rectangles de paper *Whatman™* (GE Healthcare) durant 15 minuts.
5. Remullar el sistema de transferència amb tampó i muntar la transferència tal com es detalla en la figura M16. Anar amb cura d'eliminar les possibles bombolles d'aire que es poden formar en aplicar les diferents capes.
6. Aplicar un corrent de 22 V durant 45 minuts.

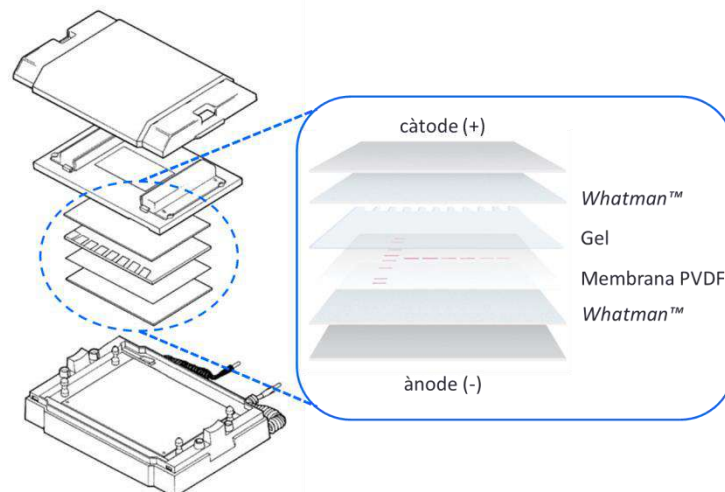


Figura M16. Muntatge de la transferència de les proteïnes a la membrana de PVDF.

### 7.5.3. Detecció immunològica de proteïnes

La detecció immunològica de proteïnes es fa amb anticossos específics per a cada proteïna d'interès. Per minimitzar els llocs d'unió inespecífics dels anticossos, la membrana es va submergir en una solució de bloqueig comercial *Odyssey® Blocking*



Buffer (PBS) (LI-COR, Nebraska; USA) durant 1 hora a temperatura ambient i en constant agitació.

Passada l'hora de bloqueig, la membrana es va incubar en un agitador, a 4 °C i durant tota la nit amb l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig comercial a la que es va afegir un 0,1% de monolaurat de polioxietilen(20)sorbità (Tween-20) (Sigma-Aldrich). La dilució utilitzada va ser diferent en funció de l'anticòs, a la taula M10 es pot veure algunes característiques dels anticossos utilitzats per a detectar les proteïnes d'interès juntament amb la casa comercial i la dilució emprada.

Taula M10. Característiques dels anticossos primaris.

Anticòs	Referència	Hoste	Dilució
$\beta$ -actina	#3700 (Cell Signaling Technology)	Mouse	1:1000
$\beta$ -catenina (D10A8)	#8480 (Cell Signaling Technology)	Rabbit	
P- $\beta$ -catenina (Ser552)	#2951 (Cell Signaling Technology)	Rabbit	
$\alpha$ -tubulina	#T9026 (Sigma-Aldrich)	Mouse	
PARP	#9542S (Cell Signaling Technology)	Rabbit	

Acabada la incubació amb l'anticòs primari, les membranes es van rentar 3 vegades, durant 10 minuts cada vegada, amb una solució salina TBS-T 1X, aquesta es va preparar tal com es mostra a la figura M17.

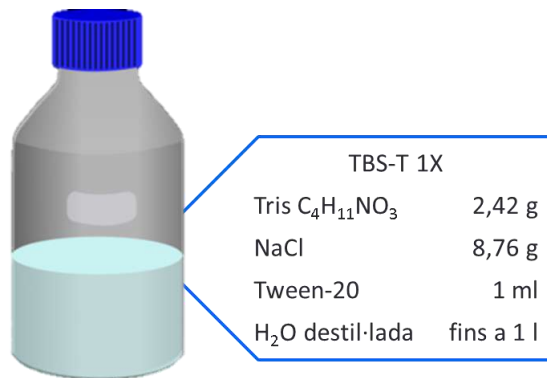


Figura M17. Preparació de la solució salina TBS-T 1X usada pels rentats entre anticossos.

Després dels rentats amb TBS-T 1X, les membranes es van incubar durant una hora, en agitació, a temperatura ambient i a les fosques amb l'anticòs secundari anti-conill o anti-ratolí. Aquests anticossos reconeixen als primaris i a més estan marcats amb el compost fluorescent IRDdye 700 o IRDdye 800. Els anticossos secundaris utilitzats van ser: *Donkey anti-Rabbit* (E365D5) i *Donkey anti-Mouse* (E510KC) (LI-COR), aquests es van preparar diluint-los (1:10000) en solució de bloqueig comercial a la que es va afegir Tween-20 (Sigma-Aldrich) 0,1%.

Finalment, es va tornar a fer una sèrie de 3 rentats de 10 minuts cada un amb TBS-T 1X abans de fer la detecció amb l'ajuda del sistema d'imatge Odyssey i el software *Image Studio™* (LI-COR). La quantificació dels senyals es va fer amb el software *Quantity One®* (Bio-Rad).

### 8. Avaluació de la viabilitat cel·lular

#### 8.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular: Mètode del MTS tetrazolium (MTT)

L'efecte que tenen els diferents inhibidors utilitzats en la tesi sobre la proliferació cel·lular es va avaluar mitjançant el mètode del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS tetrazolium, MTT). Aquest mètode es basa en la reducció de l'MTS (compost hidrosoluble de color groc) per enzims mitocondrials (NADH o NADPH) presents en les cèl·lules vives a una forma del compost, el formazà, soluble en el medi de cultiu cel·lular i de color violeta. L'absorbància d'aquest es mesura a 490 nm utilitzant un espectrofotòmetre SYNERGY microplate reader (Biotek). Pels diferents inhibidors i tractaments es va seguir sempre els mateixos passos:

1. Sembrar les cèl·lules en plaques de 96 pous (25000 cèl·lules/ml).
2. Deixar créixer durant 24 hores a 37 °C, per tal que les cèl·lules es trobin a una confluència del voltant el 70% - 80%. Llavors canviar el medi per medi amb l'inhibidor a la concentració corresponent.
3. Passat el temps estipulat en cada experiment retirar el medi i afegir a cada pou 50 µl de medi junt amb 10 µl del compost MTS, *CellTiter96® Aqueous One Solution* (Promega). Deixar la placa durant 1 hora a 37 °C.
4. Llegir l'absorbància a 490 nm a l'espectrofotòmetre.

Quan es va voler estudiar l'efecte del silenciament de *CDC25A* sobre la viabilitat cel·lular es va preparar la solució de transfecció tal com es detalla a la figura M2 i es van substituir els passos 1 i 2 pels passos: 2, 3 i 4 de l'apartat 4.1.1. La resta (passos 3 i 4) es va fer de la mateixa manera.

#### 8.2. Combinació de tractaments

L'efecte sobre la proliferació cel·lular de la combinació dels inhibidors PKF118-310 i PRI-724 amb els dos agents quimioterapèutics emprats en el tractament de sarcomes de parts toves (la doxorubicina i la trabectedina) es va analitzar amb el mateix mètode MTS tetrazolium (MTT). Les composicions de les combinacions estudiades es mostren a la taula M11, per la combinació PKF118-310 i trabectedina i a la taula M12 per la combinació PKF118-310 i doxorubicina. Les combinacions de l'inhibidor PRI-724 amb trabectedina i doxorubicina es mostren en detall a les taules M13 i M14 respectivament.

Taula M11. Composició de les combinacions de PKF118-310 amb trabectedina.

SK-UT-1					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]
0,84	11,60	1,26	5,80	0,42	17,40
0,42	5,80	0,63	2,90	0,21	8,70
0,21	2,90	0,32	1,45	0,11	4,35
0,11	1,45	0,16	0,73	0,05	2,18
0,05	0,73	0,08	0,36	0,03	1,09
0,03	0,36	0,04	0,18	0,01	0,54
0,01	0,18	0,02	0,09	0,01	0,27

HT-1080					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]
1,48	11,56	2,22	5,78	0,74	17,34
0,74	5,78	1,11	2,89	0,37	8,67
0,37	2,89	0,56	1,45	0,19	4,34
0,19	1,45	0,28	0,72	0,09	2,17
0,09	0,72	0,14	0,36	0,05	1,08
0,05	0,36	0,07	0,18	0,02	0,54
0,02	0,18	0,03	0,09	0,01	0,27

93T449					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]
1,76	8,00	2,64	4,00	0,88	12
0,88	4,00	1,32	2,00	0,44	6,00
0,44	2,00	0,66	1,00	0,22	3,00
0,22	1,00	0,33	0,50	0,11	1,50
0,11	0,50	0,17	0,25	0,06	0,75
0,06	0,25	0,08	0,13	0,03	0,38
0,03	0,13	0,04	0,06	0,01	0,19

CP0024					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]	PKF118-310 [μM]	Trabectedina [nM]
2,28	26,00	3,42	13,00	1,14	39,00
1,14	13,00	1,71	6,50	0,57	19,50
0,57	6,50	0,86	3,25	0,29	9,75
0,29	3,25	0,43	1,63	0,14	4,88
0,14	1,63	0,21	0,81	0,07	2,44
0,07	0,81	0,11	0,41	0,04	1,22
0,04	0,41	0,05	0,20	0,02	0,61

## MATERIALS I MÈTODES

**Taula M12. Composició de les combinacions de PKF118-310 amb doxorubicina.**

SK-UT-1					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]
0,84	2,56	1,26	1,28	0,420	3,84
0,42	1,28	0,63	0,64	0,210	1,92
0,21	0,64	0,32	0,32	0,105	0,96
0,11	0,32	0,16	0,16	0,053	0,48
0,05	0,16	0,08	0,08	0,026	0,24
0,03	0,08	0,04	0,04	0,013	0,12
0,01	0,04	0,02	0,02	0,007	0,06

HT-1080					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]
1,48	1,36	2,22	0,68	0,74	2,04
0,74	0,68	1,11	0,34	0,37	1,02
0,37	0,34	0,56	0,17	0,19	0,51
0,19	0,17	0,28	0,09	0,09	0,26
0,09	0,09	0,14	0,04	0,05	0,13
0,05	0,04	0,07	0,02	0,02	0,06
0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0,03

93T449					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]
1,76	1,08	2,64	0,54	0,88	1,62
0,88	0,54	1,32	0,27	0,44	0,81
0,44	0,27	0,66	0,14	0,22	0,41
0,22	0,14	0,33	0,07	0,11	0,20
0,11	0,07	0,17	0,03	0,06	0,10
0,06	0,03	0,08	0,02	0,03	0,05
0,03	0,02	0,04	0,01	0,01	0,03

CP0024					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]	PKF118-310 [μM]	Doxorubicina [μM]
2,28	2,72	3,42	1,36	1,14	4,08
1,14	1,36	1,71	0,68	0,57	2,04
0,57	0,68	0,86	0,34	0,29	1,02
0,29	0,34	0,43	0,17	0,14	0,51
0,14	0,17	0,21	0,09	0,07	0,26
0,07	0,09	0,11	0,04	0,04	0,13
0,04	0,04	0,05	0,02	0,02	0,06

Taula M13. Composició de les combinacions de PRI-724 amb trabectedina.

SK-UT-1					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]
73,72	5,80	110,58	2,90	36,86	8,70
36,86	2,90	55,29	1,45	18,43	4,35
18,43	1,45	27,65	0,73	9,22	2,18
9,22	0,73	13,82	0,36	4,61	1,09
4,61	0,36	6,91	0,18	2,30	0,54
2,30	0,18	3,46	0,09	1,15	0,27
1,15	0,09	1,73	0,05	0,58	0,14

HT-1080					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]
18,70	5,78	28,05	2,89	9,35	8,67
9,35	2,89	14,03	1,45	4,68	4,34
4,68	1,45	7,01	0,72	2,34	2,17
2,34	0,72	3,51	0,36	1,17	1,08
1,17	0,36	1,75	0,18	0,58	0,54
0,58	0,18	0,88	0,09	0,29	0,27
0,29	0,09	0,44	0,05	0,15	0,14

93T449					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]
10,36	4,00	15,54	2,00	5,18	6,00
5,18	2,00	7,77	1,00	2,59	3,00
2,59	1,00	3,89	0,50	1,30	1,50
1,30	0,50	1,94	0,25	0,65	0,75
0,65	0,25	0,97	0,13	0,32	0,38
0,32	0,13	0,49	0,06	0,16	0,19
0,16	0,06	0,24	0,03	0,08	0,09

CP0024					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 3:1 (75/25)		Proporció 1:3 (25/75)	
PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]	PRI-724 [μM]	Trabectedina [nM]
19,54	13,00	29,31	6,50	9,77	19,50
9,77	6,50	14,66	3,25	4,89	9,75
4,89	3,25	7,33	1,63	2,44	4,88
2,44	1,63	3,66	0,81	1,22	2,44
1,22	0,81	1,83	0,41	0,61	1,22
0,61	0,41	0,92	0,20	0,31	0,61
0,31	0,20	0,46	0,10	0,15	0,30

## MATERIALS I MÈTODES

**Taula M14. Composició de les combinacions de PRI-724 amb doxorubicina.**

SK-UT-1					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)	
PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]
73,72	1280,00	110,58	640,00	36,86	1920,00
36,86	640,00	55,29	320,00	18,43	960,00
18,43	320,00	27,65	160,00	9,22	480,00
9,22	160,00	13,82	80,00	4,61	240,00
4,61	80,00	6,91	40,00	2,30	120,00
2,30	40,00	3,46	20,00	1,15	60,00
1,15	20,00	1,73	10,00	0,58	30,00

HT-1080					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)	
PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]
18,70	680,00	28,05	340,00	9,35	1020,00
9,35	340,00	14,03	170,00	4,68	510,00
4,68	170,00	7,01	85,00	2,34	255,00
2,34	85,00	3,51	42,50	1,17	127,50
1,17	42,50	1,75	21,25	0,58	63,75
0,58	21,25	0,88	10,63	0,29	31,88
0,29	10,63	0,44	5,31	0,15	15,94

93T449					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)	
PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]
10,36	540,00	15,54	270,00	5,18	810,00
5,18	270,00	7,77	135,00	2,59	405,00
2,59	135,00	3,89	67,50	1,30	202,50
1,30	67,50	1,94	33,75	0,65	101,25
0,65	33,75	0,97	16,88	0,32	50,63
0,32	16,88	0,49	8,44	0,16	25,31
0,16	8,44	0,24	4,219	0,08	12,66

CP0024					
Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)		Proporció 1:1 (50/50)	
PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]	PRI-724 [μM]	Doxorubicina [nM]
19,54	1360,00	29,31	680,00	9,77	2040,00
9,77	680,00	14,66	340,00	4,89	1020,00
4,89	340,00	7,33	170,00	2,44	510,00
2,44	170,00	3,66	85,00	1,22	255,00
1,22	85,00	1,83	42,50	0,61	127,50
0,61	42,50	0,92	21,25	0,31	63,75
0,31	21,25	0,46	10,63	0,15	31,88

La construcció d'isobologrames (Loewe 1927, 1928, 1953) [217,218], a partir de les dades de proliferació cel·lular obtingudes, permet analitzar el tipus d'interacció

existent entre les dues drogues: addició, sinergia o antagonisme. S'entén per addició quan l'efecte de combinar dues drogues és el mateix que la suma dels seus efectes per separat, sinergia quan l'efecte és major i antagonisme quan l'efecte és menor.

A la figura M18 es mostra un esquema representatiu d'un isoblograma: a l'eix de les x es representa la dosi corresponent a l'IC<sub>50</sub> (concentració de droga que inhibeix en un 50% la proliferació cel·lular) de la droga A (DA) i a l'eix de les y la dosi corresponent a l'IC<sub>50</sub> de la droga B (DB). La línia que uneix aquests dos punts s'anomena línia d'additivitat. A continuació es representa el punt (dA,dB) per a cada combinació, dA és la concentració de la droga A present en la combinació que fa el mateix efecte d'inhibició (un 50%) que la droga A per separat i dB el mateix per la droga B.

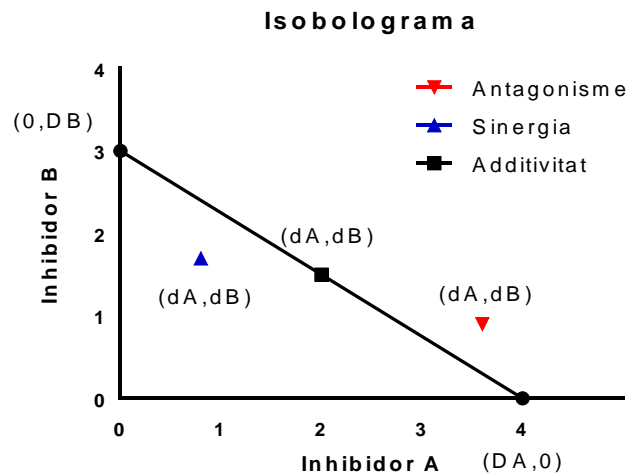


Figura M18. Representació gràfica d'un isoblograma.

Així com l'isoblograma és una representació gràfica, l'equació 3 permet el càlcul de l'índex de combinació, CI (de l'anglès, *combination index*) entre dues drogues:

$$CI = \frac{dA}{DA} + \frac{dB}{DB} \quad (3)$$

Aquest índex de combinació permet quantificar l'efecte de les diferents combinacions sent:

CI = 1 quan l'efecte produït és d'addició, CI > 1 quan és antagonisme i CI < 1 quan és sinèrgic.

### 8.3. Monitoratge a temps real del creixement cel·lular: RTCA (Real Time Cell Analyzer)

La proliferació cel·lular es va monitorar en temps real i de manera no invasiva mitjançant el sistema xCELLigence (ACEA Biosciences, San Diego, CA; USA). Les cèl·lules es van sembrar en les plaques E-plate (ACEA Biosciences) de 96 pous, les quals tenen integrats microelèctrodes d'or a la superfície inferior dels pous que serveixen de sensors de corrent alterna modificada pel nombre de cèl·lules adherides. Aplicant un petit voltatge (<20 mV) es crea un corrent entre els elèctrodes de manera que l'adherència de les cèl·lules a la superfície d'aquests modula el corrent aplicat. El

## MATERIALS I MÈTODES

senyal d'impedància (Z) es mostra en forma del paràmetre adimensional anomenat *Cell Index* (CI) que no és res més que la ràtio que compara el valor d'impedància en presència i absència de cèl·lules.

Pel monitoratge a temps real del creixement cel·lular es van seguir els següents passos:

1. Afegir 100 µl de medi/pou (on després es sembraran les cèl·lules) de la placa E-plate.
2. Posar la placa dins el sistema xCELLigence. Encendre el *software* i seleccionar la finestra de la placa ocupada.
3. Introduir les dades de la placa (línia cel·lular, concentració d'inhibidor, etc per cada pou).
4. Emplenar la finestra *Schedule* amb les següents etapes:

Etapa 1 (*Background*): aquest pas ha de durar 1 minut, serveix per mesurar la impedància quan no hi ha cèl·lules.

Etapa 2 (Creixement): és el primer pas després d'afegir les cèl·lules. En aquesta etapa es fan mesures cada 10 minuts, es programa la durada de l'etapa unes 48 hores (sempre es programa més temps del necessari)

Etapa 3 (Tractament): en haver afegit el tractament corresponent s'inicia aquesta etapa. La duració d'aquesta és de 72 hores i s'estableix l'interval de mesures d'impedància cada 10 minuts.

Etapa 4 (Extra): aquesta etapa serveix per si hi ha hagut algun problema en les etapes anteriors, les mesures es prenen cada 10 minuts i la durada és de 72 hores.

5. Un cop fet el *Background* afegir 100 µl de medi amb les cèl·lules (50000 cèl·lules/ml).
6. Passades 24 hores, aturar l'etapa denominada creixement, retirar el medi i afegir medi amb la concentració adient de cada inhibidor. Començar l'etapa de tractament.
7. Passades 96 hores, aturar l'etapa tractament i retirar la placa del sistema xCELLigence. Les dades queden guardades al *software*.

En el cas dels tractaments amb siRNAs, es va eliminar l'etapa de creixement. De manera que el protocol a seguir va quedar de la següent manera:

1. Preparar la solució de transfecció tal com es mostra a la figura M2 de l'apartat 4.1.1.
2. Afegir 100 µl de medi sense antibiòtic/pou (on després es sembraran les cèl·lules) a la placa E-plate.



3. Posar la placa dins el sistema xCELLigence. Encendre el *software* i seleccionar la finestra de la placa ocupada.
4. Introduir les dades de la placa (línia cel·lular, condició, etc per cada pou).
5. Emplenar la finestra *Schedule* amb les següents etapes:

Etapa 1 (*Background*): aquest pas ha de durar 1 minut, serveix per mesurar la impedància quan no hi ha cèl·lules.

Etapa 2 (Transfecció): és el pas següent després d'afegir la solució de transfecció i el medi sense antibiòtic amb les cèl·lules, es fixa la durada de l'etapa unes 96 hores (sempre es programa més temps del necessari: 120 hores) i s'estableix l'interval de mesures d'impedància cada 10 minuts.

Etapa 4 (Extra): aquesta etapa serveix per si hi ha hagut algun problema en les etapes anteriors, les mesures es prenen cada 10 minuts i la durada és de 72 hores.

6. Un cop fet el *Background* es retira el medi i s'afegeix 30 µl de la solució de transfecció i després 150 µl del medi sense antibiòtic amb les cèl·lules (13500 cèl·lules/ml).
7. Passades 96 hores, aturar l'experiment i retirar la placa del sistema xCELLigence. Les dades queden guardades al *software*.

## 9. Anàlisi del cycle cel·lular

L'efecte dels diferents inhibidors utilitzats sobre el cycle cel·lular i la determinació de la fracció apoptòtica de les cèl·lules, un cop tractades, es va dur a terme mitjançant la tècnica de citometria de flux i el citòmetre BD FACScan Verse (BD Bioscience, New Jersey; USA) amb el seu *software* FACSuit. La tècnica de citometria de flux permet l'anàlisi individual de les cèl·lules que hi ha dins la mostra, fent passar les cèl·lules una a una per un feix de llum emès per un làser. Quan la cèl·lula travessa aquest feix de llum fa dispersar la llum que és captada per un sistema de miralls tal com es mostra en la figura M19.

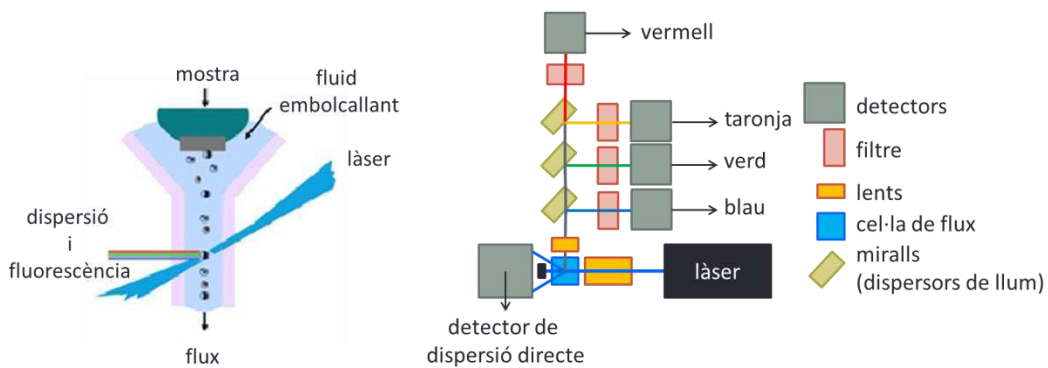


Figura M19. Representació gràfica de les parts del citòmetre. Imatge modificada de <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-2-flow-cytometer>.

## MATERIALS I MÈTODES

Per tal de determinar les diferents fases del cicle cel·lular es fan servir fluorocroms que s'uneixen al DNA com el iodur de propidi o el bromur d'etidi, en aquesta tesi es va fer servir el iodur de propidi (IP). Aquest fluorocrom s'excita a una longitud d'ona de 488 nm i això permet la quantificació del DNA present en les cèl·lules i la posterior correlació amb les fases del cicle cel·lular (G1, S i G2/M) així com la fracció apoptòtica (fase subG1). Els passos que es van seguir per a dur a terme la tècnica van ser els següents:

1. Sembrar les cèl·lules en plaques de 24 pous (15000 cèl·lules/ml), per a cada condició cal sembrar duplicats.
2. Deixar créixer les cèl·lules durant 24 hores a 37 °C, per tal que aquestes es trobin a una confluència del voltant el 70% - 80%. Llavors canviar el medi per medi amb l'inhibidor a la concentració corresponent.
3. Al cap de 24, 48 i 72 hores de tractament recollir les cèl·lules. Recuperar el medi dels dos pous (duplicats) en un tub de 15 ml.
4. Fer un rentat amb 300 µl de PBS 1X (37 °C).
5. Tripsinitzar les cèl·lules (3 minuts a l'incubador) i afegir 300 µl del medi recuperat.
6. Passar el volum (dels duplicats) al tub de 15 ml amb la resta de medi.
7. Centrifugar 5 minuts a 400 xg.
8. Aspirar el sobrenedant i resuspendre el pèl·let en 100 µl de PBS 1X fred i afegir 900 µl d'etanol absolut (de 100 µl en 100 µl) fred. Això es fa per fixar les cèl·lules.
9. Incubar com a mínim 1 hora a 4 °C. Es pot recollir totes les condicions fins a aquest punt i seguir processant les mostres un cop reunir-les totes.

Per la tinció amb iodur de propidi es va fer el següent:

1. Centrifugar 5 minuts a 400 xg.
2. Aspirar el sobrenedant.
3. Resuspendre el pèl·let en 1 ml de PBS 1X.
4. Centrifugar 5 minuts a 450 xg.
5. Resuspendre el pèl·let en 500 µl de solució de tinció de DNA. Aquesta es prepara tal com s'indica a la figura M20.

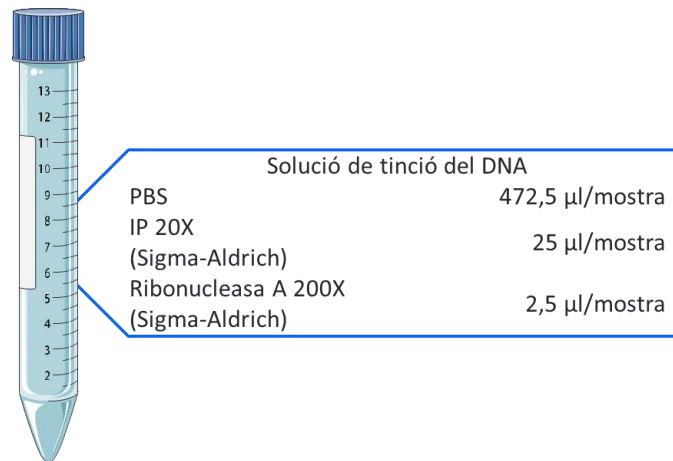


Figura M20. Composició de la solució de tinció del DNA usada en la citometria de flux.

- Passar la mostra a un tub de citometria i incubar durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps passar les mostres pel citòmetre.

## 10. *Microarrays* d'expressió

L'estudi de les diferències en els perfils d'expressió de miRNAs i mRNAs entre els dos grups de pacients amb càncer de pròstata avançat es va dur a terme amb l'ajuda de la plataforma de Genòmica de l'IdISBa.

### 10.1. *Microarrays* d'expressió de miRNAs i mRNAs

En termes generals es pot dir que els *microarrays* es basen en la hibridació d'una molècula específica (*probe*) i una molècula diana (*target*), aquesta hibridació es detecta per fluorescència i es visualitza mitjançant un escàner. De manera que els nivells de fluorescència detectats mostren la quantitat de molècules diana presents en una mostra problema.

Existeixen diferents tipus de *microarrays*, en aquesta tesi es van utilitzar per una banda, els *arrays* d'expressió de miRNAs: *GeneChip miRNA 4.0 Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA; USA) i els *arrays* d'expressió de mRNAs: *GeneChip Clariom S human arrays* (Affymetrix).

A les figures M21 i M22 es mostren els esquemes dels protocols que es van seguir. A aquests *microarrays* se'ls coneix com a *arrays* d'un color, perquè les mostres estan marcades només amb un marcador fluorescent. A cada *array* només hi hibrida una mostra i el valor que s'obté, un cop il·luminat l'*array* amb el làser, és una mesura numèrica (lectura del làser) la qual rep el nom d'expressió absoluta.

En tots dos tipus d'*array*, el material de partida és l'RNA, el qual s'amplifica i es marca amb una molècula fluorescent (biotina). Posteriorment, es fragmenta en trossos més petits perquè es puguin unir a les *probes* fixades a l'*array* mitjançant el procés d'hibridació. L'*array* hibridat s'il·lumina dins un escàner mitjançant un làser per tal que la biotina emeti llum fluorescent. La fluorescència registrada a cada *probeset* és directament proporcional a la quantitat d'RNA present a la mostra problema de cada gen o miRNA.

## MATERIALS I MÈTODES

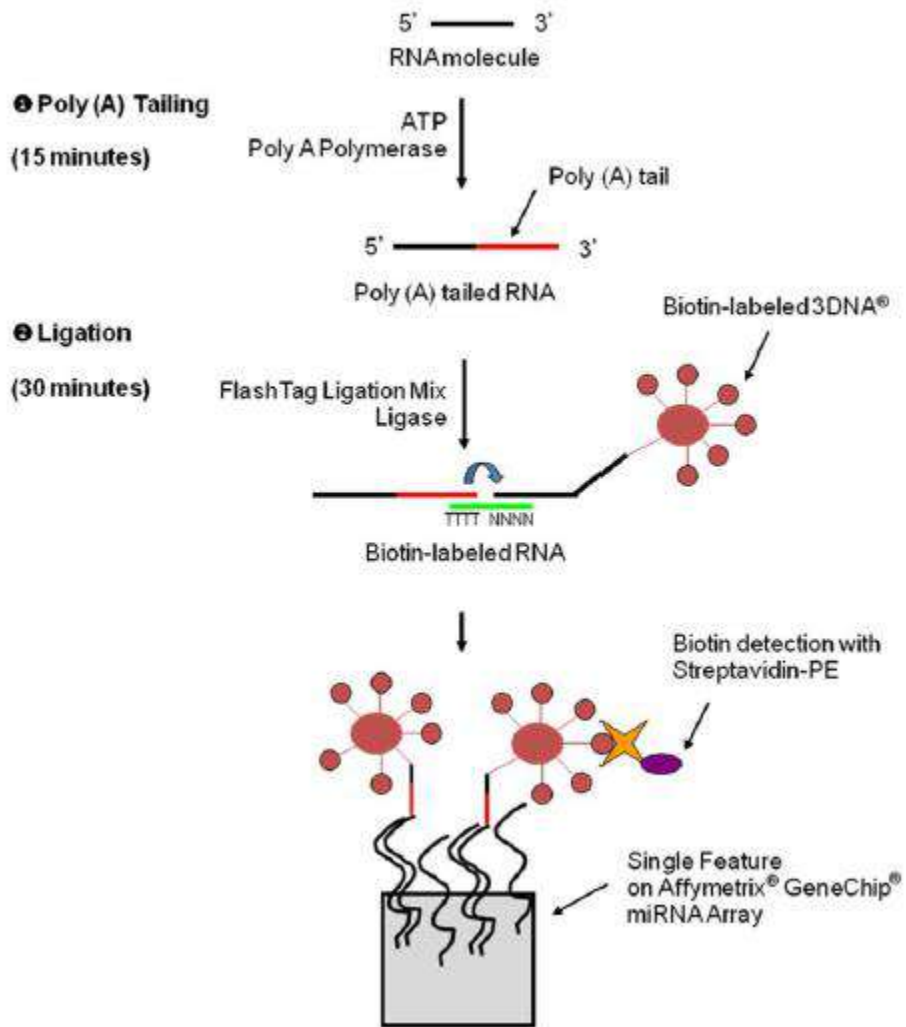


Figura M21. Esquema del protocol per l'anàlisi de miRNAs.

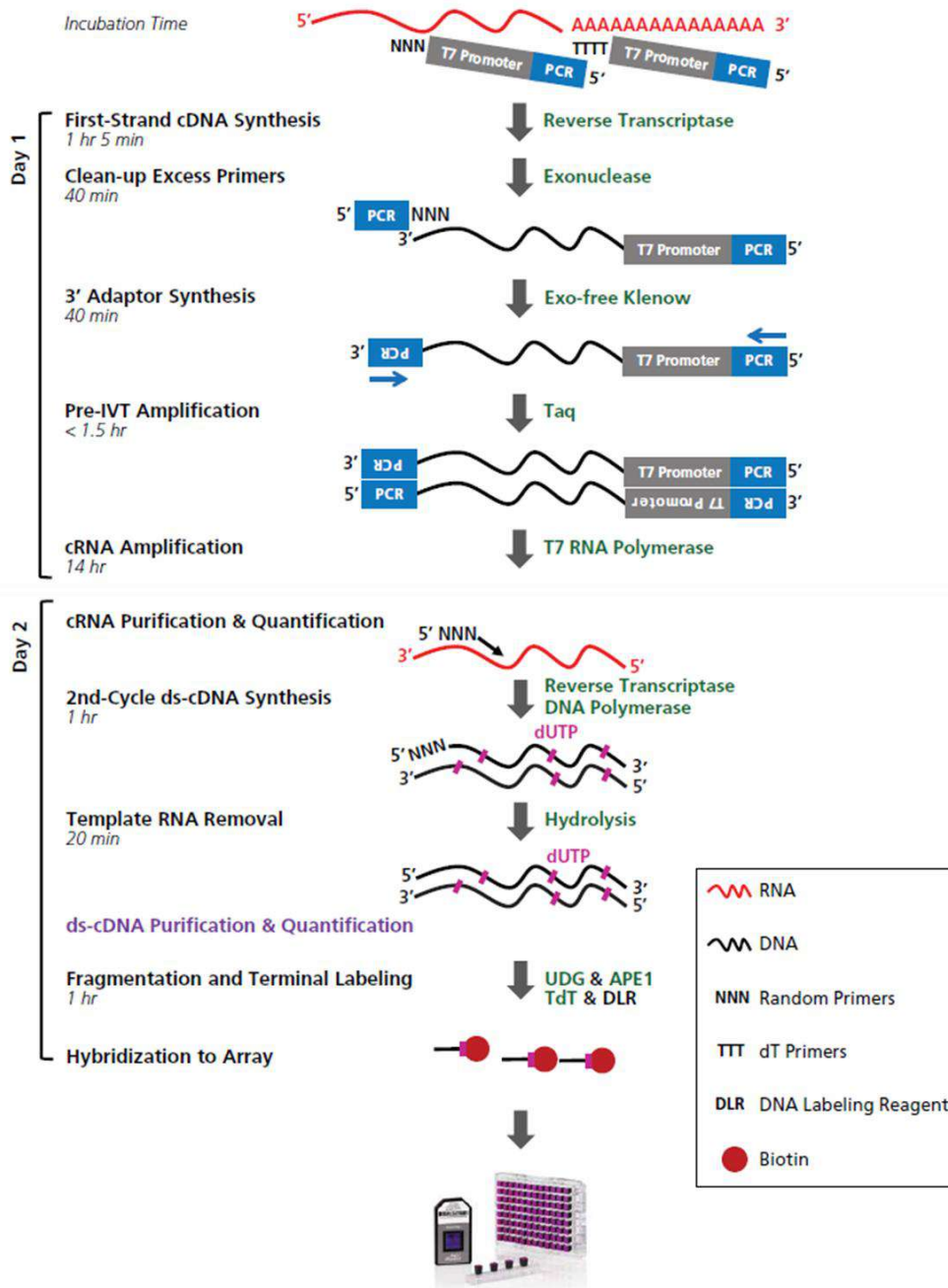


Figura M22. Esquema del protocol per l'anàlisi d'expressió de mRNAs.

### 7.5.4. Anàlisi dels microarrays d'expressió

L'escaneig de l'array i el preprocessament de les dades crues es va fer amb el mateix *software* d'Affymetrix, així es van obtenir els arxius .CEL per la posterior anàlisi. Normalment es té un arxiu .CEL per a cada mostra o condició dins l'experiment.

L'anàlisi dels *microarrays* d'expressió es va fer mitjançant el llenguatge de programació R i el *software* Bioconductor, seguint els següents passos:

1. Identificació dels grups experimentals
2. Realització del control de qualitat de les dades crues

## MATERIALS I MÈTODES

3. Normalització de les dades crues
4. Realització del control de qualitat de les dades normalitzades
5. Aplicació d'un filtratge no específic
6. Identificació dels miRNAs o mRNAs diferencialment expressats
7. Anotació dels resultats
8. Realització de les comparacions entre grups
9. Anàlisi de la significació biològica

A l'annex 2 s'inclou el protocol que es va seguir, juntament amb les línies de codi.

### 10.2. *Microarrays* d'expressió: dades obtingudes del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)

Per l'anàlisi de l'expressió de *CDC25A* a nivell de mRNA en una sèrie de mostres de pacients de SPT (formada per leiomiomes, liposarcomes i fibrosarcomes) generada per Barretina *et. al* [142] i que es troba disponible a la base de dades públiques *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), es va obtenir les dades crues (arxiu .CEL) a través de la web de l'NCBI (de l'anglès, *National Center for Biotechnology Information*) (GSE2112). El protocol que es va seguir va ser similar al de l'apartat 10.1.1 exceptuant el pas 9, a l'annex 3 es mostra en més detall, juntament amb les línies de codi.

## 11. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el *software* GraphPad Prism o el llenguatge de programació R.

L'anàlisi de correlacions entre les diferents dades moleculars obtingudes a l'apartat 1 de la secció Resultats es va fer mitjançant la correlació d'Spearman.

Amb les característiques de les mostres tumorals de pacients amb sarcomes de parts toves i càncer de pròstata avançat es va fer la comparació de les variables mitjançant l'estadística descriptiva. La comparació de les variables categòriques es va fer mitjançant el test exacte de Fisher, mentre que per variables quantitatives es va utilitzar el test de Wilcoxon.

Les comparacions múltiples de les mitjanes (més de dos grups) es van fer mitjançant el test de Kruskal-Wallis o ANOVA (juntament amb el test de Bonferroni).

Les diferències entre grups es van considerar estadísticament significatives amb un p-valor < 0,05 i s'indiquen per: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

### 12. Figures

Totes les figures de la tesi han estat realitzades per l'autora de la tesi. En cas de tractar-se d'adaptacions, s'especifica en el mateix peu de figura de quina font s'ha adaptat la imatge (Figures: I11, I12, I13). Les imatges de la secció Introducció corresponents a les figures: I2-I10 i I14, així com les de la secció Resultats corresponents a les figures: R1.6, R1.15, R2.5, R3.11 i R4.6 i les figures D1-D3 de la secció Discussió es van realitzar mitjançant l'aplicació web BioRender.com.

# **IV. RESULTATS**



# Capítol 1

## Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomagènesi

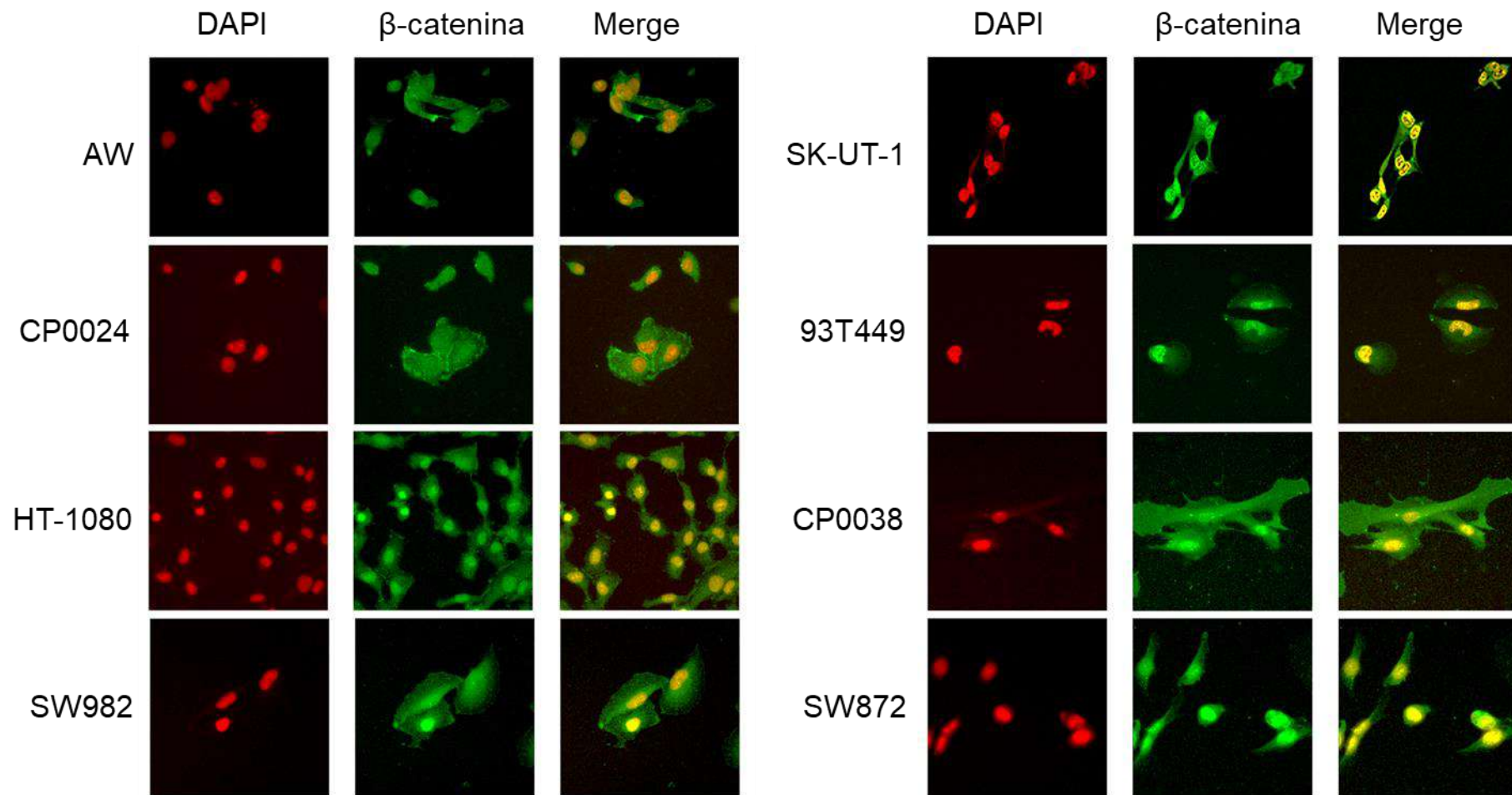
## RESULTATS CAPÍTOL 1

Per tal de caracteritzar l'activació de la via de Wnt/ $\beta$ -catenina en línies cel·lulars, representatives dels subtipus de sarcomes de parts toves més freqüents, es va disposar d'un total de 7 línies cel·lulars (SK-UT-1, HT-1080, SW684, 93T449, AW, SW872 i SW982) i 2 cultius primaris (CP0024 i CP0038), a les taules M1 i M3 de la secció Materials i Mètodes es mostren les característiques d'aquestes línies cel·lulars i cultius primaris en detall.

### 1.1 La via Wnt/ $\beta$ -catenina està activada en línies cel·lulars i cultius primaris de sarcomes de parts toves (SPT)

Quan la via Wnt/ $\beta$ -catenina està activada,  $\beta$ -catenina es transloca al nucli on activa la transcripció de gens diana de la via, és per això que la localització nuclear de  $\beta$ -catenina és un indicador de l'activació de la via de senyalització.

En primer lloc es va analitzar la localització subcel·lular de la proteïna  $\beta$ -catenina mitjançant la tècnica d'immunofluorescència. A la figura R1.1 s'observa la presència de  $\beta$ -catenina, tant al citoplasma com al nucli, de les cèl·lules de sarcoma analitzades ordenades de menor a major intensitat de senyal de  $\beta$ -catenina nuclear.



**Figura R1.1. Localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.** Les línies cel·lulars es van incubar fins a assolir un 80% de confluència, fixar amb una solució de metanol:acetona (1:1) i bloquejar amb BSA al 5%. La proteïna  $\beta$ -catenina es va visualitzar mitjançant l'anticòs primari  $\beta$ -catenina (D10A8) i l'anticòs secundari Alexa Fluor 488 (verd) anticonill. Es va utilitzar DAPI per la visualització dels nuclis. Les imatges es van prendre amb el microscopi confocal (equip ZEISS LSM 710) i l'objectiu de 40x.

## RESULTATS CAPÍTOL 1

Aquesta intensitat de senyal es va quantificar i es va calcular un IRS (de l'anglès, *immunoreactive score*), el qual permet classificar les línies cel·lulars estudiades, segons un índex immunoreactiu que té en compte la intensitat del senyal d'immunofluorescència al nucli (score 1) i el percentatge de cèl·lules que presenten senyal positiu (score 2) (Taula R1.1). De les línies cel·lulars analitzades, un 75% (6/8) van presentar un perfil d'immunofluorescència fort, un 12,5% (1/8) un perfil moderat i un altre 12,5% (1/8) un perfil feble.

**Taula R1.1. Índex d'immunoreactivitat (IRS) per a cada línia cel·lular de sarcomes de parts toves.**

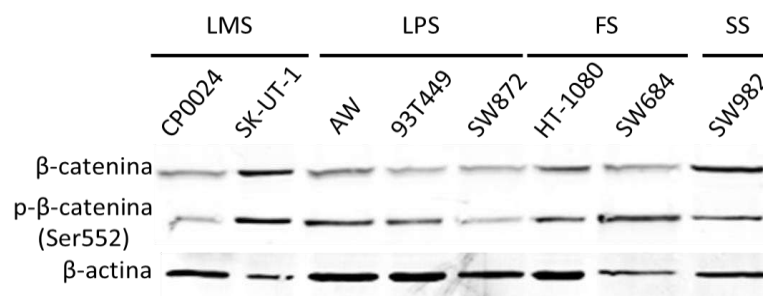
Línia cel·lular	Score 1	Score 2	IRS	Línia cel·lular	Score 1	Score 2	IRS
AW	1	4	4	SK-UT-1	3	3	9
CP0024	2	4	8	93T449	3	4	12
HT-1080	3	3	9	CP0038	3	4	12
SW982	3	3	9	SW872	3	4	12

Score 1: intensitat de senyal de  $\beta$ -catenina al nucli (1 = intensitat < 90, 2 = intensitat entre 90 i 100, 3 = intensitat > 100).

Score 2: tant per cent de cèl·lules amb quantificació positiva per  $\beta$ -catenina (1 = 0% - 25%, 2 = 26% - 50%, 3 = 51% - 75% i 4 = 76% - 100%).

IRS: índex d'immunoreactivitat = Score 1 x Score 2 (lleu (IRS = 1 - 4), moderat (IRS = 5 - 8) i fort (IRS = 9 - 12)). Índex generat pel grup d'investigació i adaptat de Fedchenko et. al. 2014 [215].

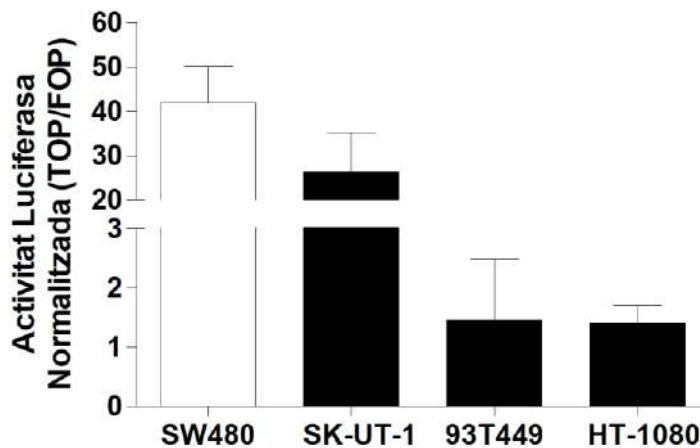
Tot seguit es va determinar els nivells d'expressió de la proteïna  $\beta$ -catenina i de la seva forma activa (p-Ser552- $\beta$ -catenina) a les diferents línies cel·lulars i cultius primaris, tal com es mostra a la figura R1.2, observant que les diferents línies cel·lulars presentaven diferents nivells d'expressió de  $\beta$ -catenina (tant de proteïna total com de la seva forma activa) independentment de la seva histologia. Un cop feta la quantificació de les bandes immunoreactives es va veure que la línia cel·lular de leiomioma SK-UT-1, la qual presenta mutacions en *APC* (c.3286C>T i c.4666delA), era la que mostrava uns nivells més alts de p-Ser552- $\beta$ -catenina. Tal com s'ha esmentat a la introducció, mutacions en *APC* o  $\beta$ -catenina són alteracions moleculars clau a l'inici de la carcinogènesi del càncer colorectal encara que són poc freqüents en sarcomes. El fet que la línia cel·lular de leiomioma SK-UT-1 presenti una mutació en *APC* condiciona l'estat d'activació aberrant de la via Wnt/ $\beta$ -catenina i explica l'elevada expressió proteica de  $\beta$ -catenina. En la resta de línies cel·lulars, altres mecanismes alternatius a *APC* deuen ser els causants de l'activació de la via canònica.



**Figura R1.2. Expressió de  $\beta$ -catenina i p-Ser552- $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.**

Les línies cel·lulars es van incubar fins a assolir un 80% de confluència. El panell mostra les bandes immunoreactives, tant de  $\beta$ -catenina total com p-Ser552- $\beta$ -catenina, representatives de 2 experiments independents. La proteïna  $\beta$ -actina es va fer servir com a control de càrrega. Abreviatures: LMS: Leiomioma, LPS: Liposarcoma, FS: Fibrosarcoma, SS: Sarcoma sinovial.

Un cop demostrat que les línies cel·lulars de SPT expressen les dues formes de la proteïna  $\beta$ -catenina i que aquesta es localitza al nucli, es va estudiar l'activitat transcripcional de la via per mitjà d'un sistema *TCF reporter* acoblat a luciferasa tal com es detalla a l'apartat 4.2.1 de la secció Materials i Mètodes. A la figura R1.3 es mostra el nivell d'activitat transcripcional de 3 línies cel·lulars de SPT (SK-UT-1, 93T449 i HT-1080) juntament amb una línia cel·lular de càncer de còlon (SW480), de la qual s'ha descrit el seu alt nivell d'activació de la via [219]. S'observa com les línies de SPT estudiades van presentar nivells basals intrínsecs d'activació transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, és més, la línia de leiomioma SK-UT-1 va mostrar uns nivells d'activitat semblants a la línia de càncer de còlon utilitzada com a control positiu ( $26,4 \pm 8,8$  i  $41,9 \pm 8,3$ , respectivament). Aquests resultats concorden amb els anteriors i demostren que  $\beta$ -catenina actua com a factor de transcripció en les cèl·lules de SPT i que el nivell d'activació és línia-cel·lular dependent, essent la línia de leiomioma SK-UT-1 la que va presentar nivells equiparables a una línia cel·lular de càncer colorectal amb activitat transcripcional d'aquesta via ben descrita anteriorment.

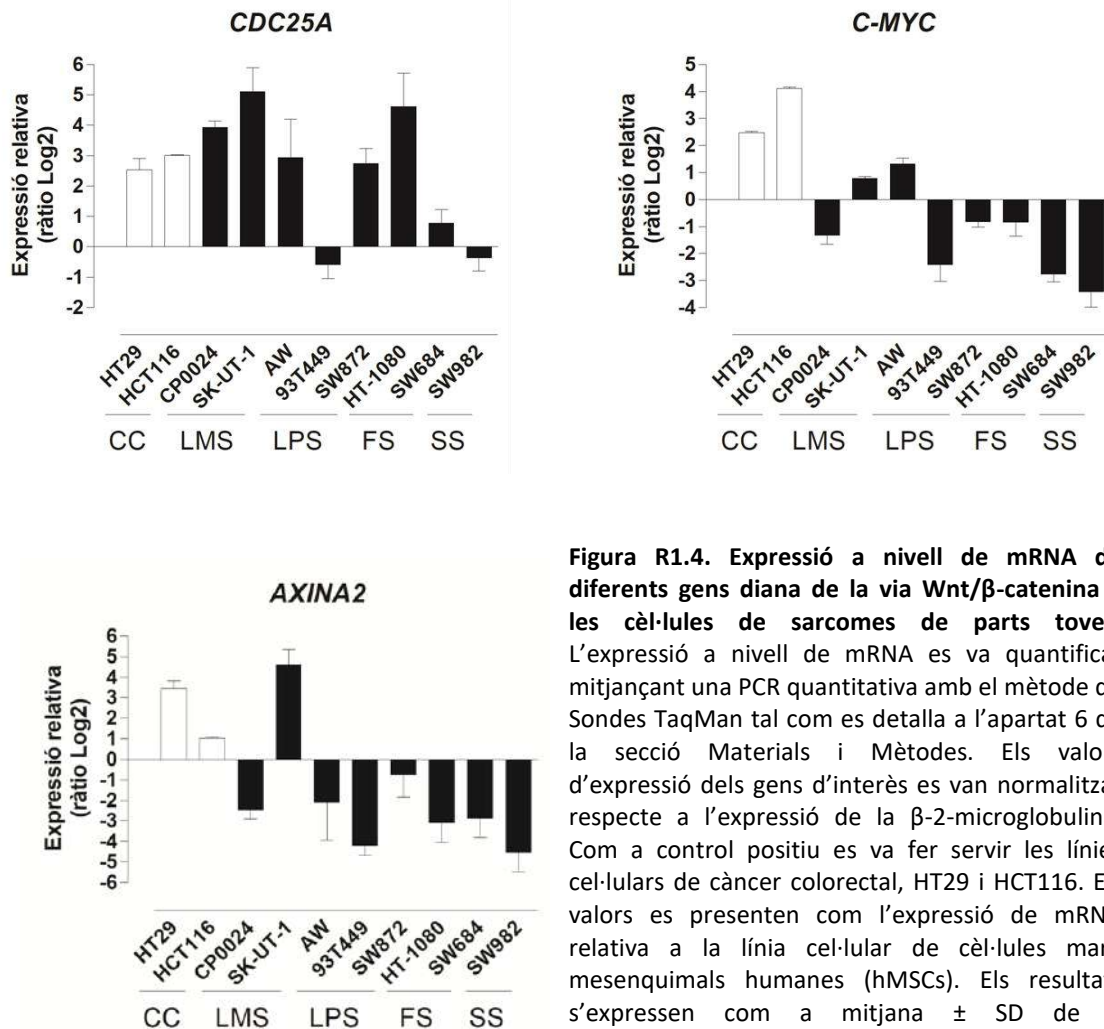


**Figura R1.3. Nivells basals intrínsecs de l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.** Les cèl·lules es van transfectar amb el sistema *TCF reporter* al cap de 24 hores d'haver estat sembrades i 24 hores després de la transfecció es va mesurar l'activitat de la *Firefly* luciferasa mitjançant el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega). Les dades es presenten com la ràtio TOP/FOP de l'activitat de la *Firefly* luciferasa mesurada normalitzada amb l'activitat de la *Renilla* luciferasa. La línia cel·lular de càncer de còlon SW480 es va fer servir com a control positiu. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD de 2 determinacions independents fetes per triplicat.

Per tal de comprovar com aquesta activació transcripcional afecta gens diana de la via en SPT, es va analitzar l'expressió de mRNA d'alguns d'aquests gens diana incloent: *CDC25A*, el qual s'ha descrit com a responsable de la proliferació cel·lular en sarcomes (154), *C-MYC* i *AXINA2*, els quals són coneguts per ser gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina independentment del teixit. La figura R1.4 mostra els nivells d'expressió relativa de mRNA d'aquests gens en el panell de línies cel·lulars de SPT, en la línia de cèl·lules mare mesenquimals hMSCs i en dues línies cel·lulars de càncer colorectal (HT29 i HCT116). La línia hMSCs prové de cèl·lules mare mesenquimals humanes i es va fer servir com a referència perquè expressa nivells endògens baixos de la via Wnt/ $\beta$ -catenina; mentre que les dues línies cel·lulars de càncer colorectal (HT29 i HCT116) van ser utilitzades com a control positiu per la seva activació intrínseca de la via. Les línies de SPT van presentar nivells més alts de *CDC25A* que la línia cel·lular hMSCs. És més, 5

## RESULTATS CAPÍTOL 1

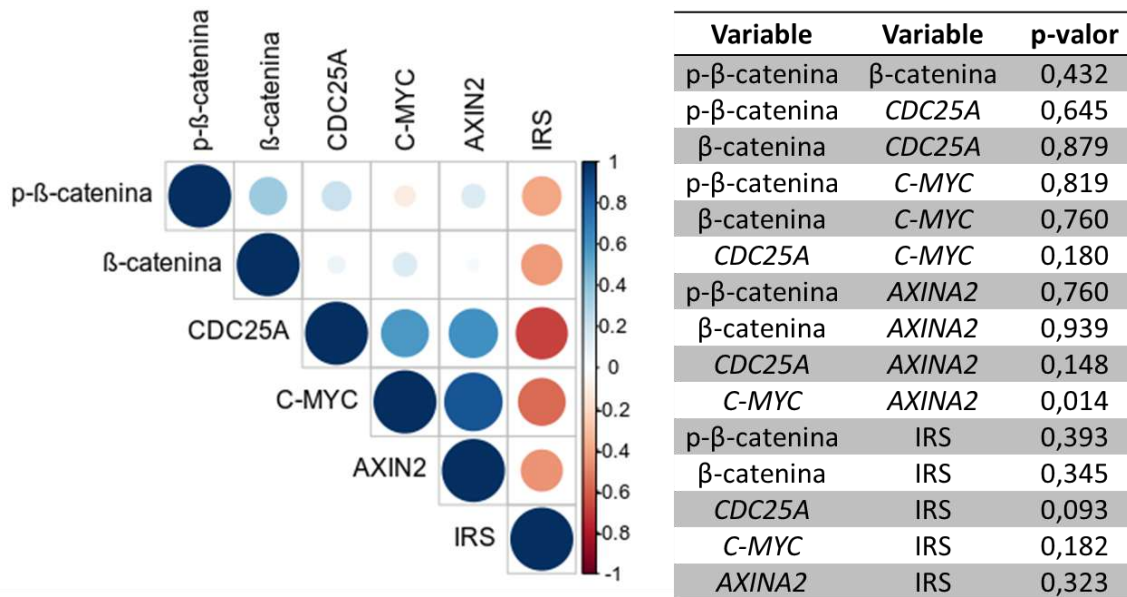
de les línies analitzades (CP0024, SK-UT-1, AW, SW872 i HT-1080) van mostrar nivells d'expressió de *CDC25A* més alts ( $3,94 \pm 0,20$ ,  $5,11 \pm 0,78$ ,  $2,94 \pm 1,26$ ,  $2,75 \pm 0,49$  i  $4,62 \pm 1,10$  respectivament) que les línies de càncer colorectal ( $2,54 \pm 0,37$  i  $3,02 \pm 0,01$  per les HT29 i HCT116, respectivament). Pel que fa a *C-MYC*, els nivells d'expressió de mRNA van ser més baixos que en les línies de càncer colorectal (amb una mitja de  $-1,18$  pels SPT i de  $3,29$  per les línies de càncer de colorectal), on *C-MYC* és el principal responsable de la proliferació cel·lular induïda per la via Wnt/ $\beta$ -catenina. A excepció de la línia SK-UT-1 ( $4,59 \pm 0,77$ ), les línies cel·lulars de SPT van presentar uns nivells d'expressió de mRNA d'*AXINA2* baixos ( $3,45 \pm 0,38$  i  $1,04 \pm 0,07$  per les HT29 i HCT116 respectivament), més baixos fins i tot que els que presentà la línia utilitzada com a referència (hMSCs). Aquests resultats de dades transcripcionals mostren que *CDC25A* és un gen diana altament expressat en SPT, a diferència de *C-MYC* i *AXINA2* que presenten nivells baixos. Així, dels resultats d'activació de la via demostrats en aquest apartat, el gen que correlaciona millor a nivell d'expressió amb aquests resultats previs seria el gen *CDC25A* implicat en la regulació del cicle cel·lular i que podria jugar un paper important en sarcomes.



**Figura R1.4. Expressió a nivell de mRNA de diferents gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Els valors d'expressió dels gens d'interès es van normalitzar respecte a l'expressió de la  $\beta$ -2-microglobulina. Com a control positiu es va fer servir les línies cel·lulars de càncer colorectal, HT29 i HCT116. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a la línia cel·lular de cèl·lules mare mesenquimals humanes (hMSCs). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD de 2 determinacions independents fetes per duplicat.

Abreviatures: CC: Càncer colorectal, LMS: Leiomioma, LPS: Liposarcoma, FS: Fibrosarcoma, SS: Sarcoma sinovial.

Amb les dades de localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina (IRS), nivells d'expressió tant de  $\beta$ -catenina total com de p-Ser552- $\beta$ -catenina i nivells d'expressió de mRNA de gens diana de la via, es va fer una anàlisi de correlacions per estudiar si hi havia alguna relació entre aquestes dades moleculars. A figura R1.5 es mostra el resultat obtingut. Així, es va trobar una correlació significativa ( $p < 0,05$ ) entre els nivells d'expressió de mRNA de *C-MYC* i *AXIN2*. Encara que no arribant a nivells de significació, es va constatar una tendència a correlacionar entre els nivells de  $\beta$ -catenina fosforilada (forma activa) amb la  $\beta$ -catenina total i els nivells d'expressió de *CDC25A*. Per altra banda, no es va trobar cap correlació entre aquestes dades moleculars i la histologia dels SPT.



**Figura R1.5. Anàlisi de correlacions de les dades moleculars estudiades en sarcomes de parts toves.** A la dreta representació gràfica del valor del coeficient de correlació de Spearman per a cada una de les correlacions dos a dos. A l'esquerra taula amb els p-valors obtinguts per cada correlació.

1.2. La inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina disminueix la viabilitat i proliferació cel·lular en línies cel·lulars i cultius primaris.

Tal com s'ha mencionat a la introducció, actualment existeixen diferents molècules amb efecte inhibitori sobre la via Wnt/ $\beta$ -catenina, les quals podrien suposar noves estratègies terapèutiques en neoplàsies on aquesta via estigui activada mitjançant diversos mecanismes que condueixin a una sobreexpressió de gens diana. Un cop demostrada l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de SPT, es va determinar l'efecte de la inhibició de la via sobre la viabilitat i la proliferació cel·lular *in vitro*.

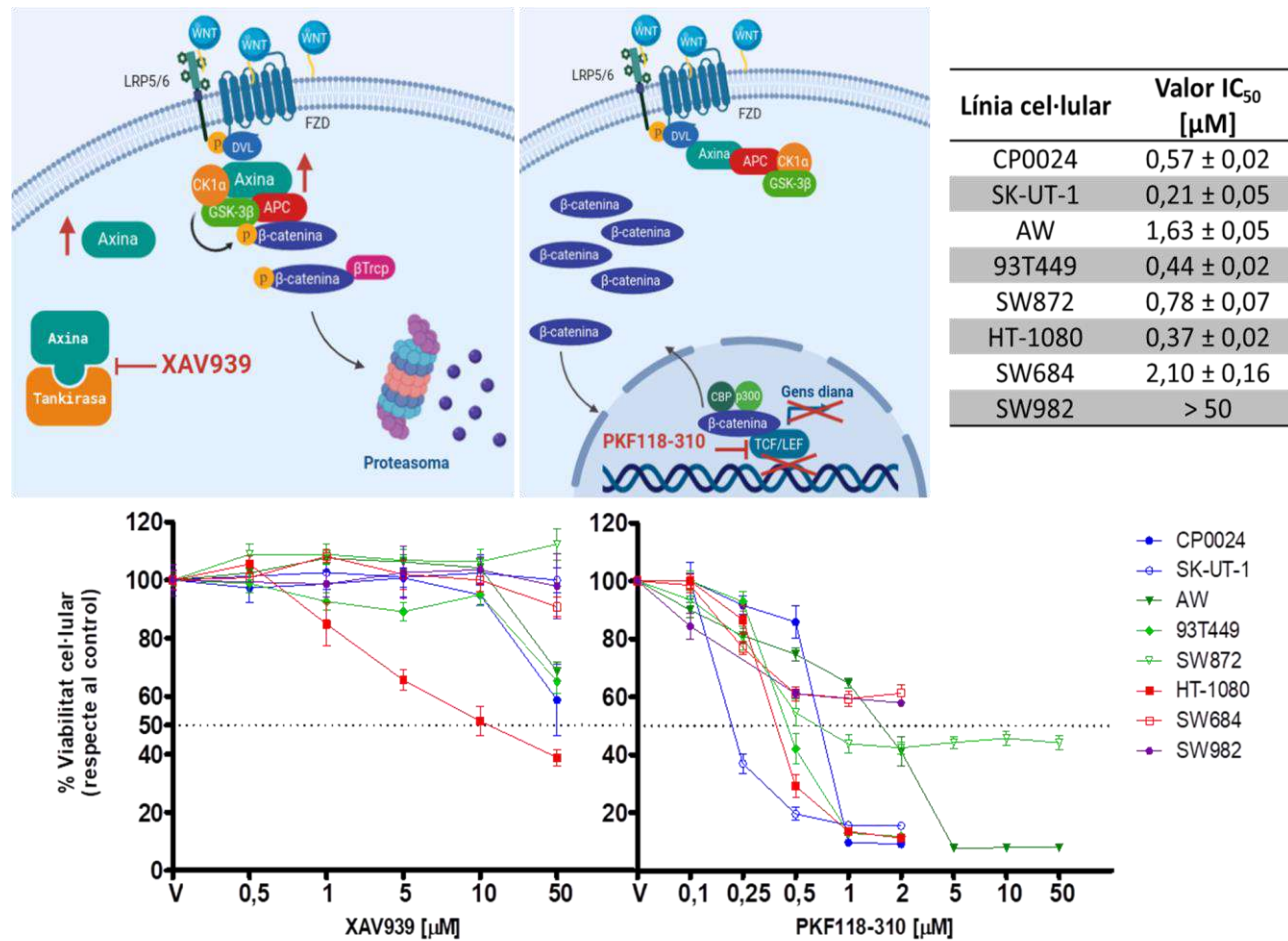
La via de Wnt/ $\beta$ -catenina es troba finament regulada al llarg de tota la cascada de senyalització i s'han desenvolupat molècules inhibidores que incideixen en diferents punts reguladors clau. Existeixen pocs biomarcadors predictors de resposta d'aquests inhibidors, però la mesura d'activitat transcripcional de  $\beta$ -catenina mesurada amb les tècniques presentades a l'apartat anterior és un subrogat de l'alteració d'alguns dels components de la via o dels seus elements reguladors. Així, donat que la majoria de SPT analitzats van presentar cert grau d'activació de la via, va semblar adient procedir

## RESULTATS CAPÍTOL 1

a determinar l'efecte de molècules que actuen a diferents punts de la via, ja que es desconeixien les alteracions subjacents en la majoria dels casos.

Per una banda, les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor de tanquirases XAV939, el qual estimula la degradació de  $\beta$ -catenina, ja que estabilitza la proteïna AXINA. Per l'altre amb l'inhibidor PKF118-310, que impedeix la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina inhibint així l'activitat transcripcional de la via. Les cèl·lules de SPT es van tractar amb concentracions creixents dels dos inhibidors durant 24, 48 i 72 hores i passat aquest temps la viabilitat cel·lular es va analitzar seguint el mètode del *metil-tiazol-tetrazolium* (MTT). A la figura R1.6 es mostra el resultat obtingut, al cap de 48 hores de tractament, amb cadascun dels inhibidors. Així es veu com la inhibició de les tanquireses va tenir un menor efecte sobre la viabilitat cel·lular de les cèl·lules de SPT en comparació amb la inhibició del complex TCF/ $\beta$ -catenina, ja que només va ser capaç de reduir la viabilitat cel·lular més d'un 50% a la línia de fibrosarcoma HT-1080 mentre amb l'inhibidor del complex TCF/ $\beta$ -catenina es va disminuir la viabilitat cel·lular un 50% a 7 de les 8 línies cel·lulars tractades amb l'inhibidor, permetent el càlcul del paràmetre  $IC_{50}$  mostrat en la taula de la mateixa figura R1.6.

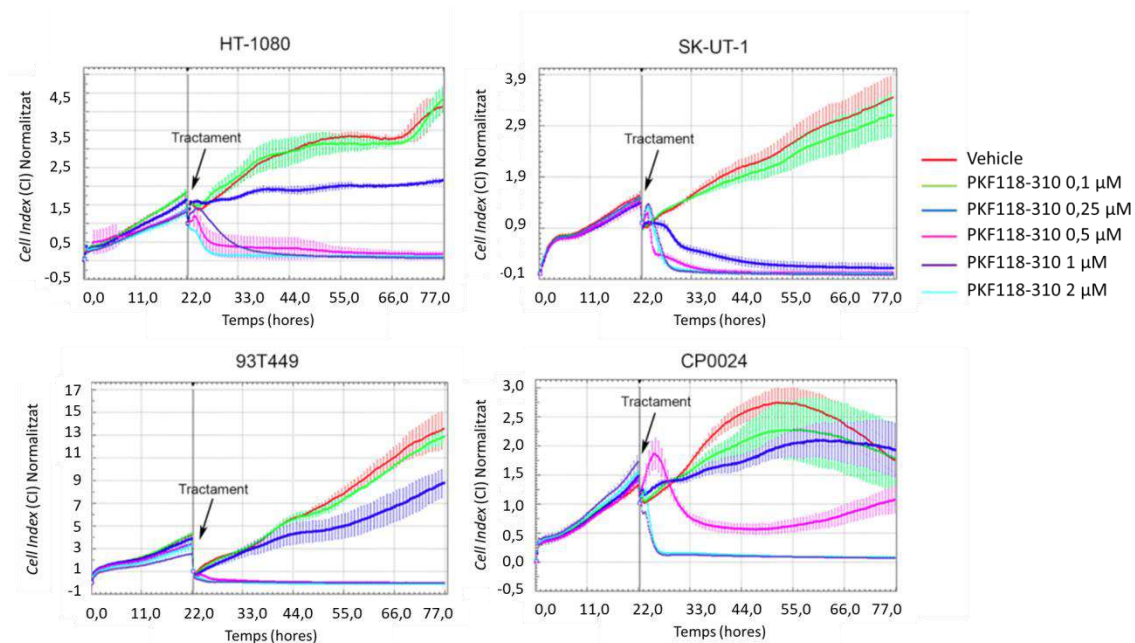




**Figura R1.6. Efecte de la inhibició de la via Wnt/β-catenina sobre la viabilitat cel·lular de les línies cel·lulars de sarcomes de parts toves.** Les cèl·lules es van tractar amb concentracions creixents dels inhibidors XAV939 i PKF118-310 (0,1 μM - 50 μM) i incubar durant 48 hores. La viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant el *CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay Kit*. Els valors de viabilitat cel·lular es representen com a percentatge relatiu a les cèl·lules tractades amb vehicle i les dades s'expressen com a mitjana ± SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat.

## RESULTATS CAPÍTOL 1

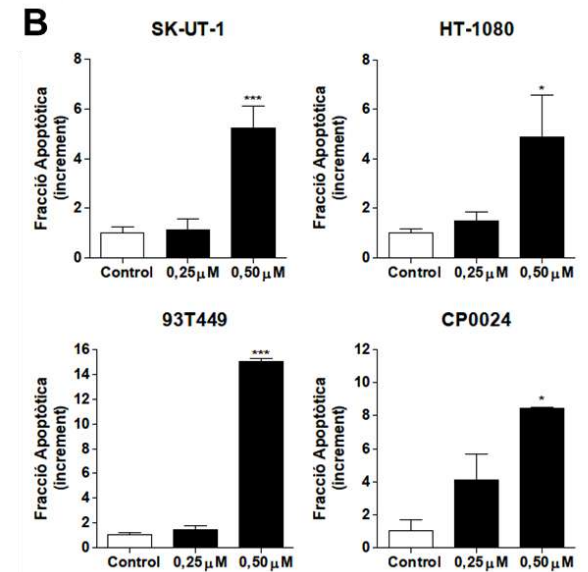
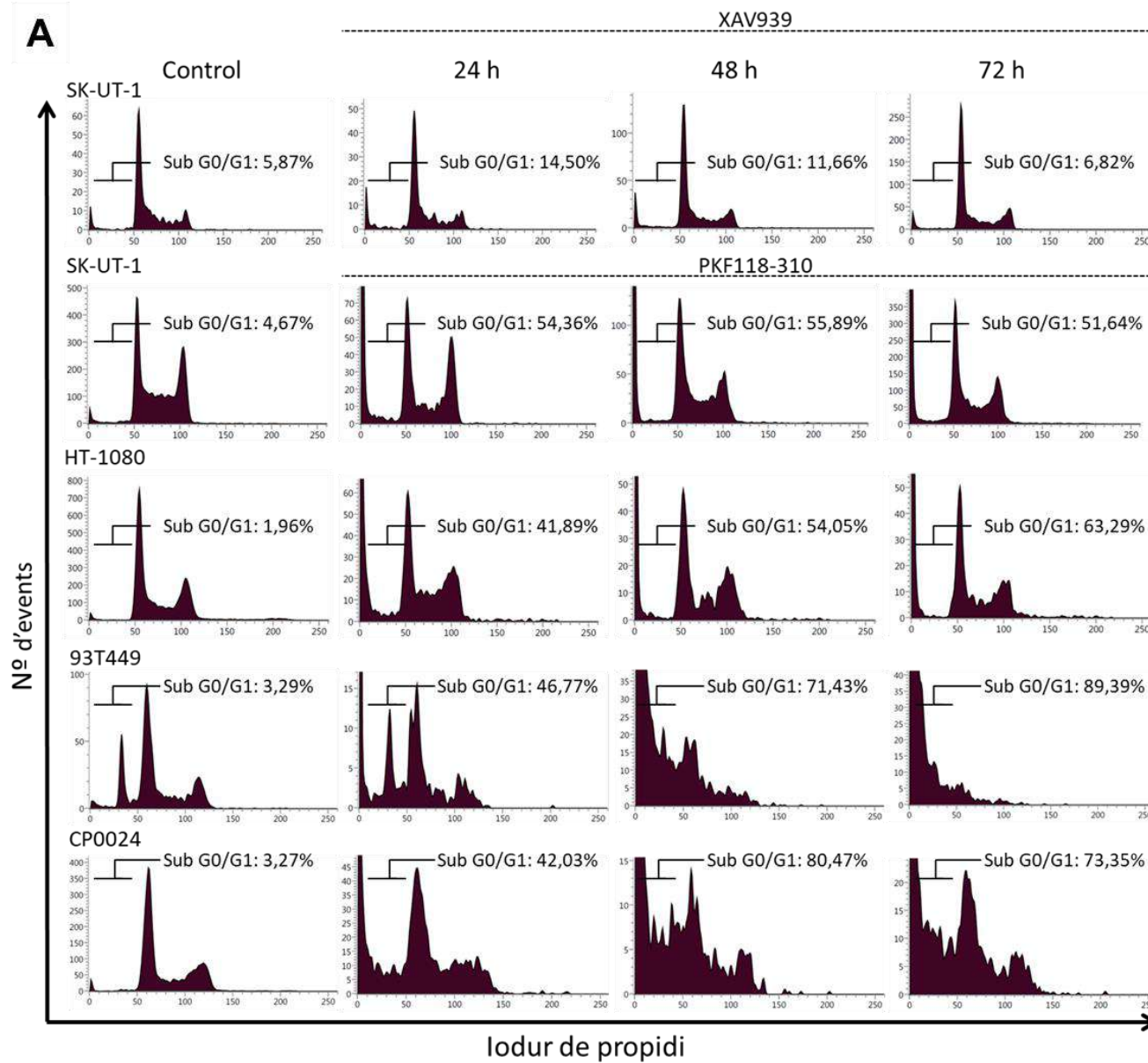
Adicionalment, l'efecte de la inhibició del complex TCF/ $\beta$ -catenina sobre el creixement cel·lular també es va determinar utilitzant una altra tècnica, la de monitoratge a temps real del creixement cel·lular mitjançant l'aparell xCELLigence System, obtenint uns resultats equivalents als obtinguts amb l'MTT, tal com es mostra a la figura R1.7.



**Figura R1.7. Monitoratge a temps real del creixement cel·lular de cèl·lules de sarcoma de parts toves tractades amb l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina.** Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor (0,1  $\mu$ M – 2  $\mu$ M), el creixement cel·lular va ser monitorat a temps real i de manera no invasiva mitjançant el sistema xCELLigence (ACEA Bioscience). Els valors de Cell Index (CI) es van normalitzar als valors de CI al temps d'iniciar el tractament, tal com s'indica amb la fletxa negra. Els perfils de CI de les cèl·lules tractades amb inhibidor i les cèl·lules tractades amb vehicle (línia vermella) es presenten com la mitjana junt amb les barres de desviació estàndard de 2 determinacions independents fetes per triplicat.

### 1.3. La inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina promou l'apoptosi.

Per tal de veure com aquest efecte sobre la viabilitat cel·lular és degut a un impacte sobre algunes de les fases del cicle cel·lular, es va analitzar la distribució de les fases del cicle cel·lular. Seguint la mateixa línia que en l'anàlisi de viabilitat cel·lular, la inhibició de les tanquirases no va tenir cap efecte sobre les diferents fases del cicle cel·lular a cap de les línies de SPT estudiades tal com es mostra a la figura R1.8A, la qual és una figura representativa dels resultats obtinguts amb la resta de línies cel·lulars. En canvi, la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina va provocar la mort cel·lular (augment de la fracció sub G0/G1) (Figura R1.8B), la qual podria ser compatible amb apoptosi en totes les línies estudiades. Sent aquest, un augment dosi-dependenent tal com es veu a la figura R1.8C, on passades 48 hores de tractament, amb una concentració de l'inhibidor de 0,5  $\mu$ M les línies de liposarcoma 93T449 i de leiomioma CP0024, que són les que es van veure més afectades, patiren un augment de la fracció apoptòtica de 14 i 7 vegades, respectivament. Mentre que a les línies de leiomioma SK-UT-1 i de fibrosarcoma HT-1080 l'augment va ser de 4 vegades la fracció apoptòtica respecte al control.



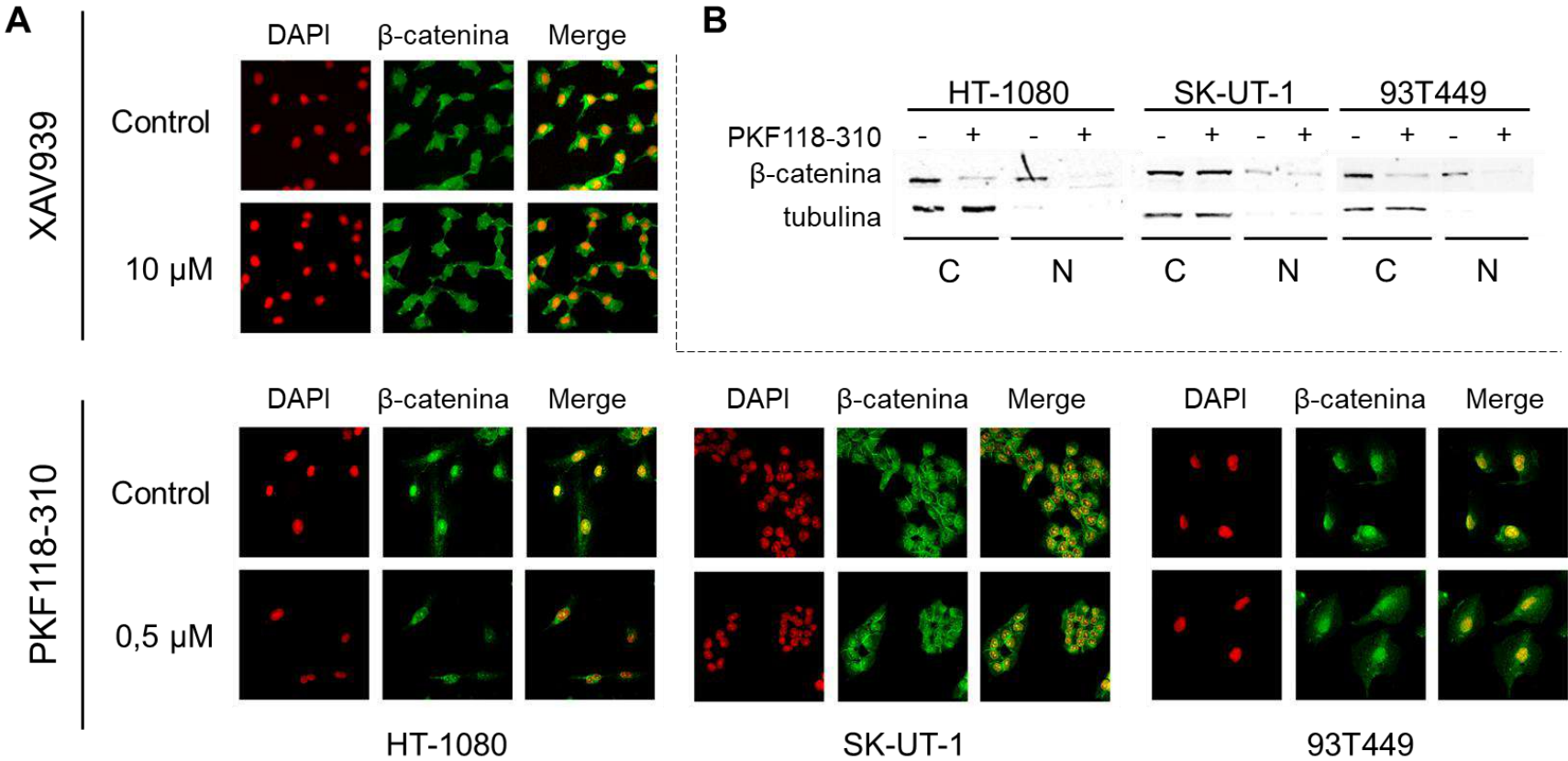
**Figura R1.8.** Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a les diferents fases del cicle cel·lular de les línies cel·lulars de sarcomes de parts toves. Les línies cel·lulars indicades a la figura es van tractar amb **A**) l'inhibidor d'enzims Tankirasa, XAV939 (5  $\mu$ M) o bé amb l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina, PKF118-310 (0,5  $\mu$ M) durant 24, 48 i 72 hores. Després les cèl·lules es van fixar amb etanol i tenyir amb iodur de propidi, el contingut en DNA es va determinar mitjançant la citometria de flux. **B**) El grau d'inducció a mort cel·lular (població subG1) a diferents concentracions de PKF118-310 (0,25 i 0,50  $\mu$ M) es representa com a increment en nombre de vegades en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. Les dades es presenten com la mitjana  $\pm$  SEM de 3 experiments independents.

## RESULTATS CAPÍTOL 1

### 1.4. La inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina disminueix la presència de $\beta$ -catenina al nucli.

Quan es troba dins el nucli,  $\beta$ -catenina té la capacitat d'activar la transcripció de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. Per tal de conèixer l'impacte que tenen els inhibidors estudiats sobre la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina, les cèl·lules de leiomioma SK-UT-1, fibrosarcoma HT-1080 i liposarcoma 93T449 es van tractar amb l'inhibidor d'enzims Tankirasa, XAV939 (5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M), i amb l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina, PKF118-310 (0,5  $\mu$ M i 1  $\mu$ M), durant 48 i 72 hores. A la figura R1.9A es presenten els resultats obtinguts, a 48 hores de tractament, amb només una de les concentracions utilitzades per cada inhibidor. Les imatges d'immunofluorescència mostren com tots dos inhibidors van produir una disminució dels nivells de  $\beta$ -catenina nuclear 48 hores després de tractament. En el cas de l'inhibidor d'enzims Tankirasa XAV939, aquest efecte sobre la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina només es va produir a la línia de fibrosarcoma HT-1080 (sensible a l'inhibidor). Pel contrari, a la línia *APC*-mutada de leiomioma SK-UT-1 l'inhibidor no va provocar cap canvi sobre la localització de  $\beta$ -catenina (aquests resultats no es mostren) a cap de les dues concentracions ni temps d'exposició a l'inhibidor estudiats. Això es deu al punt de la via on actua l'inhibidor i al fet que la línia cel·lular SK-UT-1 conté mutacions en *APC*, de manera que XAV939 no és capaç de retenir a  $\beta$ -catenina al citosol (evitant la seva translocació al nucli) en línies cel·lulars amb alteracions moleculars que els permetin escapar de la regulació del complex de destrucció.

A la figura R1.9B es veu com l'expressió corresponent a la fracció nuclear (N) de  $\beta$ -catenina pràcticament va desaparèixer a les cèl·lules tractades amb l'inhibidor PKF118-310, mentre la fracció citoplasmàtica (C) va disminuir en el cas de la línia de fibrosarcoma HT-1080 i de liposarcoma 93T449 i pel contrari, a la línia de leiomioma SK-UT-1 no es va veure alterada.

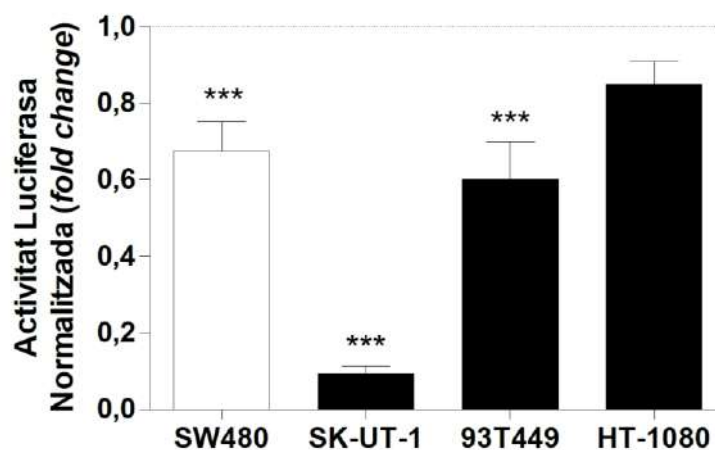


**Figura R1.9. Efectes de la inhibició de la via Wnt/β-catenina a la localització subcel·lular de β-catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves. A)** Les línies cel·lulars es van tractar amb l’inhibidor d’enzims Tankirasa, XAV939 (10 μM) o amb l’inhibidor de la formació del complex TCF/β-catenina, PKF118-310 (0,5 μM), passades 48 hores es van fixar amb una solució de metanol:acetona (1:1) i bloquejar amb BSA al 5%. La proteïna β-catenina es va visualitzar mitjançant l’anticòs primari β-catenina (D10A8) i l’anticòs secundari Alexa Fluor 488 (verd) anticorrell. Es va utilitzar DAPI per a la visualització dels nuclis. Les imatges, representatives de 2 experiments realitzats per duplicat, es van prendre amb el microscopi confocal (equip ZEISS LSM 710) i l’objectiu de 40x. **B)** Les línies cel·lulars es van tractar amb l’inhibidor de la formació del complex TCF/β-catenina, passades 48 hores es va separar la fracció nuclear de la citoplasmàtica tal com es detalla a l’apartat 7.3 de la secció Materials i Mètodes. El panell mostra les bandes immunoreactives de β-catenina total nuclear i citoplasmàtica així com de tubulina, utilitzada com a control de càrrega del compartiment citoplasmàtic, la imatge és representativa de 3 experiments independents. Abreviatures: C: citoplasma, N: nuclis.

## RESULTATS CAPÍTOL 1

1.5. La inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina disminueix l'activitat transcripcional i l'expressió de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina.

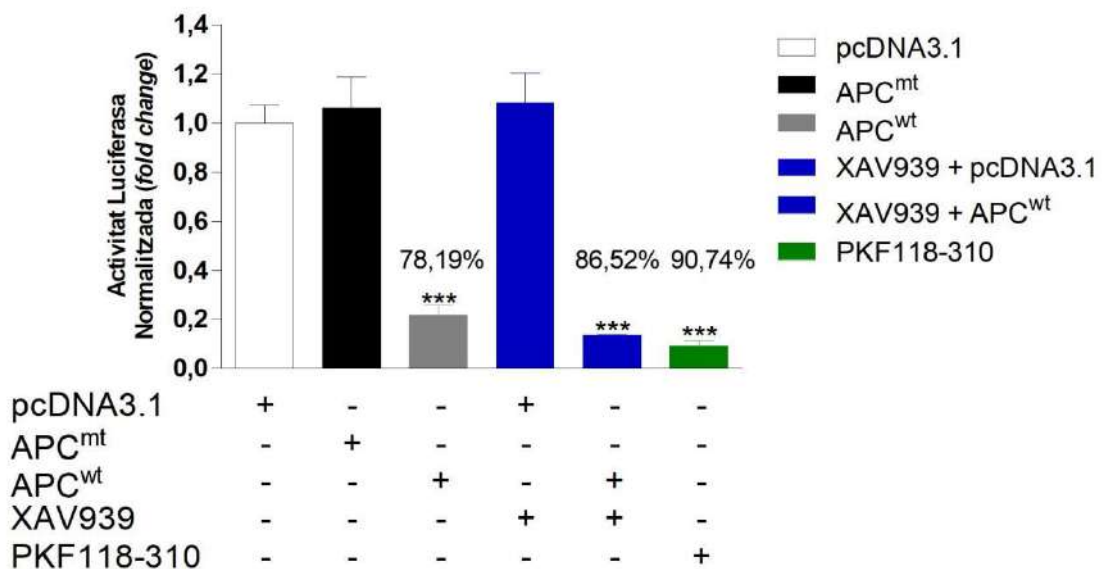
Un cop establert que el tractament de les cèl·lules de SPT amb inhibidors de la via té un impacte sobre la seva viabilitat i sobre la localització cel·lular de  $\beta$ -catenina, es va voler estudiar si aquesta disminució dels nivells de  $\beta$ -catenina nuclear es veien traduïts a un efecte sobre el seu paper com a mediadora de la transcripció dels gens diana de la via. Com a primera aproximació, es va mesurar l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina mitjançant el sistema *TCF reporter* a les línies cel·lulars de SPT a les que se'ls havia inhibit la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina amb l'inhibidor PKF118-310 (0,5  $\mu$ M) durant 24 hores. Tal com s'observa a la figura R1.10, l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina va disminuir a les 3 línies cel·lulars de SPT, sent la línia de fibrosarcoma HT-1080 la que va mostrar una menor reducció (15,10  $\pm$  6,04%); seguida de la línia de liposarcoma 93T449 amb una reducció de l'activitat transcripcional (39,88  $\pm$  9,94%) molt semblant a la de la línia de càncer de còlon SW480 (32,47  $\pm$  7,58%), que es va fer servir de control positiu perquè conté una mutació en *APC* (AAs1338) [220]. La línia de leiomioma SK-UT-1 també té mutacions en *APC* (c.3286C>T i c.4666delA) i va presentar nivells basals intrínsecs d'activitat transcripcional molt semblants a la línia de càncer de còlon SW480, tal com es pot observar a la figura R1.3. Curiosament la línia SK-UT-1 és la que va mostrar una major reducció de l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina (90,74  $\pm$  2,06%), indicant que aquest inhibidor té un impacte directe i específic sobre  $\beta$ -catenina, accentuat en línies que tenen mutacions *driver* en components clau de la via.



**Figura R1.10. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina sobre l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.** Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina (0,5  $\mu$ M), passades 24 hores es van transfectar amb el sistema *TCF reporter* i 24 hores després de la transfecció, es va mesurar l'activitat de la luciferasa mitjançant el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). L'activitat de la *Firefly* luciferasa mesurada es va normalitzar amb l'activitat de la *Renilla* luciferasa. Les dades es presenten com a *fold change* de la ràtio TOP/FOP en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Per tal de demostrar clarament l'especificitat dels inhibidors sobre la via Wnt/ $\beta$ -catenina, es van dur a terme transfeccions de dos plasmidis addicionals a la línia

cel·lular APC-mutada de leiomioma, SK-UT-1. El primer, pCMV-APC 1309Δ (APC<sup>mt</sup>), conté una mutació truncant en APC mentre que el segon, pCMV-APC WT (APC<sup>wt</sup>), conté la seqüència intacta. El plasmidi buit pcDNA3.1 es va fer servir com a control negatiu de transfecció. Tal com es mostra a la figura R1.11, l'expressió del plasmidi pCMV-APC 1309Δ no va produir cap efecte sobre l'activitat transcripcional del sistema *TCF reporter*, ja que provocaria un efecte redundat sobre la mutació que ja conté aquesta línia cel·lular. Per altra banda, l'expressió del plasmidi pCMV-APC WT a les cèl·lules de leiomioma SK-UT-1 va reduir l'activitat transcripcional del complex TCF/β-catenina un 78,19 ± 4,02%, percentatge semblant al produït per l'inhibidor PKF118-310 (90,74 ± 2,06%). Aquest resultat demostra que l'efecte de l'inhibidor es pot aconseguir, quasi amb la seva totalitat, amb la introducció d'una proteïna APC competent que pugui potenciar la degradació de β-catenina i demostra l'elevada especificitat d'aquest inhibidor. En canvi, la molècula XAV939 no va provocar cap efecte sobre l'activitat de β-catenina a la línia cel·lular SK-UT-1, perquè XAV939 actua sobre el complex de destrucció del que pot escapar β-catenina, ja que aquesta línia de sarcoma té una mutació en APC. Ara bé, quan a aquestes cèl·lules tractades amb XAV939 se'ls restaura la funcionalitat d'APC transfectant-les amb el plasmidi pCMV-APC WT, l'activitat transcripcional disminueix al mateix nivell que amb el plasmidi sol. Tots aquests resultats mostren que en un context de mutació en APC i activació de β-catenina, els inhibidors només seran eficients si actuen per sota de la proteïna mutada en la cascada de senyalització i ho seran al mateix nivell que si es restaura la funcionalitat perduda de la proteïna APC. Per tant, és rellevant conèixer les característiques mutacionals de les cèl·lules tumorals per tal de poder predir respostes a aquests inhibidors.

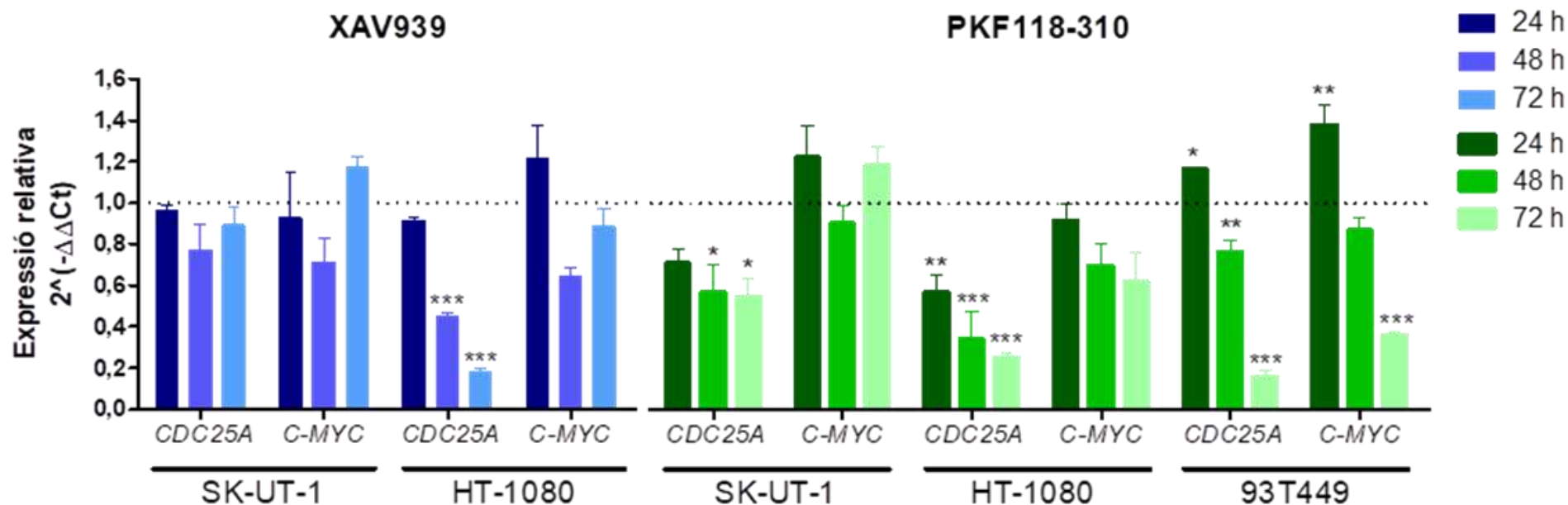


**Figura R1.11. Avaluació de l'especificitat de les molècules PKF118-310 i XAV939 per inhibir la via Wnt/β-catenina.** La línia cel·lular de leiomioma SK-UT-1 es va transfectar amb els plasmidius indicats per tal de restaurar la funcionalitat de la proteïna APC parcialment (APC<sup>mt</sup>) o completament (APC<sup>wt</sup>) i es van tractar amb vehicle, XAV939 (5 μM) o PKF118-310 (0,5 μM). Al cap de 24 hores de la transfecció, es va mesurar l'activitat de la luciferasa mitjançant el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). L'activitat de la *Firefly* luciferasa mesurada es va normalitzar amb l'activitat de la *Renilla* luciferasa. Les dades es presenten com a *fold change* de la ràtio TOP/FOP en comparació amb les cèl·lules control. Els resultats s'expressen com a mitjana ± SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*\*\* p < 0,001.

## RESULTATS CAPÍTOL 1

Un cop vist que la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina disminuïa l'activitat transcripcional de la via, es va estudiar l'efecte d'aquesta inhibició sobre l'expressió de gens diana de la via com *CDC25A* i *C-MYC*. Per això, en primer lloc, es va tractar les línies cel·lulars de leiomioma SK-UT-1 i fibrosarcoma HT-1080 amb l'inhibidor d'enzims Tankirasa XAV939 (0,5  $\mu$ M). Tal com es mostra a la figura R1.12 (esquerra), la inhibició d'enzims Tankirasa no va afectar l'expressió de cap dels dos gens diana analitzats a la línia cel·lular SK-UT-1, mentre que a la línia sensible a l'inhibidor, la HT-1080, el nivell d'expressió de *CDC25A* va disminuir un  $55,0 \pm 2,0\%$  i un  $81,7 \pm 1,7\%$  a les 48 i 72 hores, respectivament. L'efecte de la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina sobre l'expressió dels gens diana de la via es va analitzar a les línies cel·lulars de leiomioma SK-UT-1; fibrosarcoma HT-1080 i liposarcoma 93T449 exposant-les a PKF118-310 (0,25  $\mu$ M). A la figura R1.12 (dreta) es pot veure una reducció de l'expressió de *CDC25A* estadísticament significativa a totes les línies tractades amb l'inhibidor, no sent així per *C-MYC*. A la línia de leiomioma SK-UT-1, la disminució del nivell d'expressió va ser del  $43,1 \pm 13,4\%$  i del  $45,4 \pm 9,1\%$ , a les 48 i 72 hores, respectivament. A la línia cel·lular de fibrosarcoma HT-1080, es va observar una reducció del  $66,1 \pm 13,6\%$  i  $74,7 \pm 2,5\%$  a les 48 i 72 hores, respectivament. I a la línia de liposarcoma 93T449, aquesta reducció va ser del  $23,7 \pm 5,8\%$  i  $84,1 \pm 3,1\%$  a les 48 i 72 hores, respectivament. En resum, aquests resultats mostren que el gen diana *CDC25A* es veu més afectat per la inhibició de la via que no pas *C-MYC* i que la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina té una major capacitat de disminuir l'expressió d'ambdós gens diana que la inhibició d'enzims Tankirasa.





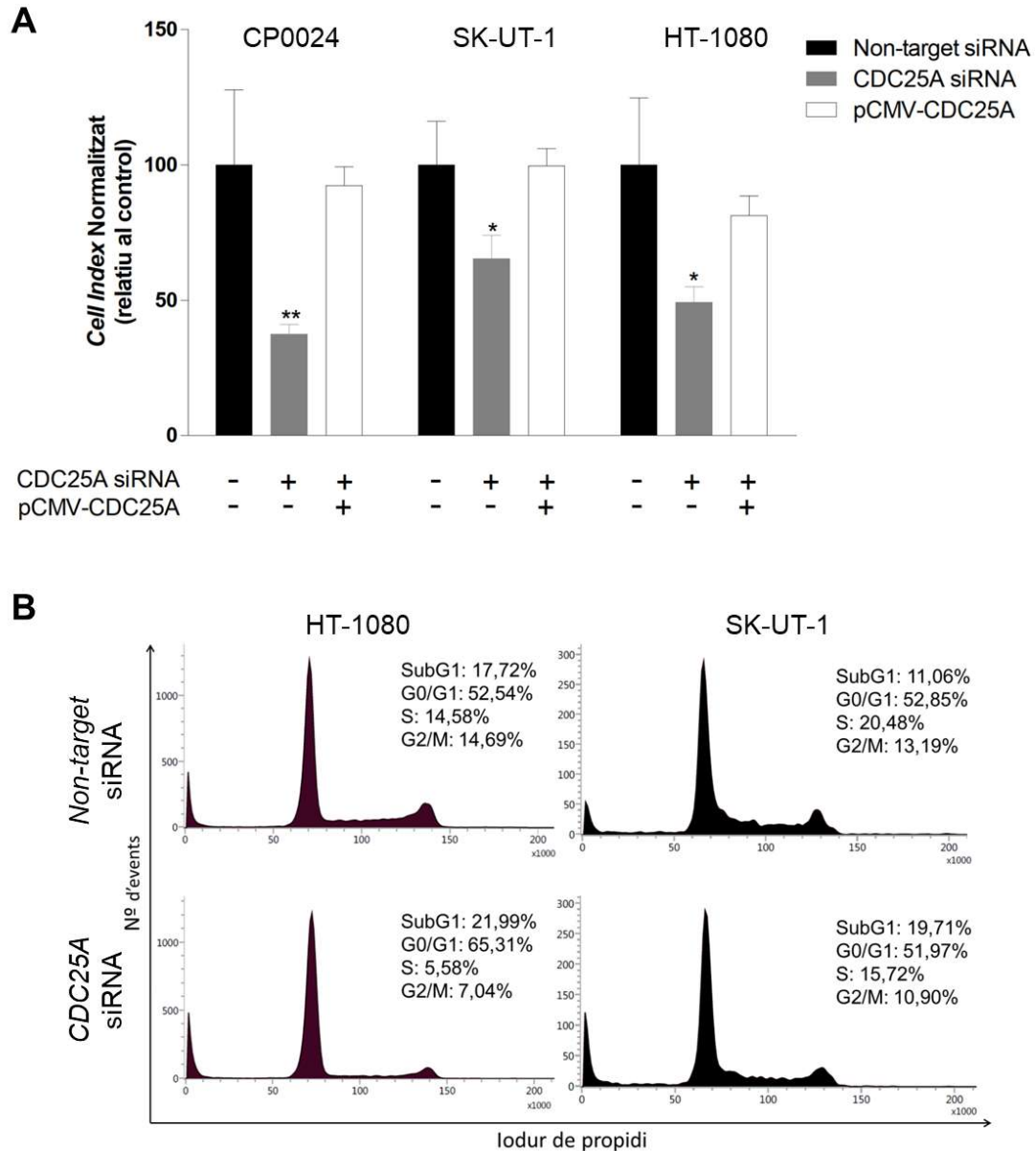
**Figura R1.12. Efectes de la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina a l'expressió de gens diana de la via a les cèl·lules de sarcomes de parts toves.** Les cèl·lules de SPT es van tractar amb l'inhibidor d'enzims Tankirasa, XAV939 (5  $\mu$ M) (esquerra) o l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina, PKF118-310 (0,25  $\mu$ M) (dreta) durant els temps indicats. L'expressió de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan, tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Els valors d'expressió dels gens d'interès es van normalitzar respecte a l'expressió de la  $\beta$ -2-microglobulina. L'expressió de mRNA s'expressa en relació amb el valor obtingut a les cèl·lules tractades amb vehicle que pren el valor 1 (línia discontinua). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD de 2 determinacions independents fetes per duplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

## RESULTATS CAPÍTOL 1

1.6. *CDC25A*, gen diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, juga un paper important en la regulació de la proliferació cel·lular.

Per aprofundir en l'estudi de la implicació de *CDC25A* en SPT es va voler estudiar el seu paper en la proliferació cel·lular, per això es va fer un silenciament de l'expressió del gen mitjançant una transfecció inversa durant 72 hores amb un siRNA específic per *CDC25A* a les línies cel·lulars que presentaren una major expressió del mRNA: les de leiomioma CP0024 i SK-UT-1 i la de fibrosarcoma HT-1080. Durant aquest temps es va monitorar l'efecte del silenciament sobre la proliferació cel·lular mitjançant l'aparell *xCELLigence System*. Tal com es mostra a la figura R1.13A, el silenciament de l'expressió de *CDC25A* va reduir la proliferació cel·lular a totes les línies estudiades. Fent-ho un  $62,54 \pm 3,67\%$ , un  $34,64 \pm 8,75\%$  i un  $50,72 \pm 5,71\%$  per les línies CP0024, SK-UT-1 i HT-1080 respectivament, valors lleugerament inferiors a la disminució provocada per l'inhibidor PKF118-310, indicant que probablement hi ha altres gens diana de la via, a part de *CDC25A*, que poden estar involucrats en el mecanisme pel qual la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina disminueix la proliferació cel·lular en SPT. Malgrat això, l'expressió exògena de *CDC25A* quan es va cotransfectar les cèl·lules amb el plasmidi pCMV-*CDC25A* 24 hores després de la transfecció amb el siRNA va restaurar els valors de *Cell Index* passades 48 hores a totes les línies cel·lulars estudiades, tal com s'observa a la figura R1.13A.

Degut a que *CDC25A* és un regulador del cicle cel·lular (regula les transicions de les fases G1 a la S i G2 a la M) i l'apoptosi, es va estudiar l'efecte del silenciament de l'expressió de *CDC25A* sobre les diferents fases del cicle cel·lular a les línies cel·lulars de leiomioma SK-UT-1 i fibrosarcoma HT-1080 utilitzant la citometria de flux. Tal com es mostra a la figura R1.13B el silenciament de l'expressió de *CDC25A* ( $87 \pm 2\%$ ,  $87 \pm 1\%$  i  $84 \pm 6\%$  de reducció de l'expressió del mRNA de *CDC25A*, al cap de 72 hores de silenciament, a les SK-UT-1, HT-1080 i CP0024 respectivament) va provocar un arrest de les cèl·lules en G1, així com un augment de la fracció subG1 i una disminució de la fracció G2/M respecte a les cèl·lules control. Aquests efectes són equiparables, en part, als obtinguts amb l'inhibidor PKF118-310, indicant que *CDC25A* és un dels gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina més importants en la proliferació aberrant de les cèl·lules de SPT depenent de  $\beta$ -catenina.

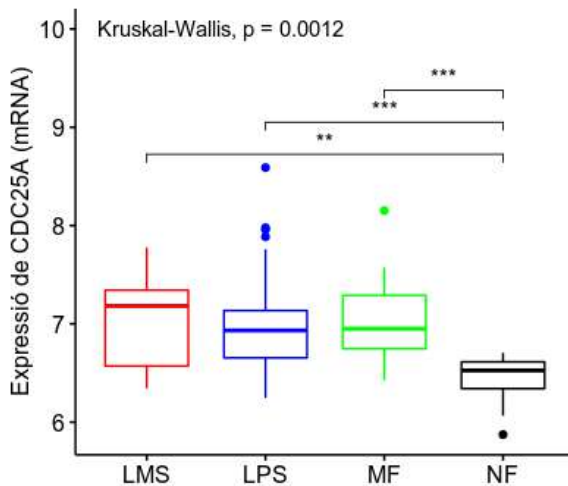


**Figura R1.13. Efectes del silenciament de l'expressió del gen *CDC25A* sobre la proliferació cel·lular i a la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular a les cèl·lules de sarcomes de parts toves. A)** Les cèl·lules de SPT es van transfectar amb el siRNA específic per *CDC25A* durant 72 hores. Al cap de 24 hores de la transfecció amb el siRNA, les cèl·lules es van cotransfectar amb el plasmidi pCMV-*CDC25A* durant 48 hores. La proliferació cel·lular es va monitorar contínuament, de manera no invasiva, gràcies al sistema *xCELLingence* (ACEA Bioscience). Els valors de *Cell Index* (CI) es van normalitzar als valors de CI en el moment de la transfecció. Les dades es presenten com la mitjana  $\pm$  SD dels valors de CI de 2 determinacions independents realitzades per quadruplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$ . **B)** Les cèl·lules de SPT es van transfectar amb el siRNA específic per *CDC25A* durant 72 hores. Després es van fixar amb etanol i tenyir amb iodur de propidi, el contingut en DNA es va determinar mitjançant la citometria de flux. Els histogrames mostrats són representatius de 3 experiments independents.

La rellevància clínica dels resultats observats es va estudiar, com a una primera aproximació, analitzant l'expressió de *CDC25A* a nivell de mRNA en una sèrie de mostres de pacients de SPT (n=149), que es troba disponible a la base de dades públiques TCGA (de l'anglès, *The Cancer Genome Atlas*), formada per 26 leiomiomes, 89 liposarcomes, 34 fibrosarcomes i 9 controls de teixit no tumoral i

## RESULTATS CAPÍTOL 1

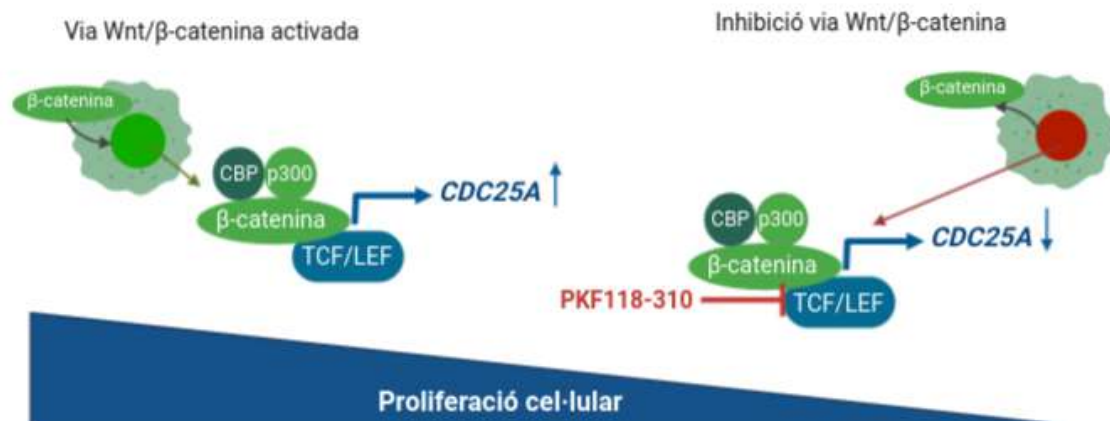
generada per Barretina et. al [142]. A la figura R1.14 es mostren els resultats obtinguts de comparar els nivells d'expressió de *CDC25A* en els diferents subtipus de SPT amb mostres de teixit no tumoral. Així es va veure com *CDC25A* es troba sobreexpressat en SPT en comparació a les mostres control i que els diferents subtipus de SPT presenten nivells semblants de *CDC25A*. En resum, aquests resultats obren la porta a investigar en més profunditat el paper d'aquesta proteïna en SPT per tal de validar-lo com a potencial nou biomarcador estudiant la seva rellevància clínica o per plantejar l'estudi d'inhibidors dirigits contra *CDC25A*.



**Figura R1.14. Comparativa dels nivells d'expressió de *CDC25A* en una sèrie de pacients de sarcomes de parts toves obtinguda a través del TCGA.** Les dades crues es van obtenir de la web del NCBI (de l'anglès, *National Center for Biotechnology Information*), de l'estudi GSE21122 que conté 149 mostres de pacients amb sarcomes de parts toves, es van normalitzar i analitzar amb el paquet Bioconductor de R tal com es descriu a l'apartat 10.2 de la secció Materials i Mètodes. Per cada diagrama de caixa es representa la mitjana i els rangs interquartílics, les diferències significatives entre subgrups es van determinar amb el test Kruskal-Wallis i s'indiquen: \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Abreviatures: LMS: leiomiocarcinoma, LPS: liposarcoma, MF:

mixofibrosarcoma i NF: de l'anglès *normal fat*.

En aquest primer capítol de resultats de la tesi doctoral s'ha mostrat la caracterització de la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina en SPT, s'ha descrit l'efecte sobre la viabilitat cel·lular i la funcionalitat transcripcional de dos inhibidors de la via i s'ha apuntat cap a un paper clau del gen diana *CDC25A* en la sarcomagènesi. Amb els resultats obtinguts en aquest capítol el model proposat es resumeix a la figura R1.15.



**Figura R1.15. Model proposat a partir dels resultats obtinguts al capítol 1: Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomagènesi.**

# Capítol 2

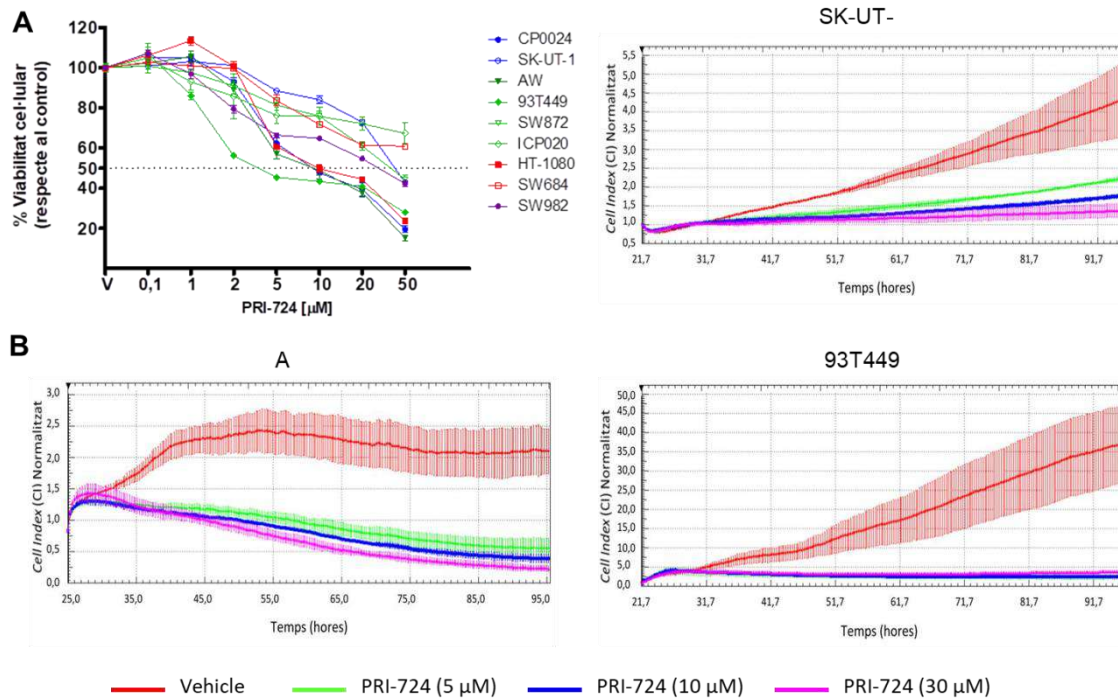
**Inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -  
catenina com a nova  
estratègia terapèutica en  
sarcomes de parts toves.**

## RESULTATS CAPÍTOL 2

Els dos inhibidors utilitzats en el primer capítol són petites molècules inhibidores que es troben en fases preclíniques i que van ser usades *in vitro* com a prova de concepte. Per tal de poder considerar la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a una possible estratègia terapèutica traslladable a la clínica, és important que les molècules inhibidores compleixin certs criteris de seguretat i eficàcia, aquests criteris (entre d'altres) s'estudien en assaigs clínics. És per això, que un cop establert l'efecte inhibitori de la via i de la viabilitat cel·lular amb molècules preclíniques, en el segon i tercer capítol de la tesi, s'estudia en SPT la inhibició *in vitro* de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb molècules que ja han entrat en fase d'assaig clínic en pacients amb diferents neoplàsies on les alteracions de la via de Wnt/ $\beta$ -catenina estan ben establertes.

### 2.1 La inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina disminueix la viabilitat i la proliferació cel·lular en línies cel·lulars i cultius primaris.

L'inhibidor PRI-724 és una molècula desenvolupada per PRISM Pharma, que es troba en fase d'assaig clínic pel tractament de neoplàsies, com l'adenocarcinoma pancreàtic o el càncer colorectal metastàtic. PRI-724 s'uneix al coactivador CBP (de l'anglès, *cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein*) impeding així que aquest s'uneixi a la  $\beta$ -catenina present al nucli (veure Figura I10, a la pàgina 20, de la secció Introducció), per tant actua a un nivell de la via semblant a l'inhibidor PKF118-310. La unió de CBP amb  $\beta$ -catenina és necessària perquè aquesta faci de medidora de l'activitat transcripcional quan s'uneix al factor de transcripció TCF/LEF. Per tant, la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina és una altra manera d'inhibir l'activitat transcripcional de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. Les cèl·lules de SPT es van tractar amb concentracions creixents de l'inhibidor durant 24, 48 i 72 hores, passat aquest temps la viabilitat cel·lular es va analitzar seguint el mètode del *metil-tiazol-tetrazolium* (MTT). Tal com es mostra a la figura R2.1A després de 48 hores de tractament amb l'inhibidor, la viabilitat cel·lular es va veure reduïda per sota del 50% en un 77,8% (7/9) de les línies de SPT. Les línies cel·lulars de liposarcoma 93T449 i AW, la línia de fibrosarcoma HT-1080 i el cultiu primari de leiomioma CP0024 van ser les més sensibles a l'inhibidor, amb uns valors d'IC<sub>50</sub> d'entre 5,18  $\mu$ M i 9,77  $\mu$ M, en comparació amb les línies de sarcoma sinovial SW982, de liposarcoma SW872 i de leiomioma SK-UT-1, amb valors d'IC<sub>50</sub> d'entre 20,13  $\mu$ M i 38,86  $\mu$ M. Dues línies cel·lulars, la de fibrosarcoma SW684 i el cultiu primari de liposarcoma ICP020, van resultar ser més resistents a aquest tipus d'inhibició de la via, ja que l'inhibidor no va ser capaç de reduir la viabilitat cel·lular per sota del 50% en cap de les condicions experimentals, no podent-se obtenir els valors d'IC<sub>50</sub>. Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts amb el monitoratge del creixement cel·lular a temps real de les línies de liposarcoma AW i 93T449, i la línia de leiomioma SK-UT-1 amb l'aparell xCELLigence System, tal com es mostra a la figura R2.1B. Si es compara els valors d'IC<sub>50</sub> obtinguts amb l'inhibidor PKF118-310 (0,21  $\mu$ M – 0,57  $\mu$ M) es pot veure com PRI-724 sembla tenir una menor efectivitat a l'hora de reduir la viabilitat cel·lular en les cèl·lules de SPT.

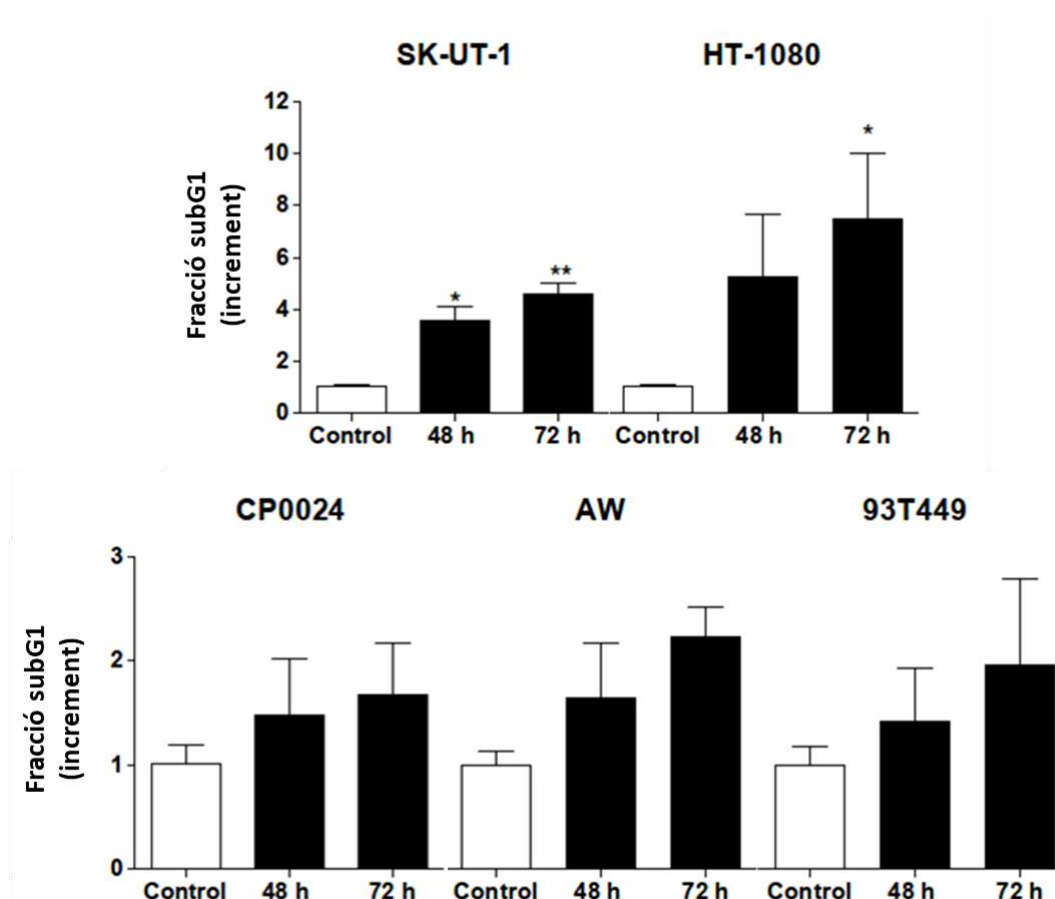


**Figura R2.1. Efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina amb PRI-724 sobre la viabilitat i la proliferació cel·lular en les línies de sarcomes de parts toves. A)** Les cèl·lules de SPT es van tractar amb concentracions creixents de l'inhibidor PRI-724 (0,1  $\mu$ M – 50  $\mu$ M) durant 48 hores. La viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant el kit *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Assay Kit*. Els valors de viabilitat cel·lular es representen com a percentatge relatiu a les cèl·lules tractades amb vehicle i les dades s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat. **B)** Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M) i el creixement cel·lular es va monitorar en temps real i de manera no invasiva mitjançant el sistema xCELLingence (ACEA Bioscience). Els valors de *Cell Index* (CI) es van normalitzar als valors de CI al temps d'iniciar el tractament. Els perfils de CI de les cèl·lules tractades amb inhibidor i les cèl·lules tractades amb vehicle (línia vermella) es presenten com la mitjana junt amb les barres de desviació estàndard de 2 determinacions independents fetes per triplicat.

## 2.2 La inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina indueix la mort cel·lular en línies cel·lulars i cultius primaris.

Per aprofundir en el mecanisme cel·lular pel qual la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina disminueix la viabilitat i la proliferació cel·lular, es va avaluar l'efecte de la inhibició del complex CBP/ $\beta$ -catenina a les diferents fases del cicle cel·lular. De la mateixa manera que la inhibició de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina, la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina també va provocar un augment de la fracció subG1, temps-dependent, en totes les línies estudiades. Tal com s'observa a la figura R2.2, passades 72 hores de tractament amb PRI-724 a una concentració de 10  $\mu$ M les línies cel·lulars de leiomioma SK-UT-1 i fibrosarcoma HT-1080 van veure augmentada la seva fracció subG1 4 i 8 vegades més que les cèl·lules tractades amb vehicle. L'efecte de l'inhibidor va ser més moderat per a la resta de línies cel·lulars, produint un augment de la fracció subG1 del voltat de 2 vegades respecte a les cèl·lules control en el cultiu primari de leiomioma CP0024 i les línies de liposarcoma AW i 93T449 a la mateixa concentració de 10  $\mu$ M.

## RESULTATS CAPÍTOL 2



**Figura R2.2.** Efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre la fracció subG1 de les cèl·lules de sarcomes de parts toves. Les línies cel·lulars es van tractar amb l'inhibidor PRI-724 (10  $\mu$ M) durant 48 i 72 hores, fixar amb etanol i tenyir amb iodur de propidi. El contingut en DNA es va determinar a través de la citometria de flux. El grau d'inducció de mort cel·lular (població subG1) a les diferents concentracions de l'inhibidor es representa com a increment en nombre de vegades en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. Les dades es presenten com la mitjana  $\pm$  SEM de 3 experiments independents. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$ .

2.3 La inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina disminueix l'activitat transcripcional i l'expressió de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina sense alterar la seva localització subcel·lular.

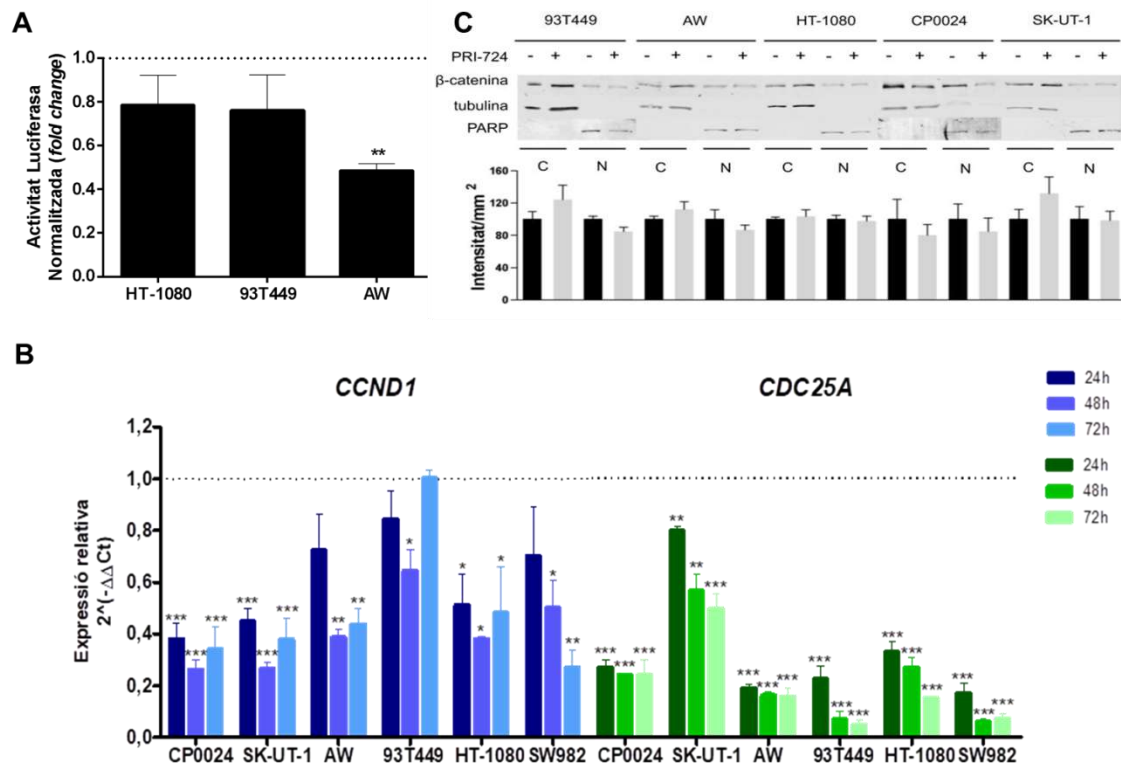
Un cop al nucli,  $\beta$ -catenina s'uneix a un dels dos coactivadors transcripcionals, CBP o p300, per tal d'induir la transcripció de gens diana de la via. Per estudiar l'efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre l'activitat transcripcional de la via es va mesurar l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina a les línies cel·lulars de SPT tractades amb l'inhibidor PRI-724 (10  $\mu$ M) durant 24 hores tal com es detalla a l'apartat 4.2.1 de la secció Materials i Mètodes. Tal com es mostra a la figura R2.3A, l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina va disminuir a les 3 línies cel·lulars de SPT analitzades, sent aquesta una reducció moderada del  $21,40 \pm 13,61\%$  a la línia de fibrosarcoma HT-1080 i del  $23,83 \pm 16,22\%$  a la línia de liposarcoma 93T449 i una disminució significativa del  $51,40 \pm 3,07\%$  a la línia de liposarcoma AW. Aquesta reducció de l'activitat transcripcional a les línies de fibrosarcoma HT-1080 i liposarcoma 93T449 és comparable a la reducció produïda per l'inhibidor PKF118-310 ( $15,10 \pm 6,07\%$  i  $39,88 \pm 9,94\%$  a les cèl·lules HT-1080 i 93T449 respectivament).



A continuació, es va estudiar l'efecte de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre l'expressió de gens diana de la via, com són: *CDC25A*, per la seva rellevància en SPT i *CCND1*, per ser també un regulador del cicle cel·lular. En aquests experiments, les línies cel·lulars de SPT es van tractar amb l'inhibidor (10  $\mu$ M) durant 24, 48 i 72 hores. Tal com es mostra a la figura R2.3B, la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina va disminuir els nivells d'expressió de *CDC25A* de manera significativa a totes les línies cel·lulars estudiades, mentre que l'expressió de *CCND1* va disminuir durant les primeres 48 hores, mostrant una recuperació dels nivells d'expressió passat aquest temps. Com s'esperava, l'efecte de PRI-724 sobre l'expressió de *CDC25A* a la línia SK-UT-1 no va ser tant pronunciat com per la resta de línies cel·lulars (reducció del 20,17  $\pm$  1,65%, 43,40  $\pm$  6,69% i 50,43  $\pm$  5,78% a les 24, 48 i 72 hores respectivament), ja que SK-UT-1 va ser una de les línies menys sensibles a l'inhibidor ( $IC_{50}$  = 38,86  $\mu$ M). Per tant, la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb PRI-724 provoca un impacte sobre l'expressió del gen de la via rellevant per la proliferació cel·lular, *CDC25A*.

A la literatura s'ha descrit que l'estabilització de  $\beta$ -catenina al nucli es deu, entre d'altres, a la unió d'aquesta amb el factor de transcripció TCF/LEF [67,68,221,222]. En el capítol 1 de la secció Resultats s'ha demostrat que, en SPT, molècules com PKF118-310 que impedeixen la unió de  $\beta$ -catenina amb el factor de transcripció TCF/LEF, eviten l'acumulació de  $\beta$ -catenina al nucli (veure Figura R1.9 a la pàgina 90 del capítol 1 de la secció Resultats). Per investigar si la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina produeix el mateix efecte sobre la localització de  $\beta$ -catenina, les línies cel·lulars de leiomioma SK-UT-1, de liposarcoma 93T449 i de fibrosarcoma HT-1080, les quals tenen un índex d'immunoreactivitat, IRS, fort; el cultiu primari de leiomioma CP0024, amb un IRS moderat i la línia cel·lular de liposarcoma AW, amb un IRS lleu es van tractar amb l'inhibidor de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina (10  $\mu$ M) durant 48 hores. Tal com es mostra a la figura R2.3C, la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina no es va veure afectada per la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina.

## RESULTATS CAPÍTOL 2



**Figura R2.3.** Efectes de la inhibició de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina sobre l'activitat transcripcional, l'expressió de gens diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina i la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina. **A)** Les cèl·lules de SPT es van tractar amb l'inhibidor de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina (10  $\mu$ M) o vehicle, passades 24 hores es van transfectar amb el sistema *TCF reporter* i 24 hores després de la transfecció es va mesurar l'activitat de la luciferasa mitjançant el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). L'activitat de la *Firefly* luciferasa mesurada es va normalitzar amb l'activitat de la *Renilla* luciferasa, les dades es presenten com a *fold change* de la ràtio TOP/FOP en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*\*  $p < 0,01$ . **B)** Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor (10  $\mu$ M) durant els temps indicats. L'expressió de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan, tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. L'expressió de mRNA s'expressa en relació al valor obtingut en les cèl·lules tractades amb vehicle que pren el valor 1 (línia discontinua). Els resultats s'expressen com a mitjana  $\pm$  SD de 3 determinacions independents fetes per duplicat. Les diferències que es consideren estadísticament significatives s'indiquen: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . **C)** Les cèl·lules de SPT es van tractar amb l'inhibidor (10  $\mu$ M), passades 48 hores es va separar la fracció nuclear de la citoplasmàtica, tal com es detalla a l'apartat 7.3 de la secció Materials i Mètodes. El panell mostra les bandes immunoreactives, de  $\beta$ -catenina total nuclear i citoplasmàtica així com de tubulina, utilitzada com a control de càrrega del compartiment citoplasmàtic i PARP, utilitzada com a control de càrrega del compartiment nuclear, representatives de 3 experiments independents, juntament amb la quantificació de la intensitat de les bandes realitzada amb el software Quantity One 1-D (BIO-RAD). Abreviatures: C: citoplasma, N: nucli.

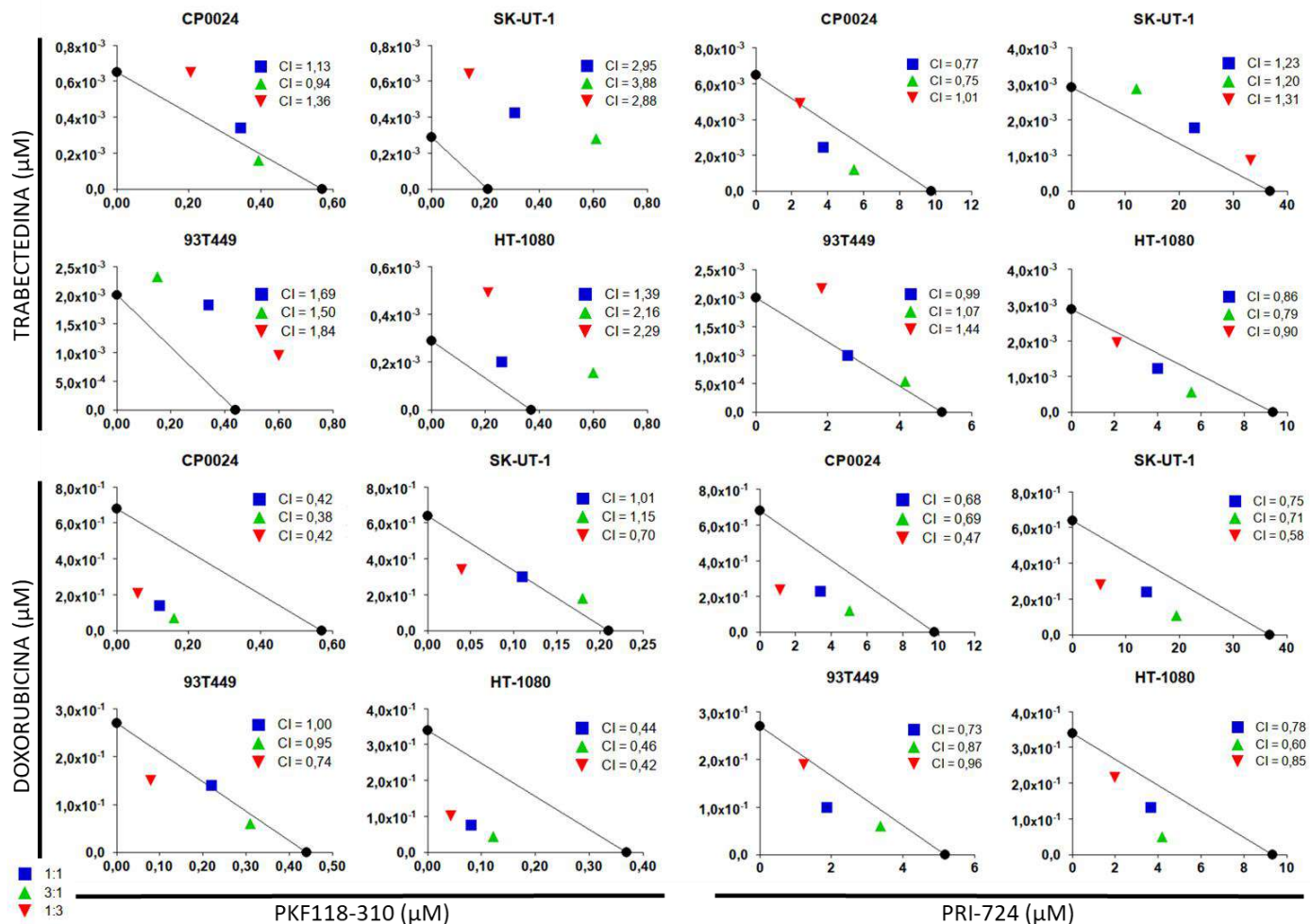
2.4 La inhibició de l'activitat transcripcional TCF/ $\beta$ -catenina millora l'efecte antitumoral de la quimioteràpia convencional en sarcomes de parts toves.

El tractament de SPT no ha canviat excessivament en les darreres dècades. En primera línia els pacients poden rebre un règim de combinació de quimioteràpia amb doxorubicina-ifosfamida, amb l'aparició d'efectes secundaris importants com la

toxicitat a nivell cardíac i en segona línia de tractament es disposa de la trabectedina. Per altra banda, durant els darrers anys, l'estudi de l'ús d'inhibidors de la via de senyalització Wnt a la clínica es veu condicionat per l'aparició de toxicitats relacionades amb l'efecte d'aquests inhibidors sobre les cèl·lules mare normals i osteoclasts majoritàriament [12,223]. Per aquest motiu, seria interessant estudiar l'ús de tractaments convencionals en combinació amb inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina ja que es podrien fer servir a dosis inferiors a les dosis en monoteràpia i així reduir els seus efectes secundaris. L'efecte de la combinació dels inhibidors, que actuen sobre components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització, amb els agents quimioterapèutics convencionals sobre la viabilitat cel·lular es va avaluar a les línies cel·lulars de leiomioma CP0024 i SK-UT-1, de liposarcoma 93T449 i de fibrosarcoma HT-1080. A la figura R2.4 es mostra els isobologrames obtinguts en tractar les cèl·lules amb la combinació simultània de l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina, PKF118-310; amb la trabectedina (esquerra a dalt) i amb la doxorubicina (esquerra a baix) durant 48 hores (tal com es detalla a l'apartat 8.2 de la secció Materials i Mètodes). En paral·lel, es mostren els isobologrames obtinguts amb la combinació simultània de l'inhibidor de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina, PRI-724, amb la trabectedina (dreta a dalt) i amb la doxorubicina (dreta a baix) també durant 48 hores. Comparant els isobologrames de la part superior amb els de la part inferior de la figura R2.4 s'observa que la combinació dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina va presentar més efectes de sinergia quan es van combinar amb l'agent quimioterapèutic doxorubicina que amb la trabectedina, ja que els punts corresponents a les diferents combinacions dels inhibidors amb la trabectedina queden per damunt la línia diagonal d'additivitat en la majoria de les condicions. I a més, la majoria dels valors de CI (de l'anglès, combination index), calculats tal com es detalla a l'apartat 8.2 de la secció Materials i Mètodes, són majors a 1, indicant un efecte antagònic. Per altra banda, si es compara la part esquerra amb la part dreta de la figura R2.4, s'observa que la combinació de l'inhibidor de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina (PRI-724) amb els agents quimioterapèutics va mostrar més efectes de sinergia que l'inhibidor de la formació del complex TCF/ $\beta$ -catenina (PKF118-310), ja que en la majoria dels isobologrames (exceptuant la combinació PRI-724:trabectedina a les línies cel·lulars SK-UT-1 i 93T449) els punts se situen per sota de la línia diagonal d'additivitat, i els valors de CI són menors a 1, indicant un efecte sinèrgic. Per tal de millorar l'efecte de la combinació de l'inhibidor PKF118-310 amb l'agent quimioterapèutic trabectedina es va realitzar dos experiments addicionals: en el primer, es tractava les cèl·lules de leiomioma SK-UT-1 i fibrosarcoma HT-1080 amb l'inhibidor PKF118-310 i passades 24 hores es tractaven les mateixes cèl·lules amb l'agent quimioterapèutic trabectedina, mentre que en el segon es va fer al revés (primer es tractava les cèl·lules amb trabectedina i passades 24 hores amb PKF118-310), seguint el mateix esquema de combinacions. Tot i això, aquesta estratègia no va millorar els resultats obtinguts amb la combinació simultània mostrats a la figura R2.4.

En resum, els resultats observats de la combinació dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb els agents quimioterapèutics convencionals mostren que l'inhibidor PRI-724, el qual ha quedat demostrat que té activitat antitumoral *in vitro* en les cèl·lules de SPT i que es troba actualment en fase d'assaig clínic, té un efecte sinèrgic amb els fàrmacs convencionals usats avui en dia en pacients amb SPT, obrint la porta a realitzar experiments *in vivo* tant a/amb models animals com a estudis preclínic.

## RESULTATS CAPÍTOL 2



**Figura R2.4. Combinació dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb els agents quimioterapèutics convencionals en sarcomes de parts toves.** Les cèl·lules de SPT es van tractar amb les diferents ràtios de combinacions, tal com es detalla a l'apartat 8.2 de la secció Materials i Mètodes. Passades 48 hores, la viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant el *CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay Kit*. Els isobologrames per a les diferents combinacions es van elaborar amb els valors d'IC<sub>50</sub> dels inhibidors i els agents quimioterapèutics en monoteràpia i en combinació tal com es detalla en el mateix apartat 8.2 de la secció Materials i Mètodes.



# Capítol 3

**Components de la via  
Wnt/ $\beta$ -catenina com a  
biomarcadors predictius**

Com s'ha comentat anteriorment, la via Wnt/ $\beta$ -catenina està finament regulada a diferents nivells. El més conegut i descrit a la literatura és el complex de destrucció de  $\beta$ -catenina format per: APC, AXINA, CK-1 $\alpha$  i GSK-3 $\beta$ , ja que alteracions en aquestes proteïnes fa anys que es coneixen com a *drivers* de carcinogènesi com és el cas del càncer colorectal. Existeixen, però, altres mecanismes reguladors que s'estan començant a descriure com a implicats en la patogènia de diferents tumors.

### 3.1 Components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 com a biomarcadors predictius de resposta a la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomes de parts toves.

Recentment s'ha descrit que alteracions moleculars en determinats components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 poden ser utilitzades com a biomarcadors predictius de resposta a determinats inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que actuen a nivell de producció de lligands Wnt, com és el cas dels inhibidors de l'activitat enzimàtica de la Porcupina (PORCN) [53,92,106,108–110,224].

Per tal d'estudiar la implicació de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en SPT, el nivell d'expressió de mRNA dels components de l'eix es va determinar en un grup de 17 línies cel·lulars i cultius primaris de diferents subtipus de SPT (Figura R3.1) i en un grup de 86 mostres de pacients procedents de l'Hospital Universitari Son Espases i de diferents estudis del Grup Espanyol d'Investigació en Sarcomes (GEIS), en concret dels estudis: GEIS20, GEIS27 i GEIS30, (Figura R3.2).

## RESULTATS CAPÍTOL 3

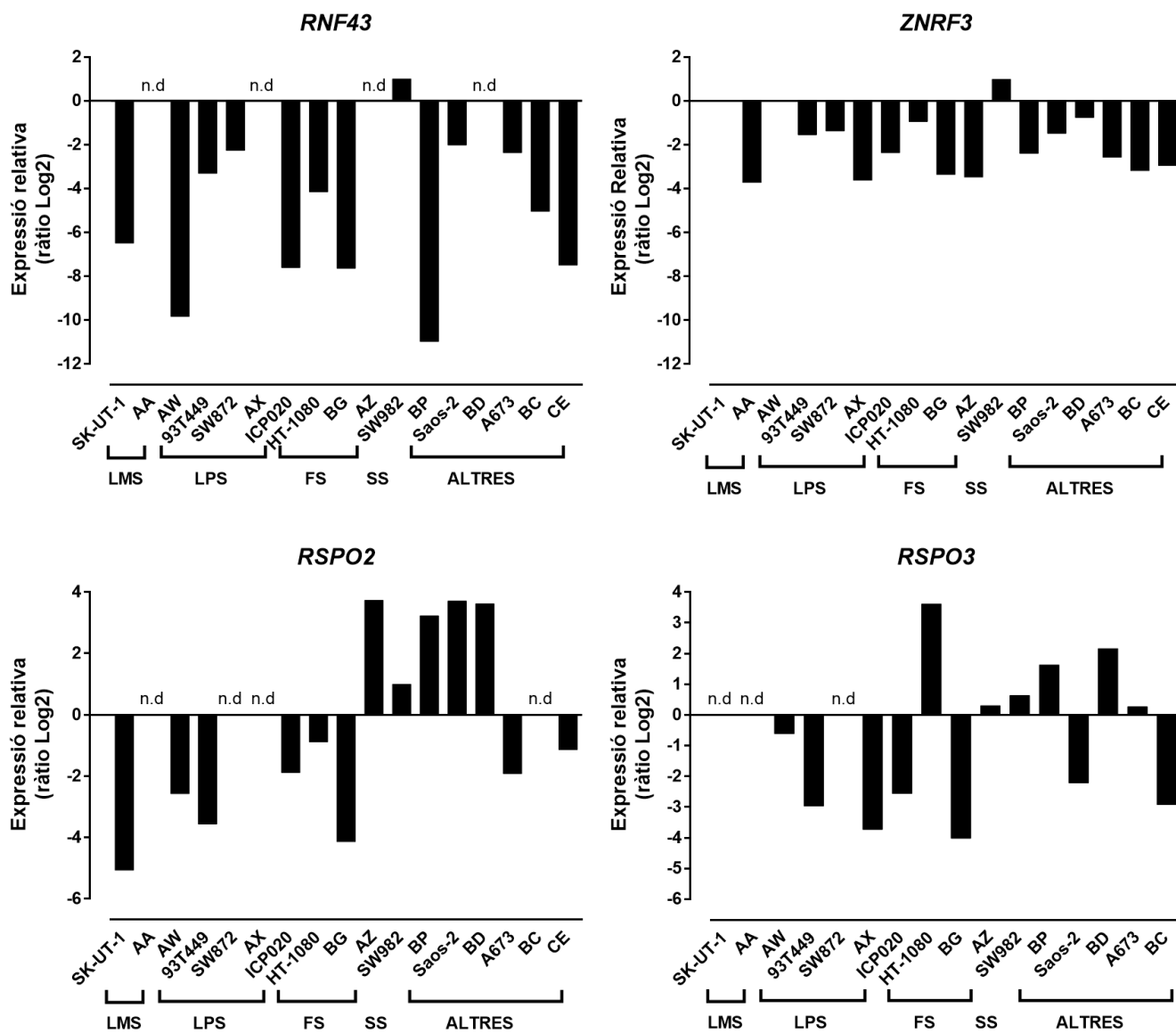


Figura R3.1. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix Respondin/Lgr5/Rnf43 en línies cel·lulars de sarcomes de parts toves. L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan, tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Els resultats s'expressen com a mitjana de 2 determinacions independents fetes per duplicat. Abreviatures: n.d: no detectat, LMS: leiomioma, LPS: liposarcoma, FS: fibrosarcoma i SS: sarcoma sinovial.



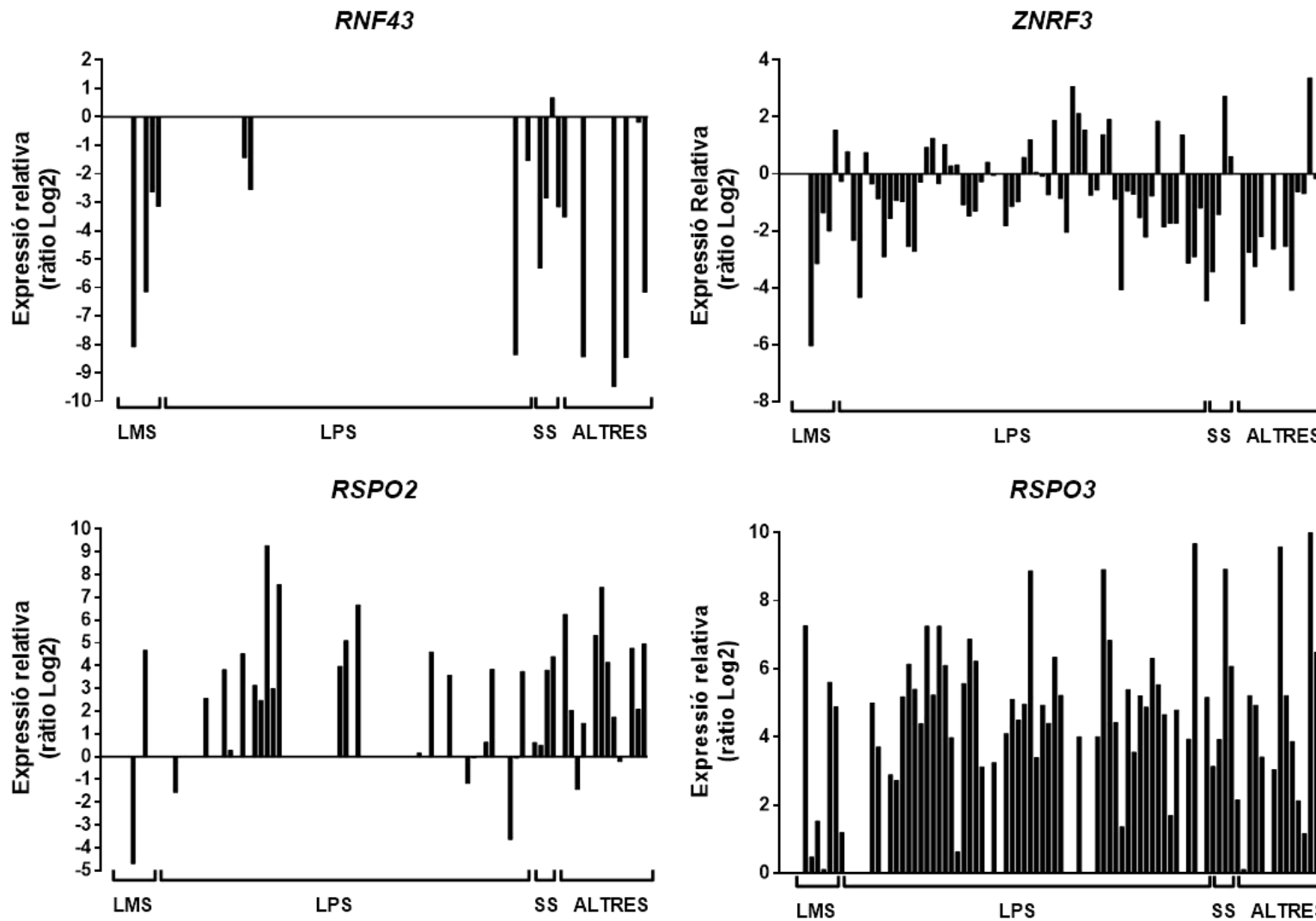
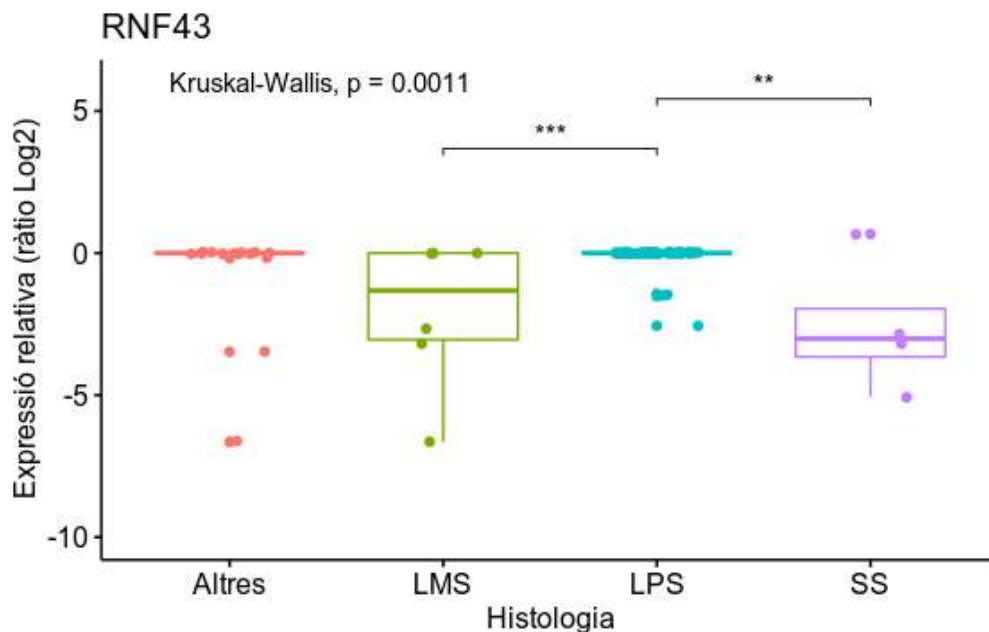


Figura R3.2. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves. L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA, 750500, Agilent*). Els resultats s'expressen com a mitjana de 2 determinacions independents fetes per duplicat. Abreviatures: LMS: leiomyosarcoma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.

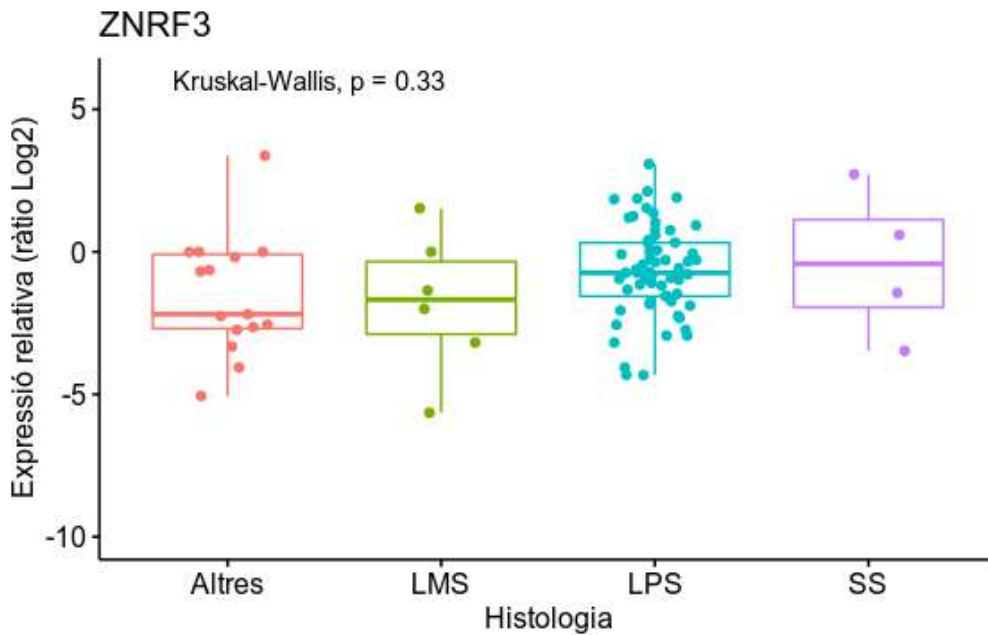
## RESULTATS CAPÍTOL 3

Les línies cel·lulars de SPT analitzades (Figura R3.1) i les mostres de pacients (Figura R3.2) van presentar el mateix perfil d'infraexpressió dels gens *RNF43* i *ZNRF3*. Pel que fa als altres dos gens, en les mostres de pacients la sobreexpressió de *RSPO2* es va observar en un 41,86% de les mostres mentre que en el grup de línies cel·lulars ho va fer en un 29,41% de les línies. La sobreexpressió de *RSPO3* va ser present en un 83,72% de les mostres de pacients i només en un 35,29% de les línies cel·lulars.

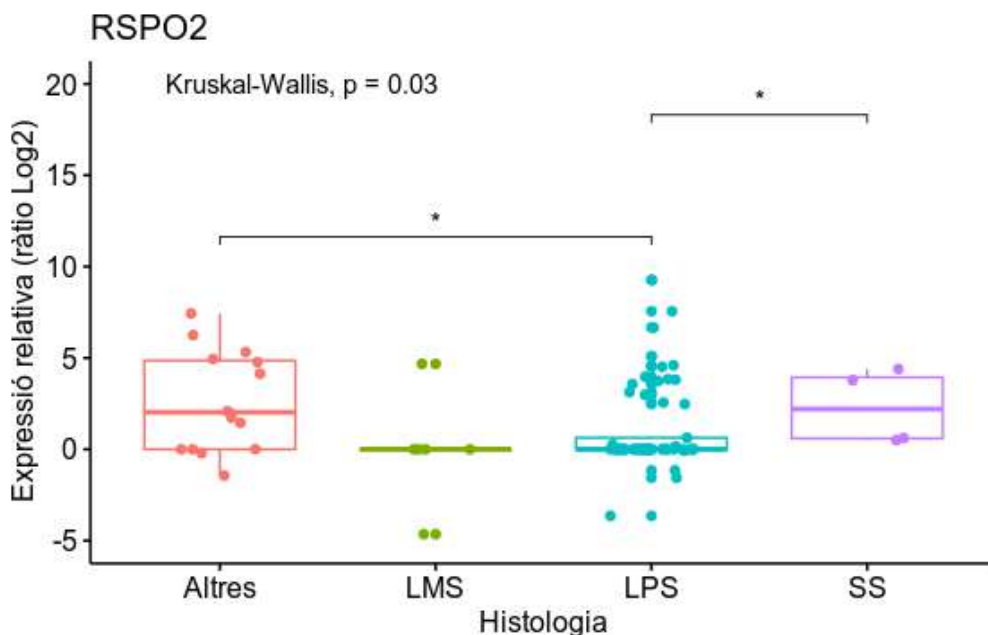
Quan es va fer la comparativa dels nivells d'expressió dels gens *RNF43*, *ZNRF3*, *RSPO2* i *RSPO3* en les mostres de pacients amb diferents subtipus de SPT, es va veure que hi havia diferències en els nivells d'expressió del gen *RNF43* entre els diferents subtipus de SPT estudiats, sent els leiomiomes i els sarcomes sinovials els que presenten una major infraexpressió del gen *RNF43* en comparació amb els liposarcomes (Figura R3.3). Mentre que la infraexpressió de *ZNRF3* va ser comparable en tots subtipus de sarcomes analitzats (Figura R3.4). Passa el mateix amb la sobreexpressió dels gens *RSPO2* i *RSPO3*, mentre que hi ha diferències significatives entre la sobreexpressió de *RSPO2* en els SPT, tal com s'observa a la figura R3.5, on els sarcomes sinovials presenten una major sobreexpressió del gen *RSPO2* que els liposarcomes; la sobreexpressió de *RSPO3* sembla ser un tret comú en els SPT analitzats (Figura R3.6).



**Figura R3.3. Expressió a nivell de mRNA del gen *RNF43* en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Per cada diagrama de caixa es representa la mitjana i els rangs interquartílics, les diferències significatives entre subgrups es van determinar amb el test Kruskal-Wallis i s'indiquen: \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ . Abreviatures: LMS: leiomioma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.

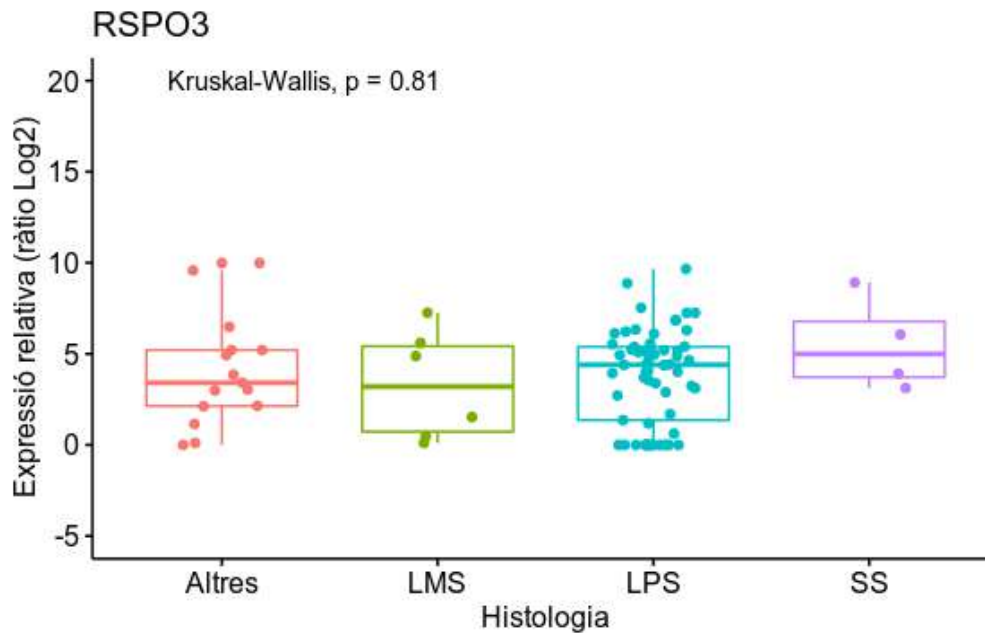


**Figura R3.4. Expressió a nivell de mRNA del gen *ZNRF3* en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Per cada diagrama de caixa es representa la mitjana i els rangs interquartílics. Abreviatures: LMS: leiomiiosarcoma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.



**Figura R3.5. Expressió a nivell de mRNA del gen *RSPO2* en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Per cada diagrama de caixa es representa la mitjana i els rangs interquartílics, les diferències significatives entre subgrups es van determinar amb el test Kruskal-Wallis i s'indiquen: \* p < 0,05. Abreviatures: LMS: leiomiiosarcoma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.

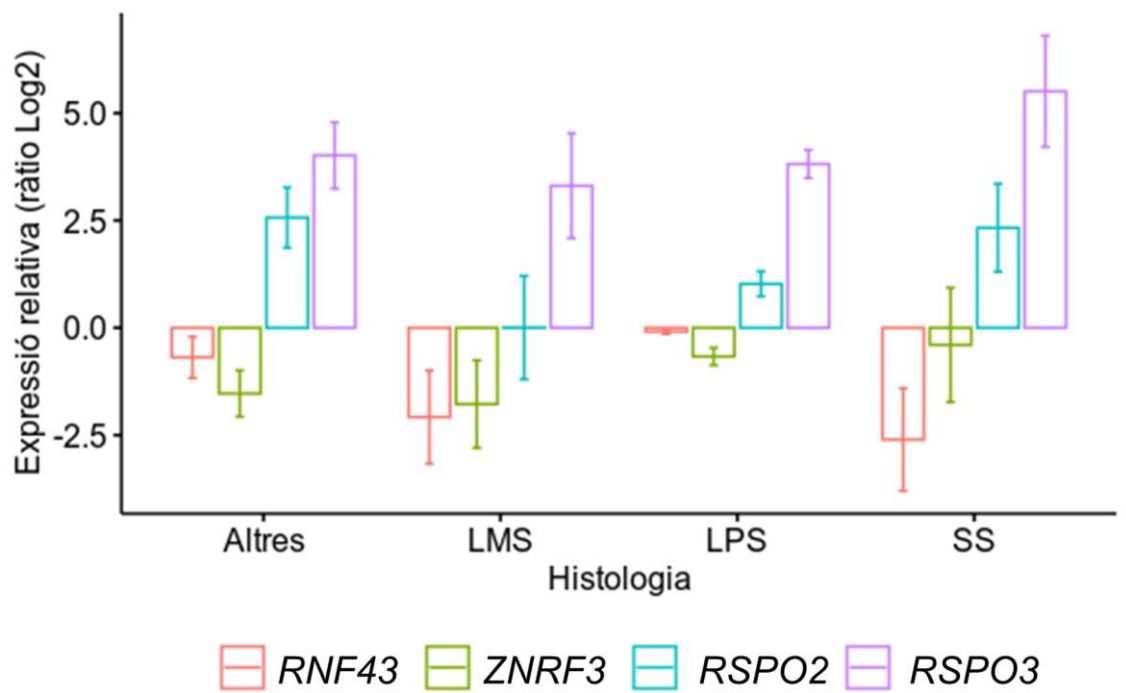
## RESULTATS CAPÍTOL 3



**Figura R3.6. Expressió a nivell de mRNA del gen *RSPO3* en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Per cada diagrama de caixa es representa la mitjana i els rangs interquartílics. Abreviatures: LMS: leiomiocarcinoma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.

Com ja s'ha comentat anteriorment, mutacions de pèrdua de funció en els gens *RNF43* i *ZNRF3* o fusions que provoquen una amplificació de l'expressió dels gens *RSPO2* i *RSPO3* poden ser utilitzades com a biomarcadors predictius de resposta a l'inhibidor de PORCN desenvolupat per Novartis, LGK974, el qual es troba en fase I d'un assaig clínic per diferents tumors sòlids.

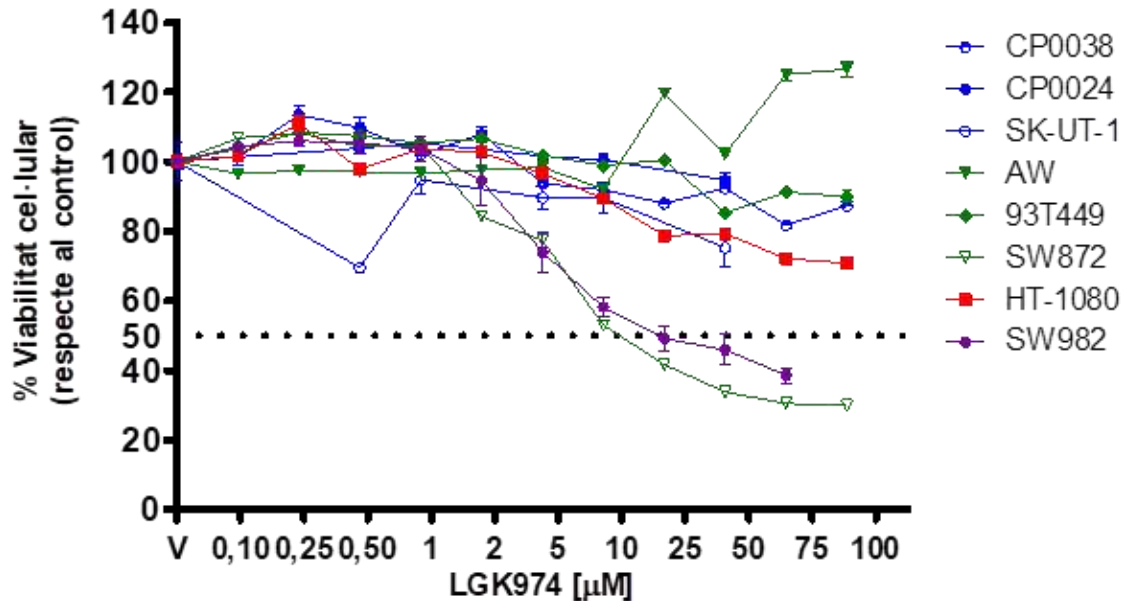
A falta de confirmar la presència de mutacions en *RNF43* i/o *ZNRF3* i de fusions que provoquin l'amplificació de *RSPO2* i/o *RSPO3*, la infraexpressió i sobreexpressió observades, en les mostres tumorals de pacients, podrien ser un subrogat d'aquestes alteracions, indicant que els SPT podrien respondre a inhibidors de PORCN (Figura R3.7).



**Figura R3.7. Expressió a nivell de mRNA de diferents components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43 en pacients de diferents tipus de sarcomes de parts toves.** L'expressió a nivell de mRNA es va quantificar mitjançant una PCR quantitativa amb el mètode de Sondes TaqMan tal com es detalla a l'apartat 6 de la secció Materials i Mètodes. Com a gen referència per a normalitzar els valors d'expressió dels gens d'interès es va utilitzar la  $\beta$ -2-microglobulina. Els valors es presenten com l'expressió de mRNA relativa a un *pool* d'RNA de diferents línies cel·lulars (*Stratagene QPCR Human Reference Total RNA*, 750500, Agilent). Per cada barra es representa la mitjana  $\pm$  SEM. Abreviatures: LMS: leiomioma, LPS: liposarcoma i SS: sarcoma sinovial.

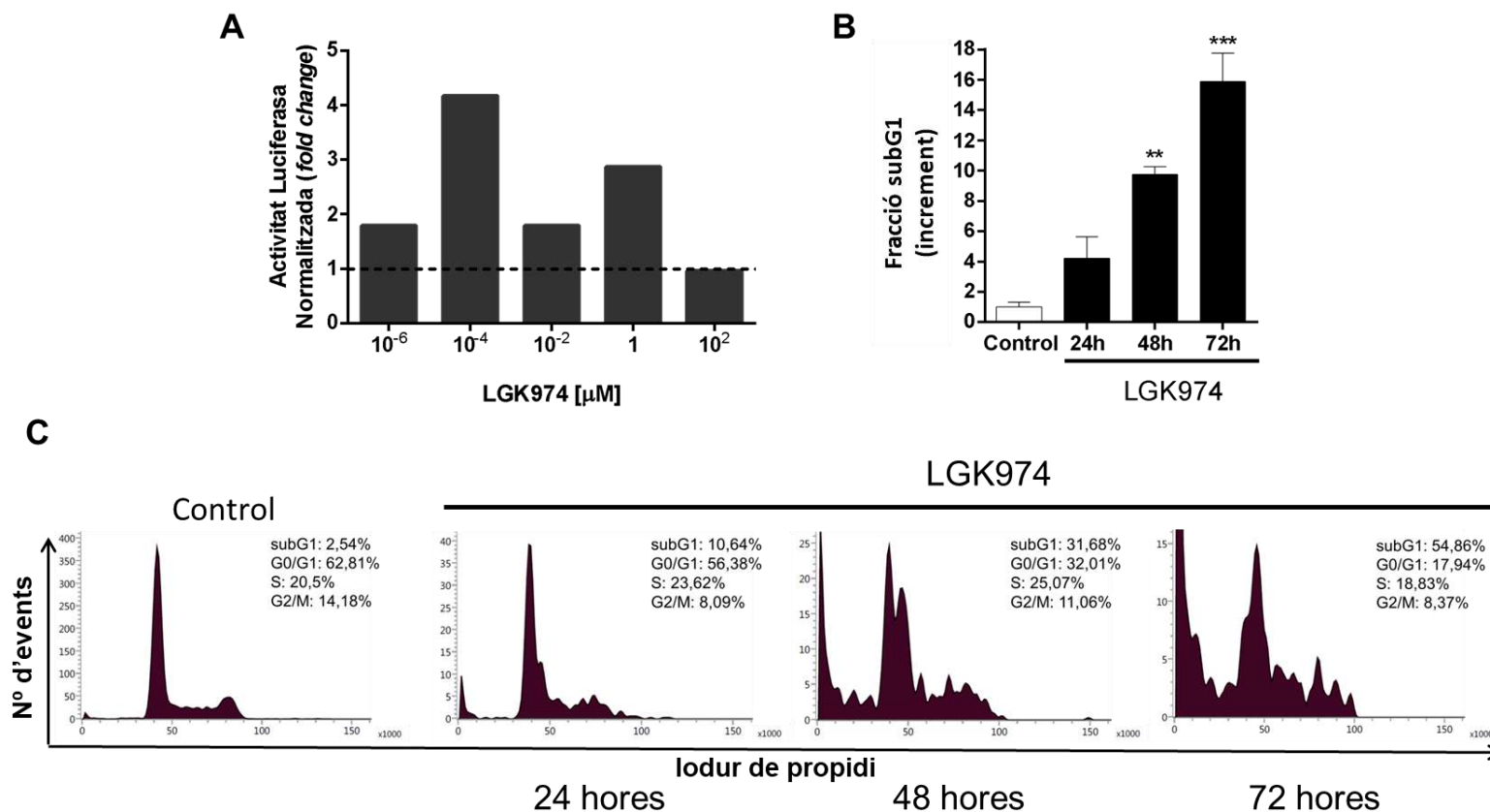
Per aquest motiu, es va avaluar l'efecte de l'inhibidor de PORCN, LGK974, sobre la viabilitat cel·lular en 6 línies cel·lulars i 3 cultius primaris de diferents subtipus de SPT. Amb els assajos de viabilitat cel·lular convencionals duts a terme per als altres inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, cap de les línies cel·lulars ni cultius primaris va resultar ser sensible a l'inhibidor. A la figura R3.8 es mostra com a les 48 hores de tractament amb concentracions creixents de l'inhibidor (0,1  $\mu$ M – 100  $\mu$ M) només les línies cel·lulars de liposarcoma SW872 i de sarcoma sinovial SW982 van respondre a l'inhibidor amb uns valors d'IC<sub>50</sub> de 15,89  $\mu$ M i 24,54  $\mu$ M, respectivament.

## RESULTATS CAPÍTOL 3



**Figura R3.8.** Efecte de la inhibició de l'activitat enzimàtica de la Porcupina sobre la viabilitat cel·lular a les línies de sarcomes de parts toves. Les cèl·lules de SPT es van tractar amb concentracions creixents de l'inhibidor LGK974 (0,1 µM – 100 µM) durant 48 hores. La viabilitat cel·lular es va determinar utilitzant el kit *CellTiter 96® AQueous One Solution Assay Kit*. Els valors de viabilitat cel·lular es representen com a percentatge relatiu a les cèl·lules tractades amb vehicle i les dades s'expressen com a mitjana ± SEM de 3 determinacions independents fetes per triplicat.

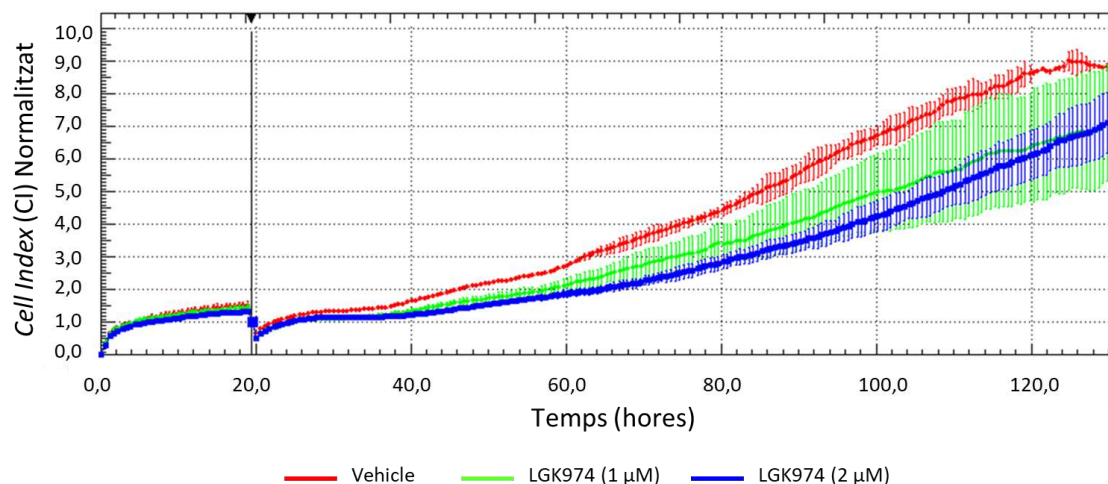
Per aquest inhibidor es considera que els efectes que es puguin observar a concentracions majors a 1 µM es deuen a la seva toxicitat, anomenats efectes *off-target*, i no a l'efecte específic de l'inhibidor sobre la producció de lligands Wnt. Per comprovar aquest fenomen, es va estudiar l'efecte de l'inhibidor a concentracions d'entre  $10^{-6}$  µM –  $10^2$  µM sobre l'activitat transcripcional de la via mitjançant el sistema *TCF reporter* en la línia cel·lular de liposarcoma SW872. Comprovant que, efectivament, l'inhibidor en aquesta línia cel·lular de SPT no tenia cap efecte sobre l'activitat transcripcional de la via a cap de les concentracions estudiades (Figura R3.9A). En paral·lel, es va avaluar aquests efectes *off-target* analitzant les fases del cicle cel·lular en la mateixa línia cel·lular de liposarcoma SW872 tractada amb l'inhibidor. A la figura R3.9B i C s'observa que la toxicitat produïda per l'inhibidor (10 µM) provoca la mort cel·lular (malgrat no es mostri a la figura, també es va provar a una concentració menor (5 µM) obtenint els mateixos resultats). I això, ho fa sense afectar a l'activitat transcripcional de la via, fet que corrobora els anomenats efectes *off-target* de l'inhibidor a aquestes concentracions.



**Figura R3.9. Avaluació dels efectes *off-target* de l'inhibidor de Porcupina, LGK974, a la línia de liposarcoma SW872. A)** Les cèl·lules es van tractar amb diferents concentracions de l'inhibidor (10<sup>-6</sup> μM – 10<sup>2</sup> μM), passades 24 hores es van transfectar amb el sistema *TCF reporter* i 24 hores després de la transfecció es va mesurar l'activitat de la luciferasa mitjançant el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). L'activitat de la *Firefly* luciferasa mesurada es va normalitzar amb l'activitat de la *Renilla* luciferasa, les dades es presenten com a *fold change* de la ràtio TOP/FOP en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. **B)** La línia cel·lular de liposarcoma SW872 es va tractat amb l'inhibidor de Porcupina (10 μM) durant 24, 48 i 72 hores, fixar amb etanol i tenyir amb iodur de propidi. El contingut en DNA es va determinar a través de la citometria de flux. **C)** El grau d'inducció apoptòtica (població subG1) al diferents temps de tractament es representa com a increment en nombre de vegades en comparació amb les cèl·lules tractades amb vehicle. Les dades es presenten com la mitjana ± SEM de 3 experiments independents. Les diferències considerades estadísticament significatives s'indiquen: \*\* p < 0,01 i \*\*\* p < 0,001.

### RESULTATS CAPÍTOL 3

Per últim, es va considerar augmentar el temps d'exposició a l'inhibidor. Així, la mateixa línia cel·lular de liposarcoma SW872 es va tractar durant 5 dies amb l'inhibidor (1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M). Durant aquest temps es va monitorar la proliferació cel·lular a temps real amb l'aparell xCELLigence System observant-se un efecte molt moderat. A la figura R3.10 s'observa una reducció dels valors de *Cell Index* d'un 25,69% (en verd) i un 28,78% (en blau), respectivament. Per altra banda, quan es va avaluar la viabilitat cel·lular amb la tècnica de l'MTT, de manera paral·lela, no es va poder determinar cap efecte de l'inhibidor sobre la viabilitat cel·lular. Aquesta línia cel·lular va presentar infraexpressió de *RNF43* i *ZNRF3* i una resposta moderada a llargues exposicions amb dosis baixes de l'inhibidor LGK974. Segons els resultats d'infraexpressió, d'aquests dos gens, observats en un elevat percentatge de les línies cel·lulars analitzades, s'esperaria una major resposta d'aquestes a l'inhibidor. Estudis publicats recentment apunten cap el potencial de l'inhibidor LGK974 per millorar la supervivència de pacients amb sarcoma d'Ewing a través de la inhibició de múltiples reguladors que promouen la metastasi, ja que s'ha demostrat que tant *in vitro* com *in vivo* l'inhibidor és capaç d'inhibir tant la migració com la invasió de les cèl·lules tumorals sense afectar a la capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules [225].



**Figura R3.10. Monitorització en temps real del creixement cel·lular en la línia de liposarcoma SW872 tractada amb l'inhibidor de Porcupina LGK974.** Les cèl·lules es van tractar amb l'inhibidor (1  $\mu$ M i 2  $\mu$ M) i el creixement cel·lular es va monitorar en temps real i de manera no invasiva mitjançant el sistema xCELLigence (ACEA Bioscience). Els valors de *Cell Index* (CI) es van normalitzar als valors de CI al temps d'iniciar el tractament, tal com s'indica amb la línia negra. Els perfils de CI de les cèl·lules tractades amb l'inhibidor i les cèl·lules tractades amb vehicle (línia vermella) es presenten com la mitjana junt amb les barres de desviació estàndard de 2 determinacions independents fetes per triplicat.



Al tercer capítol de la tesi s'ha estudiat la presència d'alteracions de la via, relacionades amb la sensibilitat a la inhibició de l'activitat enzimàtica de la Porcupina, en SPT. A nivell de mRNA s'ha comprovat que els SPT mostren nivells d'expressió de *RNF43* i *ZNRF3* (infraexpressió) així com de *RSPO2* i *RSPO3* (sobreexpressió) que podrien ser un subrogat de les mutacions que provoquen una pèrdua de funció en *RNF43* i *ZNRF3* o de les fusions que provoquen una amplificació dels gens *RSPO2* i *RSPO3* descrites a la literatura. *In vitro* s'ha determinat que la presència d'aquestes alteracions en SPT no prediu la resposta a l'inhibidor LGK974, tal com resumeix la figura R3.11.

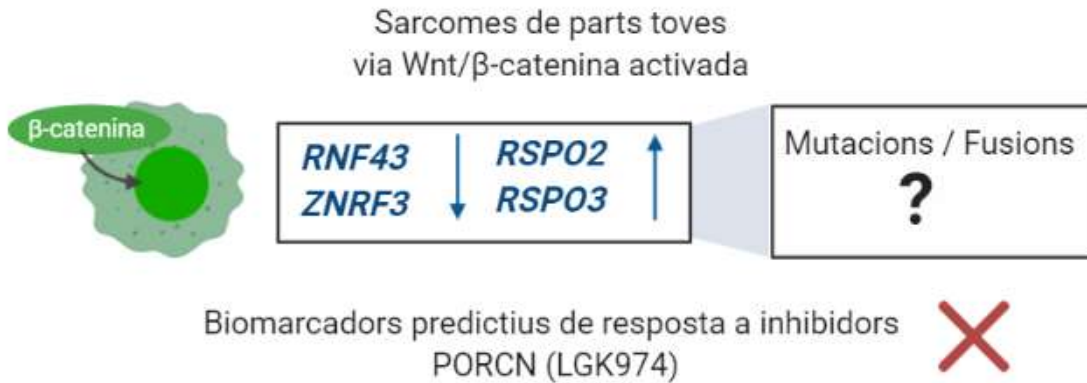


Figura R3.11. Esquema resum del model proposat amb els resultats obtinguts durant el capítol 3.

### RESULTATS CAPÍTOL 3

En el primer capítol de resultats de la tesi doctoral s'ha estudiat la implicació de la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina en SPT, s'ha descrit l'efecte de la seva inhibició sobre la viabilitat cel·lular i la funcionalitat transcripcional de  $\beta$ -catenina i s'ha apuntat cap a un paper clau del gen diana *CDC25A*. Els inhibidors utilitzats en el primer capítol es troben en fases preclíniques i s'han utilitzat *in vitro* com a prova de concepte. Per tal d'estudiar la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a una possible estratègia terapèutica traslladable a la clínica, en el segon capítol de la tesi s'ha avaluat l'efecte de la inhibició *in vitro* de la via amb l'inhibidor PRI-724, una molècula que ja es troba en fase d'assaig clínic pel tractament de neoplàsies, com l'adenocarcinoma pancreàtic o el càncer colorectal metastàtic, on les alteracions de la via de Wnt/ $\beta$ -catenina estan ben establertes. Els resultats obtinguts de les combinacions dels inhibidors de la via amb els agents quimioterapèutics convencionals són especialment interessants ja que les combinacions disminueixen la proliferació cel·lular utilitzant unes concentracions menys tòxiques que les usades en monoteràpia. Per últim, en el tercer capítol de la tesi, s'ha avaluat l'ús de determinades alteracions de la via com a biomarcadors predictius a determinats mecanismes d'inhibició de la via, en concret la inhibició de la producció de lligands Wnt a través de l'enzim Porcupina. La figura R3.12 mostra una representació global de les alteracions estudiades i determinacions analitzades per cada mostra/línia cel·lular en els tres primers capítols de la tesi.

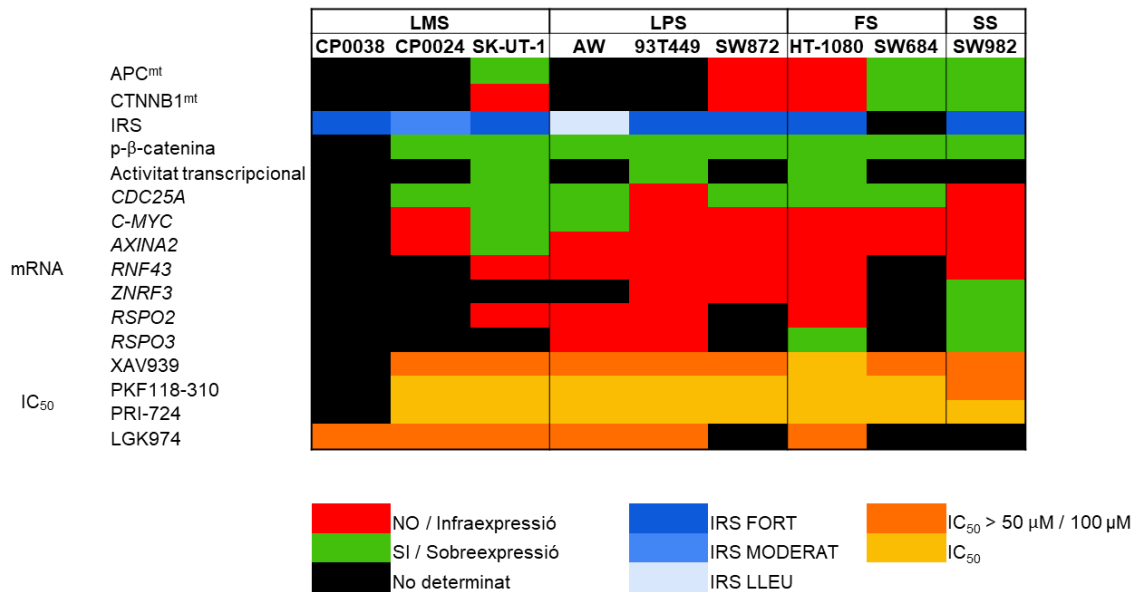


Figura R3.12. Representació global de les alteracions moleculars analitzades i la sensibilitat als inhibidors de la via per a cada mostra de SPT.

# Capítol 4

**Components de la via  
Wnt/ $\beta$ -catenina com a  
biomarcadors en càncer  
de pròstata avançat**

## RESULTATS CAPÍTOL 4

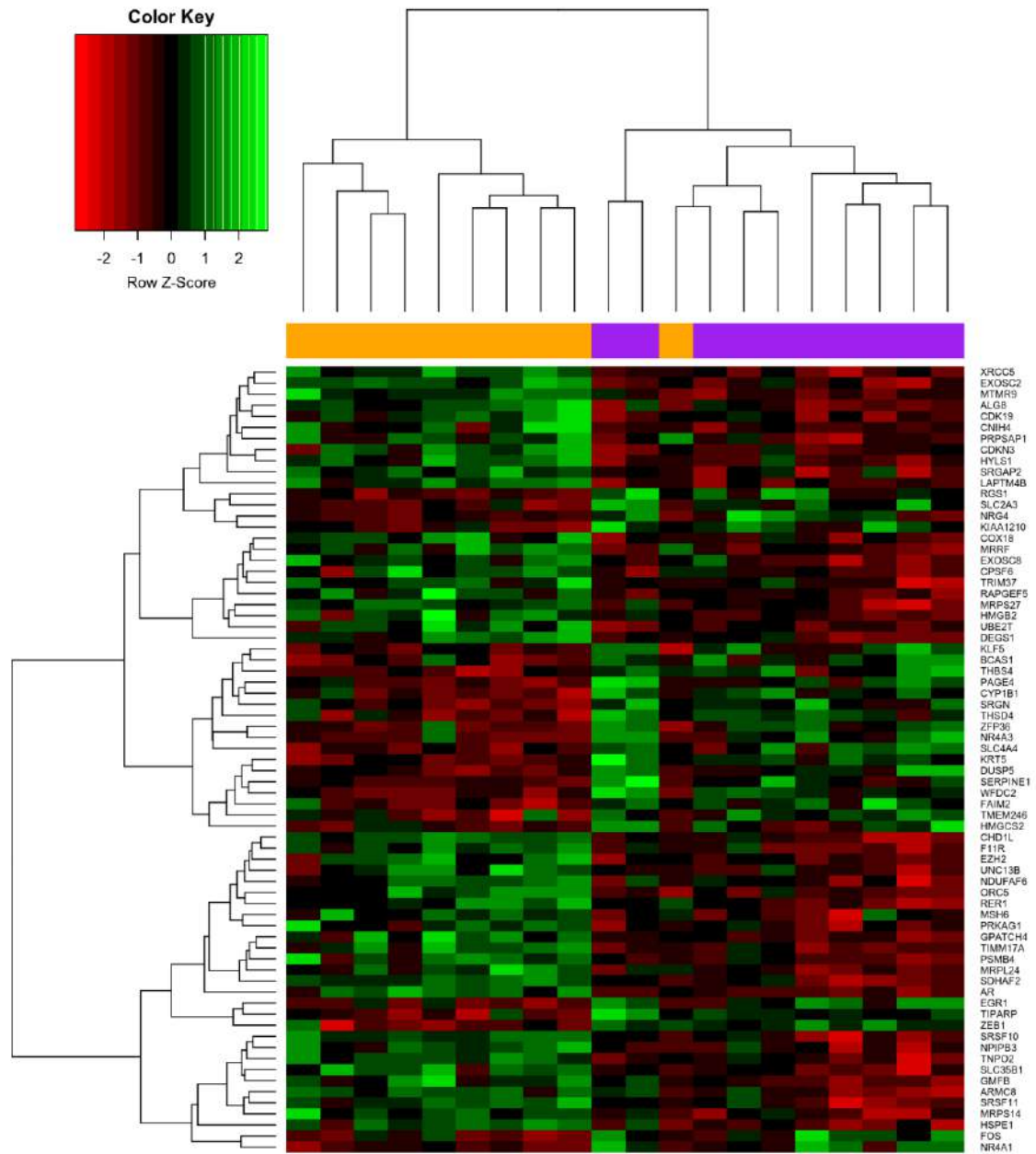
Un altre escenari on els components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina podrien ser possibles biomarcadors predictius i/o pronòstics és durant el procés de resistència a la teràpia hormonal en càncer de pròstata avançat. En un principi els carcinomes de pròstata responen bé a la teràpia hormonal, coneguda com a deprivació androgènica, ja que el creixement d'aquests tumors es produeix a través de l'estimulació del receptor d'andrògens (AR), malauradament en un període de temps variable (18 – 24 mesos) aquests tumors, hormonosensibles (HSPC), desenvolupen una resistència a aquest tipus de teràpia convertint-se en hormonoresistents (CRPC) [226,227].

### 4.1 Components de la via de Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors predictius o pronòstics en càncer de pròstata avançat

Per estudiar el paper de la via Wnt en aquest context, es van seleccionar 20 pacients amb càncer de pròstata avançat. Així es van seleccionar 10 pacients amb càncer de pròstata hormonosensibles i es van obtenir mostres de teixit tumoral, que provenien de la prostatectomia radical a la que s'havien intervingut els pacients en un inici de la malaltia. Per altra banda es van seleccionar 10 pacients amb càncer de pròstata hormonoresistent i es va obtenir mostres de teixit tumoral, que provenien de reseccions transuterals de pròstata (RTUs), a les quals es sotmeten aquests pacients per tal de paliar un dels símptomes derivats de la malaltia, en concret, l'augment de la mida de la pròstata que provoca l'obstrucció de la uretra.

#### 4.1.1 mRNA

Es va fer una extracció d'RNA d'aquestes mostres i es va realitzar un anàlisi d'expressió de mRNAs mitjançant l'*array* d'expressió d'Affymetrix: *Clariom™ S Human Arrays*, tal com es detalla a l'apartat 10.1 de la secció Materials i Mètodes. Així, es va veure que 4.632 mRNAs es trobaven diferencialment expressats entre els dos grups de pacients. Un cop seleccionats els que eren estadísticament significatius, en funció dels següents criteris: *fold change* = 2 i p-valor ajustat < 0,2, es va veure que hi havia 26 mRNAs infraexpressats i 45 mRNAs sobreexpressats. A la Figura R4.1 es mostra una visió global d'aquests mRNAs.



**Figura R4.1. Visió general dels mRNAs diferencialment expressats en la comparació CRPC vs HSPC.** Heatmap dels mRNA diferencialment expressats, es representen en vermell els mRNAs sobreexpressats estadísticament significatius i en verd els mRNAs infraexpressats estadísticament significatius amb un p-valor ajustat per fdr (de l'anglès, *False Discovery Rate*) < 0,2 i un *fold change* = 2 per la comparació CRPC (en taronja) vs HSPC (en lila).

## RESULTATS CAPÍTOL 4

Un cop obtinguda la llista de mRNAs que es trobaven diferencialment expressats entre els dos grups de pacients, es va seguir amb la seva interpretació biològica per tal d'esbrinar la rellevància dels resultats obtinguts. Hi ha diferents maneres d'abordar aquesta qüestió, en aquesta tesi es va fer servir un mètode d'enriquiment bàsic que implementa el paquet de Bioconductor: *ReactomePA* [228]. A la figura R4.2 es mostren els resultats obtinguts en forma de llista on apareixen les vies que podrien estar implicades en la progressió cap a la malaltia hormono-resistent, ordenades segons el p-valor i el nombre de gens desregulats. Entre aquestes vies destaquen les de resposta cel·lular davant l'estrès, vies de regulació transcripcional o metabòliques de TP53, vies relacionades amb el procés de *splicing* del mRNA, la via de regulació PTEN i altres vies relacionades amb la regulació de les fases del cicle cel·lular i més interessantment, la via Wnt/ $\beta$ -catenina (p-valor ajustat = 0,0451 i 19 gens implicats). Algunes vies de les mencionades han estat estudiades en el desenvolupament de resistència a la teràpia androgènica com és el cas de les vies relacionades amb el procés de *splicing* [229–232] o la via de regulació PTEN [233–236]. La via de senyalització Wnt en canvi, malgrat despertar un gran interès per part dels investigadors en aquest camp, encara es troba una mica enrere pel que fa a l'explotació del seu potencial. A la figura R4.3 es pot veure les relacions entre aquestes vies mencionades, interessantment la via de senyalització Wnt es troba en el mateix *cluster* que les vies de regulació PTEN o NOTCH, amb les quals es coneix que hi interacciona, així com també hi ha les diferents vies que regulen les diferents fases del cicle cel·lular, les quals també estan altament relacionades amb la via Wnt/ $\beta$ -catenina.

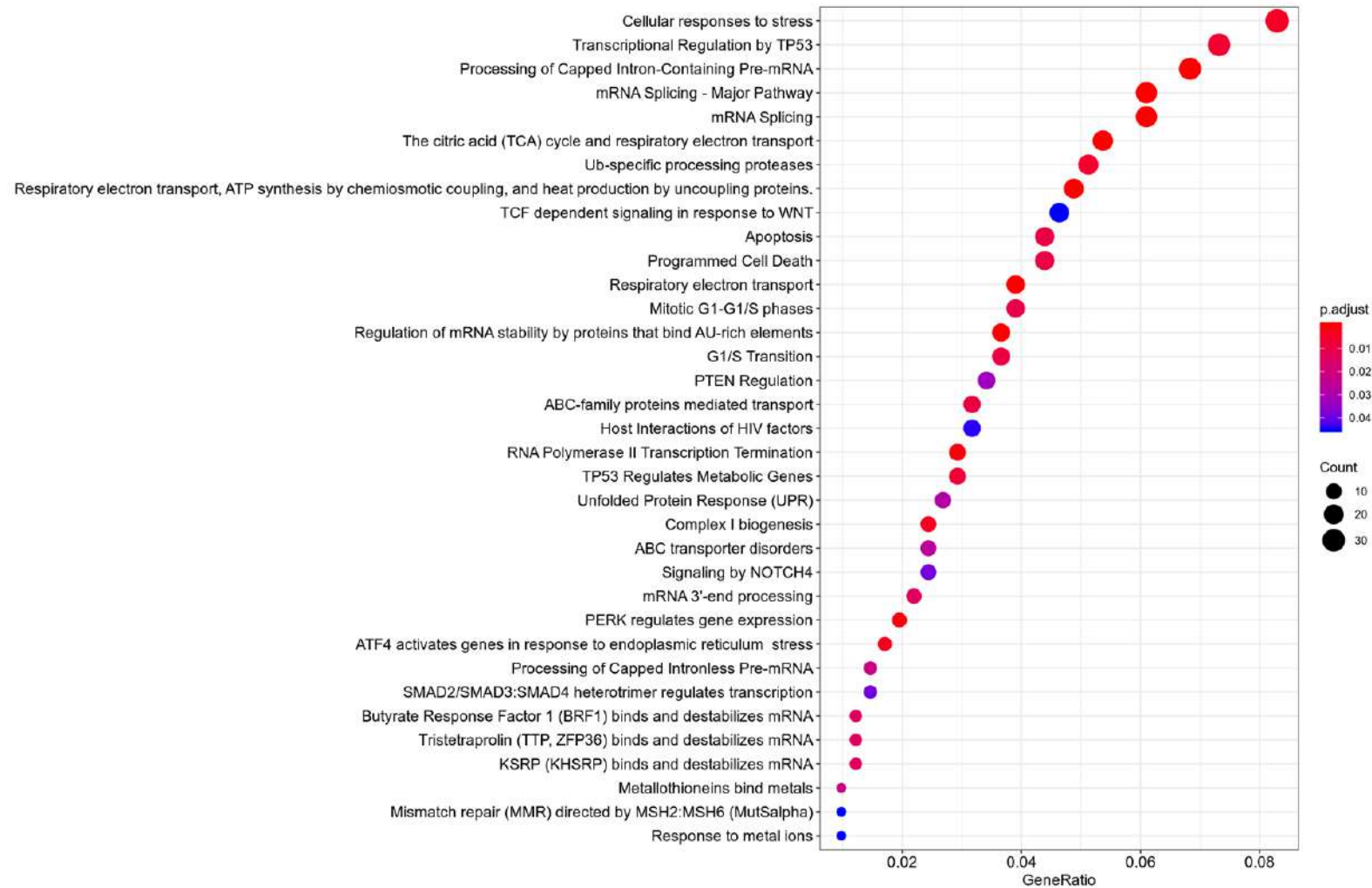
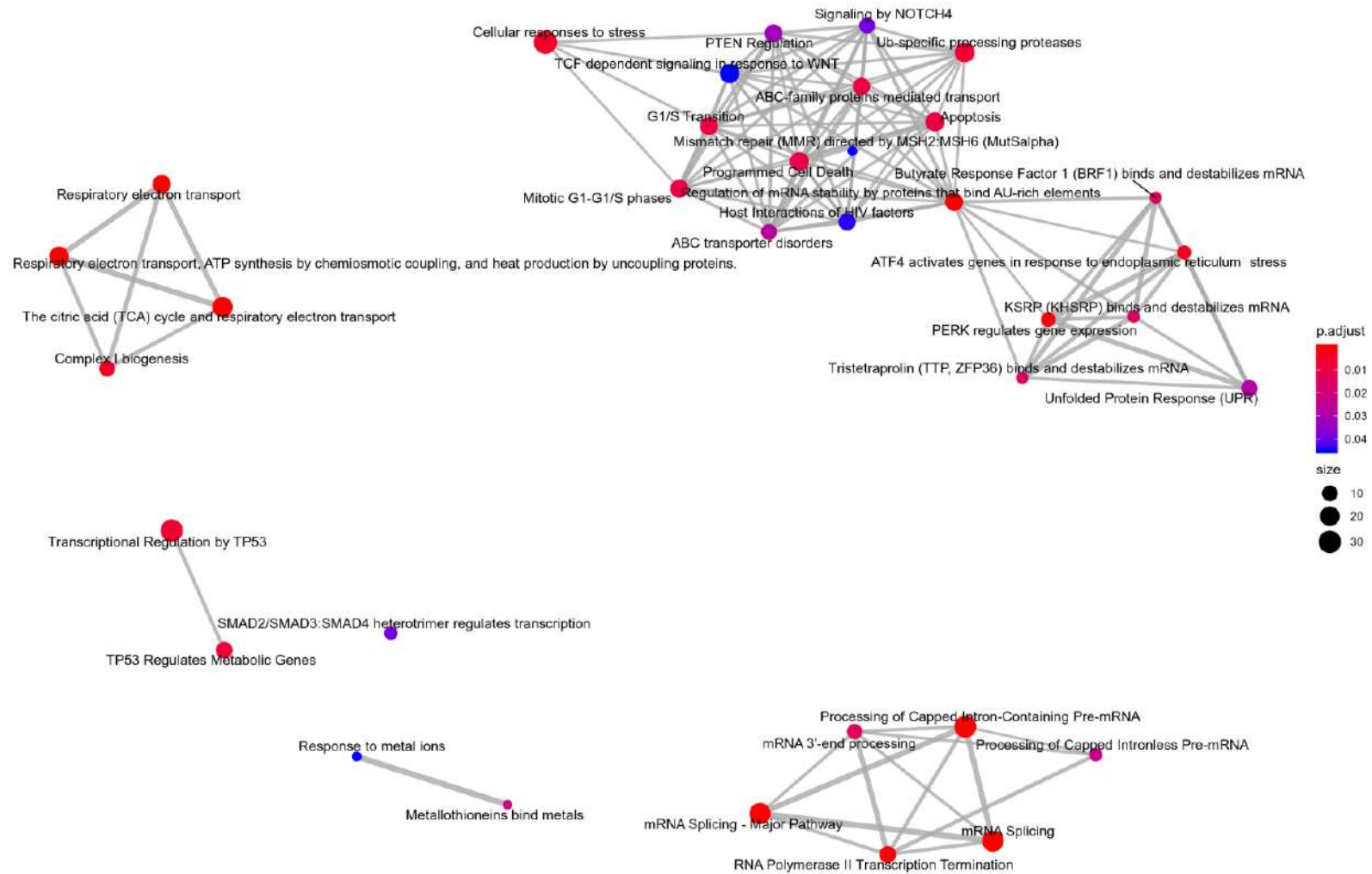


Figura R4.2. Interpretació biològica dels resultats de l'anàlisi d'arrays d'expressió de mRNAs per la comparació CRPC vs HSPC. Representació gràfica dels resultats obtinguts implementant el mètode d'enriament bàsic mitjançant el paquet *ReactomePA* de *Bioconductor*.

## RESULTATS CAPÍTOL 4



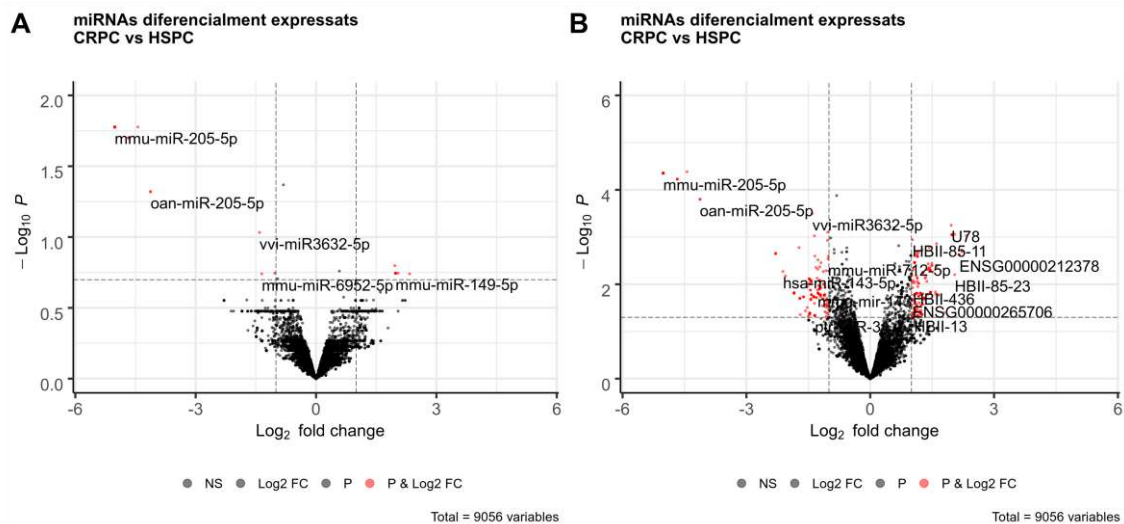
**Figura R4.3. Relació entre les vies implicades resultants de l'anàlisi d'arrays d'expressió de mRNAs per la comparació CRPC vs HSPC.** Representació gràfica de les interaccions entre les vies implicades dels resultats obtinguts amb l'enriquiment bàsic realitzat amb el paquet *ReactomePA* de *Bioconductor*.



4.1.2 miRNA

Amb les mateixes mostres i en paral·lel, es va analitzar l'expressió de miRNAs utilitzant l'array *miRNA 4.0 d'Affymetrix*. En aquest cas, es va veure que hi havia 9.056 miRNAs diferencialment expressats entre els dos grups de pacients, tal com es mostra a la figura R4.4A. Un cop seleccionats aquells miRNAs que complien els mateixos criteris que per la selecció dels mRNAs diferencialment expressats (*fold change* = 2 i p-valor ajustat < 0,2) es van identificar 3 miRNAs i 1 snoRNA: el miRNA hsa-miR-149-5p i l'snoRNA U78 que estaven sobreexpressats i els miRNAs hsa-miR-205-5p i hsa-miR-6737-5p que es trobaven infraexpressats.

Els estudis de significació biològica requereixen un nombre més elevat de miRNAs, per això en aquest cas es va utilitzar un criteri menys restrictiu per la selecció de miRNAs a estudiar (tal com es detalla a l'apartat 10 de la secció Materials i Mètodes), així es va seleccionar aquells miRNAs que presentaven un *fold change* = 2 i un p-valor (sense ajustar) < 0,05, de manera que per fer l'anàlisi de significació biològica es va partir de 39 miRNAs diferencialment expressats, dels quals 22 es trobaven sobreexpressats i 17 infraexpressats tal com mostra la figura R4.4 B.



**Figura R4.4. Visió global del miRNAs diferencialment expressats en la comparació CRPC vs HSPC.** Volcano plot on es representen els miRNAs diferencialment expressats, en vermell els que són estadísticament significatius. **A)** amb un p-valor (ajustat per *fdr*) < 0,2 i un *fold change* = 2. **B)** amb un p-valor < 0,05 i un *fold change* = 2.

Amb aquests miRNAs seleccionats es va fer una cerca a la base de dades miWalk2.0 [237] dels mRNA regulats per aquests miRNAs, a continuació es va seleccionar aquelles parelles que contenien mRNAs relacionats amb la via Wnt i AR, i d'aquestes només aquelles en què els mRNAs es trobaven diferencialment expressats entre els dos grups de pacients. A les taules R4.1 i R4.2 es mostren les parelles de miRNA-mRNA relacionades amb la via Wnt i la via AR seleccionades, en vermell es mostren els miRNAs infraexpressats i en verd els sobreexpressats en la comparació CRPC vs HSPC.

## RESULTATS CAPÍTOL 4

**Taula R4.1 Parelles de miRNAs-mRNAs relacionades amb la via Wnt/ $\beta$ -catenina.**

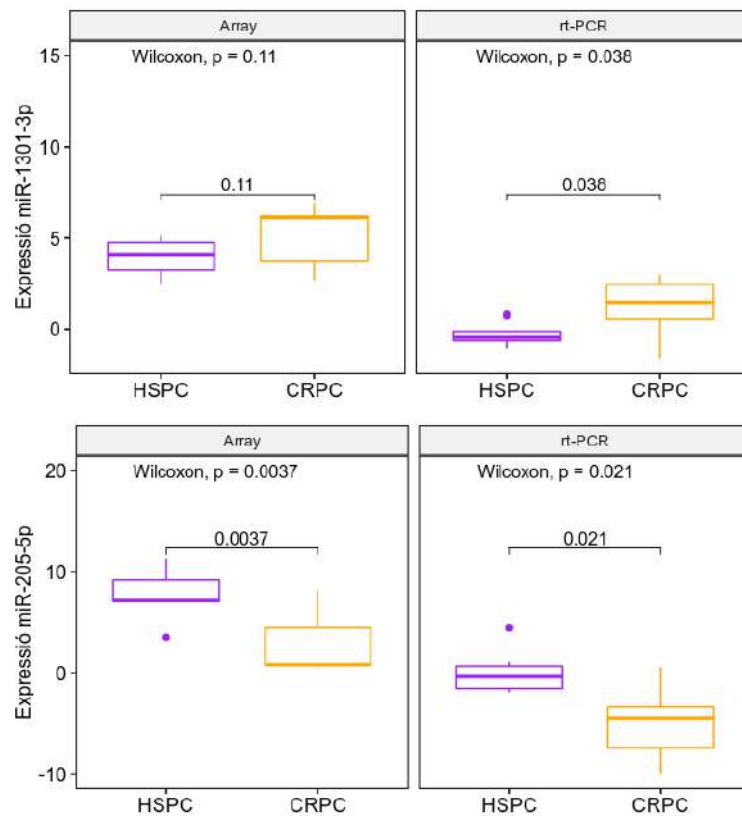
miRNA	mRNA	miRNA	mRNA	miRNA	mRNA
hsa-miR-143-5p		hsa-miR-143-5p		hsa-miR-143-5p	
hsa-miR-6855-5p		hsa-miR-3907	AP2A2	hsa-miR-143-3p	
hsa-miR-4532		hsa-miR-151b		hsa-miR-6855-5p	
hsa-miR-5100		hsa-miR-1301-3p		hsa-miR-6871-5p	
hsa-miR-4253		hsa-miR-130b-3p	HIST1H2BH	hsa-miR-4253	
hsa-miR-3907		hsa-miR-15b-5p		hsa-miR-941	
hsa-miR-941		hsa-miR-93-3p	LGR6	hsa-miR-30b-3p	PSMB2
hsa-miR-191-5p		hsa-miR-143-5p		hsa-miR-10a-5p	
hsa-miR-10a-5p	SFRP1	hsa-miR-143-3p		hsa-miR-4646-5p	
hsa-miR-484		hsa-miR-4443		hsa-miR-29b-2-5p	
hsa-miR-4646-5p		hsa-miR-4253		hsa-miR-7162-3p	
hsa-miR-1301-3p		hsa-miR-6737-5p	GNG4	hsa-miR-4284	
hsa-miR-29b-2-5p		hsa-miR-191-5p		hsa-miR-15b-5p	
hsa-miR-4284		hsa-miR-30b-3p		hsa-miR-183-3p	
hsa-miR-425-5p		hsa-miR-1301-3p		hsa-miR-29b-2-5p	HDAC1
hsa-miR-183-3p		hsa-miR-7162-3p		hsa-miR-4284	
hsa-miR-149-5p		hsa-miR-149-5p		hsa-miR-3609	VPS29
hsa-miR-222-3p		hsa-miR-143-5p		hsa-miR-205-5p	
hsa-miR-3907		hsa-miR-143-3p		hsa-miR-143-5p	
hsa-miR-484		hsa-miR-7851-3p		hsa-miR-4646-5p	
hsa-miR-1301-3p		hsa-miR-6871-5p		hsa-miR-29b-2-5p	WNT5A
hsa-miR-29b-2-5p	AGO4	hsa-miR-30b-3p		hsa-miR-3609	
hsa-miR-3609		hsa-miR-29b-2-5p	RBBP5	hsa-miR-7162-3p	
hsa-miR-130b-3p		hsa-miR-345-5p		hsa-miR-183-3p	
hsa-miR-15b-5p		hsa-miR-1306-3p		hsa-miR-1301-3p	
hsa-miR-575		hsa-miR-3609		hsa-miR-3609	YWHAZ
hsa-miR-30b-3p	PPP2R5A	hsa-miR-4284		hsa-miR-7162-3p	
hsa-miR-1301-3p		hsa-miR-575		hsa-miR-149-5p	
hsa-miR-31-5p		hsa-miR-205-5p		hsa-miR-4253	XPO1
hsa-miR-6871-5p		hsa-miR-143-5p		hsa-miR-4284	
hsa-miR-30b-3p	PSMD10	hsa-miR-222-3p	PPP3R1		
hsa-miR-425-5p		hsa-miR-941		hsa-miR-93-3p	RUVBL1
hsa-miR-149-5p		hsa-miR-3609			

**Taula R4.2 Parelles miRNAs-mRNAs relacionades amb la via del receptor d'andrògens.**

miRNA	mRNA	miRNA	mRNA
hsa-miR-205-5p		hsa-miR-130b-3p	
hsa-miR-31-5p		hsa-miR-15b-5p	HIST1H2BH
hsa-miR-143-3p			
hsa-miR-7851-3p			
hsa-miR-145-5p			
hsa-miR-4443			
hsa-miR-6871-5p			
hsa-miR-4253			
hsa-miR-3907			
hsa-miR-30b-3p	AR		
hsa-miR-4646-5p			
hsa-miR-93-3p			
hsa-miR-1301-3p			
hsa-miR-345-5p			
hsa-miR-3609			
hsa-miR-130b-3p			
hsa-miR-15b-5p			
hsa-miR-575			
hsa-miR-149-5p			

4.1.3 Validació dels miRNAs

Dels miRNAs que regulen components de la via Wnt i AR se'n van escollir dos per ser validats. El primer, el miRNA hsa-miR-205-5p, regula l'expressió de components de les dues vies i s'ha descrit la seva implicació en la progressió del càncer de pròstata [238–240] i el segon, el miRNA hsa-miR-1301-3p, perquè hi ha un estudi publicat on s'estudia el seu paper en la progressió del càncer de pròstata ja que promou l'expansió de les cèl·lules mare tumorals a través de la regulació de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina [241]. Aquesta validació es va fer utilitzant les mateixes mostres però mitjançant una altra tècnica, la rt-PCR. Així es va comprovar que els resultats obtinguts amb els *arrays* d'expressió també s'observaven amb la rt-PCR, tal com es mostra a la figura R4.5.



**Figura R4.5. Expressió dels miRNAs: hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p.** Comparació de les mitjanes de l'expressió dels miRNAs seleccionats entre els dos grups de pacients obtinguda amb: (dreta) els *arrays* d'expressió, (esquerra) la rt-PCR.

A la taula R4.3 es mostra els resultats obtinguts en fer l'anàlisi de correlacions, es pot veure que pels dos miRNAs hi ha una correlació positiva entre les dues tècniques, ja que coeficient de correlació és elevat (> 0,5) i estadísticament significatiu.

**Taula R4.3 Correlació entre les dues tècniques per detectar l'expressió de miRNAs.**

Arrays d'expressió	rt-PCR	Coefficient de correlació	p-valor
hsa-miR-205-5p	hsa-miR-205-5p	0,891	0,0000036
hsa-miR-1301-3p	hsa-miR-1301-3p	0,518	0,0398301

Els resultats obtinguts a l'últim capítol de la tesi suggereixen que durant l'aparició de la resistència a la teràpia hormonal, els miRNAs hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p podrien jugar algun paper ja sigui com a biomarcadors predictius o pronòstics o com a possibles dianes terapèutiques, encara per determinar, a través de la seva regulació de

## RESULTATS CAPÍTOL 4

components tant de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a través de la seva regulació del mateix AR. Aquest model es veu resumit a la figura R4.6.

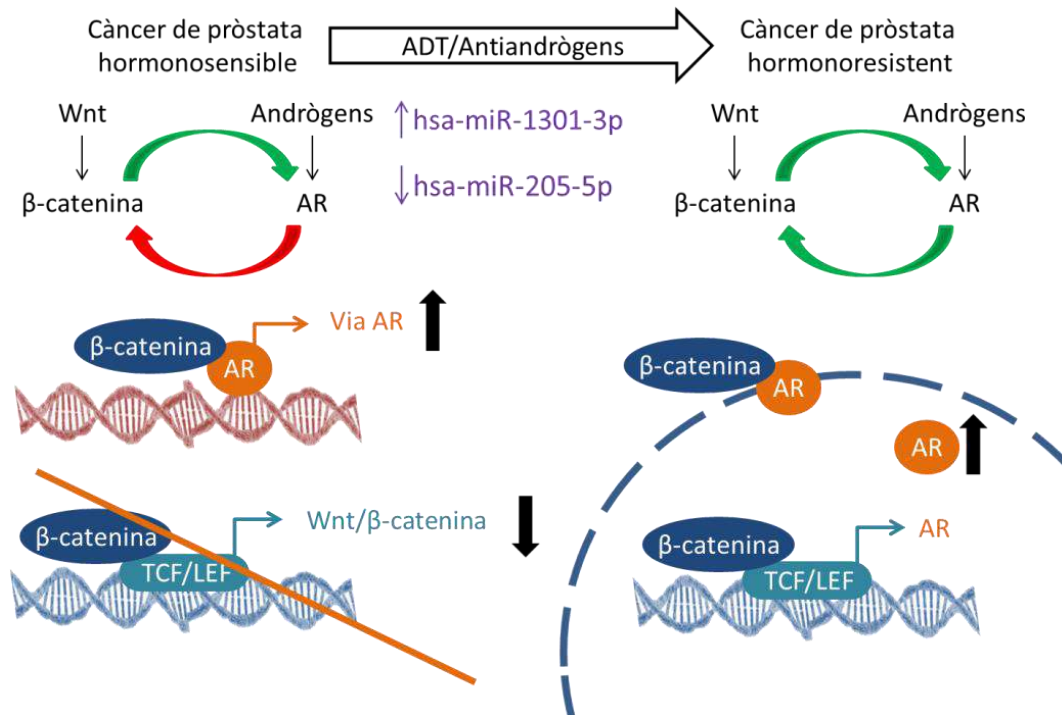


Figura R4.6. Resum esquemàtic del model proposat amb els resultats obtinguts al capítol 4.

Actualment el grup d'investigació dins el qual s'ha desenvolupat la present tesi doctoral està recollint mostres de sang de pacients amb càncer de pròstata avançant tant hormonosensibles com hormonoresistents amb l'objectiu d'explorar la presència d'aquests miRNAs (hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p) en biòpsia líquida per a possibles aplicacions posteriors així com validar-ne l'ús com a biomarcadors i ampliar la mida mostral per tal de trobar correlacions clínic-genòmiques. La recollida de mostres s'està fent de forma prospectiva així, es recull una primera mostra dels pacients a l'inici del tractament en primera línia i de forma seriada a diferents moments durant el tractament, així com a la progressió i a l'inici de segones i terceres línies de tractament (Figura R4.7).

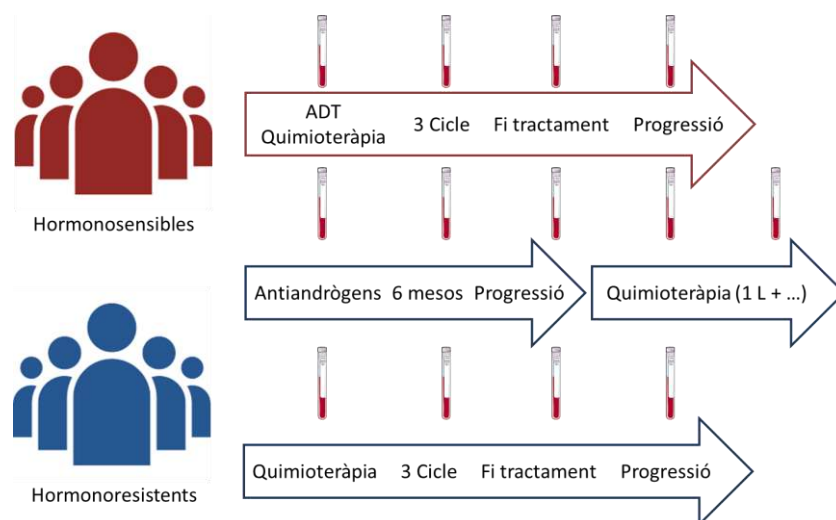


Figura R4.7. Esquema de la recollida prospectiva de mostres de biòpsia líquida en pacients de càncer de pròstata avançat.

# V. DISCUSSIÓ

## DISCUSSIÓ

La implicació de la via de senyalització Wnt en la regulació de les cèl·lules mare mesenquimals i el manteniment de l'homeòstasi en teixits adults [1,2], ha propiciat l'estudi del seu paper en diferents malalties, entre elles el càncer [83,84]. Aquests estudis s'han traduït en una millor comprensió de la carcinogènesi, en el cas del càncer de còlon, per exemple, on la via ha estat àmpliament estudiada [85,88] i a més, han contribuït al desenvolupament d'inhibidors de la via per tal de millorar les estratègies terapèutiques actuals o desenvolupar-ne de noves. En aquesta tesi es va estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en dos tipus de tumors sòlids diferents, els sarcomes de parts toves i el càncer de pròstata avançat.

Els sarcomes de parts toves (SPT) són un grup de tumors poc freqüents i molt heterogeni, sent especialment complicat el seu diagnòstic [242]. L'etiologia d'aquests tumors segueix sent desconeguda i malgrat la seva heterogeneïtat, se'ls ha considerat com una sola entitat pel que fa a diagnòstic i estratègies terapèutiques, això ha fet que el maneig d'aquestes neoplàsies hagi patit una evolució molt lenta [243]. Com s'ha comentat a la introducció, un 50% dels pacients amb SPT d'alt grau acaben desenvolupant metàstasis de les quals acaben morint [132,137], ja que el tractament d'aquests pacients quan progressen a la primera línia (quimioteràpia amb doxorubicina o ifosfamida) és pal·liatiu. Els avanços en la biologia molecular durant la darrera dècada s'han traduït en la publicació de diferents estudis [141,142,162,164] on s'aborda la caracterització en l'àmbit genòmic dels SPT amb l'objectiu de comprendre millor el procés pel qual s'originen aquests tipus de neoplàsies i la identificació de possibles dianes terapèutiques que aportin millores en el maneig d'aquests pacients. Dins aquest context, en aquesta tesi es va estudiar la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi (Capítol 1), es va avaluar la seva inhibició com a possible estratègia terapèutica (Capítol 2) i finalment es va explorar la possibilitat d'utilitzar determinats components de la via com a biomarcadors predictius de resposta a determinats inhibidors (Capítol 3).

En càncer de pròstata avançat el creixement tumoral es produeix a través de la via de senyalització del receptor d'andrògens (AR), és per això que el tractament d'aquests tumors es centra en teràpies dirigides cap a aquesta via de senyalització. Desafortunadament l'adquisició de resistències a aquest tipus de tractament (ADT, de l'anglès *androgen deprivation therapy*) és un tret comú a la majoria dels pacients, els quals acaben progressant a un estat de la malaltia anomenat càncer de pròstata hormono-resistent (CRPC, de l'anglès *castration resistant prostate carcinoma*). La comprensió dels factors clínics, genètics i biològics que condueixen a la progressió de la malaltia cap a una forma més agressiva i la identificació de biomarcadors que permetin determinar quins pacients patiran aquesta progressió s'ha convertit en un punt crític a tractar per part dels investigadors en aquest camp. Dins aquest escenari en aquesta tesi es va avaluar quins components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina podrien estar implicats en aquest procés de resistència a la teràpia hormonal i el seu possible ús com a biomarcadors predictius i/o pronòstics en aquests pacients amb càncer de pròstata avançat (Capítol 4).

### Implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en sarcomagènesi.

Així com a altres tipus de neoplàsies l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina es deu majoritàriament a alteracions genètiques en components clau de la via com mutacions en *APC* o *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina), en sarcomes s'ha demostrat que aquestes no són tan comuns i que l'activació de la via es deu a altres mecanismes com l'activació autocrina de la via o proteïnes de fusions [244–246]. En aquesta tesi es va demostrar que la via Wnt/ $\beta$ -catenina es troba constitutivament activada en una àmplia sèrie de línies cel·lulars i cultius primaris de SPT.

L'activació de la via Wnt es determina per la presència de  $\beta$ -catenina al nucli, ja que quan la via està activada  $\beta$ -catenina no pot ser degradada a través del proteasoma de manera que s'acumula al citosol i acaba translocant-se al nucli on activa la transcripció dels gens diana de la via. A la literatura hi ha una certa controvèrsia sobre la detecció de  $\beta$ -catenina nuclear mitjançant la immunohistoquímica (malgrat ser una tècnica àmpliament utilitzada per a la localització subcel·lular de proteïnes) en diferents tipus de neoplàsies, incloent-hi els sarcomes [160,247]. Per aquest motiu en aquesta tesi es va determinar la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina mitjançant la immunofluorescència. A totes les línies cel·lulars de SPT estudiades es va detectar  $\beta$ -catenina al nucli, mostrant un 75% de les línies estudiades nivells alts de  $\beta$ -catenina nuclear (avaluat segons l'IRS). I és més, totes les línies presentaven nivells positius de  $\beta$ -catenina en la seva forma activa (p-Ser552- $\beta$ -catenina). En concordança, quan es va estudiar l'activitat de la via es va demostrar que totes les línies de SPT analitzades mostraven nivells mesurables de l'activitat transcripcional basal (Figura R1.3). És més, la línia de leiomioma SK-UT-1, la qual té mutacions en *APC* presentava un nivell d'activitat transcripcional molt semblant a la línia cel·lular de càncer de còlon (SW480) utilitzada com a control positiu. Seguint en la mateixa línia, l'estudi d'expressió de gens diana de la via va revelar que les línies de SPT presentaven alts nivells d'expressió endògena del gen diana *CDC25A* i baixos nivells del gen diana *C-MYC* amb relació a la línia de cèl·lules mare mesequimals, hMSCs, que presenta una baixa activació de la via Wnt i es va utilitzar com a referència (Figura R1.4). Aquests resultats no tan sols posen de manifest l'elevada expressió del gen diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina *CDC25A* en SPT sinó que indiquen que al contrari del càncer de còlon, on la via Wnt ha estat àmpliament estudiada, *C-MYC* no és el gen diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina responsable de la proliferació cel·lular en SPT, sinó que aquest paper recau sobre *CDC25A*, d'acord amb l'estudi publicat per Vijajakumar *et. al* [158]. Part dels resultats d'aquesta tesi, van ser publicats l'any 2017 [248] i una altra part, més recentment, durant el 2020 [249] (Annex 4, Annex 5). La rellevància clínica d'aquests resultats ha estat abordada per Bertucci *et. al* (2017) que va informar, d'una correlació positiva entre l'activació de la via Wnt i l'expressió de *CDC25A* en una gran sèrie de mostres de pacients (n=1.439), en una carta per part dels autors com a comentari a la publicació esmentada de l'any 2017 [250] (Annex 6). Els resultats d'aquesta tesi, amb l'anàlisi d'una sèrie de mostres de pacients disponibles en bases de dades públiques del TCGA [142] comparant l'expressió de *CDC25A* en mostres de teixit de pacients de SPT en comparació amb mostres de teixit no tumoral (Figura R1.14), han confirmat aquests resultats i posen de manifest la rellevància clínica que té en aquests tumors l'estudi de les alteracions moleculars que presenten. Totes aquestes evidències confirmen el paper de *CDC25A*

## DISCUSSIÓ

com a biomarcador de l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que seria fàcilment valuable en mostres de pacients amb SPT.

Cal destacar el fet que l'expressió del gen diana de la via *AXINA2* només es va trobar elevat a la línia de leiomioma SK-UT-1, que va presentar una activitat transcripcional de la via elevada i que conté mutacions en *APC* i a les dues línies cel·lulars col·lorectals, HT29 i HTC116, amb una activació endògena de la via Wnt, que es van utilitzar com a controls positius (Figura R1.4). Els resultats d'expressió d'aquest gen diana de la via Wnt es contradiu amb altres estudis que han mostrat una elevada expressió d'*AXINA2* tant a nivell de mRNA com de proteïna a la línia cel·lular de fibrosarcoma HT-1080 [156]. Malgrat que seria molt interessant estudiar a què es poden deure aquestes discrepàncies, en aquesta tesi no es va abordar aquesta qüestió, hipotetitzant que aquestes discrepàncies probablement es deuen a la metodologia utilitzada en els diferents estudis.

L'estudi de l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en les línies de SPT ha posat de manifest la gran heterogeneïtat d'aquest tipus de neoplàsies i és que malgrat formar part del mateix subtipus de sarcoma, el nivell d'activació de la via que presenten les línies cel·lulars és molt diferent. Així ho revela el fet que les tres línies de liposarcoma estudiades (AW, 93T449 i SW872) presentaven grans diferències en la localització nuclear de  $\beta$ -catenina i en els nivells de  $\beta$ -catenina en la seva forma activa (Figura R1.2), encara que també cal tenir en compte que aquesta variabilitat podria ser deguda al baix nombre de mostres per subgrup. L'elevat grau d'heterogeneïtat d'aquests tumors també és present en l'anàlisi de correlacions entre les diferents dades moleculars, on no s'ha pogut obtenir cap correlació prou concloent entre aquestes. Malgrat això, es va veure una tendència entre els nivells de  $\beta$ -catenina fosforilada amb els nivells de  $\beta$ -catenina total i els nivells d'expressió del gen diana *CDC25A*. Així mateix, els nivells d'expressió de *C-MYC* i *AXINA2* van tenir un coeficient de correlació positiu i la correlació va ser estadísticament significativa (Figura R1.5). Aquests resultats podrien indicar que l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina és un tret comú de tots els SPT analitzats i és independent del subtipus de SPT, perquè les cèl·lules de SPT amb la mateixa histologia varen presentar diferents nivells d'immunoreactivitat nuclear de  $\beta$ -catenina o bé que es necessitaria augmentar el nombre de línies cel·lulars de cada subtipus de SPT a estudiar per confirmar de manera significativa aquest fet. A més, cal tenir en compte que es coneixen poc les alteracions moleculars subjacents a cada subtipus histològic. En els pròxims anys, amb les tècniques de seqüenciació massiva i altres abordatges genòmics és esperable que es puguin classificar millor els subtipus de SPT a nivell molecular i ens ajudin a entendre millor la seva biologia.

### **Inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a nova estratègia terapèutica en sarcomes de parts toves.**

Un cop demostrat que la via Wnt/ $\beta$ -catenina està activada en SPT, es va estudiar l'efecte que produeix la inhibició d'aquesta via sobre les línies cel·lulars de SPT.

La inhibició de la via es pot aconseguir actuant a diferents punts, així a la literatura es parla d'inhibidors que actuen per sobre o per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització [12,251]. Aquest és un punt de gran importància quan es considera la



inhibició de la via com a possible estratègia terapèutica, ja que en funció del punt de la via on actuïn, uns inhibidors seran eficaços per determinades neoplàsies mentre que no ho seran per altres. Per exemple, en pacients amb SPT o altres càncers (per exemple: càncer de còlon) que presenten mutacions en *APC*, inhibidors que actuen per sobre de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització com l'IWP-2 (que inhibeix a l'acetiltransferasa Porcupina, necessària per a la secreció dels lligands Wnt) no seran eficaços, ja que el mecanisme d'acció de l'inhibidor es troba per sobre de l'alteració que fa que la via es trobi constitutivament activada.

Al llarg d'aquesta tesi es va avaluar la inhibició de la via mitjançant molècules que actuen a diferents punts de la via, tant per sobre de  $\beta$ -catenina amb XAV939 (Figura R1.6) i LGK974 (Figura R2.7) com per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització amb PKF118-310 (Figura R1.6) i PRI-724 (Figura R2.1). XAV939, és un inhibidor d'enzims Tankirasa (les proteïnes responsables de la degradació d'AXINA), que estabilitza els nivells de la proteïna AXINA present al citosol. LGK974, és un inhibidor de Porcupina que actualment es troba en fase 1 d'assaigs clínics per diferents tumors sòlids. PKF118-310, és un inhibidor de la unió de  $\beta$ -catenina amb el factor de transcripció TCF. I PRI-724 és una molècula, actualment en assaigs clínics fase II (NCT02413853), que s'uneix al coactivador CBP impedint que s'hi uneixi  $\beta$ -catenina. Els resultats obtinguts en aquesta tesi determinen que la millor estratègia per inhibir la proliferació cel·lular en SPT és l'actuació a nivell per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització.

L'efecte de la inhibició de la via sobre la viabilitat i proliferació de les línies cel·lulars també posa de manifest l'heterogeneïtat dels SPT comentada anteriorment, ja que línies del mateix subtipus de SPT van respondre de forma diferent a la inhibició de la via. Per exemple, la línia cel·lular de fibrosarcoma HT-1080 va ser sensible a l'inhibidor PKF118-310 (Figura R1.6) amb un valor d' $IC_{50}$  de 0,37  $\mu$ M mentre que la línia SW684 (fibrosarcoma també) no es va veure afectada per aquest inhibidor. O la diferent resposta a PRI-724 (Figura R2.1) que van mostrar les línies cel·lulars de liposarcoma, mentre que les línies AW i 93T449 van ser de les més sensibles a l'inhibidor (amb valors d' $IC_{50}$  d'entre 5 i 9  $\mu$ M), la línia SW872 va ser de les més resistents a aquest tipus d'inhibició de la via (amb un valor d' $IC_{50}$  de 20  $\mu$ M).

La poca eficiència de l'inhibidor XAV939 (actua per sobre de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització), que només va ser capaç de reduir la viabilitat cel·lular a una de les línies de fibrosarcoma (HT-1080), no sorprèn en la línia cel·lular de leiomioma SK-UT-1 (portadora de mutacions en *APC*) o en la línia cel·lular de fibrosarcoma SW684 (amb mutació en *CTNNB1*), on la presència de mutacions en *APC* o *CTNNB1* podrien explicar la baixa efectivitat de l'inhibidor. A la resta de línies cel·lulars estudiades, mecanismes alternatius podrien ser els responsables d'aquesta resposta tan limitada. En aquest sentit, hi ha estudis on detecten alts nivells d'AKT així com d'alguna de les seves dianes (entre elles GSK-3 $\beta$  i  $\beta$ -catenina) en tumors de pacients amb SPT, especialment en sarcoma sinovial [252,253] i leiomioma [254]. La línia cel·lular on XAV939 va inhibir més efectivament la proliferació cel·lular, la línia cel·lular de fibrosarcoma HT-1080, va mostrar resultats antitumorals semblants als reportats anteriorment per De Robertis *et.al* [244], en concordança amb els elevats nivells d'expressió d'AXINA2 tant a nivell de mRNA com de proteïna publicats prèviament en

## DISCUSSIÓ

aquesta línia cel·lular [156], però com s'ha comentat anteriorment no detectats en aquesta tesi.

Per a la transcripció de gens diana de la via, quan la via està activada, és necessari que  $\beta$ -catenina es trobi al nucli. L'entrada i sortida de proteïnes del nucli se sol donar a través d'uns complexos anomenats porus nuclears, de manera que proteïnes petites (< 50 kDa) difonen lliurement a través d'aquests porus i proteïnes de mida més gran són transportades només si presenten unes determinades seqüències de senyal de transport nuclear.  $\beta$ -catenina és una proteïna amb una mida de 90 kDa que no presenta cap d'aquestes seqüències de transport nuclear. El mecanisme pel qual  $\beta$ -catenina entra i surt del nucli avui en dia encara no està clar, malgrat que hi hagi diversos estudis centrats a entendre aquest mecanisme [255]. Així hi ha estudis que suggereixen que el transport al nucli de  $\beta$ -catenina es dona per la interacció d'aquesta amb determinades nucleoporines (Nup358, Nup62, Nup98 i Nup153) [58–61] o a altres proteïnes com Smad3 i Smad4 [256], BCL-9 [69], el receptor d'andrògens (AR) [257] o LEF-1 [66] entre d'altres. Altres estudis assenyalen que mentre APC i AXINA retenen a  $\beta$ -catenina al citoplasma, TCF i LEF1 són els responsables de la retenció de  $\beta$ -catenina al nucli [67,68] i que aquesta retenció per part de TCF i LEF1 contribueix al potencial oncogènic del complex format per TCF, LEF1 i  $\beta$ -catenina en la carcinogènesi colorectal [85,86,121,258].

A nivell molecular, els inhibidors XAV939 i PKF118-310 varen reduir o afavorir la sortida de  $\beta$ -catenina del nucli (Figura R1.9). Resultats que coincideixen amb estudis publicats que suggereixen que la interacció de  $\beta$ -catenina amb el factor de transcripció TCF augmenta la seva estabilitat al nucli i que l'estabilització d'AXINA reté a  $\beta$ -catenina al citoplasma [67,68,85,259,260]. Com a conseqüència, PKF118-310 va reduir l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina a les línies cel·lulars analitzades (Figura R1.10). Aquests resultats concorden amb els observats en línies cel·lulars de sarcoma sinovial [156], càncer de fetge [125] i leucèmia crònica [261], on es van fer servir diferents molècules per inhibir la interacció de  $\beta$ -catenina amb TCF. És més, l'inhibidor PKF118-310 va provocar la mateixa reducció de l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina que la restauració de la funcionalitat d'APC a la línia APC-mutada SK-UT-1 (Figura R1.11), demostrant l'especificitat de l'inhibidor PKF118-310 per la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina.

La inhibició de la unió CBP/ $\beta$ -catenina amb l'inhibidor PRI-724, també va disminuir l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina a les línies cel·lulars de SPT analitzades, però no va provocar canvis a la localització subcel·lular de  $\beta$ -catenina (Figura R2.3). Aquests resultats, diferents dels obtinguts amb PKF118-310, es deuen al fet que el mecanisme molecular pel qual els dos inhibidors actuen sobre la via Wnt és diferent.

Un cop al nucli,  $\beta$ -catenina s'uneix a un dels dos coactivadors CBP (de l'anglès, *cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein*) o p300 (*E1A-binding protein*) per tal d'activar la transcripció de gens diana de la via Wnt. Des de fa relativament poc temps, pel seu alt grau d'homologia, es creia que CBP i p300 tenien funcions redundants, la publicació d'estudis recents [74–76,262] ha demostrat que això no és així i que cada un d'aquests coactivadors és responsable de diferents programes

transcripcionals guiant a les cèl·lules cap a la proliferació o manteniment de la pluripotència, en el cas de CBP o a iniciar la diferenciació en el cas de p300 [73,76,127,263]. En aquest context, PKF118-310 impedeix la unió de  $\beta$ -catenina amb el complex transcripcional TCF/LEF, disminuint així els nivells de  $\beta$ -catenina nuclear mentre que PRI-724 inhibeix selectivament la unió de CBP amb  $\beta$ -catenina sense alterar la interacció de  $\beta$ -catenina amb l'altre coactivador p300 [264]. Com que PRI-724 no actua sobre el complex transcripcional de TCF/LEF,  $\beta$ -catenina encara pot unir-s'hi i reclutar altres cofactors transcripcionals (diferents de CBP), i per tant els nivells de  $\beta$ -catenina nuclear no es veuen alterats. Efectes semblants als descrits també han estat reportats en el cas de l'inhibidor ICG-001 (inhibidor de CBP/ $\beta$ -catenina de primera generació), aquest inhibidor indueix l'apoptosi a través de la desregulació de la proteïna survivin, l'expressió d'aquesta proteïna es dona només a través del programa transcripcional activat pel coactivador CBP i no p300 [263]. En resum, els resultats obtinguts amb aquesta tesi són favorables al model proposat on la funció de CBP i p300 no és redundant sinó que activen programes transcripcionals diferents.

Com a resultat dels seus mecanismes d'acció, els inhibidors que actuen per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització (PKF118-310 i PRI-724) van disminuir l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina i en conseqüència l'expressió de gens diana de la via relacionats amb la proliferació cel·lular i la regulació de les fases del cicle cel·lular, com *CDC25A*, un regulador de l'entrada en apoptosi de les cèl·lules i de la progressió de les fases G1/S i G2/M del cicle cel·lular [158,265–267] i *CCND1*, un conegut gen diana de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que regula el pas de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular [122,268], però no de *C-MYC*. Aquests resultats reforcen els presentats en estudis anteriors [158] que indiquen la rellevància de *CDC25A* i no *C-MYC* com a gen diana de la via responsable de la proliferació cel·lular en SPT.

Per altra banda, la reducció de l'expressió de *CDC25A* és clínicament rellevant, ja que *CDC25A* s'ha descrit com un regulador de la proliferació cel·lular en SPT important, tant *in vitro* com *in vivo* [13,249]. Seguint en aquesta línia, la reducció de l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina provocada per PKF118-310 es va veure acompanyada d'una reducció dels nivells de mRNA de *CDC25A* i molt probablement com a conseqüència, PKF118-310 va inhibir la proliferació cel·lular per inducció de l'apoptosi a les cèl·lules de SPT analitzades. En aquest context, els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren per primera vegada els efectes antitumorals de PKF118-310 en liposarcomes, leiomiomas i fibrosarcomes, els subtipus de SPT més freqüents. PRI-724, també va reduir significativament la proliferació cel·lular a les línies de SPT estudiades provocant la mort cel·lular. Aquests resultats concorden amb els publicats per Ma *et. al* [263] on mostren com l'inhibidor ICG-001 promovia l'apoptosi en una línia cel·lular de càncer de còlon SW480. PRI-724 també va disminuir l'activitat transcripcional del complex TCF/ $\beta$ -catenina provocant un major efecte sobre l'expressió, a nivell de mRNA, de *CDC25A* que de *CCND1* a totes les línies analitzades a excepció d'una, la línia de leiomioma SK-UT-1. Aquesta mateixa línia cel·lular va ser una de les més resistents als efectes antiproliferatius de PRI-724. Finalment, en aquesta tesi també es va demostrar que el silenciament de *CDC25A* provocava una disminució de la proliferació cel·lular degut majoritàriament a un augment de la fracció subG1 i l'arrest de les cèl·lules en la fase G1 i que en restaurar l'expressió de *CDC25A* també ho feia la proliferació cel·lular, reforçant els resultats obtinguts amb els

## DISCUSSIÓ

inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que actuen per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització.

La capacitat de la via Wnt/ $\beta$ -catenina per establir relacions d'interacció amb altres vies de senyalització, fomentant mecanismes compensatoris els quals contribueixen a l'expressió de gens diana de la via malgrat la inhibició d'aquesta, es coneix des de fa temps. I és precisament per aquestes interaccions amb altres vies de senyalització, que poden activar mecanismes o vies alternatives, que estratègies terapèutiques basades únicament en la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina tenen una alta probabilitat de fracassar. Per això, en aquest sentit, es considera que la millor opció terapèutica és la combinació d'inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb els agents quimioterapèutics utilitzats habitualment en el maneig dels SPT, amb l'objectiu de millorar les taxes de resposta i retardar l'aparició de resistència a aquests tractaments. En aquesta tesi l'avaluació de l'efecte de la combinació dels dos inhibidors que actuen per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització amb els quimioterapèutics doxorubicina i trabectedina va mostrar un efecte sinèrgic amb tots dos inhibidors. És més, l'inhibidor PRI-724 el qual es troba en assaig clínic per altres neoplàsies [73,263] és el que va obtenir millors resultats a l'hora d'inhibir la proliferació cel·lular en les línies de SPT. Per aquest motiu, l'ús d'aquest inhibidor en combinació amb les teràpies que reben els pacients de SPT actualment milloraria l'acció antitumoral d'aquestes. De fet, s'ha reportat que els inhibidors de la interacció CBP/ $\beta$ -catenina són capaços de millorar la toxicitat associada a la quimioteràpia en models preclínics [78]. En conjunt, aquests resultats proporcionen les bases moleculars de l'efecte antitumoral dels inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en combinació amb quimioteràpia en SPT i recolzen la realització d'estudis d'efectivitat i toxicitat en models *in vivo*. D'aquesta manera, es completarien els estudis preclínics necessaris per a l'avaluació en un futur d'aquestes combinacions de fàrmacs en assaigs clínics fase I/II en SPT.

Observant tota la caracterització realitzada en les línies cel·lulars representatives dels diferents tipus de sarcomes (Figura R3.12) semblaria que aquesta intervenció farmacològica proposada no seria específica d'un subtipus de sarcoma en concret ja que els diferents subtipus es podrien beneficiar d'aquestes teràpies i, com es descriu el l'apartat següent les alteracions moleculars de la via són també un fenomen transversal.

### **Components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors predictius.**

Alteracions moleculars en determinats components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43, un mecanisme de regulació negatiu de la via Wnt/ $\beta$ -catenina que controla l'abundància dels receptors de membrana, poden ser utilitzades com a biomarcadors predictius de resposta a determinats inhibidors de la via, com als inhibidors de l'activitat enzimàtica de Porcupina [53,92,106,108–110,224]. Les proteïnes RNF43 i ZNRF3 que són unes ligases que ubiquitinen als receptors Frizzled provocant la seva endocitosis i reduint així la quantitat de receptors presents a la membrana cel·lular i en conseqüència la sensibilitat als lligands Wnt. Les proteïnes RSPO2 i RSPO3 són unes proteïnes que en ser secretades s'uneixen a RNF43 i ZNRF3 induint la seva autoubiquitinació de manera que disminueixen la presència de RNF43 i ZNRF3 restaurant la quantitat de receptors Frizzleds a la membrana cel·lular [50–52,269]. En concret, s'ha descrit que mutacions

en *RNF43* i *ZNRF3* que provoquen una pèrdua de funció d'aquestes proteïnes i translocacions en els gens *RSPO2* i *RSPO3* (EIF3E(e1)-*RSPO2*(e2), EIF3E(e1)-*RSPO2*(e3), PTPRK(e1)-*RSPO3*(e2) i PTPRK(e7)-*RSPO3*(e2)) que provoquen una elevada expressió d'aquestes proteïnes podrien ser biomarcadors predictius de resposta a l'inhibidor LGK974, un inhibidor de Porcupina que actualment es troba en fase I d'assaig clínic per a diferents tumors sòlids [106,110]. En els darrers anys s'han publicat diversos treballs on s'estudia la presència d'aquestes mutacions en diferents tipus de neoplàsies [91,99,270]. Però, a part d'un treball publicat el 2013, on s'identifica la presència d'una fusió entre els gens *EIF3E* i *RSPO2* en una línia cel·lular de tumor de maligne de la beina del nervi perifèric amb elevada expressió de *RSPO2* [102], en SPT no hi ha avui en dia estudis on s'abordi aquesta qüestió.

En aquesta tesi es va avaluar l'expressió a nivell de mRNA dels 4 components implicats en aquest mecanisme de regulació negatiu de la via Wnt, tant en mostres tumorals de pacients amb SPT com en línies cel·lulars i cultius primaris. A falta de confirmar la presència de mutacions en *RNF43/ZNRF3* o translocacions en els gens *RSPO2/RSPO3* que provoquin la seva amplificació, a nivell de mRNA tant les mostres tumorals de pacients com les línies cel·lulars de SPT analitzades presentaven infraexpressió dels gens *RNF43* i *ZNRF3* i sobreexpressió dels gens *RSPO2* i *RSPO3*, suggerint la implicació d'aquest eix en l'activació de la via Wnt en SPT i la possibilitat que aquests canvis observats a nivell d'expressió de mRNA poguessin ser un subrogat d'aquestes alteracions moleculars, les quals es podrien utilitzar com a biomarcadors de resposta a inhibidors de Porcupina com LGK974.

Per aquest motiu es va dur a terme l'estudi de la resposta de les línies cel·lulars de SPT a l'inhibidor de Porcupina, LGK974. Tot i que es va observar la infraexpressió dels gens *RNF43* i *ZNRF3* en les línies estudiades, l'inhibidor LGK974 va reduir la viabilitat de la majoria de les línies cel·lulars amb uns valors d'IC<sub>50</sub> superiors a 10 µM. A més l'efecte antitumoral no va millorar augmentant el temps d'exposició de les cèl·lules a l'inhibidor, mostrant uns efectes sobre la proliferació cel·lular molt moderats. Referent a això, s'ha demostrat que efectes d'aquest inhibidor sobre les funcions cel·lulars a concentracions superiors a 1 µM, no són degudes al seu efecte específic sobre la producció de lligands Wnt, pel que són considerats efectes tòxics inespecífics o *off-target*. Així mateix, l'inhibidor no va disminuir l'activitat transcripcional de la via Wnt a cap de les concentracions estudiades. Aquests resultats desalentadors en un inici concorden amb els resultats publicats per Hayashi *et. al* (2017) on estudien l'efecte de l'inhibidor en la prevenció i el maneig de les metàstasis en sarcomes d'Ewing (SE). En aquest treball es demostra que tot i que l'inhibidor no té cap efecte sobre la proliferació cel·lular, inhibeix la invasió i la migració de les cèl·lules de SE. *In vivo* el tractament amb LGK974 en monoteràpia va ser capaç de retardar l'aparició de metàstasi als pulmons sense afectar al creixement del tumor primari, indicant que la inhibició de les metàstasis es produeix per l'efecte de l'inhibidor sobre l'expressió de gens que no estan relacionats amb la proliferació [225]. Serà molt interessant en un futur poder dur a terme estudis *in vivo* amb altres subtipus de sarcomes per avaluar l'efecte antimetastàtic de l'inhibidor LGK974 observat per Hayashi *et. al* en SE. A més, per apropar els resultats obtinguts *in vitro* a estudis preclínics i a la realitat de la pràctica clínica, l'ús de models animals més pròxims als pacients, com és el cas dels xenografts derivats de tumors de pacients (PDX) o els organoides derivats de cèl·lules

## DISCUSSIÓ

tumorals de pacients, ens ajudaran a testar l'efecte de LGK974 sobre el creixement i disseminació dels tumors.

En resum, un cop determinada la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sèrie representativa de SPT, tant per expressió de components clau de la via com per l'efecte de la inhibició de la via en la proliferació cel·lular, ja sigui utilitzant molècules inhibidores com a prova de concepte (PKF118-310) o inhibidors més avançats en assaigs clínics (PRI-724). El model proposat en aquesta tesi és el següent: la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina redueix la proliferació cel·lular en disminuir els nivells de  $\beta$ -catenina nuclear i l'activitat transcripcional mediada per  $\beta$ -catenina que regula l'expressió de gens relacionats amb la proliferació cel·lular, en concret l'expressió de *CDC25A*. O sense alterar la presència de  $\beta$ -catenina al nucli però afavorint la seva unió amb altres coactivadors, reguladors de programes transcripcionals no relacionats amb la proliferació cel·lular (Figura D1).

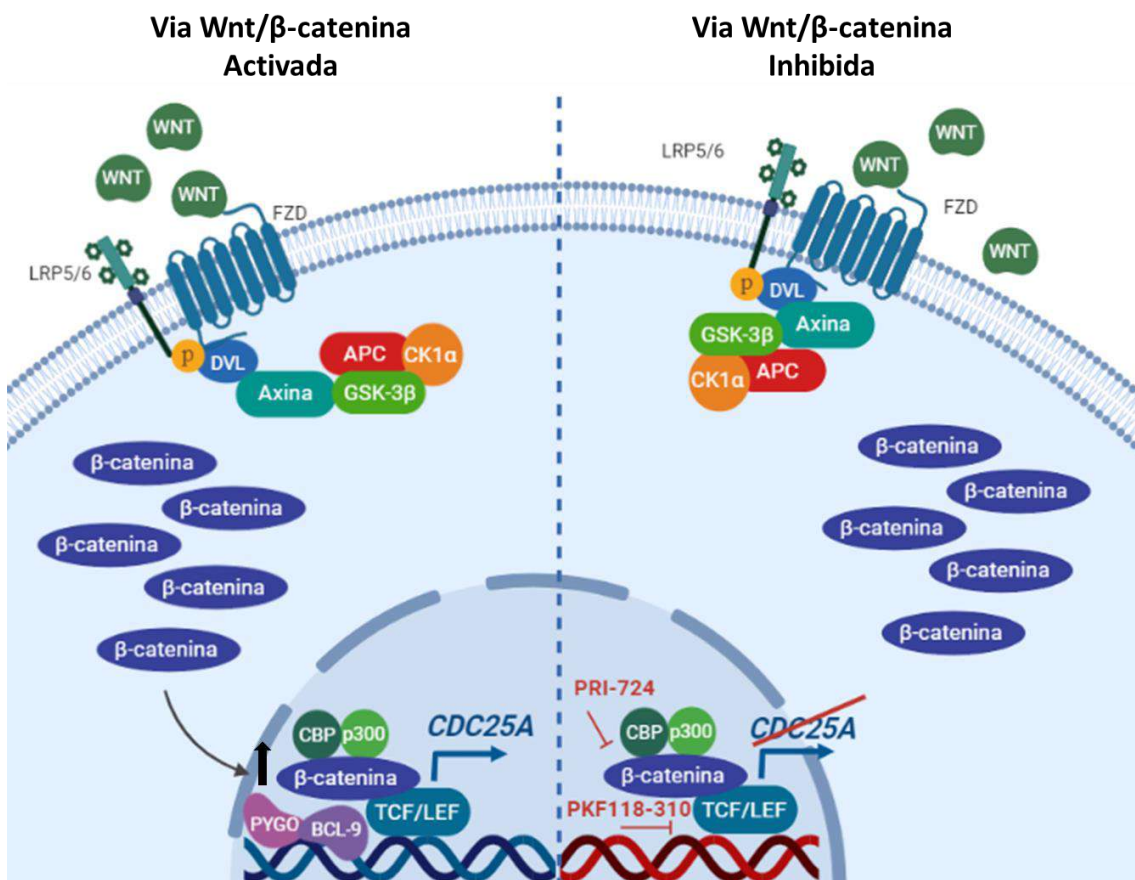


Figura D1. Model proposat a partir de l'estudi de la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi i la seva inhibició com a possible estratègia terapèutica en sarcomes de parts toves.

Per altra banda, així com en altres neoplàsies on la via Wnt/ $\beta$ -catenina està implicada, la seva activació es dona a través de mutacions en components clau de la via com *APC* o *CTNNB1* (Figura D2 A) en sarcomes de parts toves la seva implicació es deu a altres mecanismes com l'activació autocrina. Determinats components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina tenen el seu paper com a biomarcadors, com és el cas de *CDC25A* que seria un biomarcador de l'activació de la via fàcilment avaluable en mostres de pacients de SPT (Figura D2 B). O els components de l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43: *RNF43*, *ZNRF3*, *RSPO2* i *RSPO3* on els nivells d'expressió de mRNA observats podrien ser un subrogat

de les alteracions moleculars utilitzades com a biomarcadors de predicció de resposta a determinats inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina (Figura D2 C i D).

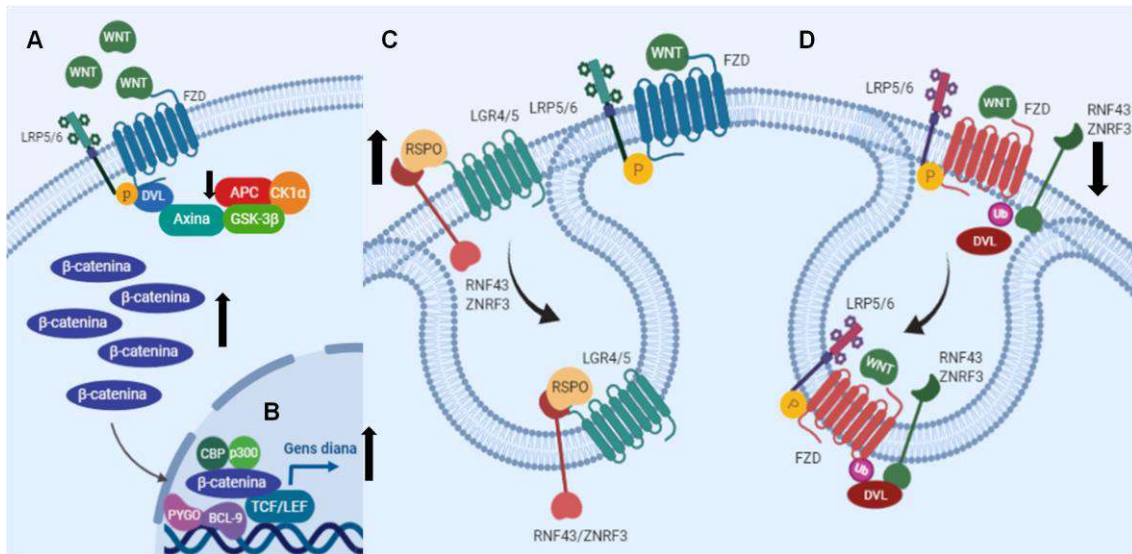


Figura D2. Model proposat a partir de l'estudi de la implicació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en la sarcomagènesi i de l'ús d'alguns dels seus components com a biomarcadors predictius en sarcomes de parts toves.

### Components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a biomarcadors predictius i pronòstics en càncer de pròstata avançat.

En càncer de pròstata, igual que en sarcomes, l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina poques vegades es dona a causa de mutacions en  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) o *APC* [201,208]. Per altra banda, la relació que hi ha entre la via de senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina i la via del receptor d'andrògens, tant a l'inici com al llarg de la progressió del càncer de pròstata, es coneix des de fa temps. En línia amb això últim, s'ha descrit que  $\beta$ -catenina és capaç d'interaccionar amb el receptor d'andrògens [201–203] i com ja s'ha comentat anteriorment a la introducció, que la unió del receptor d'andrògens amb  $\beta$ -catenina afavoreix a la localització i estabilització d'aquesta al nucli [271,272]. Per una altra banda s'ha descrit que la sobreexpressió del receptor d'andrògens potencia l'expressió de gens de la via Wnt/ $\beta$ -catenina promotors de metàstasi, però que també redueix l'expressió de gens diana de la via com són *AXIN2* i *LEF1* [273]. De manera que s'estableix una espècie de relació de competència entre el complex de transcripció TCF/LEF i el receptor d'andrògens per unir-se a  $\beta$ -catenina [201,208]. En un estudi publicat recentment s'ha vist que el tractament amb ADT o enzalutamida (un inhibidor de la via del receptor d'andrògens) afecta a aquesta relació de competència afavorint la interacció TCF/ $\beta$ -catenina, és a dir, promovent l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina (203) i que per tant, la inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina millora la sensibilitat al tractament amb enzalutamida en models xenografts de càncer de pròstata hormono-resistent.

La necessitat de trobar nous biomarcadors predictius i/o pronòstics en el càncer de pròstata es basa en el fet que, en un estat més primerenc de la malaltia quan aquesta està localitzada (càncer de pròstata localitzat), tractaments com la prostatectomia radical seguida o no de radioteràpia poden arribar a curar la malaltia. Tot i que la implementació a finals de 1990 de l'ús dels nivells de PSA (de l'anglès *prostate specific*

## DISCUSSIÓ

*antigen*) en sang com a test diagnòstic, juntament amb l'examen de la mida de la pròstata a través del tacte rectal, ha suposat una millora significativa en el diagnòstic precoç d'aquests pacients, el PSA no acaba de ser un biomarcador fiable. En aquest sentit, el seu ús en els diferents estadis de la malaltia ha estat altament discutit per diversos motius. En primer lloc es considera un biomarcador molt inespecífic, ja que així com és molt específic pel teixit prostàtic no és capaç de diferenciar casos d'hiperplàsia benigne (inflamació de la pròstata per altres motius diferents del càncer) del càncer de pròstata, donant falsos positius. En segon lloc, aquesta alta taxa de falsos positius, ha provocat la realització de nombroses biòpsies innecessàries o el tractament de pacients quan realment no era necessari [210–212]. Paradòxicament, no tots els càncers de pròstata debuten amb un augment dels nivells de PSA en sang, per tant malgrat l'alta taxa de falsos positius, encara hi ha pacients amb càncer de pròstata que s'escapen a aquest biomarcador [213]. Finalment, aquest biomarcador no és útil per predir l'agressivitat tumoral, la supervivència o la resposta als tractaments actuals pel càncer de pròstata avançat. Tot això fa que la investigació se centri des dels últims anys en identificar nous biomarcadors que puguin complementar o millorar l'ús del PSA.

En aquest sentit, d'ençà que en el 2008 van sorgir diversos estudis demostrant que diferents tumors podien alliberar al torrent sanguini diferents grups de miRNAs i que aquests miRNAs podien relacionar-se amb l'agressivitat tumoral o la resposta a diferents teràpies [274–276], molts esforços dels investigadors en el camp del càncer de pròstata avançat s'han centrat en la identificació d'aquests grups de miRNAs en diferents mostres de líquids corporals, ja no només en sang, i en diferents estadis de la malaltia per tal d'identificar biomarcadors predictius i pronòstics més fiables que el PSA. Aquests esforços s'han traduït en la publicació de nombrosos articles i revisions relacionats amb aquest tema [277–284].

En línia amb això últim, aquesta tesi va abordar l'estudi dels miRNAs implicats en la regulació de les vies de senyalització del receptor d'andrògens i de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, vista la relació que tenen les dues vies, per avaluar quins d'aquests miRNAs es trobaven diferencialment expressats en els dos grups de pacients: hormonosenibles i hormonoinsensibles. Per això es van obtenir mostres tumorals procedents de prostatectomia radical, en el cas dels pacients hormonosenibles i d'RTUs, en els pacients hormonoinsensibles. La majoria dels estudis centrats en la identificació de biomarcadors que hi ha publicats es basen en la comparativa de mostres procedents de prostatectomia radical (grup hormonosenible) i de metàstasis òssies (grup hormonoinsensible) [285–288]. En aquesta tesi es va obtenir mostres tumorals a partir de les RTUs a les que se sotmeten pacients hormonoinsensibles per pal·liar un dels símptomes associats a la malaltia que és l'obstrucció de la uretra degut al creixement del tumor present a la pròstata, el qual podria ser un model més acurat que les metàstasis òssies per a l'estudi comparatiu que es volia dur a terme.

Els resultats obtinguts amb l'anàlisi d'arrays d'expressió, van mostrar que entre els dos grups de pacients hi havia 97 parelles de miRNAs-mRNAs relacionades amb la via Wnt/ $\beta$ -catenina i 21 parelles de miRNAs-mRNAs relacionades amb la via del receptor d'andrògens, en tots dos casos els mRNAs regulats pels corresponents miRNAs també es trobaven diferencialment expressats en els dos grups de pacients. L'estudi de la



implicació dels miRNAs en la regulació de les dues vies de senyalització, va donar lloc a la selecció dels miRNAs hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p perquè participen en la regulació de components de les dues vies, en concret el miRNA hsa-miRNA-205-5p, regula tant al receptor d'andrògens com a un dels lligands Wnt, *WNT-5A* i el miRNA hsa-miR-1301-3p regula també al receptor d'andrògens i a un antagonista de la via Wnt, *SFRP1* per ser validats mitjançant una q-rt-PCR en la mateixa sèrie de pacients, obtenint resultats equiparables amb ambdues tècniques.

Aquests resultats, per primera vegada donen suport a la implicació del miRNA hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p en l'aparició de la resistència a la deprivació androgènica. A la literatura s'ha descrit el paper que té el miRNA hsa-miR-205-5p en càncer, en concret en càncer de pròstata [238–240] però fins al moment no s'ha descrit el seu paper en l'aparició de la resistència a la deprivació androgènica. En concordança amb els resultats obtinguts en aquesta tesi alguns articles han relacionat alts nivells del lligand regulat pel miRNA hsa-miR-205-5p, *WNT-5A*, amb l'aparició de resistències a diferents tipus de teràpies i a diferents tipus de neoplàsies [289], però no en càncer de pròstata.

En càncer de pròstata s'ha descrit que el miRNA hsa-miR-1301-3p regula l'expressió tant de *SFRP1* com de *GSK-3 $\beta$*  [241], i els seus nivells s'han relacionat amb l'increment de l'expressió de gens associats amb les cèl·lules mare tumorals i a l'expansió d'aquestes a través de l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina, però el seu paper en la resistència a la deprivació androgènica encara està per clarificar.

A la literatura s'ha descrit que la via Wnt/ $\beta$ -catenina està implicada en l'aparició de la resistència a la teràpia amb antiandrògens, a causa de la seva interacció amb la via de l'AR, de la qual encara hi ha molts aspectes a aclarir. Estudis publicats proposen que amb la presència d'andrògens, la via de l'AR inhibeix la via Wnt/ $\beta$ -catenina mentre que la via Wnt/ $\beta$ -catenina activa la via de l'AR. I que quan disminueixen els nivells d'andrògens, gràcies a la teràpia, la via de l'AR deixa d'inhibir la via Wnt/ $\beta$ -catenina i passa a promoure la seva activació, mentre que la via Wnt/ $\beta$ -catenina segueix afavorint a l'activació de la via de l'AR. De manera que les dues vies de senyalització activen de forma conjunta la transcripció de gens relacionats amb la progressió tumoral, independentment d'andrògens. I és més, hi ha estudis que demostren que la combinació d'inhibidors de la via Wnt/ $\beta$ -catenina en combinació amb l'enalutamida (un agent antiandrogènic) restaura la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a la teràpia amb antiandrògens. El model que es proposa en aquesta tesi, és el mostrat en la figura D3, durant l'aparició de la resistència a la teràpia hormonal, els miRNAs hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p podrien jugar algun paper sigui com a biomarcadors predictius o pronòstics o com a possibles dianes terapèutiques, encara per determinar, a través de la seva regulació de components tant de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a través de la seva regulació del mateix AR. Amb assajos addicionals sobre un grup de mostres independent es podran validar aquestes troballes i les biòpsies líquides seriades, juntament amb les dades clíniques dels pacients en quant a resposta a tractaments i supervivència, ajudaran a esclarir la revellància clínica d'aquests miRNAs.

## DISCUSSIÓ

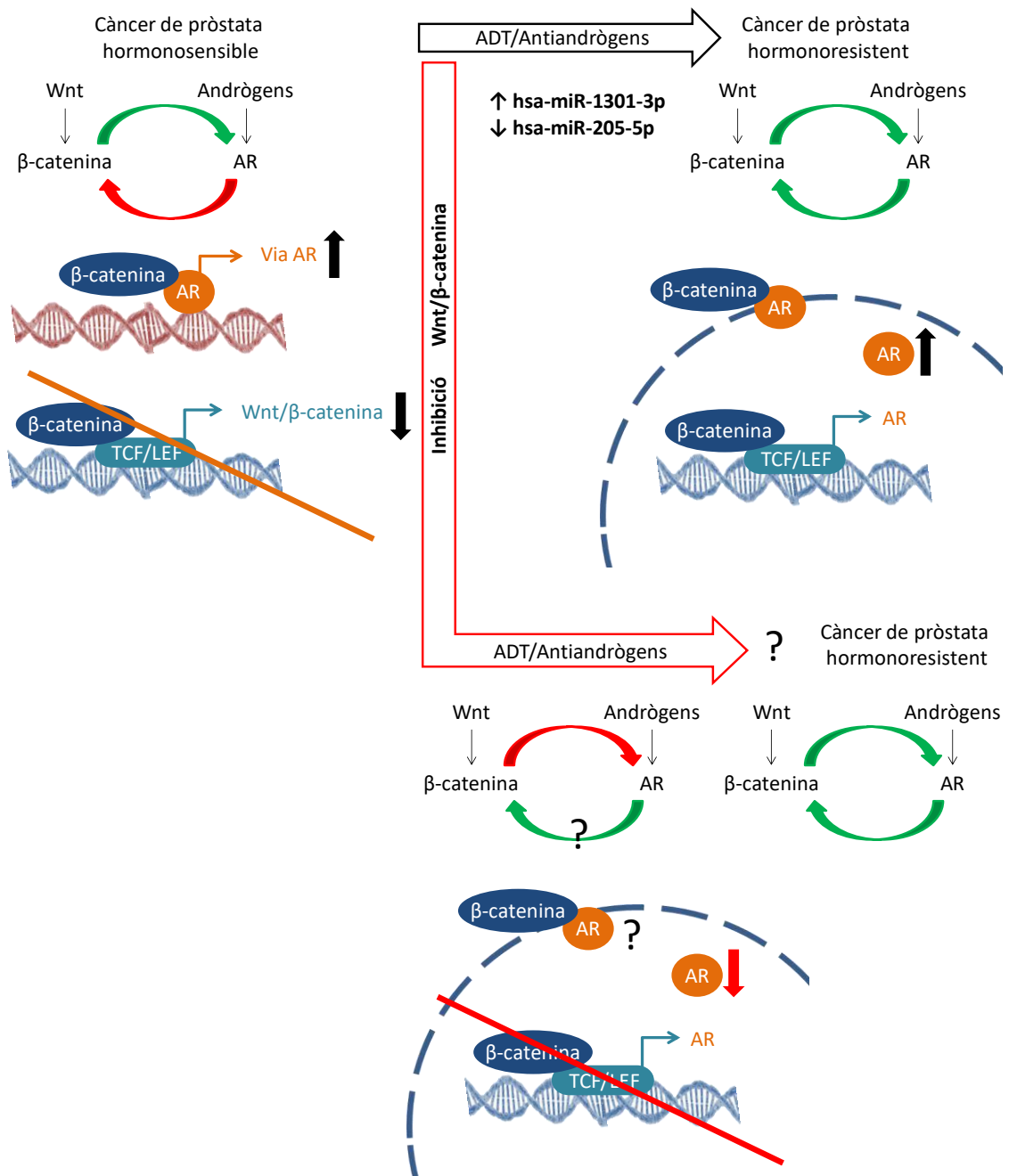


Figura D3. Model proposat a partir de l'estudi de components de la via Wnt/β-catenina com a possibles biomarcadors predictius i/o pronòstics en càncer de pròstata avançat.

# **VI. CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONS

1. La presència de  $\beta$ -catenina activada, tant citoplasmàtica com nuclear, juntament amb els alts nivells d'expressió de gens diana de la via com *CDC25A*, intrínsecs de les línies cel·lulars i cultius primaris de sarcomes de parts toves, demostra que l'activació de la via Wnt/ $\beta$ -catenina és freqüent en sarcomes de parts toves, independentment del subtipus histològic.
2. La inhibició de la via Wnt/ $\beta$ -catenina amb els inhibidors PKF118-310 i PRI-724, que actuen per sota de  $\beta$ -catenina en la cascada de senyalització, indueix considerables efectes antiproliferatius en models cel·lulars de sarcoma de parts toves, que s'associen preferentment a una disminució de l'expressió de *CDC25A*.
3. La combinació d'aquests inhibidors amb els quimioterapèutics doxorubicina i trabectedin potencia de manera sinèrgica els seus efectes antiproliferatius, donant suport al bloqueig de la via Wnt/ $\beta$ -catenina com a potencial estratègia terapèutica per a sarcomes de parts toves.
4. Els nivells alts d'expressió de *CDC25A* en mostres tumorals de pacients en comparació amb mostres de teixit no tumoral, juntament amb el paper que juga com a mediador de la proliferació cel·lular, demostren la rellevància clínica de *CDC25A* en aquests tumors sòlids.
5. La desregulació de components en l'eix R-spondin/Lgr5/Rnf43: *RNF43/ZNRF3* i *RSPO2/RSPO3*, observada tant en línies cel·lulars com en mostres tumorals de pacients, suggereix que aquest mecanisme regulador es troba alterat, representant un potencial biomarcador de resposta per a futures estratègies terapèutiques, com la inhibició de Porcupina, en alguns subtipus de sarcomes de parts toves.
6. En càncer de pròstata avançat, els miRNAs: hsa-miR-205-5p i hsa-miR-1301-3p, podrien estar implicats en la resistència al tractament hormonal, a través de la regulació de components de la via Wnt/ $\beta$ -catenina i del receptor d'andrògens.

# **VII. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Alonso L, Fuchs E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* United States; 2003;17:1189–200.
2. Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res.* United States; 2005;306:357–63.
3. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* United States; 1982;31:99–109.
4. Baker NE. Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J.* 1987;6:1765–73.
5. McMahon AP, Moon RT. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell.* United States; 1989;58:1075–84.
6. Mlodzik M. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet.* England; 2002;18:564–71.
7. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* England; 2012;13:767–79.
8. Monga SP.  $\beta$ -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2015;148:1294–310.
9. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* United States; 2005;19:877–90.
10. Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.* United States; 2004;351:657–67.
11. Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2013;19:634–64.
12. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:513–32.
13. Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:141–9.
14. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* United States; 2006;127:469–80.
15. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17:9–26.

16. Katoh M, Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40:587–606.
17. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36:1461–73.
18. Nagafuchi A, Takeichi M. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul*. 1989;1:37–44.
19. Jansen SR, Van Ziel AM, Baarsma HA, Gosens R.  $\beta$ -Catenin regulates airway smooth muscle contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. United States; 2010;299:L204-14.
20. Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:a003053.
21. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. United States; 1997;90:871–82.
22. Xing Y, Takemaru K-I, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, et al. Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure*. 2008;16:478–87.
23. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. United States; 2004;20:781–810.
24. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. England; 2009;10:468–77.
25. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. England; 2006;25:7482–91.
26. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*. United States; 1996;10:1443–54.
27. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*. 2002;16:1066–76.
28. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. United States; 2003;5:367–77.
29. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. England; 2009;10:276–86.
30. Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE*. United States; 2005;2005:cm1.

## BIBLIOGRAFIA

31. Teo J-L, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev.* Netherlands; 2010;62:1149–55.
32. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol.* United States; 2005;12:364–71.
33. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* England; 2003;423:448–52.
34. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell.* United States; 2006;11:791–801.
35. Rios-Esteves J, Resh MD. Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. *Cell Rep.* 2013;4:1072–81.
36. Rios-Esteves J, Haugen B, Resh MD. Identification of key residues and regions important for porcupine-mediated Wnt acylation. *J Biol Chem.* 2014;289:17009–19.
37. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell.* United States; 2006;125:509–22.
38. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell.* United States; 2006;125:523–33.
39. Yu J, Chia J, Canning CA, Jones CM, Bard FA, Virshup DM. WLS retrograde transport to the endoplasmic reticulum during Wnt secretion. *Dev Cell.* United States; 2014;29:277–91.
40. Herr P, Basler K. Porcupine-mediated lipidation is required for Wnt recognition by Wls. *Dev Biol.* United States; 2012;361:392–402.
41. Najdi R, Proffitt K, Sprowl S, Kaur S, Yu J, Covey TM, et al. A uniform human Wnt expression library reveals a shared secretory pathway and unique signaling activities. *Differentiation.* 2012;84:203–13.
42. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol.* England; 2012;14:1036–45.
43. McGough IJ, Vincent J-P. Exosomes in developmental signalling. *Development.* England; 2016;143:2482–93.
44. Saha S, Aranda E, Hayakawa Y, Bhanja P, Atay S, Brodin NP, et al. Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and



- enhance survival after radiation injury. *Nat Commun.* 2016;7:13096.
45. Farin HF, Jordens I, Mosa MH, Basak O, Korving J, Tauriello DVF, et al. Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature.* England; 2016;530:340–3.
  46. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* United States; 2017;169:985–99.
  47. Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther.* England; 2013;138:66–83.
  48. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal.* United States; 2008;1:re9.
  49. de Lau WBM, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family. *Genome Biol.* 2012;13:242.
  50. Jin Y-R, Yoon JK. The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44:2278–87.
  51. Hao H-X, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature.* England; 2012;485:195–200.
  52. Koo B-K, Spit M, Jordens I, Low TY, Stange DE, van de Wetering M, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature.* England; 2012;488:665–9.
  53. Hao H-X, Jiang X, Cong F. Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. *Cancers (Basel).* 2016;8.
  54. Jiang X, Charlat O, Zamponi R, Yang Y, Cong F. Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* United States; 2015;58:522–33.
  55. Gasiorowski JZ, Dean DA. Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliv Rev.* Netherlands; 2003;55:703–16.
  56. Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol.* England; 1998;8:181–90.
  57. Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* England; 1999;11:233–40.
  58. Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR. Specific Armadillo repeat sequences facilitate  $\beta$ -catenin nuclear transport in live cells via

## BIBLIOGRAFIA

- direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J. Biol. Chem.* 2016. page 4342.
59. Wälde S, Thakar K, Hutten S, Spillner C, Nath A, Rothbauer U, et al. The nucleoporin Nup358/RanBP2 promotes nuclear import in a cargo- and transport receptor-specific manner. *Traffic.* England; 2012;13:218–33.
  60. Hamada M, Haeger A, Jeganathan KB, van Ree JH, Malureanu L, Wälde S, et al. Ran-dependent docking of importin-beta to RanBP2/Nup358 filaments is essential for protein import and cell viability. *J Cell Biol.* 2011;194:597–612.
  61. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Targeting the  $\beta$ -catenin nuclear transport pathway in cancer. *Semin Cancer Biol.* England; 2014;27:20–9.
  62. Prieve MG, Guttridge KL, Munguia J, Waterman ML. Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4819–32.
  63. Bowman A, Nusse R. Location, location, location: FoxM1 mediates  $\beta$ -catenin nuclear translocation and promotes glioma tumorigenesis. *Cancer Cell.* United States; 2011;20:415–6.
  64. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu W-T, Lee H-T, Colman H, et al. FoxM1 promotes  $\beta$ -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2011;20:427–42.
  65. Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4807–18.
  66. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* England; 1996;382:638–42.
  67. Henderson BR, Galea M, Schuechner S, Leung L. Lymphoid enhancer factor-1 blocks adenomatous polyposis coli-mediated nuclear export and degradation of beta-catenin. Regulation by histone deacetylase 1. *J Biol Chem.* United States; 2002;277:24258–64.
  68. Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci.* England; 2006;119:1453–63.
  69. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* 2004;18:2225–30.
  70. Townsley FM, Cliffe A, Bienz M. Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat Cell Biol.* England; 2004;6:626–33.

71. Townsley FM, Thompson B, Bienz M. Pygopus residues required for its binding to Legless are critical for transcription and development. *J Biol Chem. United States*; 2004;279:5177–83.
72. Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell. United States*; 1998;93:361–72.
73. Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, Taira K, Chiu R, Livingston DM, et al. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature. England*; 1998;393:284–9.
74. Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM, et al. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev. 2000*;14:272–7.
75. Roth J-F, Shikama N, Henzen C, Desbaillets I, Lutz W, Marino S, et al. Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *EMBO J. 2003*;22:5186–96.
76. Rebel VI, Kung AL, Tanner EA, Yang H, Bronson RT, Livingston DM. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2002*;99:14789–94.
77. Lukaszewicz AI, McMillan MK, Kahn M. Small molecules and stem cells. Potency and lineage commitment: the new quest for the fountain of youth. *J Med Chem. 2010*;53:3439–53.
78. Kahn M. Symmetric division versus asymmetric division: a tale of two coactivators. *Future Med Chem. England*; 2011;3:1745–63.
79. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science. United States*; 1993;262:1731–4.
80. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science. United States*; 1993;262:1734–7.
81. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science. United States*; 1991;253:665–9.
82. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science. United States*; 1991;253:661–5.
83. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012*;4.
84. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer. England*; 2008. page 387–98.

## BIBLIOGRAFIA

85. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/colon carcinoma. *Science*. United States; 1997;275:1784–7.
86. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. United States; 1997;275:1787–90.
87. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. United States; 1996;87:159–70.
88. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*. England; 2006;25:7531–7.
89. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. Netherlands; 2003;1653:1–24.
90. Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, Maitra A, de Wilde RF, Wood LD, et al. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:21188–93.
91. Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature*. 2012;488:660–4.
92. Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet*. 2014;46:1264–6.
93. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, Allan PE, et al. RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. *J Pathol*. England; 2013;229:469–76.
94. Jiao Y, Yonescu R, Offerhaus GJA, Klimstra DS, Maitra A, Eshleman JR, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic neoplasms with acinar differentiation. *J Pathol*. 2014;232:428–35.
95. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin W-C, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun*. 2015;6:6744.
96. Jo YS, Kim MS, Lee JH, Lee SH, An CH, Yoo NJ. Frequent frameshift mutations in 2 mononucleotide repeats of RNF43 gene and its regional heterogeneity in gastric and colorectal cancers. *Hum Pathol*. United States; 2015;46:1640–6.
97. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HHN, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*. United States; 2014;46:573–82.
98. Sekine S, Yamashita S, Tanabe T, Hashimoto T, Yoshida H, Taniguchi H, et al.

- Frequent PTPRK-RSPO3 fusions and RNF43 mutations in colorectal traditional serrated adenoma. *J Pathol. England*; 2016;239:133–8.
99. Sekine S, Ogawa R, Hashimoto T, Motohiro K, Yoshida H, Taniguchi H, et al. Comprehensive characterization of RSPO fusions in colorectal traditional serrated adenomas. *Histopathology. England*; 2017;71:601–9.
  100. Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J-M, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015;161:1215–28.
  101. Mesci A, Lucien F, Huang X, Wang EH, Shin D, Meringer M, et al. RSPO3 is a prognostic biomarker and mediator of invasiveness in prostate cancer. *J Transl Med*. 2019;17:125.
  102. Watson AL, Rahrmann EP, Moriarity BS, Choi K, Conboy CB, Greeley AD, et al. Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling drives human schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance. *Cancer Discov*. 2013;3:674–89.
  103. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan C-W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*. 2009;5:100–7.
  104. Janku F, Connolly R, LoRusso P, de Jonge M, Vaishampayan U, Rodon J, et al. Abstract C45: Phase I study of WNT974, a first-in-class Porcupine inhibitor, in advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther [Internet]*. 2015;14:C45 LP-C45. Available from: [http://mct.aacrjournals.org/content/14/12\\_Supplement\\_2/C45.abstract](http://mct.aacrjournals.org/content/14/12_Supplement_2/C45.abstract)
  105. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2018;62:50–60.
  106. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:20224–9.
  107. Rodon J, Argilés G, Connolly RM, Vaishampayan U, Jonge M de, Garralda E, et al. Abstract CT175: Biomarker analyses from a phase I study of WNT974, a first-in-class Porcupine inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *Cancer Res [Internet]*. 2018;78:CT175 LP-CT175. Available from: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13\\_Supplement/CT175.abstract](http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13_Supplement/CT175.abstract)
  108. Boone JD, Arend RC, Johnston BE, Cooper SJ, Gilchrist SA, Oelschlager DK, et al. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in primary ovarian cancer with the porcupine inhibitor WNT974. *Lab Invest. United States*; 2016;96:249–59.
  109. Madan B, Ke Z, Harmston N, Ho SY, Frois AO, Alam J, et al. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene*. 2016;35:2197–207.

## BIBLIOGRAFIA

110. Jiang X, Hao H-X, Growney JD, Woolfenden S, Bottiglio C, Ng N, et al. Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:12649–54.
111. Ng M, Tan DSP, Subbiah V, Weekes CD, Teneggi V, Diermayr V, et al. First-in-human phase 1 study of ETC-159 an oral PORCN inhibitor in patients with advanced solid tumours. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2017;35:2584. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.2584](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.2584)
112. Proffitt KD, Virshup DM. Precise regulation of porcupine activity is required for physiological Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2012;287:34167–78.
113. Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. France; 2019;110:473–81.
114. Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. England; 2009;461:614–20.
115. Gunaydin H, Gu Y, Huang X. Novel binding mode of a potent and selective tankyrase inhibitor. *PLoS One*. 2012;7:e33740.
116. Chen W, Chen M, Barak LS. Development of small molecules targeting the Wnt pathway for the treatment of colon cancer: a high-throughput screening approach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G293-300.
117. Lu J, Ma Z, Hsieh J-C, Fan C-W, Chen B, Longgood JC, et al. Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:3825–7.
118. Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov*. England; 2012;11:923–36.
119. Wang W, Li N, Li X, Tran MK, Han X, Chen J. Tankyrase Inhibitors Target YAP by Stabilizing Angiomotin Family Proteins. *Cell Rep*. 2015;13:524–32.
120. Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T. Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci*. England; 2008;99:631–7.
121. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. United States; 2002;111:241–50.
122. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. England; 1999;398:422–6.
123. Lepourcelet M, Chen Y-NP, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-

- molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*. United States; 2004;5:91–102.
124. Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AML, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS One*. 2012;7:e33976.
  125. Wei W, Chua M-S, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int J cancer*. United States; 2010;126:2426–36.
  126. Franci G, Sarno F, Nebbioso A, Altucci L. Identification and characterization of PKF118-310 as a KDM4A inhibitor. *Epigenetics*. 2017;12:198–205.
  127. Lenz H-J, Kahn M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci*. 2014;105:1087–92.
  128. Harb J, Lin P-J, Hao J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr Oncol Rep*. United States; 2019;21:12.
  129. Ko AH, Chiorean EG, Kwak EL, Lenz H-J, Nadler PI, Wood DL, et al. Final results of a phase Ib dose-escalation study of PRI-724, a CBP/beta-catenin modulator, plus gemcitabine (GEM) in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma (APC) as second-line therapy after FOLFIRINOX or FOLFOX. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2016;34:e15721–e15721. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.e15721](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e15721)
  130. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW MF. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. In: IARC Press, editor. *WHO Classif tumours soft tissue bone*. 4th ed. Lyon, France; 2013.
  131. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. England; 2018;29:iv268–9.
  132. Garcia del Muro X, de Alava E, Artigas V, Bague S, Braña A, Cubedo R, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of patients with soft tissue sarcoma by the Spanish group for research in sarcomas (GEIS). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77:133–46.
  133. Wibmer C, Leithner A, Zielonke N, Sperl M, Windhager R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. England; 2010;21:1106–11.
  134. *Adult Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version*. Bethesda (MD); 2002.

## BIBLIOGRAFIA

135. Brownstein JM, DeLaney TF. Malignant Soft-Tissue Sarcomas. *Hematol Oncol Clin North Am. United States*; 2020;34:161–75.
136. Christie-Large M, James SLJ, Tiessen L, Davies AM, Grimer RJ. Imaging strategy for detecting lung metastases at presentation in patients with soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer. England*; 2008;44:1841–5.
137. López-Pousa A, Martín Broto J, Martínez Trufero J, Sevilla I, Valverde C, Alvarez R, et al. SEOM Clinical Guideline of management of soft-tissue sarcoma (2016). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. 2016*;18:1213–20.
138. Borden EC, Baker LH, Bell RS, Bramwell V, Demetri GD, Eisenberg BL, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. United States*; 2003;9:1941–56.
139. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer. England*; 2003;3:685–94.
140. Demicco EG, Lazar AJ. Clinicopathologic considerations: how can we fine tune our approach to sarcoma? *Semin Oncol. United States*; 2011;38 Suppl 3:S3-18.
141. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell. 2017*;171:950-965.e28.
142. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet. 2010*;42:715–21.
143. Pisters PW, Leung DH, Woodruff J, Shi W, Brennan MF. Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. United States*; 1996;14:1679–89.
144. Kattan MW, Leung DHY, Brennan MF. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. United States*; 2002;20:791–6.
145. Trovik LH, Ovrebo K, Almquist M, Haugland HK, Rissler P, Eide J, et al. Adjuvant radiotherapy in retroperitoneal sarcomas. A Scandinavian Sarcoma Group study of 97 patients. *Acta Oncol. England*; 2014;53:1165–72.
146. Zagars GK, Ballo MT, Pisters PWT, Pollock RE, Patel SR, Benjamin RS, et al. Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy: an analysis of 1225 patients. *Cancer. United States*; 2003;97:2530–43.
147. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol. United States*; 2010. page 1471–4.



148. Tanaka K, Ozaki T. New TNM classification (AJCC eighth edition) of bone and soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group. *Jpn J Clin Oncol*. England; 2019;49:103–7.
149. Navarria P, Ascolese AM, Cozzi L, Tomatis S, D’Agostino GR, De Rose F, et al. Stereotactic body radiation therapy for lung metastases from soft tissue sarcoma. *Eur J Cancer*. England; 2015;51:668–74.
150. Hawkins AG, Basrur V, da Veiga Leprevost F, Pedersen E, Sperring C, Nesvizhskii AI, et al. The Ewing Sarcoma Secretome and Its Response to Activation of Wnt/beta-catenin Signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17:901–12.
151. Nielsen TO, Poulin NM, Ladanyi M. Synovial sarcoma: recent discoveries as a roadmap to new avenues for therapy. *Cancer Discov*. 2015;5:124–34.
152. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res*. United States; 2005;65:9226–35.
153. Chen C, Zhao M, Tian A, Zhang X, Yao Z, Ma X. Aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget*. 2015;6:17570–83.
154. Uren A, Wolf V, Sun Y-F, Azari A, Rubin JS, Toretsky JA. Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. United States; 2004;43:243–9.
155. Cironi L, Petricevic T, Fernandes Vieira V, Provero P, Fusco C, Cornaz S, et al. The fusion protein SS18-SSX1 employs core Wnt pathway transcription factors to induce a partial Wnt signature in synovial sarcoma. *Sci Rep*. 2016;6:22113.
156. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, et al. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene*. England; 2014;33:5006–16.
157. Barham W, Frump AL, Sherrill TP, Garcia CB, Saito-Diaz K, VanSaun MN, et al. Targeting the Wnt pathway in synovial sarcoma models. *Cancer Discov*. 2013;3:1286–301.
158. Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, et al. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/ $\beta$ -catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell*. 2011;19:601–12.
159. Pridgeon MG, Grohar PJ, Steensma MR, Williams BO. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr Osteoporos Rep*. United States; 2017;15:239–46.
160. Briski LM, Thomas DG, Patel RM, Lawlor ER, Chugh R, McHugh JB, et al. Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation in soft-tissue sarcomas: A comparative study of synovial sarcoma and leiomyosarcoma. *Rare Tumors*. 2018;10:2036361318813431.

## BIBLIOGRAFIA

161. Gibault L, Pérot G, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Terrier P, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J Pathol. England*; 2011;223:64–71.
162. Demicco EG, Maki RG, Lev DC, Lazar AJ. New therapeutic targets in soft tissue sarcoma. *Adv Anat Pathol*. 2012;19:170–80.
163. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med. United States*; 2010;16:781–7.
164. Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:541–57.
165. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell. United States*; 2011;144:646–74.
166. Padala RR, Karnawat R, Viswanathan SB, Thakkar AV, Das AB. Cancerous perturbations within the ERK, PI3K/Akt, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling network constitutively activate inter-pathway positive feedback loops. *Mol Biosyst. England*; 2017;13:830–40.
167. Zhong Z, Sepramaniam S, Chew XH, Wood K, Lee MA, Madan B, et al. PORCN inhibition synergizes with PI3K/mTOR inhibition in Wnt-addicted cancers. *Oncogene. England*; 2019;38:6662–77.
168. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10:63–89.
169. Cassinello J, Arranz JÁ, Piulats JM, Sánchez A, Pérez-Valderrama B, Mellado B, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of metastatic prostate cancer (2017). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2018;20:57–68.
170. Ferrís-i-Tortajada J, García-i-Castell J, Berbel-Tornero O, Ortega-García JA. [Constitutional risk factors in prostate cancer]. *Actas Urol Esp. Spain*; 2011;35:282–8.
171. Albright F, Stephenson RA, Agarwal N, Teerlink CC, Lowrance WT, Farnham JM, et al. Prostate cancer risk prediction based on complete prostate cancer family history. *Prostate*. 2015;75:390–8.
172. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer. United States*; 2004;101:2371–490.
173. Dagnelie PC, Schuurman AG, Goldbohm RA, Van den Brandt PA. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU Int. England*; 2004;93:1139–50.

174. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med.* United States; 1993;118:793–803.
175. Kunath F, Grobe HR, Rücker G, Motschall E, Antes G, Dahm P, et al. Non-steroidal antiandrogen monotherapy compared with luteinising hormone-releasing hormone agonists or surgical castration monotherapy for advanced prostate cancer. *Cochrane database Syst Rev.* England; 2014;CD009266.
176. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med.* United States; 2017;377:352–60.
177. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med.* 2017;377:338–51.
178. da Silva EB, da Silva Corrêa SA, de Souza Abessa DM, da Silva BFX, Rivero DHRF, Seriani R. Mucociliary transport, differential white blood cells, and cytogenotoxicity in peripheral erythrocytes in fish from a polluted urban pond. *Environ Sci Pollut Res Int.* Germany; 2018;25:2683–90.
179. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* Switzerland; 2016;70:106–19.
180. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69:428–35.
181. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* United States; 2016;40:244–52.
182. Rubin MA, Girelli G, Demichelis F. Genomic Correlates to the Newly Proposed Grading Prognostic Groups for Prostate Cancer. *Eur. Urol.* Switzerland; 2016. page 557–60.
183. Cuccurullo V, Mansi L. *AJCC Cancer Staging Handbook: from the AJCC Cancer Staging Manual (7th edition).* *Eur J Nucl Med Mol Imaging [Internet].* 2011;38:408. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1693-9>
184. Suardi N, Capitanio U, Chun FKH, Graefen M, Perrotte P, Schlomm T, et al. Currently used criteria for active surveillance in men with low-risk prostate cancer: an analysis of pathologic features. *Cancer.* United States; 2008;113:2068–72.
185. Sweeney C, Chen Y-H, Carducci MA, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger MA, et al. Impact on overall survival (OS) with chemohormonal therapy versus hormonal

## BIBLIOGRAFIA

- therapy for hormone-sensitive newly metastatic prostate cancer (mPrCa): An ECOG-led phase III randomized trial. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2014;32:LBA2–LBA2. Available from: [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.18\\_suppl.lba2](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.18_suppl.lba2)
186. James ND, Sydes MR, Mason MD, Clarke NW, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer: First overall survival results from STAMPEDE (NCT00268476). *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2015;33:5001. Available from: [https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15\\_suppl.5001](https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.5001)
  187. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. England; 2019;20:686–700.
  188. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. Switzerland; 2017;71:630–42.
  189. Parker C, Gillessen S, Heidenreich A, Horwich A. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. England; 2015;26 Suppl 5:v69-77.
  190. Arranz Arijia JÁ, Cassinello Espinosa J, Climent Durán MÁ, Rivero Herrero F. SEOM clinical guidelines for treatment of prostate cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Spanish Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. Italy; 2012;14:520–7.
  191. Chen C-L, Mahalingam D, Osmulski P, Jadhav RR, Wang C-M, Leach RJ, et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate*. 2013;73:813–26.
  192. Volante M, Tota D, Giorcelli J, Bollito E, Napoli F, Vatrano S, et al. Androgen deprivation modulates gene expression profile along prostate cancer progression. *Hum Pathol*. United States; 2016;56:81–8.
  193. Uysal-Onganer P, Kawano Y, Caro M, Walker MM, Diez S, Darrington RS, et al. Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2010;9:55.
  194. Li ZG, Yang J, Vazquez ES, Rose D, Vakar-Lopez F, Mathew P, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone. *Oncogene*. England; 2008;27:596–603.
  195. Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science*. 2015;349:1351–6.

196. Thiele S, Rauner M, Goettsch C, Rachner TD, Benad P, Fuessel S, et al. Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem.* United States; 2011;112:1593–600.
197. Gupta S, Iljin K, Sara H, Mpindi JP, Mirtti T, Vainio P, et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* United States; 2010;70:6735–45.
198. Pascal LE, Vêncio RZN, Page LS, Liebeskind ES, Shadle CP, Troisch P, et al. Gene expression relationship between prostate cancer cells of Gleason 3, 4 and normal epithelial cells as revealed by cell type-specific transcriptomes. *BMC Cancer.* 2009;9:452.
199. Zhang S, Chen L, Wang-Rodriguez J, Zhang L, Cui B, Frankel W, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am J Pathol.* 2012;181:1903–10.
200. Murillo-Garzón V, Kypta R. WNT signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* England; 2017;14:683–96.
201. Kypta RM, Waxman J. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* England; 2012;9:418–28.
202. Terry S, Yang X, Chen M-W, Vacherot F, Buttyan R. Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J Cell Biochem.* United States; 2006;99:402–10.
203. Wang G, Wang J, Sadar MD. Crosstalk between the androgen receptor and beta-catenin in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68:9918–27.
204. Truica CI, Byers S, Gelmann EP. Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res.* United States; 2000;60:4709–13.
205. Lee E, Ha S, Logan SK. Divergent Androgen Receptor and Beta-Catenin Signaling in Prostate Cancer Cells. *PLoS One.* 2015;10:e0141589.
206. Bauman TM, Vezina CM, Ricke EA, Halberg RB, Huang W, Peterson RE, et al. Expression and colocalization of  $\beta$ -catenin and lymphoid enhancing factor-1 in prostate cancer progression. *Hum Pathol.* 2016;51:124–33.
207. Li Y, Wang L, Zhang M, Melamed J, Liu X, Reiter R, et al. LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion. *Cancer Res.* 2009;69:3332–8.
208. Yokoyama NN, Shao S, Hoang BH, Mercola D, Zi X. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2:27–44.
209. Zhang Z, Cheng L, Li J, Farah E, Atallah NM, Pascuzzi PE, et al. Inhibition of the

## BIBLIOGRAFIA

- Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Overcomes Resistance to Enzalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2018;78:3147–62.
210. Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* United States; 2004;172:1297–301.
  211. Pickles K, Carter SM, Rychetnik L. Doctors' approaches to PSA testing and overdiagnosis in primary healthcare: a qualitative study. *BMJ Open.* 2015;5:e006367.
  212. Roobol MJ, Carlsson S V. Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat Rev Urol.* England; 2013;10:38–48.
  213. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol.* United States; 1991;145:907–23.
  214. El-Bahrawy M, Poulson R, Rowan AJ, Tomlinson ITM, Alison MR. Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *Int J Exp Pathol.* 2004;85:65–74.
  215. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol.* 2014;9:221.
  216. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
  217. Tallarida RJ. An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther.* United States; 2006;319:1–7.
  218. Prichard MN, Shipman CJ. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res.* Netherlands; 1990;14:181–205.
  219. Menéndez M, González S, Obrador-Hevia A, Domínguez A, Pujol MJ, Valls J, et al. Functional characterization of the novel APC N1026S variant associated with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* United States; 2008;134:56–64.
  220. Fagman H, Larsson F, Arvidsson Y, Meuller J, Nordling M, Martinsson T, et al. Nuclear accumulation of full-length and truncated adenomatous polyposis coli protein in tumor cells depends on proliferation. *Oncogene.* England; 2003;22:6013–22.
  221. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Regulation of  $\beta$ -catenin nuclear dynamics by GSK-3 $\beta$  involves a LEF-1 positive feedback loop. *Traffic.* England; 2011;12:983–99.
  222. Tolwinski NS, Wieschaus E. Armadillo nuclear import is regulated by cytoplasmic

- anchor Axin and nuclear anchor dTCF/Pan. *Development*. England; 2001;128:2107–17.
223. Kahn M. Wnt Signaling in Stem Cells and Tumor Stem Cells. *Semin Reprod Med*. United States; 2015;33:317–25.
224. Picco G, Petti C, Centonze A, Torchiario E, Crisafulli G, Novara L, et al. Loss of AXIN1 drives acquired resistance to WNT pathway blockade in colorectal cancer cells carrying RSPO3 fusions. *EMBO Mol Med*. 2017;9:293–303.
225. Hayashi M, Baker A, Goldstein SD, Albert CM, Jackson KW, McCarty G, et al. Inhibition of porcupine prolongs metastasis free survival in a mouse xenograft model of Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2017;8:78265–76.
226. Scher HI, Halabi S, Tannock I, Morris M, Sternberg CN, Carducci MA, et al. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26:1148–59.
227. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. United States; 2006;12:1665–71.
228. Yu G, He Q-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst*. England; 2016;12:477–9.
229. Sharp A, Coleman I, Yuan W, Sprenger C, Dolling D, Rodrigues DN, et al. Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *J Clin Invest*. 2019;129:192–208.
230. Cato L, de Tribolet-Hardy J, Lee I, Rottenberg JT, Coleman I, Melchers D, et al. ARv7 Represses Tumor-Suppressor Genes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2019;35:401-413.e6.
231. Takayama K-I. Splicing Factors Have an Essential Role in Prostate Cancer Progression and Androgen Receptor Signaling. *Biomolecules*. 2019;9.
232. Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, Jayaram A, Winkquist E, McLaughlin B, et al. Assessment of the Validity of Nuclear-Localized Androgen Receptor Splice Variant 7 in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker for Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4:1179–86.
233. Yang Y, Bai Y, He Y, Zhao Y, Chen J, Ma L, et al. PTEN Loss Promotes Intratumoral Androgen Synthesis and Tumor Microenvironment Remodeling via Aberrant Activation of RUNX2 in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018;24:834–46.
234. Sackmann Sala L, Boutillon F, Menara G, De Goyon-Pélarde A, Leprévost M, Codzamanian J, et al. A rare castration-resistant progenitor cell population is

## BIBLIOGRAFIA

- highly enriched in Pten-null prostate tumours. *J Pathol.* England; 2017;243:51–64.
235. Mei W, Lin X, Kapoor A, Gu Y, Zhao K, Tang D. The Contributions of Prostate Cancer Stem Cells in Prostate Cancer Initiation and Metastasis. *Cancers (Basel).* 2019;11.
236. Bismar TA, Hegazy S, Feng Z, Yu D, Donnelly B, Palanisamy N, et al. Clinical utility of assessing PTEN and ERG protein expression in prostate cancer patients: a proposed method for risk stratification. *J Cancer Res Clin Oncol.* Germany; 2018;144:2117–25.
237. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods.* United States; 2015. page 697.
238. Yamada Y, Nishikawa R, Kato M, Okato A, Arai T, Kojima S, et al. Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis. *J Hum Genet.* England; 2018;63:195–205.
239. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaei M, Einollahi B, Mowla SJ. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate.* United States; 2019;79:88–95.
240. Li L, Li S. miR-205-5p inhibits cell migration and invasion in prostatic carcinoma by targeting ZEB1. *Oncol Lett.* 2018;16:1715–21.
241. Song X-L, Huang B, Zhou B-W, Wang C, Liao Z-W, Yu Y, et al. miR-1301-3p promotes prostate cancer stem cell expansion by targeting SFRP1 and GSK3 $\beta$ . *Biomed Pharmacother.* France; 2018;99:369–74.
242. Groisberg R, Roszik J, Conley A, Patel SR, Subbiah V. The Role of Next-Generation Sequencing in Sarcomas: Evolution From Light Microscope to Molecular Microscope. *Curr Oncol Rep.* United States; 2017;19:78.
243. Somaiah N, von Mehren M. New drugs and combinations for the treatment of soft-tissue sarcoma: a review. *Cancer Manag Res.* 2012;4:397–411.
244. De Robertis A, Mennillo F, Rossi M, Valensin S, Tunicci P, Mori E, et al. Human Sarcoma growth is sensitive to small-molecule mediated AXIN stabilization. *PLoS One.* 2014;9:e97847.
245. Hasegawa T, Yokoyama R, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Prognostic significance of histologic grade and nuclear expression of beta-catenin in synovial sarcoma. *Hum Pathol.* United States; 2001;32:257–63.
246. McQueen P, Ghaffar S, Guo Y, Rubin EM, Zi X, Hoang BH. The Wnt signaling pathway: implications for therapy in osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* England; 2011;11:1223–32.



247. Ng TL, Gown AM, Barry TS, Cheang MCU, Chan AKW, Turbin DA, et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc. United States*; 2005;18:68–74.
248. Martinez-Font E, Felipe-Abrio I, Calabuig-Fariñas S, Ramos R, Terrasa J, Vögler O, et al. Disruption of TCF/b-Catenin binding impairs Wnt signaling & induces apoptosis in soft tissue sarcoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16.
249. Martinez-Font E, Pérez-Capó M, Ramos R, Felipe I, Garcías C, Luna P, et al. Impact of Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibition on Cell Proliferation through CDC25A Downregulation in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers (Basel). Switzerland*; 2020;12.
250. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas-Letter. *Mol. Cancer Ther. United States*; 2017. page 2324.
251. Madan B, Virshup DM. Targeting Wnts at the source--new mechanisms, new biomarkers, new drugs. *Mol Cancer Ther. United States*; 2015;14:1087–94.
252. Friedrichs N, Trautmann M, Endl E, Sievers E, Kindler D, Wurst P, et al. Phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in synovial sarcoma. *Int J cancer. United States*; 2011;129:1564–75.
253. Bozzi F, Ferrari A, Negri T, Conca E, Luca DR, Losa M, et al. Molecular characterization of synovial sarcoma in children and adolescents: evidence of akt activation. *Transl Oncol.* 2008;1:95–101.
254. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med. United States*; 2007;13:748–53.
255. Shi Z, Qian X, Li L, Zhang J, Zhu S, Zhu J, et al. Nuclear translocation of  $\beta$ -catenin is essential for glioma cell survival. *J neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol. United States*; 2012;7:892–903.
256. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang X-F. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* 2006;20:666–74.
257. Mulholland DJ, Cheng H, Reid K, Rennie PS, Nelson CC. The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem. United States*; 2002;277:17933–43.
258. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol. England*; 2000;2:653–60.
259. Wang L, Liu X, Gusev E, Wang C, Fagotto F. Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of  $\beta$ -catenin by APC and its cancer-related truncated form. *J Cell Sci. England*; 2014;127:1647–59.

## BIBLIOGRAFIA

260. Morgan RG, Ridsdale J, Tonks A, Darley RL. Factors affecting the nuclear localization of  $\beta$ -catenin in normal and malignant tissue. *J Cell Biochem. United States*; 2014;115:1351–61.
261. Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, Gehrke I, Plickert G, Schlösser A, et al. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Neoplasia*. 2010;12:326–35.
262. Eid JE, Kung AL, Scully R, Livingston DM. p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion. *Cell. United States*; 2000;102:839–48.
263. Ma H, Nguyen C, Lee K-S, Kahn M. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene. England*; 2005;24:3619–31.
264. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:12682–7.
265. Al-Matouq J, Holmes T, Hammiller B, Tran N, Holmes M, Freeman SC, et al. Accumulation of cytoplasmic CDC25A in cutaneous squamous cell carcinoma leads to a dependency on CDC25A for cancer cell survival and tumor growth. *Cancer Lett. Ireland*; 2017;410:41–9.
266. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer. England*; 2007;7:495–507.
267. Brogгинi M, Buraggi G, Brenna A, Riva L, Codegoni AM, Torri V, et al. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anticancer Res. Greece*; 2000;20:4835–40.
268. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev. United States*; 1993;7:1559–71.
269. de Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev*. 2014;28:305–16.
270. Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, et al. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep. Netherlands*; 2014;41:5375–84.
271. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487:239–43.
272. Song L-N, Herrell R, Byers S, Shah S, Wilson EM, Gelmann EP. Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the

- effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1674–87.
273. Lee SH, Luong R, Johnson DT, Cunha GR, Rivina L, Gonzalgo ML, et al. Androgen signaling is a confounding factor for  $\beta$ -catenin-mediated prostate tumorigenesis. *Oncogene.* 2016;35:702–14.
  274. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* England; 2008;141:672–5.
  275. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10513–8.
  276. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* England; 2008;18:997–1006.
  277. Barceló M, Castells M, Bassas L, Vigués F, Larriba S. Semen miRNAs Contained in Exosomes as Non-Invasive Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis. *Sci Rep.* 2019;9:13772.
  278. Matin F, Jeet V, Moya L, Selth LA, Chambers S, Clements JA, et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Sci Rep.* 2018;8:6653.
  279. Movahedpour A, Ahmadi N, Ghasemi Y, Savardashtaki A, Shabaninejad Z. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer: Current status and future perspectives. *J Cell Biochem.* United States; 2019;120:16316–29.
  280. Endzeliņš E, Melne V, Kalniņa Z, Lietuvietis V, Riekstiņa U, Llorente A, et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Mol Cancer.* 2016;15:41.
  281. Fredsøe J, Rasmussen AKI, Thomsen AR, Mouritzen P, Høyer S, Borre M, et al. Diagnostic and Prognostic MicroRNA Biomarkers for Prostate Cancer in Cell-free Urine. *Eur Urol Focus.* Netherlands; 2018;4:825–33.
  282. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer.* 2017;16:156.
  283. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2015;67:33–41.
  284. Lin H-M, Castillo L, Mahon KL, Chiam K, Lee BY, Nguyen Q, et al. Circulating microRNAs are associated with docetaxel chemotherapy outcome in castration-

## BIBLIOGRAFIA

- resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2014;110:2462–71.
285. Pashaei E, Pashaei E, Ahmady M, Ozen M, Aydin N. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS One*. 2017;12:e0179543.
286. Arai T, Kojima S, Yamada Y, Sugawara S, Kato M, Yamazaki K, et al. Pirin: a potential novel therapeutic target for castration-resistant prostate cancer regulated by miR-455-5p. *Mol Oncol*. 2019;13:322–37.
287. Coarfa C, Fiskus W, Eedunuri VK, Rajapakshe K, Foley C, Chew SA, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. *Oncogene*. 2016;35:2345–56.
288. Goto Y, Kurozumi A, Arai T, Nohata N, Kojima S, Okato A, et al. Impact of novel miR-145-3p regulatory networks on survival in patients with castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2017;117:409–20.
289. Yang J, Zhang K, Wu J, Shi J, Xue J, Li J, et al. Wnt5a Increases Properties of Lung Cancer Stem Cells and Resistance to Cisplatin through Activation of Wnt5a/PKC Signaling Pathway. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1690896.

# **ANNEX 1**

Dr. Javier Martín Broto  
servicio de oncología  
Hospital U. Son Espases

Palma, 30 de marzo de 2011

El Comité Ético de Investigación Clínica de les Illes Balears, en su reunión 03/11 de día 30 de marzo de 2011, evaluó el estudio N° **IB 1558/11 PI**, denominado **PROTOCOLO DE OBTENCION DE CELULAS PRIMARIAS DERIVADAS DE SARCOMAS Y PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS** del investigador principal Dr. Javier Martín Broto del servicio de oncología del Hospital U. Son Espases.

Una vez presentado y evaluado este Comité acuerda emitir informe favorable del estudio denominado PROTOCOLO DE OBTENCION DE CELULAS PRIMARIAS DERIVADAS DE SARCOMAS Y PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS.

Lo que le comunica a los efectos oportunos.

Atentamente,

**ceic** | comitè ètic  
d'investigació  
clínica  
ILLES BALEARS  
Conselleria de Salut i Consum

Isabel M<sup>a</sup> Borrás Rosselló  
Secretaria en funciones del CEIC Illes Balears

# **ANNEX 2**

# ANNEX 2

*Anàlisi Arrays d'Expressió*

*20/12/2019*

## Contents

<b>Anàlisi miRNAs</b>	<b>1</b>
Objectius . . . . .	1
Protocol . . . . .	1
Anàlisi de la significació biològica . . . . .	19
<b>Anàlisi mRNAs</b>	<b>21</b>
Protocol . . . . .	21
Anàlisi de la significació biològica . . . . .	37
<b>Referències</b>	<b>40</b>

## Anàlisi miRNAs

### Objectius

El principal objectiu de l'estudi és evaluar el paper dels mRNAs i miRNAs relacionats amb la via Wnt en la hormono-resistència en càncer de pròstata avançat.

### Protocol

#### 1. Les dades

Les dades s'han obtingut a partir d'RNA total aïllat de teixit tumoral de dos grups de pacients (n=10 per grup): Els pacients amb càncer de pròstata hormonosensibles (CPHS) dels qual s'ha obtingut mostra de teixit tumoral a partir de prostatectomia radical, i els pacients amb càncer de pròstata hormono-resistent (CPRC) dels qual s'ha obtingut la mostra a partir del teixit tumoral obtingut a través de les RTUs. L'expressió de miRNAs s'ha determinat mitjançant els arrays d'expressió d'Affymetrix: miRNA 4.0.

#### 2. Procediment general de l'anàlisi

2.0 Preparat l'entorn de treball.

2.1 Identificat els grups experimentals i a quin grup pertany cada mostra.

2.2 Realitzat el control de qualitat per les dades *crues*.

2.3 Normalitzat del dades.

2.4 Realitzat el control de qualitat de les dades normalitzades.

2.5 Aplicat un filtratge no específic.

2.6 Identificat els miRNAs diferencialment expressats.

2.7 Anotat els resultats.

2.8 Realitzat les diferents comparacions.

2.9 Analitzat la significació biològica.



## Preparació de l'entorn de treball

Durant l'anàlisi de les dades obtingudes amb els arrays d'expressió l'usuari es troba amb que ha de treballar amb un gran nombre d'arxius, per això és recomenable crear algunes carpetes abans de començar l'anàlisi per tal de mantenir tant la informació de la que es parteix com la que es genera de manera ordenada. Per això es creen les següents carpetes:

- la carpeta **data** que inclourà els arxius **CEL** i **targets**.
- la carpeta **source** on s'emmagatzemen funcions i objectes utilitzats durant l'anàlisi.
- la carpeta **results** on s'afegeixen els resultats obtinguts durant l'anàlisi.
- la carpeta **figures** on s'hi guarden les figures més interessants.

```
> setwd(".")
> dir.create("data")
> dir.create("source")
> dir.create("results")
> dir.create("figures")
```

Els arxius **CEL** són els arxius que contenen les dades *crues* originades després de l'escaneig de l'array i el preprocessament que fa el software d'Affymetrix. Normalment es té un arxiu **.CEL** per a cada mostra o condició dins l'experiment.

## Identificació dels grups experimentals

L'altre arxiu, anomenat **targets** conté la informació referent als grups i a les mostres, de manera que relaciona cada arxiu **.CEL** amb una mostra o condició de l'experiment. Aquest arxiu permet, a la vegada, representar els grups experimentals. En aquest cas hi ha dos grups: el **CPHS** i el **CPRC**, tal com es mostra a la taula:

```
> targets <- read.csv("data/targets.csv", header = TRUE, sep = ",")
> str(targets)
```

```
'data.frame':  20 obs. of  5 variables:
 $ FileName : Factor w/ 20 levels "MP02 CP_(miRNA-4_0).CEL",...: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
 $ Group    : Factor w/ 2 levels "CPHS","CPRC": 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
 $ Sample   : Factor w/ 20 levels "MP02","MP03",...: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ...
 $ ShortName: Factor w/ 20 levels "CPHS.1","CPHS.10",...: 1 3 4 5 6 7 8 9 10 2 ...
 $ Date     : Factor w/ 3 levels "d1","d2","d3": 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 ...
```

```
> knitr::kable(
+   targets, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Contingut del targets file')
```

Table 1: Contingut del targets file

FileName	Group	Sample	ShortName	Date
MP02 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP02	CPHS.1	d1
MP03 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP03	CPHS.2	d1
MP04 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP04	CPHS.3	d1
MP05 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP05	CPHS.4	d1
MP06 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP06	CPHS.5	d2
MP07 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP07	CPHS.6	d2

FileName	Group	Sample	ShortName	Date
MP08 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP08	CPHS.7	d2
MP09 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP09	CPHS.8	d2
MP11 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP11	CPHS.9	d3
MP12 CP_(miRNA-4_0).CEL	CPHS	MP12	CPHS.10	d3
MP14 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP14	CPRC.1	d3
MP15 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP15	CPRC.2	d1
MP16 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP16	CPRC.3	d1
MP17 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP17	CPRC.4	d1
MP18 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP18	CPRC.5	d1
MP19 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP19	CPRC.6	d2
MP20 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP20	CPRC.7	d2
MP21 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP21	CPRC.8	d2
MP22 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP22	CPRC.9	d3
MP23 CP-RC_(miRNA-4_0).CEL	CPRC	MP23	CPRC.10	d2

## Instal·lació dels paquets d'R

```
> if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
+   install.packages("BiocManager")
> BiocManager::install()
```

```
> #install.packages("colorspace")
> #install.packages("gplots")
> #install.packages("ggplot2")
> #install.packages("ggrepel")
> #install.packages("htmlTable")
> #install.packages("prettydoc")
> #install.packages("devtools")
> #install.packages("BiocManager")
> #BiocManager::install("oligo")
> #BiocManager::install("pd.mirna.4.0")
> #BiocManager::install("arrayQualityMetrics")
> #BiocManager::install("pvca")
> #BiocManager::install("limma")
> #BiocManager::install("genefilter")
> #BiocManager::install("pd.mirna.4.0.db")
> #BiocManager::install("annotate")
> #BiocManager::install("org.Hs.eg.db")
> #BiocManager::install("ReactomePA")
```

## Lectura dels arxius CEL

Els arxius CEL i l'arxiu `targets` es llegeixen utilitzant la funció `read.AnnotatedDataFrame` d'aquesta manera es crea un objecte anomenat `AnnotatedDataFrame` el qual resulta més adient per treballar-hi, a més, permet canviar el nom de les mostres pel nom que definit com a `Sample` dins l'arxiu `targets`.

```
> require(oligo)
> celFiles <- list.celfiles("./data", full.names = TRUE)
> require(Biobase)
```

```

> my.targets <- read.AnnotatedDataFrame(file.path("./data", "targets.csv"),
+                                     header = TRUE, row.names = 1,
+                                     sep=",")
> str(my.targets)
> my.targets@data$Group <- as.factor(my.targets@data$Group)
> rawData <- read.celfiles(celFiles, phenoData = my.targets)

```

```

> my.targets@data$Sample->rownames(pData(rawData))
> colnames(rawData) <- rownames(pData(rawData))
> head(rawData)

```

```

ExpressionFeatureSet (storageMode: lockedEnvironment)
assayData: 1 features, 20 samples
  element names: exprs
protocolData
  rowNames: MP02 MP03 ... MP23 (20 total)
  varLabels: exprs dates
  varMetadata: labelDescription channel
phenoData
  rowNames: MP02 MP03 ... MP23 (20 total)
  varLabels: Group Sample ShortName Date
  varMetadata: labelDescription channel
featureData: none
experimentData: use 'experimentData(object)'
Annotation: pd.mirna.4.0

```

```

> save(rawData, file = "./source/rawData.Rda")

```

## Control de qualitat per les dades crues

Aquest primer pas serveix per determinar si les dades crues són de prou qualitat per a la posterior normalització.

```

> library(arrayQualityMetrics)
> arrayQualityMetrics(rawData, outdir = file.path("./results", "QCDir.Raw"))

```

Aquest pas es fa mitjançant el paquet `ArrayQualityMetrics` el qual estudia la qualitat de les dades desde diferents aproximacions i mostra una taula resum on marca els arrays que no compleixen els criteris de qualitat per les diferents funcions amb un asterisc. Aquells arrays amb 3 asteriscs cal revisar-los ja que és possible que s'hagi d'excloure la mostra en qüestió de l'anàlisi.

A la figura 1 es pot veure com les mostres MP19, MP20 i MP21 presenten 2 asteriscs, les mostres MP04, MP06, MP07 i MP23 en presenten 1 i la resta no presenta asteriscs a la taula resum, generalment 1 o 2 asteriscs indiquen un baix potencial de tenir problemes pel que es pot continuar amb l'anàlisi sense descartar cap array.

L'anàlisi de components principals (PCA) permet, d'una manera més clara, identificar possibles mostres problema.

La figura 2 mostra el gràfic dels dos primers components principals comentat.

<input type="checkbox"/>	array	sampleNames	*1	*2	*3	Group	Sample	Date
<input type="checkbox"/>	1	MP02				CPHS	MP02	110717
<input type="checkbox"/>	2	MP03				CPHS	MP03	110717
<input type="checkbox"/>	3	MP04			x	CPHS	MP04	110717
<input type="checkbox"/>	4	MP05				CPHS	MP05	110717
<input type="checkbox"/>	5	MP06			x	CPHS	MP06	120717
<input type="checkbox"/>	6	MP07			x	CPHS	MP07	120717
<input type="checkbox"/>	7	MP08				CPHS	MP08	120717
<input type="checkbox"/>	8	MP09				CPHS	MP09	120717
<input type="checkbox"/>	9	MP11				CPHS	MP11	130717
<input type="checkbox"/>	10	MP12				CPHS	MP12	130717
<input type="checkbox"/>	11	MP14				CPRC	MP14	130717
<input type="checkbox"/>	12	MP15				CPRC	MP15	110717
<input type="checkbox"/>	13	MP16				CPRC	MP16	110717
<input type="checkbox"/>	14	MP17				CPRC	MP17	110717
<input type="checkbox"/>	15	MP18				CPRC	MP18	110717
<input type="checkbox"/>	16	MP19	x		x	CPRC	MP19	120717
<input type="checkbox"/>	17	MP20		x	x	CPRC	MP20	120717
<input type="checkbox"/>	18	MP21	x		x	CPRC	MP21	120717
<input type="checkbox"/>	19	MP22				CPRC	MP22	130717
<input type="checkbox"/>	20	MP23			x	CPRC	MP23	120717

Figure 1: Taula resum de l'arxiu index.html, produït pel paquet arrayQualityMetrics, raw data

```
> plotPCA3(exprs(rawData), labels = targets$Sample, factor = targets$Group,
+          title="Raw data", scale = FALSE, size = 3,
+          colores = c("purple", "orange"))
```

Es pot veure que el primer component del PCA representa un 45.7 % de la variabilitat de les mostres, i tal com s'observa a la figura 2 sembla ser que hi ha certa heterogeneïtat entre les mostres de l'estudi. Encara que no cal perdre de vista que aquest anàlisi correspon a les dades *crues* caldrà veure com queda aquest mateix gràfic un cop normalitzades les dades.

Seguint en la mateixa línia es pot visualitzar la distribució de la intensitat dels arrays mitjançant *boxplots*. La figura 3 mostra la distribució de les intensitats per totes les mostres de l'estudi.

```
> boxplot(rawData, cex.axis=0.5, las=2, which="all",
+         col = c(rep("purple", 10), rep("orange", 10)),
+         main="Distribució dels valors d'intensitats Raw Data")
```

A la figura 3 es pot observar certa variació en la intensitat, però es pot considerar l'esperada per a dades *crues*.

## Normalització de les dades

Per tal de fer els arrays comparables entre ells i intentar reduir o eliminar, en la mesura del possible, la variabilitat deguda a causes no biològiques en les mostres es fa una normalització de les dades. El procés de normalització té com a objectiu assegurar que les diferències d'intensitats presents en l'array es deguin a la diferència d'expressió dels diferents gens i no pas a biaixos deguts a la tècnica en si. El mètode de normalització utilitzat en aquest treball és un dels més utilitzats en el camp, l'RMA (de l'anglès, Robust Multichip Analysis) Irizarry et al. (2003).

```
> library(limma)
> eset_rma <- rma(rawData)
```

```
Background correcting
Normalizing
Calculating Expression
```

```
> save(eset_rma, file = "./source/eset_rma.Rda")
```

## Control de qualitat per les dades normalitzades

Un cop feta la normalització es torna a fer un control de qualitat sobre les dades normalitzades.

```
> arrayQualityMetrics(eset_rma, outdir = file.path("./results", "QCDir.Norm"), force=TRUE)
```

La figura 4 mostra la taula resum obtinguda amb les dades normalitzades. Es pot veure que un cop feta la normalització la mostra MP02 presenta 1 asteriscs i la mostra MP14 en presenta 2. Per tant es podria considerar eliminar la mostra MP14 de l'anàlisi.

```
> plotPCA3(exprs(eset_rma), labels = targets$Sample, factor = targets$Group,
+          title="Normalized data", scale = FALSE, size = 3,
+          colores = c("purple", "orange"))
```

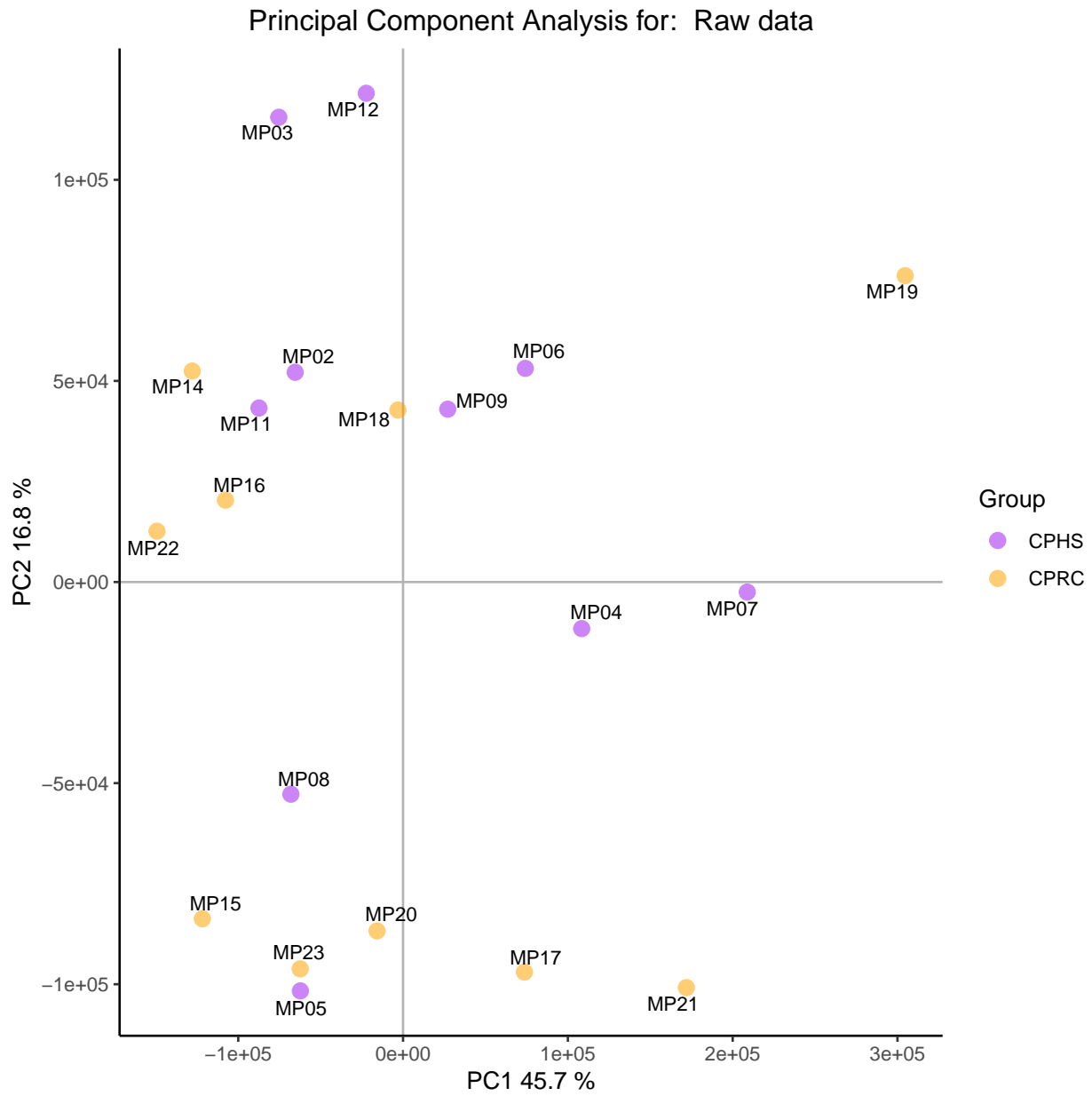


Figure 2: PCA Dades crues

### Distribució dels valors d'intenstitats Raw Data

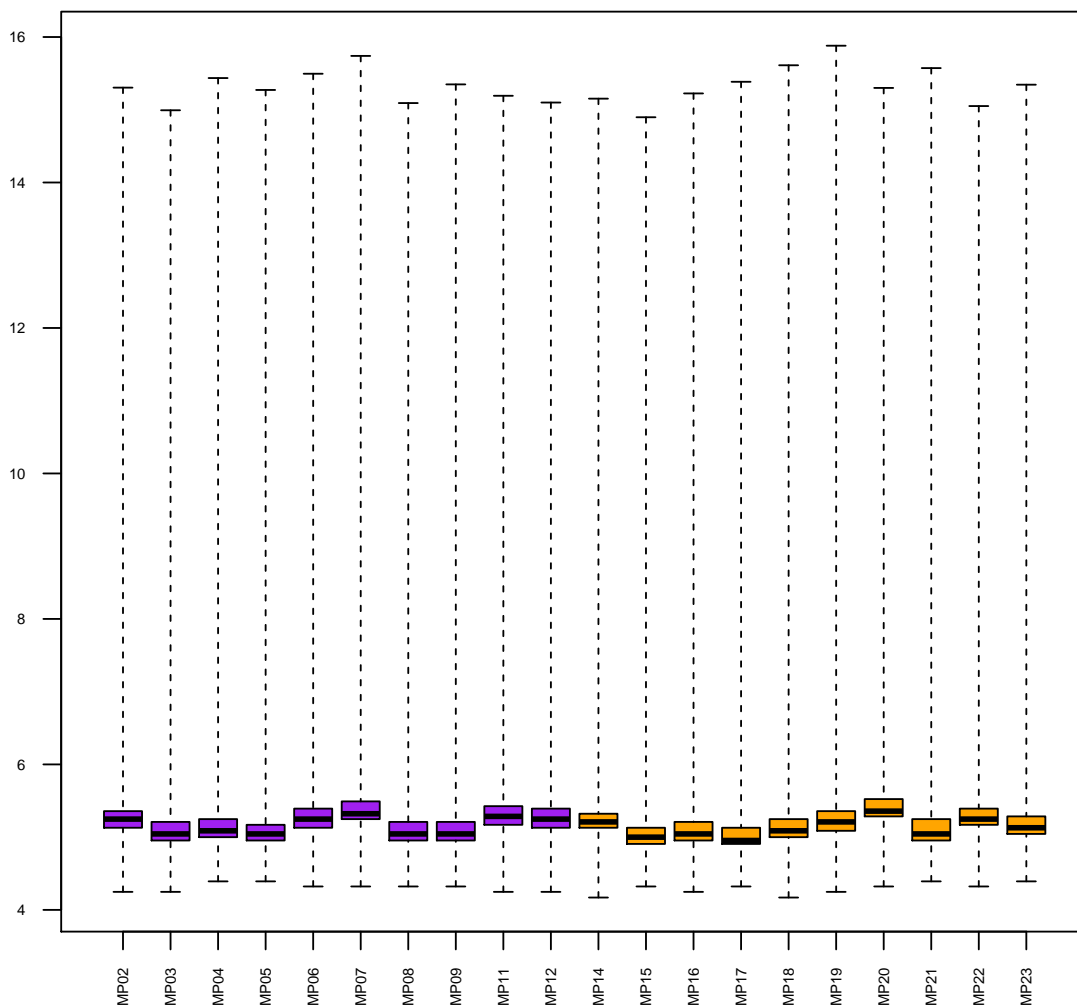


Figure 3: Boxplot per la intensitat del arrays (Raw Data)

	array	sampleNames	*1	*2	*3	Group	Sample	Date
<input type="checkbox"/>	1	MP02	x			CPHS	MP02	110717
<input type="checkbox"/>	2	MP03				CPHS	MP03	110717
<input type="checkbox"/>	3	MP04				CPHS	MP04	110717
<input type="checkbox"/>	4	MP05				CPHS	MP05	110717
<input type="checkbox"/>	5	MP06				CPHS	MP06	120717
<input type="checkbox"/>	6	MP07				CPHS	MP07	120717
<input type="checkbox"/>	7	MP08				CPHS	MP08	120717
<input type="checkbox"/>	8	MP09				CPHS	MP09	120717
<input type="checkbox"/>	9	MP11				CPHS	MP11	130717
<input type="checkbox"/>	10	MP12				CPHS	MP12	130717
<input type="checkbox"/>	11	MP14	x	x		CPRC	MP14	130717
<input type="checkbox"/>	12	MP15				CPRC	MP15	110717
<input type="checkbox"/>	13	MP16				CPRC	MP16	110717
<input type="checkbox"/>	14	MP17				CPRC	MP17	110717
<input type="checkbox"/>	15	MP18				CPRC	MP18	110717
<input type="checkbox"/>	16	MP19				CPRC	MP19	120717
<input type="checkbox"/>	17	MP20				CPRC	MP20	120717
<input type="checkbox"/>	18	MP21				CPRC	MP21	120717
<input type="checkbox"/>	19	MP22				CPRC	MP22	130717
<input type="checkbox"/>	20	MP23				CPRC	MP23	120717

Figure 4: Taula resum de l'arxiu index.html, produït pel paquet arrayQualityMetrics, normalized data



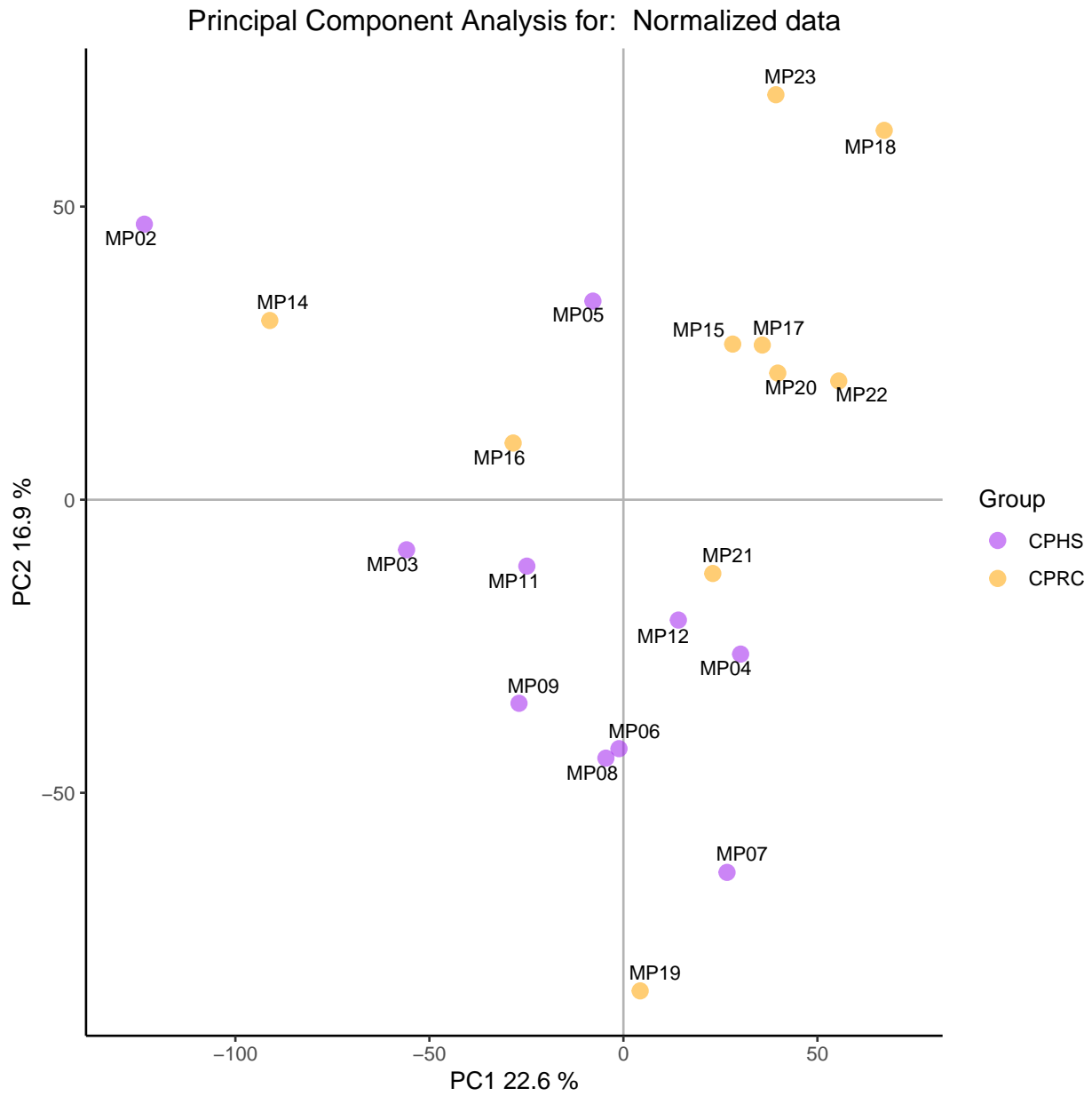


Figure 5: PCA Normalized data

A la figura 5 es pot veure com ara el primer component del PCA representa un 22.6 % de la variabilitat de les mostres, menor que l'obtingut amb les dades *crues* (45.7 %). Amb les dades normalitzades sí que s'observa una certa agrupació de les mostres explicada pel segon component del PCA, el qual representa un percentatge molt menor en comparació el primer (16.9 %). Tot i així tant la mostra MP02 com la MP14 queden separades de la resta de mostres, després de revisar que no hi hagi hagut cap errada alhora d'etiquetar o processar aquestes mostres i fer l'anàlisi amb i sense les mostres s'ha decidit no eliminar-les de l'anàlisi.

Igual que amb les dades *crues* fem la representació de les intensitats mitjançant un `boxplot` i tal com és d'esperar, degut a la manera en que el mètode RMA normalitza els valors d'intensitat dels arrays per totes les mostres, la variabilitat observada durant l'anàlisi de les dades *crues* ha desaparegut pràcticament (figura 6).

```
> boxplot(eset_rma, cex.axis=0.5, las=2, which="all",
+         col = c(rep("purple", 10), rep("orange", 10)),
+         main="Distribució dels valors d'intensitats Normalized Data")
```

## Detecció efectes batch

Els resultats obtinguts amb els arrays d'expressió es solen veure afectats per petites diferències relacionades amb fenòmens no biològics com per exemple l'ús de diferents lots de reactius o una de les més freqüents, processar en dies diferents les mostres d'un mateix experiment. Podem visualitzar gràficament amb un PCA l'efecte de la *data* que seria una de les possibles raons per tenir un efecte batch. A la figura 7 podem comprobar que no és el cas.

```
> library(ggplot2)
> library(ggrepel)
> plotPCA3(exprs(eset_rma), labels = targets$Sample, factor = targets$Date,
+          title="Normalized data", scale = FALSE, size = 2,
+          colores = c("purple", "orange", "green"))
```

## Filtrar

És interessant filtrar aquells miRNAs els quals presenten variacions degut a la variació aleatòria, ja que aquests miRNAs s'espera que no es trobin diferencialment expressats, i així es redueix el nombre de tests que cal realitzar augmentant el potencial estadístic d'aquests Hackstadt & Hess (2009).

La funció `nsFilter` del paquet de bioconductor `genefilter` permet eliminar aquests miRNAs en funció d'un punt de tall per a la variabilitat.

```
> require(genefilter)
>
> filtered <- nsFilter(eset_rma,
+                     require.entrez = FALSE, remove.dupEntrez = FALSE,
+                     var.filter=TRUE, var.func=IQR, var.cutoff=0.75,
+                     filterByQuantile=TRUE)
```

Després del filtrar queden 9056 miRNAs.

Tornem a l'anàlisi de components principals (PCA) amb les dades ja filtrades. Així veiem a la figura 8 una agrupació de les mostres en funció dels dos components.

## Distribució dels valors d'intensitats Normalized Data

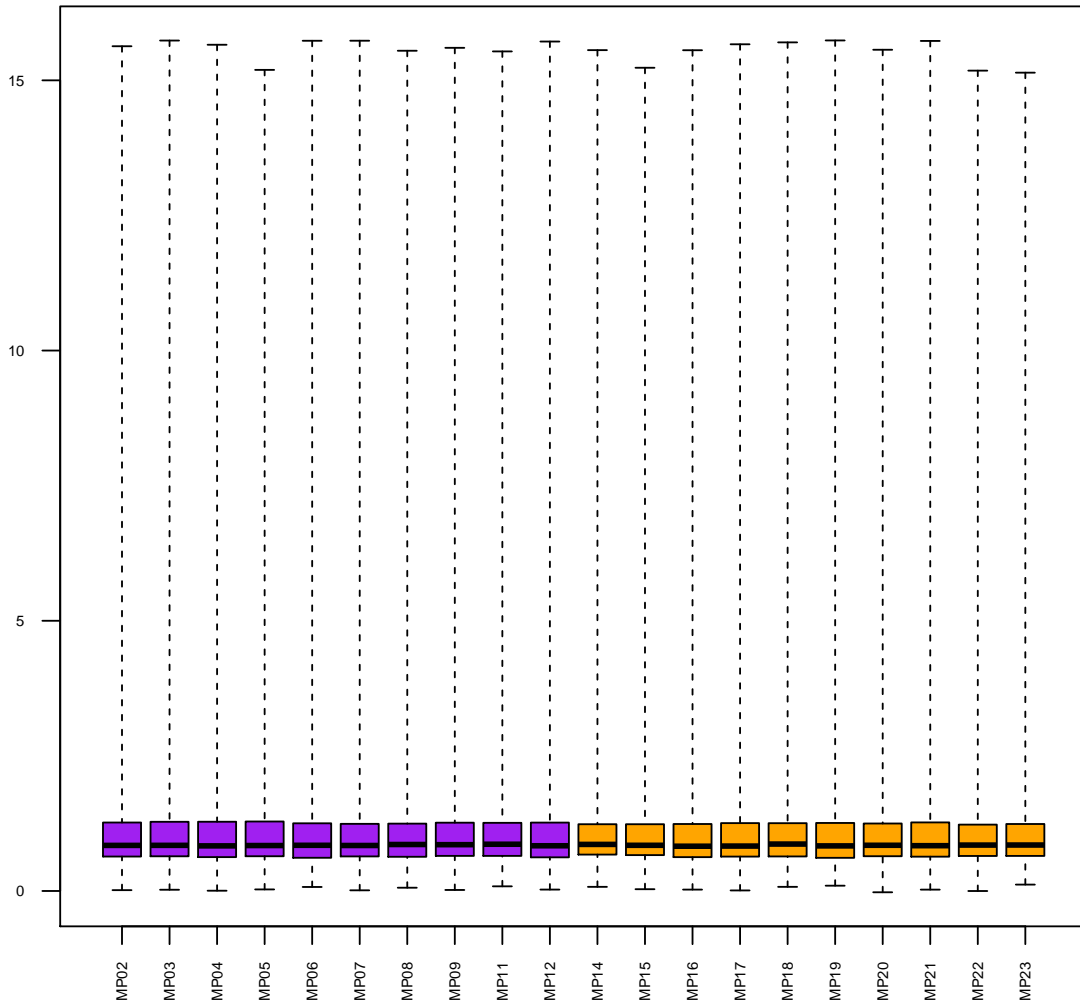


Figure 6: Boxplot per la intensitat del arrays, normalized data

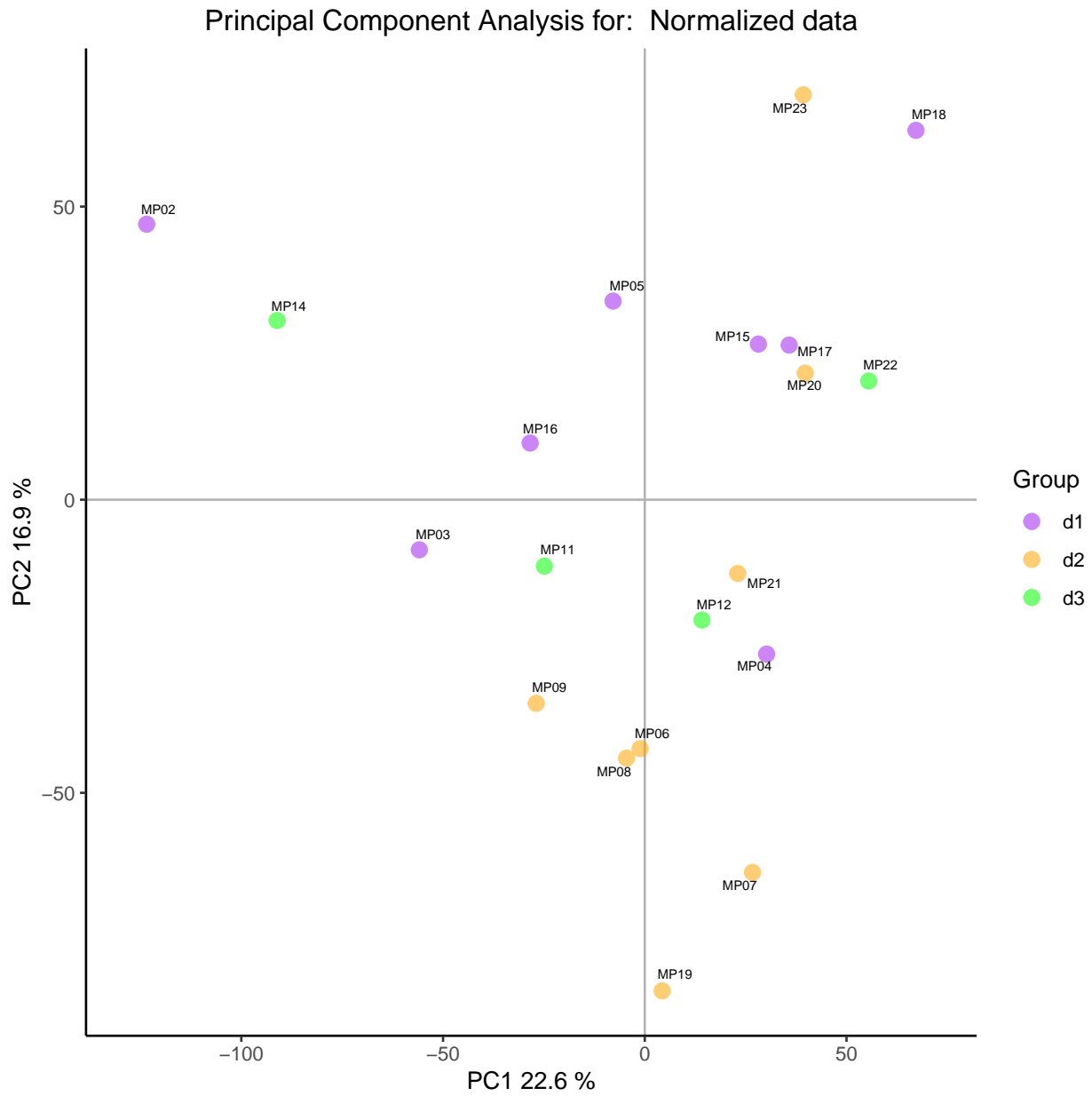


Figure 7: PCA efectes batch

```

> library(ggplot2)
> library(ggrepel)
> plotPCA3(exprs(eset_filtered), labels = targets$Sample, factor = targets$Group,
+         title="Normalized Data_filtered", scale = FALSE, size = 3,
+         colores = c("purple", "orange"))

```

## Identificació dels miRNAs diferencialment expressats

La identificació dels miRNAs diferencialment expressats consisteix bàsicament en comparar l'expressió dels miRNAs entre els grups. Hi ha diferents mètodes per fer això tal com s'explica en Chrominski & Tkacz (2015). Existeixen mètodes desenvolupats específicament pels microarrays com per exemple SAM Tusher, Tibshirani, & Chu (2001) o *Linear Models for Microarrays* Smyth (2004). Aquest últim és el que implementa el paquet `limma` Smyth (2005) que s'utilitza en aquest cas.

### La matriu de disseny

El primer pas per fer una anàlisi basat en models lineals Smyth (2005) és crear una matriu de disseny, anomenada *design matrix*. Aquesta matriu bàsicament descriu quines mostres es troben dins de cada grup, de manera que en el cas que s'està estudiant, la variable `Group` té dues condicions experimentals: CPHS i CPRC.

```

> require(limma)
> designMat<- model.matrix(~0+Group, pData(eset_filtered))
> colnames(designMat) <- c("CPHS", "CPRC")
> knitr::kable(
+   designMat, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Matriu de disseny')

```

Table 2: Matriu de disseny

	CPHS	CPRC
MP02	1	0
MP03	1	0
MP04	1	0
MP05	1	0
MP06	1	0
MP07	1	0
MP08	1	0
MP09	1	0
MP11	1	0
MP12	1	0
MP14	0	1
MP15	0	1
MP16	0	1
MP17	0	1
MP18	0	1
MP19	0	1
MP20	0	1
MP21	0	1
MP22	0	1
MP23	0	1

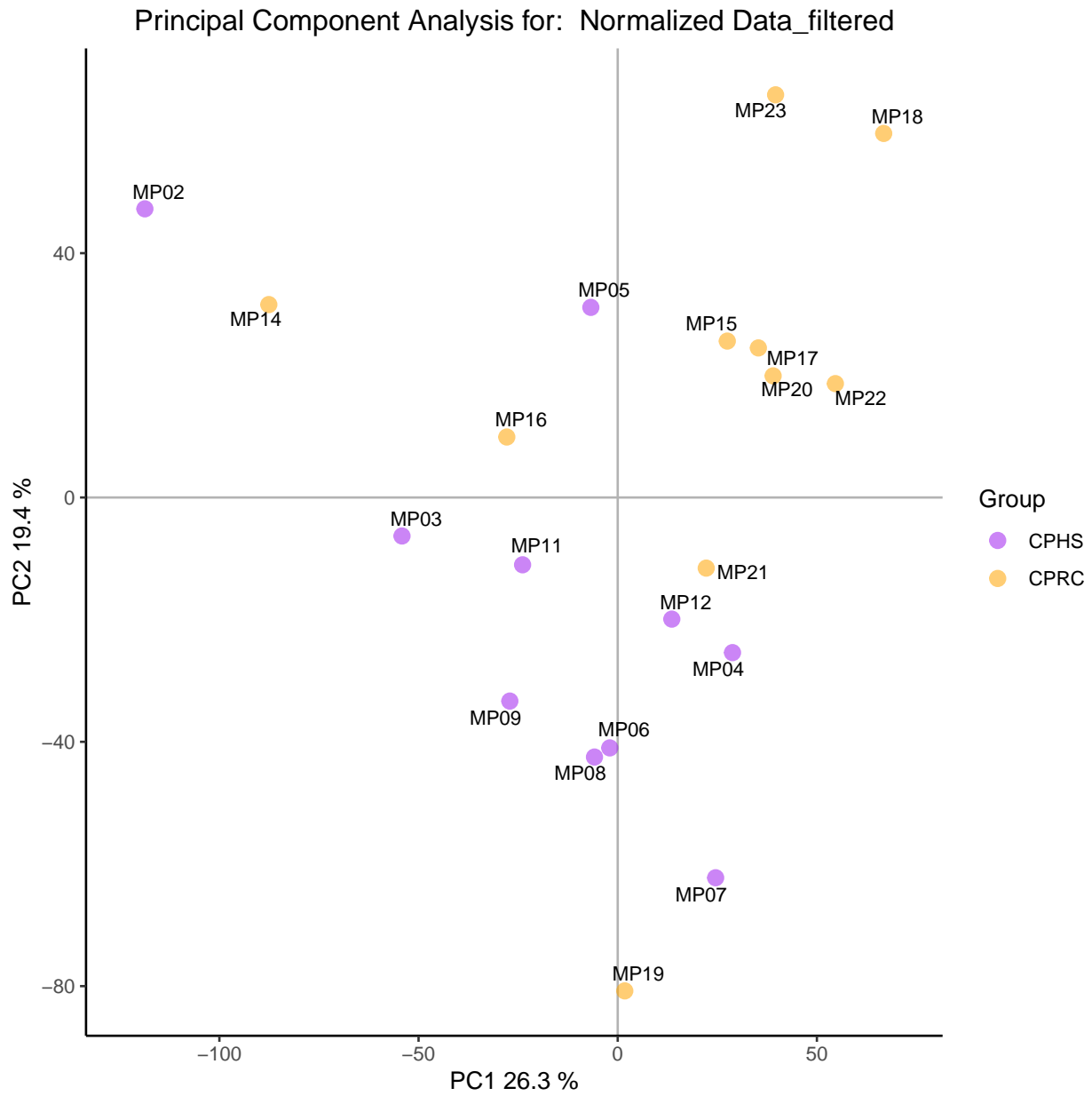


Figure 8: PCA Dades Filtrades

## La matriu de contrasts

Per tal de definir les comparacions entre grups es defineix la matriu de contrasts. Aquesta matriu esta formada per tantes columnes com comparacions cal fer i tantes files com grups hi ha (aquest coincideix amb el nombre de columnes de la matriu disseny). En aquest cas, només hi ha una comparació a fer: CPRC vs CPHS.

```
> cont.matrix <- makeContrasts (CPRCvsCPHS = CPRC-CPHS,levels=designMat)
> knitr::kable(
+   cont.matrix, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Matriu de contrast')
```

Table 3: Matriu de contrast

	CPRCvsCPHS
CPHS	-1
CPRC	1

## Model d'estimació i selecció de miRNAs

Un cop definida la matriu de disseny i la matriu de contrasts es passa a estimar el model i contrasts i a realitzar els test de significació que indicaran per cada miRNA i cada comparació si es poden considerar diferencialment expressats o no.

El mètode que implementa el paquet `limma` fa servir models de Bayes empírics per tal de combinar la informació de tota la matriu de dades així com de cada miRNA individual de manera que obté unes estimacions de l'error millorades que els models tradicionals en que es basa Smyth (2004). El mètode retorna els estadístics habituals com el **Fold-change**, **t-moderat** o **p-valor ajustat**, aquests es fan servir per ordenar els miRNAs de més a menys diferencialment expressats.

Amb la finalitat de controlar el % de falsos positius que resulten de realitzar simultàniament un nombre tant gran de contrasts es sol ajustar els p-valors amb el mètode de Benjamini i Hochberg Benjamini & Hochberg (1995).

```
> require(limma)
> fit<-lmFit(eset_filtered, designMat)
> fit.main<-contrasts.fit(fit, cont.matrix)
> fit.main<-eBayes(fit.main)
```

## miRNAs diferencialment expressats

La funció `topTable` del paquet `limma` conté per un determinat contrast la llista de miRNAs ordenats de menor a major p-valor, aquests són els miRNAs més i menys diferencialment expressats. Per cada miRNA retorna la següent informació:

- **logFC**: la diferència de mitges entre grups.
- **AveExpr**: el promig de l'expressió de tots els miRNAs dins una comparació.
- **t** : l'estadístic t-moderat.
- **P.Value**: el p-valor.

- adj.P.Val: el p-valor ajustat segons Benjamini & Hochberg (1995).
- B: l'estadístic B.

```
> topTab <- topTable (fit.main, number=nrow(fit.main), coef="CPRCvsCPHS", adjust.method = 'fdr')
> short <- head(topTab)
> knitr::kable(
+   short, booktabs = TRUE,
+   caption = 'miRNAs diferencialment expressats (6 primeres files)')
```

Table 4: miRNAs diferencialment expressats (6 primeres files)

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
MIMAT0019519_st	-4.440166	4.984619	-5.149122	4.13e-05	0.0167125	2.124962
MIMAT0000238_st	-5.015970	5.339211	-5.119746	4.43e-05	0.0167125	2.065217
MIMAT0000266_st	-5.015970	5.339211	-5.119746	4.43e-05	0.0167125	2.065217
MIMAT0001184_st	-5.015970	5.339211	-5.119746	4.43e-05	0.0167125	2.065217
MIMAT0001280_st	-5.015970	5.339211	-5.119746	4.43e-05	0.0167125	2.065217
MIMAT0002146_st	-5.015970	5.339211	-5.119746	4.43e-05	0.0167125	2.065217

## Anotació

La primera columna de la `topTable` conté l'ID de cada `probeset` de l'array d'Affymetrix, per saber a quin miRNA correspon cada un d'aquests ID cal fer el següent pas anomenat anotació. Aquest pas es pot fer de diferents maneres, en aquest cas s'ha optat per partir de l'arxiu `csv` obtingut a través de la web d'Affymetrix i s'ha generat un `dataframe` seleccionant d'aquest arxiu `csv` les files que contenen les `probeset` obtingudes amb la funció `topTable`.

```
> anotacio<-read.csv("./source/miRNA-4_0-st-v1.annotations.20160922.csv",skip =4)

> require(dplyr)
> topAnnotated <- anotacio[anotacio$Probe.Set.Name%in%rownames(topTab),c(2,4,6)]
> row.names(topAnnotated) <- topAnnotated$Probe.Set.Name
> write.csv(topTab, file="./results/topTab.csv")
> write.csv(topAnnotated, file="./results/topAnnotated.csv")
> save(topTab,topAnnotated, file="./results/topTables.Rda")
>
> annotatedTopTab<- merge(x=topAnnotated, y=topTab, by = "row.names")
> save(annotatedTopTab, file = "./results/annotatedTopTab.Rda")
> write.csv(annotatedTopTab, file = "./results/annotatedTopTab.csv")
```

El procés d'anotació fa que les taules que es generen siguin més comprensibles per l'usuari. La taula 8 mostra la taula resultant d'afegir les anotacions a la taula resultant `topTable`.

Table 5: anotació de la `topTable` per la comparació "CPRCvsCPHS" (6 primeres files)

Transcript.ID.Array.Design.	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
14qI-3	-0.0912569	1.181237	-0.4482219	0.6585520	0.8666714	-5.807114
14qI-4	-0.0716676	2.460749	-0.1824158	0.8569940	0.9480168	-5.888009



Transcript.ID.Array.Design.	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
14qI-4	-0.0802759	2.461865	-0.2286542	0.8213346	0.9390086	-5.878802
14qI-7	-0.1833446	1.921044	-0.6979508	0.4928124	0.7908752	-5.670548
14qI-8	-0.1590229	1.763027	-0.6084624	0.5493618	0.8025662	-5.726091
14qI-8	-0.0443589	1.688454	-0.1766977	0.8614273	0.9480168	-5.889004

## Comparacions

En aquest cas només es pot fer una comparació entre els miRNAs que s'expressen de manera diferent entre el grup *CPRC* i el grup *CPHS*. La funció `decideTests` del paquet `limma` es pot fer servir per seleccionar els miRNAs diferencialment expressats entre els dos grups que compleixen determinats criteris com per exemple: que tinguin un p-valor  $< 0.2$  ajustat pel mètode de Benjamini i Hochberg Benjamini & Hochberg (1995), també conegut com `fdr` (de l'anglès, False Discovery Rate) i un `logFC` igual a 1 (*fold change* = 2).

```
> require(limma)
> res<-decideTests(fit.main, method="separate", adjust.method="fdr", p.value=0.2, lfc=1)
```

La funció `decideTests` retorna per cada miRNA i comparació un valor  $+1$  quan es dona una sobreexpressió significativa (estadístic t-test  $> 0$ , FDR  $< 0.2$ ), un valor  $-1$  quan es dona una infraexpressió significativa (estadístic t-test  $< 0$ , FDR  $< 0.2$ ) i un valor  $0$  quan no hi ha diferències significatives (FDR  $> 0.2$ ). Sent 0.2 el punt de tall triat.

```
> sum.res.rows<-apply(abs(res),1,sum)
> res.selected<-res[sum.res.rows!=0,]
> print(summary(res))
```

```

          CPRCvsCPHS
Down           32
NotSig        9011
Up             13
```

D'aquesta manera trobem que hi ha 32 miRNAs infraexpressats i 13 miRNAs sobreexpressats. (Del total de miRNAs anotats de l'array).

Per tenir una visualització global del nombre de miRNAs diferencialment expressats es fa servir els *volcano-plots*. Aquests tipus de gràfics mostren a l'eix x els canvis d'expressió en escala logarítmica (l'anomenat efecte biològic) i a l'eix de les y l'estadístic B o el menys logaritme del p-valor (l'anomenat efecte estadístic). A la figura 9 es mostra el volcano plot obtingut durant aquest anàlisi, així podem veure que no tots ells corresponen a humans.

```
> load("./results/annotatedTopTab.Rda")
> miR.sel <- annotatedTopTab[annotatedTopTab$logFC>=1 | annotatedTopTab$logFC<=-1,]
> miR.seleccionats <- miR.sel[miR.sel$adj.P.Val<0.2,]
>
> library(EnhancedVolcano)
> EnhancedVolcano(toptable = annotatedTopTab,
+   lab = annotatedTopTab$Transcript.ID.Array.Design.,
+   x = 'logFC',
+   y = 'adj.P.Val',
+   xlim = c(-5.5, 5.5),
+   ylim = c(0, 2),
+   title = paste("miRNAs diferencialment expressats \nCRPC vs HSPC"),
```

```

+ subtitle = '',
+ FCcutoff = 1,
+ pCutoff = 0.2,
+ cutoffLineWidth = 0.25,
+ transcriptLabSize = 4.5,
+ col = c("black", "black", "black", "red"),
+ legendVisible = TRUE,
+ legendPosition = "bottom")

```

Seleccionem els miRNAs corresponents a l'espècie humana.

```

> miR.humans <- miR.seleccionats[miR.seleccionats$Species.Scientific.Name == "Homo sapiens",]
> hsa <- grep("hsa-", miR.seleccionats$Transcript.ID.Array.Design.)
> miR.humans.hsa <- miR.seleccionats[hsa,]
> knitr::kable(
+ miR.humans[,-c(1,2,3,5)], booktabs = TRUE,
+ caption = 'miRNAs humans seleccionats'
+ )

```

Table 6: miRNAs humans seleccionats

	Species.Scientific.Name	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
909	Homo sapiens	5.339211	-5.119746	0.0000443	0.0167125	2.0652173
972	Homo sapiens	6.366582	3.862019	0.0008940	0.1799190	-0.5493319
7847	Homo sapiens	2.859166	-3.912982	0.0007914	0.1799190	-0.4427114
9033	Homo sapiens	7.009391	4.055614	0.0005623	0.1591423	-0.1439402

```

> save(miR.humans.hsa, file = "./source/miR.humans.hsa.Rda")

```

Si volem seleccionar només els que corresponen a l'espècie humana ens trobem que només hi ha:

- 1 miRNAs i 1 snoRNA sobreexpressats hsa-miR-149-5p i U78
- 2 miRNAs infraexpressats hsa-miR-205-5p i hsa-miR-6737-5p

## Anàlisi de la significació biològica

Els anàlisis de significació biològica requereixen un nombre més elevat de miRNAs, per això en aquest pas canviem el criteri de selecció de miRNAs diferencialment expressats.

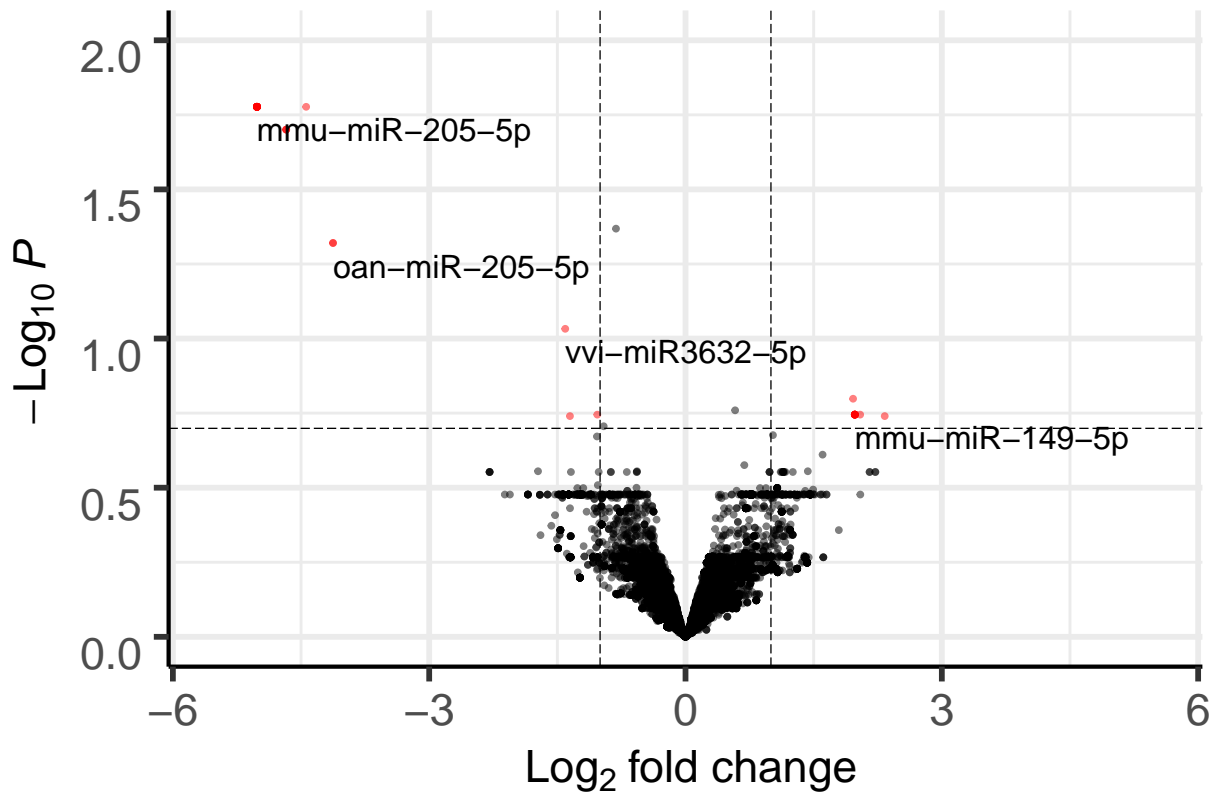
En aquest pas es seleccionen els miRNAs amb un  $\logFC = 1$  (*fold change* = 2) i amb un p-valor (sense ajustar)  $< 0,05$ , tal com es mostra a la figura 10.

```

> miR.nofdr <- miR.sel[miR.sel$P.Value<0.05,]
> miR.nofdr.humans <- miR.nofdr[miR.nofdr$Species.Scientific.Name == "Homo sapiens",]
> hsa2 <- grep("hsa-", miR.nofdr.humans$Transcript.ID.Array.Design.)
> miR.nofdr.humans.hsa <- miR.nofdr.humans[hsa2,]
> save(miR.nofdr.humans.hsa, file = "./source/miR.nofdr.humans.hsa.Rda")
> write.csv(miR.nofdr.humans.hsa, file = "./results/l1listatmiRNAsDE.csv")
> library(EnhancedVolcano)
> EnhancedVolcano(toptable = annotatedTopTab,
+ lab = annotatedTopTab$Transcript.ID.Array.Design.,
+ x = 'logFC',

```

## miRNAs diferencialment expressats CRPC vs HSPC



● NS ● Log2 FC ● P ● P & Log2 FC

Total = 9056 variables

Figure 9: Volcano plot miRNAs diferencialment expressats

```

+   y = 'P.Value',
+   xlim = c(-5.5, 5.5),
+   ylim = c(0, 6),
+   title = paste("miRNAs diferencialment expressats \nCRPC vs HSPC"),
+   subtitle = '',
+   FCcutoff = 1,
+   pCutoff = 0.05,
+   cutoffLineWidth = 0.25,
+   transcriptLabSize = 4.5,
+   col = c("black", "black", "black", "red"),
+   legendVisible = TRUE,
+   legendPosition = "bottom")

```

D'aquesta manera s'obtenen:

17 miRNAs infraexpressats

22 miRNAs sobreexpressats

Un cop definits els miRNAs diferencialment expressats, cal buscar els mRNA diana d'aquests miRNAs. Això s'ha fet cercant a la web de miRWalk: (miRWalk, miRanda, miRDB, RNA22 i TargetScan)

```

> miR.mRNA1 <- read.csv("./source/miRWalk1.csv", header = TRUE, sep = ",")
> miR.mRNA2 <- read.csv("./source/miRWalk2.csv", header = TRUE, sep = ",")
> miR.mRNA <- as.data.frame(rbind(miR.mRNA1, miR.mRNA2))

```

Seleccionem només aquelles parelles de miRNA-mRNA que apareixen com a mínim en 3 de les bases de dades consultades.

```

> miR.mRNA.sel <- miR.mRNA[miR.mRNA$SUM >= 3,]
> write.csv2(miR.mRNA.sel, "./results/miRmRNAsel.csv")

```

## Anàlisi mRNAs

### Protocol

Els materials i mètodes emprats són els mateixos que per l'estudi de miRNAs.

### Identificació dels grups experimentals

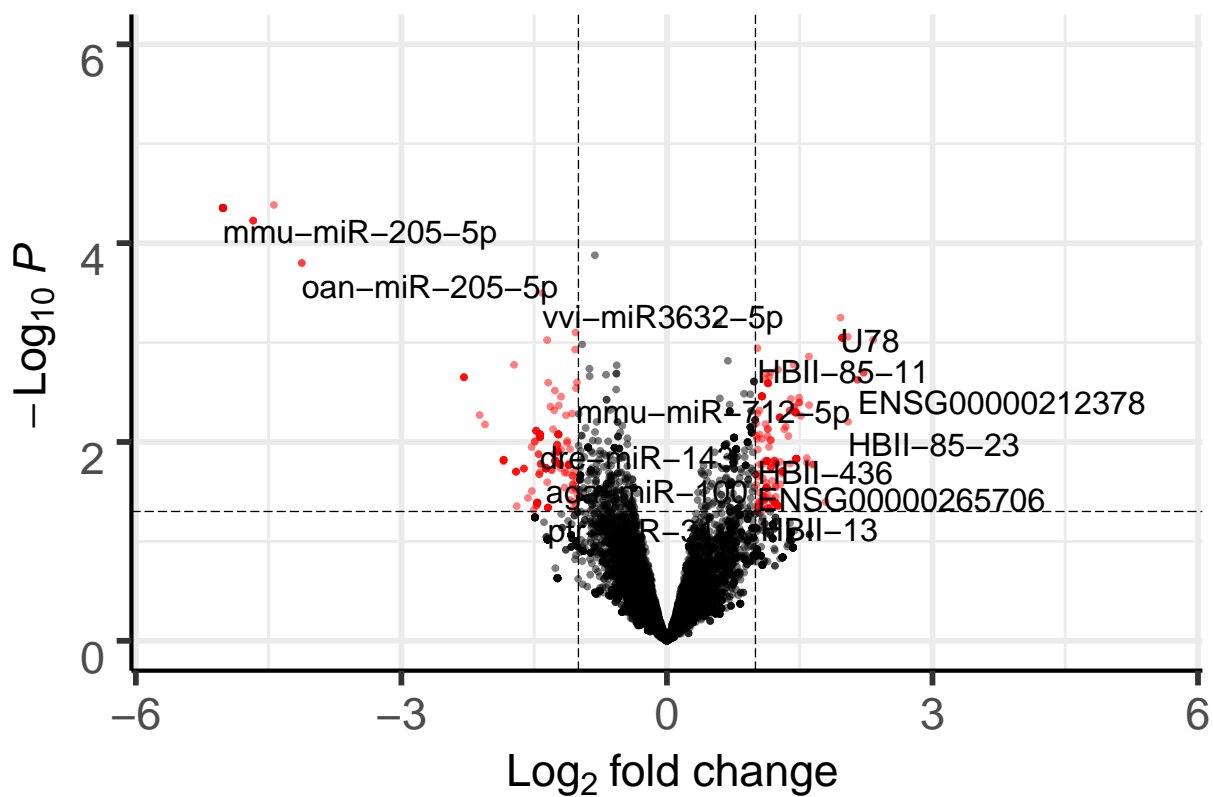
A continuació es mostra l'arxiu anomenat `targets` conté la informació referent als grups i a les mostres, de manera que relaciona cada arxiu `.CEL` amb una mostra o condició de l'experiment.

```

> targetsm <- read.csv("datamRNA/targetsm.csv", header = TRUE, sep = ",")
> knitr::kable(
+   targetsm, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Contingut del targets file')

```

## miRNAs diferencialment expressats CRPC vs HSPC



● NS ● Log2 FC ● P ● P & Log2 FC

Total = 9056 variables

Figure 10: Volcano plot miRNAs usats per la significaió biològica

Table 7: Contingut del targets file

FileName	Group	Sample	ShortName	Date
MP-01_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP01	CPHS.1	d1
MP-03_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP03	CPHS.2	d2
MP-04_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP04	CPHS.3	d2
MP-05_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP05	CPHS.4	d2
MP-06_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP06	CPHS.5	d2
MP-07_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP07	CPHS.6	d2
MP-08_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP08	CPHS.7	d1
MP-09_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP09	CPHS.8	d1
MP-12_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP12	CPHS.9	d1
MP-13_(Clariom_S_Human).CEL	CPHS	MP13	CPHS.10	d1
MP-14_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP14	CPRC.1	d1
MP-15_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP15	CPRC.2	d1
MP-16_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP16	CPRC.3	d1
MP-17_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP17	CPRC.4	d1
MP-18_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP18	CPRC.5	d1
MP-19_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP19	CPRC.6	d2
MP-20_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP20	CPRC.7	d2
MP-21_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP21	CPRC.8	d2
MP-22_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP22	CPRC.9	d2
MP-23_(Clariom_S_Human).CEL	CPRC	MP23	CPRC.10	d1

```
> #BiocManager::install("pd.clariom.s.human")
> #BiocManager::install("arrayQualityMetrics")
> #BiocManager::install("clariomshumanhthtranscriptcluster.db")
```

## Lectura dels arxius CEL

```
> require(oligo)
> celFilesm <- list.celfiles("./datamRNA", full.names = TRUE)
> require(Biobase)
> my.targets <- read.AnnotatedDataFrame(file.path("./datamRNA", "targets.csv"),
+                                     header = TRUE, row.names = 1,
+                                     sep=",")
> rawDatam <- read.celfiles(celFilesm, phenoData = my.targets)
> my.targets@data$Group <- as.factor(my.targets@data$Group)
```

```
> my.targets@data$Sample->rownames(pData(rawDatam))
> colnames(rawDatam) <- rownames(pData(rawDatam))
> save(rawDatam, file = "./sourcemRNA/rawDatam.Rda")
```

```
> rm(celFilesm)
```

## Control de qualitat per les dades crues

	array	sampleNames	*1	*2	*3	Group	Sample	Date
<input type="checkbox"/>	1	MP02				CPHS	MP02	110717
<input type="checkbox"/>	2	MP03				CPHS	MP03	110717
<input type="checkbox"/>	3	MP04			x	CPHS	MP04	110717
<input type="checkbox"/>	4	MP05				CPHS	MP05	110717
<input type="checkbox"/>	5	MP06			x	CPHS	MP06	120717
<input type="checkbox"/>	6	MP07			x	CPHS	MP07	120717
<input type="checkbox"/>	7	MP08				CPHS	MP08	120717
<input type="checkbox"/>	8	MP09				CPHS	MP09	120717
<input type="checkbox"/>	9	MP11				CPHS	MP11	130717
<input type="checkbox"/>	10	MP12				CPHS	MP12	130717
<input type="checkbox"/>	11	MP14				CPRC	MP14	130717
<input type="checkbox"/>	12	MP15				CPRC	MP15	110717
<input type="checkbox"/>	13	MP16				CPRC	MP16	110717
<input type="checkbox"/>	14	MP17				CPRC	MP17	110717
<input type="checkbox"/>	15	MP18				CPRC	MP18	110717
<input type="checkbox"/>	16	MP19	x		x	CPRC	MP19	120717
<input type="checkbox"/>	17	MP20		x	x	CPRC	MP20	120717
<input type="checkbox"/>	18	MP21	x		x	CPRC	MP21	120717
<input type="checkbox"/>	19	MP22				CPRC	MP22	130717
<input type="checkbox"/>	20	MP23			x	CPRC	MP23	120717

Figure 11: Taula resum de l'arxiu index.html, produït pel paquet arrayQualityMetrics, raw data

```
> library(arrayQualityMetrics)
> arrayQualityMetrics(rawDatam, outdir = file.path("./resultsmRNA", "QCDir.Raw"))
```

A la figura 11 es pot veure com exceptuant 2 mostres (MP17 i MP19) la resta no presenta asteriscs a la taula resum.

L'anàlisi de components principals (PCA), permet d'una manera més clara identificar possibles mostres problema.

```
> load("./source/plotPCA3.Rda")
> plotPCA3(exprs(rawDatam), labels = targetsm$Sample, factor = targetsm$Group,
+         title="Raw data", scale = FALSE, size = 3,
+         colores = c("purple", "orange"))
```

Es pot veure que el primer component del PCA representa un 35.2 % de la variabilitat de les mostres. Sembla

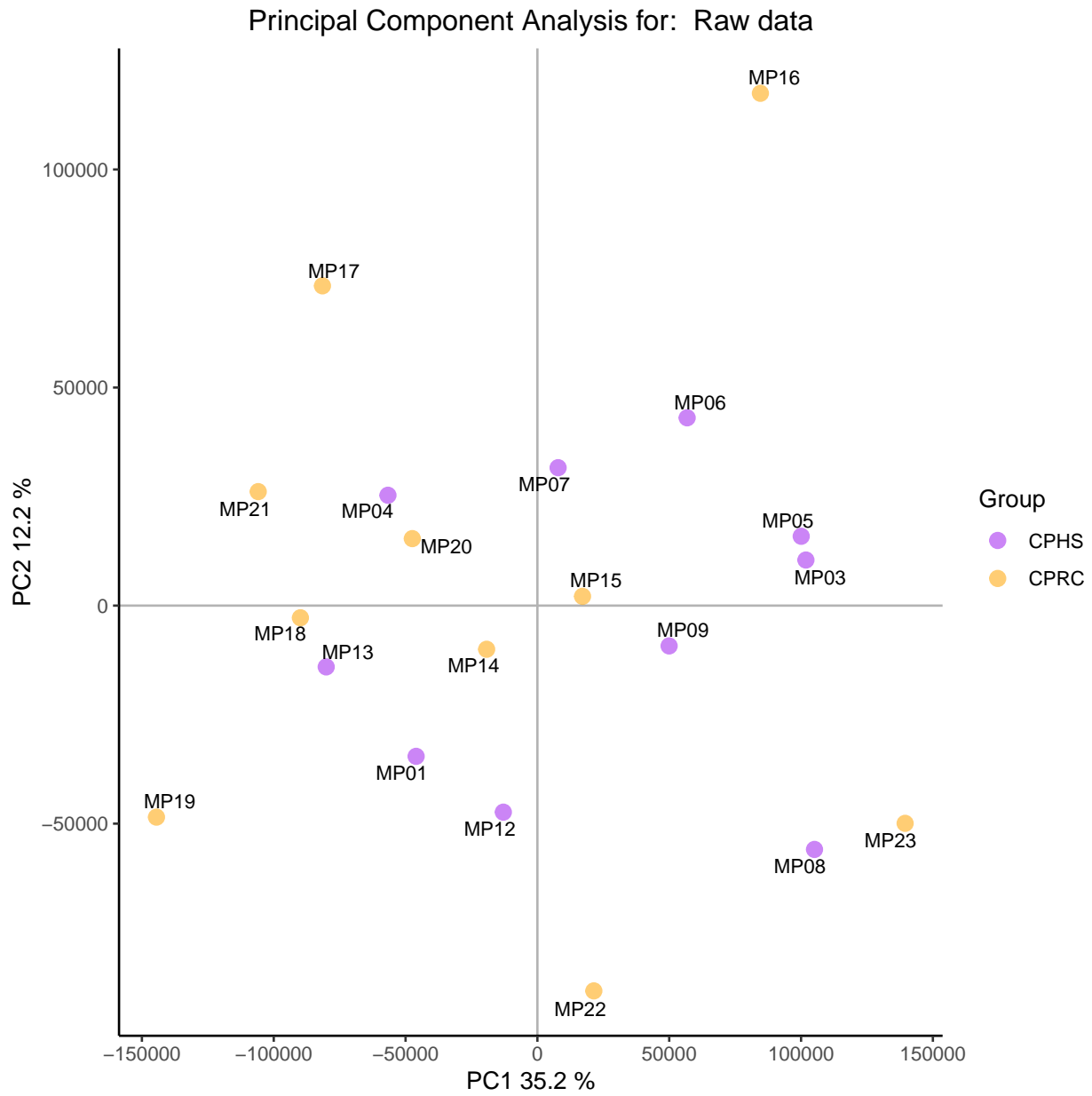


Figure 12: PCA raw data



ser que hi ha certa heterogeneïtat entre les mostres de l'estudi. Encara que no cal perdre de vista que aquest anàlisi correspon a les dades *crues* caldrà veure com queda aquest mateix gràfic un cop normalitzades les dades.

Seguint en la mateixa línia es pot visualitzar la distribució de la intensitat dels arrays mitjançant `boxplots`. La figura 12 mostra la distribució de les intensitats per totes les mostres de l'estudi.

```
> boxplot(rawDatam, cex.axis=0.5, las=2, which="all",
+         col = c(rep("purple", 10), rep("orange", 10)),
+         main="Distribució dels valors d'intenstitats crus")
```

A la figura 12 es pot observar certa variació en la intensitat, però es pot considerar l'esperada per a dades *crues*.

### Normalització de les dades

```
> eset_rnam <- rma(rawDatam)
```

```
Background correcting
Normalizing
Calculating Expression
```

### Control de qualitat per les dades normalitzades

```
> arrayQualityMetrics(eset_rnam, outdir = file.path("./resultsmRNA", "QCDir.Norm"), force=TRUE)
```

La figura 13 mostra la taula resum obtinguda amb les dades normalitzades. Es pot veure que un cop feta la normalització la mostra MP23 presenta 1 asteriscs i la mostra MP19 en presenta 2.

```
> plotPCA3(exprs(eset_rnam), labels = targetsm$Sample, factor = targetsm$Group,
+          title="Normalized data", scale = FALSE, size = 3,
+          colores = c("purple", "orange"))
```

A la figura 14 es pot veure com ara el primer component del PCA representa un 29 % de la variabilitat de les mostres, és lleugerament menor que l'obtingut amb les dades *crues* (35.2 %). Amb les dades normalitzades s'observa una certa agrupació de les mostres explicada pel segon component del PCA, el qual representa un percentatge molt menor en comparació el primer (10.4 %). Tot i així la mostra MP19 queda separada de la resta de mostres.

### Eliminació de mostres

```
> library(oligo)
> #load("./sourcemRNA/rawDatam.Rda")
> #image(rawDatam, which =16)
> #rm(rawDatam)
```

### Distribució dels valors d'intenstitats crus

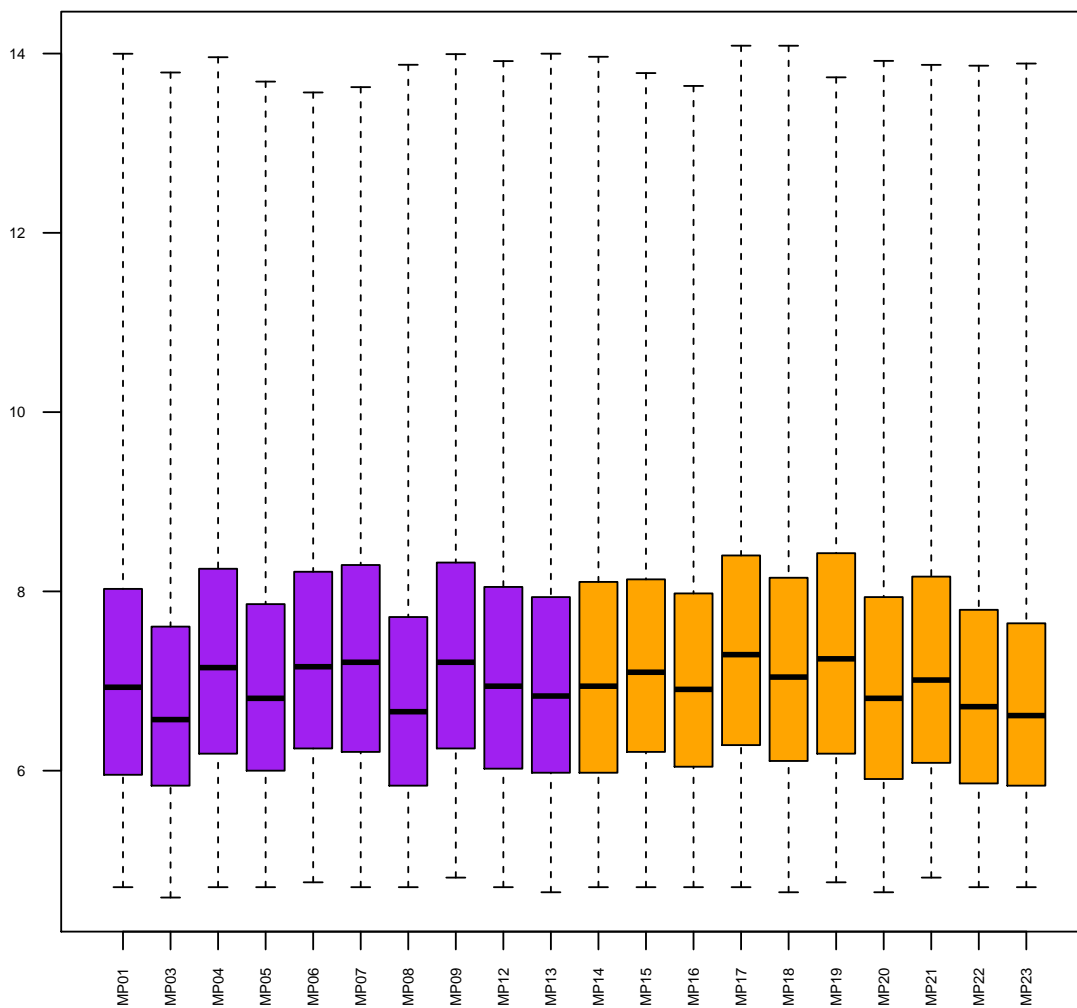


Figure 13: Boxplot per la intensitat del arrays (Raw Data)

<input type="checkbox"/>	array	sampleNames	*1	*2	*3	Group	Sample	Date
<input type="checkbox"/>	1	MP01				CPHS	MP01	140219
<input type="checkbox"/>	2	MP03				CPHS	MP03	90218
<input type="checkbox"/>	3	MP04				CPHS	MP04	90218
<input type="checkbox"/>	4	MP05				CPHS	MP05	90218
<input type="checkbox"/>	5	MP06				CPHS	MP06	90218
<input type="checkbox"/>	6	MP07				CPHS	MP07	90218
<input type="checkbox"/>	7	MP08				CPHS	MP08	140219
<input type="checkbox"/>	8	MP09				CPHS	MP09	140219
<input type="checkbox"/>	9	MP12				CPHS	MP12	140219
<input type="checkbox"/>	10	MP13				CPHS	MP13	140219
<input type="checkbox"/>	11	MP14				CPRC	MP14	140219
<input type="checkbox"/>	12	MP15				CPRC	MP15	90219
<input type="checkbox"/>	13	MP16				CPRC	MP16	90219
<input type="checkbox"/>	14	MP17				CPRC	MP17	90219
<input type="checkbox"/>	15	MP18				CPRC	MP18	90219
<input type="checkbox"/>	16	MP19	x	x		CPRC	MP19	140219
<input type="checkbox"/>	17	MP20				CPRC	MP20	140219
<input type="checkbox"/>	18	MP21				CPRC	MP21	140219
<input type="checkbox"/>	19	MP22				CPRC	MP22	140219
<input type="checkbox"/>	20	MP23	x			CPRC	MP23	90219

Figure 14: Taula resum de l'arxiu index.html, produït pel paquet arrayQualityMetrics, normalized data

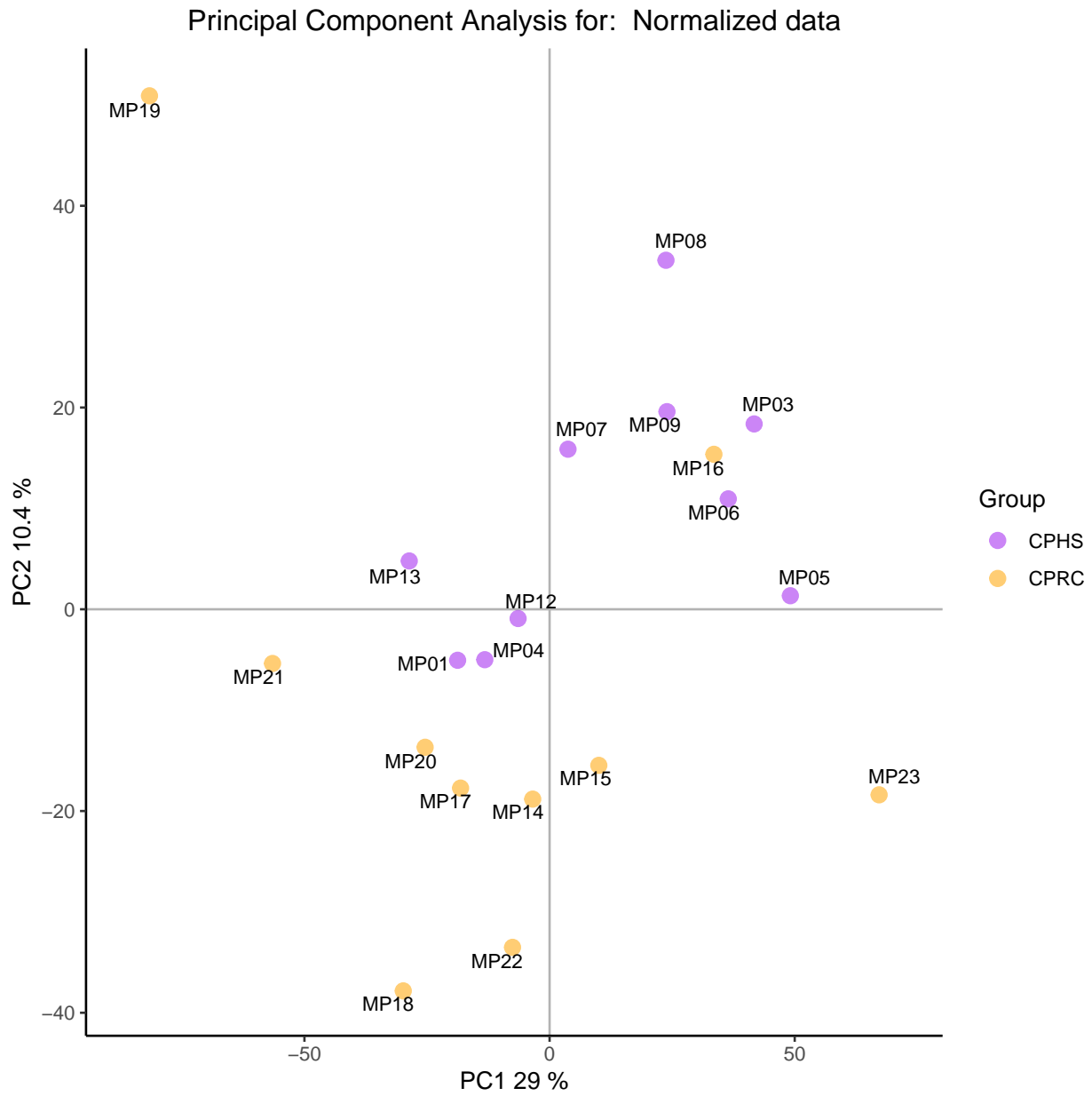


Figure 15: PCA Normalized data

Així veiem que el chip de l'array corresponent a la mostra MP19 no presenta cap anomalia, un cop fet l'anàlisi amb i sense la mostra es decideix no eliminar-la.

Igual que amb les dades *crues* fem la representació de les intensitats mitjançant un `boxplot` i tal com és d'esperar, degut a la manera en que el mètode RMA normalitza els valors d'intensitat dels arrays per totes les mostres, la variabilitat observada durant l'anàlisi de les dades *crues* ha desaparegut pràcticament (figura 15).

```
> boxplot(eset_rnam, cex.axis=0.5, las=2, which="all",
+         col = c(rep("purple", 10), rep("orange", 10)),
+         main="Distribució dels valors d'intensitats Normalized Data")
```

## Filtratge

És interessant filtrar aquells mRNAs els quals presenten variacions degut a la variació aleatòria, ja que aquests mRNAs s'espera que no es trobin diferencialment expressats, i així es reduïx el nombre de test que cal realitzar augmentant el potencial estadístic d'aquests Hackstadt & Hess (2009).

La funció `nsFilter` del paquet de bioconductor `genefilter` permet eliminar aquests mRNAs en funció d'un punt de tall per a la variabilitat, a més permet eliminar aquells `probesets` de l'array que no tenen un identificador de mRNA associat.

```
> require(genefilter)
> require(clariomshumanhttranscriptcluster.db)
>
> annotation(eset_rnam) <- "clariomshumanhttranscriptcluster.db"
> filteredm <- nsFilter(eset_rnam,
+                       require.entrez = TRUE, remove.dupEntrez = TRUE,
+                       var.filter=TRUE, var.func=IQR, var.cutoff=0.75,
+                       filterByQuantile=TRUE, feature.exclude = "^AFFX")
```

```
> eset_filteredm <- filteredm$eset
> #dim(exprs(eset_filteredm)) #gens un cop fet el filtrat
> save(eset_filteredm, file="./results/eset_filteredm.Rda")
```

Després de filtrar queden 4632 mRNAs.

Tornem a l'anàlisi de components principals (PCA) amb les dades ja filtrades (Figura 16). Així veiem una agrupació de les mostres en funció dels dos components.

```
> plotPCA3(exprs(eset_filteredm), labels = targets$Sample, factor = targets$Group,
+          title="Normalized Data_filtered", scale = FALSE, size = 3,
+          colores = c("purple", "orange"))
```

## Identificació dels gens diferencialment expressats

### La matriu de disseny

```
> require(limma)
> eset_filteredm@phenoData@data$Group <- as.factor(eset_filteredm@phenoData@data$Group)
> designMatm <- model.matrix(~0+Group, pData(eset_filteredm))
```

## Distribució dels valors d'intensitats Normalized Data

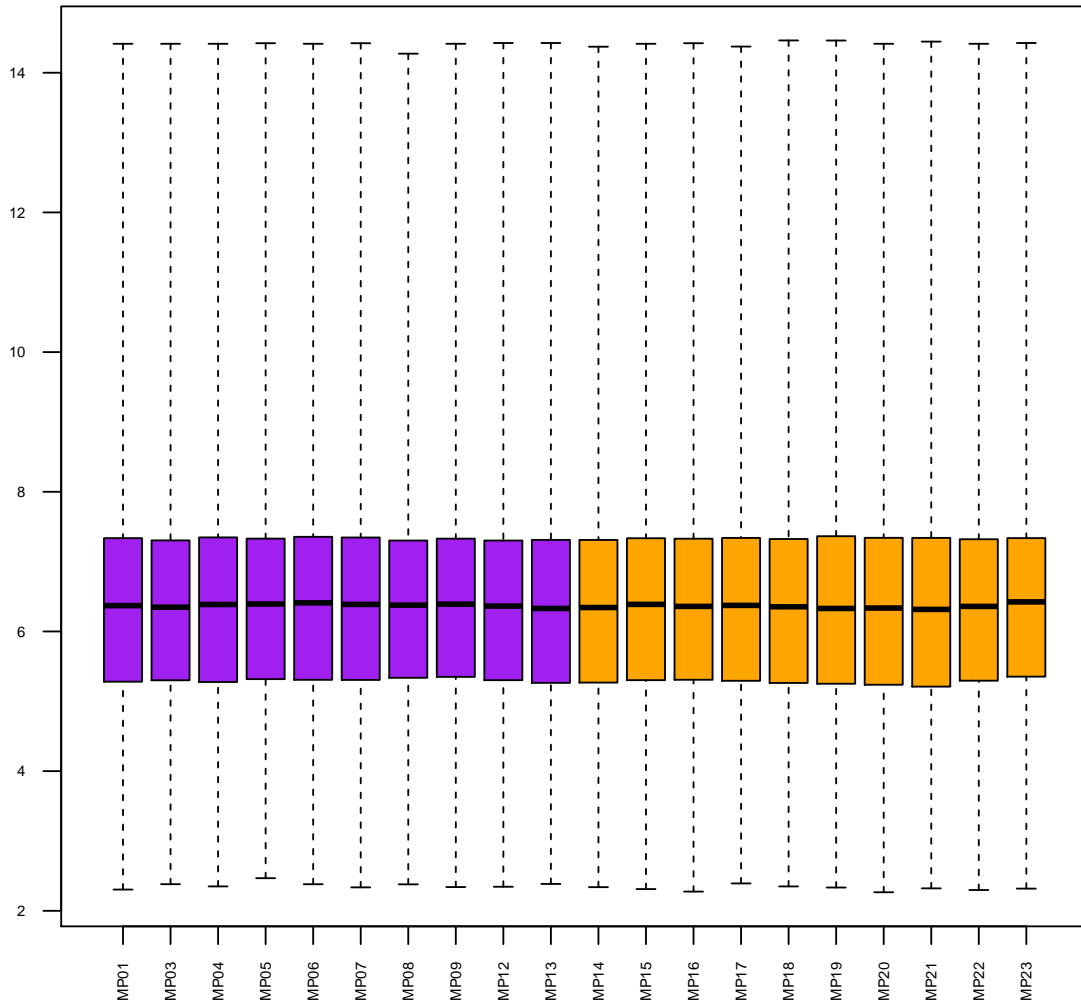


Figure 16: Boxplot per la intensitat del arrays, normalized data

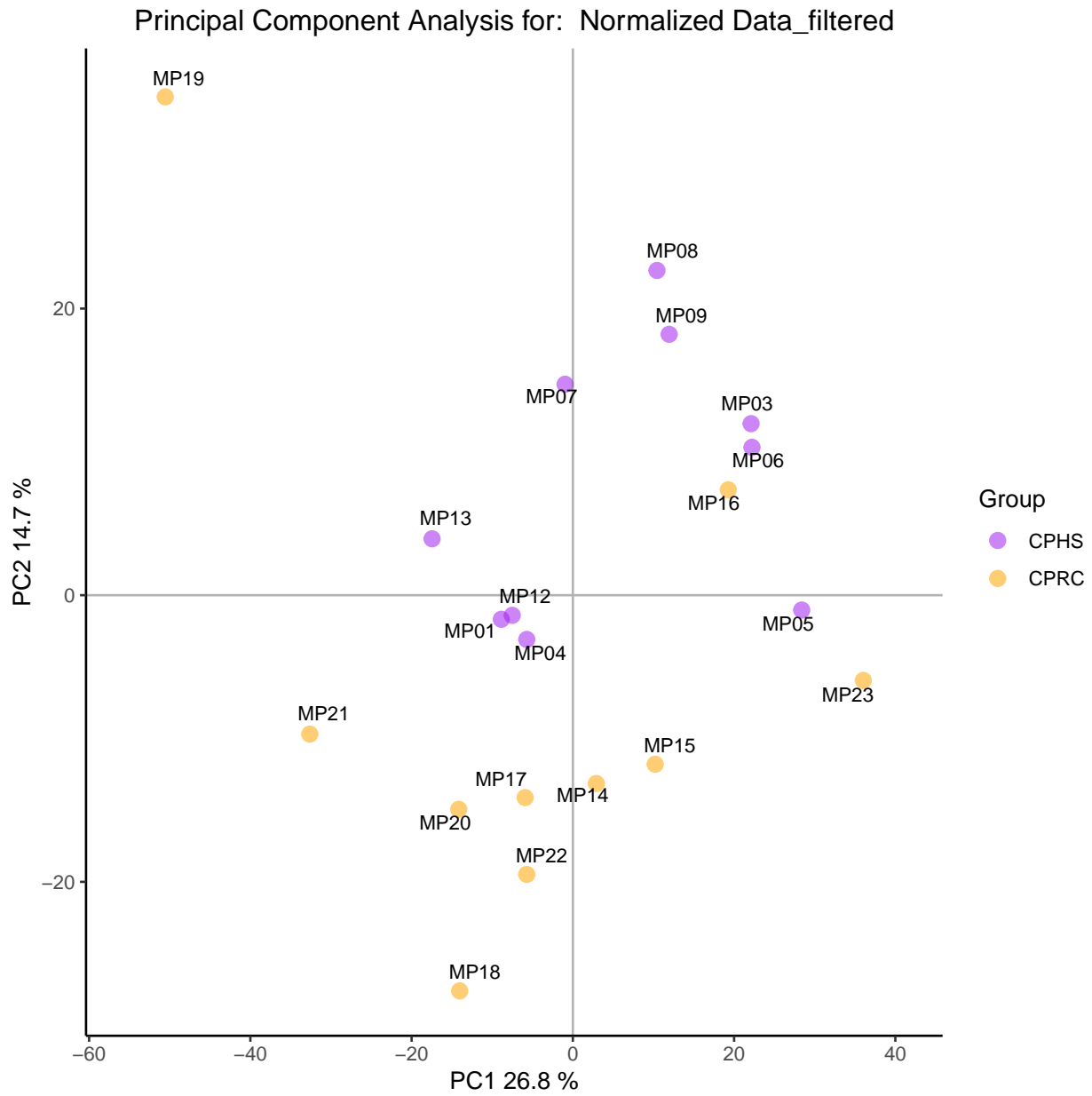


Figure 17: PCA Dades Filtrades

```

> colnames(designMatm) <- c("CPHS", "CPRC")
>
> knitr::kable(
+   designMatm, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Matriu de disseny')

```

Table 8: Matriu de disseny

	CPHS	CPRC
MP01	1	0
MP03	1	0
MP04	1	0
MP05	1	0
MP06	1	0
MP07	1	0
MP08	1	0
MP09	1	0
MP12	1	0
MP13	1	0
MP14	0	1
MP15	0	1
MP16	0	1
MP17	0	1
MP18	0	1
MP19	0	1
MP20	0	1
MP21	0	1
MP22	0	1
MP23	0	1

### La matriu de contrasts

```

> cont.matrixm <- makeContrasts (CPRCvsCPHS = CPRC-CPHS,levels=designMatm)
> knitr::kable(
+   cont.matrixm, booktabs = TRUE,
+   caption = 'Matriu de contrast')

```

Table 9: Matriu de contrast

	CPRCvsCPHS
CPHS	-1
CPRC	1

### Model d'estimació i selecció de mRNAs

```

> require(limma)
> fitm<-lmFit(eset_filteredm, designMatm)
> fit.mainm<-contrasts.fit(fitm, cont.matrixm)
> fit.mainm<-eBayes(fit.mainm)

```



## mRNAs diferencialment expressats

```
> topTabm <- topTable (fit.mainm, number=nrow(fit.mainm), coef="CPRCvsCPHS", adjust="fdr")
> short5 <- head(topTabm)
> knitr::kable(
+   short5, booktabs = TRUE,
+   caption = 'mRNAs diferencialment expressats')
```

Table 10: mRNAs diferencialment expressats

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
TC0X00007493.hg.1	2.2667676	7.563016	7.060933	0.0000002	0.0011178	6.425706
TC0100018284.hg.1	0.8482341	7.445828	4.798655	0.0000664	0.0853818	1.680226
TC0100016952.hg.1	1.3076362	6.456292	4.612645	0.0001069	0.0853818	1.267004
TC0500008785.hg.1	-0.9741793	7.872982	-4.574653	0.0001179	0.0853818	1.182469
TC0100011012.hg.1	-1.5044029	5.367050	-4.546408	0.0001267	0.0853818	1.119598
TC2000007492.hg.1	-0.9492259	6.784868	-4.512092	0.0001384	0.0853818	1.043197

## Anotació

L'anotació es pot fer de diferents maneres, en aquest cas s'ha optat per definir una funció anomenada `annotatedTopTable` la qual, donats: la `topTable` obtinguda anteriorment gràcies a la funció del paquet `limma` i el paquet d'anotacions corresponent a l'espècie i l'array amb el que s'està treballant, en aquest cas el paquet `clariomshumanhttranscriptcluster.db`, genera una taula amb la informació de la `topTable` i informació adicional com són el símbol del gen, el codi ENTREZID i el nom del gen per a cada `probeset`.

```
> annotatedTopTable <- function(topTab, anotPackage)
+ {
+   topTab <- cbind(PROBEID=rownames(topTab), topTab)
+   myProbes <- rownames(topTab)
+   thePackage <- eval(parse(text = anotPackage))
+   geneAnots <- select(thePackage, myProbes, c("SYMBOL", "ENTREZID", "GENENAME"))
+   annotatedTopTab <- merge(x=geneAnots, y=topTab, by.x="PROBEID", by.y="PROBEID")
+   return(annotatedTopTab)
+ }

> require(clariomshumanhttranscriptcluster.db)
> topAnnotatedm <- annotatedTopTable(topTabm, anotPackage="clariomshumanhttranscriptcluster.db")
```

La taula 11 mostra les anotacions afegides a la taula resultant `topTable`.

Table 11: anotació de la `topTable` per la comparació "CPRCvsCPHS"

PROBEID	SYMBOL	ENTREZID	GENENAME
TC0100006501.hg.1	CPTP	80772	ceramide-1-phosphate transfer protein
TC0100006577.hg.1	RER1	11079	retention in endoplasmic reticulum sorting receptor 1
TC0100006602.hg.1	ACTRT2	140625	actin related protein T2
TC0100006723.hg.1	VAMP3	9341	vesicle associated membrane protein 3
TC0100006725.hg.1	PER3	8863	period circadian regulator 3

## Comparacions

Igual que pels miRNAs es fa servir la funció `decideTests` del paquet `limma` per seleccionar els mRNAs diferencialment expressats entre els dos grups que compleixen determinats criteris com per exemple: que tinguin un p-valor  $< 0.2$  ajustat pel mètode de Benjamini i Hochberg Benjamini & Hochberg (1995), també conegut com `fdr` (de l'anglès, False Discovery Rate) i un logFC igual a 0,6 (*fold change* = 1,5).

```
> require(limma)
> resm<-decideTests(fit.mainm, method="separate", adjust.method="fdr", p.value=0.2, lfc=0.6)

> sum.res.rowsm<-apply(abs(resm),1,sum)
> res.selectedm<-resm[sum.res.rowsm!=0,]
> print(summary(resm))
```

```
          CPRCvsCPHS
Down           26
NotSig        4561
Up             45
```

D'aquesta manera trobem que hi ha 26 mRNAs infraexpressats i 45 mRNAs sobreexpressats. Per tenir una visualització global del nombre de mRNAs diferencialment expressats es fa servir els *volcano-plots*.

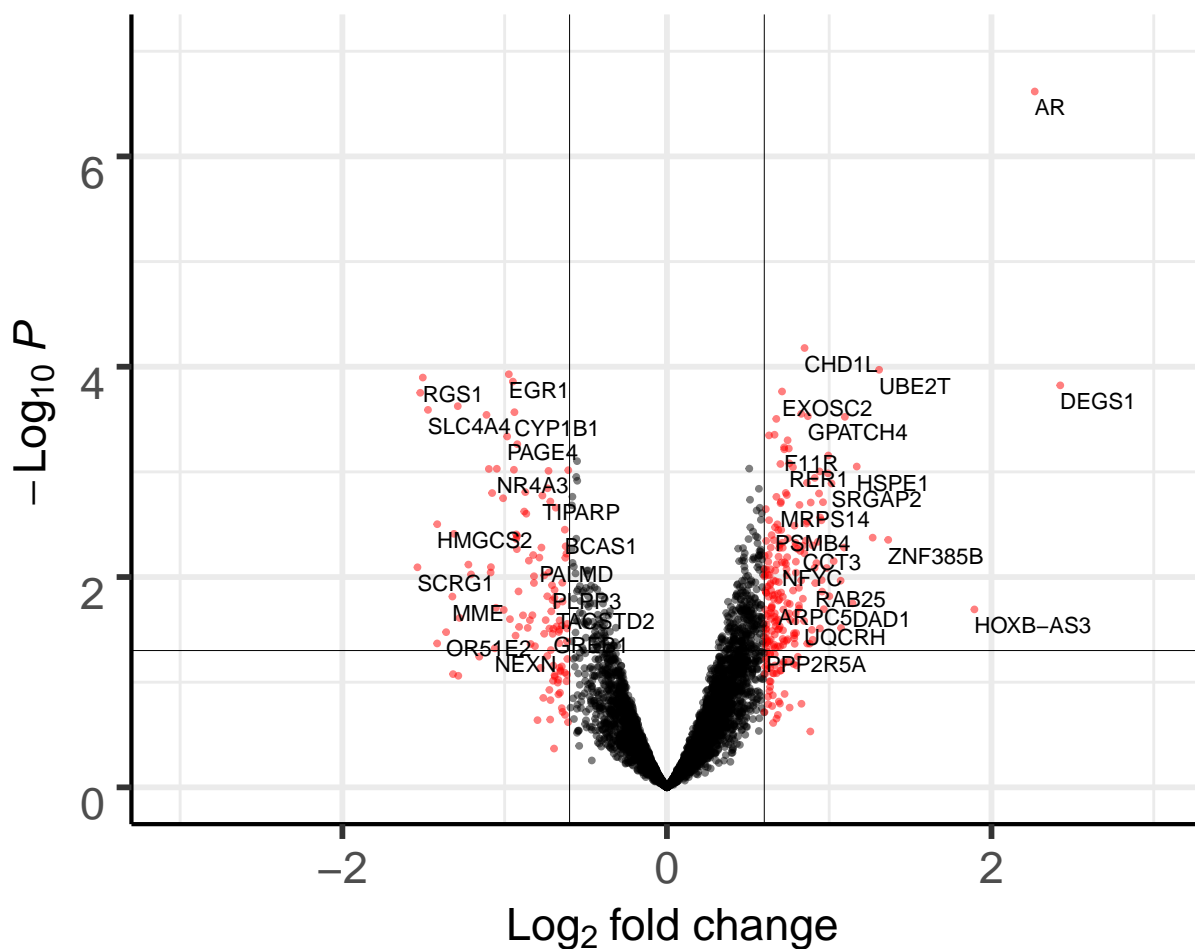
## Heatmap

Aquests resultats obtinguts es poden visualitzar gràficament mitjançant l'ús de *heatmaps*.

```
> load("./sourcemRNA/eset_rmam.Rda")
> res.selected2<-as.matrix(res.selectedm)
> probesInHeatmap <- rownames(res.selected2)
> HMdata <- exprs(eset_rmam)[rownames(exprs(eset_rmam)) %in% probesInHeatmap,]
> geneSymbols <- select(clariomshumanhttranscriptcluster.db, rownames(HMdata), c("SYMBOL"))
> SYMBOLS<- geneSymbols$SYMBOL
> rownames(HMdata) <- SYMBOLS
> colnames(HMdata) <- targetsm$Sample
> write.csv(HMdata, file = file.path("./resultsmRNA/data4Heatmap.csv"))
```

```
> load("./results/eset_filteredm.Rda")
> color.map <- function(grupo) {
+   if (grupo=="CPRC"){
+     c<- "orange"
+   }else{
+
+     c<- "purple"
+   }
+   return(c)}
>
> grupColors <- unlist(lapply(pData(eset_filteredm)$Group, color.map))
> require("gplots")
> heatmap.2(HMdata,
+           col=redgreen, scale="row",
```

## mRNAs diferencialment expressats CPRCvsCPHS



Total = 4632 variables

Figure 18: Volcano plot mRNAs diferencialment expressats

```
+ ColSideColors=grupColors, key=TRUE, symkey=FALSE,
+ density.info="none", trace="none", cexCol=1)
```

## Anàlisi de la significació biològica

Un cop obtinguda la llista de mRNAs que es troben diferencialment expressats entre els dos grups cal donar-li una interpretació biològica per tal d'esbrinar la rellevància dels resultats obtinguts. Hi ha diferents maneres d'abordar aquesta qüestió, en aquest cas es farà servir un mètode d'enriquiment bàsic que implementa el paquet de Bioconductor ReactomePA. Aquests tipus d'anàlisi necessiten un nombre de mRNA relativament alt, per això es solen aplicar seleccions menys restrictives que en els altres passos de l'anàlisi de microarrays. En aquest cas s'ha optat per seleccionar aquells gens amb un p-valor (sense ajustar) < 0,05.

```
> DEmRNAs <- topAnnotatedm[topAnnotatedm$P.Value<0.05,]
> save(DEmRNAs, file = "./sourcemRNA/DEmRNAs.Rda")
> geneList <- DEmRNAs$logFC
> attr(geneList, "names") <- DEmRNAs$ENTREZID
> geneList <- sort(geneList, decreasing = TRUE)
```

```
> library(ReactomePA)
> de <- names(geneList)
> mapped_genes2GO <- mappedkeys(org.Hs.egGO)
> mapped_genes2KEGG <- mappedkeys(org.Hs.egPATH)
> mapped_genes <- union(mapped_genes2GO , mapped_genes2KEGG)
> universe <- mapped_genes
```

```
> enrich.result <- enrichPathway(gene= de, pvalueCutoff=0.05, readable=T,
+                               pAdjustMethod = "fdr", organism = "human",
+                               universe = universe)
> enrich.result2 <- as.data.frame(enrich.result)
> comparison <- "CPRCvsCPHS"
> #dotplot(enrich.result, showCategory=35)
> #quargem les figures
> pdf(file=paste0("./resultsmRNA/", "ReactomePADotplot2.", comparison, ".pdf"))
> print(dotplot(enrich.result, showCategory = 35, font.size = 6,
+              title = "Reactome Pathway"))
> dev.off()
>
> #emapplot(enrich.result, showCategory = 35, color = "p.adjust", layout = "kk")
```

pdf  
2

Seleccionem els gens de la via de senyalització Wnt i AR.

```
> vies <- enrich.result@result
> write.csv(vies, file = "./results/vies.csv")
> save(enrich.result, file = "./sourcemRNA/enrichresult.Rda")
```

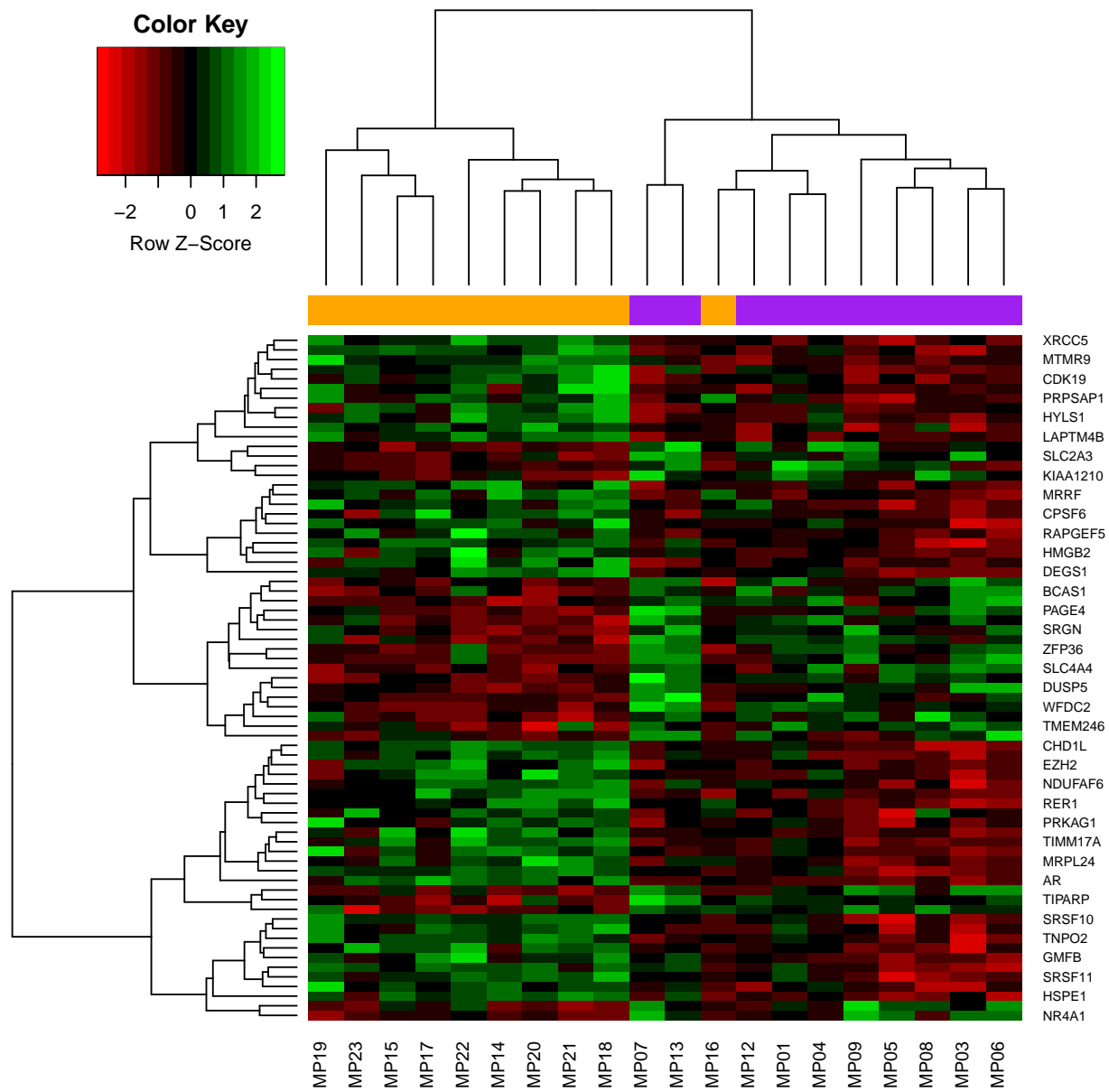


Figure 19: Heatmap mRNAs differentialment expressats

```

> Wnt.EP <- enrich.result@result[grep("WNT",enrich.result@result$Description),]
> Wnt <- Wnt.EP[Wnt.EP$p.adjust<0.45,]
> AR <- enrich.result@result[grep("androgen", enrich.result@result$Description),]
>
> llista.gens.Wnt <- Wnt$geneID
> llista.gens.AR <- AR$geneID
>
> llistat <- function(llista.gens){
+   gens <- c()
+
+   for (i in 1:length(llista.gens)){
+
+     gens.id <- strsplit(llista.gens[i], "/")
+     gens.id <- unlist(gens.id)
+     gens <- c(gens, gens.id)
+     gens <- unique(gens)
+   }
+   gens
+ }
>
> Wnt.gens <- llistat(llista.gens.Wnt)
> AR.gens <- llistat(llista.gens.AR)
>
> Wnt.DEmRNAs <- DEmRNAs[DEmRNAs$SYMBOL %in% Wnt.gens,]
> AR.DEmRNAs <- DEmRNAs[DEmRNAs$SYMBOL %in% AR.gens,]
> save(Wnt.DEmRNAs, file = "/sourcemRNA/Wnt.DEmRNAs.Rda")
> save(AR.DEmRNAs, file = "/sourcemRNA/AR.DEmRNAs.Rda")

```

Un cop determinats els mRNAs de la via Wnt diferencialment expressats cerquem els que es troben en la llista de parelles miRNA-mRNA obtinguda anteriorment.

```

> load("/sourcemRNA/Wnt.DEmRNAs.Rda")
> load("/sourcemRNA/AR.DEmRNAs.Rda")
>
> #miRWalk analysis
>
> Wnt.reg <- Wnt.DEmRNAs[Wnt.DEmRNAs$ENTREZID %in% miR.mRNA.sel$EntrezID,]
> save(Wnt.reg, file = "/results/Wntgenesregulats.Rda")
> miR.Wnt <- miR.mRNA.sel[miR.mRNA.sel$EntrezID %in% Wnt.DEmRNAs$ENTREZID,]
> save(miR.Wnt, file = "/results/miRwnt.Rda")
> write.csv(miR.Wnt, file = "/results/miRwnt.csv")
> AR.reg <- AR.DEmRNAs[AR.DEmRNAs$ENTREZID %in% miR.mRNA.sel$EntrezID,]
> save(AR.reg, file = "/results/ARgenesregulats.Rda")
> miR.AR <- miR.mRNA.sel[miR.mRNA.sel$EntrezID %in% AR.DEmRNAs$ENTREZID,]
> save(miR.AR, file = "/results/miRAR.Rda")
> write.csv(miR.AR, file = "/results/miRAR.csv")

```

Així s'han obtingut les taules T4.1 i T4.2 del Capítol 4 de la secció Resultats.

## Referències

- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2346101> <http://www.jstor.org/http://www.jstor.org/action/showPublisher?publisherCode=black>.
- Chrominski, K., & Tkacz, M. (2015). Comparison of High-Level Microarray Analysis Methods in the Context of Result Consistency. *PLOS ONE*, 10(6), e0128845. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0128845>
- Hackstadt, A. J., & Hess, A. M. (2009). Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, 10, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-11>
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2), 249–264. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/4.2.249>
- Smyth, G. K. (2004). Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1), 1–25. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>
- Smyth, G. K. (2005). limma: Linear Models for Microarray Data. In *Bioinformatics and computational biology solutions using r and bioconductor* (pp. 397–420). [https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0\\_23](https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23)
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5116–5121. <https://doi.org/10.1073/pnas.091062498>

# **ANNEX 3**



# ANNEX 3

*Anàlisi de dades del TCGA*

*27/9/2019*

## Localització de les dades

```
workingDir<-getwd()
dataDir<-file.path(workingDir,"data")
dir.create("results")
resultsDir<-file.path(workingDir,"results")
dir.create("celfiles")
celfilesDir<-file.path(workingDir,"celfiles")
setwd(workingDir)
```

## Instal·lació de llibreries R:

```
if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")
BiocManager::install()
BiocManager::install("Biobase")
BiocManager::install("hgu133a.db")
BiocManager::install("affy")
BiocManager::install("affyPLM")
BiocManager::install("arrayQualityMetrics")
BiocManager::install("genefilter")
BiocManager::install("limma")
BiocManager::install("annotate")
BiocManager::install("annaffy")
BiocManager::install("hwriter")
BiocManager::install("gplots")
BiocManager::install("GOstats")
```

## Lectura de les dades

```
library(affy)
celFiles <- list.celfiles("./data", full.names = F)
#preparem l'arxiu targets.txt
target<-read.csv2("./data/GSE21122_targets.csv", sep=",")
targets<-cbind(celFiles,target)
write.table(targets,"targets.txt", quote = FALSE, sep = "\t", row.names = FALSE)
#creem l'objecte affybatch
my.targets <-read.AnnotatedDataFrame(file.path("./data","targets.txt"),header = TRUE,
                                     row.names = 1,sep="\t")
celFiles <- list.celfiles("./data", full.names = T)
rawData<-read.affybatch(celFiles, phenoData = my.targets)
show(rawData)
```

```
## AffyBatch object
## size of arrays=712x712 features (91 kb)
## cdf=HG-U133A (22283 affyids)
## number of samples=158
## number of genes=22283
## annotation=hgu133a
## notes=
```

```
#head(colnames(rawData))
#tail(rownames(rawData))
```

## Control de qualitat de les dades crues

```
library(arrayQualityMetrics)
arrayQualityMetrics(rawData, outdir = file.path("./results", "QCDir.Raw"), force=TRUE)
```

## Normalització de les dades

```
require(affy)
require(affyPLM)
```

```
## Loading required package: affyPLM

## Loading required package: gcrma

## Loading required package: preprocessCore
```

```
eset_rma <- affy::rma(rawData)
```

```
## Background correcting
## Normalizing
## Calculating Expression
```

## Control de qualitat de les dades normalitzades

```
arrayQualityMetrics(eset_rma, outdir = file.path("./results", "QCDir.Norm"), force=TRUE)
```

Mitjançant un PCA podem avaluar la presència o no de “batch effects”

```
#Primer però hem de definir la funció
```

```
require(ggplot2)
require(ggrepel)
```

```
plotPCA <- function (datos, factor, title, scale,colores, size = 1.5, glineas = 0.25) {
```

```

data <- prcomp(t(datos),scale=scale)

dataDf <- data.frame(data$x)
Group <- factor
loads <- round(data$sdev^2/sum(data$sdev^2)*100,1)

p1 <- ggplot(dataDf,aes(x=PC1, y=PC2)) +
  theme_classic() +
  geom_hline(yintercept = 0, color = "gray70") +
  geom_vline(xintercept = 0, color = "gray70") +
  geom_point(aes(color = Group), alpha = 0.55, size = 3) +
  coord_cartesian(xlim = c(min(data$x[,1])-5,max(data$x[,1])+5)) +
  scale_fill_discrete(name = "Group")

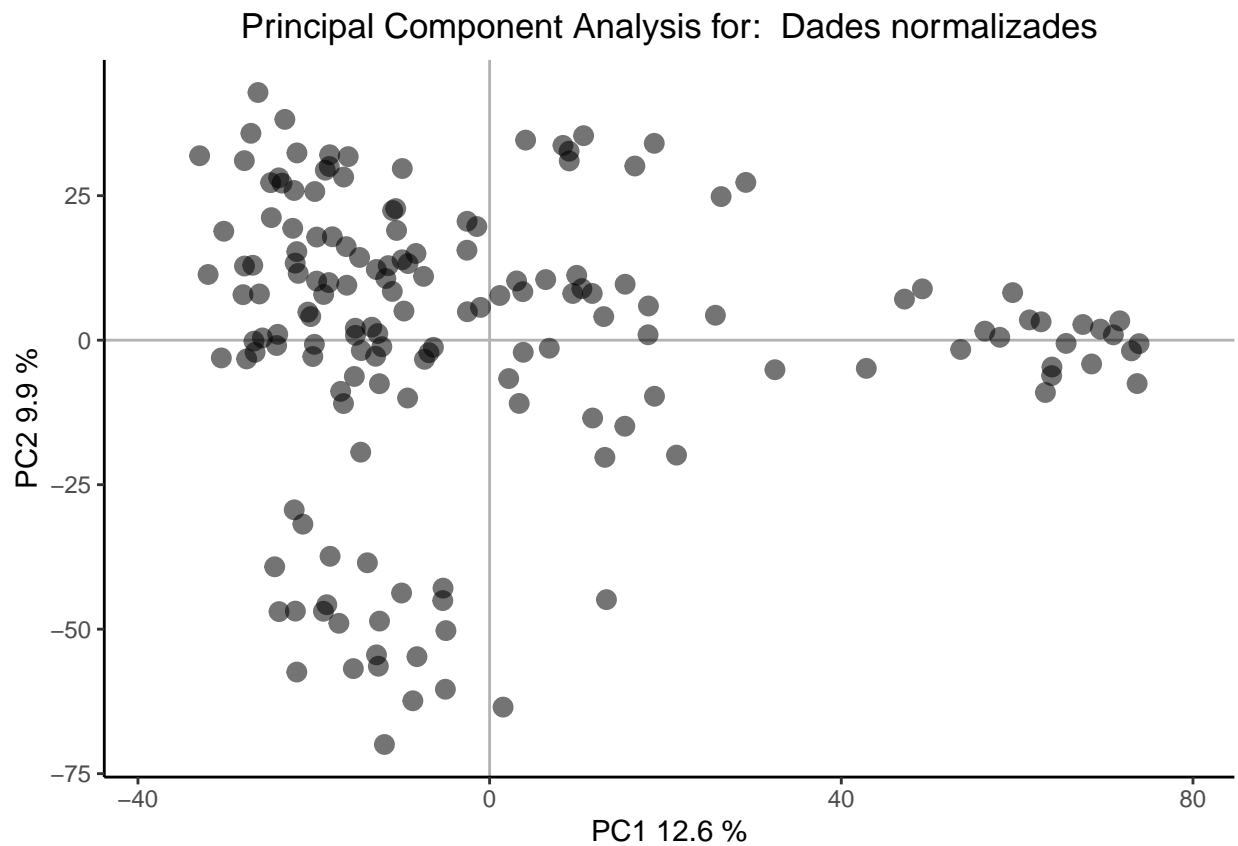
p1 + labs(x = c(paste("PC1",loads[1],"%")),y=c(paste("PC2",loads[2],"%"))) +
  ggtitle(paste("Principal Component Analysis for: ",title,sep=" ")) +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5)) +
  scale_color_manual(values=colores)
}

```

```

plotPCA(exprs(eset_rma), factor = targets$Group,
  title="Dades normalizades", scale = FALSE, size = 3,
  colores = c("red", "blue", "green", "yellow"))

```



```

# Guardem la figura en format tiff
dir.create("figures")
tiff("figures/PCA_NormData.tiff", res = 150, width = 10, height = 10, units = 'in')
plotPCA(exprs(eset_rma), factor = targets$Group,
         title="Dades normalitzades", scale = FALSE, size = 3,
         colores = c("red", "blue", "green", "yellow"))
dev.off()

```

```

## pdf
## 2

```

## Estudi de la variabilitat general de tots els gens o filtratge no específic

```

library(genefilter)
filtered <- nsFilter(eset_rma,
                    require.entrez = TRUE, remove.dupEntrez = TRUE,
                    var.filter=TRUE, var.func=IQR, var.cutoff=0.75,
                    filterByQuantile=TRUE, feature.exclude = "^AFFX")

names(filtered)
class(filtered$eset)
print(filtered$filter.log)

eset_filtered<-filtered$eset

```

## Guardem els arxius dels resultats normalitzats

```

save(eset_rma,eset_filtered, file = file.path("results", "dadesnormalitzades.Rda"))
write.csv2(exprs(eset_rma), file.path("results","dades.normalitzades.csv2"))

```

## Anotació dels resultats

```

require(annaffy)
genes<-rownames(exprs(eset_rma))
anot<-aafTableAnn(genes,"hgu133a.db")
saveHTML(anot,file.path("results","anotations.html"),"Annotations for genes")

#load("./results/dadesnormalitzades.Rda")
#head(exprs(eset_rma))
gens<-exprs(eset_rma)
colnames(gens)<-eset_rma$Sample.id

df<-cbind(anot@table$Probe,anot@table$Symbol,gens)
df<-as.data.frame(df)
df$V2<-as.character(df$V2)

```

Components de la via Wnt, busquem *CDC25A*

```

cdc25a<-subset(df,df$V2=="CDC25A")
cdc25a<-t(cdc25a)
cdc25a<-as.data.frame(cdc25a)
#head(cdc25a)
cdc25a<-cdc25a[-c(1,2),]
#head(cdc25a)
cdc25a<-cbind(cdc25a,eset_rma$Group,eset_rma$GSE)
#head(cdc25a)
cdc25a$`204695_at`<-as.numeric(cdc25a$`204695_at`)
cdc25a$`204696_s_at`<-as.numeric(cdc25a$`204696_s_at`)
colnames(cdc25a)<-c("cdc25a1","cdc25a2","Group","GSE")
#head(cdc25a)
write.csv2(cdc25a, file = "results/cdc25a.csv")

```

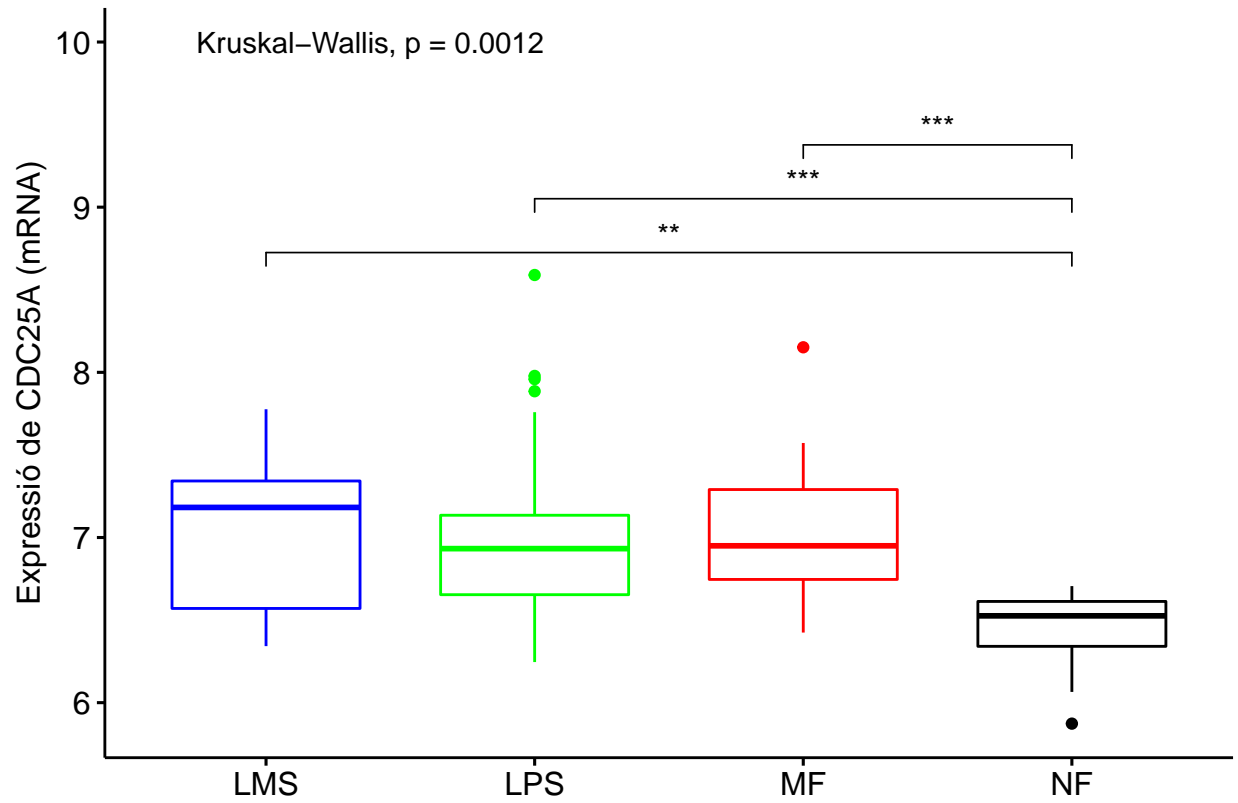
Representació gràfica dels resultats

```

#install.packages("ggpubr")
library(ggpubr)
library(ggplot2)

my_comparisons <- list( c("LMS", "NF"), c("LPS", "NF"), c("MF", "NF") )
my_symnum.args <- list(cutpoints = c(0, 0.001, 0.01, 0.05, 1),
                      symbols = c("***", "**", "*", "ns"))
ggboxplot(cdc25a, x = "Group", y = "cdc25a$cdc25a1",
          color = c("blue", "green", "red", "black"),
          xlab = " ", ylab = "Expressió de CDC25A (mRNA)")+
  stat_compare_means(comparisons = my_comparisons,
                    symnum.args = my_symnum.args)+
  stat_compare_means(label.y = 10)

```



```
# Guardem la figura en format tiff
tiff("./figures/cdc25a2.tiff", res = 200, width = 4, height = 4, units = 'in')
my_comparisons <- list( c("LMS", "NF"), c("LPS", "NF"), c("MF", "NF") )
my_symnum.args <- list(cutpoints = c(0, 0.001, 0.01, 0.05, 1),
                      symbols = c("***", "**", "*", "ns"))
ggboxplot(cdc25a, x = "Group", y = "cdc25a$cdc25a1",
           color = c("red", "blue", "green", "black"),
           xlab = " ", ylab = "Expressió de CDC25A (mRNA)")+
  stat_compare_means(comparisons = my_comparisons,
                    symnum.args = my_symnum.args)+
  stat_compare_means(label.y = 10)
dev.off()
```

```
## pdf
## 2
```

# **ANNEX 4**

# Disruption of TCF/ $\beta$ -Catenin Binding Impairs Wnt Signaling and Induces Apoptosis in Soft Tissue Sarcoma Cells



Esther Martinez-Font<sup>1</sup>, Irene Felipe-Abrio<sup>2</sup>, Silvia Calabuig-Fariñas<sup>3,4</sup>, Rafael Ramos<sup>5</sup>, Josefa Terrasa<sup>1,6</sup>, Oliver Vögler<sup>1,7</sup>, Regina Alemany<sup>1,7</sup>, Javier Martín-Broto<sup>2,8</sup>, and Antònia Obrador-Hevia<sup>1,6</sup>

## Abstract

Soft tissue sarcomas (STS) are malignant tumors of mesenchymal origin and represent around 1% of adult cancers, being a very heterogeneous group of tumors with more than 50 different subtypes. The Wnt signaling pathway is involved in the development and in the regulation, self-renewal, and differentiation of mesenchymal stem cells, and plays a role in sarcomagenesis. In this study, we have tested pharmacologic inhibition of Wnt signaling mediated by disruption of TCF/ $\beta$ -catenin binding and AXIN stabilization, being the first strategy more efficient in reducing cell viability and downstream effects. We have shown that disruption of TCF/ $\beta$ -cate-

nin binding with PKF118-310 produces *in vitro* antitumor activity in a panel of prevalent representative STS cell lines and primary cultures. At the molecular level, PKF118-310 treatment reduced  $\beta$ -catenin nuclear localization, reporter activity, and target genes, resulting in an increase in apoptosis. Importantly, combination of PKF118-310 with doxorubicin resulted in enhanced reduction of cell viability, suggesting that Wnt inhibition could be a new combination regime in these patients. Our findings support the usefulness of Wnt inhibitors as new therapeutic strategies for the prevalent STS. *Mol Cancer Ther*; 16(6); 1166–76. ©2017 AACR.

## Introduction

Soft tissue sarcomas (STS) are malignant tumors of mesenchymal origin and represent around 1% of adult cancers (1). STS are a very heterogeneous group of sarcomas comprising more than 50 different subtypes which can appear anywhere in the body. In case of localized disease, surgical resection with or without radiotherapy and chemotherapy is the standard curative treatment. Unfortunately, STS recur frequently as locally inoperable or metastatic disease, at which point systemic therapy is used to treat patients. For treating advanced-stage STS, chemotherapy consisting of doxorubicin and ifosfamide is the standard treatment with overall

response rates of about 25% in the first-line setting (2). Despite this fact, STS are almost invariably fatal making the development of new therapeutic approaches based on personalized medicine with clearly defined molecular targets a primordial necessity.

In this context, current research is focusing on the study of new molecular pathways that provide a better understanding of sarcomagenesis. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulates various processes that are important for cancer progression, including tumor initiation, tumor growth, cell senescence, cell death, differentiation and metastasis. Although the role of this signaling pathway is well known in many malignancies such as colorectal cancer (3), there is still limited knowledge of its role in sarcomas. Wnt signaling pathway is involved in development and in the regulation, self-renewal, and differentiation of mesenchymal stem cells (4). The involvement of Wnt signaling in these processes and the knowledge of the mesenchymal origin of sarcomas led to the study of its role in sarcomagenesis. It has been shown that this signaling pathway is activated through the canonical pathway in some types of sarcomas, including leiomyosarcoma, fibrosarcoma, and osteosarcoma, resulting in cell proliferation mainly through expression of the cell-cycle progress regulator *CDC25A*, which is a Wnt target gene (5). This activation is mainly accomplished by an autocrine loop (5–8) or via crosstalk with other signaling pathways including PI3K/AKT/mTOR pathway (9–11).

The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is activated when a secreted extracellular Wnt ligand binds to a seven transmembrane receptor, Frizzled (FZD), and its coreceptors, low-density lipoprotein receptor-related proteins called LRP5/6. Once FZD is activated, it triggers a cascade of intracellular signals which inactivate the Axin-APC-GSK3 $\beta$  destruction complex that phosphorylates  $\beta$ -catenin, targeting it for degradation (12).

<sup>1</sup>Group of Advanced Therapies and Biomarkers in Clinical Oncology, Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma de Mallorca, Spain. <sup>2</sup>Group of Molecular Oncology and New Therapies, Oncohematology and Genetics Department, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Sevilla, Spain. <sup>3</sup>Molecular Oncology Laboratory, Fundación de Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Department of Pathology, Universitat de Valencia, Valencia, Spain. <sup>5</sup>Department of Pathology, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain. <sup>6</sup>Department of Oncology, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain. <sup>7</sup>Group of Clinical and Translational Research, Department of Biology, Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS), University of the Balearic Islands, Spain. <sup>8</sup>Department of Oncology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** Antònia Obrador-Hevia, Hospital Universitari Son Espases, Cra. Valldemossa, 79, Palma, Illes Balears E-07010, Spain. Phone: 348-7120-5050; Fax: 348-7120-6868; E-mail: antonia.obrador@ssib.es

**doi:** 10.1158/1535-7163.MCT-16-0585

©2017 American Association for Cancer Research.



When the function of the destruction complex is inhibited, free nonphosphorylated  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm, translocates to the nucleus, and binds to the T-cell factor/lymphoid enhancer factor-1 (TCF/LEF) family of transcription factors, thereby inducing canonical gene transcription. Deregulation of Wnt signaling can be driven by upstream or downstream alterations, leading to cancer development or growth. In this line, targeted molecular therapies for a variety of Wnt-activated cancers are now being developed. Furthermore, within the past several years, a number of agents, both small molecules and monoclonal antibodies, have entered clinical trials (13).

In this study, we demonstrate the efficacy of different Wnt inhibitors such as XAV939, which induces the stabilization of AXIN by inhibiting the poly(ADP)-ribosylating enzymes tankyrase 1 and tankyrase 2 (14) or PKF118-310. PKF118-310 disrupts the  $\beta$ -catenin/TCF interaction (15), inducing apoptosis in patient-derived STS cells and established cell lines. On one hand, the Wnt inhibitors studied reduced the expression of important Wnt genes involved in cell-cycle regulation in sarcomas, such as *CDC25A* (5). On the other hand, treatment of STS with Wnt inhibitors also decreased nuclear  $\beta$ -catenin levels and its mediated transcriptional activity, altogether leading to a subtype-independent inhibition of sarcoma cell growth. When combined with the conventional chemotherapeutic drug doxorubicin, PKF118-310 showed an additive antitumoral effect. Our findings support the impairment of the Wnt pathway as a potential therapeutic treatment for STS.

## Materials and Methods

### Cell lines and reagents

Experiments were conducted with nine different sarcoma cell lines (Supplementary Table S1), three colorectal cancer cell lines (HT29, HCT116, and SW480), and human mesenchymal stem cells (hMSC; Lonza) as controls. Colorectal cancer cell lines were kindly provided by Dr. Gwendolyn Barceló, IdISPa, Palma de Mallorca, Spain (2016) and hMSC cell line was kindly donated by Dr. Carlos Río, IdISPa, Palma de Mallorca, Spain (2016). All of them were grown according to instructions provided by commercial providers. 93T449 cell line was kindly provided by Dr. Florence Pedeutour (2012) and was established at Hospital de l'Archet, France (16, 17). PharmaMar S.A. (2011) kindly donated cell lines SW684 and SW872 (available from the ATCC). HT-1080, SK-UT-1, and SW982 cell lines were purchased from the ATCC (2011). AW cell line was kindly provided by Dr. Amancio Carnero (2011) and was established at CNIO, Madrid, Spain (18). 93T449 cell line was maintained in RPMI1640 medium (PAA) supplemented with 10% FBS (PAA), 100 U/mL penicillin/streptomycin (PAA), 1% Ultrosor (Pall Life Sciences), and 0.5% Fungizone (Invitrogen). SW872, SW684, and SW982 were maintained in Leibovitz medium with L-glutamine (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, and 1 mmol/L HEPES (Sigma-Aldrich). HT-1080 was maintained in MEM liquid with Earle Salts medium with L-glutamine (PAA) supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, and 1 mmol/L HEPES. AW was maintained in F-10 Ham medium (Gibco) supplemented with 1% Ultrosor, 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, and 1 mmol/L HEPES. SK-UT-1 was maintained in DMEM (PAA) supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, and 1 mmol/L HEPES. Cells were grown in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

XAV939, IWR-1, and PKF118-310 were purchased from Sigma. Doxorubicin was kindly provided by the Pharmacology Department of Son Espases University Hospital.

### Primary cell cultures

Two primary cell cultures [CP0024 (2012) and CP0038 (2013)] were derived from resected leiomyosarcomas (Supplementary Table S1). The biopsies were minced in culture medium and then disaggregated by 30-minute incubation with collagenase (Gibco, 221 U/mg). Cells were cultured in RPMI1640 medium (PAA) supplemented with 20% FBS (PAA), 100 U/mL penicillin/streptomycin (PAA). Informed consent was obtained from all patients in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of Clinical Investigation (CEIC-IB, Spain) and the Declaration of Helsinki.

### Immunofluorescence

A total of 5,000 cells were grown in a Lab-Tek II Chamber Slide (Lab-Tek) chamber, washed three times with a PBS plus 0.2% BSA solution and fixed with 100  $\mu$ L of a solution of methanol:acetone (1:1), blocked using 300  $\mu$ L of 5% BSA solution, incubated with the primary antibody  $\beta$ -catenin (D10A8; #8480, Cell Signaling Technology, 1:30) and with the secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat a-R A11008, Invitrogen, 1:150 dilution). To visualize the nuclei, DAPI was used (Fisher Scientific). Samples from two individual experiments performed by duplicate were analyzed with the confocal microscope, ZEISS LSM 710. The ZEN2011 (black edition 64bit) software was used to quantify  $\beta$ -catenin staining intensity, which was scored (score 1) into four categories 0–3 (0 = negative, 1 = intensity <90, 2 = intensity 90–100, 3 = intensity >100). The percentage of  $\beta$ -catenin-positive stained cells was also scored (score 2) into four categories 1–4 (1 = 0%–25%; 2 = 26%–50%; 3 = 51%–75%; 4 = 76%–100%). The level of  $\beta$ -catenin staining was evaluated by IRS (staining average immunoreactive score), which was calculated by multiplying the two scores previously described. On the basis of the IRS,  $\beta$ -catenin staining pattern was defined as negative (IRS: 0), weak (IRS: 1–4), moderate (IRS: 5–8), and strong (IRS: 9–12).

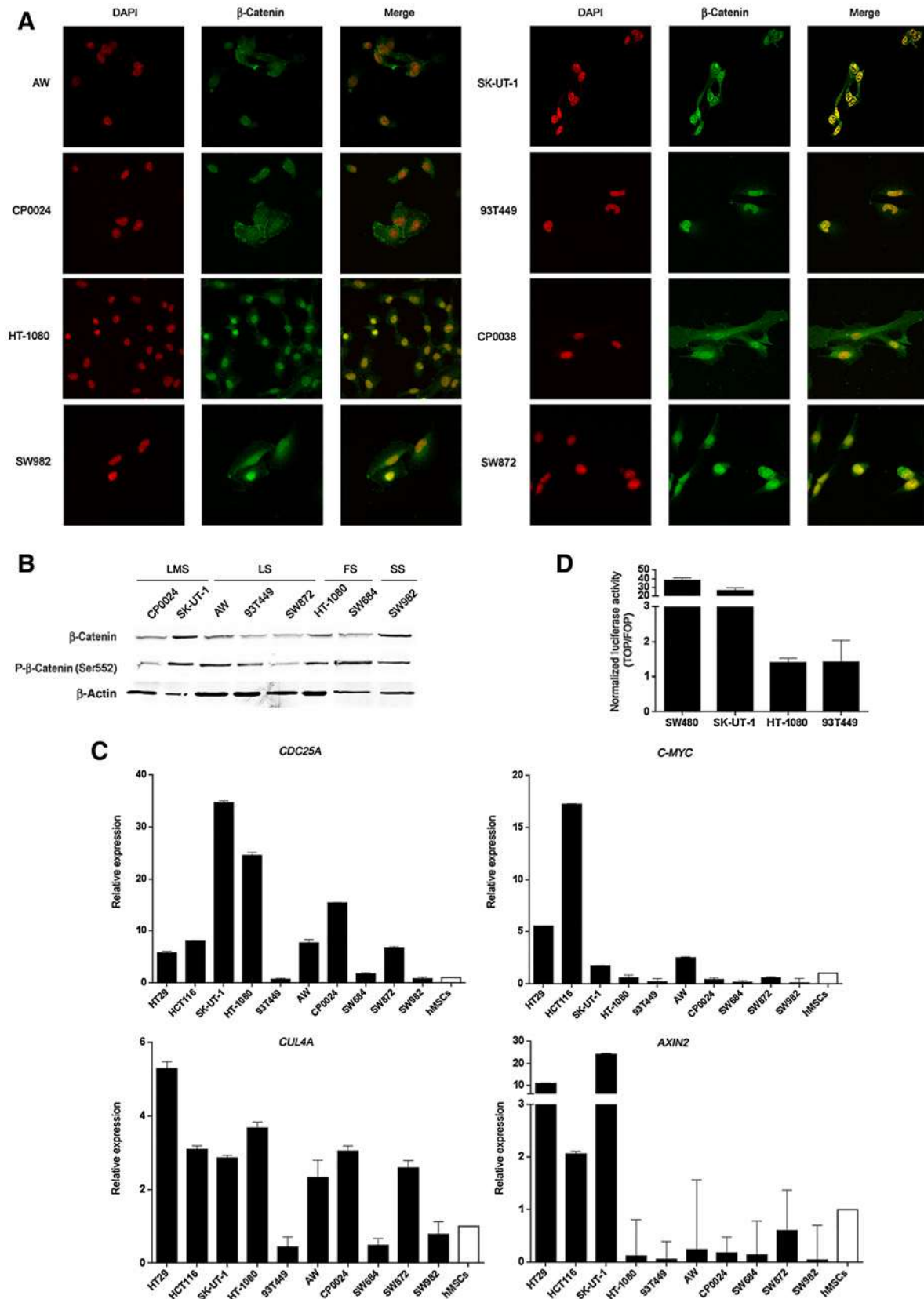
### Gene expression analysis

Total RNA was isolated using TRIzol Plus RNA Purification Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. A total of 300 ng of RNA were reverse-transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Subsequent real-time PCR reactions were performed in duplicate (CFX96 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) using the TaqMan probes method.  *$\beta$ 2-Microglobulin* was used as an internal control for normalization. To quantify the level of gene expression changes, the following formula was used:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $\Delta\Delta C_t = C_{t\text{target}}(\text{control} - \text{sample}) - C_{t\text{reference}}(\text{control} - \text{sample})$ . The TaqMan probes used were the following:  *$\beta$ 2-microglobulin* (HS99999907), *CDC25A* (HS00947994), *C-MYC* (HS01067802), *CUL4A* (HS00757716), and *AXIN2* (HS00610344; Applied Biosystems).

### Cell viability assay (MTT)

Cell viability was measured using the methylthiazolotetrazolium (MTT) method, which indicates the presence of metabolically active cells, using the CellTiter 96Aqueous One Solution (Promega) following the manufacturer's instructions. Briefly,

Martinez-Font et al.



5,000 cells were seeded in 96-well plates for 24 hours and exposed to increasing concentrations of inhibitors for 48 hours followed by addition of CellTiter reagent. Absorbance at 490 nm was detected using a multiwell scanning spectrophotometer (Synergy H1 microplate reader, Bio-tek). The mean percentage of cell viability relative to vehicle-treated cells was estimated from data of three individual experiments performed by triplicate. The compound concentration resulting in 50% inhibition of cell viability ( $IC_{50}$ ) was determined using GraphPad software.

#### Cell-cycle analysis

The effect of the inhibitors on cell cycle was assessed by flow cytometric analysis. Briefly, 30,000 cells were seeded in 24-well plates. After 24, 48, and 72 hours of treatment, cells were washed in PBS and fixed in 90% ethanol, collected by centrifugation and stained in 500  $\mu$ L of a mixture of propidium iodide (50 mg/mL; Sigma-Aldrich), and ribonuclease A (50 mg/mL; Sigma-Aldrich) diluted in PBS for 1 hour. Cell populations at different stages of the cell cycle [sub- $G_1$  peak (apoptosis),  $G_1$ , S, and  $G_2$ -M] were estimated on the basis of their DNA content in flow cytometer using the BD system Verse BD FACScan and software FACSuit.

#### Western blot analysis and antibodies

Western blot whole-cell extracts were prepared by lysing cells with lysis buffer (1% Nonidet P-40, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L  $Na_3VO_4$ , and protease inhibitors "Complete"; Roche) on ice for 15 minutes. Nuclear and cytoplasmic fractions were obtained using Nuclear Extract Kit (Active Motif) and following the manufacturer's instructions. The antibodies used were the following: CDC25A (ab989, Abcam),  $\beta$ -actin (#3700), c-Myc (#9402), CUL4A (#2699),  $\beta$ -catenin (#8480), P- $\beta$ -catenin (Ser552; #2951) from Cell Signaling Technology and  $\alpha$ -tubulin (#T9026) from Sigma. The secondary antibodies were: Donkey anti-Rabbit (E 365D5) and Donkey anti-Mouse (E 510KC) from LI-COR. Immunoreactivity intensity of the bands was analyzed with the Odyssey imaging system from LI-COR.

#### Transient transfection and luciferase reporter assay

Transient transfection of the TCF reporter system coupled to luciferase was performed using the Lipofectamine Plus (Invitrogen) method. TCF reporter system plasmids (pTOPFLASH and pFOPFLASH), expression plasmids pCMV-APC (APC WT, APC 1309 $\Delta$ ), and the empty vector pcDNA3.1 were kindly donated by Dr. Gabriel Capellà. Luciferase reporter assay was performed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was quantified by the Luciferase Reporter Assay System (Promega) 24 hours after transfection. Firefly luciferase activity was normalized to the corresponding *Renilla* luciferase activity. All experiments were performed in triplicates.

#### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from  $n$  independent experiments. Statistical evaluations were assessed by GraphPad Prism, GraphPad Software, Inc. To detect the difference of quantitative values between the different groups, a ANOVA has been used, along with a Bonferroni test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$  and were indicated by: \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*,  $P < 0.05$ .

## Results

### Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is activated in STS cell lines and tumor-derived cells

To study the role of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in STS, we first examined the expression and phosphorylation status of the pathway components in a panel of STS cell lines and patient-derived primary cells (Supplementary Table S1). The expression and subcellular localization of  $\beta$ -catenin was examined by immunofluorescence (Fig. 1A). For nuclear localization, a staining average IRS was estimated using immunofluorescence images (Supplementary Table S2).  $\beta$ -Catenin staining was cytoplasmic and nuclear staining (IRS) in STS cells was scored as strong in 75% (6/8), moderate in 12.5% (1/8), and weak in 12.5% (1/8) of cases. Nuclear staining indicated that  $\beta$ -catenin was active and able to transactivate its target genes in most STS cells. Accordingly, protein levels of  $\beta$ -catenin and active phospho- $\beta$ -catenin (Ser552) were detected in all of the analyzed cell lines as shown by Western blotting (Fig. 1B), being the APC-mutated leiomyosarcoma SK-UT-1 cell line the one that showed the highest level of active phospho- $\beta$ -catenin (Supplementary Table S3). Wnt target genes were also evaluated (Fig. 1C) including *CDC25A*, which had been described to drive proliferation of sarcomas (5), *CUL4A* which is an E3 ubiquitin ligase involved in the Wnt-induced proteolytic targeting (19), *C-MYC* and *AXIN2*, which have been described as transcriptionally activated genes in a tissue-independent manner (5). Consistent with  $\beta$ -catenin activation, *CDC25A* and *CUL4A* gene levels in STS cells were higher than those of hMSCs, a reference cell line with low levels of endogenous Wnt signaling (20). Moreover, in most of the STS cell lines studied, especially in APC-mutated-SK-UT-1 cells, *CDC25A* levels were higher than those found in two colorectal cancer cell lines with a strong intrinsic Wnt signaling activity used as positive controls. *C-MYC* levels were lower than those expressed in the colorectal cancer cells, in which *C-MYC* is responsible for Wnt-induced proliferation (21, 22), but not in sarcomas as shown by others (5). Likewise, *AXIN2* levels in all of the STS cells studied, with the exception of SK-UT-1 cells, were also lower than those expressed in the colorectal cancer cells, being their levels similar to those found in hMSC. Finally, increased basal TCF reporter activity was found in SK-UT-1, HT-1080, and 93T449 cells (Fig. 1D), which was similar to that of human colon cancer cell line SW480, which

#### Figure 1.

Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in STS cells. **A**,  $\beta$ -Catenin immunofluorescence in STS cell lines at 40 $\times$ . STS cell lines were fixed using a solution of methanol:acetone (1:1).  $\beta$ -Catenin was visualized with the primary antibody [ $\beta$ -catenin (D10A8) XPRabbit mAb #8480, Cell Signaling Technology] followed by the addition of the secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat a-R A11008, Invitrogen). DAPI was added to visualize the nuclei. **B**, Panels show the immunoreactive bands of total and phosphorylated (P-Ser552)  $\beta$ -catenin in representative immunoblots of STS cells,  $\beta$ -actin was used as a loading control. **C**, Real-time PCR reactions were performed in duplicate using the TaqMan probes method.  *$\beta$ -2-microglobulin* was used as an internal control for normalization. Gene expression analyses were performed as described in the Material and Methods section. Human colon cancer HT29 and HCT116 cell lines were used as positive controls. Normalized values are represented relative to those in hMSCs. **D**, TCF luciferase reporter activity in STS cells. Data are represented as the ratio of TOP/FOP luciferase activity at 24 hours after transfection and normalized to *Renilla* luciferase activities. Human colon cancer SW480 cell line was used as positive control. Each column represents mean  $\pm$  SEM of two independent determinations performed in triplicate. LMS: leiomyosarcoma, LS: liposarcoma, FS: fibrosarcoma, SS: synovial sarcoma.

Martinez-Font et al.

we had previously reported to be strongly Wnt activated (23). Taken together, these results demonstrate upregulated Wnt signaling in STS cells relative to that observed in hMSCs as evidenced by increased activation of  $\beta$ -catenin, which was able to transactivate Wnt target genes, mainly *CDC25A* and by increased TCF reporter activity. Interestingly, the lack of correlation between the nuclear (IRS) or total  $\beta$ -catenin levels of the studied sarcoma cells with their histology (Supplementary Tables S3 and S4; Supplementary Methods and Materials) suggests that Wnt activation is a common feature of sarcomas. Moreover, the positive correlation found between *CDC25A* and *CUL4A* expression pointed that *CUL4A* could be an important gene in sarcomas, which deserves further investigation as *CDC25A* has been reported as a promoter of proliferation in sarcomas. In contrast, a positive correlation was found between *C-MYC* and *AXIN2* low expression levels, suggesting a partial role of these genes in STS.

Altogether our results demonstrate upregulation of the Wnt canonical pathway in several human sarcomas of different histologic subtypes.

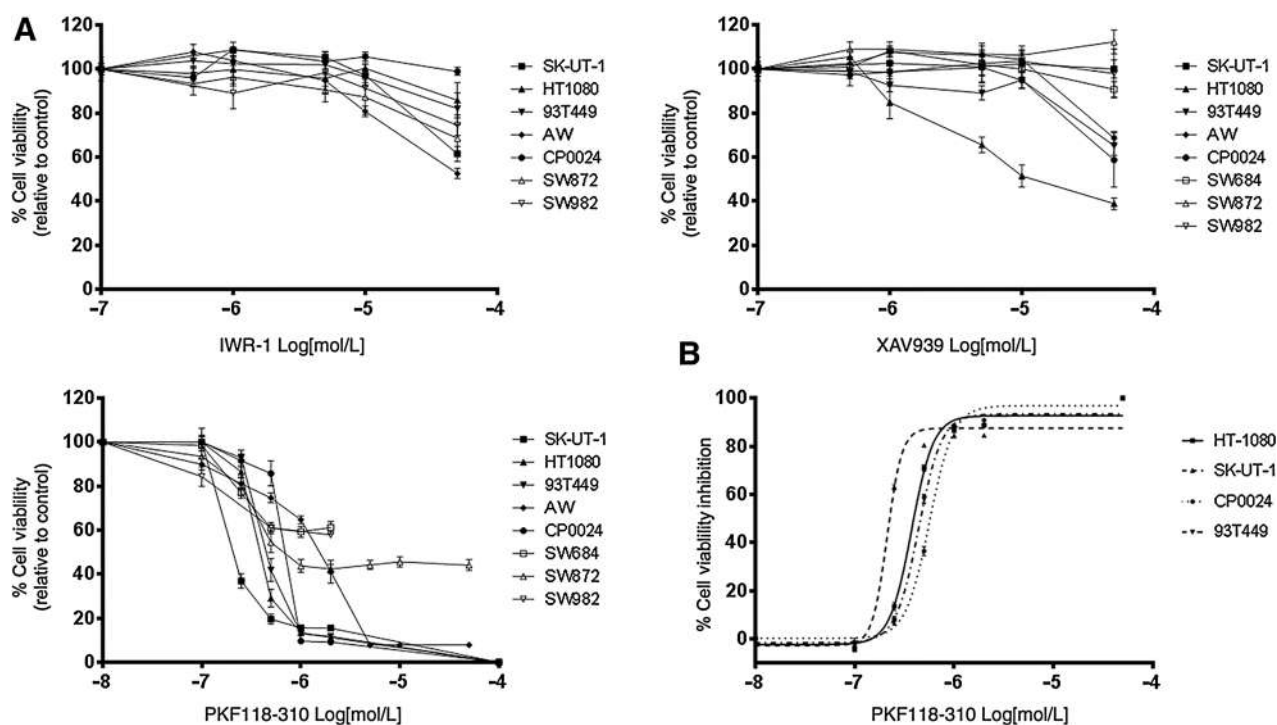
#### Disruption of $\beta$ -catenin/TCF complex suppresses cell viability of STS cell lines

Once the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was established in the panel of STS cells, we aimed to investigate the biological effect of small-molecule inhibitors of this signaling pathway PKF118-310, IWR-1, and XAV939 on sarcoma cell viability. Sarcoma cell lines were exposed to increasing doses (0.1–50  $\mu$ mol/L) of these compounds for 48 h. PKF118-310 selectively

disrupts  $\beta$ -catenin/TCF interaction and inhibits its transcriptional activity. IWR-1 and XAV939 are small molecules that stimulate  $\beta$ -catenin degradation by stabilizing AXIN through inhibition of the poly-(ADP)-ribosylating enzymes tankyrase 1 and tankyrase 2 (14, 24). Tankyrase inhibitors IWR-1 and XAV939 were less effective in reducing cell viability of sarcoma cell lines in comparison with PKF118-310 (Fig. 2A), which reduced sarcoma cell viability with  $IC_{50}$  values ranging from 0.21 to 0.57  $\mu$ mol/L (Fig. 2B; Supplementary Table S1). SK-UT-1, HT-1080, 93T449, and CP0024 cells were more sensitive to treatment compared with AW, SW684, SW872, and SW982 cells, and again no correlation was observed between the inhibitory effect of PKF118-310 and sarcoma histology (Supplementary Tables S3 and S4). In addition, similar results were obtained when cell growth was continuously monitored in the most sensitive sarcoma cell lines under PKF118-310 treatment by using the xCELLigence System (Supplementary Fig. S1 and Supplementary Methods and Materials).

#### PKF118-310 inhibits cell proliferation by inducing apoptosis in STS cell lines

To further characterize the response to these inhibitors, cell-cycle phase distribution was obtained for inhibitor-treated STS cells. For PKF118-310 inhibitor, cytometry data indicated that apoptosis was induced in all analyzed cell lines, as revealed by the percentage of cells with a  $<2N$  DNA content (sub- $G_1$  phase; Fig. 3; Supplementary Fig. S2A). All cell lines showed a dose-dependent increase in the apoptotic fraction after 72 hours of treatment. Liposarcoma 93T449 and leiomyosarcoma

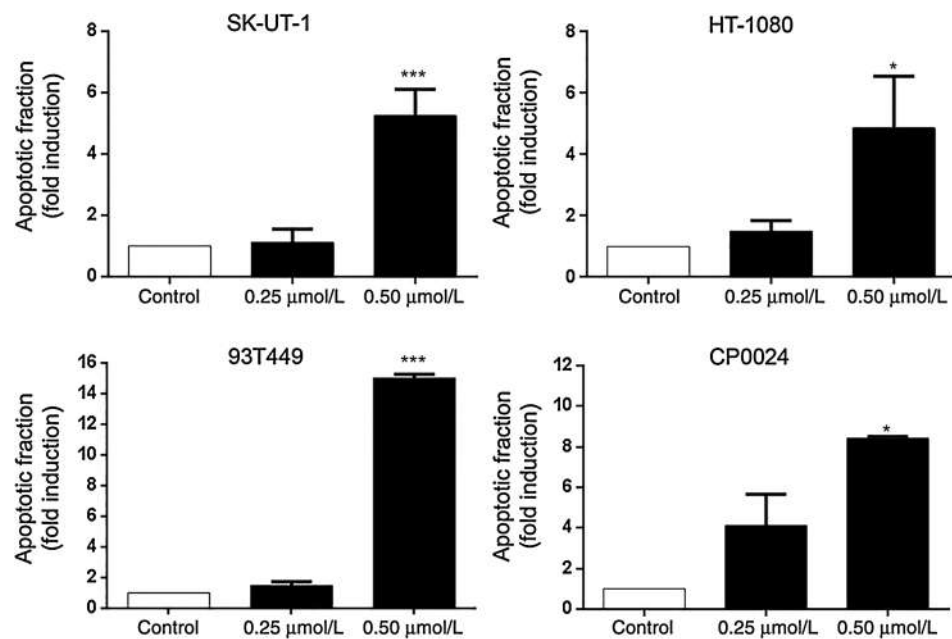


**Figure 2.**

Cell viability analysis of STS cells upon treatment with Wnt signaling inhibitors. **A**, STS cells were treated with either IWR-1, XAV939, or PKF118-310 (0.1–50  $\mu$ mol/L) and incubated for 48 hours. Cell viability was measured using the CellTiter 96 AQueous One Solution Assay Kit and absorbance was detected with a multiwell scanning spectrophotometer. Cell viability is represented as mean  $\pm$  SEM percentage of cell viability relative to vehicle-treated cells estimated from three independent determinations performed in triplicate. **B**,  $IC_{50}$  determination using GraphPad software.

**Figure 3.**

Cell-cycle analysis of STS cells after PKF118-310 treatment. STS cells were treated with PKF118-310 (0.25–0.50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24, 48, and 72 hours, fixed in ethanol, stained with propidium iodide, and DNA content determined by flow cytometry. Columns show the extent of apoptosis induction with the drug (sub- $G_1$  population) represented as fold increase at 48 hours. Each column represents mean  $\pm$  SEM of three independent determinations. \*,  $P < 0.05$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with vehicle-treated cells.



CP0024 cells showed the highest levels of apoptosis induction. Treatment of 93T449 and CP0024 cells with 0.50  $\mu\text{mol/L}$  of PKF118-310 resulted in increased cell death, raising 14- and 7-fold the apoptotic cell fraction compared to vehicle-treated cells, respectively. In SK-UT-1 and HT-1080 cell lines, the apoptotic effect of PKF118-310 was more moderate, increasing cell death up to 4-fold at 0.50  $\mu\text{mol/L}$  (Fig. 3). In contrast, neither the apoptotic nor the  $G_1$  fraction was significantly increased upon XAV939 treatment (Supplementary Fig. S2B), which correlated with previous viability analysis (Fig. 2A).

#### Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitors decrease nuclear $\beta$ -catenin levels and mediate transcriptional activity in STS cells

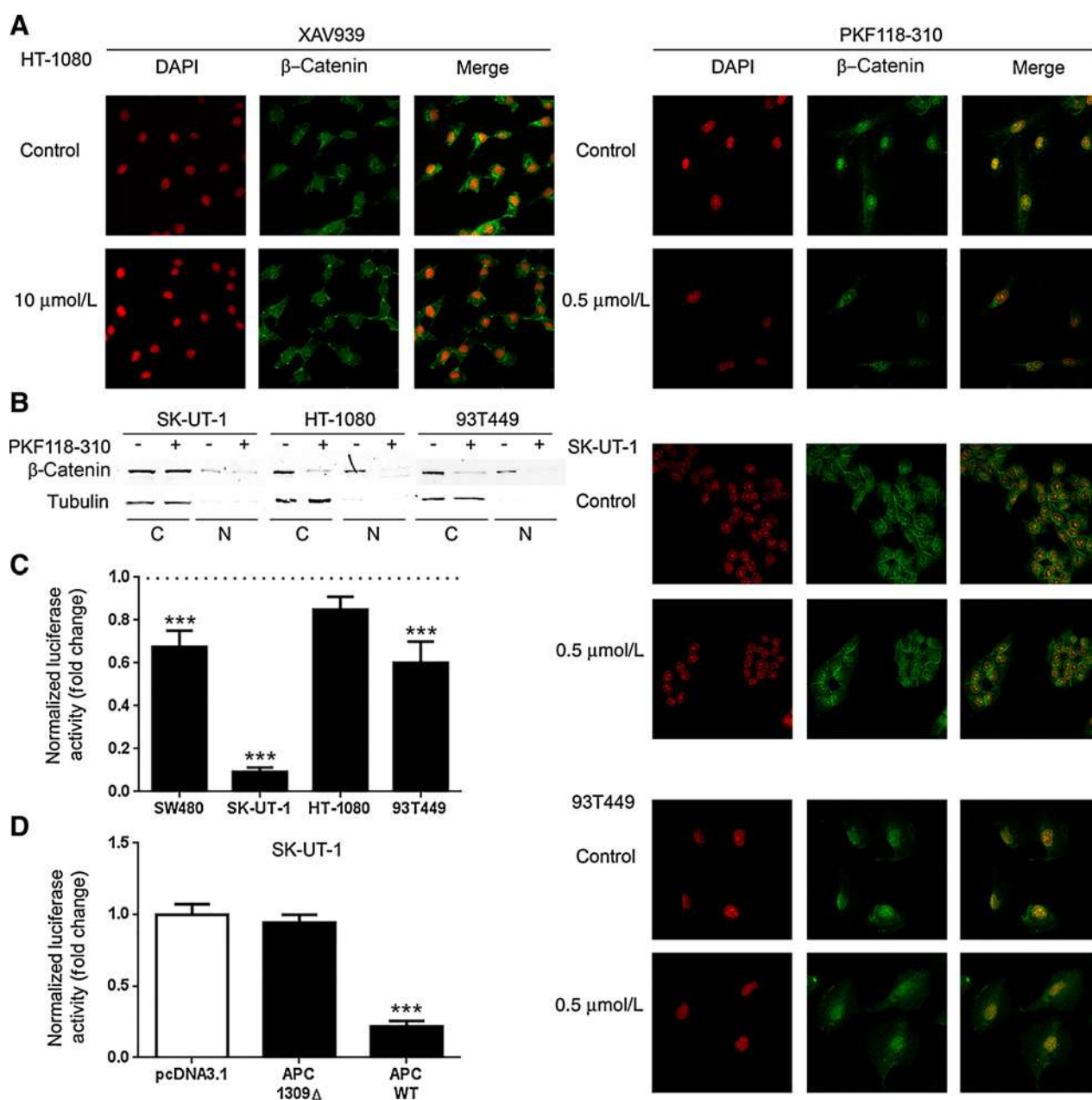
As  $\beta$ -catenin is a transcription factor and its activity is thus dependent on its subcellular localization, we investigated whether compounds used in our study were able to relocate  $\beta$ -catenin to the cytoplasm of STS cells as part of its inactivation process. To this end, SK-UT-1, HT-1080, and 93T449 cells, which had strong nuclear  $\beta$ -catenin staining, were treated with XAV939 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and PKF118-310 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) and the intracellular localization of  $\beta$ -catenin was analyzed by immunofluorescence. Results for XAV939 are only shown with the most responsive cell line to this drug, the HT-1080 cells. Following the same line, results for PKF118-310 are shown with these three cell lines, which are representative of the ones that respond to this compound. In untreated cells,  $\beta$ -catenin resided in the cytoplasm and nucleus. Interestingly, XAV939 and PKF118-310 clearly induced a decrease in  $\beta$ -catenin nuclear translocation, being in agreement with our previous data regarding sensitivity to these inhibitors and  $\beta$ -catenin activation (Fig. 4A). In parallel, a significant decrease in nuclear and cytoplasmic  $\beta$ -catenin levels was observed after treatment with PKF118-310 (0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 48 hours) as determined by nuclear/cytoplasmic fractionation (Fig. 4B). As expected for the effect of XAV939, which stabilizes AXIN in the destruction complex, there was a decrease in nuclear  $\beta$ -catenin. We found that PKF118-310 compound was also capable of reducing the

nuclear localization of  $\beta$ -catenin, suggesting that binding to TCF stabilizes  $\beta$ -catenin nuclear localization in STS.

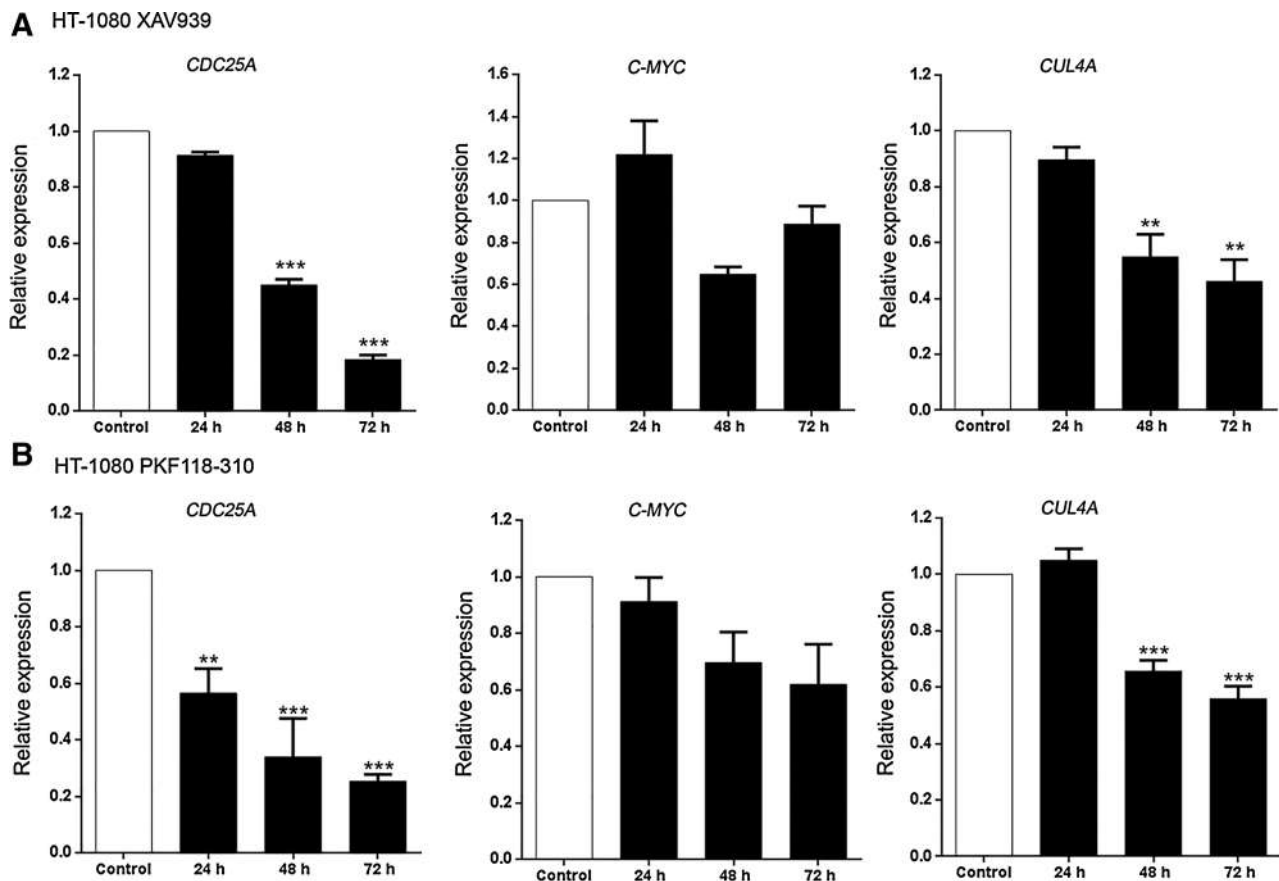
To further investigate the effects of this reduction on nuclear  $\beta$ -catenin upon treatment with PKF118-310, TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity was assessed in STS cells using TOP/FOPflash luciferase reporter assay in comparison with the APC-mutated (truncated at AAs1338) colorectal cancer cell line SW480 (23). Interestingly, APC-mutated-SK-UT-1 cells, that showed similar basal TCF activity to that of SW480 cells (Fig. 1D), had a stronger decrease of TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity upon PKF118-310 treatment (Fig. 4C). HT-1080 cells only showed a small decrease in TCF reporter activity after treatment, whereas 93T449 cells showed a similar decrease to that of SW480 cells.

To evaluate the specificity of the used Wnt inhibitors on TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity in STS cells, an APC 1309 $\Delta$  mutated plasmid or a full-length APC (APC WT) plasmid (25, 26), were transfected into SK-UT-1 cells. The latter plasmid was reported to reduce  $\beta$ -catenin levels and to downregulate TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity in the colorectal cancer SW480 cell line, which expresses an endogenous mutant APC protein. As shown in Fig. 4D, the expression of APC WT in SK-UT-1 reduced by 78.19% the transcriptional activity of TCF/ $\beta$ -catenin when compared with pcDNA3.1-transfected control cells, whereas the expression of the mutated APC (1309 $\Delta$ ) did not affect the elevated TCF/ $\beta$ -catenin reporter activity found in control SK-UT-1 cells. The fact that the inhibitory effect of PKF118-310 treatment on TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity was similar to that observed with the transfection of APC WT in APC-mutated-SK-UT-1 cells indicates that the inhibitory effect of this compound on STS proliferation and cell viability is due to the impairment of the Wnt pathway.

Taken together, these results support our hypothesis that inhibition of nuclear translocation results in inhibition of  $\beta$ -catenin transcriptional activity, which most probably are necessary requisites for the effective induction of cell death in response to Wnt pathway inhibitors.

**Figure 4.**

Decrease in  $\beta$ -catenin functionality after treatment with Wnt inhibitors. **A**, STS cell lines were treated with XAV939 (left) and PKF118-310 (right) at the indicated concentrations for 48 hours before being fixed with a solution of methanol:acetone (1:1).  $\beta$ -Catenin was visualized with the primary antibody [ $\beta$ -catenin (D10A8) XPRabbit mAb #8480 Cell Signaling Technology] followed by the addition of the secondary antibody (Alexa Fluor 488, Goat a-R A11008, Invitrogen). DAPI was added to visualize the nuclei. **B**, Nuclear-cytoplasmic localization of  $\beta$ -catenin. STS cells were treated with PKF118-310 (0.5  $\mu$ mol/L) for 48 hours and then subjected to subcellular fractionation. Panels show the immunoreactive bands of  $\beta$ -catenin in nuclear and cytoplasmic fractions in representative immunoblots of STS cells.  $\alpha$ -Tubulin was used as a cytoplasmic marker. **C**, TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity in STS cells. Cells were treated with PKF118-310 (0.5  $\mu$ mol/L) for 24 hours and transfected with TOP/FOPflash luciferase reporter plasmid. Luciferase reporter activities were measured 24 hours after transfection and normalized to *Renilla* luciferase activities. Results are depicted as fold change of normalized luciferase activity values relative to those of each control. Each column represents mean  $\pm$  SEM of three independent determinations. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with vehicle-treated cells. **D**, SK-UT-1 cells were transfected with TOP/FOP flash luciferase reporter plasmid and pcDNA3.1 or APC 1309 $\Delta$  or APC WT plasmid. Luciferase reporter activities were measured 24 hours after transfection and normalized to *Renilla* luciferase activities. Results are depicted as fold change of normalized luciferase activity values relative to those of each control. Each column represents mean  $\pm$  SEM of three independent determinations. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with pcDNA3.1-transfected cells.

**Figure 5.**

Expression of Wnt/ $\beta$ -catenin target genes in response to Wnt inhibitors. HT-1080 cells were treated with XAV939 (A) and PKF118-310 (B) for 24, 48, and 72 hours and expression of *CDC25A*, *C-MYC*, and *CUL4A* genes were quantified as described in the Materials and Methods section.  $\beta$ -2-microglobulin was used as an internal control for normalization. Each column represents mean  $\pm$  SEM of three independent determinations. \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with vehicle-treated cells.

### $\beta$ -Catenin inactivation correlates with reduced downstream signaling in STS cells

The effect of Wnt inactivation on expression of downstream signaling targets was investigated in STS cells. First, a sensitive to XAV939 cell line, HT-1080, and a nonsensitive cell line, SK-UT-1, were treated with this inhibitor and RT-PCR assessment of *CDC25A*, *C-MYC*, and *CUL4A* was performed. Results revealed a time-dependent downregulation for *CDC25A* and *CUL4A* gene expression in HT-1080 cells (Fig. 5A), whereas no changes in expression were detected in the nonsensitive SK-UT-1 cell line (Supplementary Fig. S3A). *CDC25A* levels were strongly downregulated by PKF118-310 treatment in all cell lines (Fig. 5B; Supplementary Fig. S3B), whereas the downregulation effect of this inhibitor on *CUL4A* expression was less pronounced. In all cell lines, XAV939 and PKF118-310 treatment failed to significantly downregulate *C-MYC* levels, indicating that it is not a direct transcriptional target of Wnt signaling in sarcoma cells.

### PKF118-310 enhanced doxorubicin antitumoral effect when both were simultaneously combined in STS cells

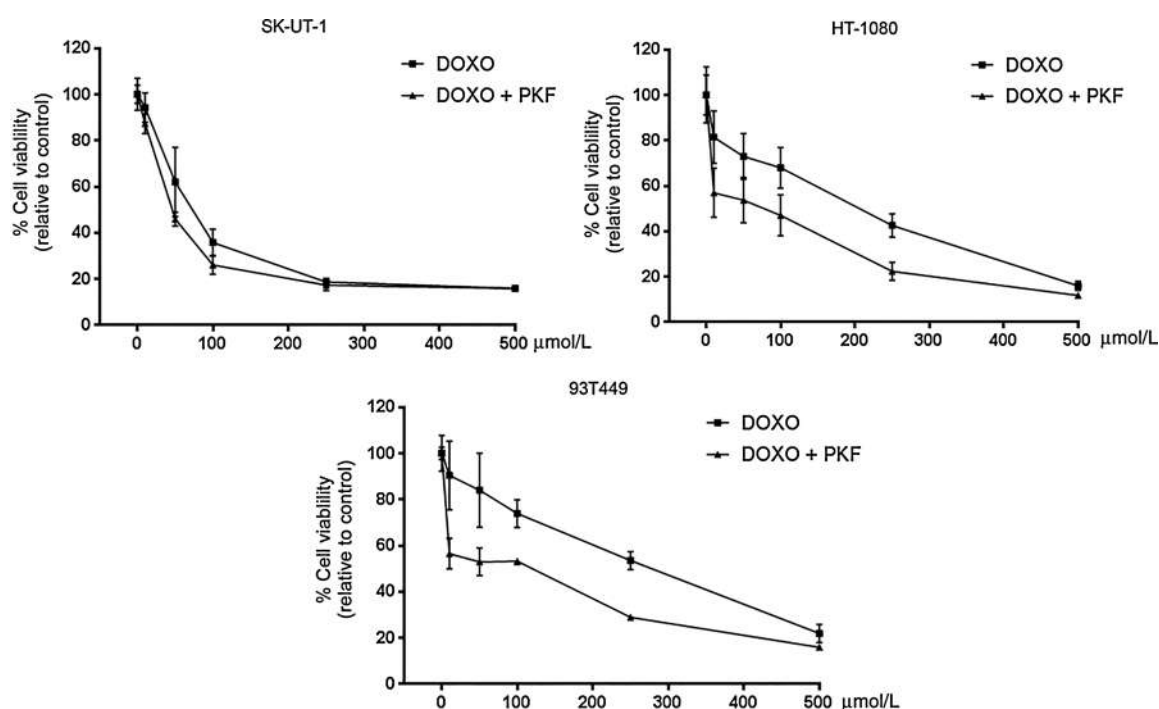
Combination of a low dose of PKF118-310 (0.25  $\mu$ mol/L) with the standard chemotherapeutic agent doxorubicin at different concentrations, used as first-line treatment in metastatic

STS, led to an enhanced reduction of STS cell viability. The antiproliferative effects of PKF118-310 and doxorubicin combination were lower in SK-UT-1 cells than in HT-1080 and 93T449 cells (Fig. 6). These results demonstrated that concomitant treatment with a Wnt inhibitor is able to enhance the chemotherapeutic effect of a conventional STS treatment by a mechanism involving inhibition of  $\beta$ -catenin nuclear translocation and, consequently, inhibition of  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional activity and *CDC25A* downregulation.

## Discussion

In recent years, several efforts have been made in characterizing Wnt signaling status in sarcomas, but mostly focusing in specific sarcoma types, especially in osteosarcomas, in which the activation of the pathway is well established (27–29). Nevertheless, knowledge about this pathway in STS is still very limited. However, new -omics studies are pointing to aberrations of members of this pathway in other sarcoma subtypes, such as liposarcomas, but only few results have been reported (30). In contrast to other malignancies, where activation of Wnt signaling is due to genetic aberrations in key pathway components, including *CTNNB1* and *APC*, these alterations are reported to have a low occurrence in

Martinez-Font et al.

**Figure 6.**

Cell viability analysis of STS cells upon simultaneous treatment with doxorubicin and PKF118-310. The antiproliferative effect of doxorubicin (10–500  $\mu\text{mol/L}$ ) as single compound or combined with PKF118-310 (0.25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 hours was studied in SK-UT-1, HT-1080, and 93T449 cells. Each value represents mean  $\pm$  SEM of three individual experiments performed in triplicate.

STS. This suggests that other mechanisms, such as autocrine loop activation (5), fusion proteins (31–33), or genomic aberrations (30) could be involved. In this study, we demonstrated the constitutive activation of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in a broad range of STS cell lines and primary cell cultures (liposarcomas, leiomyosarcomas, synovial sarcomas, and fibrosarcomas), and the impact of Wnt signaling inhibition on the growth of these tumoral cells by targeting cytosolic and nuclear components of this pathway. Moreover, to our knowledge, little or no information regarding Wnt signaling inhibition in liposarcomas and leiomyosarcomas has been reported until now, so this is the first study supporting this approach in L-sarcomas (liposarcomas and leiomyosarcomas).

Activation of the canonical Wnt pathway is generally associated with nuclear accumulation of active  $\beta$ -catenin that has escaped from proteasome degradation. In our study,  $\beta$ -catenin displayed a cytoplasmic/nuclear staining using immunofluorescence and in a high percentage of the studied STS cells (75%) nuclear staining was scored as strong, which is in accordance with previous studies (34). Moreover, in all STS subtypes,  $\beta$ -catenin was present in its phosphorylated and transcriptionally active form (Ser552), as shown by others in synovial sarcoma (33). Consistently, expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling target genes *CDC25A* and *CUL4A* was found elevated in STS relative to hMSCs, suggesting that *CUL4A* could be a novel targetable gene in sarcomas. Moreover, TCF reporter activity was also increased, and its activity in SK-UT-1 cells was similar to that found in the well-studied colorectal cancer cell line SW840. In contrast, *C-MYC* showed low expression in all the STS cells studied, confirming that *CDC25A*, but not *C-MYC*, is a

$\beta$ -catenin/TCF transcriptional target in sarcoma cells, as previously shown (5, 35). Likewise, *AXIN2* levels were only found elevated (relative to levels observed in hMSC) in STS cells harboring APC mutations, SK-UT-1 cells, and in the two colorectal cell lines, HT29 and HTC116, with endogenous activation of Wnt pathway, which were used as positive controls. Others have shown elevated *AXIN2* expression by Western blot analysis in the fibrosarcoma HT-1080 and the rhabdomyosarcoma cell lines, suggesting that its expression could depend on methodological issues leading to contradictory results in STS (33, 36). Altogether, these results clearly indicate that activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a frequent event in sarcomas and is independent of the sarcoma subtype, because sarcoma cells with the same histology had different levels of nuclear  $\beta$ -catenin immunoreactivity.

Once our results had demonstrated the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in sarcoma cell lines, the effect of blocking the Wnt signaling pathway at different levels, by AXIN stabilization of the destruction complex (XAV939 and IWR-1) and by disruption of  $\beta$ -catenin binding to TCF (PKF118-310), was explored. Upon treatment with XAV939 and IWR-1, STS cells displayed only partial inhibition of cell proliferation, cell-cycle changes, and decrease of Wnt target gene expression. The cell line in which XAV939 most effectively inhibited cell proliferation was the fibrosarcoma HT-1080 showing similar antitumoral results to those previously reported by De Robertis and colleagues (35). Only two of the studied STS cell lines harbor mutations, that is, in *APC* (leiomyosarcoma, SK-UT-1) and *CTNNB1* (fibrosarcoma SW684) genes, which could explain the failure of XAV939 to effectively inhibit the viability of these cell lines. In the rest of the



cell lines, alternative mechanisms could be responsible for this limited response. In line with this, IHC studies showed elevated AKT and a concomitant upregulation of downstream effectors (e.g., GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin) in tumors of patients with STS, especially synovial sarcoma (37, 38) and leiomyosarcoma (39). For this reason, our results show that the disruption of  $\beta$ -catenin/TCF binding with the small-molecule inhibitor PKF118-310 is the best strategy to significantly counteract Wnt/ $\beta$ -catenin dependent signal transduction *in vitro* in all STS cell lines studied.

At the molecular level, PKF118-310 reduced the levels of  $\beta$ -catenin in the nucleus and  $\beta$ -catenin/TCF-mediated transcriptional activity, leading to decreased mRNA levels of the Wnt target gene *CDC25A*, but not of *C-MYC*, in our panel of STS cell lines. Most probably as a consequence, PKF118-310 suppressed STS cell viability by induction of apoptosis. Our results are in agreement with those observed for synovial sarcoma cells (33), hepatocellular carcinoma (40), and hematopoietic malignancies (41), where small molecules were used to inhibit TCF/ $\beta$ -catenin interaction. Moreover, the fact that PKF-110-310 provoked the same decrease in TCF reporter activity as the transfection with wild-type APC of an APC-mutant cell line, that is, SK-UT-1, demonstrates that the inhibition of the Wnt canonical signaling pathway by PKF118-310 is specific. In this line, downregulation of Wnt signaling by using dnTCF4 provoked a reduction of *CDC25A* levels together with an inhibition of growth in HT-1080 and SK-UT-1 cells (5) similar to what was observed with PKF118-310. In this context, our study is the first showing significant antitumoral effects when PKF118-310 is applied to L-sarcomas and fibrosarcomas, expanding its relevance to the most frequent sarcomas in adults.

Inhibition of the pathway alone is unlikely to result in long-lasting responses due to coactivation of alternative oncogenic pathways (42). For this reason, we also explored the possibility of the combination of PKF118-310 with doxorubicin, as because a combination therapy will probably be the most promising option when targeting this molecular pathway. PKF118-310 simultaneously combined with different concentrations of the conventional therapeutic agent doxorubicin increased its antitumoral effect in an additive manner. Interestingly, Wnt signaling has also been related to the development of drug resistance mechanisms in response to doxorubicin in mantle cell lymphoma (43) and doxorubicin-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma (44), making it a promising combination therapy for sarcomas. Multidrug resistance (MDR) induced by doxorubicin is mainly caused by high expression of ATP-binding cassette (ABC) transporters, including P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-related protein (MRP-1) (45). In fact, Pgp is the product of *ABCB1* gene which has been described as a Wnt target gene in chronic myeloid leukaemia (46). The molecular

mechanism by which PKF118-310 sensitizes STS cells to doxorubicin should therefore be further explored.

In conclusion, these findings demonstrated that Wnt signaling is involved in STS survival and proliferation. Moreover, these results are highly translational because they show that TCF/ $\beta$ -catenin protein complex, a target of the small-molecule inhibitor PKF118-310, is a possible therapeutic target for STS. Its inhibition not only induced apoptosis in STS cells, but also enhanced the antitumoral effect of doxorubicin in sarcomas. Clinical trials with a similar compound (PRI-724) are currently in preparation for patients with metastatic colorectal cancer. Further characterization of the results of our study with *in vivo* models and in clinical settings, could benefit sarcoma patients with molecular alterations in this signaling pathway.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J. Martín-Broto has received speakers bureau honoraria from PharmaMar, Novartis, and Lilly and is a consultant/advisory board member of PharmaMar, Lilly, and Novartis. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

### Authors' Contributions

**Conception and design:** E. Martínez-Font, J. Martín-Broto, A. Obrador-Hevia  
**Development of methodology:** E. Martínez-Font, I. Felipe-Abrio, R. Ramos  
**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** S. Calabuig-Fariñas, R. Ramos, A. Obrador-Hevia  
**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** E. Martínez-Font, I. Felipe-Abrio, J. Terrasa, O. Vögler, R. Alemany, A. Obrador-Hevia  
**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** E. Martínez-Font, I. Felipe-Abrio, S. Calabuig-Fariñas, J. Terrasa, O. Vögler, R. Alemany, J. Martín-Broto, A. Obrador-Hevia  
**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** R. Ramos, A. Obrador-Hevia  
**Study supervision:** A. Obrador-Hevia

### Acknowledgments

We thank the Department of Oncology at the Hospital Universitari Son Espases and patients for providing samples, Drs. Catalina Crespí and Dr. Javier Pierola for technical support, and Andrea Ochoa for help with viability experiments and Dr. Aina Yañez for statistical support.

### Grant Support

This study was partially supported by the Institute of Health Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad) and the EC [European Regional Development Fund (ERDF); PI12/01748; to A. Obrador-Hevia, S. Calabuig-Fariñas, R. Ramos]. This study was also supported by PharmaMar, S.A.\_JM.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 12, 2016; revised October 13, 2016; accepted March 2, 2017; published OnlineFirst March 14, 2017.

### References

- Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2011;11:541-57.
- Linch M, Miah AB, Thway K, Judson IR, Benson C. Systemic treatment of soft-tissue sarcoma-gold standard and novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:187-202.
- Finch AJ, Soucek L, Junttila MR, Swigart LB, Evan GI. Acute overexpression of *Myc* in intestinal epithelium recapitulates some but not all the changes elicited by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation. *Mol Cell Biol* 2009;29:5306-15.
- Hartmann CA. Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* 2006;16:151-8.
- Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, et al. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/ $\beta$ -catenin target gene, *CDC25A*. *Cancer Cell* 2011;19:601-12.

6. Iwao K, Miyoshi Y, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent beta-catenin abnormalities in bone and soft-tissue tumors. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:205–9.
7. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Kawaguchi K, Tanaka K, Matsuda S, et al. APC mutations in synovial sarcoma. *J Pathol* 2002;196:445–9.
8. Watson AL, Rahrman EP, Moriarity BS, Choi K, Conboy CB, Greeley AD, et al. Canonical Wnt/beta-catenin signaling drives human Schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance. *Cancer Discov* 2013;3:674–89.
9. Gehrke I, Gandhirajan RK, Kreuzer KA. Targeting the WNT/beta-catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: multiplicity of therapeutic options. *Eur J Cancer* 2009;45:2759–67.
10. Marklein D, Graab U, Naumann I, Yan T, Ridzewski R, Nitzki F, et al. PI3K inhibition enhances doxorubicin-induced apoptosis in sarcoma cells. *PLoS One* 2012;7:e52898.
11. Wan X, Helman LJ. The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *Oncologist* 2007;12:1007–18.
12. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837–47.
13. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:513–32.
14. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009;461:614–20.
15. Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AM, Girgis-Gabardo A, Iliava D, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS One* 2012;7:e33976.
16. Pedetour F, Forus A, Coindre JM, Berner JM, Nicolo G, Michiels JF, et al. Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:30–41.
17. Sirvent N, Forus A, Lescaut W, Burel F, Benzaken S, Chazal M, et al. Characterization of centromere alterations in liposarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:117–29.
18. Moneo V, Serelde BG, Fominaya J, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Romero L, et al. Extreme sensitivity to Yondelis (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma cell lines correlates with mutated p53. *J Cell Biochem* 2007;100:339–48.
19. Miranda-Carboni GA, Krum SA, Yee K, Nava M, Deng QE, Pervin S, et al. A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors. *Genes Dev* 2008;22:3121–34.
20. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005;37:945–52.
21. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509–12.
22. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241–50.
23. Menendez M, Gonzalez S, Obrador-Hevia A, Domínguez A, Pujol MJ, Valls J, et al. Functional characterization of the novel APC N1026S variant associated with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2008;134:56–64.
24. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 2009;5:100–7.
25. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787–90.
26. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3046–50.
27. Goldstein SD, Trucco M, Guzman WB, Hayashi M, Loeb DM. A monoclonal antibody against the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget* 2016;7:21114–23.
28. Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Wijers-Koster PM, Abrunhosa AJ, Fontes-Ribeiro C, Bovée JV, et al. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Lett* 2016;370:286–95.
29. Stratford EW, Daffinrud J, Munthe E, Castro R, Waaler J, Krauss S, et al. The tankyrase-specific inhibitor JW74 affects cell cycle progression and induces apoptosis and differentiation in osteosarcoma cell lines. *Cancer Med* 2013;3:36–46.
30. Kanojia D, Nagata Y, Garg M, Lee DH, Sato A, Yoshida K, et al. Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* 2015;6:42429–44.
31. Pedersen EA, Menon R, Bailey KM, Thomas DG, Van Noord RA, Tran J, et al. Activation of Wnt/beta-catenin in Ewing sarcoma cells antagonizes EWS/ETS function and promotes phenotypic transition to more metastatic cell states. *Cancer Res* 2016;76:5040–53.
32. Cironi L, Petricevic T, Fernandes Vieira V, Provero P, Fusco C, Cornaz S, et al. The fusion protein SS18-SSX1 employs core Wnt pathway transcription factors to induce a partial Wnt signature in synovial sarcoma. *Sci Rep* 2016;6:22113.
33. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, et al. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/beta-catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene* 2014;33:5006–16.
34. Ng TL, Gown AM, Barry TS, Cheang MC, Chan AK, Turbin DA, et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* 2005;18:68–74.
35. De Robertis A, Mennillo F, Rossi M, Valensin S, Tunicci P, Mori E, et al. Human sarcoma growth is sensitive to small-molecule mediated AXIN stabilization. *PLoS One* 2014;9:e97847.
36. Annavarapu SR, Cialfi S, Dominici C, Kokai GK, Uccini S, Ceccarelli S, et al. Characterization of Wnt/beta-catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* 2013;93:1090–9.
37. Bozzi F, Ferrari A, Negri T, Conca E, Luca DR, Losa M, et al. Molecular characterization of synovial sarcoma in children and adolescents: evidence of Akt activation. *Transl Oncol* 2008;1:95–101.
38. Friedrichs N, Trautmann M, Endl E, Sievers E, Kindler D, Wurst P, et al. Phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in synovial sarcoma. *Int J Cancer* 2011;129:1564–75.
39. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med* 2007;13:748–53.
40. Wei W, Chua MS, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2010;126:2426–36.
41. Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, Gehrke I, Plickert G, Schlösser A, et al. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Neoplasia* 2010;12:326–35.
42. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:11–26.
43. Mathur R, Sehgal L, Braun FK, Berkova Z, Romaguerra J, Wang M, et al. Targeting Wnt pathway in mantle cell lymphoma-initiating cells. *J Hematol Oncol* 2015;8:63.
44. Zhou Y, Liang C, Xue F, Chen W, Zhi X, Feng X, et al. Salinomycin decreases doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the beta-catenin/TCF complex association via FOXO3a activation. *Oncotarget* 2015;6:10350–65.
45. Villar VH, Vogler O, Martinez-Serra J, Ramos R, Calabuig-Fariñas S, Gutiérrez A, et al. Nilotinib counteracts P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and synergizes the antitumoral effect of doxorubicin in soft tissue sarcomas. *PLoS One* 2012;7:e37735.
46. Correa S, Binato R, Du Rocher B, Castelo-Branco MT, Pizzatti L, Abdelhay E. Wnt/beta-catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer* 2012;12:303.

# Molecular Cancer Therapeutics

## Disruption of TCF/ $\beta$ -Catenin Binding Impairs Wnt Signaling and Induces Apoptosis in Soft Tissue Sarcoma Cells

Esther Martinez-Font, Irene Felipe-Abrio, Silvia Calabuig-Fariñas, et al.

*Mol Cancer Ther* 2017;16:1166-1176. Published OnlineFirst March 14, 2017.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/1535-7163.MCT-16-0585](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0585)

**Supplementary Material** Access the most recent supplemental material at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/suppl/2017/03/14/1535-7163.MCT-16-0585.DC1>

**Cited articles** This article cites 46 articles, 8 of which you can access for free at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/6/1166.full#ref-list-1>

**Citing articles** This article has been cited by 5 HighWire-hosted articles. Access the articles at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/6/1166.full#related-urls>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.




**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, use this link  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/6/1166>.  
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

# **ANNEX 5**

Article

# Impact of Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibition on Cell Proliferation through *CDC25A* Downregulation in Soft Tissue Sarcomas

Esther Martínez-Font <sup>1,2,†</sup>, Marina Pérez-Capó <sup>1,2,†</sup> , Rafael Ramos <sup>3</sup>, Irene Felipe <sup>4</sup> , Carmen Garcías <sup>1,2</sup>, Pablo Luna <sup>2</sup>, Josefa Terrasa <sup>1,2</sup>, Javier Martín-Broto <sup>5,6</sup>, Oliver Vögler <sup>1,7</sup>, Regina Alemany <sup>1,7</sup> and Antònia Obrador-Hevia <sup>1,8,\*</sup> 

<sup>1</sup> Group of Advanced Therapies and Biomarkers in Clinical Oncology, Health Research Institute of the Balearic Islands (IdISBa-IUNICS), Son Espases University Hospital, 07120 Palma, Spain; esther.martinez@ssib.es (E.M.-F.); marina.perez@ssib.es (M.P.-C.); mariad.garcias@ssib.es (C.G.); josefa.terrasa@ssib.es (J.T.); oliver.vogler@uib.es (O.V.); regina.alemany@uib.es (R.A.)

<sup>2</sup> Medical Oncology Department, Son Espases University Hospital, 07120 Palma, Spain; pablo.luna@ssib.es

<sup>3</sup> Pathology Department, Son Espases University Hospital, 07120 Palma, Spain; rafaelf.ramos@ssib.es

<sup>4</sup> Epithelial Carcinogenesis Group, Spanish National Cancer Research Centre-CNIO, 28029 Madrid, Spain; ifelipe@cnio.es

<sup>5</sup> Medical Oncology Department, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Sevilla, Spain; jmartin@mustbesevilla.org

<sup>6</sup> Institute of Biomedicine of Sevilla, IBIS, HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

<sup>7</sup> Group of Clinical and Translational Research, Department of Biology, University of the Balearic Islands, 07122 Palma, Spain

<sup>8</sup> Molecular Diagnosis Unit, Son Espases University Hospital, 07120 Palma, Spain

\* Correspondence: antonia.obrador@ssib.es; Tel.: +34-8-7120-5448

† These authors contributed equally to this work.

Received: 6 August 2020; Accepted: 4 September 2020; Published: 8 September 2020



**Simple Summary:** Growing evidence suggests that Wnt signaling may be crucial for tumorigenesis and progression of soft tissue sarcomas (STS). Inhibitors of this pathway are currently in clinical trials or pre-clinical studies in order to validate its utility in different neoplasia. One of this inhibitors, PRI-724, is showing promising results for advanced pancreatic adenocarcinoma or ovarian cancer. We found that PRI-724 is able to suppress cell viability/proliferation and to increase cell death rates of soft tissue sarcomas cells in vitro. *CDC25A*, a target gene of Wnt signaling pathway, is essential for STS proliferation because its downregulation via siRNA was able to mimic the effect of PRT-724 on cell cycle arrest and evaluation of NCBI/GenBank data confirmed its overexpression in STS patients' samples. Moreover, in vitro administration of PRI-724 along with standard STS chemotherapeutic drugs improved the efficacy of chemotherapy, suggesting that Wnt inhibition could be a promising new therapeutic strategy in STS.

**Abstract:** The Wnt signaling pathway is an important cellular mechanism for regulating differentiation processes as well as cell cycle events, and different inhibitors of this pathway, for example, PRI-724, are showing promising results in clinical trials for treatment of advanced pancreatic adenocarcinoma or ovarian cancer. Growing evidence suggests that Wnt signaling may also be crucial for tumorigenesis and progression of soft tissue sarcomas (STS), a malignant neoplasm with few therapeutic options at an advanced state. Our study with several STS cell lines and primary cultures shows that inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with PRI-724 is able to suppress cell viability/proliferation and to increase cell death rates. TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity is decreased in treated cells, leading to downregulation of its target genes *CCND1* and *CDC25A*. The latter was critical because its downregulation via siRNA was able to mimic the effect of PRI-724 on cell cycle arrest and cell death induction. An evaluation of NCBI/GenBank data confirmed that *CDC25A* mRNA is elevated in STS patients. Importantly, PRI-724 in

combination with standard STS chemotherapeutics doxorubicin or trabectedin enhanced their antitumoral effect in a synergistic manner according to isobolographic analysis, suggesting that Wnt inhibition through PRI-724 could be a beneficial combination regime in patients with advanced STS.

**Keywords:** soft tissue sarcoma; Wnt signaling;  $\beta$ -catenin; CDC25A; PRI-724

---

## 1. Introduction

Soft tissue sarcomas (STS) are a heterogeneous group of malignant tumors of mesenchymal origin with 50 different histological subtypes. STS are part of the so-called rare cancers, since they have a low incidence on the population, representing only one per cent of all solid malignant neoplasia in adults [1,2]. Surgery with or without radiotherapy and chemotherapy is the first treatment option in patients with localized disease. Unfortunately, recurrence is frequent, reaching up to 60% or higher in high-risk localized populations. Therefore, systematic therapy for metastatic or unresectable patients is needed to offer some disease control [3]. The therapeutic options for inoperable or metastatic STS only offer a limited benefit on the prognosis and patients' survival making the search for new molecular targets and the development of novel therapeutic approaches a still unmatched goal.

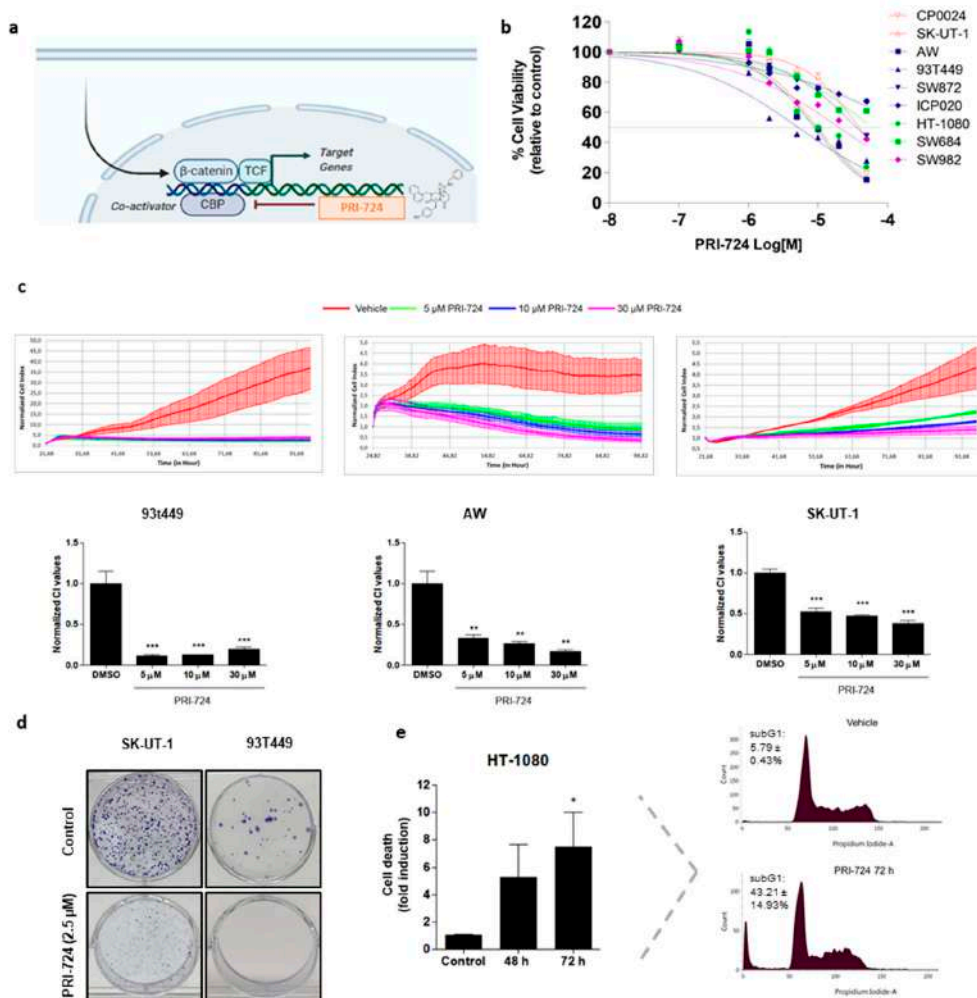
In many cancers, including soft tissue sarcomas, the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is found to have aberrant activation [4–6]. Its normal function is to regulate the development and homeostasis of many tissues, including those derived from mesenchymal cell lineages. The canonical the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is activated with the binding of extracellular Wnt ligand to Frizzled (FZD) receptors and low-density lipoprotein receptor-related proteins-5/6 (LRP5/6) co-receptors. This triggers an intracellular signaling cascade that inactivates the Axin-APC-GSK3 $\beta$  destruction complex, allowing the accumulation of non-phosphorylated  $\beta$ -catenin in the cytoplasm. Free non-phosphorylated  $\beta$ -catenin then translocates to the nucleus and binds to the T-cell factor/lymphoid enhancer factor-1 (TCF/LEF) family of transcription factors and coactivator complexes, thereby inducing transcription of Wnt target genes [7].

Wnt pathway is frequently dysregulated through a variety of genetic and epigenetic mechanisms, such as loss of function mutations in *APC* gene, especially in colorectal carcinomas, or point mutations in  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*), which prevent its GSK3-dependent phosphorylation in a variety of tumors [5,6,8]. In the context of sarcomas, Wnt canonical pathway has been shown to be upregulated by other mechanisms [8,9]. It is known that SS18-SSX, the oncogenic fusion protein in synovial sarcoma, drives constitutively active  $\beta$ -catenin signaling allowing tumor formation [8,10,11]. Moreover, an increase in Wnt receptor expression or a loss of expression of secreted inhibitors due to increased  $\beta$ -catenin activity is frequently observed in osteosarcoma. Therefore, the aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling disrupts normal bone development [8,12]. On the other hand, we and others have described that the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is constitutively activated in a panel of STS cell lines and tumor-derived cells (liposarcomas, leiomyosarcomas, synovial sarcomas and fibrosarcomas), which confer them a highly proliferative and survival capacity, with *CDC25A* being a key target gene [11,13,14].

Many efforts have been made over the past decades in order to target the canonical Wnt signaling in cancer. There are multiple Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitors, including biological and small molecules, which have shown promising activities in cancer therapy by disrupting the pathway at different points [15–19]. The biological compounds include antibodies, RNA interference molecules and recombinant proteins that target Wnt proteins and extracellular modulators of the pathway [19,20]. Small molecules can be divided into four categories according to their mechanism of action [19]. At present, the Class I types (e.g., PKF118-310, CGP049090, CWP232228) are receiving increasing attention because they block the final step of the whole signaling pathway, i.e., the interaction of  $\beta$ -catenin with TCF. As a result, they more efficiently bypass all aberrant activations of the Wnt signaling pathway caused by any upstream dysregulation [16,18,19,21–23]. Recently, our group showed that

PKF118-310 effectively inhibits cell proliferation by inducing apoptosis in a panel of representative STS cell lines and primary cultures with upregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Importantly, PKF118-310 simultaneously combined with doxorubicin, the standard first-line therapy in metastatic STS, increased its antitumoral effect in a synergistic manner [14].

Despite the fact that most of those Wnt inhibitors are in preclinical phases, a few of them, especially OMP-54F28 (Ipafricept) and PRI-724, are showing positive results in clinical trials for cancer treatment [15,16,21–26]. A phase I trial of Ipafricept in combination with chemotherapy in ovarian cancer reported that 35% of patients showed complete response, 47% exhibited a partial response, and 18% had stable disease [27]. PRI-724 belongs to the Class II small molecule Wnt inhibitors, which are antagonists of  $\beta$ -catenin transcriptional coactivators. PRI-724 specifically inhibits CBP (CREB-binding protein)/ $\beta$ -catenin interaction, thereby reducing the recruiting of  $\beta$ -catenin with its coactivator CBP [26,28] (Figure 1a). In a phase Ib study, PRI-724 exhibited modest antitumoral activity when combined with gemcitabine as second-line therapy in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma [29]. In addition, a phase II clinical trial is currently underway in which PRI-724 is evaluated in combination with chemotherapy and bevacizumab for the treatment of patients with newly diagnosed metastatic colorectal cancer [30].



**Figure 1.** Inhibition of the interaction between  $\beta$ -catenin and its transcriptional coactivator CBP suppresses cell viability and colony formation of STS cell lines. (a) PRI-724 inhibits  $\beta$ -catenin interaction with its co-activator CBP. (b) STS cells were treated with PRI-724 (0.1–50  $\mu$ M) and cell viability was determined after 48 h. Data is represented as mean  $\pm$  SEM percentage of cell viability relative to vehicle-

treated cells calculated from three independent experiments performed in triplicate. (c) STS cells were treated with PRI-724 (5, 10 and 30  $\mu\text{M}$ ) for 72 h and cell growth was continuously monitored using the RTCA MP Instrument. Cell Index (CI) values were normalized to the CI value at the time point of compound addition. (Upper panel) The CI profiles of PRI-724-treated cells and DMSO-treated cells (red line) reflect response to the respective treatments. Error bars show the standard deviation of the mean of triplicates of at least two independent experiments. (Lower panel) Quantification of Normalized CI values at 48 h. (d) STS cells were treated with PRI-724 (2.5  $\mu\text{M}$ ) every 96 h. After 9 days, colonies reached saturation and quantification of colony-forming ability was determined by counting the colonies using the ImageJ software (ImageJ 1.51j8, Wayne Rasband, NIH, USA). The panel shows representative results of at least three independent experiments. (e) Cells were treated with PRI-724 (10  $\mu\text{M}$ ) for 48 and 72 h, fixed with ethanol, stained with propidium iodide, and DNA content was determined by flow cytometry. Columns show the extent of cell death induction with the inhibitor represented as fold increase at 48 and 72 h. Each column represents mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Histograms of vehicle-treated (control) and PRI-724-treated cells (10  $\mu\text{M}$ ) for 72 h are shown. The fluorescence values used to calculate the peaks corresponding to the sub-G1 phase (cell death) are indicated on each histogram. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  compared with vehicle-treated cells.

In the present work, we examined the antitumor efficacy of PRI-724 in a panel of prevalent STS cell lines and primary cultures. Our findings show that inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction suppresses the proliferation of a wide range of STS cell lines and patient-derived cells and promotes cell death, at least in part, via *CDC25A* downregulation. Furthermore, the combination of PRI-724 with conventional chemotherapeutic agents used in the treatment of metastatic STS, such as doxorubicin and trabectedin, increased their antitumoral effects in a synergistic manner, suggesting that CBP/ $\beta$ -catenin inhibitors, such as PRI-724, could also be a promising therapeutic option for STS patients, and should be further evaluated.

## 2. Results

### 2.1. Inhibition of CBP/ $\beta$ -Catenin Interaction Suppresses Cell Viability and Colony Formation of STS Cell Lines

To test the effect of CBP/ $\beta$ -catenin disruption on cell proliferation, STS cell lines and primary cultures representing different sarcoma histologies and mutational background were exposed to increasing concentrations of PRI-724 (0.1–50  $\mu\text{M}$ ) for 24, 48 and 72 h (Table S1). As shown in Figure 1b, after 48 h of treatment cell viability was reduced below 50% in 77.8% (7/9) of the cell lines tested. 93T449, AW, HT-1080 and CP0024 cell lines were more sensitive to treatment, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 5.18 to 9.77  $\mu\text{M}$ , compared with SW982, SW872 and SK-UT-1, with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 20.13 to 38.86  $\mu\text{M}$  (Table S1 shows  $\text{IC}_{50}$  values for 48 h treatment). Two cell lines, the commercial fibrosarcoma cell line SW684 and the primary liposarcoma culture ICP020, were more resistant to this Wnt inhibitor, since it was not able to achieve a 50% inhibition of cell viability at any of the concentrations studied. In addition, similar results were obtained when cell growth was continuously monitored in liposarcoma AW, 93T449 and leiomyosarcoma SK-UT-1 cells under PRI-724 treatment by using the xCELLigence system (Figure 1c). To assess whether disruption of CBP/ $\beta$ -catenin interaction altered more phenotypic properties of tumoral cells, colony formation assay was performed in two cell lines with different sensitivity to PRI-724. After 9 days of treatment, PRI-724 (2.5  $\mu\text{M}$ ) significantly decreased the colony-forming ability of leiomyosarcoma SK-UT-1 and liposarcoma 93T449 cells. As shown in Figure 1d, the reduction effect of PRI-724 was  $52.04 \pm 4.12\%$  in SK-UT-1 cells and  $99.59 \pm 0.22\%$  in 93T449 cells, the latter being the most sensitive cell line to this Wnt inhibitor according to the proliferation assay. Taken together, PRI-724 was able to reduce viability as well as proliferation of STS cells, and no correlation between antitumoral effects and histology of cell lines could be established.

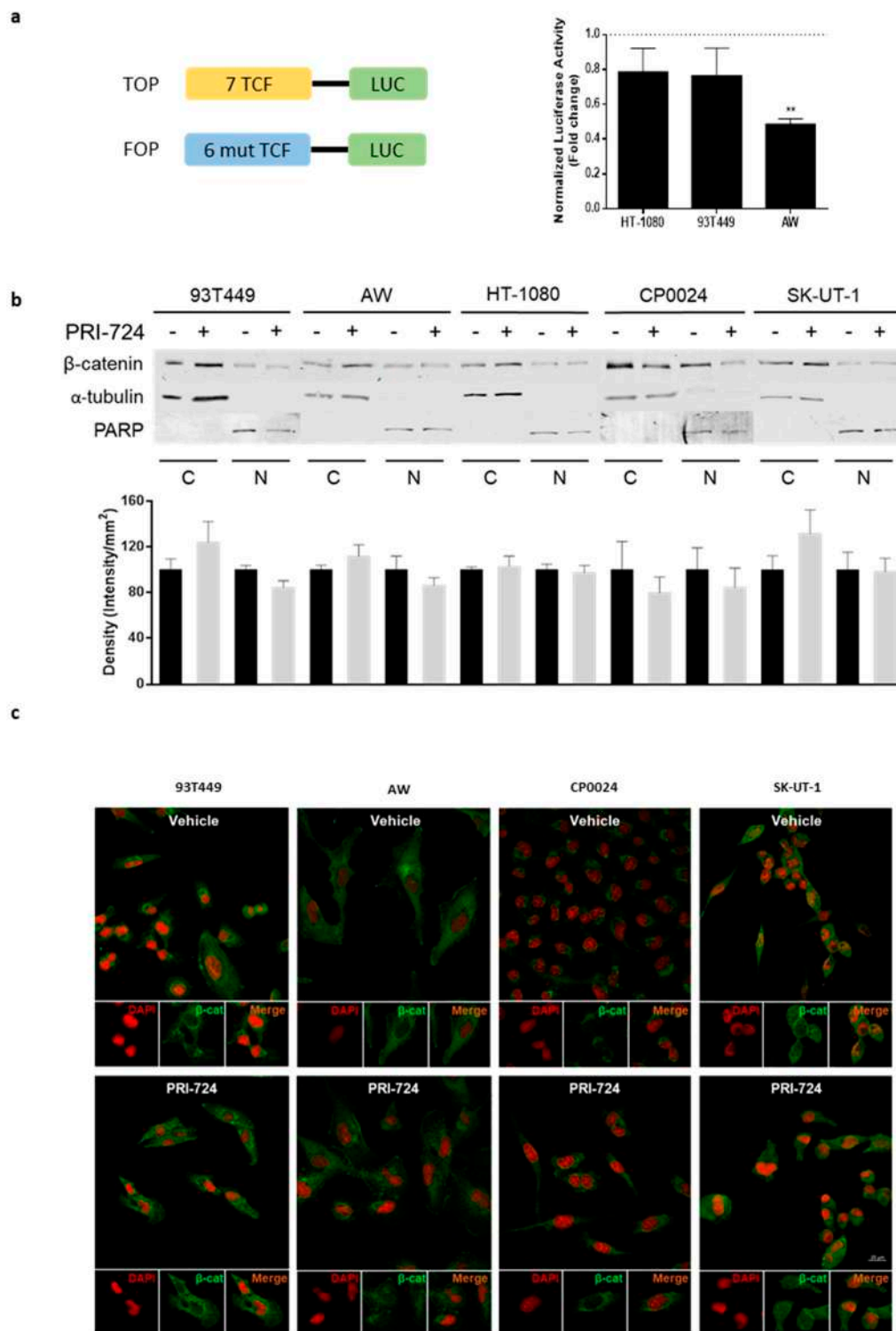


## 2.2. Inhibition of CBP/ $\beta$ -Catenin Interaction Promotes Cell Death of STS Cell Lines

Cell cycle profiling was performed on STS cells treated with PRI-724 by flow cytometry (Figure 1e and Figure S1). Treatment with PRI-724 for 48 and 72 h increased the sub-G1 phase of STS cells in a time-dependent manner, being statistically significant in only two of the five cell lines tested. At 10  $\mu$ M, CBP/ $\beta$ -catenin inhibitor provoked in fibrosarcoma HT-1080 and leiomyosarcoma SK-UT-1 the highest effect on the sub-G1 phase, thus raising cell death in vehicle-treated cells after 72 h 8- and 4-fold, respectively. This effect of CBP/ $\beta$ -catenin inhibition was more moderate in the rest of the cell lines tested, increasing cell death 2-fold after 72 h of treatment. Taken together, these results indicate that PRI-724 exhibits antiproliferative activity, at least in part, by triggering cell death in STS cell lines. Additional studies performed with Annexin V/PI and assessment of the cleavage of PARP by immunoblot, as well as measurement of caspase 3/7 activities (Figure S2) ruled out that the involved mechanism of cell death provoked by PRI-724 treatment was apoptosis.

## 2.3. Inhibition of CBP/ $\beta$ -Catenin Interaction Reduces TCF/ $\beta$ -Catenin-Mediated Transcriptional Activity, but Not $\beta$ -Catenin Subcellular Localization

To further evaluate the effects of PRI-724 treatment on STS, we chose representative cell lines covering a wide range of sensitivity to this inhibitor, i.e., 93T449, AW, HT-1080, CP0024 and SK-UT-1 (Table S1). As we previously reported, STS cell lines have basal TCF/ $\beta$ -catenin mediated transcriptional activity [14] being similar to that of human colon cancer cells, whose Wnt pathway is known to be strongly activated. To evaluate the effect of CBP/ $\beta$ -catenin disruption on  $\beta$ -catenin transcriptional activity, TCF reporter activity was evaluated in STS cells treated with PRI-724 by TOP/FOPflash luciferase reporter assay. As shown in Figure 2a, PRI-724 treatment for 24 h led to a reduction of TCF/ $\beta$ -catenin reporter activity in fibrosarcoma HT-1080 cells and 93T449 and AW liposarcoma cells. The inhibitory effect of PRI-724 on TCF/ $\beta$ -catenin reporter activity was rather small in HT-1080 and 93T449 cells (20% of decrease), while it inhibited by 50% the  $\beta$ -catenin transcriptional activity in AW cells. Several studies have shown that compounds that disrupt the interaction between  $\beta$ -catenin and TCF/LEF transcription factors prevent nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin [14,31]. To investigate whether the disruption of  $\beta$ -catenin interaction with CBP had a similar effect on  $\beta$ -catenin localization, SK-UT-1, HT-1080 and 93T449 with strong nuclear  $\beta$ -catenin staining, CP0024 with moderate nuclear staining of  $\beta$ -catenin and AW with weak  $\beta$ -catenin nuclear staining were treated with the PRI-724 at 10  $\mu$ M for 48 h. After treatment, intracellular location of  $\beta$ -catenin was determined by nuclear/cytoplasmic fractionation and immunofluorescence showing that disruption of CBP/ $\beta$ -catenin interaction was not able to reduce nuclear  $\beta$ -catenin levels in the STS cell lines studied, instead a mild increase in nuclear  $\beta$ -catenin was detected by immunofluorescence in 93T449 cells (Figure 2b,c and Figures S3 and S4).

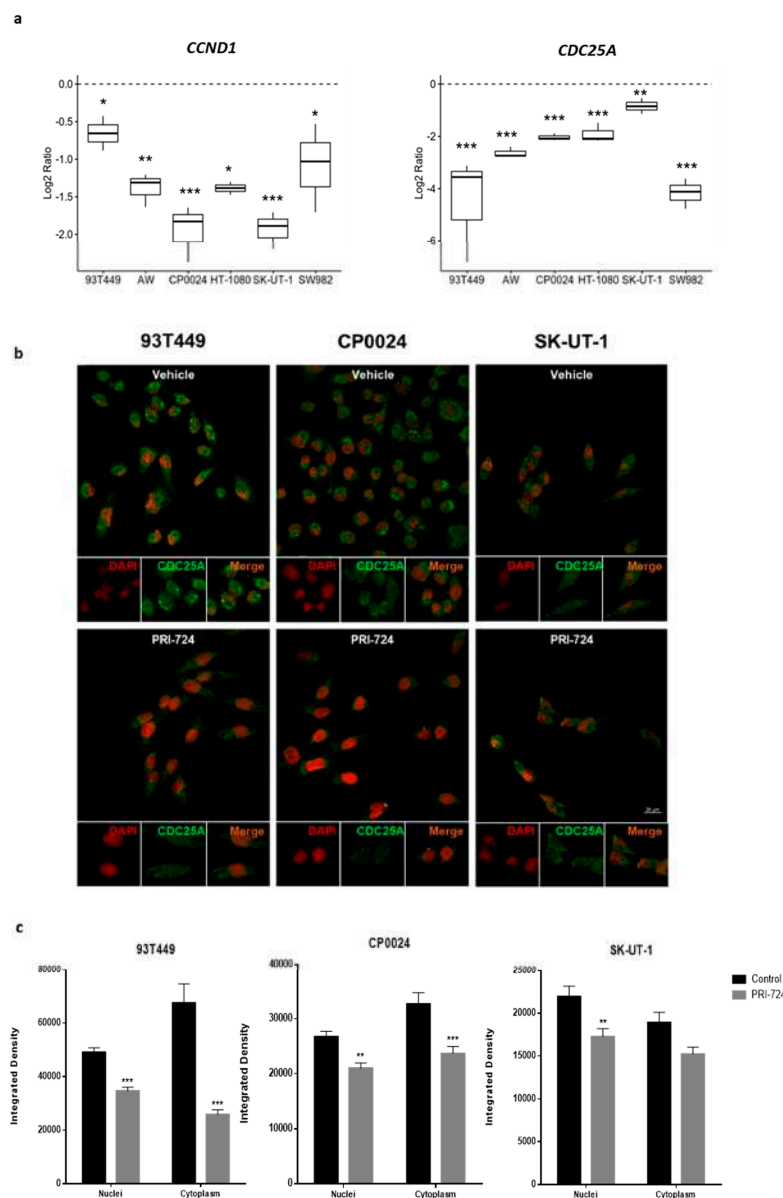


**Figure 2.** Inhibition of CBP/β-catenin interaction reduces TCF/β-catenin-mediated transcriptional activity, but not β-catenin subcellular localization. (a) STS cells were treated with PRI-724 (10 μM) or vehicle (control, DMSO) for 24 h and transfected with TCF reporter system plasmids. After 24 h of transfection, luciferase reporter activity was measured. Firefly luciferase was normalized to Renilla luciferase activity. Results are expressed as fold change of normalized luciferase activity values relative to those of each control. Each column represents mean ± SEM of two independent experiments performed in triplicate. \*\*  $p < 0.01$  compared with vehicle-treated cells. (b) STS cells treated with PRI-724 (10 μM)

for 48 h were subjected to subcellular fractionation. Upper panel shows the immunoreactive bands of  $\beta$ -catenin in cytoplasmic and nuclear fractions in a representative immunoblot of at least three independent experiments.  $\alpha$ -Tubulin and PARP were used as a cytoplasmic and nuclear marker, respectively. Intensity quantification of the bands are shown in the bottom graphs. (c) STS cells were treated with PRI-724 (10  $\mu$ M) for 48 h and fixed with methanol: acetone (1:1).  $\beta$ -catenin was visualized with the primary antibody  $\beta$ -catenin (D10A8) [(XP Rabbit mAb #8480, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)] followed by the addition of the secondary antibody Alexa Fluor 488 (Goat a-R A11008, Invitrogen S.A, Barcelona, Spain). DAPI was added to visualize the nuclei. Panel shows representative images taken with confocal microscope, ZEISS LSM 710 (Carl Zeiss Microscope GmbH, Jena, Germany), with a 40 $\times$  objective and power of 512  $\times$  512 pixels of at least two independent experiments performed in duplicate.

#### 2.4. Inhibition of CBP/ $\beta$ -Catenin Interaction Reduces TCF/ $\beta$ -Catenin-Dependent Expression of Target Genes

To further investigate the effect of CBP/ $\beta$ -catenin disruption in STS cells, the expression of Wnt downstream signaling targets in STS treated with PRI-724 was assessed by RT-PCR. *CCND1* is a well-known cell cycle regulator and *CDC25A* has been described as a major regulator of cell cycle progression in STS [13,14], with both of them being TCF/ $\beta$ -catenin-dependent target genes. Previous results showed that *CDC25A* gene levels in STS cells are higher than those of hMSCs, a reference cell line with low levels of endogenous Wnt signaling [14]. Interestingly, in APC-mutated-SK-UT-1 cells, endogenous *CDC25A* levels were higher than those found in two colorectal cancer cell lines with strong intrinsic Wnt signaling activity used as positive controls. Treatment with PRI-724 revealed a progressive time-dependent downregulation of *CDC25A* gene in all cell lines tested, whereas *CCND1* gene expression decreased only during the first 48 h of treatment, recovering its expression afterwards (Figure 3a and Figure S5). As expected, the downregulation effect of PRI-724 on *CDC25A* expression was less pronounced in SK-UT-1 cells (reduction of 20%, 44% and 51% after 24, 48 and 72 h, respectively) (Table S1). To evaluate *CDC25A* protein levels, immunofluorescence analysis was performed due to inconsistent data obtained by immunoblot with different *CDC25A* antibodies. In line with the results of mRNA expression, they confirmed a significant reduction of *CDC25A* protein levels in STS cells after 48 h of PRI-724 treatment (10  $\mu$ M). *CDC25A* protein was detected in cytoplasmic as well as nuclear compartments in the analyzed STS cells (Figure 3b,c). Liposarcoma 93T449 and leiomyosarcoma CP0024 cells, which were more sensitive to disruption of CBP/ $\beta$ -catenin interaction (Table S1), had higher levels of *CDC25A* protein in the cytoplasm than in the nuclei. Conversely, in leiomyosarcoma SK-UT-1 cells, one of the most resistant cell lines to this Wnt inhibitor (Table S1), the *CDC25A* expression was greater in the nucleus than in the cytoplasm. In agreement with their sensibility to PRI-724, the greatest inhibitory effect of this compound on *CDC25A* protein levels was observed in liposarcoma 93T449 cells (Figure 3b,c) when compared with leiomyosarcoma CP0024 or SK-UT-1 cells. Thus, PRI-724 exerted an inhibitory effect on expression of *CDC25A* being in line with the decrease of  $\beta$ -catenin transcriptional activity shown with the reporter assay.

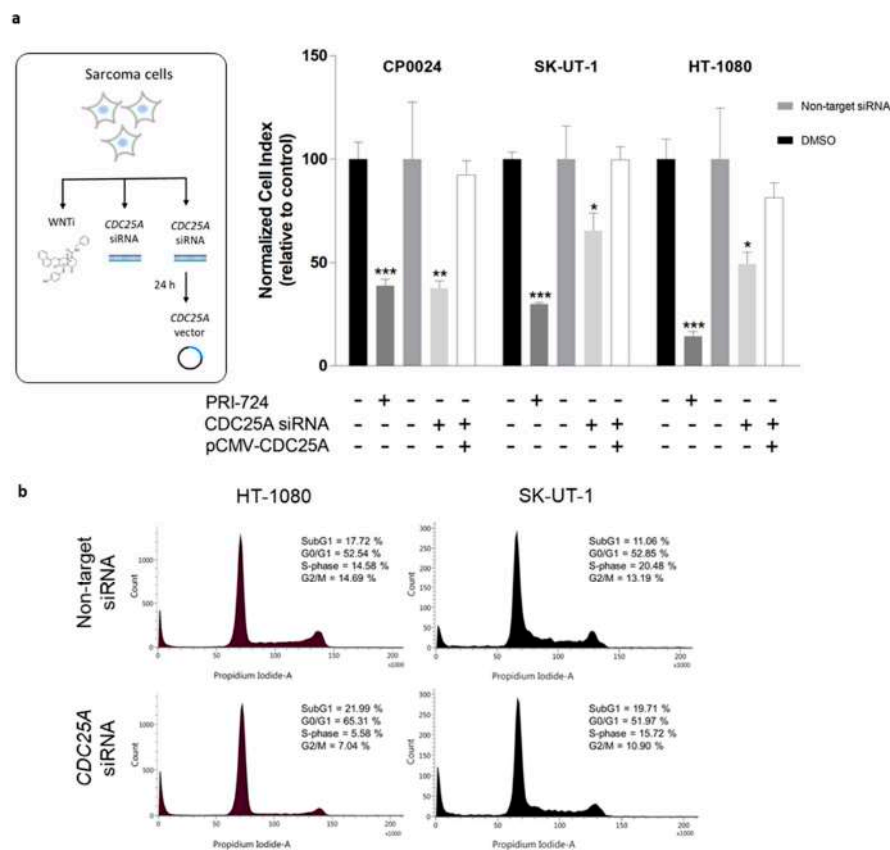


**Figure 3.** Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction decreases the expression of TCF/ $\beta$ -catenin dependent target genes. (a) *CCND1* and *CDC25A* mRNA expression levels in STS cells treated with PRI-724 (10  $\mu$ M) for 48 h. Each column represents means  $\pm$  SEM of three independent determinations performed by duplicate. (b) STS cells were treated with PRI-724 (10  $\mu$ M) for 48 h, fixed with methanol: acetone (1:1) and incubated with the primary antibody CDC25A (M-191) (sc-7157, Santa Cruz) followed by the addition of the secondary antibody Alexa Fluor 488 (Goat a-R A11008, Invitrogen). DAPI was added to visualize the nuclei. Panel shows representative images taken with confocal microscope, ZEISS LSM 710 (Carl Zeiss Microscope GmbH, Jena, Germany), with a 40 $\times$  objective and power of 512  $\times$  512 pixels of at least two independent experiments performed in duplicate. (c) Nuclear and cytoplasmic CDC25A protein levels were quantified measuring the integrated density by ImageJ software. Each column represents mean  $\pm$  SEM of two independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  compared with vehicle-treated cells.

### 2.5. *CDC25A* Is a Major Regulator of STS Cell Proliferation Mediated by $\beta$ -Catenin Transcriptional Activity

To elucidate the role of *CDC25A* in STS proliferation we used those STS cells lines with a higher expression of *CDC25A*, SK-UT-1, HT-1080 and CP0024, as determined in a previous work [14]. A small interfering RNA (siRNA) to specifically downregulate *CDC25A* gene expression was used

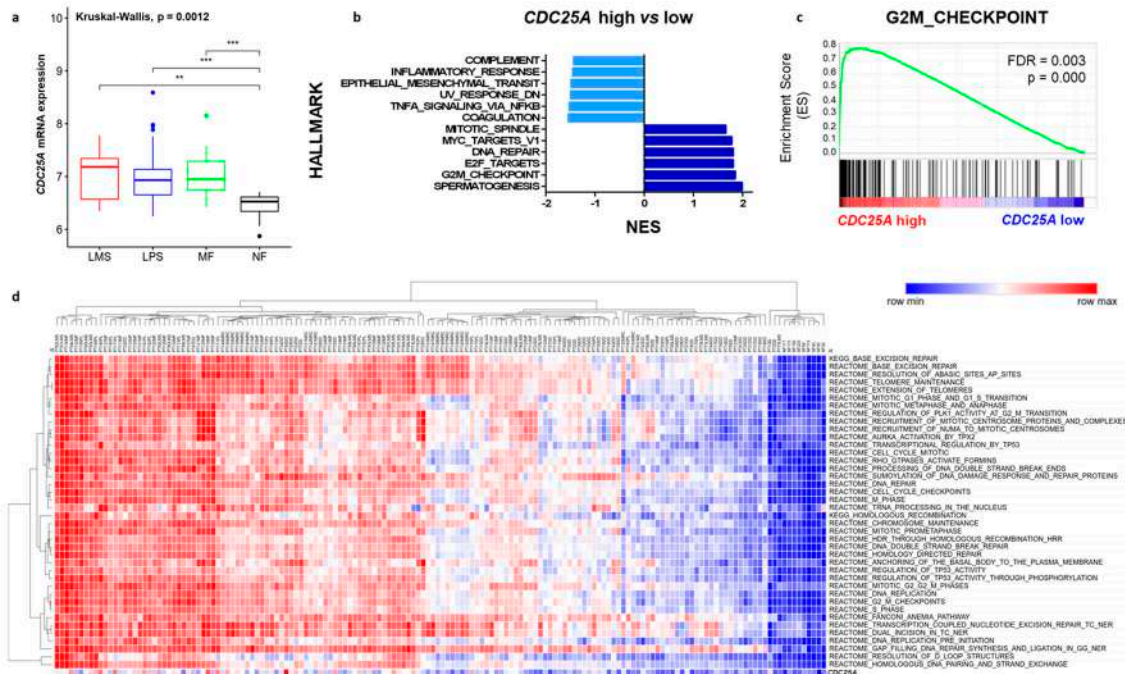
(Figures S6 and S7). Fibrosarcoma HT-1080 and leiomyosarcoma CP0024 and SK-UT-1 cells were transiently transfected with *CDC25A* siRNA, and cell viability was continuously monitored using the xCELLigence system. As shown in Figure 4a, the inhibitory effect of PRI-724 at 30  $\mu$ M was evaluated, as this corresponded to the IC<sub>50</sub> concentration regarding proliferation inhibition of the most resistant cell line SK-UT-1. In fact, cell proliferation of CP0024 decreased by 66%, which was very similar to the 55% reduction induced by the downregulation (silencing) of *CDC25A* expression. However, *CDC25A* downregulation caused a moderate reduction of cell proliferation in SK-UT-1 and HT-1080 cell lines (22% and 49%, respectively) compared to that caused by CBP/ $\beta$ -catenin inhibition (70% and 89%, respectively). Interestingly, exogenous expression of *CDC25A* by co-transfecting cells with pCMV-*CDC25A* 24 h after siRNA transfection rescued cell index values after 48 h in all cells tested (Figure 4a white column). As *CDC25A* is an important regulator of cell cycle progression, we performed cell cycle analysis by flow cytometry to determinate the effect of *CDC25A* gene downregulation in the different phases of the cell cycle. As seen in Figure 4b, *CDC25A* downregulation inhibited cell proliferation in HT-1080 and SK-UT-1 cells by impairing cell cycle progression through the G1 checkpoint or by cell death induction. These results show that *CDC25A* is a relevant mediator of proliferation in STS and its downregulation leads to a decrease of cell growth as treatment with PRI-724.



**Figure 4.** Depletion of *CDC25A* inhibits cell proliferation either via cell death induction or G1 arrest in STS cells. (a) STS cells were treated with PRI-724 (30  $\mu$ M), transfected with *CDC25A* siRNA or Non-Target siRNA for 72 h. After 24 h of siRNA transfection, STS cells were co-transfected with pCMV-*CDC25A* plasmid or the empty vector pcDNA3.1 for 48 h. Cell growth was continuously monitored using the RTCA MP Instrument. Cell index (CI) values were normalized to each CI value at the time point of compound addition or transfection. Each column represents mean  $\pm$  SEM of cell index values of two independent experiments performed in quadruplicate. (b) STS cells were transfected with *CDC25A* siRNA or Non-Target siRNA for 72 h, fixed in ethanol, stained with propidium iodide,

and DNA content was determined by flow cytometry. Representative histograms of propidium iodide from the singlet gate are represented to display the phases of the cell cycle of at least three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

To further address the clinical relevance of *CDC25A* in STS, its mRNA expression levels were examined in a broad series of patient samples ( $n = 149$ ) gathered from a public TCGA data set [32] including 26 leiomyosarcomas, 89 liposarcomas, 34 myxofibrosarcomas and 9 control adipose tissue samples. As shown in Figure 5a *CDC25A* mRNA expression was similar between STS subtypes and higher when compared with control normal fat tissue samples. In conclusion, as shown by our results and public data, *CDC25A* is overexpressed in STS samples and seems to be involved in tumor proliferation. To further investigate this question, we analyzed the tumor same sample set by using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in order to identify curated gene signatures whose expression changed significantly in *CDC25A* high STS patient samples. For that purpose, samples were separated in two groups, *CDC25A* high and *CDC25A* low, based on *CDC25A* first and last quartile of expression. As shown in Figure 5b,c and Table S3, gene signatures related with cell cycle regulation and DNA repair were significant enriched in the *CDC25A* high subgroup. Single-sample GSEA (ssGSEA) enrichment score represents the degree to which the genes in a particular gene set are coordinately up- or down-regulated within a sample. This score characterizes cell state in terms of the activity levels of biological processes and pathways rather than through the expression levels of individual genes. The ssGSEA performed on the entire sample revealed an up-down regulation of those pathways enriched in *CDC25A* high tumor subgroup. As shown in Figure 5d, samples nicely separate in two clusters (tumor and normal tissue) accompanied by a concordance with *CDC25A* expression levels. The samples with highest *CDC25A* levels showed higher scores in cell cycle and DNA repair related processes.

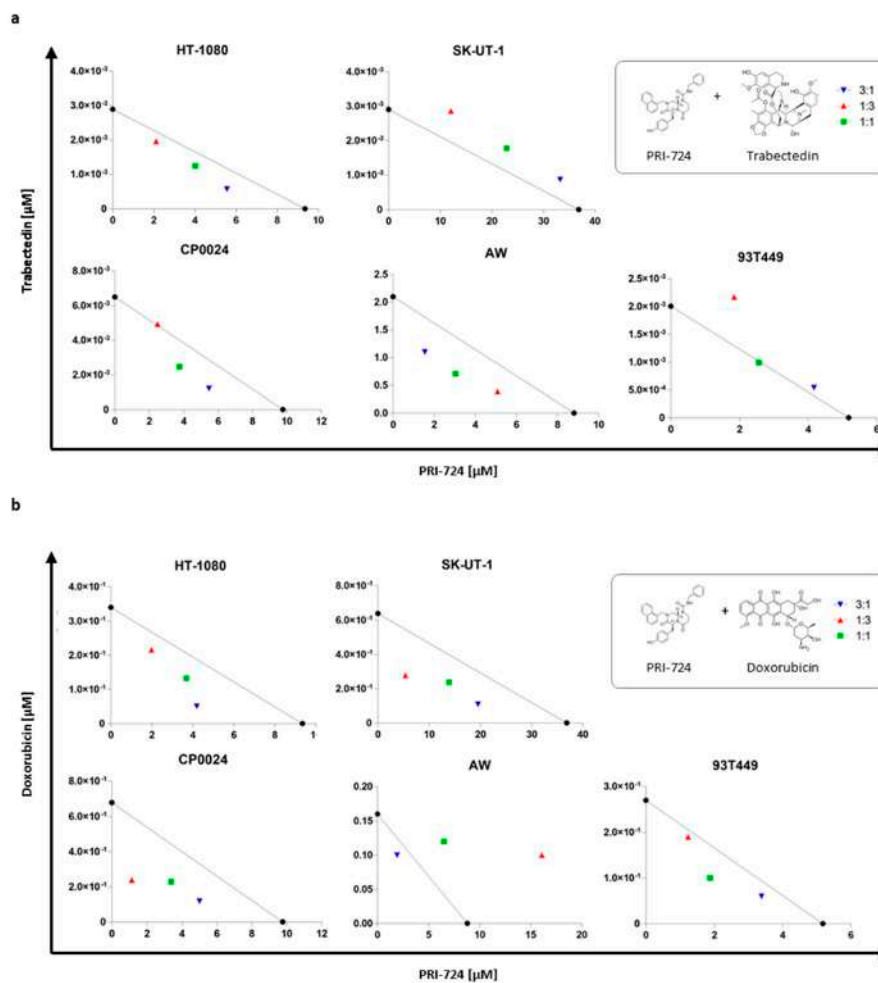


**Figure 5.** Overexpression of *CDC25A* mRNA levels in STS is related to cell cycle and DNA repair pathways enrichment. Raw data was collected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)/GenBank GEO web site (GSE21122) and normalized in R using Bioconductor and associated packages. (a) For each box plot, median and ranges are indicated. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . LMS: Leiomyosarcoma, LPS: Liposarcoma, MF: Myxofibrosarcoma and NF: normal fat. (b) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) table summarizing the enrichment in gene signatures (hallmarks) in *CDC25A* high versus low STS patient samples. Samples were separated in two groups: *CDC25A* high

and *CDC25A* low (based on Q1/Q4 distribution) and GSEA was used to analyze gene signatures and pathways enrichment. Enrichment Score (ES) reflects the degree to which a gene set is overrepresented at the top or bottom of a ranked list of genes. The normalized enrichment score (NES) is the primary statistic for examining gene set enrichment results and can be used to compare analysis results across gene sets. Gene sets were selected by their statistical significance filtered by FDR  $q$ -value  $< 0.25$  and Nom  $p$ -value  $< 0.05$ . (c) Snapshots of G2M Checkpoint gene set significantly enriched in *CDC25A* high STS patient samples. (d) Heatmap of top 40 enriched Canonical pathways gene sets derived from the KEGG and Reactome pathways databases from MSigDB in STS samples determined by single-sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA). Each ssGSEA enrichment score represents the degree to which the genes in a particular gene set are coordinately up- or down-regulated within a sample.

## 2.6. Inhibition of CBP/ $\beta$ -Catenin Interaction Enhances Antitumoral Effect of Standard Chemotherapeutic Agents in STS Cells

Combination of the CBP/ $\beta$ -catenin inhibitor PRI-724 with trabectedin or doxorubicin at different fixed dose ratio combinations, led to an enhanced reduction of STS cell viability, achieving synergistic effects ( $CI < 1$ ) in most of cell lines tested after 48 h of treatment as seen in Table S2 and Figure 6. One of the combinations that exerted an antagonist effect was with PRI-724 and trabectedin in APC-mutated SK-UT-1 cell line.



**Figure 6.** PRI-724 enhances antitumoral effect of trabectedin and doxorubicin in STS cells. STS cells were treated with fixed dose ratio combinations of PRI-724 and trabectedin (a) or doxorubicin (b) for 48 h. Isobolograms were constructed by plotting the  $IC_{50}$  of trabectedin (a) or doxorubicin (b) on the y-axis and

the IC<sub>50</sub> of PRI-724 on the x-axis, being the line that connects these two points the additivity line. Combination index (CI) was calculated using data from three independent experiments performed in triplicate.

### 3. Discussion

In a previous work, we demonstrated that the Wnt signaling pathway is constitutively activated in a broad range of STS cell lines and primary cultures independently of the sarcoma subtype [14]. In this study, we explore the antitumoral effects of Wnt pathway inhibition on STS cell lines and patient-derived primary cultures using the small molecule PRI-724, which blocks CBP/ $\beta$ -catenin interaction and is currently in clinical trials for different cancer types but not for STS.

PRI-724 was able to strongly reduce cell proliferation in vitro by inducing nonapoptotic cell death or by impairing cell cycle progression through the G1 checkpoint (Figure 1). This effect was less pronounced in cell lines with mutations in the *APC* gene (SK-UT-1 and SW684), and this is probably related to the elevated activation of the pathway as a consequence of this mutation, which is not completely reverted by PRI-724. Our results are in agreement with Ma and colleagues, who found that ICG-001, a first generation of CBP/ $\beta$ -catenin inhibitor, is able to reduce viability in colorectal carcinoma cells SW480 [33]. Moreover, as pointed by Emami and colleagues, who found the same effects of ICG-001 on cell viability using SW480 and HCT116 cells [34], most probably PRI-724 would be cytostatic at lower concentrations and cytotoxic, increasing caspase activity, at higher concentrations. Accordingly, in our study, caspase activity decreased upon treatment with PRI-724 (10  $\mu$ M), which would be consistent with an inability to induce apoptotic processes due to cell cycle arrest.

At the molecular level, PRI-724 treatment caused attenuation of TCF/ $\beta$ -catenin mediated transcriptional activity in STS cells, and it was not accompanied by a change of the subcellular localization of  $\beta$ -catenin (Figure 2), whereas disruption of TCF/ $\beta$ -catenin interaction by PKF118-310 provokes destabilization of  $\beta$ -catenin and reduction of its nuclear localization as our previous study indicated [14,31]. However, it has to be taken into account that both compounds interact with the Wnt pathway through different molecular mechanisms. Once in the nucleus,  $\beta$ -catenin must recruit one of the two transcriptional coactivators CBP (cAMP-response-element-binding protein (CREB)-binding protein) or p300 (E1A-binding protein) to induce transcription of Wnt target genes. For several years, the functions of these two coactivators have been described as redundant due to their high degree of homology. Despite this, emerging studies [35–38] indicate that CBP and p300 are not interchangeable, and it has been reported that each of these two coactivators is responsible for a distinct transcriptional program guiding the cell to either proliferate or retain potency in the case of CBP or to initiate differentiation in case of p300 [33,37,39,40]. In this context, PKF118-310 blocks the binding of  $\beta$ -catenin to the TCF/LEF complex, thereby decreasing the amount of bound  $\beta$ -catenin in the nucleus, whereas PRI-724 selectively blocks the CBP/ $\beta$ -catenin interaction without interfering with the interaction of  $\beta$ -catenin with p300 [34]. This fact would explain that, although the inhibitory effect of PRI-724 on total TCF/ $\beta$ -catenin-mediated transcriptional activity was mild and not statistically significant in HT-1080 and 93T449 cells (Figure 2a), PRI-724 strongly reduced their proliferation (Figure 1; Table S1) most probably by inhibiting the expression of TCF/CBP/ $\beta$ -catenin dependent target genes which are related to cell proliferation, as is *CDC25A* (Figure 3). As PRI-724 leaves the TCF/LEF binding site unaltered,  $\beta$ -catenin can still bind to TCF/LEF and recruit transcriptional cofactors other than CBP, thereby avoiding a decrease of nuclear  $\beta$ -catenin localization. Such a differential regulation of TCF/LEF activity has also been observed in the case of the formerly mentioned CBP/ $\beta$ -catenin antagonist ICG-001. This compound induces apoptosis through downregulation of the protein survivin, whose expression is as well only increased by the transcriptional coactivator CBP but not p300 [33]. Altogether, our results point to a cellular model with a nonredundant function of CBP and p300, which seem to be able to trigger a different set of transcriptional routes.

As a result of the attenuation of CBP/ $\beta$ -catenin mediated transcriptional activity, PRI-724 significantly reduced the expression of TCF/ $\beta$ -catenin dependent target genes related with cell proliferation such as



*CCND1*, a cell cycle regulator well-known by its role in tumorigenesis [41,42], and *CDC25A*. The reduction of *CDC25A* expression at mRNA and protein level is of special clinical relevance, since *CDC25A* has been described as a major cell proliferation mediator in STS, both in vitro and in vivo [13]. We observed that, in general terms, *CDC25A* was more strongly downregulated by PRI-724 than *CCND1* (Figure 3a). However, in SK-UT-1 cells, which were rather resistant to the antiproliferative effect of PRI-724, downregulation of *CDC25A* levels were also rather weak. In contrast, in 93T449 cells a drastic downregulation of *CDC25A* was paralleled by an only weak downregulation of *CCND1*, and these cells were highly sensitive to PRI-724. Accordingly, depletion of *CDC25A* by a specific siRNA significantly decreased STS proliferation through cell death induction or G1 arrest (Figure 4). Additionally, in this work *CDC25A* protein was found in both nuclear and cytoplasmic compartments in all analyzed STS cells and, interestingly, those STS cell lines in which CBP/ $\beta$ -catenin inhibition by PRI-724 most effectively inhibited cell proliferation were the ones with higher levels of *CDC25A* in cytoplasm (Figure 3b). In fact, the extent of *CDC25A* protein reduction in cytoplasm after treatment with PRI-724 determined the extent of sensitivity to this Wnt inhibitor (e.g., 93T449 cells) (Figure 3b). These results are in line with previously published data indicating that cytoplasmic localization of *CDC25A* is related to anti-apoptotic and pro-survival effects on ovarian and skin tumor cells [43,44], and therefore leads to a dependency of tumor progression on *CDC25A*. Taken together, the fact that inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction by PRI-724 suppressed cell proliferation to a similar extent to that provoked by *CDC25A* downregulation further strengthens the role of *CDC25A* as a major regulator of STS cell proliferation and its importance as pivotal molecular target of this compound.

High *CDC25A* mRNA levels have been reported previously by us and others in a wide range of representative Wnt-activated STS cell lines [13,14]. In parallel, Bertucci and colleagues reported a positive correlation between Wnt activation and expression of *CDC25A* mRNA in a large series of sarcoma patient samples [45]. The results of available public data analysis, comparing STS patient samples with normal tissues and evaluating gene signatures and pathways enriched in *CDC25A* high STS patient samples confirmed these results (Figure 5) and highlight that this gene target is actually of clinical relevance in STS independently of STS subtype.

Although the Wnt signaling pathway was discovered over 30 years ago, it was not before the last decade that drug development focused on this pathway as a new therapeutic approach in oncology. However, clinical Wnt modulator candidates must take into account the different roles of the pathway, which maintain the fine balance between cell proliferation versus differentiation. Therefore, only few specific therapeutic agents targeting this pathway have entered clinical trials until today. On the other hand, a growing body of evidence indicates that a combination therapy with such compounds may be more effective than monotherapy in most malignancies [26,28–30]. For this reason, several clinical trials are currently testing PRI-724 in combination with conventional chemotherapeutics. Our work demonstrates that combination of PRI-724 with trabectedin or doxorubicin, both standard chemotherapeutic agents in advanced STS, may also have a beneficial clinical effect. In fact, the combination of PRI-724 with either of these drugs increased their antitumor activity in a synergistic manner in most of the STS cells studied. Interestingly, it has been reported that CBP/ $\beta$ -catenin inhibitors are able to improve the chemotherapy-associated toxicity in preclinical models [46].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Lines, Primary Cell Culture and Reagents

93T449 cell line was established at Hospital de l'Archet, Nice, Francia (2012) [47,48], and kindly provided by Dr. Florence Pedeutour (UMR 6549, CNRS UNSA, Université de Nice-Sophia Antipolis, France). Pharma Mar S.A. (2011) kindly donated cell lines SW684 and SW872 (available from the American Type Culture Collection, ATCC). HT-1080, SK-UT-1 and SW982 cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA) (2011). AW cell line was established at CNIO (2011) [49], and kindly provided by Dr. Amancio Carnero. 93T449 cell line was maintained in RPMI 1640 medium (PAA, Piscataway,

NJ, USA) supplemented with 1% L-glutamine (Invitrogen S.A, Barcelona, Spain), 10% FBS (PAA), 100 units/mL penicillin/streptomycin (PAA), 1% Ultrosor (Pall Life Sciences, Port Washington, NY, USA) and 0.5% Fungizone (Invitrogen). SW872, SW684 and SW982 were maintained in Leibovitz's medium with L-glutamine supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin and 1 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). HT-1080 was maintained in MEM liquid with Earle's Salts medium with L-glutamine (PAA) supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin and 1 mM HEPES. AW was maintained in F-10 Ham medium (Gibco) supplemented with 1% Ultrosor, 10% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin and 1mM HEPES. SK-UT-1 was maintained in DMEM High glucose with L-glutamine (PAA) supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin, 1 mM HEPES and 1% of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) and MEM non-essential amino acid solution (Sigma-Aldrich). Two primary cell cultures (CP0024 (2012) and ICP020 (2015)) were derived from a resected leiomyosarcoma and liposarcoma. The biopsies were minced in culture medium and then disaggregated by 30 min incubation with collagenase (Gibco, 221 U/mg). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 100 units/mL penicillin/streptomycin. Informed consent was obtained from all patients in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of Clinical Investigation (CEI-IB, Palma, Spain) and the Declaration of Helsinki. Cells were grown in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

Wnt inhibitor, PRI-724, was purchased from Selleck Chemicals LLC (Houston, TX, USA). Doxorubicin was kindly provided by the Pharmacology Department of Son Espases University Hospital. Trabectedin was provided by Pharmamar (Madrid, Spain).

#### 4.2. Cell Viability Assay (MTT)

The methylthiazolotetrazolium (MTT) method was used to measure cell viability using the CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 5000 cells were seeded in 96-well plates for 24 h and exposed to increasing concentrations of the Wnt inhibitor for 24, 48 and 72 h followed by addition of CellTiter reagent. Absorbance at 490 nm was detected using a multi-well scanning spectrophotometer (Synergy H1 microplate reader, Bio-tek, Winooski, VT, USA). The mean percentage of cell viability relative to vehicle-treated cells was estimated, the compound concentration resulting in 50% inhibition of cell viability (IC<sub>50</sub>) was determined using GraphPad software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 4.3. Real-Time Cell Analysis (RTCA)

Cells were seeded in 96-well E-plates with integral sensor electrode arrays (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). After 24 h, the cells were treated with different concentrations of the Wnt inhibitor and cell proliferation was monitored noninvasively, in real time and label-free using the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (ACEA Biosciences) for up to 96 h. The 96-well E-plates used with the xCELLigence system have gold electrodes on their bottom surface, serving as sensors of alternating current modified by the number of adherent cells and cell status (including cell viability, morphology, and adhesion). A dimensionless parameter termed cell index (CI) was derived as a relative change in measured electrical impedance to represent cell status. CI normalized to the time of medium switch/treatment was presented in xCELLigence recordings.

#### 4.4. Colony-Forming Assay

Cellular ability to grow and form colonies was evaluated by clonogenic assay. Briefly, 500 cells were seeded in 6-well plates and treated with PRI-724 (2.5 μM) for 9 days (medium was changed every 96 h). Once colonies reached saturation cells were fixed with cold methanol, washed with PBS and stained with crystal violet 1% (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 20 min. Cellular colony-forming ability was quantified using the ImageJ software.

#### 4.5. Cell Cycle Analysis

Flow cytometry was performed to analyze the effect of Wnt inhibitor on cell cycle. Briefly, 30,000 cells were seeded in 24-well plates. After 24, 48 and 72 h of treatment, cells were washed in PBS and fixed in 90% ethanol, collected by centrifugation and stained in 500  $\mu$ L of a mixture of propidium iodide (50  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and ribonuclease A (50  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluted in PBS for 1 h. Cell populations at different stages of the cell cycle were estimated based on their DNA content in flow cytometer using the BD system Verse BD FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and software FACSuit (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). Cellular apoptosis was studied with Annexin V/PI (Molecular Probes™ Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI), ThermoFisher V13241, Waltham, MA, USA) for flow cytometry, measurement of caspases 3 and 7 activities by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 Assay, (Promega G8091, Madison, WI, USA), and finally with the assessment of the cleavage of PARP by immunoblot analysis (#9542S, Cell Signaling Technology).

#### 4.6. Western Blotting and Antibodies

Cells were seeded in 6-well plates, and after 48 h of treatment with vehicle or Wnt inhibitor, nuclear and cytoplasmic fractions were obtained using Nuclear Extract kit (Active Motif) and following the manufacturer's instructions. The antibodies used were the following:  $\beta$ -catenin (#8480, Cell Signaling Technology, 1:1000 dilution), PARP (#9542S, Cell Signaling Technology, 1:1000 dilution) and  $\alpha$ -tubulin (#T9026, Sigma-Aldrich, 1:1000 dilution). The secondary antibodies were: Donkey anti-Rabbit (E 365D5) and Donkey anti-Mouse (E 510KC) (LI-COR, 1:10,000 dilution). Western blotting was performed, subjecting 10  $\mu$ g of each lysed fraction to SDS-PAGE, transferring onto a PVDF membrane (Immobilon-FL, Merck Millipore, Cork, Ireland) and incubating with the indicated antibodies. Immunoreactivity intensity of the bands was analyzed with the Odyssey imaging system from LI-COR and quantified by Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

#### 4.7. Immunofluorescence

Cells were grown in a Lab-Tek II Chamber Slide (Lab-Tek) chamber, and 48 h after treatment with vehicle or Wnt inhibitor cells were washed with PBS plus 0.2% BSA and fixed with methanol: acetone (1:1), blocked with a 5% BSA solution, incubated with the primary antibody  $\beta$ -Catenin (D10A8) (#8480, Cell Signaling Technology, 1:250 dilution), and CDC25A (M-191) (sc-7157, Santa Cruz, 1:250 dilution) and with the secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat a-R A11008, Invitrogen, 1:150 dilution). DAPI (Fisher Scientific) was used to visualize the nuclei. Five images per condition of each individual experiment were taken using the confocal microscope, ZEISS LSM 710, with a 40X objective and power of  $512 \times 512$  pixels. The ImageJ software was used to quantify  $\beta$ -catenin and CDC25A staining intensity. Briefly, using the DAPI channel, the nuclei of the cells in each field of view were selected manually and the software automatically measured the integrated density of selected areas.

#### 4.8. mRNA Expression Analysis

Total RNA was isolated using Trizol Plus RNA Purification Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. 300 ng of RNA were reverse-transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Subsequent real-time PCR reactions were performed using the TaqMan probes method (CFX96 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler, BIO-RAD). Relative gene expression was normalized to  $\beta$ -2-microglobulin using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [50]. The TaqMan probes used were the following:  $\beta$ -2-microglobulin (Hs99999907), CDC25A (Hs00947994) and CCND1 (Hs00765553) (Applied Biosystems).

#### 4.9. TCF Reporter Assay, Small Interfering RNA (siRNAs), Plasmids and Transfections

Transient transfection was performed using the Lipofectamine Plus (Invitrogen) method. TCF reporter system plasmids (pTOPFLASH and pFOPFLASH) and the empty vector pcDNA3.1 were kindly donated by Dr. Gabriel Capellà, expression plasmid pCMV-CDC25A (HG11291-M-N) was purchased from Abyntek Biopharma, S.L (Bizkaia, Spain). Luciferase reporter assay was performed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was quantified by multi-well scanning spectrophotometer (Synergy H1 microplate reader, Bio-tek) 24 h after transfection and treatment with Wnt inhibitor. Firefly luciferase activity was normalized to the corresponding Renilla luciferase activity.

*CDC25A* gene was silenced by reverse transfection with the ON-TARGETplus Human *CDC25A* (993) siRNA-SMARTpool (Thermo Scientific Dharmacon, Waltham, MA, USA), which contains four different *CDC25A* siRNAs. Lipofectamine<sup>®</sup>RNAiMAX Reagent (Invitrogen) was used as transfection reagent following the manufacturer's instructions. The Non-target (D-001810-10-05) pool (Thermo Scientific Dharmacon) was used as control. Briefly, transfection complexes were prepared by adding 5  $\mu$ L (6-well plate) or 0.18  $\mu$ L (96-well plate) of Lipofectamine<sup>®</sup>RNAiMAX Reagent, 10 nM of *CDC25A* siRNA-SMARTpool in 750  $\mu$ L (6-well plate) or 30  $\mu$ L (96-well plate) of Opti-MEMTM (ThermoFisher Scientific). During the 30 min of incubation, cells were trypsinized and suspended in complete growth medium without antibiotics to a concentration of 50,000 cell/mL (6-well plate) or 13,500 cell/mL (96-well plate).

Cells seeded with added transfection complex were incubated for 24 h or 72 h at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.10. Data Collection and Analysis

Raw data from Barretina et al. 2010 public data set (GSE21122) was collected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)/GenBank GEO web site. After quality control, raw data was normalized by RMA [51] in R using Bioconductor and related packages.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed based on *CDC25A* first and last quartile of expression in STS tumor samples using the GSEA 4.0.3 software ([www.broadinstitute.org/gsea](http://www.broadinstitute.org/gsea)). Gene sets were obtained from H (Hallmark gene sets) and C2 (Curated gene sets) collections from MSigDB (Molecular Signature Database) [52,53]. Significant enriched signatures were identified using FDR  $q$ -value < 0.25 and nominal  $p$ -value < 0.05.

Single-sample GSEA (ssGSEA) was performed using the GenePattern web-tool (v3.9.11\_b270) with Canonical pathways gene sets derive from KEGG and Reactome databases from MSigDB (<https://cloud.genepattern.org/GenePattern>) [52,54].

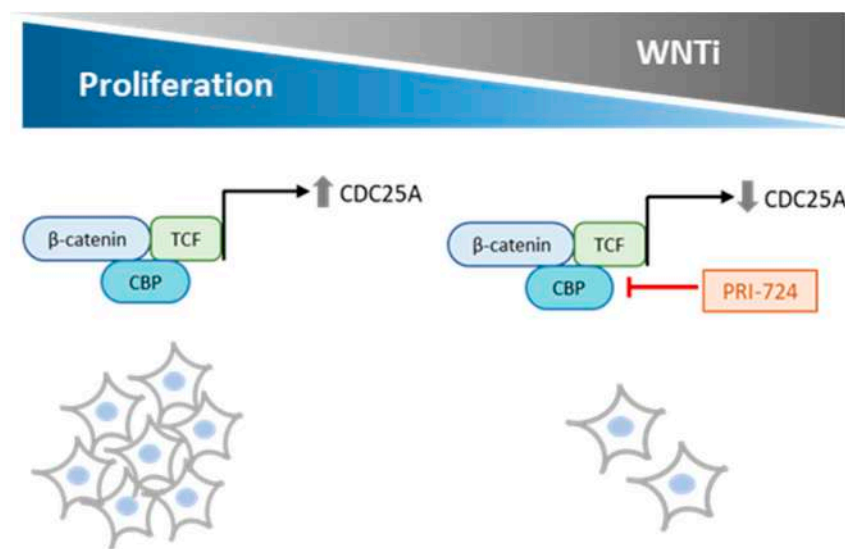
#### 4.11. Statistical Analysis

The antiproliferative effect of the combination of Wnt inhibitor with doxorubicin and trabectedin was assessed by Loewe's isobolographic analysis (1927, 1928, 1953), which considered three types of interactions: additivity (CI = 1), synergy (CI < 1) and antagonism (CI > 1). Each combination was evaluated by cell viability assay to determine the 50% inhibition of cell viability (IC<sub>50</sub>) value. By plotting the IC<sub>50</sub> value of doxorubicin or trabectedin on the Y-axis and the IC<sub>50</sub> value of PRI-724 on the X-axis combination isobolograms were obtained. The line connecting these two points it is known as line of additivity.

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from n independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical evaluations were assessed by GraphPadPrism, GraphPad Software, Inc. To detect the difference of quantitative values between the different groups, an ANOVA (parametric), along with a Bonferroni test for multiple comparisons, or Kruskal–Wallis (non-parametric) were used. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  and are indicated by: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

In summary, our study provides evidence that the Wnt inhibitor PRI-724 reduces STS cell proliferation *in vitro* by inducing cell death or G1 arrest, at least in part, through *CDC25A* downregulation. Moreover, these results are highly translational because they demonstrate that inhibition of *CDC25A*, which is highly expressed in a broad series of patient samples, could represent a potential new therapeutic drug target (Figure 7). Moreover, concomitant treatment with the Wnt inhibitor PRI-724 and trabectedin or doxorubicin is able to enhance the chemotherapeutic effect of standard STS drugs. This new strategy could benefit sarcoma patients with molecular alterations in the Wnt signaling pathway, especially if *CDC25A* deregulation is observed.



**Figure 7.** Proposed model for PRI-724 reduction of STS cell proliferation. PRI-724 binds to CBP, leading to inactivation of TCF/CBP/ $\beta$ -catenin-dependent target gene transcription, such as *CDC25A*, a major player in STS cell proliferation.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/9/2556/s1>, Figure S1: Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction promotes cell death in STS cells, Figure S2: Determination of cellular apoptosis upon treatment with PRI-724, Figure S3: Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction does not reduce  $\beta$ -catenin subcellular localization, Figure S4: Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction does not alter  $\beta$ -catenin nuclear levels in STS cells, Figure S5: Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin interaction decreases the expression of TCF/ $\beta$ -catenin dependent target genes, Figure S6: *CDC25A* mRNA expression levels in STS cells after transfection of *CDC25A* siRNA for 48, 72 and 96 h, Figure S7: *CDC25A* mRNA expression levels in STS cells, Table S1: STS cell lines characteristics and IC<sub>50</sub> values for PRI-724 after 48 h, Table S2: Combination Index (CI) values for combinations of the CBP/ $\beta$ -catenin inhibitor with standard chemotherapeutic agents: trabectedin and doxorubicin in STS cells, Table S3: Significant top 100 pathways enriched in *CDC25A* high STS samples.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.O.-H., R.A. and E.M.-F.; methodology, E.M.-F.; M.P.-C., R.R. and I.F.; validation, E.M.-F. and M.P.-C.; formal analysis, A.O.-H., R.A., E.M.-F. and I.F.; investigation, E.M.-F.; M.P.-C., R.R., I.F., A.O.-H. and R.A.; resources, C.G., P.L., J.T., J.M.-B. and A.O.-H.; data curation, E.M.-F. and M.P.-C.; writing—original draft preparation, A.O.-H., R.A., M.P.-C. and E.M.-F.; writing—review and editing, O.V.; supervision, A.O.-H. and R.A.; project administration, A.O.-H. and R.A.; funding acquisition, A.O.-H., J.T. and J.M.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was financed by Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS) and Fundación Mari Paz Jiménez Casado. MPC is supported by Programa Estrategia de Emprendimiento y Empleo Joven, Garantía Juvenil (Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social-SOIB).

**Acknowledgments:** We thank IdISBa technicians for their technical support and patients who participated in the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lahat, G.; Lazar, A.; Lev, D. Sarcoma epidemiology and etiology: Potential environmental and genetic factors. *Surg. Clin. N. Am.* **2008**, *88*, 451–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Burningham, Z.; Hashibe, M.; Spector, L.G.; Schiffman, J.D. The Epidemiology of Sarcoma. *Clin. Sarcoma Res.* **2012**, *2*, 14. [[CrossRef](#)]
3. Linch, M.; Miah, A.B.; Thway, K.; Judson, I.; Benson, C. Systemic treatment of soft-tissue sarcoma—gold standard and novel therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 187–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Anastas, J.N.; Moon, R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 11–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Polakis, P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008052. [[CrossRef](#)]
6. Zhan, T.; Rindtorff, N.T.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2016**, *36*, 1461–1473. [[CrossRef](#)]
7. Baarsma, H.A.; Königshoff, M.; Gosens, R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 66–83. [[CrossRef](#)]
8. Pridgeon, M.G.; Grohar, P.J.; Steensma, M.R.; Williams, B.O. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2017**, *15*, 239–246. [[CrossRef](#)]
9. Taylor, B.S.; Barretina, J.; Maki, R.G.; Antonescu, C.R.; Singer, S.; Ladanyi, M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 541–557. [[CrossRef](#)]
10. Cironi, L.; Petricevic, T.; Vieira, V.F.; Provero, P.; Fusco, C.; Cornaz, S.; Fregni, G.; Letovanec, I.; Aguet, M.; Stamenkovic, I. The fusion protein SS18-SSX1 employs core Wnt pathway transcription factors to induce a partial Wnt signature in synovial sarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22113. [[CrossRef](#)]
11. Trautmann, M.; Sievers, E.; Aretz, S.; Kindler, D.; Michels, S.; Friedrichs, N.; Renner, M.; Kirfel, J.; Steiner, S.; Huss, S.; et al. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene* **2014**, *33*, 5006–5016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chen, C.; Zhao, M.; Tian, A.; Zhang, X.; Yao, Z.; Ma, X. Aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17570–17583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vijayakumar, S.; Liu, G.; Rus, I.A.; Yao, S.; Chen, Y.; Akiri, G.; Grumolato, L.; Aaronson, S.A. High-Frequency Canonical Wnt Activation in Multiple Sarcoma Subtypes Drives Proliferation through a TCF/ $\beta$ -Catenin Target Gene, CDC25A. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 601–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Martínez-Font, E.; Felipe-Abrio, I.; Calabuig-Fariñas, S.; Ramos, R.; Terrasa, J.; Vögler, O.; Alemany, R.; Martín-Broto, J.; Obrador-Hevia, A. Disruption of TCF/ $\beta$ -Catenin binding impairs Wnt signaling and induces apoptosis in soft tissue sarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1166–1176.
15. Martins-Neves, S.R.; Paiva-Oliveira, D.I.; Fontes-Ribeiro, C.; Bovee, R.J.; Cleton-Jansen, A.-M.; Gomes, C. IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Lett.* **2018**, *414*, 1–15. [[CrossRef](#)]
16. Krishnamurthy, N.; Kurzrock, R. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 50–60. [[CrossRef](#)]
17. An, T.; Gong, Y.; Li, X.; Kong, L.-M.; Ma, P.; Gong, L.; Zhu, H.; Yu, C.; Liu, J.; Zhou, H.; et al. USP7 inhibitor P5091 inhibits Wnt signaling and colorectal tumor growth. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *131*, 29–39. [[CrossRef](#)]
18. Yan, M.; Li, G.; An, J. Discovery of small molecule inhibitors of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by targeting  $\beta$ -catenin/Tcf4 interactions. *Exp. Boil. Med.* **2017**, *242*, 1185–1197. [[CrossRef](#)]
19. Takahashi-Yanaga, F.; Kahn, M. Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells? *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3153–3162. [[CrossRef](#)]
20. He, B.; You, L.; Uematsu, K.; Xu, Z.; Lee, A.Y.; Matsangou, M.; McCormick, F.; Jablons, D.M. A Monoclonal Antibody against Wnt-1 Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. *Neoplasia* **2004**, *6*, 7–14. [[CrossRef](#)]
21. Wei, W.; Chua, M.-S.; Grepper, S.; So, S. Small molecule antagonists of Tcf4/ $\beta$ -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 2426–2436.
22. Leow, P.-C.; Tian, Q.; Ong, Z.Y.; Yang, Z.; Ee, P.L.R. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ $\beta$ -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Investig. New Drugs* **2010**, *28*, 766–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, J.Y.; Park, G.; Krishnan, M.; Ha, E.; Chun, K.-S. Selective Wnt/ $\beta$ -catenin Small-molecule Inhibitor CWP232228 Impairs Tumor Growth of Colon Cancer. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, v243. [[CrossRef](#)]

24. Li, C.; Zheng, X.; Han, Y.; Lv, Y.; Lan, F.; Zhao, J. XAV939 inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma A549 cells through the WNT pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 8973–8982. [[CrossRef](#)]
25. Harb, J.; Lin, P.-J.; Hao, J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kleszcz, R.; Szymańska, A.; Krajka-Kuźniak, V.; Baer-Dubowska, W.; Paluszczak, J. Inhibition of CBP/ $\beta$ -catenin and porcupine attenuates Wnt signaling and induces apoptosis in head and neck carcinoma cells. *Cell. Oncol.* **2019**, *42*, 505–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. O’Cearbhaill, R.E.; McMeekin, D.S.; Mantia-Smaldone, G.; Gunderson, C.; Sabbatini, P.; Cattaruzza, F.; Fischer, M.; Kapoun, A.M.; Xu, L.; Dupont, J.; et al. Phase 1b of WNT inhibitor ipafricept (IPA, decoy receptor for WNT ligands) with carboplatin (C) and paclitaxel (P) in recurrent platinum-sensitive ovarian cancer (OC). *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2515. [[CrossRef](#)]
28. Fang, F.; VanCleave, A.; Helmuth, R.; Torres, H.; Rickel, K.; Wollenzien, H.; Sun, H.; Zeng, E.; Zhao, J.; Tao, J. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36780–36792. [[CrossRef](#)]
29. Ko, A.H.; Chiorean, E.G.; Kwak, E.L.; Lenz, H.-J.; Nadler, P.I.; Wood, D.L.; Fujimori, M.; Inada, T.; Kouji, H.; McWilliams, R.R. Final results of a phase 1b dose-escalation study of PRI-724, a CBP/ $\beta$ -catenin modulator, plus gemcitabine (GEM) in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma (APC) as second-line therapy after FOLFIRINOX or FOLFOX. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, e15721. [[CrossRef](#)]
30. Combination Chemotherapy and Bevacizumab with or without PRI-724 in Treating Patients with Newly Diagnosed Metastatic Colorectal Cancer. Available online: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02413853> (accessed on 7 February 2020).
31. Shi, Z.; Qian, X.; Li, L.; Zhang, J.; Zhu, S.; Zhu, J.; Chen, L.; Zhang, K.; Han, L.; Yu, S.; et al. Nuclear Translocation of  $\beta$ -catenin is Essential for Glioma Cell Survival. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2012**, *7*, 892–903. [[CrossRef](#)]
32. Barretina, J.; Taylor, B.S.; Banerji, S.; Ramos, A.H.; Lagos-Quintana, M.; Decarolis, F.L.; Shah, K.; Socci, N.D.; Weir, B.A.; Ho, A.; et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 715–721. [[CrossRef](#)]
33. Ma, H.; Nguyen, C.; Lee, K.-S.; Kahn, M. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/ $\beta$ -catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene* **2005**, *24*, 3619–3631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Emami, K.H.; Nguyen, C.; Ma, H.; Kim, D.H.; Jeong, K.W.; Eguchi, M.; Moon, S.H. A small molecule inhibitor of  $\beta$ -catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12682–12687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kung, A.L.; Rebel, V.I.; Bronson, R.T.; Ch’Ng, L.-E.; Sieff, C.A.; Livingston, D.M.; Yao, T.-P. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genome Res.* **2000**, *14*, 272–277.
36. E Eid, J.; Kung, A.L.; Scully, R.; Livingston, D.M. p300 Interacts with the Nuclear Proto-Oncoprotein SYT as Part of the Active Control of Cell Adhesion. *Cell* **2000**, *102*, 839–848. [[CrossRef](#)]
37. Rebel, V.I.; Kung, A.L.; Tanner, E.A.; Yang, H.; Bronson, R.T.; Livingston, D.M. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14789–14794. [[CrossRef](#)]
38. Roth, J.-F.; Shikama, N.; Henzen, C.; Desbaillets, I.; Lutz, W.; Marino, S.; Wittwer, J.; Schorle, H.; Gassmann, M.; Eckner, R. Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *EMBO J.* **2003**, *22*, 5186–5196. [[CrossRef](#)]
39. Lenz, H.-J.; Kahn, M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 1087–1092. [[CrossRef](#)]
40. Kawasaki, H.; Eckner, R.; Yao, T.-P.; Taira, K.; Chiu, R.; Livingston, D.M.; Yokoyama, K.K. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* **1998**, *393*, 284–289. [[CrossRef](#)]
41. Sherr, C.J. Cancer cell cycles. *Science* **1996**, *274*, 1672–1677. [[CrossRef](#)]
42. Arber, N.; Doki, Y.; Han, E.K.; Sgambato, A.; Zhou, P.; Kim, N.H.; Delohery, T.; Klein, M.G.; Holt, P.R.; Weinstein, I.B. Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1569–1574. [[PubMed](#)]

43. Al-Matouq, J.; Holmes, T.; Hammiller, B.; Tran, N.; Holmes, M.; Freeman, S.C.; Hansen, L.A. Accumulation of cytoplasmic CDC25A in cutaneous squamous cell carcinoma leads to a dependency on CDC25A for cancer cell survival and tumor growth. *Cancer Lett.* **2017**, *410*, 41–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Broggini, M.; Buraggi, G.; Brenna, A.; Riva, L.; Codegoni, A.M.; Torri, V.; A Lissoni, A.; Mangioni, C.; D’Incalci, M. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anticancer. Res.* **2000**, *20*, 4835–4840. [[PubMed](#)]
45. Bertucci, F.; Finetti, P.; Birnbaum, D. Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas-Letter. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kahn, M. Symmetric division versus asymmetric division: A tale of two coactivators. *Futur. Med. Chem.* **2011**, *3*, 1745–1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pedoutour, F.; Forus, A.; Coindre, J.M.; Berner, J.M.; Nicolo, G.; Michiels, J.F.; Terrier, P.; Ranchere-Vince, D.; Collin, F.; Myklebost, O.; et al. Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes Chromosom. Cancer* **1999**, *24*, 30–41. [[CrossRef](#)]
48. Sirvent, N.; Forus, A.; Lescaut, W.; Burel, F.; Benzaken, S.; Chazal, M.; Bourgeon, A.; Vermeesch, J.R.; Myklebost, O.; Turc-Carel, C.; et al. Characterization of centromere alterations in liposarcomas. *Genes Chromosom. Cancer* **2000**, *29*, 117–129. [[CrossRef](#)]
49. Moneo, V.; Serelde, B.G.; Fominaya, J.; Leal, J.F.M.; Blanco-Aparicio, C.; Romero, L.; Sanchez-Beato, M.; Cigudosa, J.C.; Tercero, J.C.; Piris, M.A.; et al. Extreme sensitivity to Yondelis<sup>®</sup> (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma cell lines correlates with mutated p53. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *100*, 339–348. [[CrossRef](#)]
50. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)). *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
51. Irizarry, R.A.; Hobbs, B.; Collin, F.; Beazer-Barclay, Y.D.; Antonellis, K.J.; Scherf, U.; Speed, T. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **2003**, *4*, 249–264. [[CrossRef](#)]
52. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. Available online: <http://www.pnas.org/content/102/43/15545.abstract> (accessed on 7 February 2020). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mootha, V.K.; Lindgren, C.M.; Eriksson, K.-F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstråle, M.; Laurila, E.; et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet* **2003**, *34*, 267–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Barbie, D.A.; Tamayo, P.; Boehm, J.S.; Kim, S.Y.; Moody, S.E.; Dunn, I.F.; Schinzel, A.C.; Sandy, P.; Meylan, E.; Scholl, C.; et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **2009**, *462*, 108–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





# **ANNEX 6**

## Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas—Letter

François Bertucci, Pascal Finetti, and Daniel Birnbaum



In a recent issue of *Molecular Cancer Therapeutics* (1), Martinez-Font and colleagues reported that the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway represents a potential therapeutic target in soft tissue sarcomas (STS). Analysis of cell lines representing different pathologic subtypes showed frequent pathway activation and *in vitro* antitumor activity of PKF118-310, a disruptor of TCF/ $\beta$ -catenin binding. STSs are rare and heterogeneous cancers of mesenchymal origin (2), with poor prognosis: approximately 50% of nonmetastatic operated patients die from metastatic relapse, and in this metastatic setting, the median survival is inferior to 18 months. The development of new systemic therapies is crucial, and the Martinez-Font's study represents a promising new avenue of research. However, the frequency and clinical relevance of WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation in STS clinical samples are not documented (3).

We examined the activation probability of the  $\beta$ -catenin pathway based on a transcriptional signature (4) in 1,439 clinical soft tissue samples gathered from 15 public datasets (Supplementary Table S1), including 1,379 primaries and 32 relapses of STS, and 28 normal tissues. Expression profiles, generated using DNA microarrays and RNA-seq, were normalized before analysis (5).

Department of Molecular Oncology, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli-Calmettes, INSERM UMR1068, CNRS UMR7258, Marseille, France.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** François Bertucci, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd. Sainte-Marguerite, Marseille 13009, France. Phone: 334-9122-3789; Fax: 3304-9122-3670; E-mail: bertuccif@ipc.unicancer.fr

**doi:** 10.1158/1535-7163.MCT-17-0491

©2017 American Association for Cancer Research.

### References

- Martinez-Font E, Felipe-Abrio I, Calabuig-Farinas S, Ramos RF, Terrasa J, Vogler O, et al. Disruption of TCF/ $\beta$ -catenin binding impairs Wnt signalling and induces apoptosis in soft tissue sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 2017;16:1166–76.
- Wunder JS, Nielsen TO, Maki RG, O'Sullivan B, Alman BA. Opportunities for improving the therapeutic ratio for patients with sarcoma. *Lancet Oncol* 2007;8:513–24.
- Hasegawa T, Yokoyama R, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Prognostic significance of histologic grade and nuclear expression

of  $\beta$ -catenin activation probability, assessed as a continuous variable, was higher in primary tumors than in normal samples ( $P = 1.68E-15$ ; Supplementary Fig. S1A), and heterogeneous but similar in primary tumors and relapses ( $P = 0.12$ ). In the 1,379 nonmetastatic, operated patients, the activation probability was associated with patients' gender (higher in women;  $P = 2.39E-02$ ), tumor site (higher in extremities;  $P = 4.24E-05$ ), pathologic subtypes (higher in leiomyosarcomas,  $P = 2.33E-17$ ), tumor grade (higher in grade 2–3;  $P = 1.84E-16$ ), genetic profile (higher in complex profile;  $P = 3.77E-27$ ), and CINSARC class (higher in high-risk;  $P = 3.28E-77$ ). Positive correlation existed with *CDC25A* mRNA expression, a known WNT target gene, as reported in cell lines (1).

Metastasis-free survival (MFS) was available for 610 nonmetastatic, operated patients. With a median 36-month follow-up, the 5-year MFS was 64% [95% confidence interval (CI), 59–69]. In univariate analysis, high  $\beta$ -catenin activation probability (HR = 6.6; 3.88–11.20;  $P = 3.19E-12$ ), leiomyosarcoma subtype ( $P = 3.37E-05$ ), grade 2–3 ( $P = 1.32E-02$ ), complex genetic profile ( $P = 8.33E-03$ ), and CINSARC high-risk ( $P = 1.66E-11$ ) were associated with shorter MFS. High and low activation probabilities were associated with respective 5-year MFS of 53% (95% CI, 47–60) and 75% (95% CI, 69–82;  $P = 2.53E-09$ ; Supplementary Fig. S1B). In multivariate analysis, pathologic subtype ( $P = 2.46E-02$ ), genetic profile ( $P = 4.93E-02$ ), and  $\beta$ -catenin activation probability ( $P = 4.16E-02$ ) remained associated with MFS, suggesting independent prognostic value.

This analysis of  $\beta$ -catenin activation in STS in a large series of clinical samples nicely complements the Martinez-Font's study and reinforces the potential therapeutic value of this new target in STS.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

- of  $\beta$ -catenin in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 2001;32:257–63.
- Gatza ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6994–9.
- Bertucci F, Finetti P, Colpaert C, Mamessier E, Parizel M, Dirix L, et al. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget* 2015;6:13506–19.

# Molecular Cancer Therapeutics

## Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas—Letter

François Bertucci, Pascal Finetti and Daniel Birnbaum

*Mol Cancer Ther* 2017;16:2324.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2324>

**Cited articles** This article cites 5 articles, 2 of which you can access for free at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2324.full#ref-list-1>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, use this link <http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2324>. Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

## Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas—Response

Esther Martínez-Font<sup>1</sup>, Oliver Vögler<sup>1,2</sup>, Regina Alemany<sup>1,2</sup>, and Antònia Obrador-Hevia<sup>1,3</sup>



First, we would like to thank Drs. Bertucci, Finetti, and Birnbaum for their scientific input.

The data they provide is certainly very interesting and perfectly complements our work (1). We understand that these results have not been published before, for which reason, they present novel correlations with clinical data in STS compared with other articles describing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling alterations only on the molecular level (2, 3, 4). From their results, we would like to highlight two important points.

First, they describe higher  $\beta$ -catenin activation in sarcomas when compared with normal tissue and, especially in leiomyo-

sarcomas, this activation correlates with high-risk cases and lower metastasis-free survival. These findings are consistent with our results on cell lines and primary cultures, in which we compared  $\beta$ -catenin activation and expression of target genes with normal mesenchymal stem cells. Regarding the leiomyosarcoma subtype, we have analyzed several leiomyosarcoma cell lines and primary cultures and also observed high  $\beta$ -catenin activation. In fact, our work (1) demonstrates the importance of the Wnt signaling in liposarcomas and leiomyosarcomas, suggesting that leiomyosarcomas could be a sarcoma subtype that may benefit the most from this inhibitory therapeutic strategy.

Second, we and others (2) have suggested that CDC25A is one of the most relevant target genes in sarcomas. In fact, Bertucci and colleagues also mention a positive correlation of  $\beta$ -catenin activation and CDC25A mRNA expression in a large series of soft tissue samples from patients (1,379), reinforcing the role of CDC25A in sarcomagenesis and making it an attractive biomarker for future research.

<sup>1</sup>Group of Advanced Therapies and Biomarkers in Clinical Oncology, Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma, Spain. <sup>2</sup>Group of Clinical and Translational Research. Department of Biology, Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS), University of the Balearic Islands, Spain. <sup>3</sup>Department of Oncology, Hospital Universitari Son Espases, Palma, Spain.

**Corresponding Author:** Antònia Obrador-Hevia, Hospital Universitari Son Espases, Crta. Valldemossa 79, Palma, Illes Balears E- 07010, Spain. Phone: 348-7120-5050; Fax: 348-7120-6868; E-mail: antonia.obrador@ssib.es

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0567

©2017 American Association for Cancer Research.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### References

- Martínez-Font E, Felipe-Abrio I, Calabuig-Farinas S, Ramos R, Terrasa J, Vögler O, et al. Disruption of TCF/ $\beta$ -catenin binding impairs Wnt signaling and induces apoptosis in soft tissue sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 2017;16:1166–76.
- Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, et al. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/ $\beta$ -catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell* 2011;19:601–12.
- Kanojia D, Nagata Y, Garg M, Lee DH, Sato A, Yoshida K, et al. Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* 2015;6:42429–44.
- Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, et al. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene* 2014;33:5006–16.

# Molecular Cancer Therapeutics

## Wnt Signaling Inhibition Promotes Apoptosis in Sarcomas— Response

Esther Martinez-Font, Oliver Vögler, Regina Alemany, et al.

*Mol Cancer Ther* 2017;16:2325.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2325>

**Cited articles** This article cites 4 articles, 1 of which you can access for free at:  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2325.full#ref-list-1>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, use this link  
<http://mct.aacrjournals.org/content/16/10/2325>.  
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.