



El papel de la vía Notch en Rabdomiosarcoma

Anna Masià Fontana



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



Programa de Doctorado en Biomedicina
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

El papel de la vía Notch en Rabdomiosarcoma

Memoria presentada por Anna Masià Fontana para optar al grado de Doctor en Biomedicina
por la Universitat de Barcelona

Barcelona, 2013

Directora de Tesis

Director de Tesis

Tutora de Tesis

Doctoranda

Dra. Soledad
Gallego Melcón

Dr. Josep Roma
Castanyer

Dra. Anna Bigas
Salvans

Anna Masià
Fontana

A Sergio
A mi padre
A mi abuelo
y a toda mi familia

ESQUEMA DE CONTENIDOS

ESQUEMA DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
NOTAS PARA EL LECTOR	5
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE	9

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1 Aspecto microscópico de un RMS embrionario y alveolar	22
Figura I.2 Clasificación anatómo-patológica y molecular del RMS	24
Figura I.3 Modelo de miogénesis esquelética	26
Figura I.4 Organización de los dominios de los receptores Notch	28
Figura I.5 Organización de los dominios de los ligandos de Notch	29
Figura I.6 Activación de la transcripción mediada por NICD	30
Figura I.7 Componentes principales y factores reguladores de la vía Notch	32
Figura I.8 Organización de los dominios de las proteínas Hes y Hey	33
Figura I.9 Implicación de la vía Notch en la miogénesis esquelética	38
Figura I.10 Proceso de metástasis: adhesión, migración e invasión celular	42
Figura I.11 Mecanismos de regulación de la N-Caderina en cáncer	48
Figura I.12 Esquema general de la estructura de una integrina	55
Figura I.13 Cambios conformacionales de las integrinas relacionados con la regulación de la afinidad al ligando	57
Figura I.14 Mecanismo propuesto de la implicación de la $\alpha 9\beta 1$ en la migración celular	60
Figura I.15 Representación de la dinámica de las integrinas en la migración celular	61

RESULTADOS

Figura R.1 Ilustración de los genes diferencialmente expresados	70
Figura R.2 La vía Notch está ampliamente expresada en RMS	71

Figura R.3 La vía Notch está ampliamente activada en RMS	72
Figura R.4 La activación de la vía Notch se correlaciona con la capacidad invasiva de las líneas celulares de RMS	75
Figura R.5 La activación de la vía Notch se inhibe significativamente mediante GSIs en líneas celulares de RMS	76
Figura R.6 La inhibición de la activación de la vía Notch reduce significativamente la movilidad en líneas celulares de RMS	77
Figura R.7 La inhibición de la activación de la vía Notch reduce significativamente la invasividad en líneas celulares de RMS	78
Figura R.8 La inhibición de la activación de la vía Notch no afecta a la progresión del ciclo celular ni a la apoptosis celular	79
Figura R.9 Efectos del silenciamiento de la activación de la vía Notch usando dnMAML1 en la línea celular RH30	80
Figura R.10 La inhibición farmacológica de la vía Notch disminuye la adhesión celular en líneas celulares de RMS	82
Figura R.11 El tratamiento con GSIs no afecta a la viabilidad celular	83
Figura R.12 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de N-Caderina e Integrina- α 9	84
Figura R.13 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de N-Caderina	85
Figura R.14 La modificación genética de la vía Notch afecta la expresión de la N-Caderina	87
Figura R.15 Niveles de expresión de N-Caderina mediante IC	88
Figura R.16 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades adhesivas de las células de RMS	89
Figura R.17 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades móviles de las células de RMS	90
Figura R.18 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades invasivas de las células de RMS	92
Figura R.19 Unión del NICD y Hes1 con la región promotora de la N-Caderina	92
Figura R.20 La N-Caderina está ampliamente expresada en pacientes de RMS	93
Figura R.21 La expresión de la N-Caderina se correlaciona con la de Hes1 en tumores de RMS	94
Figura R.22 La inhibición farmacológica de Notch reduce significativamente la expresión de la Integrina- α 9	95

Figura R.23 La modificación genética de la vía Notch regula la expresión de la Integrina- α 9	96
Figura R.24 La modificación genética de la vía Notch reduce la expresión de la Integrina- α 9 causando una redistribución en su localización celular	98
Figura R.25 El bloqueo específico de la Integrina- α 9 reduce las propiedades invasivas de las células de RMS	100
Figura R.26 Unión de NICD y Hes1 con la región promotora de la Integrina- α 9	101
Figura R.27 La Integrina- α 9 está ampliamente expresada en pacientes de RMS	101
Figura R.28 La expresión de la Integrina- α 9 se correlaciona con la de Hes1 en tumores de RMS	102
Figura R.29 Generación de un modelo de xenógrafo ortotópico de tumor de RMS	103
Figura R.30 El tratamiento con GSI inhibe la activación de la vía Notch <i>in vivo</i>	104
Figura R.31 El tratamiento con GSI inhibe el crecimiento de tumores de RMS <i>in vivo</i>	105

DISCUSIÓN

Figura D.1 Modelo propuesto de la regulación de procesos de adhesividad, invasividad y movilidad celular mediada por Notch en células de RMS	121
---	------------

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla M.M.1 Líneas celulares de RMS utilizadas	131
Tabla M.M.2 Cantidades y volúmenes de transfección con FuGene	136
Tabla M.M.3 Cantidades y volúmenes de transfección con Lipofectamina™	136
Tabla M.M.4 Nombre del gen y nº de catálogo de Applied Biosystems de las sondas utilizadas en los experimentos de RT-PCR	141
Tabla M.M.5 Cantidades de las soluciones utilizadas en la preparación del gel separador y concentrador	145
Tabla M.M.6 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western-blot ...	146
Tabla M.M.7 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de IC	147
Tabla M.M.8 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de CHIP	149
Tabla M.M.9 Listado de sondas utilizadas en las PCRs de los experimentos de CHIP	149
Tabla M.M.10 Nombre del gen y nº de catálogo de Applied Biosystems de las sondas utilizadas en los experimentos de RT-PCR	155
Tabla M.M.11 Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de IHC	159

Tabla M.M.12 Interpretación de la IHC según intensidad y porcentaje de marcaje	159
Tabla M.M.13 Valor final de la tinción	159
Figura M.M.1 Esquema que muestra las diferentes fases de amplificación por PCR	140
Figura M.M.2 Visualización del crecimiento de los tumores mediante el sistema IVIS Spectrum	162

ANEXOS

Tabla A.1 Relación entre la expresión de los componentes de la vía Notch, N-Caderina e Integrina- α 9 y las características clínicas y evolutivas de un de un panel de 38 pacientes de RMS	191
Tabla A.2 Relación entre la activación de la vía Notch y los factores pronóstico del RMS en 19 pacientes	192
Tabla A.3 Categorización de los factores pronóstico según criterios favorables (F) o desfavorables (DF)	192

NOTAS AL LECTOR

En general, los *GENES* aparecen en mayúscula y en cursiva y las Proteínas/proteínas aparecen en minúscula. En este trabajo, y si no se especifica, *CDH2* hace referencia al *GEN*, mientras que N-Caderina hace referencia a la proteína. Del mismo modo, la *ITGA9* hace referencia al *GEN* y la Integrina- α 9 a la proteína.

ABREVIATURAS

A: Absence	CREB/CBP: cAMP response element binding / CREB-binding protein
ACTN2/3: Anti-actinin-alpha 2/3	cRNA: complementary RNA
ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase	CSL: CBF1/Su(H)/Lag-1
AKT/PKB: Activated Kinase murine Thymoma/ Protein Kinasa B	Ct: Cycle Threshold
AM: Adult Muscle	CTF: C-Terminal Fragment
ANK: Ankyrin domains	CTP: Cytidine Triphosphate
APC: Adenomatous Polyposis coli	CTRL: Control
Aph-1: Anterior Pharynx defective 1	DAB: Diaminobenzidine
aRMS: Alveolar Rhabdomyosarcoma	DF: Desfavorable
ASC1: Achaete-Scute homolog 1	DHH: Desert Hedgehog
ATCC: American Type Culture Collection	DMD: Duchenne Muscular Dystrophy
BAD: Bcl-2-Associated Death promoter	DMEM: Dubbeco's Modified Eagle's Medium
Bcl-2: B-Cell Lymphoma 2	DMSO: Dimethyl Sulfoxide
bHLH: basic Hélix-loop-Helix	DNA: Deoxyribonucleic acid
BM: Bone Marrow	dnMAML1: Dominant negative Mastermind-Like1
BSA: Bovine Serum Albumin	dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate
CAMs: Cell Adhesion Molecules	DOS: Delta and OSM-11-like proteins
CBF1: C-promoter Binding Factor-1	DPX: Diethyl-henylxanthine
CDH2: Cadherin 2	Dsh: Dishevelled
CDH7: Cadherin 7	DSL: Delta/Serrate ligands
CDK: Cyclin-Dependent Kinase	DTT: Dithiotreitol
cDNA: complementary DNA	Dx: Deltex
cGMP: cycling Guanosine Monophosphate	E(Spl): Enhancer of Split
ChIP: Chromatin IP	E: Éxitus
CIP: Calf Intensitive Phosphatase	EC: Extracelular Caderin domains
CklI: Casein Kinase II	ECM: Extracellular Matrix
CMC: Células Madre Cancerosa	EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
CoA: Co- Activators	EGF-like: Epidermal Growth Factor-like
CoR: Receptor co-repressor	
CR: Cysteine-Rich domain	

EILDV: Glutamic-Isoleucine-Leucine-Aspartic acid-Valine-Proline-Serine-Threonine

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

ERK: Extracellular signal Regulated Kinases

EST: Expressed Sequence Tag

EtBr: Ethidium Bromide

EtOH: Ethanol

F: Favorable

FAK: Focal Adhesion Kinase

FAs: Focal Adhesions

FBS: Fetal Bovine Serum

FC: Fold Change

FDR: False Discovery Rate

Fer: Fes-related protein

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FM: Fetal Muscle

Fng: Fringe

FOXO: Forkhead box class O

GAA: Acid alpha glucosidase

GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

GATA2: Globin Transcription factor 2

GC: Guanylyl Cyclase

GFFKR: Glycine-phenylalanine-phenylalanine-lysine-arginine

GFP: Green Fluorescent Protein

GO: Gene Ontology

GSIs: Gamma-Secretase Inhibitors

GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

GTP: Guanosine Triphosphate

HAVD: Histidine-Alanine-Valine-Aspartic acid

HD: Heterodimerization Domain

HDAC: Histone Deacetylases

Hes: Hairy Enhancer of Split

Hey/Hrt: Hairy Related Transcription factor

Hg: Hedgehog

Hhip: Hedgehog interacting protein

HRP: Horse Radish Peroxidase

HUGO: Human Genome Organization

IC: Immunocytochemistry

ID: Directional Index

Ig: Immunoglobulin

IHC: Immunohistochemistry

IHH: Indian Hedgehog

iNOS: inducible NOS

ITG α 9: Integrin alpha 9

ITG- α 9Ab: Integrin-alpha 9 antibody

JMD: Juxtamembrane Domain

JNKs: Jun N-terminal kinases

Kb: Kilobase pair

KDa: Kilodaltons

KLLxxxHDR: Lysine-Leucine-Leucine-x-x-x-Histidine-Aspartic acid-Arginine

Lag1: Lin-12 and glp-1

LB: Luria Broth

LNG: Lin-12, Notch, Glp-1

m: Molality (moles/kg)

M: Molar (mole/m³)

M: Modulation of movement

M: Middle

MAML: Mastermind-like

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MEF: Myocyte Enhanced Factor

MEK: Mitogen Activated protein Kinase

MEM: Modified Eagle's Medium

MET: Mesenchymal-Epithelial Transition

MHC: Major Histocompatibility Complex

min: Minutes

mm: Millimeter

M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus

MMPs: Matrix Metalloproteinases

mpc: Myogenic precursor cells

MRFs: Muscle Regulatory Factors

mRNA: messenger RNA

MTOC: Microtubule Organizing Center

MyF: Myogenic Factor

MyoD: Myoblast Determination protein 1

N: Negativa

N-Cad Ab: N-cadherin antibody

NCAD: Neural cadherin

N-Cad/FLL: The full-length N-cadherin

N-CoR: Nuclear receptor Co-Repressor

NICD: Notch Intracellular Domain

NLS: Nuclear Localization Sequence

nm: Nanometer

NOs: Nitric Oxide synthases

NTF: N-Terminal Fragment

°C: Degrees Celsius

O-FucT-1: O-Fucosyl Transferasa-1

Or: Orange domain

P: Present

P: Positive

PAX: Paired box

PBS: Phosphate Buffered Saline

PC: Prostate Cancer

PCDH10: Protocadherin-10

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pen-2: Presenilin enhancer-2

PEST: Proline-Glutamic acid-Serine-Threonine

PFA: Paraformaldehyde

PI: Propidium Iodide

PI3Ks: Phosphatidylinositol 3-kinases

PKG: cGMP-dependent Protein Kinase or Protein Kinase G

PS1: Presenilin 1

PTCH: *Patched*

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

PTP1B: Phosphatase protein Tyrosine Phosphatase 1B

PTPases: Protein Tyrosine Phosphatases

PVDF: Polyvinylidene Fluoride

R: Ratonas

RAC: Ras-related

RAM: Rbp-Jk association module

RBP-jk: Recombination signal sequence-binding protein Jk

REDV: Arginine-Glutamine-Aspartic acid-Valine

RGD: Arginine-Glycine-Aspartic acid

RMS: Rhabdomyosarcoma

RNA: Ribonucleic Acid

RNAc: Complementary RNA

ROCK: Rho-associated protein kinase

RT: Reverse Transcription

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

Runx2: Runt-related transcription factor 2

S: Suppression motility

S: Survival

SAGE: Serial Analysis Gene Expression

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

SD: Standard Deviation

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis

SELL: Selectine L

SFKs: Src tyrosine kinases

SHH: Sonic Hedgehog

SMRT: Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor

SMO: Smoothened

SOC: Super Optimal medium

Src: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Su (Dx): Suppressor of Deltex

Su (H): Suppressor of Hairless

TACE: TNF α converting enzyme

T-ALL: T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia

TAMRA: Tetramethylrhodamine

TBP: TATA Binding Protein

TBS: Tris Buffered Saline

TBS-T: TBS Tween

TCF: T-Cell Factor

TD: Transmembrana Domain
TGFβ1: Transforming Growth Factor Beta 1
TIMPs: Tissue Inhibitor of
Metalloproteinases
TLE: Transducin-Like Enhancer of split
TPM3: Tropomyosin 3
uPA: urokinasa Plasminogen Activator
UTP: Uridine triphosphate
UV: Ultraviolet
V: Volt
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion protein 1
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
W: WRPW domain
Y: YXXW domain

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	17
---------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

I.1 Rbdomiosarcoma	21
I.1.1 Consideraciones clínicas	21
I.1.2 Clasificación celular: Histología	21
Rbdomiosarcoma embrionario (eRMS)	21
Rbdomiosarcoma alveolar (aRMS)	22
Rbdomiosarcoma pleomórfico	22
Sarcoma indiferenciado	23
Sarcoma no clasificable	23
I.1.3 Características cromosómicas y moleculares	23
I.1.4 Origen del Rbdomiosarcoma	24
I.2 La vía Notch	27
I.2.1 Introducción	27
I.2.2 Componentes de la vía Notch	27
Los receptores Notch	27
Los ligandos Delta y Jagged	29
I.2.3 Activación de la vía Notch	30
I.2.4 Regulación de la vía Notch	31
I.2.5 Los genes diana de Notch	33
I.2.6 Señalización de Notch independiente de CSL	34
Notch y Wnt	35
Notch y Ras	35
Notch y TGF β 1	36
Notch y PI3K-AKT	36
Notch y Hedgehog	36

I.2.6 Evidencias de la implicación de la vía Notch en RMS	37
El papel de la vía Notch en la miogénesis	37
El papel oncogénico de la vía Notch	39
I.3 Metástasis: Adhesión, Migración e Invasión Celular	41
I.4 N-Caderina	45
I.4.1 Estructura y funciones como molécula de adhesión	45
I.4.2 Señalizaciones de la N-Caderina independientes de adhesión	47
N-Caderina y cateninas	47
N-Caderina y las Rho-GTPases	48
Interacción con la vía de señalización FGFR	49
Regulación de otras vías de señalización	50
Proteólisis N-Caderina	50
I.4.3 Implicación de la vía Notch en la regulación de la N-Caderina	50
I.4.4 Evidencias de la implicación de la N-Caderina en RMS	51
El papel de la N-Caderina en la miogénesis	51
I.5 Integrina-α9	53
I.5.1 Introducción	53
I.5.2 Estructura de la Integrina-α9	54
I.5.3 Integrinas y vías de señalización	56
Señalización <i>inside-out</i>	56
Señalización <i>outside-in</i> : transducción de señal	58
La vía de señalización común de las integrinas: Las FAK/Src	59
Vía de señalización específica de la Integrina- α 9	59
I.5.4 Internalización de las Integrinas	61
I.5.5 Implicación de la vía Notch en la regulación de la Integrina-α9	62
I.5.6 Evidencias de la implicación de la Integrina-α9 en RMS	62
El papel de la Integrina- α 9 en la miogénesis	63

OBJETIVOS	65
------------------	-----------

RESULTADOS

R.1 La vía Notch está ampliamente expresada y activada en RMS	69
R.1.1 Análisis de expresión para identificar marcadores relevantes del RMS	69
R.1.2 Perfil de expresión y activación de la vía Notch en RMS	70
R.2 La inhibición de la vía Notch reduce significativamente la invasividad y movilidad del RMS <i>in vitro</i>	74
R.2.1 La activación de la vía Notch se correlaciona con el fenotipo invasivo de las líneas celulares de RMS	74
R.2.2 La vía Notch puede ser inhibida farmacológicamente mediante GSIs	75
R.2.3 La inhibición de la vía Notch reduce significativamente la movilidad y la invasividad celular	77
R.2.4 La inhibición de la vía Notch no afecta a la progresión del ciclo celular ni a la apoptosis celular	79
R.2.5 Especificidad de los GSIs	80
R.3 La vía Notch confiere un fenotipo más invasivo a las células de RMS mediante la regulación de moléculas de adhesión	82
R.3.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch disminuye la adhesión celular en líneas celulares de RMS	84
R.3.2 La inhibición farmacológica de la vía Notch modifica el patrón de expresión de moléculas de adhesión	84
R.4 La vía Notch regula la N-Caderina	85
R.4.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de la N-Caderina	85
R.4.2 La modificación genética de la activación de la vía Notch regula a la N-Caderina	86
R.4.3 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce la adhesividad y la movilidad en células de RMS	89
R.4.4 NICD y Hes1 se unen al promotor de la N-Caderina	92
R.4.5 La N-Caderina está ampliamente expresada en pacientes de RMS	93
R.4.6 La N-Caderina se correlaciona con Hes1 en tumores de RMS	93

R.5 La vía Notch regula la Integrina- α 9	95
R.5.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de la Integrina- α 9	95
R.5.2 La modificación genética de la activación de la vía Notch regula la expresión de la Integrina- α 9	96
R.5.3 El bloqueo específico de la Integrina- α 9 reduce la adhesividad y movilidad en células de RMS	99
R.5.4 NICD y Hes1 se unen al promotor de la Integrina- α 9	100
R.5.5 La Integrina- α 9 está ampliamente expresada en pacientes de RMS	101
R.5.6 La Integrina- α 9 se correlaciona con Hes1 en tumores de RMS	102
R.6 El tratamiento con GSI inhibe el crecimiento de tumores de RMS en un modelo de xenotransplante murino de RMS	103
R.6.1 Generación de un modelo de xenotransplante murino de RMS	103
R.6.2 El tratamiento con DAPT inhibe la activación de la vía Notch <i>in vivo</i>	104
R.6.3 El tratamiento con DAPT inhibe el crecimiento de tumores de RMS <i>in vivo</i>	105

DISCUSIÓN

D.1 La vía Notch en Rabdomiosarcoma: consideraciones iniciales	109
D.2 Estudio de los mecanismos moleculares responsables del control del proceso de metástasis en RMS	111
D.2.1 La inhibición de la vía Notch reduce la invasividad y movilidad en células de RMS	111
D.2.2 La vía Notch regula la N-Caderina confiriendo un fenotipo más invasivo en células de RMS	113
D.2.3 La vía Notch regula la Integrina- α 9 confiriendo un fenotipo más invasivo en células de RMS	116
D.2.4 Regulación de los procesos de adhesividad, invasividad y movilidad celular mediada por Notch en células de RMS	120
D.2.5 La inhibición de la vía Notch disminuye el crecimiento de tumoral en un modelo murino de RMS	121

CONCLUSIONES

127

MATERIALES Y MÉTODOS

M.M.1 Líneas celulares	131
M.M.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares	131
M.M.1.2 Contaje celular	131
M.M.1.3 Tratamientos	132
M.M.1.4 Supervivencia celular	132
M.M.1.5 Ensayo de ciclo celular	132
M.M.1.6 Ensayo de apoptosis	133
M.M.1.7 Manipulación del DNA	133
Preparación de los vectores	133
M.M.1.8 Transfecciones	135
M.M.1.9 Extracción y análisis de RNA	137
Extracción de RNA	137
Electroforesis de ácidos nucleicos	137
RT (Reverse Transcription)	138
Polymerase Chain reaction (PCR)	138
Purificación del producto de PCR	139
Real Time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)	139
M.M.1.10 Análisis de expresión génica mediante un sistema de arrays de oligonucleótidos	142
M.M.1.11 Extracción y análisis de proteína	143
Extracción de proteína	143
Cuantificación de proteína	144
Análisis de proteínas por SDS-PAGE y Western-blot	144
M.M.1.12 Inmunofluorescencia (IC)	147
M.M.1.13 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	148
M.M.1.14 Ensayos funcionales	150
Ensayo de invasión	150

Ensayo de wound healing/cierre de la herida	151
Ensayo de adhesión en fibronectina y colágeno	152
M.M.2 Muestras de tumor	154
M.M.2.1 Obtención y mantenimiento de las muestras	154
M.M.2.2 Extracción de RNA, RT y RT-PCR	154
M.M.2.3 Análisis de expresión génica	156
Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)	156
Arrays de DNA complementario	156
Arrays de oligonucleótidos de Affimetrix	157
Selección de genes	157
M.M.2.4 Inmunohistoquímica (IHC)	158
M.M.3 Estudios <i>in vivo</i> . Formación de tumores en ratones	160
M.M.3.1 Transfección estable del vector pEGFP-luciferasa	160
M.M.3.2 Generación del modelo de xenógrafo ortotópico de ratones SCID	160
M.M.3.3 Determinación de la concentración óptima del fármaco	161
M.M.3.4 Tratamiento con DAPT	161
M.M.3.5 Sacrificio de los ratones y extracción de tumores	161
M.M.3.6 Visualización del crecimiento de los tumores <i>in vivo</i>	162
M.M.3.7 Análisis del patrón de crecimiento de los tumores <i>in vivo</i>	162
M.M.3.8 Análisis de RNA y proteína	162

REFERENCIAS	163
--------------------	------------

ANEXO

A.1 Relación entre la activación de la vía Notch, las características clínicas y evolutivas de los pacientes de RMS	191
A.1.1 Caracterización de la expresión de la vía Notch y de la N-Caderina e Integrina- α 9 mediante RT-PCR	191
A.1.2 Caracterización de la expresión de la vía Notch mediante IHC	192
Relación del marcaje con la supervivencia y los factores pronósticos	192

A.2 Artículos publicados	195
A.2.1 <i>Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro</i>	197
A.2.2 <i>Notch-mediated induction of N-cadherin and α9-integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells</i>	207

PRESENTACIÓN

El trabajo que se presenta en esta tesis se inició en el año 2008, bajo la co-dirección de la Dra. Soledad Gallego y el Dr. Josep Roma y bajo la tutoría de la Dra. Anna Bigas. Se llevó a cabo en el Departamento de Investigación Traslacional en Cáncer Pediátrico de la Unidad de Investigación Biomédica y de Oncología Traslacional y Pediátrica, del Instituto de Investigación del *Hospital Vall d'Hebrón* (Barcelona). La fundación SMALL, junto con las entidades ICO, Instituto de Salud Carlos III y la Fundación de La Marató de TV3 han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Este estudio se inició como consecuencia de los trabajos realizados por nuestro laboratorio, en colaboración con el Dr. Shaaf (Amsterdam, Netherlands), sobre la identificación de genes relevantes asociados a la patología del Rbdomiosarcoma (RMS). A partir de estos trabajos, se procedió al análisis de la vía Notch en células de RMS, el cual ha dado lugar a dos publicaciones hasta el momento, adjuntadas en los **Anexos** de este trabajo. Los resultados descritos en los artículos se detallan en el apartado de **Resultados** de la memoria. Éstos representan la primera descripción de la implicación de la vía Notch como elemento clave en la regulación de mecanismos de adhesividad, movilidad e invasividad en células de RMS. Además se propone un mecanismo de regulación de estos procesos, mediado por Notch, a través de la implicación de moléculas de adhesión, tales como la N-Caderina e Integrina- α 9. A parte de los resultados publicados en los artículos, en este trabajo se describen los efectos observados de la inhibición de la vía Notch *in vivo* y se profundiza en la caracterización del estado muscular inmaduro propio del RMS según los niveles de expresión de varios genes claves para el proceso de la miogénesis, tales como la vía Notch, la N-Caderina y la Integrina- α 9 en un amplio abanico de tumores de RMS.

La memoria de este trabajo consta de las siguientes partes: una **Introducción** que pretende facilitar una visión general del RMS, de la vía de señalización Notch y de su relación con las moléculas de adhesión N-Caderina e Integrina- α 9; un apartado de **Resultados** que contiene los resultados de los dos artículos publicados, más resultados aún no publicados; una **Discusión** general sobre todos los resultados obtenidos; un apartado de **Conclusiones**; un apartado de **Materiales y Métodos** que detalla las técnicas y reactivos empleados y finalmente los **Anexos**, donde se muestran los datos clínicos y moleculares de los pacientes estudiados, así como los artículos publicados.

INTRODUCCIÓN

I.1 Rhabdiosarcoma (RMS)

I.1.1 Consideraciones Clínicas

El RMS es el sarcoma de partes blandas más común de la infancia y de la adolescencia. Es un tumor maligno de origen musculoesquelético (1). Del total de casos de cáncer infantil registrados desde 1980 en España, el 7.5% corresponden a sarcomas de tejidos blandos, siendo el RMS el tipo más frecuente (suponiendo aproximadamente el 62% de los sarcomas de partes blandas) (2).

La supervivencia actual de los pacientes afectados de rhabdiosarcoma está alrededor del 70% aunque la curación depende del tipo específico de tumor, de su localización y del grado de diseminación (3).

El RMS puede diseminarse de forma local (infiltrándose en los tejidos situados en la inmediata vecindad del lugar en el que se originó), regional (las células tumorales migran a los ganglios linfáticos que drenan la zona donde se originó) o a distancia (las células malignas viajan a través de la corriente sanguínea a otra parte del cuerpo). Los lugares más habituales de diseminación a distancia del RMS son los pulmones, los huesos y la médula ósea. Los pacientes con enfermedad diseminada continúan teniendo un mal pronóstico a pesar del uso de terapias intensivas (4-7).

Los sitios primarios más comunes donde aparece el RMS son la cabeza y el cuello (parameningeas, órbita, faringe), las vías genitourinarias y las extremidades. Otros sitios primarios no tan frecuentes son el tronco, la pared torácica, abdomen (incluyendo el retroperitoneo y tracto biliar) y la región del perineo/ano (7, 8).

I.1.2 Clasificación celular: Histología

La característica definitoria del RMS es la evidencia demostrable de su estirpe muscular esquelética, ya sea por su aspecto microscópico o por el patrón de tinción inmunohistoquímica (IHC) (9). Es un tumor de célula pequeña y redonda que forma diferentes estructuras histológicas, permitiendo su clasificación en varios tipos histológicos: embrionario (que consta de los siguientes subtipos: botrioides y de células fusiformes/fusocelular), alveolar o pleomórfico (10, 11).

Rhabdiosarcoma embrionario (eRMS)

Aproximadamente dos tercios de los niños con RMS presentan el tipo embrionario (eRMS) (60% del total) (12). Estos tumores son más comunes en niños pequeños de entre 0 y 5 años

de edad. Los lugares más comunes donde se desarrollan son en la cabeza, el cuello (incluyendo la localización parameningea) y el sistema genitourinario (incluyendo vejiga y próstata). Está formado por células mesenquimales en diferentes estadios de diferenciación muscular y tienden a la diferenciación de músculo estriado. Es un tumor con celularidad moderada y estroma mixoide laxo (11, 13) (**Figura I.1**).

Dentro del eRMS se encuentra el subtipo botriode y el subtipo fusocelular. El subtipo botriode se caracteriza por presentar un aspecto macroscópico de racimo, a consecuencia de los miofibroblastos que crecen por debajo de la superficie epitelial y subepitelial de la pared de la vejiga y vagina formando el aspecto característico poliploide. Generalmente se asocia con un buen pronóstico. El subtipo fusocelular es de localización frecuentemente testicular (12, 14).

Rabdomiosarcoma alveolar (aRMS)

Alrededor de un 20-25% de los niños con RMS tienen la variante alveolar (aRMS). Estos tumores son mucho más frecuentes en adolescentes y asientan de forma habitual en las extremidades (9). Las células tumorales tienden a ser más pequeñas y redondas, ofreciendo un aspecto densamente celular. Deben su denominación a la similitud que muestran con los pequeños espacios aéreos saculares del pulmón (los alveolos pulmonares). Los aRMS presentan un peor pronóstico que las formas embrionarias (15, 16) (**Figura I.1**).

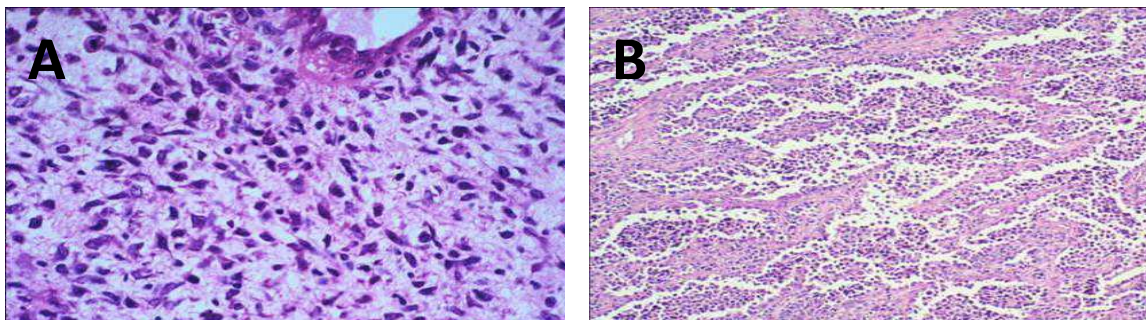


Figura I.1 Aspecto microscópico de un RMS embrionario y alveolar. A, imagen de un eRMS: se muestra menos denso y más fusiforme; aumento x400. B, imagen de un aRMS: las células son típicamente más pequeñas y redondas. Arquitectalmente se distribuyen revistiendo pseudoespacios que remedan los pequeños espacios aéreos saculares distales del pulmón (alveolos); aumento x1000. Figura adaptada de Leonard H. y Wexler, 2004.

Rabdomiosarcoma pleomórfico

El RMS pleomórfico se presenta principalmente en pacientes adultos de entre 25 y 50 años de edad y representa aproximadamente el 8% de los RMS. Normalmente presentan un pronóstico desfavorable, similar al del subtipo aRMS. Se pueden originar en diversas localizaciones, tales

como las extremidades, partes blandas y órganos profundos como el corazón. Macroscópicamente tienen la forma del músculo donde se originan, mientras que microscópicamente tienen un aspecto muy pleomórfico con numerosas células gigantes tumorales (17, 18).

Sarcoma indiferenciado

Representan el 11% de los casos de RMS y se incluyen en esta categoría los sarcomas anaplásicos difusos. Se caracterizan por tener un núcleo hiper cromático largo y mitosis atípicas. Suelen tener también un mal pronóstico (14).

Sarcoma no clasificable

Un 5-10% de los niños con RMS presenta tumores que no pueden ser tipificados o categorizados de manera definitiva, porque no cumplen ninguna de las características citológicas mencionadas. Suelen tener un mal pronóstico (14).

I.1.3 Características cromosómicas y moleculares

Las histologías embrionarias y alveolares tienen características moleculares distintivas que han sido utilizadas en la confirmación del diagnóstico histológico, siendo de gran utilidad en el control de la enfermedad residual mínima durante el tratamiento (10).

Aproximadamente el 90% de los casos de aRMS, poseen una translocación característica entre el brazo largo del cromosoma 2 y el brazo largo del cromosoma 13 $t(2; 13) (q35; q14)$; o entre el brazo corto del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 13 $t(1; 13) (p36; q14)$ (19). Esta translocación genera una fusión de los genes *PAX3* o *PAX7* (reguladores transcripcionales del desarrollo muscular, *Paired box genes*) con el gen *FKHR*, también conocido como *FOXO1A* (un miembro de la familia de factores de transcripción *Forkhead/HNF-3*) (20, 21). Aunque se desconoce la consecuencia precisa de estas translocaciones, diversos estudios demuestran que el resultado de esta fusión es la activación anormal de la transcripción de uno o varios genes que contribuyen a la transformación neoplásica (22) (**Figura I.2**).

Los aRMS con translocación en *PAX3-FKHR* representan aproximadamente el 59% de los casos, mientras que los pacientes con translocación en *PAX7-FKHR* representan el 19%. Los pacientes con translocación en el gen *PAX3* suelen tener peor pronóstico que los pacientes con translocación en el gen *PAX7* (4).

Los tumores con histología alveolar que carecen de translocación representan aproximadamente el 10% de los casos de aRMS. Presentan un perfil de expresión génica que

resulta más parecido a los eRMS que a los aRMS. Suelen tener un pronóstico más favorable que los aRMS *PAX3*⁺, pero menos favorable que los aRMS *PAX7*⁺ (23, 24).

En el subtipo embrionario no existe ninguna translocación característica descrita. Sin embargo, con frecuencia, muestran pérdida de material genómico específico en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15) y una ganancia en los cromosomas 2, 7, 8, 11, 12 y 17 (25)(Figura I.2).

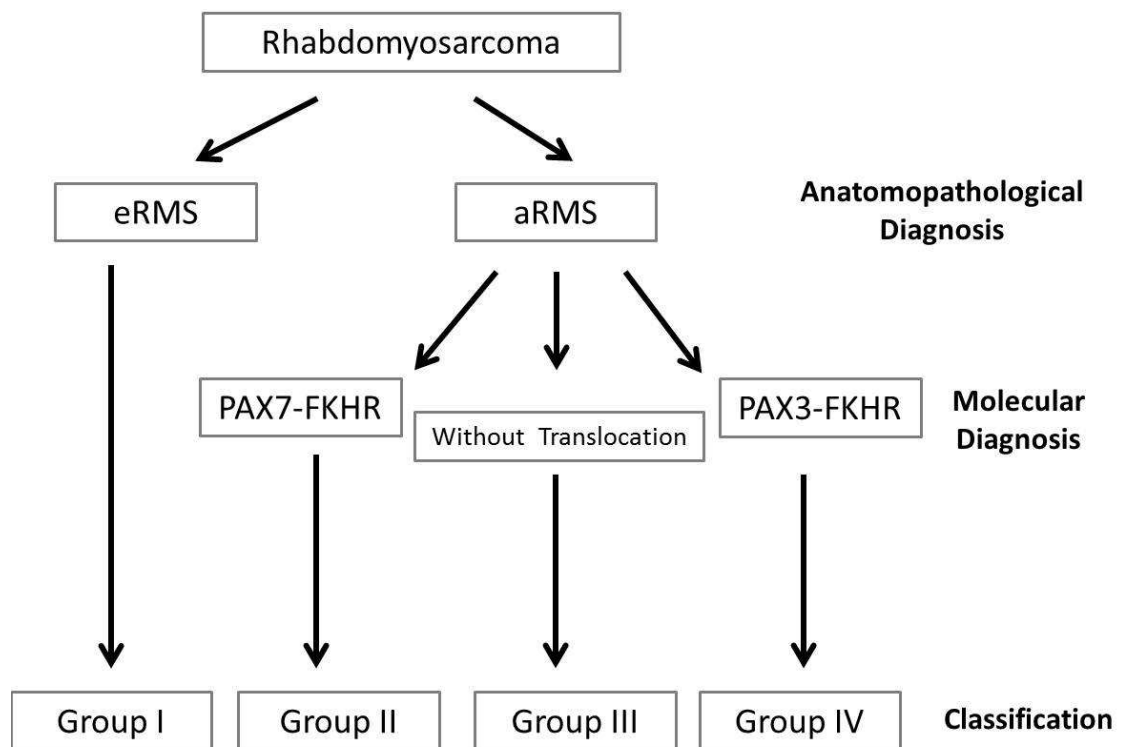


Figura I.2 Clasificación anatomo-patológica y molecular del RMS. La gráfica muestra la clasificación histológica y molecular del RMS. A nivel anatomo-patológico se clasifica según los subtipos embrionario (eRMS) y alveolar (aRMS). Dentro del subtipo alveolar hay una subclasificación molecular, en función del tipo de translocación.

I.1.4 Origen del Rbdomiosarcoma

El proceso de formación del músculo esquelético durante la embriogénesis y la regeneración muscular adulta se conoce con el nombre de miogénesis. Todos los músculos esqueléticos de los vertebrados son generados desde el mesodermo paraxial, el cual es segmentado en somitas en cada lado del tubo neural y del notocordo. Durante el desarrollo, cada somita es compartimentalizada en el dermomiótomo y el esclerotomo (que posteriormente generará los tejidos óseos). En el dermomiótomo se generarán los tejidos del músculo esquelético. Durante este proceso, las células progenitoras mesodérmicas progresan a lo largo de diferentes etapas, hasta formar la fibra muscular madura. Estas etapas son: la determinación del linaje

mioblástico, la proliferación celular, el arresto del ciclo celular para permitir la fusión de mioblastos mononucleados en miotubos plurinucleados y finalmente la diferenciación morfológica (26). Durante este proceso de formación, algunos mioblastos quedan en estado quiescente y son los que formarán, en el músculo esquelético maduro, las células madre llamadas células satélites. Las células satélites, son células quiescentes mononucleadas que se encuentran adyacentes a las fibras musculares maduras. Estas células son capaces de proliferar, diferenciarse y fusionarse con fibras musculares existentes en caso de daño muscular. Además son capaces de autorenovarse y generar nuevas células satélites, generando un depósito de células madre o satélite en caso de necesidad. El programa de diferenciación que utilizan las células satélites durante la reparación del músculo adulto es muy similar al que siguen las células progenitoras musculares durante el desarrollo embrionario (27).

La diferenciación de los mioblastos supone cambios génicos caracterizados por la coordinación de genes que codifican proteínas importantes para el desarrollo del músculo esquelético. Esta diferenciación se regula por la combinación de factores de transcripción específicos del músculo esquelético: factores de transcripción miogénicos o MRFs (*Muscle regulatory factors*); y por otros factores de transcripción, principalmente los factores de transcripción MEFs (*Myocyte enhanced factors*) y los genes *PAX*. Los MRFs pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción tipo bHLH (basic Hélix-loop-Hélix), formada por MyoD (llamado también Myf-3, *Myoblast determination protein 1*), Myf-5 (*Myogenic factor 5*), miogenina o Myf-1 (*Myogenic factor 1*) y Mrf-4 (*Muscle regulatory factors 4*) o Myf-6 (*Myogenic factor 6*)(26, 27).

Las células progenitoras musculares o las células satélites, las cuales son positivas para los marcadores CD34 (28) y M-caderina, son inducidas a convertirse en mioblastos gracias a la expresión del factor de transcripción Pax3. Se cree que la activación de este gen regula la entrada al programa de diferenciación muscular esquelética (29). La determinación del músculo esquelético y la adquisición de los precursores mioblásticos, a parte de requerir algunos de los genes *PAX*, dependen también de la expresión de Myf5 y Mrf-4 (31). Se ha demostrado que Pax3 activa Myf5 y puede activar también MyoD. A su vez Mrf-4 también regula la expresión de MyoD dando lugar a la especificación del fenotipo muscular (32). La expresión de MyoD, además, permite la diferenciación temprana de mioblastos a miotubos, mientras que las expresiones de miogenina y posteriormente de Mrf4 son necesarias para completar el proceso de la diferenciación muscular esquelética (29, 33) (**Figura I.3**). A pesar de que se haya descrito la implicación de los genes *PAX3* y *7* en la miogénesis del músculo esquelético, se desconoce por qué las translocaciones *PAX3/7-FKHR*, las cuales generan una

activación constitutiva de los factores de transcripción quiméricos correspondientes, dan lugar a un fenotipo oncogénico (30).

Durante la regeneración muscular, la secuencia de expresión de los MRFs se comparte de manera similar que en el desarrollo embrionario: Myf5 y MyoD se expresan en los mioblastos en proliferación; la miogenina junto con MyoD empieza a expresarse en estadios de diferenciación primaria; y finalmente, en estadios más avanzados es MRF4 el factor predominante (26) (Figura I.3).

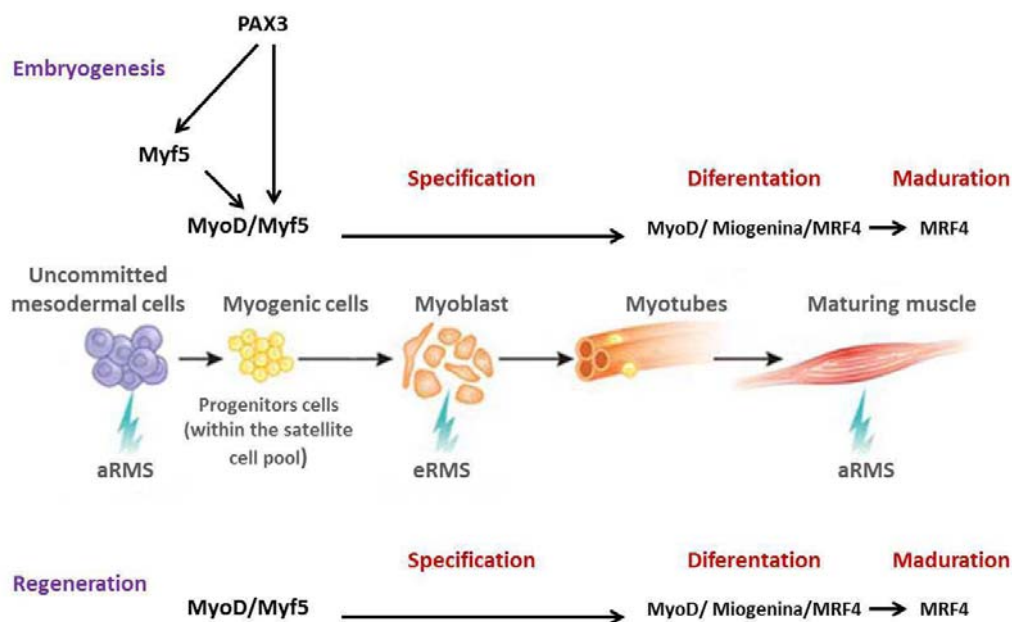


Figura I.3 Modelo de miogénesis esquelética. Representación de la expresión del MRFs durante el desarrollo muscular (embriogénesis y músculo adulto), mostrando los posibles orígenes celulares del RMS. Figura adaptada de Sartoli y Caretti, 2005; Hettmer y Wagers, 2010.

El RMS surge como consecuencia de una disrupción en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células precursoras de la miogénesis (34). No se sabe cuál es exactamente el mecanismo responsable de esta disrupción, ni en qué punto se interrumpe el proceso de la miogénesis para acabar convirtiendo las células miogénicas en células malignas. El avance en el conocimiento de los procesos biológicos que subyacen el desarrollo y mantenimiento del RMS puede ayudar al progreso de nuevas terapias específicas contra esta patología.

I.2 La vía Notch

I.2.1 Introducción

A lo largo de la evolución, los organismos pluricelulares han desarrollado una serie de mecanismos reguladores que aseguran el correcto desarrollo y homeostasis de órganos y tejidos. Estos organismos se organizan de una forma muy compleja repartiendo las diversas funciones celulares entre las distintas poblaciones de células, las cuales requieren de la interacción entre ellas para su correcto funcionamiento. De este modo, cada célula depende de otras y las influye, coordinando procesos de proliferación, crecimiento, migración, diferenciación y apoptosis. Muchas de las interacciones entre células vecinas dependen de receptores de membrana, entre los que se encuentran los receptores de la familia Notch. Estos receptores son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos (35, 36).

El término Notch debe su nombre al origen del descubrimiento del gen. En 1914, John S. Dexter observó la aparición de unas incisiones (*notches* en inglés) en las alas de las hembras de moscas *Drosophila melanogaster* y observó que dichas incisiones eran producto de una haploinsuficiencia de un gen, no identificado hasta aquel momento, el cual presentaba una herencia dominante ligada al cromosoma X (37). Los alelos del gen fueron identificados en 1917 por Thomas Hunt Morgan. No fue hasta el 1980 cuando se llevaron a cabo análisis de secuenciación y estudios moleculares de los genes *NOTCH* (38).

I.2.2 Componentes de la vía Notch

Los receptores Notch

Los genes *NOTCH* codifican para cuatro receptores transmembrana (Notch1-4) de aproximadamente 300 kDa, cuya estructura está altamente conservada. Son proteínas transmembrana (receptores transmembrana de tipo I) involucradas en la transducción de señales específicas, en respuesta a la unión a sus ligandos.

Los receptores Notch constan de una subunidad extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular (**Figura I.4**). La subunidad extracelular contiene múltiples repeticiones en tándem de dominios *EGF-like* (*Epidermal growth factor-like repeats*), siendo las repeticiones 11 y 12 los sitios principales de unión a sus ligandos (39, 40). Los dominios *EGF-like* se unen a iones calcio y éstos determinan la conformación y la afinidad del receptor Notch por sus ligandos (41). Los receptores Notch1 y Notch2, los cuales comparten entre sí el mayor grado de similitud, contienen 36 repeticiones *EGF-like*, mientras que Notch3 contiene 34 y Notch4 solamente 29. En el extremo C-terminal se encuentran tres repeticiones *EGF-like* que

contienen residuos de cisteína, llamadas repeticiones LNG (Lin-12, Notch, GLP-1), implicadas en el mantenimiento de la estabilidad del dominio extracelular y en la regulación negativa de la activación del receptor en ausencia del ligando (42). Mutaciones puntuales en esta región causan una sobreactivación de la vía Notch, causando leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) en humanos (43). La región N-terminal del dominio transmembrana es una región extracelular que consta de dos regiones importantes en el procesamiento y regulación de la vía Notch. La primera, llamada S2, es un dominio susceptible de proteólisis por la metaloproteasa TACE/ADAM 17 (*TNF α converting enzyme/A desintegrin and metalloproteínasa 17*) (44) (véase **I.2.3 Activación de la vía Notch**). La segunda es un *link* no covalente entre residuos de cisteína que funciona como dominio de heterodimerización.

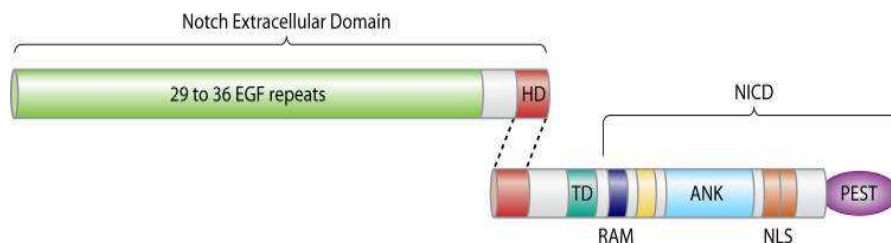


Figura I.4 Organización de los dominios de los receptores Notch. Abreviaturas: ANK (*ankyrin domains*), EGF (*epidermal growth factor-like*), HD (*heterodimerization domain*), NLS (*nuclear localization sequence*), PEST (*proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich domain*), RAM (*Rbp-Jk association module*), TD (*transmembrane domain*). El número de las repeticiones de los dominios EGF son de 36 en Notch1 y Notch2, 34 en Notch3 y 29 en Notch4. La líneas punteadas representan las interacciones entre las dos partes de la forma heterodimérica de Notch; los fragmentos amarillos representan dominios adicionales de las secuencias NLS. Figura adaptada de Zanotti, S. 2010.

El dominio intracelular de Notch tienen una serie de regiones altamente conservadas con una funcionalidad muy concreta. Posee un residuo de valina que es objeto de proteólisis (S3) en el momento en el que se produce la unión receptor-ligando, liberándose el fragmento NICD (*Notch intracelular domain*). El NICD puede interactuar con un elevado número de moléculas mediante dos dominios: RAM (*Rbp-Jk association module*) y las repeticiones de anquirina (ANKR). Después de las repeticiones de ANKR se encuentra una secuencia de localización nuclear, seguida de un dominio transactivador que difiere en los cuatro receptores Notch. Mientras que Notch1 tiene una secuencia fuerte de transactivación en este dominio, Notch2 tiene una actividad mucho más débil y tanto Notch3 como Notch4 carecen de capacidad transcripcional (45). El extremo C-terminal consiste en un dominio rico en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) (PEST). Esta región actúa como señal peptídica para la ubiquitinización y degradación del dominio intracelular de Notch regulando el descenso de la actividad señalizadora de la vía (**Figura I.4**) (véase **I.2.3 Activación de la vía Notch**) (40). A

pesar de que poseen una estructura muy similar entre sí en mamíferos, con diferencias esenciales en las porciones extracelulares y citoplasmáticas, los receptores de Notch pueden tener funciones redundantes o únicas (46).

Los ligandos Delta y Jagged

La señalización a través de los receptores Notch se inicia por la unión con uno de sus ligandos, situados en células contiguas. En *Drosophila* se han identificado dos ligandos de Notch (Delta y Serrate), mientras que en vertebrados se han identificado cinco (Jagged1, Jagged2, Delta1, Delta3 y Delta4). Los ligandos son proteínas transmembrana caracterizadas por tener en la región extracelular repeticiones en tándem de dominios *EGF-like*. A diferencia de los ligandos Delta, los ligandos Jagged contienen un dominio rico en cisteína (CR) importantes para el ensamblaje de estas proteínas. El dominio de unión a Notch se encuentra en el extremo N-terminal formado por un dominio característico, llamado DSL (Delta/Serrate/ Lag2), y dos repeticiones en tándem de dominios de *EGF-like*, llamados Delta y OSM11-like (DOS) (Figura I.5) (47, 48, 49). La región intracelular está mucho menos conservada, consta de unos pocos aminoácidos y se desconoce su funcionalidad específica (40).

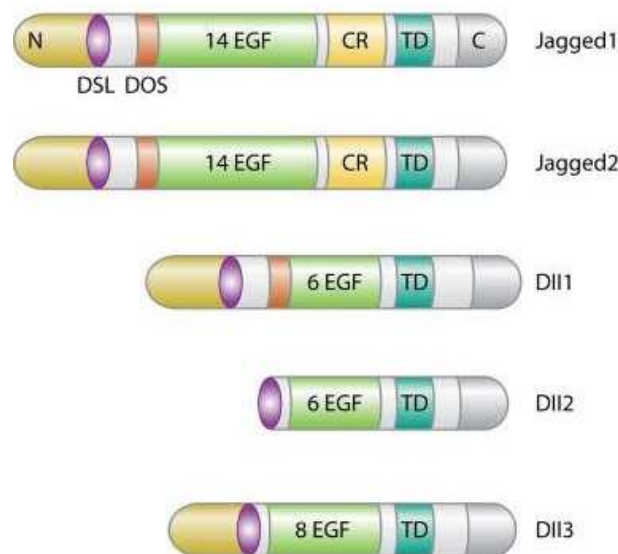


Figura I.5 Organización de los dominios de los ligandos de Notch. Abreviaturas: C (región C-terminal), CR (cysteine-rich domain), DOS (Delta and OSM-11-like proteins), DSL (Delta/Serrate/Lag2 motif), EGF (epidermal growth factor-like repeat), N (N-terminal signal) y TD (transmembrane domain). Figura adaptada de Zanotti, S. 2010.

I.2.3 Activación de la vía Notch

Notch es sintetizado como un péptido inmaduro en el retículo endoplasmático donde pasa a la red trans-Golgi para ser procesado. El procesamiento consiste en la proteólisis y posterior glicosilación de los residuos de EGF mediada por O-Fucosil Transferasa-1 (O-FucT-1) y *Fringe* (Fng). Notch es procesado con un primer corte proteolítico (S1) mediado por una Furina, generando el dominio extracelular de Notch y el NICD. Ambos dominios interactúan entre ellos de manera no covalente, en una forma dependiente de calcio, generando un péptido maduro, que finalmente es expuesto en la membrana celular para ser activado por sus ligandos (39, 50).

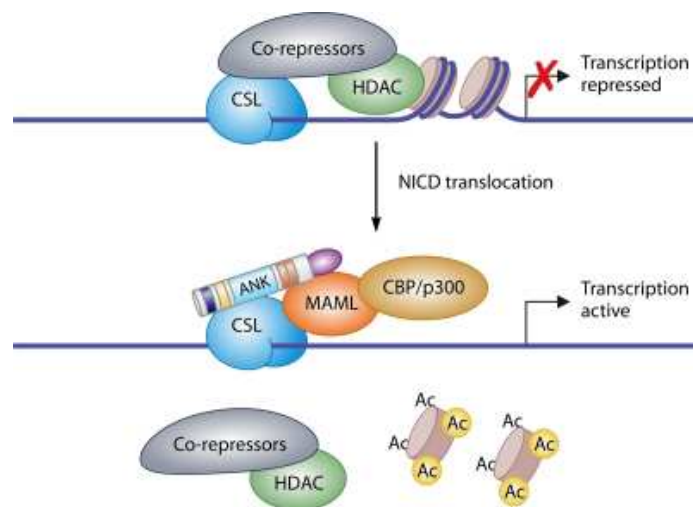


Figura I.6 Activación de la transcripción mediada por NICD. Bajo condiciones basales los correpresores transcripcionales se unen al promotor Epstein-Barr virus latency C1, Suppressor of Hairless, y Lag1 (CSL) y secuestran las histonas desacetilasas (HDAC) para suprimir la transcripción de los genes diana. Cuando el NICD se transloca al núcleo, se forma un complejo alternativo compuesto por el NICD, CSL y MAML. Este complejo desplaza los correpresores y las HDAC, reclutando CBP/p300 y las histonas aciltransferasas (Ac), permitiendo el inicio de la transcripción. Figura adaptada de Zanotti, S. 2010.

La interacción de Notch con sus ligandos desencadena una serie de procesamientos proteolíticos del receptor, necesarios para la activación de la vía. El primer corte se da en la región extracelular del receptor, denominada S2. La responsable de este procesamiento es la proteasa de la familia ADAM, llamada TACE o ADAM17 en vertebrados y *Kuzbanian* en *Drosophila*, la cual genera un péptido intermedio inestable (Notch Δ E). Este péptido sufre otro corte proteolítico en la región transmembrana, llamada S3, mediante el complejo de la γ -secretasa. Este complejo está formado por la Presenilina 1 (PS1), la Nicastrina, Pen-2 (*Presenilin enhancer 2*) y Aph-1 (*Anterior pharynx defectiva*). El corte del complejo γ -secretasa libera el fragmento intracelular (NICD), el cual se transloca al núcleo y se une al factor de transcripción CSL. El factor CSL debe su nombre a las proteínas que lo integran en los

diferentes organismos: CBF1(*C-promoter binding factor-1*) en humanos, RBP-jk (*Recombination signal sequence-binding protein Jk*) en mamíferos, Su(H)/Lag1 (*Supressor of Hairless/Lin-12 y glp-1*) en *Drosophila* y *C.elegans* respectivamente (51).

En ausencia de NICD, el factor de transcripción CSL está unido al DNA y a proteínas corepresoras (SMRT –*Silencing mediator for retinoid and thyroid receptor*–, N-CoRs –*Nuclear receptor corepressor*–), las cuales reclutan el complejo de histonas desacetilasas (HDAC) para suprimir la transcripción. Cuando NICD se une al factor CSL, Notch desplaza los complejos corepresores y recluta varios coactivadores, como las histonas acetil transferasa p300 y el coactivador específico de Notch MAML1 (*Mastermind-like1*), convirtiendo las proteínas CSL en activadoras transcripcionales (40, 52). Como consecuencia, se activa la expresión de los genes *HES* (*Hairy enhanced of Split*) y *HEY/HRT* (*Hairy related transcriptor factor*) (60) (**Figura I.6**).

I.2.4 Regulación de la vía Notch

La expresión de los receptores Notch y su ligandos queda supeditada a un conjunto de mecanismos reguladores para asegurar la correcta coordinación de la vía durante el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. Uno de estos mecanismos que asegura la especificidad e intensidad de unión entre Notch y sus ligandos es la glicosilación. Tanto Notch como sus ligandos son glicoproteínas y este proceso de glicosilación en los dominios *EGF-like* tiene propiedades reguladoras sobre sus funciones. Inicialmente la enzima O-FucT-1 agrega una fucosa en los residuos de serina y treonina. Después la cadena de carbohidratos se sigue extendiendo por la acción de Fng. Los genes *Fng* codifican para la N-acetilglucosaminiltransferasas, que adicionan residuos de N-acetilglucosamida a los grupos 3'-OH de las fucosas unidas a las repeticiones EGF. La incorporación de moléculas de fucosa es básica para que se produzca la interacción ligando-receptor, mientras que el nivel de glicosilación, dependiente de *Fng*, modula la respuesta a los diferentes tipos de ligandos, incrementando la unión a Delta e inhibiendo la respuesta de los ligandos Jagged/Serrate. Varios de los elementos repetidos de EGF tienen el potencial de ser modificados, dando la posibilidad de generar un gran repertorio de receptores que permiten la especificidad a sus ligandos (38, 53).

Otro mecanismo que regula la activación de la vía Notch es la ubiquitinización. Los niveles de actividad de Notch dependerán exclusivamente de la concentración nuclear de NICD. La actividad de Supresor de Deltex (Su[Dx]) y Deltex (Dx) se han asociado al tráfico, endocitosis y degradación del receptor Notch. Cuando el receptor es ubiquitinado por Su(Dx), éste entra en la vía endocítica para ser degradado. Dx por el contrario, antagoniza la actividad de Su(Dx),

inhibiendo el ingreso del receptor Notch a la vía endocítica y regulando su tiempo y localización en la membrana celular. Numb, que es una E-ubiquitin ligasa, es otro importante regulador negativo que participa en el ingreso de NICD en la vía endocítica para ser degradado, como lo hace Su(Dx). La ubiquitinización no sólo participa en la degradación de péptidos, sino también en la activación, transporte y localización membranal de los mismos (54). La duración de la transcripción de Notch también es un elemento regulado, donde participa MAML1, que promueve la fosforilación del dominio PEST y la subsiguiente degradación de NICD mediante el reclutamiento de Cdk8 (55) (Figura I.7).

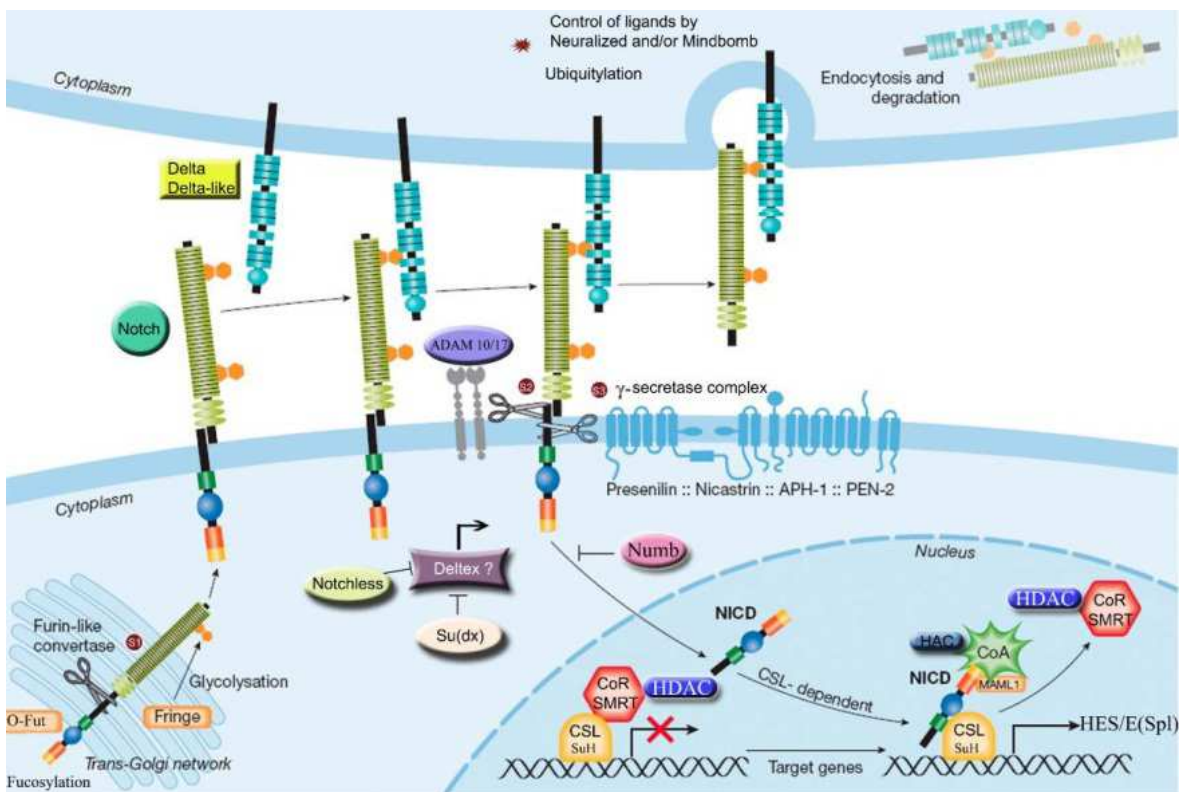


Figura I.7 Componentes principales y factores reguladores de la vía Notch. Los receptores de Notch son sintetizados como proteínas precursoras únicas que son proteolizadas en el aparato de Golgi mediante una *Furin-like proteasa* durante su transporte a la superficie celular donde se expresan como heterodímeros. La glicosiltransferasa Fringe modifica los dominios *EGF-like repeats* añadiendo N-acetilglucosamina en el aparato de Golgi. La señalización de Notch se inicia después de la interacción ligando-receptor, el cual induce dos cortes proteolíticos. El primer corte en el dominio extracelular es mediado por la metaloproteína TACE. La subunidad extracelular proteolizada se “trans-endocita” mediante las células vecinas que expresan los ligandos, este proceso se controla mediante ubiquitinización. El segundo corte ocurre en el dominio transmembrana y es mediado por la actividad de la alfa-secretasa. El dominio NICD se transloca al núcleo y se une a los factores CSL. La interacción permite la activación transcripcional mediante el desplazamiento de complejos corepresores (CoR) y el reclutamiento simultáneo de coactivadores (CoA). El nivel de glicosilación dependiente de Fringe modula la respuesta a los diferentes tipos de ligandos. Figura adaptada de Gazave, E. 2009.

I.2.5 Los genes diana de Notch

A pesar de los numerosos procesos que regula la vía Notch, son muy pocos los genes diana descritos hasta el momento. Lo más conocidos son los llamados bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*). En *Drosophila* los componen la familia de Hairy y E(Spl), mientras que en mamíferos se conocen las familias de *HEY* y *HES* principalmente. Hasta el momento, se han identificado en mamíferos siete genes *HES* (*HES1-7*). A excepción de *HES2*, 3 y 6, los cuales aparecen como dianas independientes de la vía Notch, los genes *HES1*, 5 y 7 se han establecido como dianas específicas de ésta. Hacen falta más datos sobre el gen *HES4* para determinar si es dependiente o no de la vía Notch (56). La familia de genes *HEY* se compone de los miembros *HEY1*, 2 y L, los cuales todos ellos pueden ser inducidos por Notch (57). Ambas familias de genes tienen un elevado grado de similitud estructural. Forman una familia de reguladores transcripcionales que pertenecen a la familia bHLH, nombre que define su estructura. El dominio HLH es el responsable de la dimerización de estas proteínas, imprescindible para realizar su función. A continuación de este dominio se encuentra el dominio *Orange*, el cual contribuye a la especificidad de estas interacciones proteína-proteína. Las proteínas Hes se caracterizan por la presencia de un residuo de prolina altamente conservado en el dominio básico, mientras que las proteínas Hey contienen un residuo de glicina. El dominio básico es el encargado de la unión específica a las secuencias de DNA, por este residuo que les diferencia los genes *HES* son capaces de unirse a las cajas N y E (CACNAG, CANNTG), mientras que los genes *HEY* sólo se unen a las cajas E. Otra diferencia se encuentra en el motivo tetrapéptido del extremo C-terminal, donde las secuencias WRPW y YXXW están presentes en la familia de los genes *HES* y *HEY* respectivamente (56, 57) (**Figura I.8**).

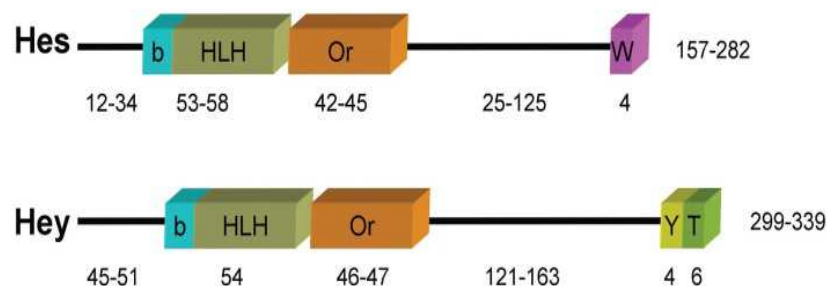


Figura I.8 Organización de los dominios de las proteínas Hes y Hey. Abreviaturas: bHLH (*basic-helix-loop-helix*), Or (*Orange*), W (dominio WRPW) y Y (dominio YXXW). Los números indican el número de los aminoácidos de cada dominio.

Los mecanismos de acción los genes *HES* y *HEY* conocidos hasta el momento son: unión directa a secuencias del DNA que contengan los dominios de unión *N* y *E-box* en los promotores de los genes diana; uniones indirectas a través de otros factores de transcripción, los cuales a menudo transforma en represores transcripcionales, tales como *Gata2* (*Globin transcription factor*) en la aorta embrionaria (58), *Runx2* (*Run-related transcription factor 2*) en la válvula aórtica (59, 60) y *Stat3* (*Signal transducer and activator of transcription 3*) en el sistema nervioso central (61); y uniones a activadores transcripcionales bloqueando su actuación (56). Mayoritariamente funcionan como represores transcripcionales, aunque hay excepciones con función antagónica. Por ejemplo, el caso de *Hes1* que actúa como regulador positivo de ciertos genes, tales como el gen *GAA* (*Acid alpha-glucosidase*) y *MASH1/ASCL1* (*Achaete-scute homolog 1*) (62, 63).

1.2.6 Señalización de Notch independiente de CSL

La familia de factores de transcripción CSL son los principales genes reguladores de la acción transcripcional de NICD. Sin embargo, existen múltiples evidencias que apoyan la existencia de una vía de señalización independiente de CSL.

Inicialmente se observó en *Drosophila* cómo el fenotipo ocasionado en embriones por pérdida de la función de Su(H) (CSL en mamíferos) era menos grave que el originado por mutaciones directas en los receptores Notch. Se obtuvieron resultados similares en un estudio donde comparaban mutantes de *NOTCH* con mutantes de *CBP* en ratones (64). Posteriormente, varios estudios reportaron la existencia de esta vía independiente de los factores CSL en varios tejidos celulares en vertebrados (65). En la línea celular miogénica C2C12, Notch bloquea la diferenciación de los miocitos a miotubos inhibiendo la acción del factor de transcripción específico del músculo MyoD. Esta diferenciación se encuentra también bloqueada cuando se utilizan formas mutantes de *NOTCH* que no se pueden unir a los factores CSL, sugiriendo que la implicación de Notch en este proceso puede ser independiente de los factores CSL (66).

En la señalización mediada por Notch independiente de CSL, el NICD puede actuar de formas muy diversas: 1) una vez proteolizado se transloca al núcleo donde interacciona con coactivadores específicos de tejido y otros factores no definidos para activar la transcripción, 2) el NICD proteolizado interacciona con componentes de otras vías de señalización, activando la transcripción; 3) o puede actuar fuera del núcleo, uniéndose a la membrana celular y activando otras vías de señalización (65). La interrelación de la vía Notch con otras vías de señalización se ha visto implicada en varios procesos celulares, tales como la especificación, proliferación y oncogénesis. Algunos de los ejemplos más destacados son:

Notch y Wnt

La señalización de Wnt, al igual que la vía Notch, es importante para la homeostasis y la diferenciación de muchos tejidos y órganos celulares. La activación de la vía de Wnt se lleva a cabo mediante sus co-receptores Arrow/LRP, los cuales a través del receptor Frizzled activan el adaptador citoplasmático Dishevelled (Dsh), permitiendo que la proteína β -catenina entre a núcleo y actúe como coactivador transcripcional de los factores de transcripción TCF (*T-cell factor*). En ausencia de Wnt, la proteína β -catenina es degradada por acción de GSK3 β (*Glycogen synthase kinase-3 β*), Axin, APC (*Adenomatosis polyposis coli*), la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la quinasa casein 1 α (CK1 α) (67).

Se han descrito varias interacciones reguladoras entre ambas vías de señalización. Entre ellas, la interacción de Dsh con NICD (68, 69); la interacción de NICD con varios componentes del complejo de destrucción de la β -catenina, tales como Axin (el cual afecta la estabilidad de la β -catenina) y el factor APC (*Adenomatous polyposis coli*) (70).

Notch y Ras

Existen numerosos ejemplos de *cross-talk* entre las vías de señalización Notch y Ras debido a que los dos efectores actúan sobre componentes del otro. Estas relaciones pueden ser:

Antagonistas: Ras promueve el descenso en la expresión del receptor Notch en *C. elegans*. También se ha visto involucrada en el bloqueo de la actividad transcripcional de los genes diana de Notch mediante MAPK (*Mitogen-activated protein*), la cual fosforila la proteína *Groucho*, y éste a su vez inhibe el gen *E(spl)-Enhancer of Split* en *D. Melanogaster*. Del mismo modo, se ha descrito la implicación de Notch en la transcripción de los genes inhibidores de la vía de Ras (71).

Agonistas: Notch y Ras pueden actuar de forma conjunta sobre el mismo promotor o sobre promotores diferentes con el objetivo de conseguir una determinación y diferenciación celular concreta. Estos mecanismos de cooperación son especialmente importantes para adquirir la capacidad de transformar células o para el mantenimiento del fenotipo tumoral.

En tumores de glándula mamaria iniciados por Notch4 se encontraron activados los diferentes elementos de la vía Ras (p. ej.: MEK), los cuales son cruciales para el mantenimiento del fenotipo maligno y el crecimiento independiente de un soporte sólido (72). Por otra parte, en fibroblastos transformados por Ras se detectó una regulación positiva tanto del receptor Notch como de otros elementos de la vía, tales como PS1 o Delta1. Esta desregulación de

Notch mostró ser un elemento clave en el mantenimiento del fenotipo maligno de estas células (73).

Notch y TGFβ1

Los ligandos de la familia TGFβ1 (*Transforming growth factor β1*) son moléculas secretadas que se unen diméricamente a receptores transmembrana serina/treonina quinasa. Esta unión produce la activación de varias vías de señalización dependientes de las proteínas reguladoras Smads o independientes de éstas (74, 75). La señalización dependiente de Smad, permite la interacción con otros Smads, los cuales se translocan al núcleo activando diferentes factores de transcripción (c-Jun, c-Fos, Fox1H1, Gli-3) y permitiendo el control de diferentes procesos tales como el control del ciclo celular y la regulación de la matriz extracelular (ECM). La señalización independiente de Smad, implica la activación de la vía de señalización MAPK. Las MAPKs son serina/treonina quinasa que se activan en respuesta a varias señales extracelulares, entre ellas la vía de señalización TGFβ1. Se han identificado tres grupos diferentes de MAPKs en mamíferos: ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) y p38 MAPK, implicadas en muchos procesos celulares (75, 76). Varios estudios han demostrado que existe una interacción directa entre el NICD y los mediadores intracelulares de la vía de TGFβ1 (las proteínas Smad y las MAPKs). Esta interacción se ha visto implicada en la regulación de los genes diana de Notch (*HES1* y *HEY1*), en la inhibición de la diferenciación miogénica y en la migración celular en células endoteliales (75, 77).

Notch y PI3K-AKT

El gen *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) es un supresor de tumores que inhibe la vía de señalización PI3K-AKT (*Phosphatidylinositol 3 kinases/ Activated kinase murine thymoma*), regulando la proliferación. Notch controla una compleja red transcripcional que disminuye la expresión de *PTEN* activando la vía de AKT. Mutaciones que activan constitutivamente Notch o provocan la pérdida de función de *PTEN* causan una hiperactividad de la cinasa Akt que contribuye a la transformación celular inducida por Notch y a la aparición de un fenotipo maligno, como sucede en T-ALL (78, 79).

Notch y Hedgehog

La vía de señalización de *Hedgehog* (Hh) es esencial en la embriogénesis debido a su implicación en el desarrollo de múltiples órganos, donde controla aspectos tan importantes como la especificación de los distintos tipos celulares, la proliferación y la diferenciación. Los mamíferos presentan tres genes de la familia Hh, llamados *Sonic hedgehog* (*SHH*), *Indian*

hedgehog (IHH) y *Desert hedgehog (DHH)*. Cuando los ligandos de Hh se unen a los receptores *patched (Ptch1 y Ptch2)*, se activa *Smoothed (Smo)*. La activación de Smo en la membrana citoplasmática evita la degradación proteosomal de la familia de las proteínas Gli (Gli1, Gli2 y Gli3), produciéndose la translocación de éstas al núcleo activando la transcripción. Las dianas más conocidas de la vía son Gli1, Ptch1 y Hhip (*Hedgehog interacting protein*), los cuales son genes de la propia vía.

Varios estudios han descrito la existencia de una interacción entre la vía de Hh y la vía Notch. Ingram WJ. y colaboradores demostraron que la transcripción de *HES1* podía ser activada mediante los ligandos de Hh, independientemente de la activación de la vía Notch, en células mesodérmicas y neuronales (80). Además, se ha demostrado la unión directa del factor de transcripción Hes1 con el promotor de *GLI1*, reprimiendo su función e influenciando la vía de señalización Hh en glioblastoma (81).

1.2.7 Evidencias de la implicación de la vía Notch en RMS

El papel que jugaba la vía Notch en la oncogenicidad del RMS era totalmente desconocido al inicio de nuestro estudio. La hipótesis de partida fue que la vía Notch podría tener un papel importante en el mantenimiento del estado inmaduro muscular característico del RMS (35). Los antecedentes que nos condujeron a plantearnos esta hipótesis fueron los siguientes: i) el papel que juega la vía Notch en el proceso de la miogénesis y en la activación de las células satélites; ii) y el perfil oncogénico de la vía en una gran variedad de tumores.

El papel de la vía Notch en la miogénesis

La vía Notch juega un papel importante en la regulación embrionaria y post-natal en la miogénesis esquelética. Experimentos *in vivo*, realizados desde hace más de una década, y más recientemente experimentos *ex vivo* han demostrado la implicación de la vía Notch en la expansión e inhibición de la diferenciación de las células precursoras miogénicas (27, 33, 82, 83, 84, 85). Sin embargo el mecanismo molecular mediante el cual la vía Notch ejerce sus efectos inhibitorios no está del todo claro.

Varios estudios demostraron que la activación de la vía Notch inhibía la actividad del factor miogénico MyoD y Myf-5 durante la diferenciación temprana (83, 84, 86, 87). Posteriormente se sugirieron varios mecanismos moleculares mediados por Notch capaces de controlar la diferenciación: el primero mediado a través del efector Hes1, el cual se observó que reprimía la expresión de MyoD secuestrando el cofactor E47 (imprescindible para que MyoD se pueda unir al DNA); el segundo, implicaba la unión directa del NICD con el cofactor Mef2c,

bloqueando la unión de MyoD al DNA; y finalmente, a través del efector *downstream* Hey, el cual mostró reprimir los factores de transcripción Mef2C y la miogenina (27, 87, 88). Estos datos sugirieron que la activación de Notch tenía lugar durante la especificación y proliferación miogénica y cesaba durante la diferenciación temprana de los mioblastos postmitóticos durante el proceso de la miogénesis normal.

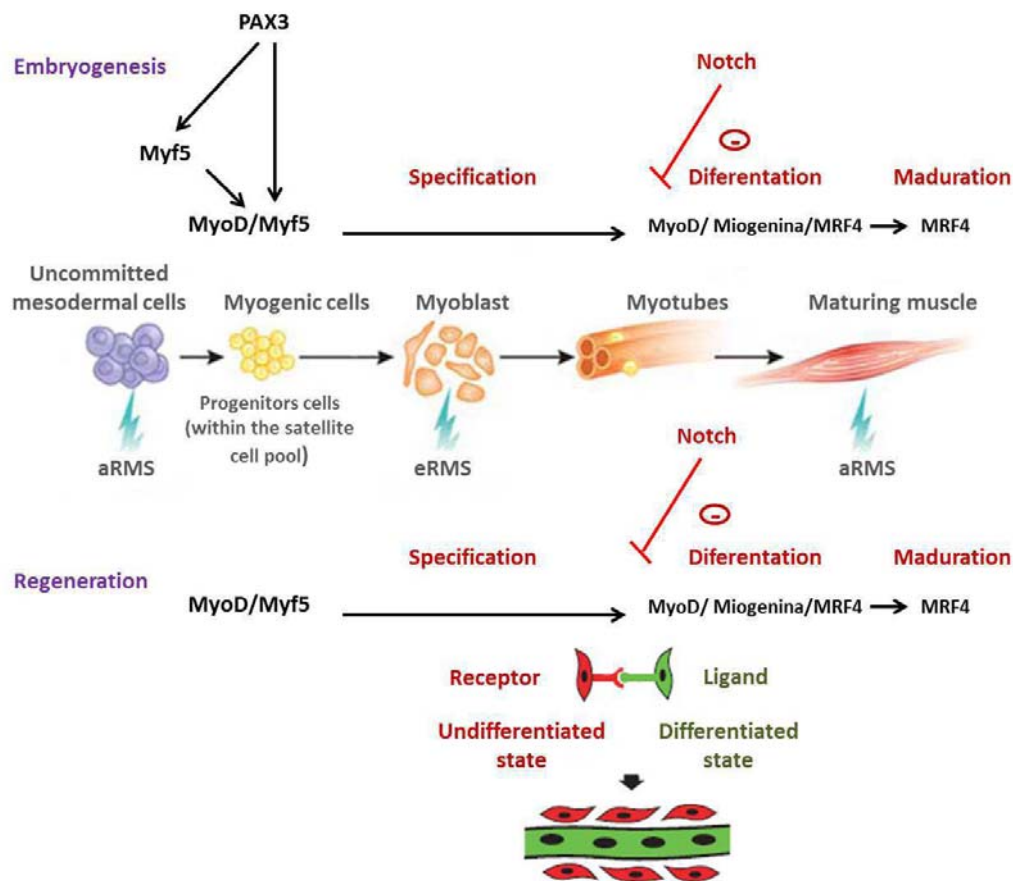


Figura I.9 Implicación de la vía Notch en la miogénesis esquelética. Representación de la expresión de los MRFs durante el desarrollo muscular (embriogénesis y músculo adulto). Pax3 y Myf5 se asocian con la proliferación de mioblastos. Myf5 permanece expresado en mioblastos post-mitóticos, posteriormente se expresa MyoD, seguido de miosina. La vía Notch inhibe la actividad del factor miogénico MyoD. Los mioblastos que expresan el receptor Notch permanecen en un estado indiferenciado, mientras que los mioblastos que expresan los ligandos (Delta y Serrate) siguen su diferenciación. Figura adaptada de Sartolli y Caretti, 2005; y Delfini, M.C. 2000.

Experimentos llevados a cabo por Delfini MC. y colaboradores demostraron que los receptores Notch se expresaban en mioblastos inmaduros, mientras que los ligandos (Delta, Serrate) y el inhibidor de Notch (Numb) se expresaban en los mioblastos postmitóticos o en las fibras musculares (83). Estos resultados sugirieron que el papel de la vía Notch durante la miogénesis podría consistir en el mantenimiento de los mioblastos (positivos para los receptores Notch)

en un estado inmaduro hasta el momento de diferenciarse, cuando cesaría la expresión de los receptores Notch. Por el contrario, los mioblastos postmitóticos, positivos para los ligandos de Notch y Numb, se diferenciarían activando MyoD. Además se observó que MyoD era un regulador positivo de Delta, generando un *feedback* positivo que aumentaba el proceso de diferenciación en células que expresaban los ligandos y Numb (33, 82). Se cree que este mecanismo de regulación de la vía Notch durante la miogénesis esquelética permite la diferenciación del músculo esquelético y el mantenimiento de un pool de células satélite indiferenciadas. Un defecto en la regulación de la vía Notch podría ser la causa del origen del RMS (**Figura I.9**).

El papel oncogénico de la vía Notch

El potencial oncogénico de la vía Notch fue descrito por primera vez en T-ALL a finales de los años ochenta (89). Posteriormente, se describió una expresión aberrante de la vía en otras neoplasias (52), tales como cáncer de ovario (90), mama (91) y más recientemente en tumores sólidos pediátricos. En cuanto a los tumores sólidos pediátricos, la señalización de Notch parece contribuir a la formación de las metástasis (92) y a la capacidad proliferativa de las células tumorales en osteosarcoma (93), a la supervivencia de las células madre cancerosas (CMC) en meduloblastoma (94), a la angiogénesis en neuroblastoma (95) y finalmente a la tumorogénesis del aRMS, inhibiendo la diferenciación y promoviendo la proliferación celular (96, 97).

La actividad de Notch en tumores sólidos se ha visto asociada prácticamente a todos los procesos tumorigénicos, tales como la iniciación y progresión de enfermedades neoplásicas, el mantenimiento del fenotipo maligno y la resistencia a agentes terapéuticos. El papel oncogénico de la vía Notch en este tipo de tumores se ha relacionado con una activación inapropiada de la vía (98). La amplitud de genes regulados por Notch, la interrelación de la vía con otras vías de señalización y la gran cantidad de elementos reguladores de ésta, hacen muy difícil clarificar cuáles son los mecanismos responsables del origen y/o mantenimiento de esta activación aberrante, responsable, en parte, del fenotipo maligno de las células neoplásicas (99). Una de las estrategias más utilizada para dilucidar la implicación de la vía Notch en diferentes células neoplásicas se basa en inhibir la activación de la vía mediante el uso de inhibidores de las enzimas responsables de los cortes proteolíticos, necesarios para la activación de ésta. Actualmente los inhibidores más utilizados son los del complejo de la γ -secretasa (GSI), que inhiben la proteólisis por S3, y los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) ADAM10 y ADAM17, que bloquean la proteólisis de Notch en posición S2. Ambos

inhibidores impiden la generación por proteólisis del NICD, bloqueando así la activación de la vía. Los GSI más comúnmente utilizados son el DAPT, y otros péptido-miméticos estructuralmente muy similares, como el GSI-XXI. Estos péptidos mimetizan a la PSI, responsable del corte proteolítico en la región S3 del receptor Notch, inhibiendo la formación del NICD (100). Los inhibidores de ADAM10/ADAM17 más utilizados son miembros de la familia TIMP, en especial TIMP-3. Los TIMPs son una familia de proteínas que regulan la activación y el corte proteolítico de las metaloproteasas de matriz extracelular (101).

En el curso de este trabajo se ha descrito por primera vez la importancia de la vía Notch en el control de los mecanismos celulares de migración e invasión en células de RMS. Además se ha propuesto el uso de los GSIs como posible terapia complementaria dirigida contra las células de esta neoplasia (35) (véase **Resultados y Discusión**).

1.3 Metástasis: Adhesión, Migración e Invasión Celular

El proceso de metástasis se conoce como la diseminación de células cancerígenas desde el tumor primario hasta órganos distales. Las metástasis suponen la principal causa de mortalidad de los pacientes afectados de cáncer, ya que a menudo es imposible de erradicarlas con éxito (102). Los avances tecnológicos capaces de identificar y rastrear las metástasis han ayudado a perfilar los múltiples procesos que llevan a las células cancerosas de un tumor primario a alcanzar y colonizar órganos distantes (103). Primeramente las células del tumor, debido al crecimiento del tumor primario, requieren de la formación de nuevos vasos sanguíneos para hacer frente a las necesidades nutricionales, mediante un proceso llamado angiogénesis (**Figura I.10**). Para que se lleve a cabo el proceso de diseminación, algunas células del tumor primario deben adquirir la capacidad de separarse de su lugar de origen, adoptar un comportamiento migratorio y secretar enzimas proteolíticas para degradar la matriz extracelular y/o membrana basal (dependiendo del tipo histológico). Estas células cancerosas se pueden diseminar básicamente por vía hematológica, mediante los nuevos capilares formados en el proceso de angiogénesis; o por vía linfática mediante los vasos linfáticos que filtran fluidos del tumor al tejido adyacente. Esta capacidad de las células cancerosas de entrar en los vasos sanguíneos o linfáticos se llama intravasación. Una vez las células cancerígenas se alojan en los capilares de órganos distantes deben atravesar las paredes capilares para acceder a la parénquima del órgano, proceso llamado extravasación. El microentorno del órgano infiltrado es en gran medida hostil para las células cancerosas extravasadas, muchas de las cuales mueren. Aquellas que sobreviven forman micrometástasis que deben adaptarse al nuevo entorno y modificar las células residentes en él para reiniciar el proceso de crecimiento del tumor y formar nuevos focos tumorales, generalmente más agresivos (102, 103) (**Figura I.10**). Aunque en términos generales el proceso de metástasis sigue los múltiples procesos anteriormente mencionados, el patrón de diseminación es distinto en cada tipo de neoplasia. El tipo histológico determina la forma cómo se disemina la enfermedad y el lugar donde se localizan las metástasis. En los sarcomas de partes blandas, a diferencia de lo que ocurre en los carcinomas, la unión entre las células es laxa y ninguna estructura separa el tejido tumoral del sano. No existe un obstáculo entre la célula tumoral y el sistema vascular (104).

La comprensión de los múltiples procesos moleculares que participan en la formación de metástasis, tales como los procesos de adhesión, migración e invasión celular, puede conducir a formas más efectivas de tratar esta enfermedad.

Metastasis process

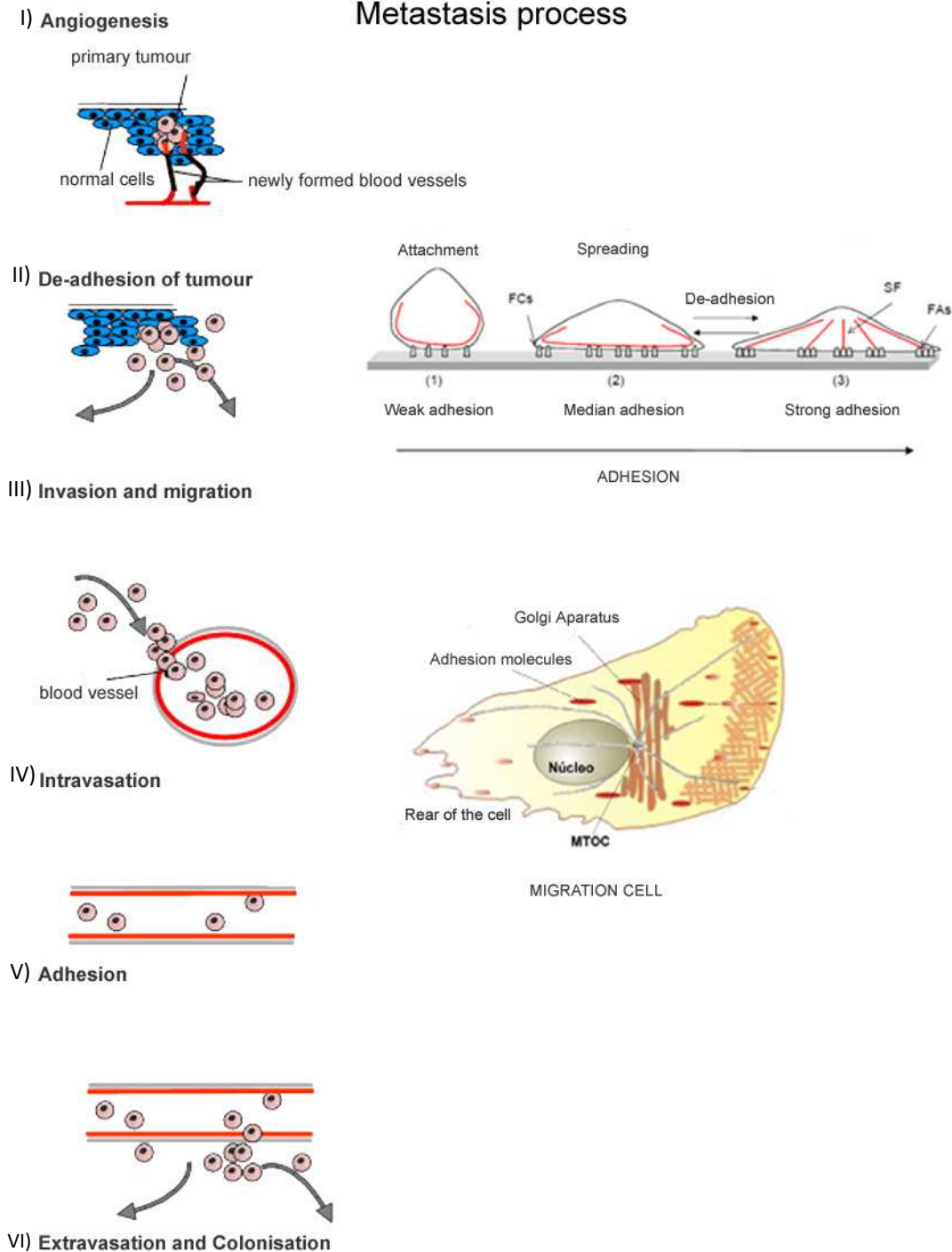


Figura I.10 Proceso de metástasis: adhesión, migración e invasión celular. La cascada metastásica (I) angiogenesis (II) liberación de células tumorales del tumor primario (III) invasión y migración (IV) intravasación (V) adhesión de las células migratorias (VI) invasión hacia el órgano diana y desarrollo del tumor secundario. Se muestra el proceso de adhesión celular, con los tres grados de adhesión. Finalmente, se muestra una célula migratoria donde se observan la polarización de la célula, acompañada de la reorientación de orgánulos como el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos (*microtubule organizing center*, MTOC), que se colocan entre el núcleo y el frente de avance. Figura adaptada de Brooks, S. A. 2008; Greenwood, I. 1998 y Vicente-Manzanares, 2005.

La adhesión celular implica la unión de proteínas transmembrana con un ligando extracelular, y con el citoesqueleto. Las adhesiones célula-ECM, imprescindibles para el proceso de metástasis, son puntos de la superficie celular donde los receptores de adhesión unen las células a la ECM, conectándolas intracelularmente con componentes del citoesqueleto (105). Los contactos célula-ECM tienen como funciones principales: anclar elementos de la ECM a la superficie celular; formar una conexión física constante entre el citoesqueleto y la ECM, necesaria tanto para la adhesión como para la movilidad; y actuar como zonas de actividad localizada de moléculas de señalización. El proceso de adhesión se puede dividir en tres grados o estados diferentes: contacto con el sustrato o adhesión débil (*attachment*), extensión (*spreading*) o adhesión mediana y adhesión fuerte. El proceso es secuencial y el nivel de adhesión pasa de una adhesión débil a una fuerte. La desadhesión, imprescindible también para la migración, se podría describir como el proceso que implica la transición de un estado fuertemente adherido hacia un estado de adhesión intermedia. Se cree que la migración celular depende de la fuerza física de adhesión de la célula al sustrato (106). Se ha descrito que sólo cuando la fuerza de la interacción célula-ECM alcanza el estado intermedio o nivel óptimo se produce el movimiento. Mientras que una adhesión débil no es suficiente para conseguir una tracción necesaria para inducir movimiento celular, una adhesión fuerte limita la generación de esta fuerza de tracción, impidiendo la migración (107) (**Figura I.10**).

Durante la progresión del tumor, las células malignas suelen infraregular proteínas que median la adhesión a la membrana basal y a células vecinas y, al mismo tiempo, promueven la expresión de moléculas de adhesión que facilitan la interacción dinámica con componentes de la ECM promoviendo la formación de metástasis (108-110). Un ejemplo paradigmático de este fenómeno es la transición de las caderinas, frecuentemente observado en la transición epitelio-mesénquima (EMT) de los cánceres epiteliales. Durante esta transición la E-caderina es infra regulada mientras que aumenta la expresión de la N-Caderina, la cual se correlaciona con la adquisición de propiedades metastásicas e invasivas de las células malignas (108). La migración celular es un proceso complejo de gran relevancia tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (111). Podemos entender la migración celular como un fenómeno compuesto por múltiples pasos secuenciales, durante los cuales son precisas la integración y coordinación espacio-temporal de numerosas vías de señalización (111, 112). En primer lugar la célula emite extensiones de membrana hacia el frente de avance, formando estructuras denominadas lamellipodium. Estas protrusiones son estabilizadas mediante adhesiones intermedias a la matriz extracelular. A continuación se produce una translocación de la célula en la dirección de desplazamiento y finalmente tiene lugar una retracción del polo posterior de

la célula con el desensamblaje de las estructuras de adhesión. Durante todo el proceso de migración, la célula sufre una polarización, tanto a nivel morfológico como intracelular. Esta polarización va acompañada de la reorientación de orgánulos, tales como el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC), que se colocan entre el núcleo y el frente de avance (113) (**Figura I.10**).

La invasión tiene lugar cuando ocurren las extravasaciones o intravasaciones a los órganos distales y/o a los vasos sanguíneos/ linfáticos respectivamente, y cuando el tumor secundario sufre la cascada metastásica, invadiendo el tejido sano. Este proceso está muy relacionado con la activación de vías de señalización (114) (**Figura I.10**).

Para que se produzcan los procesos de adhesión, migración e invasión celular se requieren toda una serie de cambios coordinados en el citoesqueleto de actina-miosina, en los sitios de adhesión de la célula al sustrato y en el tráfico de membranas, entre otros eventos (113). En todos estos pasos intervienen numerosas moléculas de señalización, tales como las metaloproteasas que facilitan el desplazamiento celular por medio de la degradación de la matriz; las caderinas, responsables de la unión entre células facilitando la invasión y migración celular a sitios distales; y las integrinas, involucradas en procesos de adhesión a la ECM, migración e invasión celular (108-110). Estas dos últimas moléculas de señalización (caderinas e integrinas) son objeto de estudio de este trabajo.

I.4 N-Caderina

Durante la progresión del tumor, las células malignas suelen infra-regular proteínas que median la adhesión a la membrana basal y a células vecinas y, al mismo tiempo, promueven la expresión de moléculas de adhesión que facilitan la interacción dinámica con componentes de la matriz promoviendo la formación de metástasis (108, 109). Un ejemplo paradigmático de este fenómeno es el cambio de expresión de caderinas, frecuentemente observado en la EMT de las células cancerosas epiteliales (114, 115). Durante esta transición la E-cadherina se infra-regula, produciéndose un aumento en la expresión de la N-Caderina, la cual se correlaciona generalmente con la adquisición de un mayor potencial invasivo y metastásico de las células malignas. Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual el aumento de expresión de la N-Caderina promueve la malignidad, se ha demostrado que la sobreexpresión de ésta promueve la adhesión de las células malignas a células endoteliales o del estroma que expresan N-Caderina, facilitando la invasión y migración de las células tumorales a sitios distales (116-118). Además varios estudios han demostrado que la expresión de N-Caderina es suficiente para promover migración, invasión y metástasis en algunos cánceres, tales como en cáncer de pulmón, de piel y en carcinomas de células escamosas (118-120). Las crecientes evidencias experimentales sobre el papel pro-oncogénico de la N-Caderina, sugieren que esta proteína podría ser una posible diana terapéutica contra el cáncer. ADH-1 (Exherin™) es un pentapéptido cíclico que mimetiza la secuencia natural HAVDV (His-Ala-Val-Asp-Val) de la N-Caderina, inhibiendo su función. Varios autores han demostrado su actividad antitumoral en una gran variedad de modelos murinos, tales como modelos de mama, ovario, colon y pulmón. Se ha observado que ADH-1 ejerce un efecto antitumoral directo mediante el bloqueo de la funcionalidad de la N-Caderina expresada en células tumorales, inhibiendo la invasión e induciendo apoptosis (121).

I.4.1 Estructura y funciones como molécula de adhesión

La N-Caderina (*CDH2*) fue descrita por primera vez en 1982 como una molécula de 130 kDa en la retina neuronal de pollo. Dado que el estudio se llevó a cabo en el sistema nervioso, se le llamó caderina neuronal (122). El gen humano de la *CDH2* se localiza en el cromosoma 18 (18q11.2), y está compuesto por 15 intrones y 16 exones, midiendo aproximadamente 250 Kb (123). Se sintetiza como un polipéptido precursor que requiere de modificaciones postraduccionales para formar una proteína transmembrana madura. Estudios de Whal JK.y colaboradores demostraron que la formación de la N-Caderina madura requiere de una serie

de pasos secuenciales. Primeramente se produce la síntesis del polipéptido precursor en el retículo endoplasmático, donde se une a la catenina p120. Posteriormente el dominio citoplasmático es fosforilado por la quinasa caseína II (CKII), la cual permite la unión de la β -catenina y la subsiguiente unión de la α -catenina con la β -catenina. Una furina proteasa elimina la pro-región, y entonces el complejo se transporta a la membrana plasmática, para efectuar su función (124). El tráfico de la N-Caderina a la membrana plasmática está regulado por la PS1. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la PS1 transporta la N-Caderina, pero se ha observado que cuando se noquea la actividad de ésta, la N-Caderina se encuentra en el aparato de Golgi y en retículo endoplasmático (125).

La *CDH2* forma parte de la familia de las caderinas clásicas tipo I. Su estructura molecular está formada por un gran dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular C-terminal, los cuales son codificados por los exones 4 a 13, 13 al 14 y del 14 al 16 respectivamente (116). El dominio extracelular está compuesto por 5 dominios repetidos en tándem aproximadamente de 110 amino ácidos, llamados *extracellular Cadherin domains* (EC1-5). Estos dominios contienen sitios de unión al calcio, necesarios para que se produzca una adhesión funcional mediante cambios conformacionales (126), y dominios de unión, imprescindibles para la formación de uniones en *cis* y *trans*. A pesar de los diferentes modelos que se han propuesto para explicar las interacciones *cis* entre monómeros de caderinas, la mayoría de estos están de acuerdo en que las regiones EC1 y EC2 son las responsables de estas interacciones. Las uniones *trans* se producen mediante interacción entre los extremos N-terminal de las regiones EC1 de las células vecinas, siendo los dominios EC1 los que determinan la especificidad de las interacciones homotípicas o heterotípicas (uniones con receptores u otras moléculas de adhesión (CAMs) en el mismo tipo o en diferente tipo de célula respectivamente) (127). Está generalmente aceptado que para llevar a cabo la adhesión célula-célula, los monómeros de caderina primero se han de dimerizar en la superficie de la célula donde están expresadas (dimerización *cis*) y entonces interaccionar con dímeros localizados en la superficie de las células vecinas (dimerización *trans*). Aunque, normalmente, la N-Caderina forma interacciones homotípicas homofílicas, también se han descrito interacciones heterotípicas homofílicas o heterofílicas, como veremos más adelante (116). Las uniones que se forman entre los dominios extracelulares de las caderinas son débiles, se requiere que se produzca un agrupamiento lateral de las caderinas para producir una adhesión fuerte. Se ha visto que este agrupamiento es dependiente de la unión del dominio transmembrana, con el citoplasmático y las moléculas de catenina (128). El dominio

transmembrana JMD (*Juxtamembrane domain*) se une a la catenina p120. Todas las isoformas de la catenina p120 contienen diez repeticiones de dominios armadillo responsables de la unión al JMD de las caderinas. El extremo C-terminal de la N-Caderina interactúa con la β -catenina a través de 12 dominios repetidos armadillo, estructuralmente homólogos a los de la catenina p120. β -catenina se une a la α -catenina, la cual interactúa directamente con el citoesqueleto de la actina (128). Estas interacciones de la caderina con las cateninas son imprescindibles para formar complejos fuertemente agrupados de caderinas y así poder ejercer sus funciones como moléculas de adhesión (129).

1.4.2 Señalizaciones de la N-Caderina independientes de adhesión

La actividad de las caderinas ha sido considerada desde hace mucho tiempo como una consecuencia directa de sus propiedades adhesivas. Sin embargo hay procesos fisiológicos y patológicos que reducen o eliminan las propiedades adhesivas de las caderinas, tales como proteólisis, interacciones con otros ligandos, regulación de otras vías, modulación por parte de diversos efectores, pudiendo actuar como vías de señalización independientes a la adhesión para ejercer otro tipo de funciones celulares (**Figura 1.11**). Algunos ejemplos de esta señalización independiente de adhesión son:

N-Caderina y cateninas

La modulación de la unión de la N-Caderina con las cateninas puede afectar la función de ésta, afectando a los procesos de adhesión y migración celular. La asociación de la catenina p120 (p120^{ctn}) con el dominio JMD de la N-Caderina se regula mediante fosforilación. Cuando la p120^{ctn} es fosforilada su unión a la N-Caderina aumenta, incrementando la capacidad adhesiva. Contrariamente, se ha visto que la catenina p120 desfosforilada modula la actividad de las Rho GTPases, inhibiendo la actividad de Rho y activando la actividad de Rac y Cdc42, promoviendo migración en fibroblastos y células CHO. Estos efectos dependen de la concentración de p120^{ctn} libre en el medio y, por tanto, son suprimidos cuando la p120^{ctn} se une a la N-Caderina (130). Un sistema de regulación de la fosforilación de la p120^{ctn} se realiza mediante la proteína quinasa Fer (*Fes-related protein*) (123, 131).

La β -catenina interactúa con la N-Caderina y, a través de la α -catenina, con el citoesqueleto de actina. La asociación entre la β -catenina y la N-Caderina está regulada por la proteína fosfatasa tirosina 1 β (PTP1B), la cual se une al dominio citoplasmático de la N-Caderina, desfosforilando a la β -catenina. La desfosforilación de la β -catenina implica su unión con el dominio citoplasmático de la N-Caderina, aumentando la estabilidad y en última instancia la adhesión celular (132). La proteína Fer también puede modular la unión de la β -catenina a la

N-Caderina fosforilando PTP1B, la cual se une a la N-Caderina aumentando la adhesión celular mediante la unión N-Caderina/ β -catenina (123).

La estructura y función del complejo caderina-catenina se regula mediante fosforilación. En general, se cree que si la fosforilación se produce mediante tirosina quinasas se pierde la estabilidad caderina-catenina, aumentando los niveles de β -catenina en el citoplasma; contrariamente, si la fosforilación se lleva a cabo mediante proteínas tirosina fosfatasa (PTPasas) se estabiliza el complejo caderina-catenina, aumentando la capacidad adhesiva de las células (133). Un ejemplo paradigmático de este hecho es la implicación de la proteína Fer como moduladora de la interacción N-Caderina- β^{ctn} (132, 134).

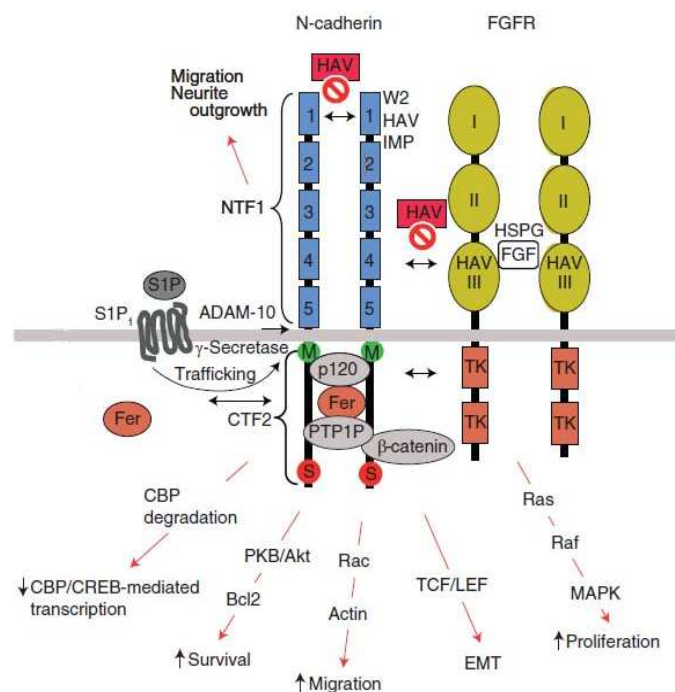


Figura I.11 Mecanismos de regulación de la N-Caderina en cáncer. La N-Caderina puede promover la supervivencia celular, la migración, la invasión, la proliferación y la EMT mediante el reclutamiento o la interacción con diferentes moléculas de señalización. La modulación del estado fosforilado de las cateninas regula su unión a la N-Caderina y a otras moléculas efectoras, contribuyendo a la vía de señalización de la N-Caderina. La interacción de la CDH2 con otras proteínas de membrana (como integrinas, S1P1, ADAM-10, γ -secretasa y FGFR) también activa cascadas de señalización que regulan la transcripción y contribuyen a la proliferación, invasión y adhesión celular. Figura adaptada de Mariotti, A. 2007.

N-Caderina y las Rho-GTPasas

Varios estudios han mostrado que la actividad de las Rho-GTPasas está regulada por las interacciones homofílicas de las caderinas durante la formación de los contactos celulares. Lambert M. y colaboradores demostraron que la unión de la N-Caderina con su propio dominio extracelular inducía migración celular, mediante la activación de Rac (135, 136) (**Figura I.11**). Contrariamente, Charrasse y colaboradores mostraron que las uniones homofílicas de la N-

Caderina durante la formación de los contactos celulares en células mioblásticas, infraregulaban la actividad de Rac1 y Cdc42, aumentando la actividad de RhoA (137). Estos resultados contrapuestos, ponen en evidencia que la regulación de las Rho-GTPasas mediante la N-Caderina es dependiente del tipo y del contexto celular.

Interacción con la vía de señalización FGFR

Varios estudios han demostrado una cooperación funcional entre el receptor FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*) y la N-Caderina. William EJ. y colaboradores describieron por primera vez una interacción directa de la secuencia HAV (His-Al-Val) presente en FGFR con el dominio EC4 de la N-Caderina en células neuronales (138). La interrelación de estas dos proteínas también fue descrita en células de cáncer de mama, donde demostraron que el potencial pro-invasivo de la N-Caderina se incrementaba mediante la estimulación del receptor FGFR-2 (139). Posteriormente se demostró que la N-Caderina se asociaba con el receptor FGFR en algunas líneas celulares cancerígenas. Como consecuencia de esta asociación, el receptor FGFR no era capaz de internalizarse, lo que provocaba la activación constitutiva la vía de las MAPK-ERK, aumentando la expresión de MMP-9 (*Matrix metalloproteínases 9*) y, por consiguiente, la invasión y migración celular (140) (**Figura I.11**).

Regulación de otras vías de señalización

Múltiples estudios han demostrado que la N-Caderina juega un papel importante en la supervivencia celular. Li G. y Tran NL. y colaboradores demostraron que la agregación dependiente de N-Caderina en células cancerosas aumentaba la supervivencia a través de la activación de la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt, en cáncer de próstata y melanoma. Se describió que mientras en cáncer de próstata la activación de Akt provocaba la inactivación de las funciones proapoptóticas de Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) y el aumento de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (141), en células de melanoma la activación de Akt implicaba la estabilización de la unión β -catenina-N-Caderina, promoviendo supervivencia celular (142).

Además de estar involucrada en procesos de supervivencia celular, la N-Caderina se ha visto implicada en procesos de movilidad celular en varios tipos celulares. Kim JB. y colaboradores demostraron que una molécula quimérica de E-caderina que contenía el dominio EC4 de la N-Caderina era capaz de inducir la EMT en células epiteliales escamosas e inducir movilidad en células malignas. Demostraron que el bloqueo de la función del dominio EC4 de la N-Caderina inhibía la movilidad pero no la adhesión celular, indicando que adhesión y movilidad son dos propiedades independientes (143). Fedor-Chaiken M. y colaboradores identificaron una

secuencia en el dominio citoplasmático de la N-Caderina que suprimía la movilidad en células tumorales de mama, llamado dominio S (*suppression motility*); y una secuencia en el dominio JMD que promovía la movilidad, reprimiendo la función del dominio S, llamado dominio M (*modulation of movement*). Este estudio sugirió que la modulación de las vías de señalización implicadas en la migración celular podían estar reguladas por la unión citoplasmática de diversos efectores (aún por conocer) con los dominios M y S (144) (**Figura I.11**).

Proteólisis de la N-Caderina

Existen evidencias que la N-Caderina, en ciertas condiciones (de disociación de interacciones célula-célula, de invasión, migración...etc.), es sometida a dos proteólisis sucesivas generando dos fragmentos biológicamente activos (un fragmento que corresponde a la región extracelular de la molécula y un fragmento citoplasmático). La escisión del fragmento intracelular requiere del desprendimiento previo del dominio extracelular. La primera proteólisis que sufre la N-Caderina se produce en el dominio EC5 de la región extracelular. Esta proteólisis está mediada por una desintegrina y la metaloproteasa ADAM10, las cuales generan la liberación del fragmento N-Terminal (NTF) de 95 KDa al medio extracelular, dejando expuesto para la siguiente proteólisis un fragmento C-terminal (CTF1) de 40 KDa en la membrana citoplasmática. CTF1 se convierte en sustrato para el complejo de la γ -secretasa generando un fragmento citoplasmático (CTF2) de aproximadamente 35 KDa, dejando sólo un pequeño fragmento transmembrana en la superficie celular (123).

La proteólisis de la N-Caderina tiene diversas consecuencias en el comportamiento celular. Su inhibición, a través del bloqueo de la función de ADAM10, aumenta la localización de la N-Caderina en las uniones célula-célula y promueve la asociación con la β -catenina, aumentando su capacidad adhesiva (145). Se ha descrito la implicación funcional del fragmento NTF de 95 KDa como molécula de adhesión en el desarrollo de la retina neuronal en el embrión de pollo (146). El fragmento CTF2 se ha visto implicado en la regulación de la transcripción de varios genes, tal como la proteína de unión CREB (*cAMP response element binding*), reguladora de procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis celular (147) (**Figura I.11**).

I.4.3 Implicación de la vía Notch en la regulación de la N-Caderina

Uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido demostrar que existe una correlación entre la activación de la vía Notch y los mecanismos que controlan la movilidad e invasividad mediante la regulación de varias moléculas de adhesión, tal como la N-Caderina, en células de RMS. Estudios previos han demostrado una correlación entre la vía Notch y la N-Caderina en varios tipos celulares. Liu ZJ y Wang describieron que las vías de señalización de Notch1 y

Notch3 promovían una sobrerregulación en la expresión de la N-Caderina en melanoma y en células del músculo liso arterial respectivamente (148, 149). Los experimentos de Liu ZJ. y colaboradores sugirieron que la oncogenicidad de la activación de la vía de señalización de Notch1 se debía, en parte, al incremento de la expresión de la N-Caderina, la cual regulaba la activación de las vías de señalización MAPK y PI3K-AKT (148). Wang T. y colaboradores propusieron que la activación de la vía a través de la activación de Notch3 promovía cambios en la proliferación y supervivencia celular debidos, en parte, al aumento de expresión de la N-Caderina (149).

I.4.4 Evidencias de la implicación de la N-Caderina en RMS

A pesar de que varios trabajos han demostrado que la expresión de la N-Caderina es suficiente para promover metástasis en algunos cánceres (119-120) y se ha descrito una expresión aberrante de la N-Caderina en RMS (150), no existen publicaciones anteriores que hayan mostrado el papel pro-invasivo de la N-Caderina en células de RMS.

Nuestra hipótesis de partida, teniendo en cuenta la implicación de la N-Caderina en la miogénesis (véase **El papel de la N-Caderina en la miogénesis**) y en la oncogenicidad de células tumorales, fue que la N-Caderina podría tener un papel importante en el mantenimiento del estado inmaduro muscular e invasivo característico del RMS y que el mecanismo de inducción de ésta podría estar regulado por la vía Notch.

El papel de la N-Caderina en la miogénesis

La miogénesis esquelética en el embrión se desarrolla siguiendo un proceso muy ordenado de pasos secuenciales que incluye la especificación, la migración y la diferenciación a fibras musculares. Este proceso de múltiples pasos está estrechamente regulado tanto espacial como temporalmente. Una de los mecanismos de regulación de este proceso es a través de la coordinación de la adhesión célula-célula y, por consiguiente de la activación de las vías de señalización resultantes. Se han identificado varias moléculas que actúan como mediadoras de los efectos pro-miogénicos derivados del contacto célula-célula, tales como factores de crecimiento, las inmunoglobulinas y las caderinas (151).

La variedad de eventos celulares que ocurren durante la miogénesis esquelética requieren de la adhesión dependiente de caderinas. Éstas se han visto involucradas en muchos pasos de la miogénesis, tales como la determinación temprana de las células del dermomiótomo, la migración de los mioblastos, la proliferación celular y la diferenciación morfológica. El músculo esquelético en desarrollo expresa las caderinas N, M, R, y 11. Estas caderinas están reguladas espacial-temporalmente durante las diferentes fases del proceso de la miogénesis. Aunque se

desconoce qué función ejercen cada una de ellas durante este proceso, existen varios estudios que intentan clarificar su implicación en el desarrollo del músculo esquelético. Estudios recientes han demostrado que la caderina-M está implicada en los eventos de diferenciación tardía, que incluyen la diferenciación terminal de los mioblastos y la fusión de estos para formar miotubos. La caderina-11 se expresa débilmente en el músculo en desarrollo y se encuentra esencialmente en células mesenquimales. La caderina-R se detecta en los somitas y se localiza en los contactos célula-célula de los mioblastos primarios durante la primera fase de la miogénesis (152). Finalmente, la N-Caderina se expresa en los somitas, en el miotomo y en los músculos embrionarios y su expresión cesa en el proceso de miogénesis tardía (137, 152). Su principal función durante la miogénesis es la de inducir la terminación del ciclo celular y promover la diferenciación de los mioblastos, mediante la regulación de RhoA y Rac1. Estos resultados sugieren que la activación de la N-Caderina tiene lugar durante la diferenciación temprana de los mioblastos posmitóticos durante el proceso de la miogénesis sin aberraciones. Durante este proceso, la N-Caderina regula negativamente la actividad de Rac1 y Cdc42Hs, los cuales inducen proliferación impidiendo la terminación del ciclo celular; y activa RhoA, la cual regula positivamente la expresión de MyoD y por consiguiente la diferenciación temprana de células musculares (137).

A pesar de que se haya descrito la implicación de la N-Caderina en la miogénesis temprana, resulta difícil clarificar cuál es el papel exacto de esta molécula en este proceso debido, principalmente, a su multifuncionalidad como molécula de adhesión y de señalización. Probablemente su implicación en las diferentes etapas de este proceso sea cambiante y dependiente del contexto celular, hecho que dificulta aún más el estudio de esta molécula.

1.5 Integrina- α 9

El papel de las integrinas en la migración y la invasión celular es una de las funciones más estudiadas en la biología tumoral. La interacción de las integrinas con componentes de la ECM proporciona la tracción necesaria para iniciar la movilidad e invasión celular. Además de sus efectos pro-invasivos, las integrinas también pueden regular la proliferación, la supervivencia y la angiogénesis (153). El heterodímero α 9 β 1 se ha visto implicado en varios procesos de interacción dinámica entre células y componentes de la ECM, tales como re-epitelización durante el cierre de una herida cutánea (154), adhesión celular en meduloblastoma o en células progenitoras hematopoyéticas (155, 156) y, finalmente, en la migración celular de células neoplásicas y no neoplásicas (155, 157).

Los recientes avances sobre el conocimiento del papel pro-oncogénico de las integrinas en varios cánceres humanos, ha hecho relevante la búsqueda de terapias basadas en el bloqueo de la actividad de éstas. Existen ensayos clínicos de fase II para las integrinas α 5 β 3 y α 5 β 5 que han demostrado tener una efectividad clínica remarcable (109). Sin embargo, vale la pena señalar que debido a la redundancia en la expresión y función de las integrinas, la inhibición de una única integrina puede resultar en un efecto clínico poco relevante, y que es necesario enfocar las terapias basadas en el bloqueo de varias de ellas. La Integrina- α 9 no sólo tiene un papel relevante en la biología del tumor aisladamente, sino que también tiene un papel remarcable en la modulación de ciertos factores de crecimiento, representando una potencial nueva diana farmacoterapéutica (158).

1.5.1 Introducción

El término integrina fue utilizado por primera vez por Hynes, R.O en un artículo de revisión en 1987 para describir una familia de receptores heterodiméricos que “integraban” el citoesqueleto celular con componentes de la ECM (159). Actualmente se sabe que las integrinas son moléculas de adhesión que actúan como receptores conectando el citoesqueleto de la célula con proteínas de la ECM o con otros receptores de células vecinas o “counter-receptors”, generalmente miembros de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig). Son proteínas heterodiméricas formadas por una subunidad α y una subunidad β . Ambas subunidades son proteínas transmembrana tipo I con una pequeña extensión citoplasmática que pueden unirse de forma no covalente para formar más de 24 heterodímeros diferentes. Actualmente, en mamíferos, se conocen 24 subunidades α y 9 subunidades β y es la composición $\alpha\beta$ la que determina la especificidad de unión a sus ligandos (160, 161). Generalmente, se asocian muchas subunidades α (excepto α 4, α 6 y α V que se asocian

aleatoriamente) con un solo tipo de subunidad β , generando las distintas subfamilias β integrinas, siendo las más conocidas las $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ integrinas (162). La diversidad de las integrinas se ve ampliada por la maduración por corte y unión (*splicing* alternativo), por las modificaciones postraduccionales tales como glicosilación y corte de algunas subunidades α , y por las interacciones con otras moléculas (161, 163).

Existen diversos tipos de ligandos, incluyendo proteínas de la ECM, proteínas del plasma (fibrinógeno y moléculas de la activación del complemento), y proteínas de membrana integrales. Muchas integrinas se unen a más de un ligando y más de uno de estos ligandos se une a más de una integrina, usando el mismo o distinto sitio de reconocimiento (161). El primer sitio de unión identificado molecularmente fue la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp). Esta secuencia se ha encontrado en moléculas de la ECM, proteínas víricas, toxina y factores de crecimiento. Sin embargo, muchas integrinas no reconocen la secuencia RGD y se unen a otras secuencias de unión (156), como por ejemplo las secuencias EILDV (Glu-Ile-Leu-Asp-Val) y REDV (Arg-Glu-Asp-Val) que se encuentran en proteínas de la ECM y son reconocidas por la $\alpha 4\beta 1$ (153).

La Integrina- $\alpha 9$ forma parte de la subfamilia de las integrinas $\beta 1$. Guarda una estrecha similitud estructural con la $\alpha 4\beta 1$, por lo que algunos autores consideran ambas integrinas como una única subfamilia (158). Está altamente expresada en epitelio, la membrana basal del epitelio escamoso, en músculo liso y esquelético, así como en hepatocitos (164) y en diversos tipos de células neoplásicas (165, 166). Comparada con las otras integrinas, la Integrina- $\alpha 9$ se caracteriza por tener una implicación notable en procesos de migración celular (166). Existe una descripción detallada de algunos de sus ligandos, sin embargo se desconoce con exactitud cuáles son los mecanismos moleculares responsables de su funcionalidad. Algunos de los ligandos de la Integrina- $\alpha 9$ descritos hasta el momento son la osteoponina, VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein-1*), la tenascina-C, ADAMs y VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (167, 168).

I.5.2 Estructura de la Integrina- $\alpha 9$

La Integrina- $\alpha 9$, al igual que el resto de integrinas, es una glicoproteína transmembrana heterodimérica formada por una subunidad α y una subunidad β . Las subunidades α y β son totalmente distintas, sin una homología estructural aparente entre ellas. Sin embargo, ambas subunidades constan de un dominio extracelular N-terminal, de una región transmembrana y de un dominio citoplasmático corto.

Las subunidades α de las integrinas son homólogas entre ellas. En su extremo amino-terminal tienen siete repeticiones de aproximadamente 60 aminoácidos que adoptan una estructura terciaria de hoja β . Es en esta zona donde se ha identificado los residuos de interacción con los ligandos (**Figura I.12**). Los sitios de unión a cationes se encuentran en la superficie inferior de las hojas β (161). En general, estos cationes divalentes pueden actuar como efectores (promoviendo la unión a ligandos), como antagonistas (inhibiendo la unión del ligando) y como selectores (cambiando la especificidad de la unión del ligando) (165). La subunidad $\alpha 4$ y $\alpha 9$ son los únicos miembros del grupo de las subunidades α -integrinas que poseen tres sitios de unión a cationes divalentes (168). Los dominios citoplasmáticos de las subunidades α son cortos, entre 15 y 77 aminoácidos, y en general, no están muy relacionados por su secuencia, aunque están bien conservados filogenéticamente (169). Sin embargo, un motivo de secuencia próximo a la membrana, GFFKR (Gly-Phe-Phe-Lys-Arg), está conservado entre todos los dominios citoplasmáticos y participa en la regulación del reconocimiento del ligando y en la asociación entre las subunidades α y β (169, 170).

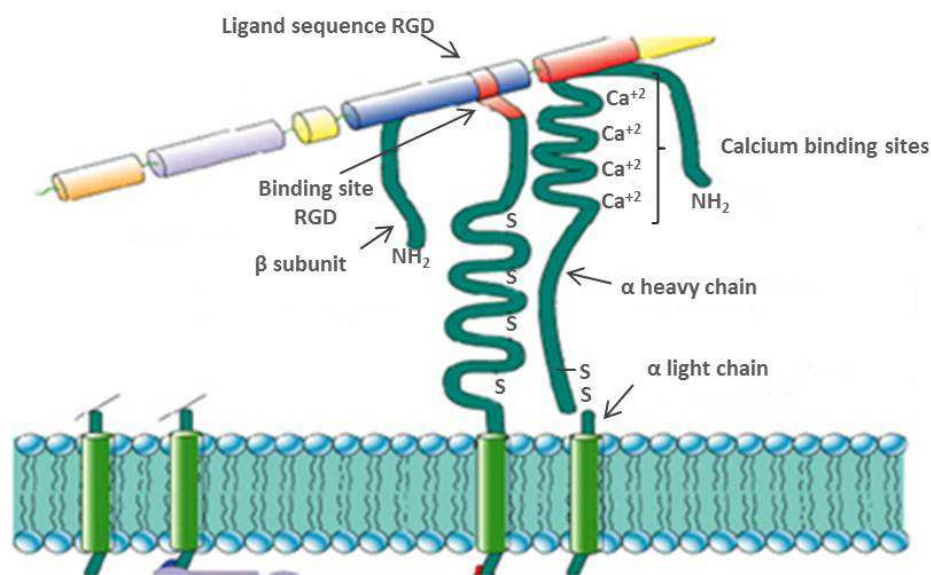


Figura I.12 Esquema general de la estructura de una integrina. Las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas formadas por una subunidad α y una subunidad β .

La comparación entre secuencias de subunidades β de distintas especies pone de manifiesto que se trata de estructuras proteicas altamente conservadas que comparten una estructura básica: un dominio extracelular largo, de 675-700 aminoácidos, un único dominio transmembranario hidrofóbico y un dominio corto citoplasmático variable en longitud, de entre 40-60 aminoácidos. La región N-terminal de las subunidades β contiene una región

altamente conserva de 250 aminoácidos, crítica para el reconocimiento del ligando. Es una zona con un elevado contenido en puentes disulfuro, por eso se presentan en una estructura doblada muy compacta que confiere a las integrinas una relativa resistencia a la proteólisis. Además todas las subunidades β presentan un segmento de cuatro repeticiones rico en cisteínas muy similar a los dominios *EGF-like* (171). Una característica específica de la subunidad $\beta 1$ es que una parte del dominio intracelular o citoplasmático establece el anclaje de la integrina en la célula a través de la interacción con proteínas citoplasmáticas como la vinculina y la talina (172). Además contiene un motivo altamente conservado próximo a la membrana, KLLxxxHDR (Lys-Leu-Leu-x-x-x-His-Asp-Arg), que participa en la regulación del reconocimiento del ligando (161).

I.5.3 Integrinas y vías de señalización

Las integrinas fueron identificadas originalmente por sus propiedades adhesivas, sin embargo, múltiples evidencias han puesto de manifiesto que también actúan como receptores de señalización (173). La función de las integrinas está altamente regulada y contribuye en actividades celulares tan complejas como la migración, la supervivencia y la muerte celular. Todo ello supone un papel decisivo de las integrinas tanto en procesos biológicos normales como en procesos patológicos, entre los que se incluyen la homeostasis, inflamación, respuesta inmune, maduración celular, crecimiento, desarrollo embriológico y metástasis tumorales (174, 175).

Las integrinas desarrollan funciones bidireccionales en la transducción de señal a través de la membrana plasmática. Es decir, pueden transmitir información desde dentro de la célula hasta el medio extracelular (*inside-out signaling*) o desde fuera hasta dentro de la célula (*outside-in signaling*). Se desconocen los mecanismos exactos de ambos procesos, pero se cree que existe una regulación general en todos los tipos de integrinas (161).

Señalización *inside-out*

Se conoce como señalización *inside-out* de las integrinas al proceso utilizado por las células para regular la interacción integrina-ligando y por lo tanto su actividad. Los cambios en la actividad de las integrinas pueden ser explicados por dos mecanismos principales: cambios en la avidéz y en la afinidad.

Los cambios en la avidéz de las integrinas tienen como resultado una redistribución de las integrinas en la membrana plasmática que, normalmente, resultan en la agregación de las integrinas en los lugares de unión a sus ligandos, formando estructuras especializadas llamadas adhesiones focales (FAs). Las FAs son estructuras planas y alargadas que se encuentran en la

periferia, caracterizadas por la presencia de proteínas tales como la vinculina, la talina, la paxilina...etc. Su función principal es adherir fuertemente la célula al substrato y anclar haces de filamentos de actina a la ECM. Esta agregación de las integrinas permite interacciones multivalentes con los ligandos y facilita la unión a nuevos ligandos, consiguiendo adhesiones con una elevada fuerza de tensión (169, 176).

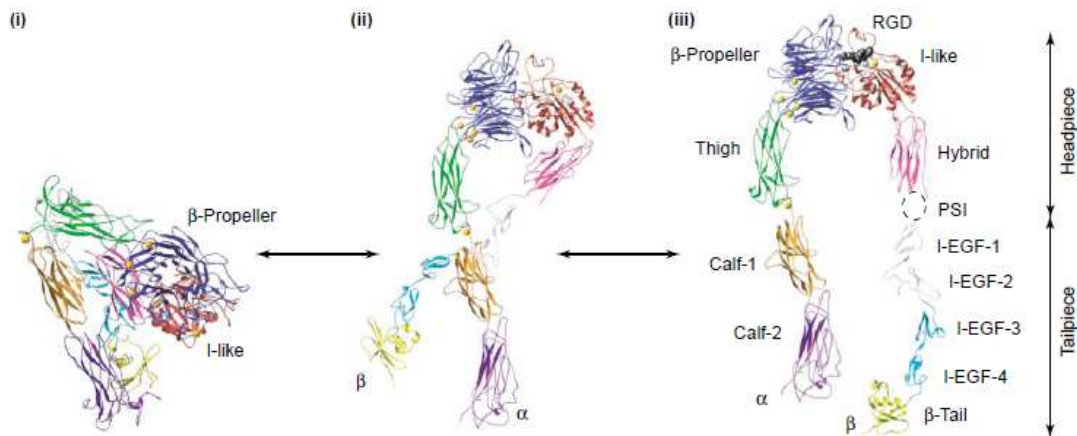


Figura I.13 Cambios conformacionales de las integrinas relacionados con la regulación de la afinidad al ligando. Modelo de regulación del estado de afinidad de las integrinas, en el que se observa la transición desde un estado de baja afinidad o conformación “plegada” (I) a un estado de alta afinidad o conformación “extendida” (III), pasando por una etapa de afinidad intermedia (II). Figura adaptada de Carman, 2003.

Aunque el mecanismo no es del todo conocido, existen algunas evidencias que describen esta modulación por afeidez. Se cree que fenómenos de fosforilación, la implicación del metabolismo fosfolipídico y el canje de GTP-GDP están relacionados con un aumento de la afeidez de las integrinas (177). Los cambios en la actividad de las integrinas también se pueden dar a través de cambios individuales en la afinidad intrínseca de la propia integrina. En algunas circunstancias, las integrinas se encuentran en la superficie de la célula de forma inactiva. Esta forma no se une al ligando de una forma eficiente, formando lo que es conocido como “estado de baja afinidad”. Cuando las integrinas se encuentran en este estado, las colas citoplasmáticas de las dos subunidades α y β están interaccionando entre sí. Esto provoca que los dominios extracelulares se encuentren replegados, con una topología de V invertida que bloquea la unión con el ligando. Por el contrario, cuando se produce la separación de las colas α y β por acción de ciertas proteínas citoplasmáticas, los dominios extracelulares se despliegan y las integrinas adoptan una conformación activa, en la que se favorece la interacción con el ligando (**Figura I.13**) (178). La modulación de la afinidad es dependiente de la energía, es específica

según el tipo celular y se cree que se propaga desde el dominio citoplasmático al dominio extracelular de la integrina (179).

La activación de las integrinas es importante pero también lo es la supresión de su función adhesiva para muchos procesos celulares. Un ejemplo sería el caso de migración celular, donde las células reparten ciclos de adhesión y desadhesión para desplazarse de un lugar a otro (180).

Señalización *outside-in*: transducción de señal

En varias ocasiones se ha observado que la supervivencia de muchos tipos celulares es dependiente tanto de la presencia de factores solubles en el medio como de la adhesión celular. Específicamente se ha demostrado que en varios sistemas celulares la adhesión célula-ECM mediada por integrinas es necesaria para la supervivencia y proliferación y en ausencia de una correcta señalización *outside-in* las células entran en apoptosis (181). Además, se ha observado que cuando la proliferación celular y la apoptosis van desapareadas de los procesos de adhesión se producen situaciones patológicas, considerándose la proliferación celular independiente de la adhesión célula-ECM un signo de transformación maligna. En estos procesos de transformación, las vías de señalización que están debajo de las integrinas podrían estar constitutivamente activadas (182).

Las integrinas poseen una región intracitoplásmica relativamente corta que por sí misma no genera señales de activación. Sin embargo, la interacción de las integrinas con sus ligandos o la presencia de factores solubles en el medio provocan la generación de señales de gran importancia para ciertos procesos fisiológicos, tales como la diferenciación, movilidad y proliferación celular. La interacción de las integrinas con sus ligandos o la estimulación de varios factores solubles en el medio producen una reacción en cadena de activación de varias moléculas que acaban induciendo diferentes vías de señalización. Las integrinas muestran una localización preferencial en ciertas regiones de la membrana, las FAs. En estos sitios, la porción intracelular de las integrinas se asocia con las proteínas talina y actina, las cuales a su vez interaccionan con otros componentes del citoesqueleto tales como vinculina, paxilina, tensina y actina. A estos complejos de adhesión focal se asocian también diversas proteínas intracelulares involucradas en la generación de señales de activación tales como la cinasa de adhesiones focales (FAK) y la proteína tirosina cinasa Src. La activación de estas enzimas induce a su vez la activación de otras enzimas (fosfolipasa C, MAP cinasa), lo que finalmente resulta en fenómenos tales como la reorganización del citoesqueleto o la inducción de la expresión de

diversos genes implicados en diversos procesos celulares, tales como migración e invasión celular (161).

La vía de señalización común de las integrinas: Las FAK/Src

La cinasa de las adhesiones focales (pp125^{FAK} o FAK) es una de las proteínas tirosina-cinasa implicada en las principales vías de señalización mediada por integrinas, la cual está íntimamente relacionada con la función de las FAs, con el ensamblaje del citoesqueleto y con la movilidad celular (183).

Un modelo de activación de las FAK, sugiere que serían la talina y la paxilina quien reclutaría a FAK en las FCs. Esto induciría un cambio conformacional de la FAK, permitiendo su interacción con los dominios citoplasmáticos de las subunidades β de las integrinas (familias β_1 , β_2 y β_3), quedando expuesto su sitio catalítico (184). Contrariamente de lo que pasa con otras quinasas citoplasmáticas, la FAK no contiene dominios SH2 y SH3, pero contiene fosfotirosinas y regiones ricas en prolina que se pueden unir a los dominios SH2 y SH3 de otras proteínas. El principal lugar de fosforilación de las FAK es la Tyr397, la cual crea un sitio de unión para el dominio SH2 de miembros de la familia de las quinasas Src (*SFKs*).

Las dos principales dianas de los *SFKs* en las FAs son p130Cas y paxilina, las cuales activan varias vías de señalización de las GTPasas, como la vía de señalización Rac-GTPasa, Rho-GTPasas, Rab-GTPasas. La actividad Rac-GTPasa permite la formación del lamellipodium en células migratorias y activa, a su vez, las vías de señalización ERK y JNK, promoviendo migración e invasión celular. Ambas vías promueven un aumento en la transcripción de genes que codifican para proteínas que aumentan la segregación de la MMP-2, la MMP-9 y la uPA (*urokinasa plasminogen activator*), facilitando la degradación de la matriz imprescindible para la invasión celular (185). Rho-GTPasa está involucrada en la formación de fibras y en el establecimiento de adhesiones focales (186) y activa también la vía de señalización ERK. Las Rab-GTPasas se han relacionado con el reciclaje de las integrinas (187, 188) (**Figura I.14**).

Vía de señalización específica de la Integrina- α_9

Se ha propuesto que la integrina $\alpha_9\beta_1$ regula la actividad de varias vías de señalización que son iniciadas mediante la actividad de la tirosina quinasa Src independiente de FAK. Se ha demostrado que Src puede interactuar directamente con la cola citoplasmática de la subunidad α_9 , y reclutar otras proteínas de señalización para inducir la migración celular (158). Src activa p130Cas y iNOs (*Inducible NOs*), con la subsiguiente activación de Rac-1, la cual permite la formación del lamellipodium en células migratorias, y la producción de NOs (*Nitric oxide synthases*) respectivamente (189). iNOs es una proteína citoplasmática que genera NOs,

un subproducto del catabolismo de la L-arginina que consiste en un radical libre gaseoso que puede mediar diversos procesos biológicos. Puede actuar como cofactor de la GC (*Guanylyl cyclase*) para promover la síntesis de un segundo mensajero cGMP (*Cycling guanosine monophosphate*), el cual regula la migración celular de una manera dependiente o independiente de PKG (*Protein kinase G*). Además puede regular la expresión de MMP-2, MMP9, dependiente o independientemente de cGMP (158).

Aunque para la integrina $\alpha9\beta1$ no se requiera FAK para promover la migración, se cree que esta puede contribuir en la amplificación de los efectos biológicos producidos por Src (158, 185). Esta activación de la integrina y subsecuente cascada de señalización es específica del tipo celular y puede deberse a la unión intracelular de proteínas adaptadoras (*inside-out activation*) o a la unión de un complejo de ligandos extracelulares (*outside-in activation*) (Figura I.14).

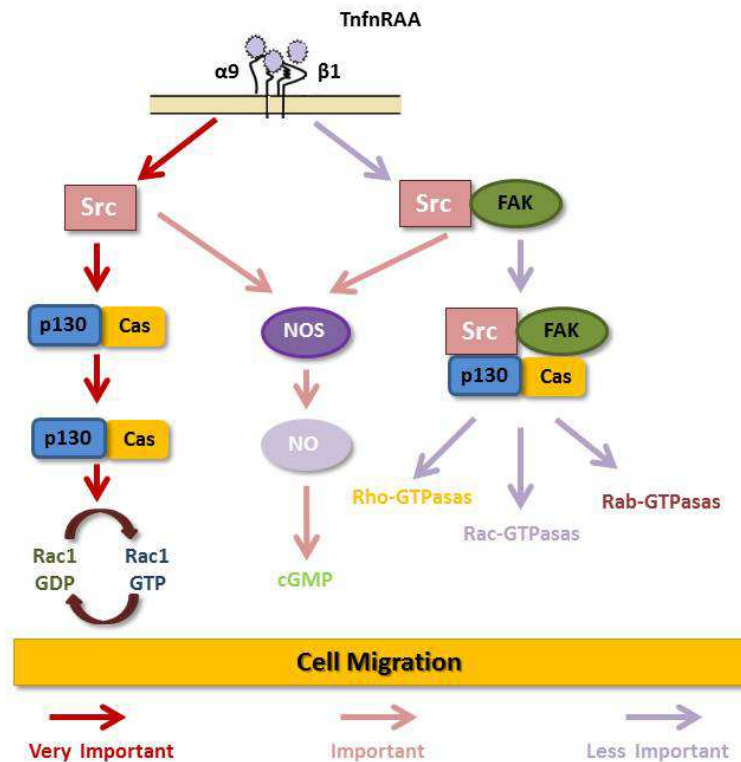


Figura I.14 Mecanismo propuesto de la implicación de la $\alpha9\beta1$ en la migración celular. A la derecha se ilustra la vía común de todas las integrinas mediante la actividad FAK-Src. Este complejo recluta p130Cas-Crk, promoviendo la actividad Rac-GTPasa, Rho-GTPasa y Rab-GTPasa, entre otras. A la izquierda se muestra el mecanismo principal de actuación de la $\alpha9\beta1$ mediado por Rac-GTPs regulado por Src. Finalmente se muestra la implicación de NOS también regulado, de manera independiente a FAK, por Src. Figura adaptada de Gutpa, S.K. 2009 y Mitra, S.K. 2006.

I.5.4 Internalización de las Integrinas

La internalización de las integrinas se ha relacionado con algunos fenómenos como la migración celular (190) y la eliminación y reorganización de los componentes de la ECM (191). Durante la migración celular, se requieren mecanismos eficientes para liberar las adhesiones de la parte posterior de la célula y formar nuevas adhesiones en el frente de avance. Las integrinas se pueden transportar por la membrana celular o por el citoplasma mediante vesículas, de forma individual o formando agregados entre ellas. El borde de la célula, particularmente la parte posterior, es el locus donde los agregados adhesivos tienden a desadherirse. Una vez allí, las integrinas se liberan y dispersan para ser utilizadas para formar nuevas adhesiones en la parte frontal de la célula, o, alternativamente, permanecen agregadas moviéndose a lo largo de la membrana celular hasta llegar al frente de la célula y formar nuevas adhesiones. Una fracción de integrinas provenientes de la parte posterior de la célula son internalizadas en vesículas endocíticas que se acumulan en la región perinuclear donde se eliminan. Para mantener unos niveles adecuados de integrinas se requiere de un mecanismo de reposición. Este mecanismo se basa en la biosíntesis de nuevas moléculas de integrinas, sin embargo se desconoce el modo cómo se produce este proceso de reciclaje (190, 192, 193) (Figura I.15).

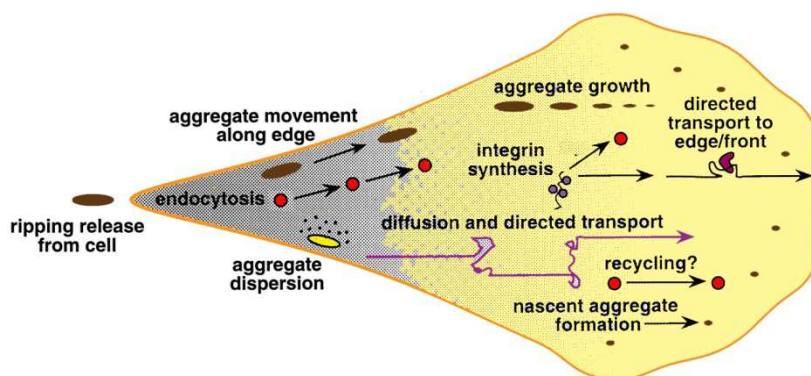


Figura I.15 Representación de la dinámica de las integrinas en la migración celular. Las integrinas recicladas tienen que internalizarse por la membrana plasmática y transportarse a lo largo de la célula hasta llegar al frente de acción. Una vez allí, forman adhesiones con el sustrato e inician la activación de diversas vías de señalización. Durante este proceso se pierden algunas integrinas, siendo necesaria la biosíntesis *de novo* y así mantener niveles óptimos capaces de promover la migración celular. Figura adaptada de Lauffenburger y Horwitz, 1996.

Algunos estudios han demostrado que el ciclo endo-exocítico de las integrinas es necesario durante la migración. Las integrinas hacen este ciclo aproximadamente cada 15-40 minutos, lo

que equivaldría a que la superficie entera de una célula migratoria es endocitada cada 50 minutos por término medio (193).

I.5.5 Implicación de la vía Notch en la regulación de la Integrina- α 9

Estudios previos indican un importante paralelismo entre los procesos de desarrollo controlados por Notch y la adhesión mediada por integrinas. Las integrinas son esenciales para la embriogénesis y se han visto involucradas en procesos dependientes de Notch tales como adhesión, migración, angiogénesis, transición mesénquima-epitelio (MET) y procesos de cicatrización de herida (194-196).

Varios estudios han descrito que la activación de Notch regula positivamente la adhesión celular a través de la activación de moléculas de integrina de la familia β 1, principalmente α 5 β 1, α 4 β 1 y α 3 β 1 (194). Juliach D. y Leong KG. demostraron que este incremento en la adhesividad mediado por Notch, es debido a un aumento de la afinidad en la unión de la subunidad β 1 de las integrinas en la superficie celular (196, 197). Hodking PS. y colaboradores propusieron que la activación de las integrinas se conseguía por la acción intracelular de la GTPasa R-Ras (194). La familia Ras de las proteínas de unión a GTP y sus efectores *downstream* son claves para la regulación de la activación de las integrinas. R-Ras y H-Ras tiene efectos contrarios en la adhesión célula-matriz. R-Ras aumenta la adhesión celular mediada por integrinas, mientras que H-Ras y su efector *downstream* Raf-1 inhiben la actividad de las integrinas. Se ha sugerido que NICD bloquea H-Ras y activa R-Ras, activando de este modo a las integrinas (196, 198). Ciado F. y colaboradores demostraron que la vía Notch regulaba la expresión de la α 3 β 1 a nivel transcripcional, sugiriendo que la sobrerregulación de la integrina α 3 β 1 mediada por Notch promovía la adhesión célula-ECM, estimulando la migración en células de médula ósea (195).

I.5.6 Evidencias de la implicación de la Integrina- α 9 en RMS

Este trabajo representa la primera descripción del potencial pro-invasivo de la Integrina- α 9 en RMS. Nuestra hipótesis de partida, teniendo en cuenta el papel que juega la Integrina- α 9 en la miogénesis esquelética (véase **El papel de la Integrina- α 9 en la miogénesis**) y en la transformación o mantenimiento del fenotipo maligno en células tumorales, fue que la Integrina- α 9 podría tener un papel relevante en el mantenimiento del estado inmaduro muscular e invasivo característico del RMS y que el mecanismo de inducción de ésta podría estar regulado por la vía Notch.

El papel de la Integrina- α 9 en la miogénesis

Tanto el proceso de miogénesis como el proceso de regeneración del músculo esquelético adulto requieren de la activación, proliferación y fusión de las células precursoras miogénicas (mpc).

Las ADAMs son una familia de aproximadamente 30 glicoproteínas transmembrana con un único dominio, que incluye un prodominio, un dominio proteolítico, y un dominio de adhesión a las integrinas (199). La ADAM12 se ha visto constitutivamente expresada durante la formación de los miotubos en la regulación embrionaria temprana, persiste en la fase post-natal y cesa su expresión en el músculo adulto (200). Eto K. y colaboradores observaron que la subunidad α 9 era la pareja preferible de ADAM12 (201). Lafatuse P. y colaboradores demostraron que ambas moléculas, ADAM12 y la integrina α 9, estaban constitutivamente expresadas durante la diferenciación miogénica en humanos, siendo los responsables, en parte, de la interacción célula-célula y célula-ECM durante la fusión de los mioblastos mononucleados (200). La inhibición de la interacción de ambas moléculas producía defectos en la formación de miotubos, siendo dos moléculas claves en el proceso de diferenciación miogénica y en la mediación de la interacción célula-célula de los mioblastos mononucleados, imprescindible para acabar formando los miotubos (200).

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es:

Identificar y estudiar marcadores y genes relevantes asociados con el Rabdomiosarcoma.

Los resultados que hemos ido obteniendo a lo largo de este trabajo nos han llevado a centrar nuestro interés en los siguientes objetivos secundarios:

1. Estudiar la implicación de la vía de señalización de Notch en células de RMS.
2. Estudiar los mecanismos que regulan las funciones pro-invasivas de la vía Notch en esta neoplasia.
3. Caracterizar la vía Notch *in vivo* y estudiar el posible uso de los inhibidores de gamma-secretasa (GSIs) como terapia complementaria dirigida contra las células neoplásicas de RMS.

RESULTADOS

R.1 La vía Notch está ampliamente expresada y activada en RMS

R.1.1 Análisis de expresión para identificar marcadores relevantes del RMS

En el momento de iniciar este trabajo el conocimiento sobre los genes y vías implicadas en la transformación celular de los rbdomioblastos a células neoplásicas era muy escaso. Por ello, con el objetivo de identificar marcadores y genes relevantes asociados a este proceso, se llevó a cabo un estudio de expresión mediante una plataforma de microarray de cDNA en colaboración con el Dr. Schaaf (Amsterdam, Netherlands) (no publicado). Previo a este estudio, el grupo del Dr. Schaaf realizó un análisis completo del transcriptoma del RMS comparándolo con el músculo adulto (AM), mediante la técnica de SAGE (*Serial analysis gene expression*) (202). A pesar de que este estudio proporcionó gran información respecto a genes que podían estar implicados en la tumorigénesis, el número de muestras incluidas fue muy pequeño (n=4 RMS y n=4 AM) y no permitió sacar datos concluyentes. Para aumentar la robustez del análisis el Dr. Schaaff, en colaboración con nuestro grupo, analizó un nuevo conjunto de muestras (25 RMS y 6 AM) mediante una plataforma de microarray de cDNA que contenía 4200 genes. El objetivo del estudio era comparar los genes que se encontraban expresados diferencialmente en ambos grupos de muestras, independientemente de la plataforma que se utilizara. Por ello, se empezó por analizar las diferentes plataformas y conjuntos de muestra por separado, para posteriormente analizar los resultados entre las diferentes plataformas. Los resultados obtenidos mediante la técnica de SAGE mostraron 793 genes diferencialmente expresados, mientras que con el microarray de cDNA se identificaron 451 genes. Con el objetivo de aumentar la robustez del estudio, se incluyeron los resultados obtenidos de dos estudios accesibles públicamente, realizados mediante una plataforma de arrays de oligonucleótidos de Affimetrix (U133A). Se compararon 30 muestras de AM (203, 204) con 29 muestras de RMS (205). La comparación de los datos permitió identificar 3620 genes diferencialmente expresados entre ambos grupos de muestras. Posteriormente, se combinaron los resultados obtenidos de las tres plataformas independientes (SAGE, arrays de cDNA y Affimetrix), y sólo los genes que mostraban una consistente expresión diferencial, en al menos dos de las tres comparaciones, fueron seleccionados como genes candidatos. Para determinar si la combinación de plataformas producía parcialidades o falsos resultados, se llevaron a cabo test de permutación, los cuales mostraban si el número de genes consistentemente expresados entre las plataformas era significativo o no ($p < 0.001$). Se procedió al análisis de la lista genes para seleccionar aquellos que eran informativos para la biología del RMS o podían tener una relevancia clínica mediante análisis GO (*gene ontology analysis*). Entre los 427 genes

seleccionados, se observó principalmente una categoría de genes infraexpresados que estaban involucrados en la regulación de la miogénesis normal y/o la funcionalidad del músculo esquelético, tales como *DMD*, *TPM3* y *ACTN2/3*; y otra categoría de 34 genes sobrerregulados que estaban implicados en el desarrollo embrionario, tales como *HEY1*, *MEF2C*, *NOTCH2* y *HES1* (**Figura R.1**). A partir de estos resultados se procedió al estudio de la vía Notch en RMS.

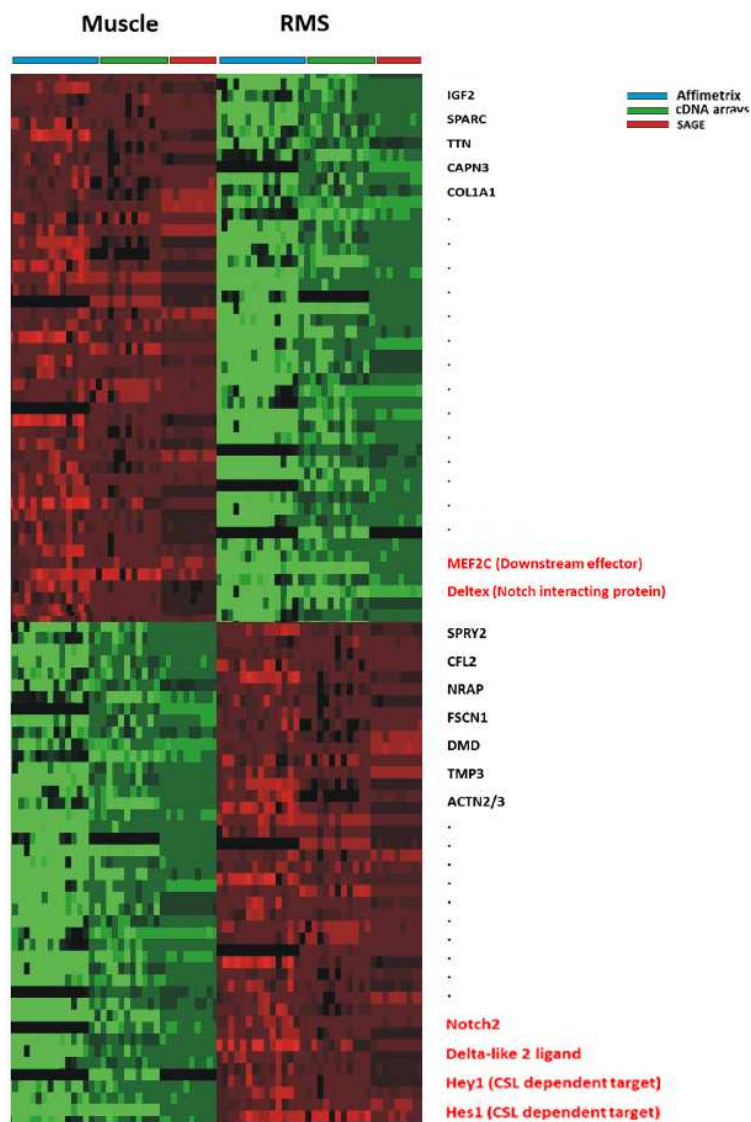


Figura R.1 Ilustración de los genes diferencialmente expresados. La imagen muestra los componentes de la vía Notch (marcados en rojo) que están sobrerregulados en RMS (parte inferior de la imagen) y los que están infraexpresados (parte superior) comparado con el músculo esquelético normal, en al menos dos grupos de datos/plataformas analizadas. El colorgrama muestra los niveles relativos de expresión de los genes: alta (rojo) y bajo (verde).

R.1.2 Perfil de expresión y activación de la vía Notch en RMS

Los resultados obtenidos del análisis comparativo de los genes diferencialmente expresados en muestras de RMS y AM realizado mediante tres plataformas independientes (SAGE, arrays de cDNA y Affimetrix) anteriormente comentado, fueron ratificados mediante RT-PCR (*Real time Polymerase Chain reaction*). Se estudió la expresión de los cuatro receptores *NOTCH* y de los dos efectores *Downstream HES1* y *HEY1* en un panel de 37 muestras de tumores primarios de RMS. Los resultados mostraron una amplia distribución de los receptores de *NOTCH* y de los efectores *downstream* en las muestras estudiadas (**Figura R.2**). Se compararon los niveles de RNAs de los tejidos tumorales (clasificados en función del tipo tumoral, aRMS y eRMS) con niveles de RNA de músculo adulto y fetal (AM y FM, 2 pools de tres muestras fueron analizados para ambos AM y FM).

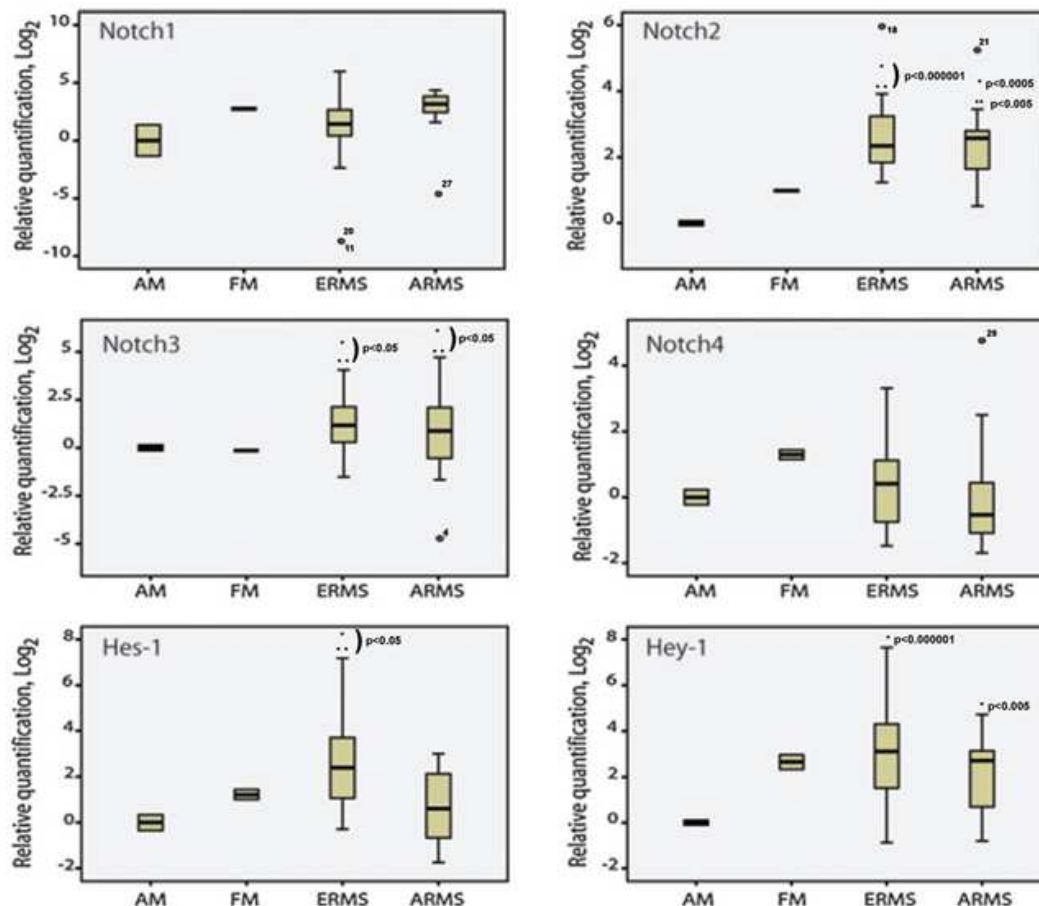


Figura R.2 La vía Notch está ampliamente expresada en RMS. Box-plot representando la expresión de los 4 receptores *NOTCH* y la expresión de *HES1* y *HEY1* mediante real-time PCR en tumores de RMS. Los resultados fueron normalizados usando valores de AM como línea de base (valores $\log_2 = 0$). AM, músculo adulto; FM, músculo fetal; ERMS, RMS embrionario; ARMS, RMS alveolar. Los asteriscos representan valores significativamente diferentes comparados con el AM (*) o con el FM (**).

El resultado más destacado fue el incremento en la expresión del receptor *NOTCH2* en todas las muestras de pacientes analizadas comparadas con el AM y FM. *NOTCH3* mostró una sobreexpresión moderada en ambos tipos de RMS, aunque no tan clara como en el caso de *NOTCH2*. Contrariamente, no se observó sobreexpresión significativa en el caso de *NOTCH1* y *NOTCH4* en ningún tipo de RMS (**Figura R.2**). En cuanto a los efectores *downstream*, la expresión de *HES1* se encontró moderadamente incrementada en el tipo embrionario comparado con ambas muestras control (AM y FM), mientras que *HEY1* mostró un aumento de expresión en aRMS y eRMS comparado con el AM (**Figura R.2**).

Además analizamos el patrón de expresión de los efectores de la vía Notch mediante inmunohistoquímica (IHC) en 19 tumores de RMS utilizando como control positivo muestras de carcinoma de próstata, donde es bien conocida la activación de la vía Notch (206). Los resultados mostraron una expresión intensa o moderada de Hes1 en el 90% de los casos, con un marcado predominantemente nuclear (**Figura R.3A**); la expresión de Hey1 fue fuerte o moderada en un 50% de los casos estudiados, siendo de predominio citoplasmático a diferencia de Hes1 (**Figura R.3B**).

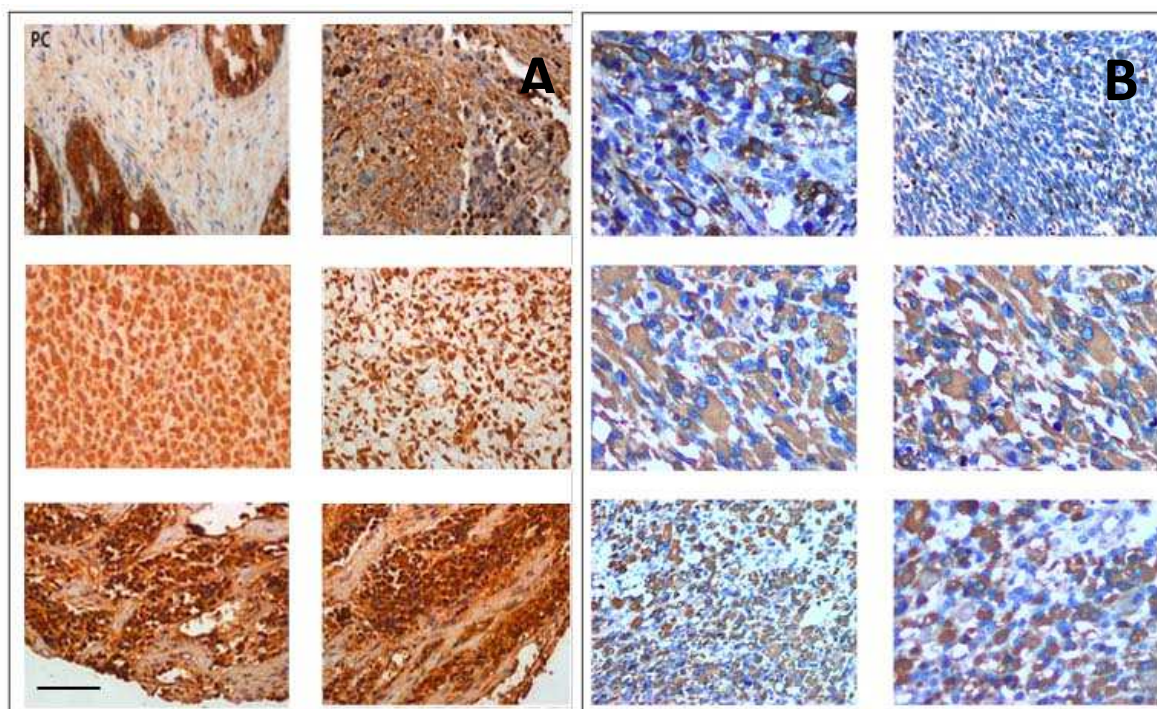


Figura R.3 La vía Notch está ampliamente activada en RMS: IHC de Hes1 (A) y Hey1 (B) en ambos subtipos de RMS, utilizando como control positivo muestras de carcinoma de próstata (PC). Barra horizontal, 100µm. Obsérvese la estructura de septos característica de aRMS y las células pequeñas y redondas sin septos característicos del subtipo embrionario. Globalmente el marcaje es menor en Hey1 (B), siendo la tinción principalmente citoplasmática.

Hasta el momento no ha sido posible establecer una relación entre la activación de la vía y las características clínicas y evolutivas de los pacientes dada la reducida muestra con la que contamos al ser un tumor tan poco frecuente (véase **Anexo 1**).

R.2 La inhibición de la vía Notch reduce significativamente la invasividad y movilidad del RMS in vitro.

R.2.1 La activación de la vía Notch se correlaciona con el fenotipo invasivo de las líneas celulares de RMS

Para estudiar la implicación de la vía Notch en la patología del RMS, se utilizaron como modelo tres líneas celulares de RMS (RH30, CW9019 y HTB82) pertenecientes a subtipos diferentes. Cada subtipo celular presenta características biológicas únicas (véase **Introducción**). El hecho de que se haya trabajado con estas tres líneas celulares, con grandes diferencias biológicas, ha permitido estudiar el mecanismo general del RMS y no uno particular de un subtipo de éste.

Se llevó a cabo la caracterización de la vía Notch en estas tres líneas celulares mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que aunque las líneas celulares expresaban de manera significativa los receptores *NOTCH1*, *NOTCH2* y *NOTCH3* en comparación con el AM y FM, no se observó ninguna correlación entre su expresión y la oncogenicidad de las tres líneas celulares analizadas (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando se estudió la expresión de los efectores *downstream* de Notch (*HES1* y *HEY1*) se observó una correlación significativa entre su expresión y la oncogenicidad de las tres líneas celulares. Se observaron niveles de expresión bajos de *HES1* y *HEY1* en la línea HTB82 (derivada de un eRMS), valores moderados en la línea celular CW9019 (derivada de un aRMS con translocación en *PAX7-FOXO1*) y valores elevados en la línea celular RH30 (aRMS con translocación en *PAX3-FOXO1*). *HES1* mostró una expresión 24.2 veces mayor en CW9019 y 37.5 veces mayor en RH30 comparado con HTB82. Se observó el mismo patrón de expresión en el caso de *HEY1* (12.3 veces mayor en CW9019 y 34.8 veces mayor en RH30) (**Figura R.4A**). Cuando estudiamos las capacidades invasivas de las tres líneas celulares mediante un ensayo de transwell los resultados verificaron la correlación entre la expresión de la activación de la vía Notch y las capacidades invasivas de cada línea celular (**Figura R.4B**). La invasividad de la línea HTB82 fue muy baja, a las 48 horas de iniciar el ensayo no se observó capacidad invasiva significativa. La línea celular CW9019 mostraba un potencial invasivo notable: a las 8 horas de iniciar el ensayo no se observó invasión, sin embargo el número de células que migraron a la cámara inferior aumentó considerablemente entre las 24 y 48 horas. Finalmente, la línea RH30 mostró una elevada capacidad invasiva detectada a las 8 horas del inicio del ensayo, la invasión fue tal que la cámara inferior estaba saturada de células a las 24 horas. Analizamos además la movilidad de las tres líneas celulares mediante un ensayo de cierre de herida (*wound healing*). Los resultados mostraron que mientras la línea celular

RH30 cerraba la herida en aproximadamente 18 horas después de hacer la incisión, la línea CW9019 necesitaba 3 días y la línea HTB82 necesitaba más de una semana para completar el cierre de la herida (**Figura R.4C**).

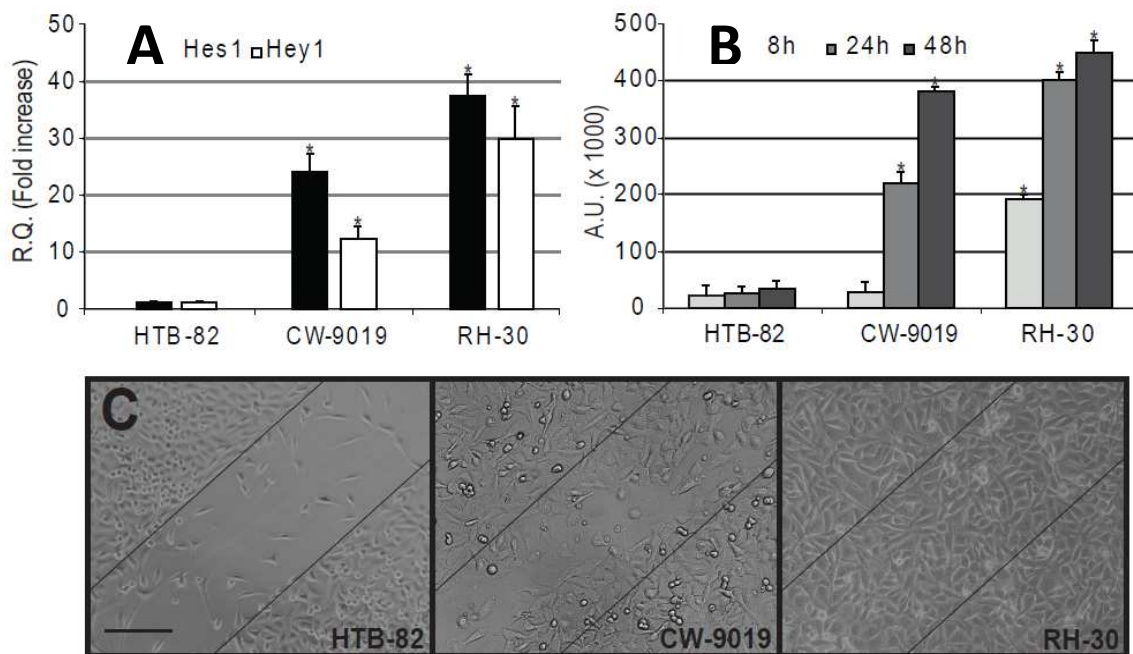


Figura R.4 La activación de la vía Notch se correlaciona con la capacidad invasiva de las líneas celulares de RMS. A, cuantificación relativa de *HES1* y *HEY1* en las 3 líneas celulares de RMS. B, evaluación de la capacidad invasiva de las 3 líneas celulares de RMS mediante un ensayo de transwell a las 8, 24 y 48 horas. *, en A y B, el valor es significativamente más elevado que los niveles obtenidos con la línea celular HTB82 con una $P < 0.001$. C, imágenes representativas del ensayo de wound healing tomadas a las 48 horas después de hacer la herida en las 3 líneas celulares indicadas. Las dos líneas paralelas delimitan la zona de la herida. Barra horizontal 100 μm.

R.2.2 La vía Notch puede ser inhibida farmacológicamente mediante inhibidores de gama-secretasa (GSIs)

Con el objetivo de evaluar la importancia de la vía Notch en RMS, se analizaron los efectos de los GSIs. Los GSIs testados fueron el DAPT, GSI-X, GSI-XX y GSI-XXI. Son peptidomiméticos estructuralmente muy similares, los cuales mimetizan la presenilina, responsable del corte en la región S3 del receptor Notch, inhibiendo la proteólisis del NICD y, por lo tanto, la activación de la vía (99, 100). Para evaluar los efectos de los GSIs, se comparó la expresión de mRNA de Hes1 y Hey1 entre las líneas celulares tratadas con GSIs y las líneas celulares tratadas con DMSO (control). Los resultados mostraron una reducción significativa en los niveles de Hes1 en las tres líneas celulares tratadas con DAPT (25 μM), GSI-XX (8 nM) y GSI-XXI (2 nM). El tratamiento con GSI-X (200 nM) producía una inhibición menor o nula en las tres líneas

estudiadas (**Figura R.5A**). En cuanto a la expresión de *Hey1* se observó un patrón similar de inhibición: las células tratadas con GSI-XX (8 nM) y GSI-XXI (2 nM) mostraban una disminución significativa en las tres líneas celulares estudiadas; el tratamiento con DAPT (25 μ M) producía una reducción de aproximadamente el 80% en las líneas RH30 y CW9019, mientras que en HTB82 el efecto no fue significativo; y finalmente el tratamiento con GSI-X (200 nM) fue prácticamente nulo, excepto en la línea celular RH30, la cual mostró una reducción del 30% aproximadamente (**Figura R.5B**).

Aunque no se consiguió una inhibición total, los niveles de proteína de *Hes1* también se redujeron significativamente cuando las células fueron tratadas con los GSIs, especialmente con el GSI-XXI (**Figura R.5C**). No se observó ningún efecto significativo, a nivel de proteína, cuando las células fueron tratadas con el GSI-X y el DAPT (resultados no mostrados).

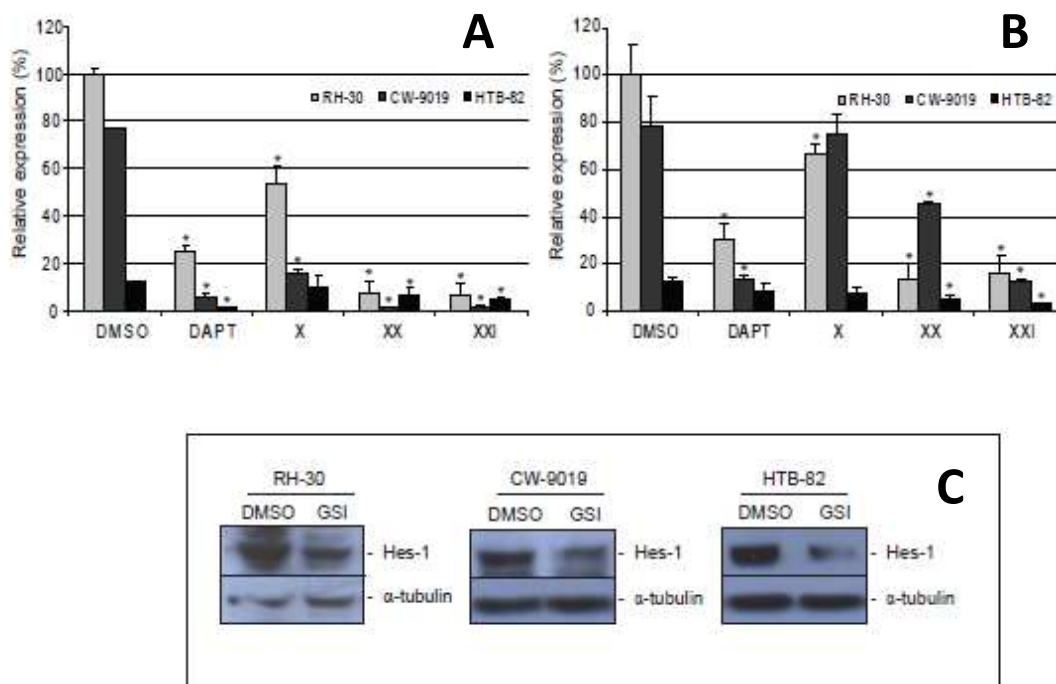


Figura R.5 La activación de la vía Notch se inhibe significativamente mediante GSIs en líneas celulares de RMS. Efectos de los GSIs en la expresión de mRNA de *HES1* (A) y *HEY1* (B) en líneas celulares de RMS expresadas en función del control (líneas celulares tratadas con DMSO). Significación estadística de las diferencias en comparación con el control: *, $p < 0,005$. Todas las medidas de RNA se realizaron por triplicado. C, Western-blot que muestra los efectos de los GSIs en la expresión de proteína *Hes1* en las líneas celulares RH30 (20 μ g de proteína por pocillo), CW9019 (40 μ g de proteína por pocillo) y HTB82 (80 μ g de proteína por pocillo). Se usó la α -tubulina como control de carga. GSI, γ -secretasa inhibitor XXI.

R.2.3 La inhibición de la vía Notch reduce significativamente la movilidad y la invasividad celular

Cuando las tres líneas celulares de RMS fueron tratadas con los GSIs, observamos una reducción significativa en la movilidad analizada mediante un ensayo de cierre de herida. En la **Figura R.6A** se ilustra este retraso en el cierre de la herida de la línea celular RH30 cuando es tratada con los GSIs. Se capturaron dos imágenes por tratamiento, una inmediatamente después de producir la herida (imágenes superiores) y la otra 18 horas más tarde (imágenes inferiores). Se observó que mientras las células tratadas con DMSO (control) cerraban la herida en aproximadamente 18 horas, las células tratadas con los GSIs, especialmente con DAPT, GSI-XX y GSI-XXI, no lo hacían).

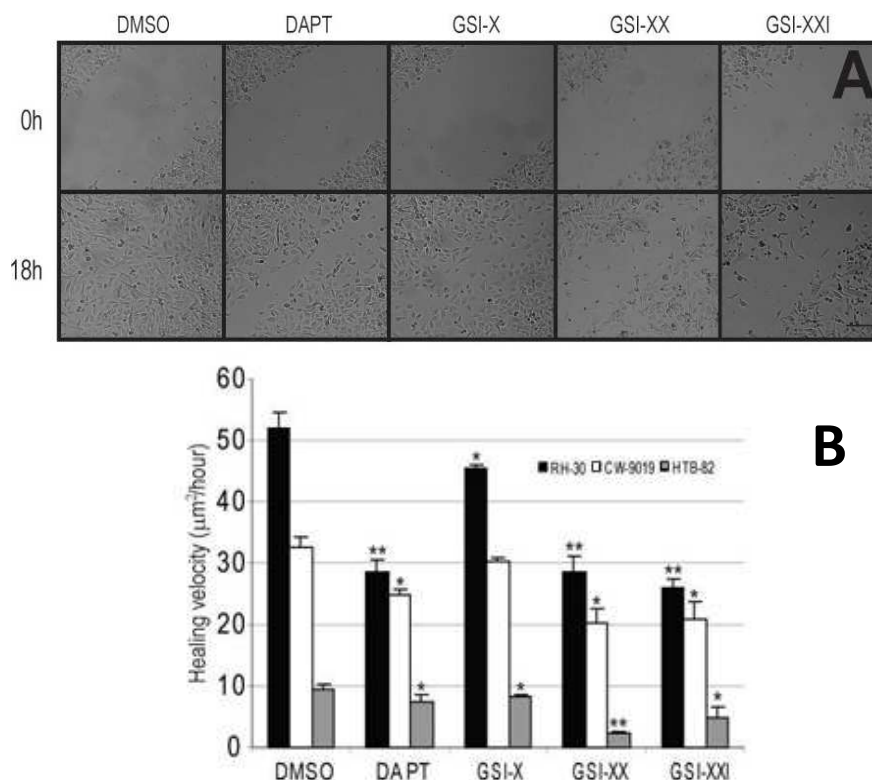


Figura R.6 La inhibición de la activación de la vía Notch reduce significativamente la movilidad en líneas celulares de RMS. A, imágenes representativas del ensayo de wound healing inmediatamente después de producir la herida (0 h) y 18 horas más tarde (18 h) de la línea celular RH30 en presencia de los GSIs o en ausencia (DMSO) (indicado en la parte superior). Barra horizontal 100 µm. B, efecto de los GSIs en la velocidad de cierre en las 3 líneas celulares. Cada barra representa la media de las velocidades de cierre de la herida en 8 muestras independientes en µm² por hora. Diferencias significativas respecto al control: *, P < 0,05; **, P < 0,005.

Además, se cuantificó la capacidad de cierre de la herida de las células mediante la velocidad de cierre (µm²/h) (**Figura R.6B**). Se observó que las células tratadas con GSI-XX y XXI reducían la velocidad de cierre aproximadamente a la mitad respecto al control en todas las líneas celulares. El tratamiento con DAPT producía una reducción significativa aunque de forma

dependiente a la línea celular: mientras que en RH30 la velocidad de cierre se redujo aproximadamente a la mitad respecto a la del control, en las otras dos líneas el efecto de los fármacos fue moderadamente significativo, con una reducción de aproximadamente $30 \mu\text{m}^2/\text{h}$ en la línea celular CW9019 y de $10 \mu\text{m}^2/\text{h}$ en la línea celular HTB82. Finalmente con el tratamiento GSI-X, la reducción de velocidad de cierre fue muy leve o nula en las tres líneas celulares analizadas (**Figura R.6B**).

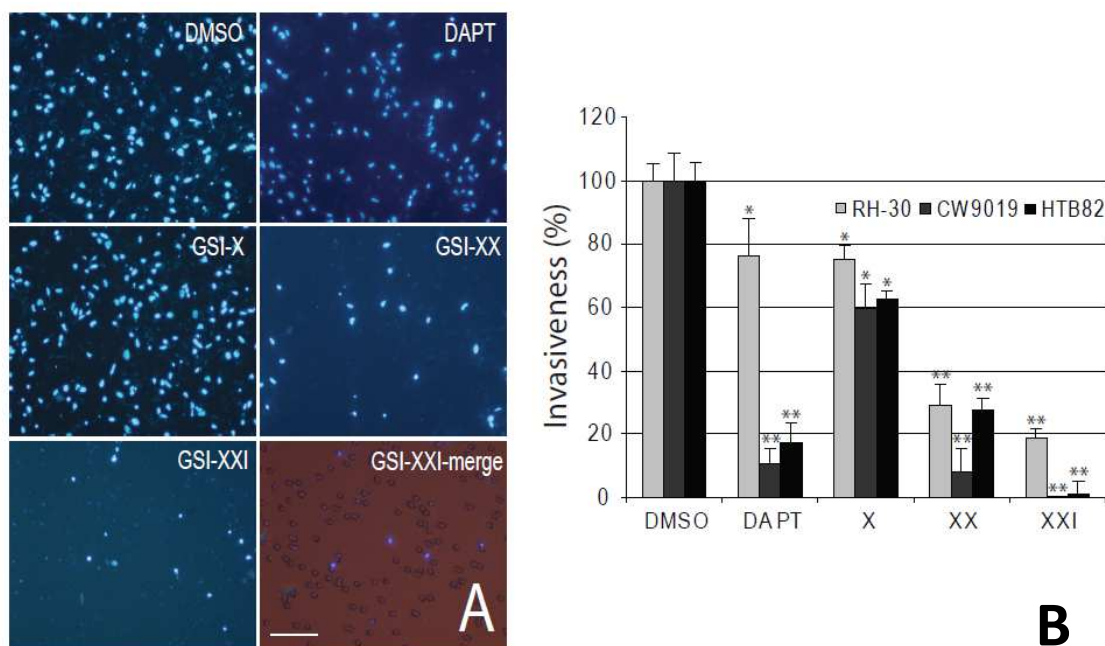


Figura R.7 La inhibición de la vía Notch reduce significativamente a la invasividad en líneas celulares de RMS. A, fotocomposición que muestra un campo representativo de cada tratamiento de la parte inferior de la membrana del transwell. Las células fueron teñidas con Hoechst33342. El inhibidor está indicado en la esquina de arriba de cada foto. La imagen de la esquina inferior derecha es una imagen captada con Hoechst33342 y luz visible. B, las barras representan el porcentaje de invasión de las 3 líneas celulares analizadas comparadas con el control (DMSO) al tratarlos con los GSIs (indicado debajo de las barras). Cada barra representa la media de tres pocillos independientes. Barra horizontal 100 μm . Diferencia significativa respecto al control:*, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$.

El tratamiento con GSIs, además de disminuir la movilidad celular, también afectaba a la capacidad invasiva de las células, analizada mediante un ensayo de matrigel (**Figura R.7**). Se cuantificó la capacidad invasiva de las células midiendo el porcentaje de invasión, es decir, el número de células que atravesaron el matrigel respecto al control. El 100% de invasión se corresponde con el número de células que atravesaron el matrigel al tratarlo con DMSO (control). En este ensayo los cuatro inhibidores de la vía Notch testados producían efectos desiguales. Además se observó, al igual que en el ensayo anterior, que todos los inhibidores, excepto el DAPT, producían un efecto similar en las tres líneas celulares. El tratamiento con el

DAPT producía una disminución moderadora del porcentaje de invasión en la línea RH30 (30%), sin embargo producía una reducción notable en las líneas CW9010 y HTB82 (de más del 80%). Las células tratadas con los fármacos GSI-XX y XXI mostraban una disminución del 70-90% en las tres líneas celulares analizadas. Finalmente, las células tratadas con el GSI-X mostraban una reducción muy leve, disminuyendo aproximadamente un 20% el porcentaje de invasión (**Figura R.7B**). La **figura R.7A** muestra un campo representativo de cada tratamiento de la parte inferior de la membrana del transwell. Como se observa, con los tratamientos GSI-XX y XXI el número de células que atravesó el matrigel es mucho menor que con los otros tratamientos, incluido el control. Estos resultados sugirieron que la vía Notch juega un papel importante en la movilidad e invasividad en células de RMS.

R.2.4 La inhibición de la vía Notch no afecta a la progresión del ciclo celular ni a la apoptosis celular

Al tratar las líneas celulares de RMS durante tres días con los 4 GSIs testados no observamos ninguna diferencia significativa en cuanto a progresión del ciclo celular y nivel de apoptosis comparadas con las células control (DMSO). Estos resultados confirman que la inhibición observada en la movilidad e invasividad de las células de RMS no se podía atribuir a cambios en el ciclo celular ni en la apoptosis.

A

Cell Cycle		DMSO	DAPT	GSI-X	GSI-XX	GSI-XXI
RH-30	G0/G1 (%)	43.97	45.63	47.52	45.17	44.26
	S (%)	30.69	28.010	27.38	27.07	26.36
	G2/M (%)	25.32	26.36	25.08	27.79	28.01
CW-9019	G0/G1 (%)	48.03	47.32	48.22	49.34	44.26
	S (%)	29.56	28.96	27.98	29.34	26.36
	G2/M (%)	22.41	23.72	23.8	21.32	29.38
HTB-82	G0/G1 (%)	46.04	47.95	47.98	49.22	47.86
	S (%)	30.02	27.56	26.99	29.99	28.36
	G2/M (%)	23.94	24.49	25.03	20.79	23.78

B

Apoptosis Assay		DMSO	DAPT	GSI-X	GSI-XX	GSI-XXI
RH-30	Viable Cells (%)	73.32	74.98	69.99	74.64	76.93
	Early Apoptotic (%)	1.03	1.05	1.13	1.20	1.24
	Late Apoptotic (%)	6.89	9.84	8.93	6.25	5.96
CW-9019	Viable Cells (%)	87.93	82.43	80.65	79.98	80.02
	Early Apoptotic (%)	1.06	1.75	1.43	1.84	0.99
	Late Apoptotic (%)	12.82	12.98	14.93	14.82	13.98
HTB-82	Viable Cells (%)	79.98	76.56	78.23	76.99	80.78
	Early Apoptotic (%)	1.09	1.85	1.65	1.56	1.23
	Late Apoptotic (%)	11.98	13.86	9.75	10.56	11.89

Figura R.8 La inhibición de la vía Notch no afecta a la progresión del ciclo celular ni a la apoptosis celular. A, porcentaje de células acumuladas en las diferentes fases del ciclo celular en las tres líneas celulares analizadas tratadas con los GSIs. B, porcentaje de células viables y apoptóticas en las tres líneas celulares analizadas tratadas con los diferentes GSIs.

R.2.6 Especificidad de los GSI

Para descartar la posibilidad de que los efectos observados sobre las células tratadas fueran debidos a la inhibición específica de Notch, manipulamos genéticamente la vía transfectando una construcción que contenía el dominante negativo MAML1 (dnMAML1) o el vector vacío (pEGFP). MAML1 es un coactivador que coopera con el NICD y los factores de transcripción CSL para activar los genes diana de Notch. Se ha demostrado que una versión truncada de MAML1 es capaz de mantener una asociación con este complejo impidiendo la activación de la vía (207).

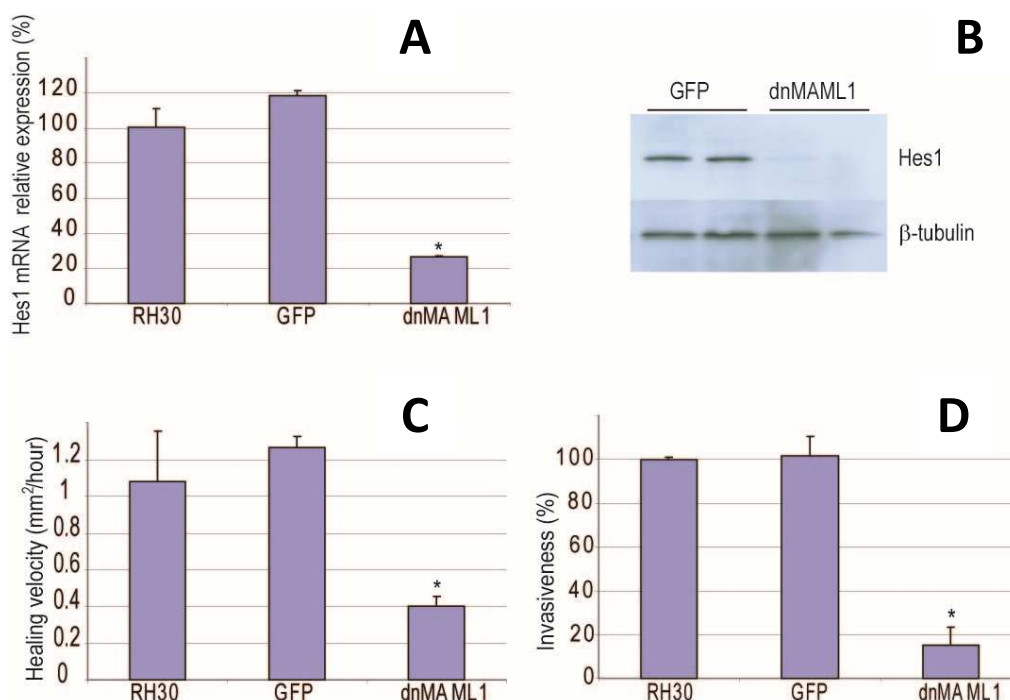


Figura R.9 Efectos del silenciamiento de la activación de la vía Notch usando el dnMAML1 en la línea celular RH30. A, efectos del dnMAML1 en la expresión de Hes1 evaluada mediante RT-PCR expresada como porcentaje y comparada con el control (RH30). B, Western-blot mostrando el efecto de la expresión del dnMAML1 en la expresión de proteína Hes1. Se utilizó el α -tubulina como control de carga. C, ensayo de wound healing mostrando la reducción en la velocidad de cierre de las células que expresan el dnMAML1. D, efectos del dnMAML1 en el ensayo de invasión matrigel/transwell. En A, C, y D, *, diferencia significativa con el control ($p < 0,005$).

Tal y como esperábamos, la línea celular RH30 transfectada establemente con el dnMAML1 reducía los niveles de expresión de mRNA Hes1 un 75-95% respecto a los niveles hallados en los controles RH30 transfectada con pEGFP y RH30 sin transfectar, respectivamente (**Figura R.9A**). Asimismo, se observó una reducción significativa en los niveles de proteína de Hes1 en las células transfectadas con el dnMAML1 (**Figura R.9B**). Esta atenuación en la expresión de Hes1 producía efectos en la movilidad e invasividad celular. Las células transfectadas con el

dnMAML1 cerraban la herida de forma significativamente más lenta que las células control, con una reducción en la velocidad de cierre de más de la mitad (**Figura R.9C**). La capacidad invasiva de las células también se vio afectada al transfectar el dnMAML1, reduciendo el porcentaje de invasión un 80% respecto a las células control (**Figura R.9D**).

R.3 La vía Notch confiere un fenotipo más invasivo a las células de RMS mediante la regulación de moléculas de adhesión

R.3.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch disminuye la adhesión celular

Cuando las líneas celulares de RMS fueron tratadas con el GSI-XXI se observó una clara reducción de la adhesividad celular detectada tanto en placas recubiertas con colágeno como con fibronectina (**Figura R.10**). El efecto observado del GSI-XXI era variable en función de las líneas celulares analizadas y del sustrato utilizado. En general, se producía una reducción considerable del porcentaje de células adheridas, una vez realizados los ensayos de lavado, que variaba desde el 20 al 50% en las placas de fibronectina (**Figura R.10A**) y desde el 30 al 60% en las placas de colágeno (**Figura R.10B**). Estos resultados sugirieron un papel importante de la vía Notch no sólo en procesos moleculares de movilidad e invasividad, sino que también en la regulación de la adhesividad celular.

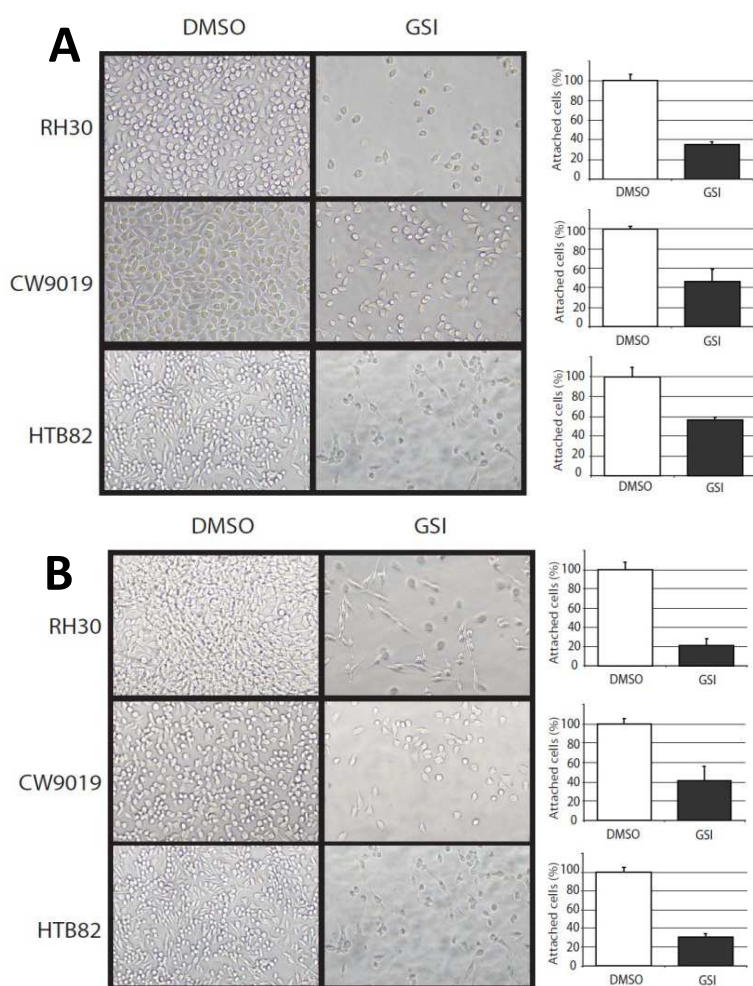


Figura R.10 La inhibición farmacológica de la vía Notch disminuye la adhesión celular en líneas celulares de RMS. Las fotografías muestran una imagen representativa de las células adheridas de cada línea celular en presencia del GSI-XXI (GSI) o en ausencia de éste (DMSO) en sustrato de fibronectina (A) o de colágeno (B). Las barras representan el porcentaje de células adheridas en cada sustrato. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado. *, P<0,05; **, P<0,005.

Para descartar que los efectos observados de adhesividad fueran debidos a algún tipo de muerte celular llevamos a cabo un ensayo de viabilidad mediante citometría de flujo. No se observaron diferencias sustanciales entre las células tratadas con GSI-XXI y las células tratadas con DMSO (**Figura R.11**).

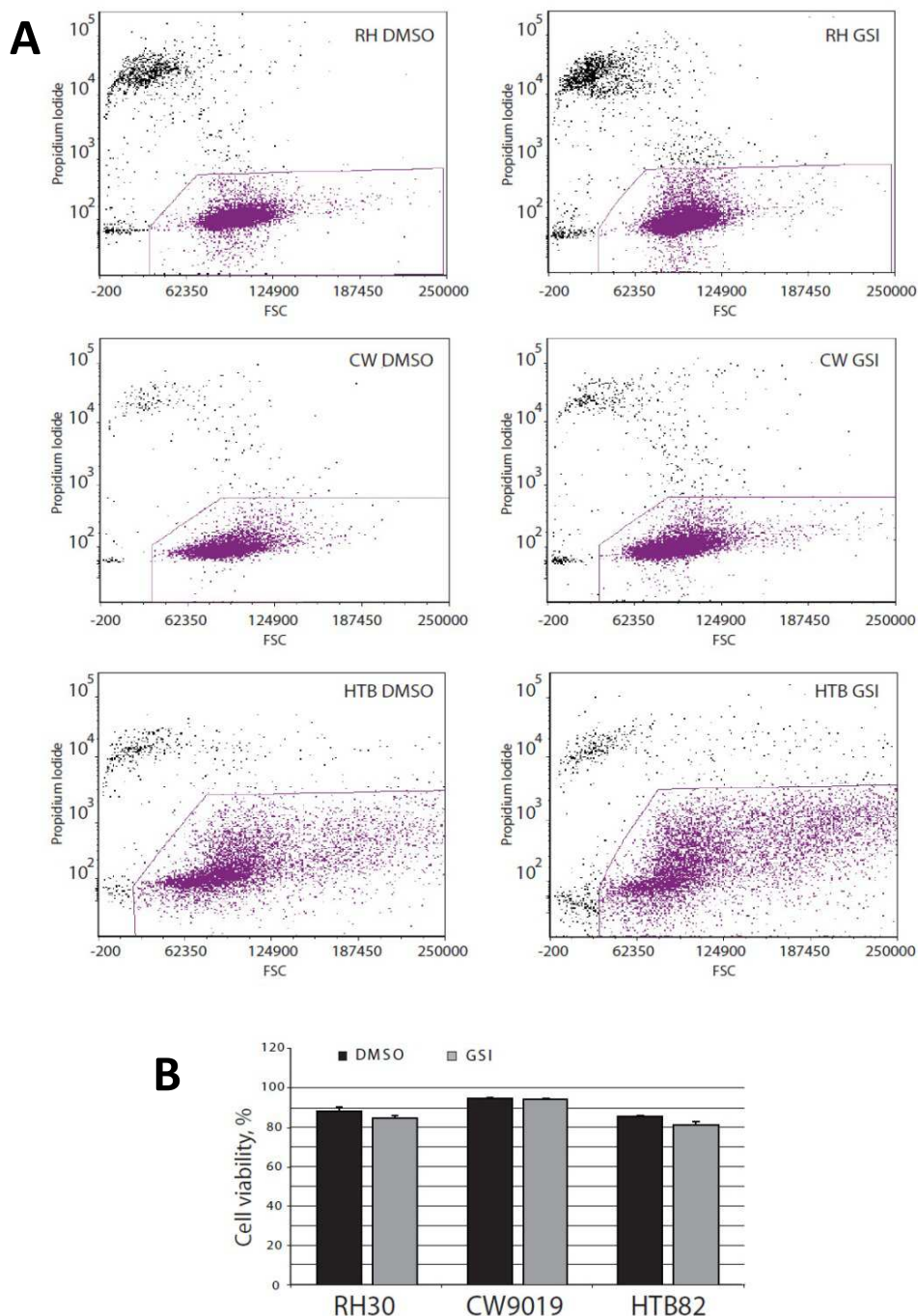


Figura R.11 El tratamiento con GSIs no afecta a la viabilidad celular. A, gráficas de citometría que muestran la incorporación de yoduro de propidio en células no viables (población de color negro) y células viables (población de color púrpura) para las líneas celulares tratadas (GSI) y los no tratados (DMSO) (RH30, CW9019 y HTB82). B, gráfica que representa el porcentaje de viabilidad de las células tratadas y no tratadas en las tres líneas de celulares indicadas al pie de la figura.

R.3.2 La inhibición farmacológica de la vía Notch modifica el patrón de expresión de moléculas de adhesión

En base a los resultados anteriores hipotetizamos que la vía Notch tenía que estar regulando algunas moléculas de adhesión implicadas en los procesos de adhesividad, movilidad e invasividad en células de RMS. Por ello, con el objetivo de buscar moléculas candidatas responsables de estos procesos celulares, se analizó un conjunto de muestras (líneas celulares tratadas con GSI-XX/XXI y no tratadas) mediante una plataforma de microarray de Affymetrix (U133A). El objetivo del estudio era comparar los genes implicados en la adhesividad celular que se encontraban expresados diferencialmente en ambos grupos de muestras (tratados y no tratados), independientemente del fármaco que se utilizara. Se procedió al análisis de la lista de genes para seleccionar aquellos que eran relevantes en los procesos de adhesividad e invasividad celular. Entre los genes seleccionados, se observó un grupo que mostraba una infraexpresión consistente en las muestras tratadas con GSIs respecto a las muestras control, tales como la *CDH2*, la protocaderina 10 (*PCDH10*) y la Integrina- α 9 (*ITGA9*); y otro grupo de genes sobreexpresados tales como la caderina 7 (*CDH7*) y selectina L (*SELL*) (datos no mostrados).

Después de un exhaustivo trabajo de selección y validación mediante RT-PCR y Western-blot, seleccionamos aquellas moléculas que presentaban una expresión diferencial y consistente en los dos grupos de muestra de estudio (líneas celulares tratadas y sin tratar). Las moléculas candidatas fueron la N-Caderina, descrita por su capacidad de promover adhesividad, invasividad y migración a sitios distales en células tumorales (117, 118); y la Integrina- α 9, implicada en varios procesos de interacción dinámica entre células-ECM, como re-epitelización de una herida cutánea (154), adhesión y migración celular en células neoplásicas (155-157, 189)(Figura R.12).

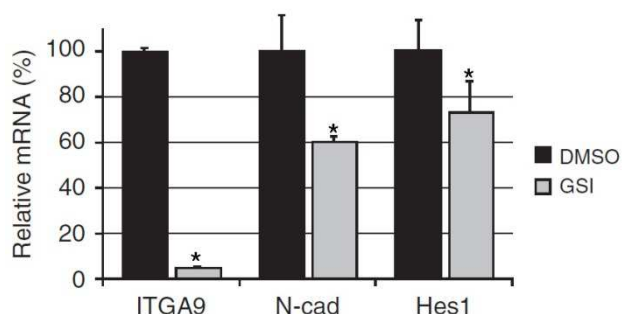


Figura R.12 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de N-Caderina e Integrina- α 9. Resultados del análisis del microarray de de cDNA, mostrando los niveles de expresión relativos de N-Caderina (N-cad), Integrina- α 9 (ITGA9) y Hes1 de muestras tratadas con GSIs comparadas con el control (DMSO).

R.4 La vía Notch regula la N-Caderina

R.4.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de la N-Caderina.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión, comentado anteriormente, fueron ratificados mediante RT-PCR y Western-blot. Se compararon los niveles de expresión de la N-Caderina entre las líneas celulares tratadas con el GSI-XXI y las líneas celulares tratadas con DMSO (control). Confirmando los resultados previos, se observó que las células tratadas con el GSI mostraban una reducción en los niveles de la N-Caderina en las tres líneas celulares analizadas. Los niveles de expresión de mRNA de la N-Caderina se redujeron aproximadamente un 60-85% en comparación con el control (100%). Se analizó la expresión de mRNA Hes1 como control de la correcta inhibición de la vía Notch. Como esperábamos, la expresión de mRNA de Hes1 mostraba una reducción significativa en las células tratadas con GSI (**Figura R.13B**), y a pesar de no conseguir una inhibición completa de la vía (con una reducción del 60-85% en los niveles de mRNA de Hes1), pudimos observar una reducción significativa en la expresión de la N-Caderina (**Figura R.13A**).

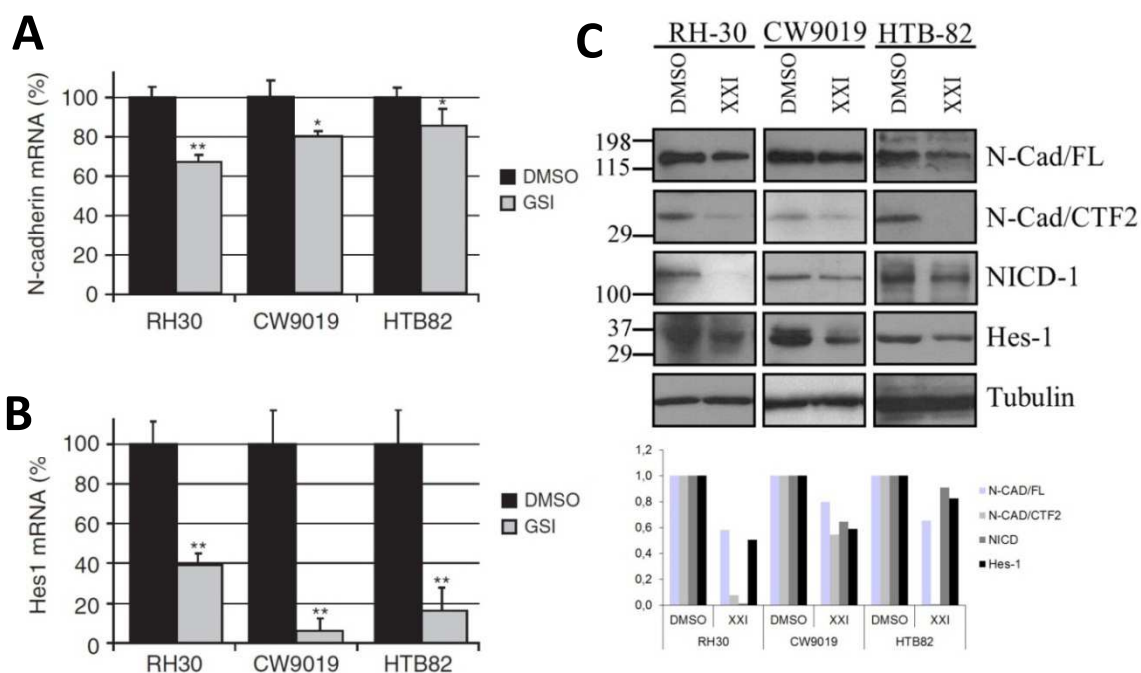


Figura R.13 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de N-Caderina. A y B, niveles relativos de mRNA evaluados mediante PCR cuantitativa en presencia (GSI) o ausencia (DMSO) de los inhibidores de la γ -secretasa de la N-Caderina (A) y de *HES1* (B). Los niveles de la N-Caderina y *HES1* fueron evaluados por triplicado. *, $P < 0,005$; **, $P < 0,05$. C, un panel de Western-blot mostrando los efectos de los GSIs en los niveles de N-Caderina, NICD1 y Hes1 comparado con muestras no tratadas (DMSO). Se utilizó α -tubulina como control de carga. A continuación de la composición de Western-blot, se muestra los análisis densitométricos de cada banda del Western-blot.

A nivel de proteína, se observó una reducción en los niveles de las isoformas funcionales de la N-Caderina: N-Caderina no procesada (N-Cad/FLL) y la isoforma CTF2 (**Figura R.13C**). El fragmento CTF1 no se detectó sugiriendo que esta isoforma tenía un papel poco importante en RMS (**Figura R.13C**). En la **figura R.13** se muestra también la reducción de los niveles de proteína Hes1 y NICD como marcadores de la inhibición de la vía Notch. Todos los ensayos de Western-blot fueron cuantificados mediante análisis de densitometría (**Figura R.12C** parte inferior).

R.4.2 La modificación genética de la activación de la vía Notch regula a la N-Caderina

Con el objetivo de verificar que los efectos observados de los fármacos no eran debidos a la implicación de otras vías celulares o al efecto directo de las drogas sobre la N-Caderina modificamos genéticamente la actividad de la vía Notch, transfectando varias construcciones que contenían el ligando de Notch (Delta) y el dnMAML1.

La activación de la vía transfectando Delta causaba un aumento en los niveles de N-Caderina (**Figura R.14A y C**). Los efectos de la transfección fueron desiguales para las tres líneas celulares analizadas. A nivel de mRNA, la sobreexpresión de N-Caderina al transfectar Delta fue mucho mayor en la línea celular HTB82 que en las otras dos líneas celulares. Los resultados mostraron que mientras que en la línea celular HTB82 se observaba una sobreexpresión de 700% en los niveles de mRNA de N-Caderina comparado con su control (HTB2 transfectadas con un vector vacío, pCDNA3.1), en las líneas celulares CW9019 y RH30 se producía una sobreexpresión de 70-60% comparado con sus respectivos controles (CW9019 y RH30 pCDNA3.1s) (**Figura R.14C**). El Western-blot reveló la presencia de la N-Caderina *full lenght* (N-Cad FL) y del fragmento CTF2, mientras que el fragmento CTF1 no se detectó. Ambas formas de la N-Caderina (N-Cad FL y CTF2) mostraron una inducción cuando la vía Notch estaba activada (sobreexpresión de Delta). Como se puede observar, la línea celular HTB82 presentó mayor expresión de la forma activa de la N-Caderina CTF2, sugiriendo un papel relevante de esta isoforma en esta línea celular, proveniente de un subtipo de RMS embrionario (**Figura R.14A**).

La inhibición de la vía, mediante sobreexpresión del dnMAML1, producía una reducción significativa en los niveles de N-Caderina (**Figura R.14B y C**). A nivel de mRNA, los efectos de la transfección fueron similares en las tres líneas celulares analizadas, con una disminución en la expresión de la N-Caderina de aproximadamente el 50% comparado con sus respectivos controles. Asimismo, se observó una reducción significativa a nivel de proteína de la N-Caderina *full lenght* (N-Cad FL) y del fragmento CTF2. Se evaluaron los niveles de expresión de

proteína de Hes1, NICD y de mRNA de Hes1 como control de la inhibición de la vía Notch (Figura R.14D).

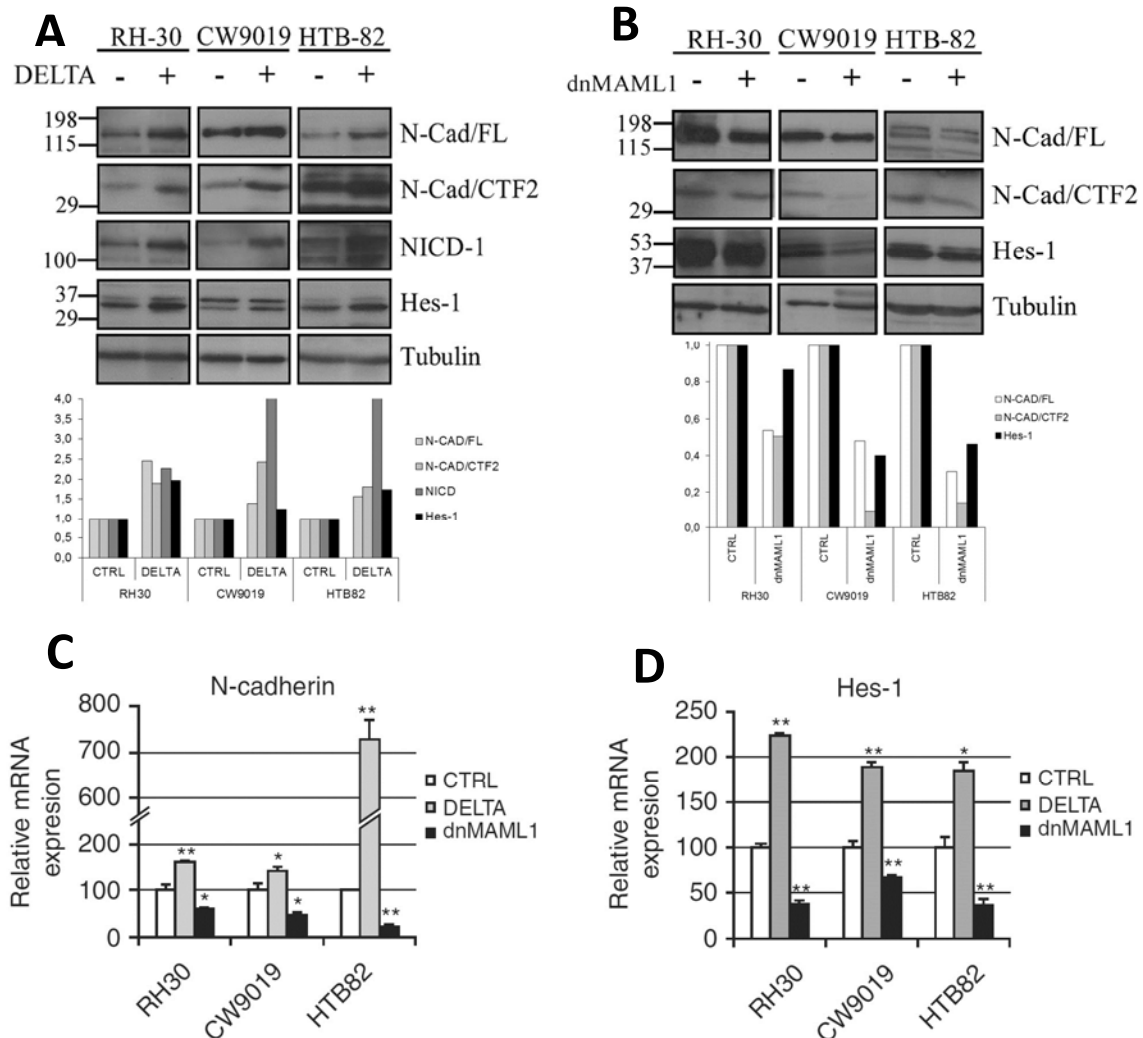


Figura R.14 La modificación genética de la vía Notch afecta la expresión de N-Caderina. Las líneas celulares de RMS transfectadas con Delta (A) muestran activación de la vía Notch (NICD y Hes1) y de la N-Caderina (N-Cad/FL y CTF2). Contrariamente, las células transfectadas con el dnMAML1 muestran una reducción de la vía Notch (NICD y Hes1) y de la N-Caderina (B). En la parte inferior de cada panel de Western - blot se muestran las cuantificaciones realizadas mediante análisis de densitometría. Las variaciones asociadas a las modificaciones genéticas de la Vía Notch (transfecciones de Delta y MAML1) observadas en proteínas, se observan también a nivel de mRNA de N-Caderina y Hes1 (C, D). Todas las medidas de RNA fueron realizadas por triplicado. **, P<0,005;*, P<0,05. La eficiencia de transfección fue de 170% en RH30, del 50% en CW9019 y del 80% en HTB82.

Para ratificar estos resultados, realizamos un estudio comparativo mediante inmunocitoquímica (IC) de la N-Caderina en las tres líneas celulares. Comparamos las líneas celulares con activación de la vía Notch (transfectando Delta) con las líneas celulares transfectadas con el vector control (pCDNA3.1). La IC reveló una expresión moderada de N-

Caderina en las células control (**Figura R.15**). Cuando las células fueron transfectadas con el ligando Delta la expresión de N-Caderina aumentó significativamente, conservando el patrón de localización de la proteína endógena en todas las líneas celulares (**Figura R.15A, B y C**). La tinción se localizó en citoplasma y membrana celular en RH30 y CW9019, sin embargo fue mucho más nuclear en HTB82, sugiriendo una mayor presencia de la isoforma N-Caderina CTF2 en esta línea celular (también observado en Western-blot, **Figura R.14A y B**).

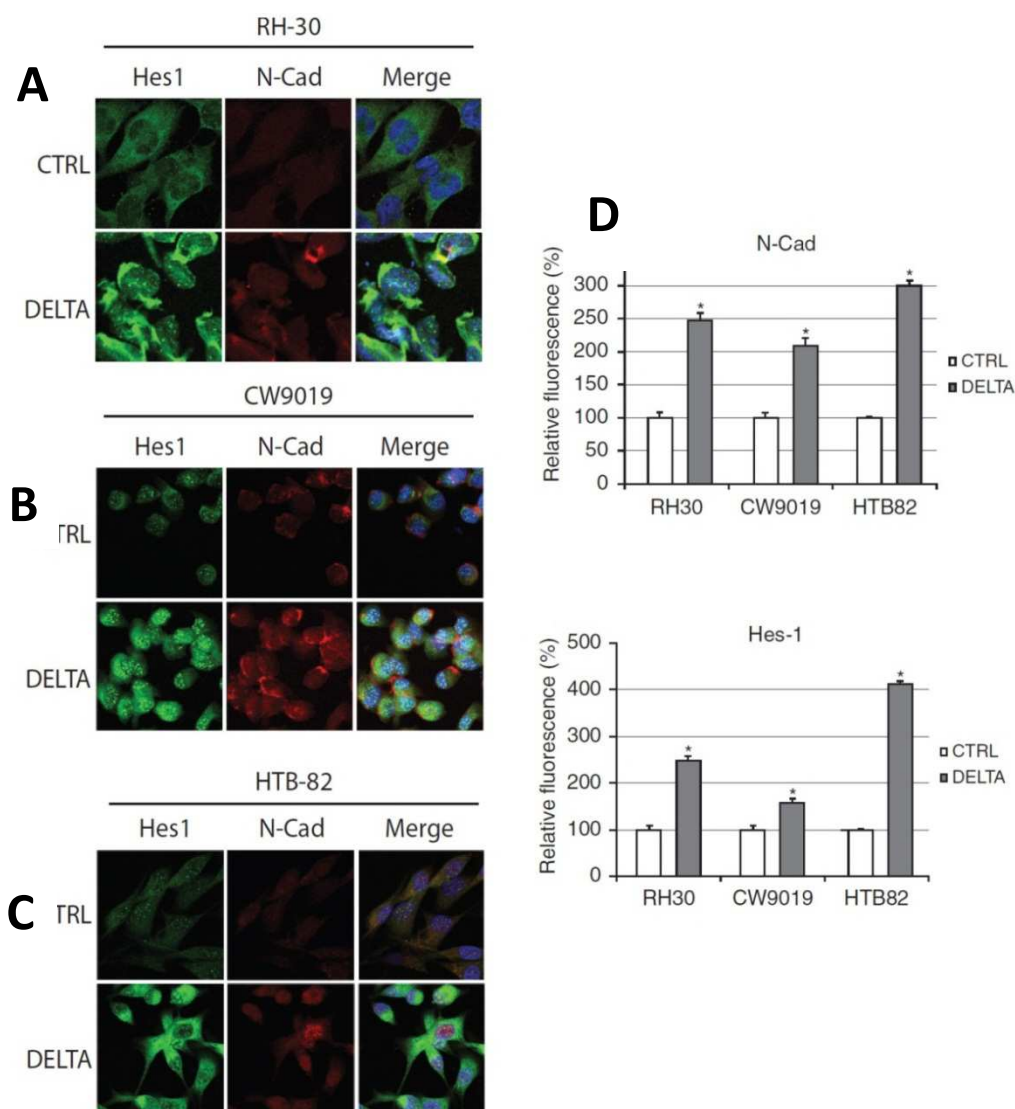


Figura R.15 Niveles de expresión de N-Caderina mediante IC. Doble inmunocitoquímica con anticuerpos anti-Hes1 (Hes1) y anti-N-Caderina (N-Cad) en células transfectadas con Delta en RH30 (A), CW9019 (B) y HTB82 (C). La tinción es la siguiente: Hes1 (verde), N-Caderina (rojo) y tinción nuclear (azul). D, cuantificación de la IC. En todas las cuantificaciones, al menos 100 células fueron evaluadas en experimentos duplicados. *, $P < 0,005$. La eficacia de transfección fue del 50% en RH30, del 40% en CW9019 y del 70% en HTB82.

R.4.3 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce la adhesividad y la movilidad en células de RMS

Con el objetivo de demostrar que el papel de la N-Caderina era decisivo para el aumento de las capacidades migratorias e invasivas de las células de RMS mediadas por Notch, llevamos a cabo una serie de ensayos funcionales (ensayo de adhesividad, movilidad e invasividad) en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante específico de la N-Caderina. El objetivo principal de estos experimentos era analizar si la inhibición de la funcionalidad de la N-Caderina era suficiente para compensar el aumento de adhesividad y/o movilidad y/o invasividad observado en células de RMS con una activación constitutiva de la vía Notch.

Las células de RMS transfectadas con Delta mostraron un aumento de adhesividad en placas recubiertas con fibronectina, fenotipo que podía ser revertido usando un anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina (**Figura R.16A**). La capacidad adhesiva se evaluó cuantificando la fracción de células que después de formar adhesiones iniciales resistieron a la fuerza convencional propia de ensayos de lavado (uniones intermedias o a corto plazo) y se evaluaron en porcentaje respecto al control (líneas celulares transfectadas con pCDNA3.1). Los efectos del anticuerpo bloqueante parecieron ser similares en las tres líneas celulares, con una reducción en la capacidad adhesiva del 40-70% comparado con sus respectivas líneas celulares transfectadas con Delta. Además se observó un cambio a un fenotipo más estrellado al usar el anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina, caracterizado por la disminución de uniones entre células y con el sustrato (**Figura R.16B**). Estos resultados sugirieron que el aumento observado de adhesividad al sobreexpresar la vía Notch era debido, al menos en parte, al efecto de la regulación de la N-Caderina.

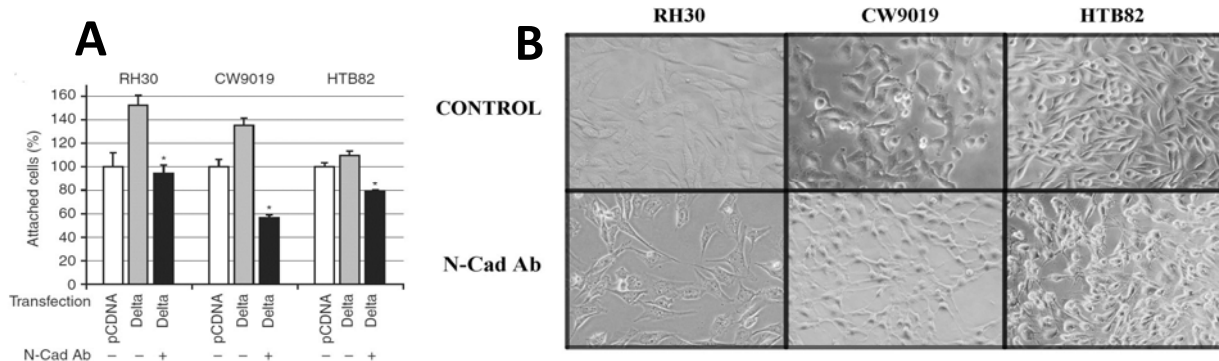


Figura R.16 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades adhesivas de las células de RMS. Las tres líneas celulares fueron transfectadas con las construcciones indicadas al pie de las gráficas (pCDNA, Delta) en presencia (+) o ausencia (-) del anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina (N-Cad Ab) tal como se indica en la figura. A, ensayo de adhesión en placas recubiertas con fibronectina. El porcentaje de las células adheridas fue cuantificado por triplicado en cada condición (línea celular, transfección y tratado o no tratado). B, fotografías tomadas 24 horas después del tratamiento con el anticuerpo bloqueante (N-Cad Ab) o con IgG (Control), se observa en las imágenes inferiores un cambio a un fenotipo más estrellado, caracterizado por la disminución de uniones de células con el sustrato y entre ellas, comparado con las muestras control. **, $P < 0,005$; *, $P < 0,05$.

Asimismo se observó, mediante el ensayo de *wound healing*, que las células de RMS transfectadas con Delta mostraban un aumento en la velocidad de cierre de la herida, capacidad que podía ser revertida usando el anticuerpo anti-N-Caderina (**Figura R.17A**). En este caso, el anticuerpo bloqueante mostró tener efectos desiguales en las tres líneas celulares analizadas: mientras que para las líneas celulares RH30 y CW9019 la velocidad de cierre se redujo aproximadamente a la mitad respecto a las células con sobreactivación de la vía Notch, en la línea celular HTB82 el efecto del anticuerpo bloqueante fue más moderado, debido, probablemente, a su ya escasa velocidad de partida.

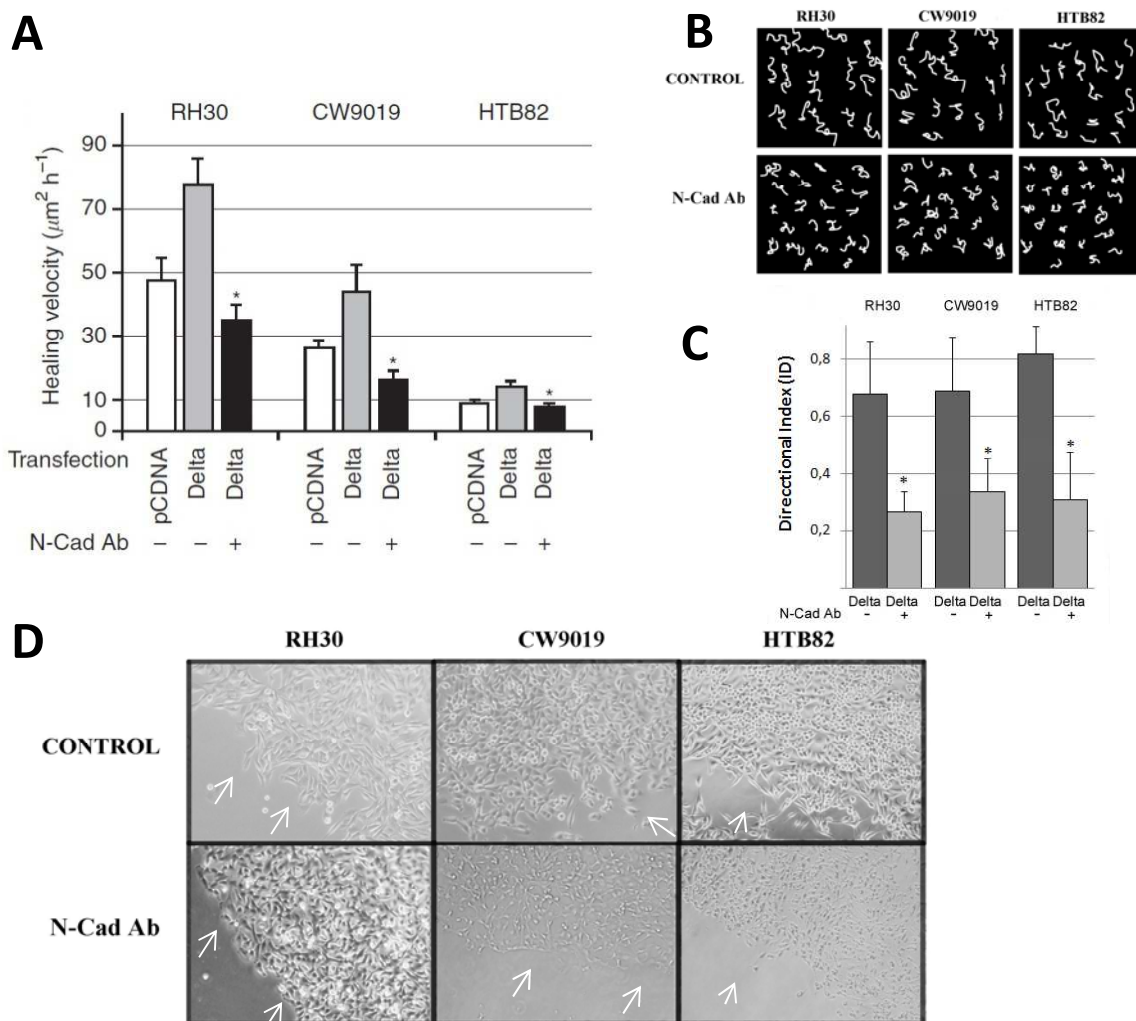


Figura R.17 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades móviles de las células de RMS. A, ensayo de *wound healing*. Todas las barras indican la media de la velocidad de cierre de 8 muestras independientes de cada condición (línea celular transfectadas, tratadas o no tratadas). Las tres líneas celulares fueron transfectadas con las construcciones indicadas al pie de las gráficas (pCDNA, Delta) en presencia (+) o ausencia (-) del anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina (N-Cad Ab). B, las líneas blancas representan las trayectorias de migración representativas de los desplazamientos celulares de las diferentes líneas celulares (indicadas en la parte superior del panel) tratadas con el anticuerpo bloqueante (N-Cad Ab) o con IgG (Control). Debajo de la imagen se observa la cuantificación del Índice de Direccionalidad (ID). C, fotografías captadas 24 horas después del tratamiento con el anticuerpo bloqueante. Se observa como las células tratadas (N-Cad Ab) pierden la direccionalidad, propia de las células control. **, $P < 0,005$; *, $P < 0,05$.

Se observó que el bloqueo de la N-Caderina, además de reducir la velocidad de cierre, afectaba a las trayectorias de migración. Los resultados mostraron que mientras que las células control (transfectadas con Delta y tratadas con IgG) tenían cierta direccionalidad intrínseca o persistencia en migración, es decir, tendían a migrar en una misma dirección durante periodos de tiempo relativamente largos; las células tratadas con el anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina presentaban una pérdida significativa de este sentido de direccionalidad. Para medir este parámetro se obtuvieron y analizaron la trayectoria recorrida por cada célula individual durante un periodo de 37 horas con ayuda del software de *Image J*. Con el fin de visualizar las diferencias de la forma más clara posible se representaron los movimientos de varias células representativas elegidas al azar (**Figura R.17B**). Las células tratadas con el anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina mostraron un desplazamiento neto más corto (entendido como la distancia lineal más corta entre el punto inicial y el punto final del recorrido de la célula), comparado con las células control, las cuales se movían por trayectorias más largas y de una forma más directa. Para cuantificar estas diferencias, se calculó el índice de direccionalidad (ID), definido como el cociente entre la distancia neta dividido por la distancia total recorrida por la célula (véase **Materiales y Métodos**). Las células con inhibición de la funcionalidad de la N-Caderina mostraron una reducción importante en la ID comparado con las células control (**Figura R.17C**). La **Figura R.17D** ilustra la pérdida de direccionalidad de las células tratadas con el anticuerpo bloqueante. Se muestran fotografías captadas 24 horas después del tratamiento con el anticuerpo bloqueante (N-Cad Ab) o con IgG (Control). Como se observa el bloqueo de la N-Caderina modifica el fenotipo de las células en el frente de avance a un fenotipo menos agresivo. Mientras que en las células control se observa un fenotipo celular típico de células migratorias (con extensiones de membrana hacia el frente de avance), las células tratadas con el anticuerpo bloqueante de la N-Caderina se muestran más redondeadas sin ningún tipo de extensión de membrana, típico de células que han perdido la direccionalidad. Estos resultados sugirieron que el carácter móvil propio de las células de RMS al sobreexpresar la vía Notch era debido, en parte, a un aumento en la expresión de la N-Caderina.

Finalmente se analizó la capacidad invasiva de las células, cuantificando el número de células que habían migrado a la parte inferior del matrigel y se cuantificó el porcentaje con respecto al control (líneas celulares transfectadas con pCDNA3.1). Se observó que las células de RMS transfectadas con Delta mostraban un aumento en su capacidad invasiva, fenotipo que podía ser revertido si se inhibía la funcionalidad de la N-Caderina. Sin embargo, en este caso, los efectos observados del anticuerpo bloqueante fueron menores, aunque significativos, con respecto a los efectos observados en la velocidad de cierre y capacidad adhesiva de las líneas

celulares analizadas (**Figura R.18**). Estos resultados sugieren que la N-Caderina podría tener un papel más importante en la movilidad celular que no en la capacidad invasiva en líneas celulares de RMS.

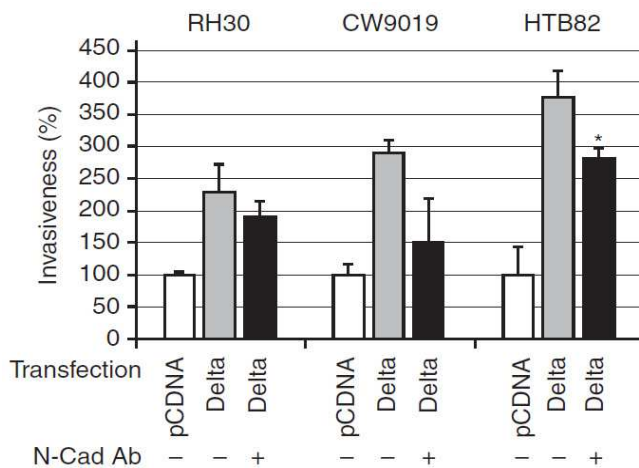


Figura R.18 El bloqueo específico de la N-Caderina reduce las propiedades invasivas de las células de RMS. Las tres líneas celulares fueron transfectadas con las construcciones indicadas al pie de las gráficas (pCDNA, Delta) en presencia (+) o ausencia (-) del anticuerpo bloqueante anti-N-Caderina (N-Cad Ab) tal como indica la figura. Ensayo de matrigel/transwell. La invasión se representa como porcentaje de las células presentes en el compartimiento de abajo respecto al control. Cada barra representa la media de tres pocillos independientes. *, P<0,05.

R.4.4 NICD1 y Hes1 se unen al promotor de la N-Caderina

Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para analizar la posible interacción de los efectores *downstream* Hes1 y NICD con la región promotora de la N-Caderina. Los resultados revelaron una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas con la región reguladora de la N-Caderina. El control de las IgGs no mostró amplificación (**Figura R.19**). Estos resultados sugirieron una unión directa de estos efectores *downstream* con la región promotora del gen de la N-Caderina.

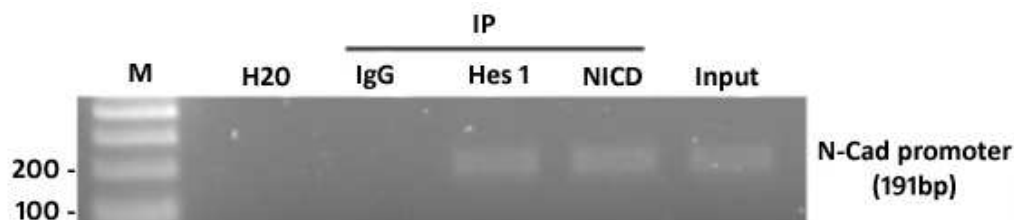


Figura R.19 Unión del NICD y Hes1 con la región promotora de la N-Caderina. Se analizaron lisados de células RH30 mediante un ensayo de ChIP usando anticuerpos específicos contra Hes1, NICD y IgG de conejo como control. La cromatina inmunoprecipitada fue amplificada mediante PCR usando la región específica del promotor de la N-Cadherin. IgG: control negativo IgG de conejo; Input: 5% de lisado celular sonificado usado para la IP; H₂O: control negativo de la PCR; M: 100bp de marcador de DNA.

R.4.5 La N-Caderina está ampliamente expresada en pacientes de RMS

Se estudió la expresión de la N-Caderina en un panel de 31 muestras de tumores primarios de RMS mediante PCR a tiempo real. Se compararon los niveles de RNAs de los tejidos tumorales (aRMS y eRMS) con niveles de RNA de músculo adulto y fetal (AM y FM, 2 pools de tres muestras fueron analizados para ambos AM y FM). Los resultados mostraron un aumento de expresión de N-Caderina en prácticamente todas las muestras de pacientes analizados comparados con el AM. Sin embargo cuando utilizamos como control la expresión del FM, observamos que los niveles de la N-Caderina eran ligeramente inferiores a éste (**Figura R.20**). Hasta el momento, no ha sido posible establecer una relación entre la activación de la vía y las características clínicas y evolutivas de los pacientes dada la reducida muestra con la que contamos al ser un tumor tan poco frecuente (véase **Anexo 1**).

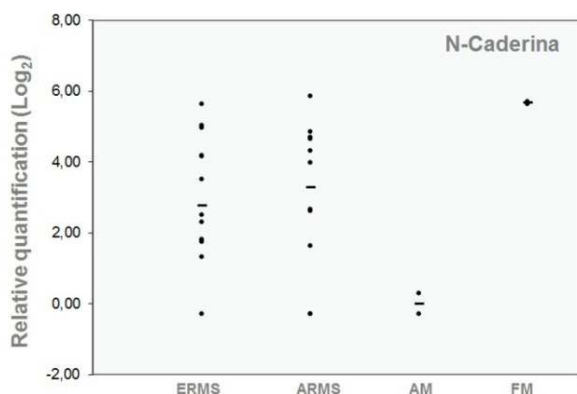


Figura R.20 La N-Caderina está ampliamente expresada en pacientes de RMS. Box-plot mostrando la expresión de la N-Caderina mediante real-time PCR en tumores de RMS. Los resultados fueron normalizados usando valores de AM como línea de base (valores $\log_2 = 0$). AM, músculo adulto, FM, músculo fetal, ERMS, RMS embrionario, ARMS, RMS alveolar.

R.4.6 La N-Caderina se correlaciona con Hes1 en tumores de RMS

Con el objetivo de analizar si existía correlación entre Hes1 y N-Caderina en pacientes de RMS, tal como se había observado en las líneas celulares, se realizó un ensayo IHC. Se marcaron varias muestras de pacientes usando los anticuerpos contra Hes1 y N-Caderina. La intensidad de marcaje fue evaluada usando un método semicuantitativo, tal como se describe en la sección de **Materiales y Métodos**. Aunque el número de muestras fue limitado ($n=9$), los resultados mostraron una correlación entre la expresión de Hes1 y N-Caderina (**Figura R.21**), con una correlación de Pearson de 0.584 ($p < 0.01$), sugiriendo una dependencia entre ambas proteínas.

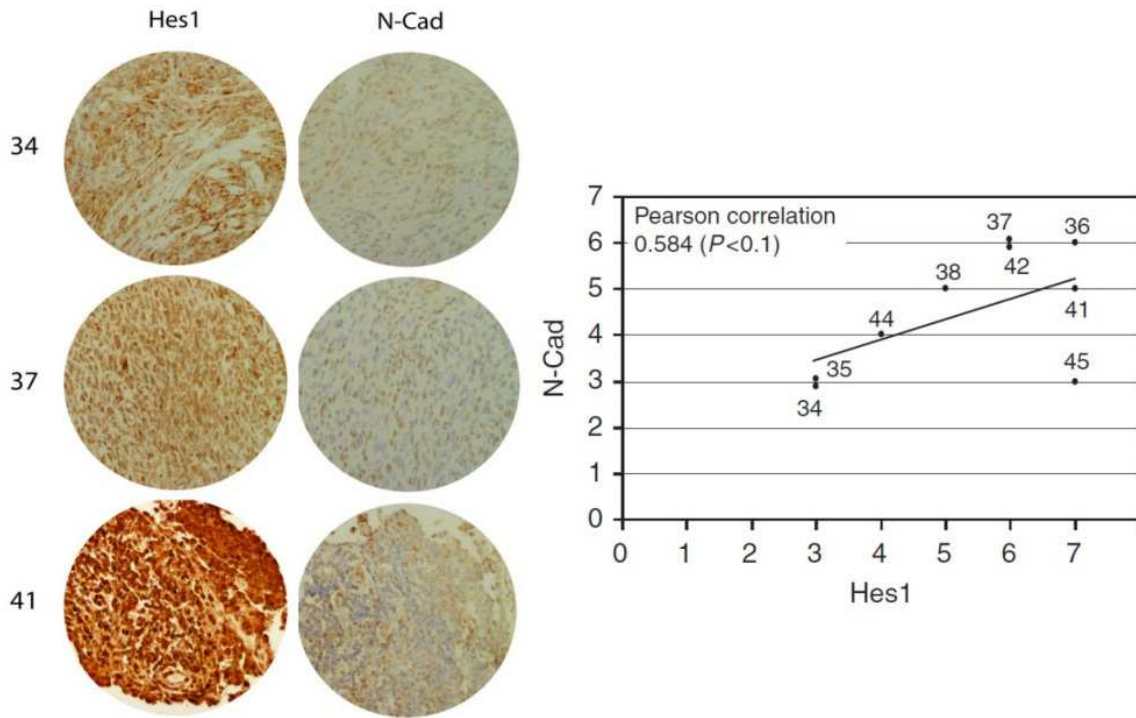


Figura R.21 La expresión de N-Caderina se correlaciona con la de Hes1 en tumores de RMS. A, secciones representativas de tres pacientes (34, 37 y 41) marcados con los anticuerpos anti-Hes1 y N-Caderina. B, plots representando la correlación entre Hes1 y N-Caderina. Los valores de la correlación de Pearson y la significancia se muestran en la esquina superior izquierda del gráfico.

R.5 La vía Notch regula la Integrina- α 9

R.5.1 La inhibición farmacológica de la vía Notch reduce significativamente la expresión de la Integrina- α 9

Los resultados obtenidos del análisis de Affymetrix (U133A) (véase **Figura R.12**), aparte de conducirnos al análisis de la N-Caderina, nos llevó a estudiar la Integrina- α 9. Para ratificar estos resultados, se compararon los niveles de expresión de la Integrina- α 9 entre las líneas celulares tratadas con el GSI-XXI y las líneas celulares tratadas con DMSO (control) mediante RT-PCR y Western-blot. Los niveles de mRNA mostraron una reducción significativa del 80% para las líneas celulares RH30 y CW9019, y del 60% para HTB82 en comparación con el control (100%) (**Figura R.22A**). Se analizó la expresión de mRNA Hes1 como control de la correcta inhibición de la vía Notch (**Figura R.22B**). A pesar de que no se consiguió una inhibición completa de la vía Notch (**Figura R.22B**), pudimos observar una reducción clara en los niveles de proteína de la Integrina- α 9 en las tres líneas celulares estudiadas (**Figura R.22C**). En la figura se muestra también la reducción de los niveles de proteína de Hes1 y NICD como marcador de la inhibición de la vía Notch (**Figura R.22C**). En la parte inferior del panel de Western-blot se muestran las cuantificaciones realizadas mediante análisis de densitometría.

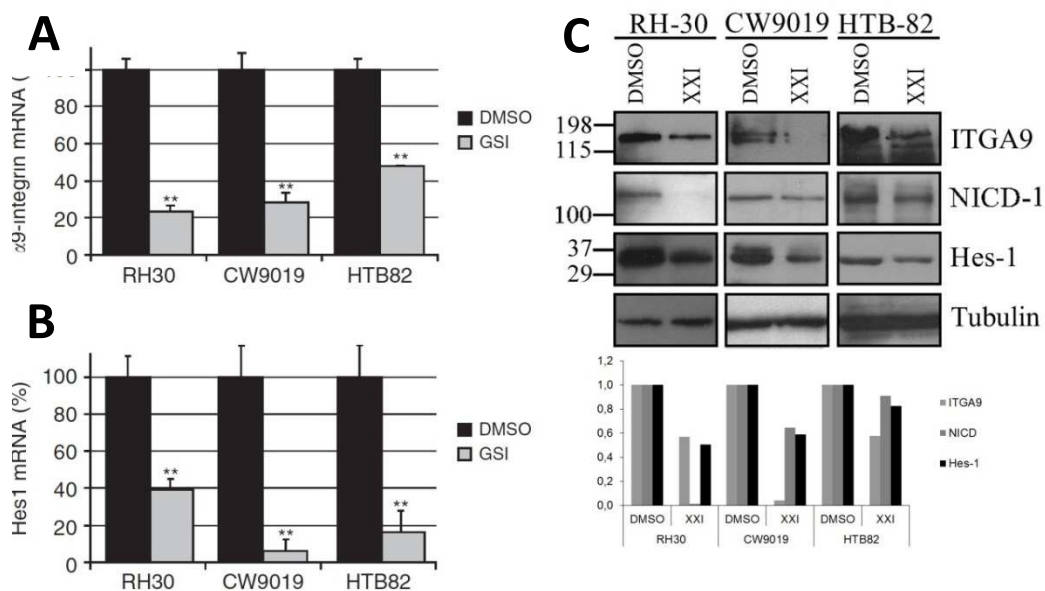


Figura R.22 La inhibición farmacológica de Notch reduce significativamente la expresión de la Integrina- α 9. Niveles relativos de mRNA evaluados mediante PCR cuantitativa en presencia (GSI) o ausencia (DMSO) de los inhibidores de la γ -secretasa de Integrina- α 9 (A) y de Hes1 (B). En la parte inferior del panel de Western-blot se muestran las cuantificaciones realizadas mediante análisis de densitometría. Los niveles de Integrina- α 9 y Hes1 fueron evaluados por triplicado. *, $P < 0,005$. C, un panel de Western-blot mostrando los efectos de los GSIs en los niveles de Integrina- α 9, NICD1 y Hes1 comparado con muestras no tratadas (DMSO). Se utilizó la tubulina como control de carga.

R.5.2 La modificación genética de la activación de la vía Notch regula la Integrina- α 9

Con el objetivo de verificar que los efectos observados por los fármacos no eran debidos a la implicación de otras vías celulares o al efecto directo de las drogas sobre la Integrina- α 9 modificamos genéticamente la actividad de la vía Notch transfectando varias construcciones que contenían el ligando de Notch (Delta) y el dnMAML1.

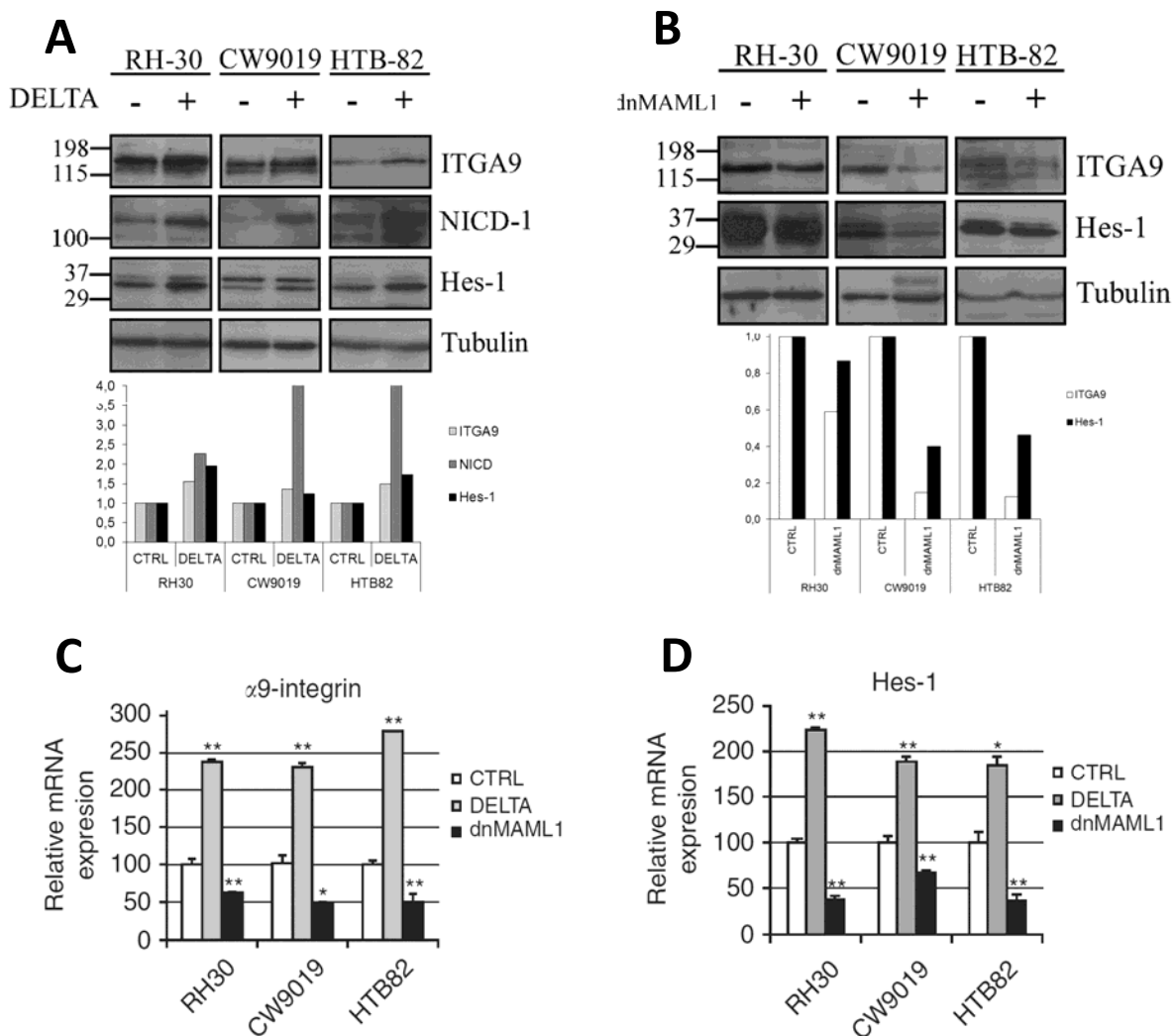


Figura R.23 La modificación genética de la vía Notch regula la expresión de la Integrina- α 9. Las líneas celulares de RMS transfectadas con Delta y dnMAML1 muestran respectivamente un incremento y una reducción en la activación de la vía Notch (Hes1) y en la expresión de la Integrina- α 9 a nivel de proteína (A, B). En la parte inferior de cada panel de Western-blot se muestran las cuantificaciones realizadas mediante análisis de densitometría. Las variaciones asociadas a las modificaciones genéticas de la vía Notch observadas en proteínas, se observan también a nivel de mRNA de Integrina- α 9 y Hes1 (C, D). Todas las medidas de RNA fueron cuantificadas por triplicado. **, $P < 0,005$; *, $P < 0,05$. La eficacia de transfección fue del 40% en RH30, del 60% en CW9019 y del 50% en HTB82.

La activación de la vía por transfección mediante Delta dio lugar a un aumento en los niveles de Integrina- α 9, tanto a nivel de proteína como de mRNA (Figura R.23). Los resultados fueron

similares para las tres líneas celulares analizadas. Se observó un incremento de aproximadamente el 50% a nivel de proteína y de aproximadamente el doble a nivel de mRNA comparado con sus respectivos controles (**Figura R.23A y C**). Se analizó la expresión de Hes1 y NICD1 a nivel de proteína, y de mRNA de Hes1 como control de una correcta transfección y activación de la vía Notch (**Figura R.23A y D**). Contrariamente, se observó que al inhibir la vía mediante el dnMAML1 se producía una reducción significativa en los niveles de expresión de la Integrina- α 9. A nivel de mRNA se observó una disminución del 60% en las líneas celulares RH30 y CW9019 y del 40% en la línea celular HTB82 comparado con sus respectivos controles (**Figura R.23C**). Las variaciones asociadas a las modificaciones genéticas de la vía Notch (transfección dnMAML1) observadas en mRNA, se observan también a nivel de proteína reduciéndose la mitad o más de la mitad en las tres líneas celulares analizadas (**Figura R.23B**). Con el objetivo de verificar los resultados anteriores, realizamos un estudio de expresión mediante IC en las tres líneas celulares. Se compararon los niveles de expresión de Hes1 e Integrina- α 9 en células que contenían las construcciones del ligando de Notch (Delta) y el dnMAML1 con células transfectadas con el vector vacío (control). La IC reveló una expresión moderada de la Integrina- α 9 en células no transfectadas. Se observó una tinción citoplasmática, perinuclear y en membrana celular. Cuando las células fueron transfectadas con Delta se observó un aumento significativo en la expresión de la Integrina- α 9 (**Figura R.24A, B y C**), conservando el patrón de localización de la proteína endógena en todas las líneas celulares. Contrariamente, tal y como se esperaba, los resultados revelaron una disminución significativa en la expresión de la Integrina- α 9 en células transfectadas con el dnMAML1 (**Figura R.24A, B y C**). La disminución fue muy similar en las tres líneas celulares. Se evaluó la expresión de Hes1 como control de la inhibición de la vía Notch. Tal y como se muestra en la figura, la inhibición de Hes1 no fue completa (**Figura R.24D**) permitiendo evaluar la expresión de la Integrina- α 9, ya que a mayor inhibición de Hes1 las células perdían su capacidad adhesiva siendo muy costoso realizar el ensayo de IC. Además observamos que la inhibición de la vía Notch, mediante el dnMAML1, producía una redistribución en la localización celular de la Integrina- α 9. En las células control, la expresión de esta proteína se localizaba principalmente en la membrana citoplasmática, sobre todo en la parte frontal de las células; mientras que en las células con inhibición de la vía Notch la Integrina- α 9 estaba ampliamente distribuida por todo el citoplasma y en la zona perinuclear (**Figura R.24E**).

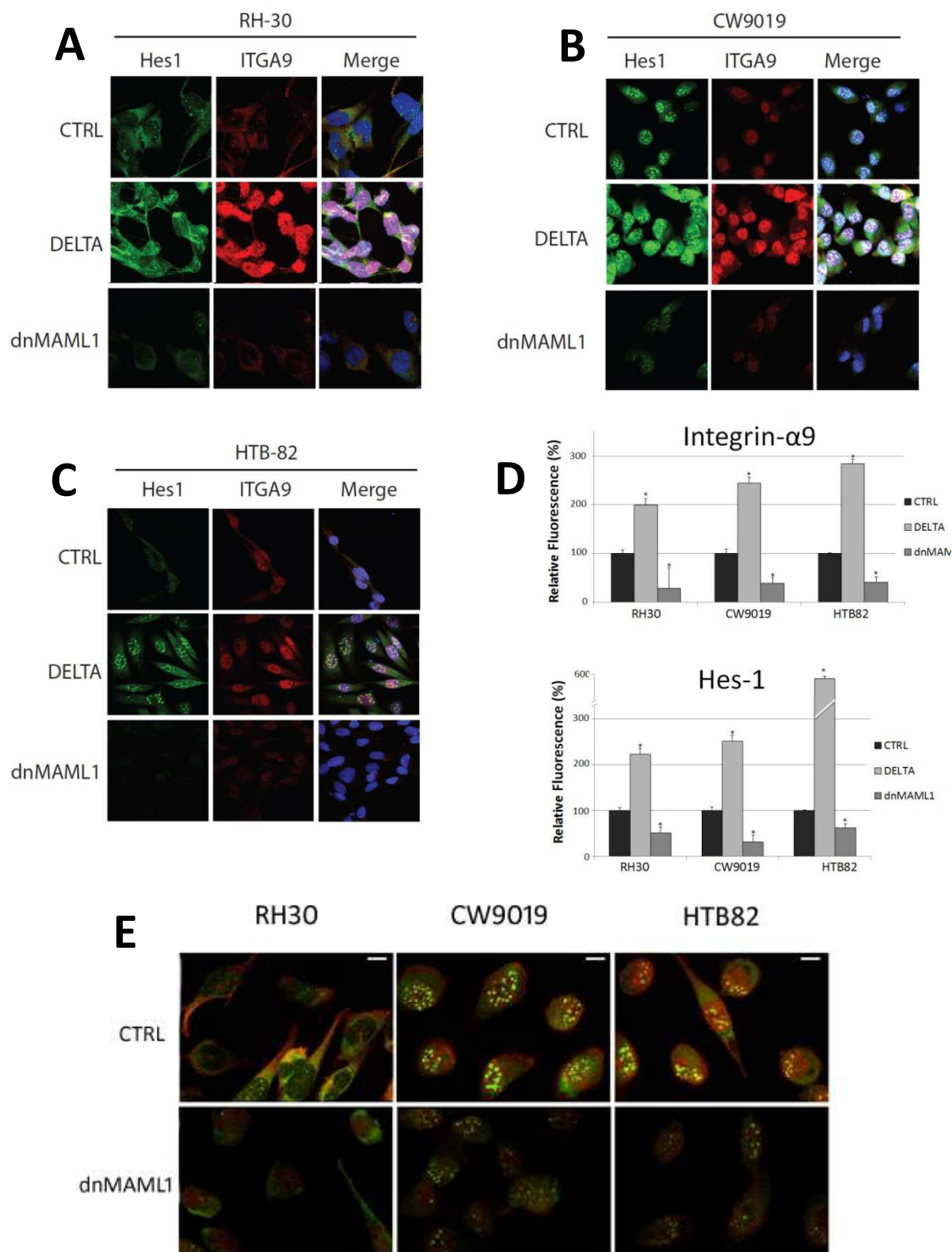


Figura R.24 La modificación genética de la vía Notch reduce la expresión de la Integrina- α 9 causando una redistribución en su localización celular. A, doble inmunocitoquímica con anticuerpos anti-Hes1 (Hes1) y anti-Integrina α 9 (ITGA9) en células transfectadas con Delta y el dnMAML1 en las tres líneas celulares (A, B y C). La tinción es la siguiente: Hes1 (verde), Integrina- α 9 (rojo) y tinción nuclear (azul). D, cuantificación de la IC. En todas las cuantificaciones, al menos 100 células fueron evaluadas en experimentos duplicados. E, imágenes captadas con el microscopio de fluorescencia de las tres líneas celulares transfectadas con el dnMAML1 o el control (CTRL) donde se muestra la localización de la Integrina- α 9. Barra, 40, 30 y 20 μ m en RH30, CW9019 y HTB82 respectivamente. *, $P < 0,005$. *, $P < 0,05$. La eficacia de transfección fue del 40% en RH30, del 50% en CW9019 y del 40% en HTB82.

R.5.3 El bloqueo específico de la Integrina- α 9 reduce la adhesividad y movilidad en células de RMS

De igual modo que en el caso de la N-Caderina, se llevó a cabo una serie de ensayos funcionales (ensayo de adhesividad, invasividad y *wound healing*) en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante específico de la Integrina- α 9 para dilucidar la posible implicación de ésta en células de RMS. La hipótesis de partida fue que la Integrina- α 9 podía ejercer un papel decisivo en el aumento de las capacidades migratorias e invasivas de las células de RMS mediada por Notch. El objetivo principal de estos experimentos era analizar si la inhibición de la funcionalidad de la Integrina- α 9 era suficiente para compensar el aumento de adhesividad, y/o invasividad, y/o movilidad observado en células de RMS con una activación constitutiva de la vía Notch.

La capacidad adhesiva se evaluó, al igual que en el caso de la N-Caderina, cuantificando la fracción de células que después de formar adhesiones iniciales resistieron a la fuerza convencional propia de ensayos de lavado y se evaluaron en porcentaje respecto al control (líneas celulares transfectadas con pCDNA3.1). Los resultados mostraron que las células transfectadas con Delta al ser tratadas con el anticuerpo bloqueante anti-Integrina- α 9 revertían su fenotipo a uno menos adhesivo, típico de la línea celular sin transfectar (100%) (**Figura R.25A**). El efecto del anticuerpo fue muy similar en las tres líneas celulares, disminuyendo la capacidad adhesiva en un 40-60% en comparación con sus respectivas líneas celulares transfectadas con Delta. Estos resultados sugirieron que el aumento observado de adhesividad al sobreexpresar la vía Notch era debido, al menos en parte, al efecto de la regulación de la Integrina- α 9.

El uso del anticuerpo bloqueante no produjo ningún efecto significativo en la velocidad de cierre de la herida (**Figura R.25B**), analizado mediante el ensayo de *wound healing*. Las líneas celulares con sobreactivación de la vía Notch y tratadas con el anticuerpo bloqueante conservaban el mismo fenotipo móvil que las líneas celulares transfectadas con Delta. Estos resultados sugirieron un papel poco relevante de esta molécula en los procesos de migración celular.

Finalmente, el uso del anticuerpo bloqueante de la Integrina- α 9 mostró tener unos efectos notorios en la capacidad invasiva de las células de RMS. Se analizó la capacidad invasiva, cuantificando el número de células que habían migrado a la parte inferior del matrigel y se analizaron en porcentaje con respecto al control (líneas celulares transfectadas con pCDNA3.1). Los resultados mostraron que el anticuerpo bloqueante revertió el fenotipo invasivo de las células transfectadas con Delta a uno menos invasivo, típico de las líneas

celulares sin transfectar. Los efectos observados fueron similares en las tres líneas celulares, reduciendo aproximadamente cinco veces el porcentaje invasivo de las células transfectadas (Figura R.25C). Estos resultados indicaron un papel relevante de la Integrina- $\alpha 9$ en la capacidad invasiva de las células de RMS.

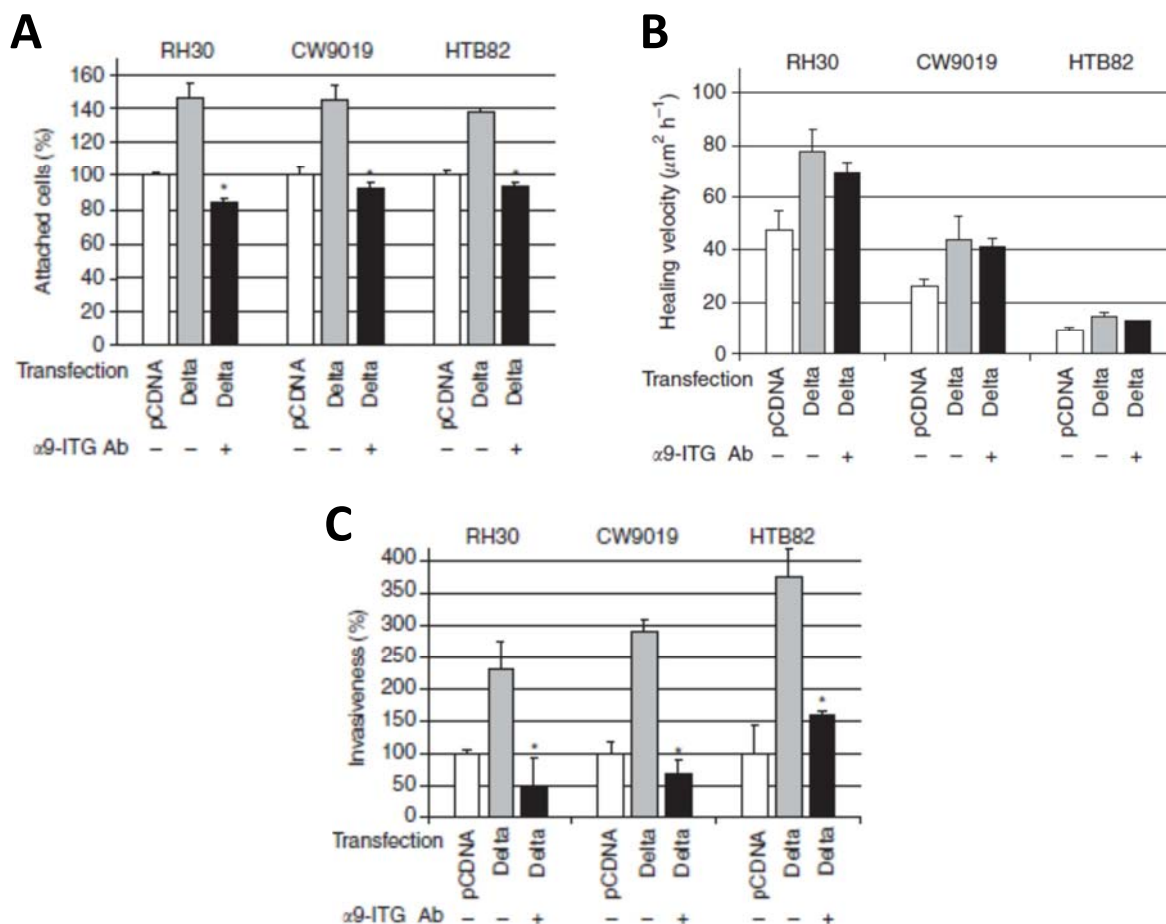


Figura R.25 El bloqueo específico de la Integrina- $\alpha 9$ reduce las propiedades invasivas de las células de RMS. Las tres líneas celulares fueron transfectadas con las construcciones indicadas al pie de las gráficas (pCDNA, Delta) en presencia (+) o ausencia (-) del anticuerpo bloqueante anti-Integrina- $\alpha 9$ ($\alpha 9$ -ITG Ab) tal como indica la figura. A, ensayo de adhesión en placas recubiertas con fibronectina. El porcentaje de las células adheridas fue cuantificado por triplicado en cada condición (línea celular, transfección y tratado o no tratado). B, ensayo de *wound healing*. Todas las barras indican la media de la velocidad de cierre de 8 muestras independientes de cada condición (línea celular transfectadas, tratadas o no tratadas). C, ensayo de matrigel/*transwell*. La invasión se representa como porcentaje de las células presentes en el compartimiento de abajo respecto al control. Cada barra representa la media de tres pocillos independientes. **, P<0,005; *, P<0,05.

R.5.4 NICD1 y Hes1 se unen al promotor de la Integrina- $\alpha 9$

Se procedió a analizar la posible interacción de los efectores *downstream* Hes1 y NICD con la región promotora de la Integrina- $\alpha 9$ mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Los resultados revelaron una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas NICD y Hes1 con la región reguladora de la Integrina- $\alpha 9$. El control de las IgGs no mostró

amplificación (**Figura R.26**). Estos resultados sugieren una unión directa de estos efectores *downstream* con la región promotora del gen de la Integrina- α 9.

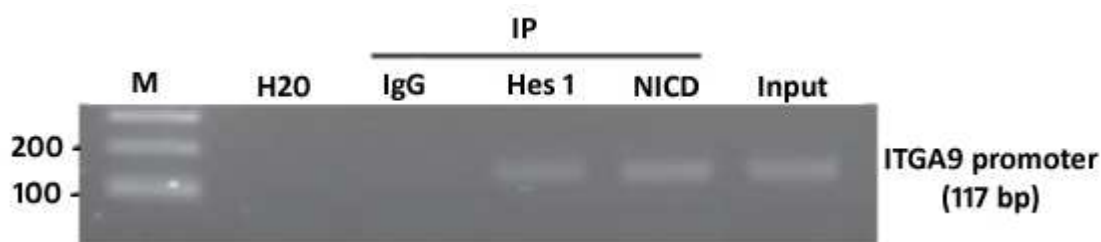


Figura R.26 Unión del NICD y Hes1 con la región promotora de la Integrina- α 9. Se analizaron lisados de células RH30 mediante un ensayo de ChIP usando anticuerpos específicos contra Hes1, NICD y IgG de conejo como control. La inmunoprecipitación de cromatina fue amplificada mediante PCR usando la región específica del promotor de la Integrina- α 9. IgG: control negativo IgG de conejo; Input: 5% de lisado celular sonificado usado para la IP; H2O: control negativo de la PCR; M: 100bp de marcador de DNA.

R.5.5 La Integrina- α 9 está ampliamente expresada en pacientes de RMS

Se estudió la expresión de la Integrina- α 9 en un panel de 22 muestras de tumores primarios de RMS mediante RT-PCR. Se compararon los niveles de RNAs de los tejidos tumorales (aRMS y eRMS) con niveles de RNA de músculo adulto y fetal (AM y FM).

Tomando como tejido de referencia AM, conocido por sus elevados niveles de expresión de Integrina- α 9 (160), los resultados mostraron una amplia distribución de esta proteína, expresándose moderadamente incrementada en los RMS. Al comparar los resultados con la expresión FM, observamos niveles similares de expresión de la Integrina- α 9, sugiriendo que esta proteína también está constitutivamente activada en el proceso de la miogénesis (**Figura R.27**).

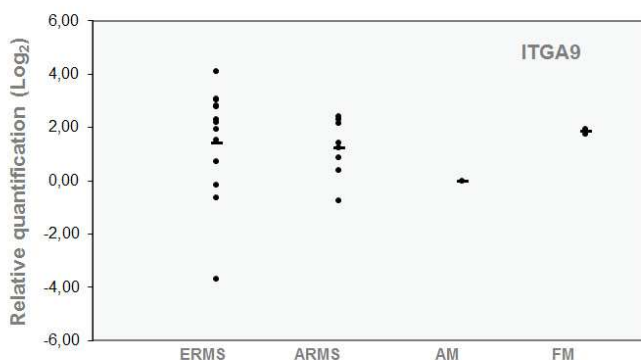


Figura R.27 La Integrina- α 9 está ampliamente expresada en pacientes de RMS. Box-plot mostrando la expresión de la Integrina- α 9 mediante RT-PCR en tumores de RMS. Los resultados fueron normalizados usando valores de AM como línea de base (valores $\log_2 = 0$). AM, músculo adulto, FM, músculo fetal, ERMS, RMS embrionario, ARMS, RMS alveolar.

Hasta el momento, no ha sido posible establecer una relación entre la activación de la vía y las características clínicas y evolutivas de los pacientes dada la reducida muestra con la que contamos al ser un tumor tan poco frecuente (véase **Anexo 1**).

R.5.6 La Integrina- α 9 se correlaciona con Hes1 en tumores de RMS

Se realizó un ensayo de IHC con el objetivo de analizar si existía correlación entre Hes1 e Integrina- α 9 en pacientes de RMS, tal como se había observado en las líneas celulares. A pesar de que el número de muestras fue limitado (n=9), los resultados mostraron una correlación entre la expresión de Hes1 e Integrina- α 9 (**Figura R.28**), con una correlación de Pearson de 0.771 ($p < 0.05$). Lo que sugiere una dependencia entre ambas proteínas. Esta correlación observada en pacientes, confirma los hallazgos encontrados en las líneas celulares.

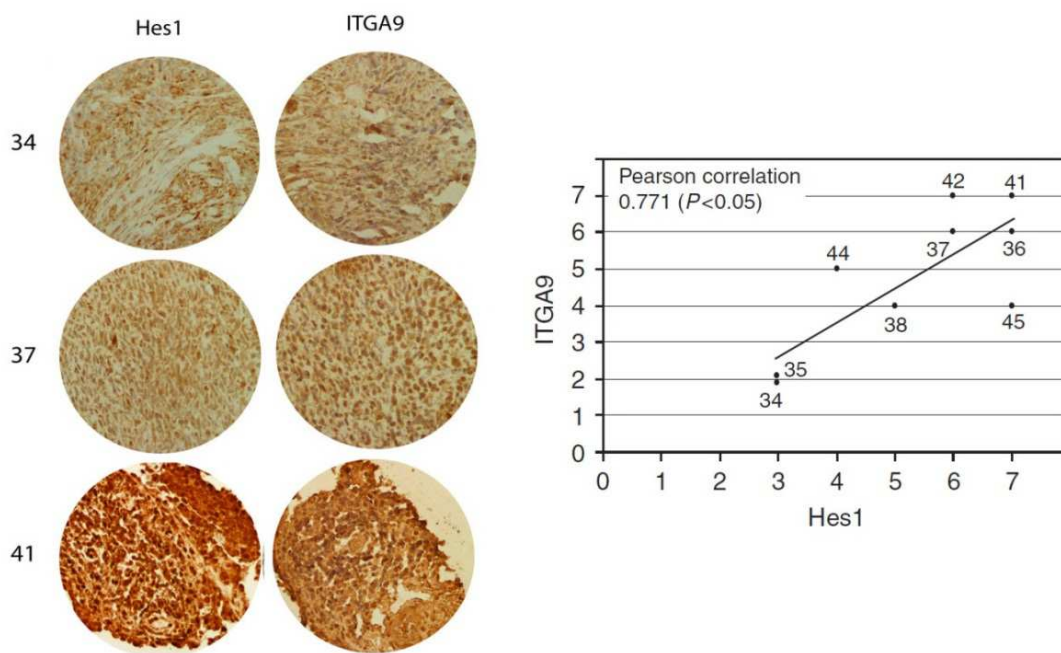


Figura R.28 La expresión de la Integrina- α 9 se correlaciona con la de Hes1 en tumores de RMS. A, secciones representativas de tres pacientes (34, 37 y 41) marcados con los anticuerpos anti-Hes1 e Integrina- α 9. B, plots representando la correlación entre Hes1 e Integrina- α 9. Los valores de la correlación de Pearson y la significancia se muestran en la esquina superior izquierda del gráfico.

R.6 El tratamiento con GSI inhibe el crecimiento de tumores de RMS en un modelo de xenotransplante murino de RMS

R.6.1 Generación de un modelo de xenotransplante murino de RMS

Con lo anterior expuesto se ha demostrado la implicación de la vía Notch en la activación de procesos que permiten la movilidad e invasividad *in vitro* en RMS. Sin embargo, no se ha descrito la implicación de esta vía en el microambiente tumoral propio de pacientes de RMS. Por ello se llevó a cabo la generación de un modelo murino de RMS para caracterizar la vía Notch *in vivo* y estudiar el posible uso de los GSIs como terapia complementaria dirigida contra las células neoplásicas del RMS.

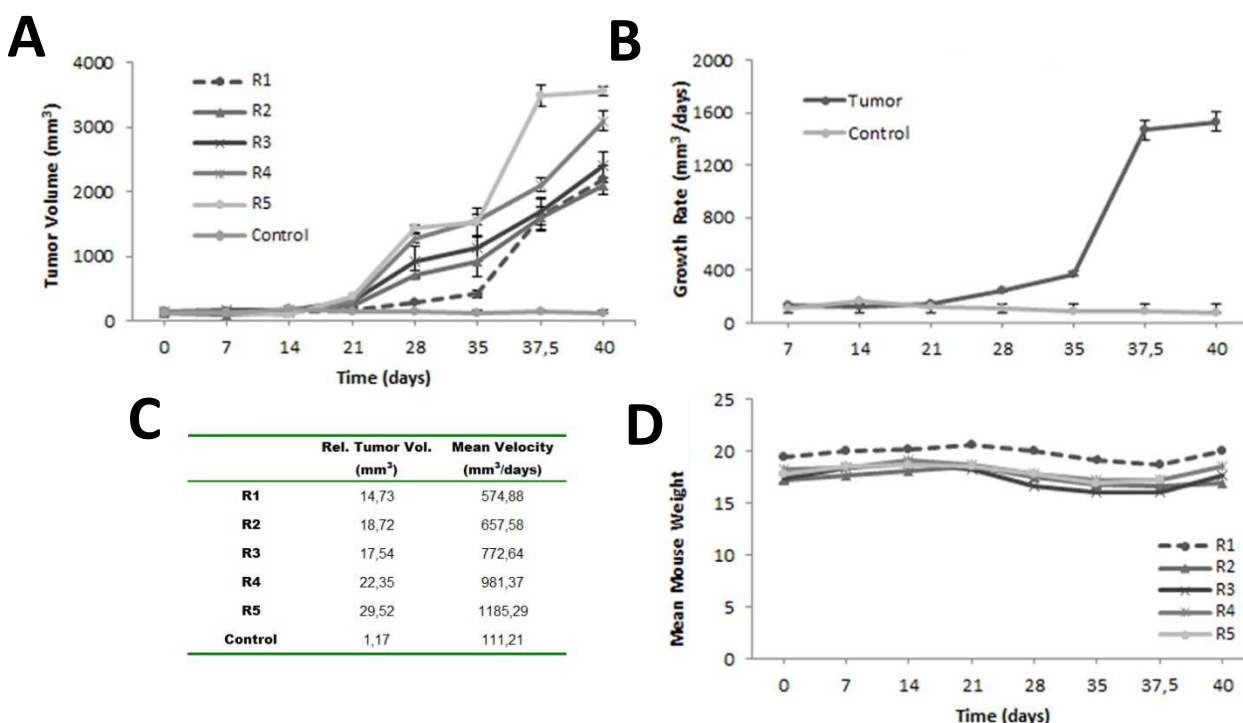


Figura R.29 Generación de un modelo de xenógrafo ortotópico de tumor de RMS. A, cinética del crecimiento tumoral utilizando como inóculo inicial 1 millón (R1), 2 millones (R2), 3 millones (R3), 4 millones (R4) y 5 millones (R5). B, la tabla muestra el volumen relativo del tumor (Rel. Tumor Vol.) y la velocidad media de crecimiento (*Mean Velocity*). C, cinética de crecimiento del modelo seleccionado R1. D, representación de los pesos de los ratones como índice de bienestar. R1-5, ratones inoculados con 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 y 5×10^6 células respectivamente.

Para la generación del modelo murino, se determinó el número de células a inyectar, inoculando 1, 2, 3, 4 y 5 millones de células tumorales RH30-pEGFP-Luciferasa en los músculos de las extremidades posteriores derechas de cinco ratones SCID (*Severe combined immunodeficiency*) (R1, R2, R3, R4, R5) respectivamente. Las extremidades izquierdas se usaron como control. Los resultados mostraron un aumento visible y calculable del volumen

del tumor a partir del día 21 de la inoculación (**Figura R.29A**). Al día 40 de la inoculación el volumen del tumor ya era mayor de 0,2 cm³ y se procedió a sacrificar a los ratones, tal y como estipulaba el comité ético. A pesar del gran crecimiento de los tumores, el bienestar de los ratones fue bueno, evaluado a través de los pesos (**Figura R.29D**) y aspecto físico de los ratones. Tal y como esperábamos a mayor número de células inoculadas, mayor era el volumen relativo del tumor y mayor la velocidad media de crecimiento (**Figura R.29B**). Seleccionamos el modelo R1 (inoculación de 1x10⁶) para evaluar los efectos de la inhibición de la vía Notch *in vivo*, ya que era el modelo que mostraba un crecimiento relativo y una velocidad media menor. La cinética de crecimiento de este modelo queda reflejada en la gráfica B (**Figura R.29B**).

R.6.2 El tratamiento con DAPT inhibe la activación de la vía Notch *in vivo*

En base a los estudios realizados por Konoshi J. y Hyde LA. y colaboradores (100, 208) testamos dos concentraciones diferentes de DAPT de 1 μm y 5 μm en 8 ratones SCID, inoculados previamente con la línea celular RH30-GFP-Luciferasa. Los grupos de estudio se compararon con un grupo control tratado con placebo, tal y como se describe en la sección de **Materiales y Métodos**. Los ratones fueron sacrificados a los tiempos indicados, y se procedió a la extracción de proteína y mRNA de las muestras de tumores. Para verificar el grado de inhibición de la vía Notch se compararon los niveles de expresión de Hes1 entre los grupos tratados (1 μm y 5 μm) y el grupo control.

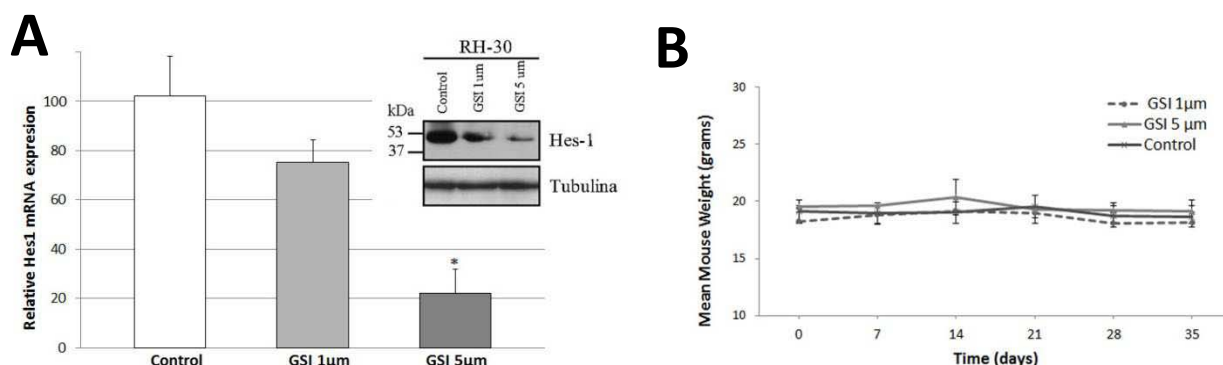


Figura R.30 El tratamiento con GSI inhibe la activación de la vía Notch *in vivo*. A, efecto del GSI en la expresión de mRNA y proteína de Hes1 en los tumores de ratones tratados con una dosis de 1 μm y de 5 μm. Los resultados de mRNA se expresan en función del grupo control (Control). A nivel de proteína se usó la α-tubulina como control de carga. B, representación de los pesos de los ratones como índice de bienestar. Significación estadística comparada con el control: *, p< 0,005. GSI, DAPT.

Los resultados mostraron una disminución en la expresión de Hes1, tanto a nivel de mRNA como de proteína, con ambas dosis testadas. Sin embargo, la inhibición de la vía fue mucho mayor a más concentración (5 $\mu\text{mol/Kg}$), produciéndose una reducción de aproximadamente un 80% en los niveles de mRNA (Figura R.30A). Dado que ninguna de las dosis administradas producía efectos tóxicos en los ratones, evaluado a través de la pérdida de peso del animal (Figura R.30B), la dosis seleccionada fue 5 μm .

R.6.3 El tratamiento con DAPT inhibe el crecimiento de tumores de RMS *in vivo*

Para dilucidar si el tratamiento con DAPT producía efectos en el crecimiento del tumor *in vivo*, inoculamos ortotópicamente células RH30-pEGFP-Luciferasa en el músculo gastrocnemio de las extremidades posteriores derechas de los ratones. En base a nuestros datos iniciales, administramos diariamente por vía intraperitoneal el fármaco a una dosis de 5 $\mu\text{mol/Kg}$ durante 35 días, empezando un día después de la inoculación de las células. Todos los ratones controles recibieron intraperitonealmente un volumen igual de solución de soporte (DMSO).

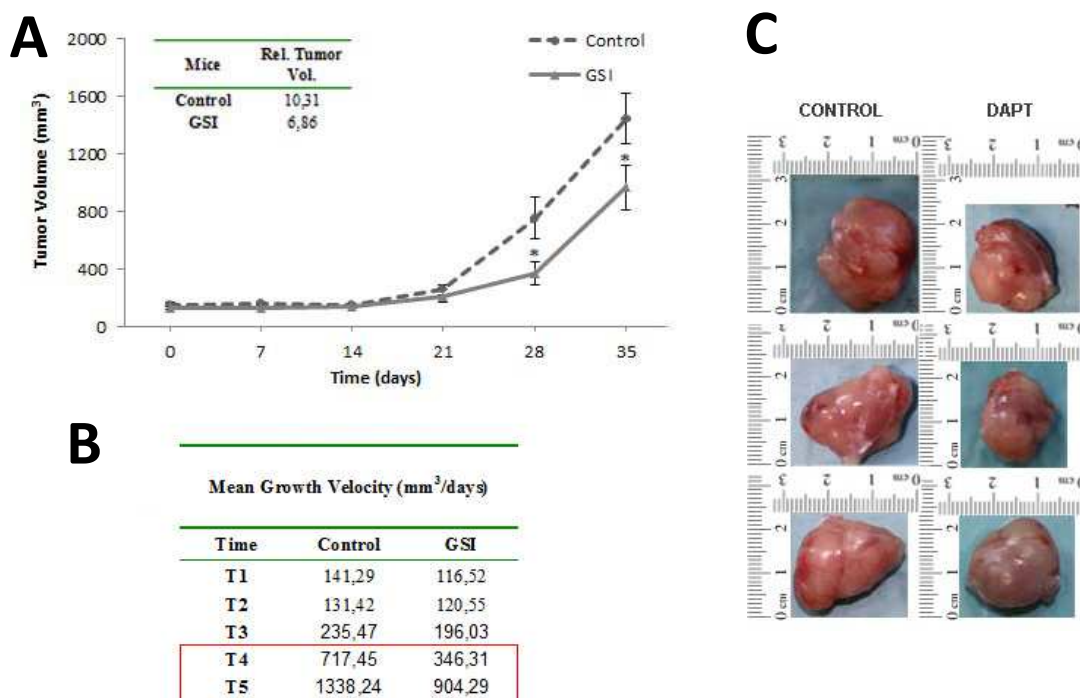


Figura R.31 El tratamiento con GSI inhibe el crecimiento de tumores de RMS *in vivo*. A, promedio del crecimiento del tumor de 8 ratones SCID tratados con GSI 5 $\mu\text{mol/Kg}$ y tratados con placebo. La tabla indicada en la esquina superior izquierda de la gráfica muestra el volumen relativo del tumor de ambos grupos de estudio. B, tabla que muestra la velocidad media de crecimiento del tumor a lo largo del tratamiento. C, fotografías de varios tumores en el momento del sacrificio de los animales. Significación estadística comparada con el control: *, $p < 0,005$. GSI, DAPT; Rel. Tumor Vol, volumen relativo del tumor.

La **Figura R.31A** muestra que el tratamiento con GSI 5 $\mu\text{mol/Kg}$ tiene un efecto antitumoral notable, observando una disminución significativa del tamaño del tumor a partir del día 28 de tratamiento (**Figura R.31A**). El volumen relativo del tumor a las 35 semanas de tratamiento es de 10.31 para el grupo control y 6.86 para el grupo tratado, siendo significativa la diferencia entre ambos grupos (**Figura R.31A** tabla). La **Figura R.31B** muestra la velocidad media de crecimiento del tumor a lo largo del tratamiento. Como se observa, a partir de T4 (28 días) se observa una disminución en la velocidad de crecimiento de aproximadamente $400 \text{ mm}^3/\text{días}$.

DISCUSIÓN

D.1 La vía Notch en Rabdomiosarcoma: consideraciones iniciales

El RMS es el sarcoma de partes blandas más común de la infancia y de la adolescencia. Es generalmente curable en la mayoría de los niños con enfermedad localizada. Sin embargo los pacientes con enfermedad diseminada continúan teniendo un mal pronóstico a pesar del uso de terapias intensivas. La principal causa de muerte de estos pacientes es la formación de metástasis (3, 6).

El RMS surge como consecuencia de una disrupción en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células precursoras de la miogénesis (34). No se sabe cuál es exactamente el mecanismo responsable de esta disrupción, ni en qué punto falla el proceso de la miogénesis para acabar convirtiendo las células miogénicas en células malignas. El avance en el conocimiento de los procesos biológicos que subyacen en el desarrollo y mantenimiento del RMS puede ayudar al progreso de nuevas terapias específicas contra esta patología.

Con el fin de conocer mejor la biología del RMS, se llevó a cabo un estudio en colaboración con el Dr. Schaaf (Amsterdam, Netherlands), donde se identificaron genes que aparecían anormalmente regulados en las células de RMS en comparación con el músculo esquelético normal (AM). El objetivo de este estudio fue encontrar genes implicados en el origen, mantenimiento y progresión del RMS. Estos resultados nos llevaron a analizar en profundidad el papel de la vía Notch en esta patología (véase **Figura R.1**).

El papel que jugaba la vía Notch en RMS era totalmente desconocido al inicio de nuestro estudio. La hipótesis inicial planteada fue que la vía Notch podría estar implicada en el mantenimiento del estado inmaduro muscular característico del RMS. Para sustentar esta hipótesis nos basamos en los siguientes antecedentes: i) El perfil oncogénico de la vía en una gran variedad de tumores, tales como T-ALL (89), cáncer de ovario (90), mama (91) y tumores sólidos pediátricos (92-95). ii) La implicación de la vía Notch en la miogénesis y activación de las células satélites. La vía Notch juega un papel importante en la regulación embrionaria y post-natal en la miogénesis esquelética, así como en el mantenimiento de las células satélites en el músculo esquelético maduro (27, 33, 82, 83). El RMS es un tumor embrionario que presenta un perfil de expresión parecido al de las células musculares fetales (202). Este estado inmaduro característico del RMS podría deberse a un defecto en la regulación de la vía Notch. Partiendo de esta hipótesis estudiamos el potencial oncogénico de la vía Notch en RMS, lo que nos llevó a profundizar sobre los mecanismos responsables de los procesos de metástasis

(véase **D.2 Estudio de los mecanismos moleculares responsables del control del proceso de metástasis en RMS**).

D.2 Estudio de los mecanismos moleculares responsables del control del proceso de metástasis en RMS

D.2.1 La inhibición de la vía Notch reduce la invasividad y movilidad en RMS

Uno de los criterios previos para establecer la importancia de una vía de señalización en un tejido es determinar si esta vía está expresada y activada en este tejido. En este trabajo, se ha evidenciado una expresión notable de varios receptores y efectores *downstream* de la vía Notch en todos los RMS analizados (n=37). Ha sido llamativa la sobreexpresión de *NOTCH2* comparada con el AM. Del mismo modo, se ha observado una expresión significativa de *NOTCH3*, *HES1* y *HEY1* en la mayoría de los tumores analizados. Estos resultados evidencian una expresión redundante de los miembros de la vía Notch en RMS. Una probable explicación de este hecho, es la importancia de esta vía de señalización en el proceso de la miogénesis y la necesidad de la existencia de múltiples receptores para permitir la amplificación de la señalización. La sobreexpresión de la vía Notch en RMS podría deberse a la existencia de varias influencias *upstream* de la vía, tales como Ras, la cual se ha visto implicada en la activación de la vía Notch (73); las vías de señalización Wnt y TGF β 1, y su interacción directa con el NICD (68, 69, 75, 77); y finalmente la vía de señalización Hedgehog, que activa la transcripción del efector *downstream* Hes1 (80).

Dada la sobreexpresión observada de los componentes de la vía Notch en tumores primarios, se utilizaron tres líneas celulares de RMS (RH30, CW9019 y HTB82) como modelo para el estudio de la activación e implicación de la vía Notch. Los resultados mostraron una correlación significativa entre la activación de la vía y la oncogenicidad de las líneas. La línea celular HTB82 proviene de un subtipo embrionario, el cual se asocia al fenotipo más benigno de la patología. Su invasividad es mínima y la activación de la vía Notch es prácticamente ausente. En contraste, la línea celular RH30 proviene de un subtipo alveolar con translocación en *PAX3-FOXO1*, representando el fenotipo más agresivo. Esta línea celular ha mostrado ser altamente invasiva en cultivo y presenta elevados niveles de activación de la vía Notch. Finalmente, la línea celular CW9019 proviene de un subtipo alveolar con translocación *PAX7-FOXO1*, la cual se asocia a un fenotipo moderadamente agresivo. En concordancia con los resultados anteriores, esta línea ha manifestado ser considerablemente invasiva, pero menos que RH30, y ha presentado niveles intermedios de la activación de la vía Notch comparado con las otras dos líneas celulares (véase **Figura R.4**). Esta observación ha sido particularmente interesante porque sugiere que la activación de la vía Notch puede ser responsable, al menos en parte, de los mecanismos metastásicos de las células invasivas del RMS.

Para elucidar la implicación de la vía Notch en la oncogenicidad del RMS, se testaron varios inhibidores de γ -secretasa (GSIs). Pollack SJ. y Lewis H. fueron los primeros en usar estos inhibidores como posibles agentes terapéuticos contra la enfermedad de Alzheimer (209). Desde entonces, han sido muchos los autores que han utilizado estos inhibidores para estudiar la implicación de la vía Notch en varias patologías, tales como en mieloma múltiple, en linfomas de células B y T y en glioblastoma (210, 211, 212). En este trabajo, se ha demostrado la utilidad de varios GSIs como inhibidores de la vía en las tres líneas celulares de RMS analizadas. De los cuatro GSIs estudiados, tres de ellos (DAPT, GSI-XX y GSI-XXI) han resultado ser buenos inhibidores, mientras que el GSI-X ha demostrado tener unos efectos moderados o prácticamente nulos. La inhibición de Notch mediada por GSIs, a pesar de que no consiguió una supresión total, ha mostrado tener efectos relevantes en la pérdida de movilidad e invasividad celular *in vitro*. Estos resultados sugieren que la vía Notch es responsable, al menos en parte, del control de mecanismos que permiten a las células de RMS migrar e invadir hacia órganos distales (véase **Figura R.6 y R.7**).

Aproximadamente 55 proteínas de membrana son proteolizadas por la γ -secretasa (213), un hecho que hay que tener presente antes de atribuir los efectos de los GSIs a una única vía de señalización. Por eso, en este trabajo se validaron todos los resultados obtenidos mediante un sistema de inhibición de la vía Notch independiente de los GSIs. Se creó un modelo en el cual el NICD no podía activar las dianas de la vía debido a la sobreexpresión de una forma truncada de MAML1 que actuaba como dominante negativo (dnMAML1), quedando intacta la proteólisis de Notch. Usando esta metodología se han observado efectos prácticamente idénticos a los obtenidos con los GSIs, confirmando más específicamente que la inhibición de la vía Notch produce los efectos observados sobre movilidad e invasividad en células de RMS *in vitro*.

La adquisición de propiedades invasivas está estrechamente relacionada con cambios en la expresión de las CAMs, tales como las caderinas y las integrinas. Durante la progresión del tumor, las células malignas suelen infra-regular proteínas que median la adhesión a la membrana basal y a células vecinas y, al mismo tiempo, promueven la expresión de moléculas de adhesión que facilitan la interacción dinámica con componentes de la matriz promoviendo la formación de metástasis (108, 109). Estudios recientes han descrito la implicación de la vía Notch en la movilidad e invasividad celular de sarcomas pediátricos (35, 92), sin embargo, no se ha descrito el mecanismo mediante el cual la vía Notch regula estos procesos celulares. En este trabajo se ha demostrado la existencia de una conexión entre la activación de la vía Notch y la regulación de mecanismos responsables de la movilidad e invasividad celular en RMS.

Además se ha implicado a varias moléculas de adhesión como responsables de la inducción de estos procesos celulares. Con la finalidad de esclarecer qué moléculas de adhesión estaban implicadas en estos procesos, se realizó un estudio de expresión mediante una plataforma de microarray de muestras de líneas celulares de RMS tratadas con GSIs y no tratadas. Después de un exhaustivo trabajo de validación mediante RT-PCR y Western-blot, estos resultados nos condujeron a estudiar las moléculas de adhesión N-Caderina e Integrina- α 9.

D.2.2 La vía Notch regula la N-Caderina confiriendo un fenotipo más invasivo en células de RMS

La N-Caderina es un miembro de la familia de las caderinas clásicas tipo I, descrita por su capacidad de promover invasividad y migración en células tumorales. Aunque no se conoce con claridad el mecanismo por el cual el aumento de expresión de la N-Caderina induce malignidad, se cree que promueve adhesión de las células malignas a células del estroma o endoteliales facilitando la invasión y la migración de las células tumorales a sitios distales (117, 118). A pesar de que varios trabajos han demostrado que la expresión de la N-Caderina es suficiente para promover metástasis en algunos cánceres (119, 120) y se ha descrito una expresión aberrante de la N-Caderina en RMS (150), no existen publicaciones anteriores que hayan mostrado el papel pro-invasivo de la N-Caderina en células de RMS. En este trabajo se ha propuesto un mecanismo de inducción de la N-Caderina mediado por la vía Notch y se ha demostrado el papel central de esta molécula en la adhesión y movilidad celular en RMS.

En cuanto al mecanismo de inducción de la N-Caderina, se ha observado que la inhibición o la activación de la vía Notch han producido una disminución o un aumento en la expresión de la N-Caderina respectivamente, sugiriendo que la vía Notch podría inducir la expresión de la N-Caderina en RMS. En concordancia con estos resultados, varios estudios han descrito la implicación de la vía Notch en la regulación positiva de la N-Caderina en melanoma y en células del músculo liso arterial (148, 149). Asimismo se ha propuesto que la oncogenicidad de la vía Notch se debe, en parte, al incremento de la expresión de la N-Caderina (148). Respecto al mecanismo molecular por el cual la vía de Nocth regula la N-Caderina, Zavadil J. y colaboradores demostraron la implicación directa del efector *downstream* Hey1 como elemento clave en procesos de EMT en células epiteliales, regulando positivamente la expresión de la N-Caderina (214). Por el contrario, nuestros resultados han evidenciado que Hey1 no tiene influencia en la expresión de la N-Caderina, la cual parece estar regulada por el NICD1 y Hes1. Además se ha demostrado una interacción directa de los efectores *downstream*

NICD1 y Hes1 con la región reguladora de la N-Caderina, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (véase **Figura R.19**).

El NICD1 es un activador transcripcional que no se puede unir directamente al DNA, pero heterodimeriza con proteínas de unión al DNA activando la transcripción (215). La familia de los factores de transcripción CSL son las principales dianas de la acción transcripcional del NICD1, las cuales suelen activar los genes de la familia *HES* y *HEY*. Para que se dé esta interacción es necesario que los promotores de estos genes contengan el sitio de unión de los factores CSL. Existen múltiples evidencias de la existencia de una vía de señalización de Notch independiente de los factores CSL. Así mismo, se han descrito múltiples secuencias sensibles a ser reguladas por el NICD1, dependientes o no de factores CSL, diferentes a los de la familia *HES* y *HEY*, tal como *MEF2*, *LEF1*, *CD25*, *GATA3*, genes del complejo *MHC I*, interleucinas, *MYC*, *p21* o el gen de *Ciclina D1* (214-217). El número de dianas inmediatas de NICD1 conocidas hasta el momento es relativamente bajo. No obstante al ser muchas de ellas factores de transcripción, la amplitud de los genes regulados por Notch aumenta considerablemente. El hecho de que nuestros resultados hayan mostrado una disminución en la expresión de la N-Caderina al inhibir la vía Notch mediante el dnMAML1, sugiere que el NICD regula la N-Caderina a través de los factores CSL o de proteínas de unión al DNA que coordinen la activación transcripcional mediante el coactivador MAML1.

Por otra parte, los resultados han mostrado que Hes1 interacciona con la región reguladora del gen de la N-Caderina. Hes1 es un represor transcripcional que se puede unir directamente al DNA. Los mecanismos de acción de Hes1 conocidos hasta el momento son: unión directa a secuencias del DNA que contengan los dominios de unión *N*- y *E-box* en los promotores de los genes diana; uniones indirectas a través de otros factores de transcripción, a los cuales frecuentemente transforma en represores transcripcionales; y uniones a activadores transcripcionales bloqueando su actuación (56). Aunque por el momento no se han descrito dominios de unión del efector *downstream* Hes1 en el promotor de la N-Caderina, mediante un análisis bioinformático se ha podido observar que existen dominios de unión *N* y *E-box* en la región promotora de la N-Caderina (resultados no mostrados), sugiriendo una posible interacción a través de estos dominios. Estos resultados proponen que uno de los mecanismos de acción del NICD para regular la N-Caderina es a través del efector *downstream* Hes1. Aunque Hes1 se considera, hasta el momento, como un represor transcripcional, es bien conocida su implicación como regulador positivo de ciertos genes, tales como el *GAA* y *MASH1* (62, 63). En este trabajo no ha quedado claro si Hes1 actúa como represor o activador transcripcional de la N-Caderina. Sería concebible que el NICD y Hes1 regularan

cooperativamente la expresión de la N-Caderina, induciendo o reprimiendo en función de la proporción relativa de ambos.

Además de proponer un mecanismo de inducción de la N-Caderina, se ha demostrado la implicación de la N-Caderina en la adhesión, movilidad e invasividad celular en RMS, mediadas al menos en parte, por la activación de la vía Notch. En cuanto a la adhesividad celular, nos centramos en valorar las adhesiones intermedias o uniones a corto plazo, necesarias para que se produzca la migración celular (103). En este trabajo se ha demostrado que en líneas celulares donde habíamos activado constitutivamente la vía Notch, la inhibición de la N-Caderina mediante el anticuerpo bloqueante GC4-Ab, revertía el fenotipo a uno menos adhesivo, característico de células de RMS con una expresión endógena de la vía (véase **Figura R.16**). Estos resultados sugirieron un papel central de la N-Caderina en la formación de adhesiones intermedias, inducidas, en parte, por la activación de la vía Notch. Los posibles mecanismos que controlan la formación de adhesiones intermedias mediadas por la N-Caderina, podrían basarse en la interacción de ésta con sus ligandos y/o en la activación de varias vías de señalización, tales como la activación de las RhoA-GTPasas, las cuales se han descrito por su implicación en la formación de adhesiones célula-célula, célula-ECM (103); la activación de la vía de señalización PI3K, implicada en el control de la fuerza de adhesión mediada por integrinas (103); la implicación de las ERK MAPK quinasas, las cuales regulan los niveles de RhoA manteniendo las adhesiones intermedias (218); o la regulación de la unión β -catenina a la N-Caderina mediada por PTP1B o Fer, estabilizando la unión de ambas proteínas y aumentando las adhesiones celulares (123). La interrelación de los procesos de adhesividad y movilidad es tal que se hace difícil diferenciar ambos procesos. La movilidad celular en condiciones controladas se inicia mediante cambios en la morfología celular: en primer lugar la célula emite extensiones de membrana hacia el frente de avance, después estabiliza adhesiones intermedias a la matriz extracelular, a continuación se produce una translocación de la célula en la dirección de desplazamiento y finalmente tiene lugar una retracción del polo posterior de la célula con el desensamblaje de las estructuras de adhesión (113). Este proceso está regulado por las uniones intermedias y es mediado por las caderinas que tienen el potencial de producir cambios en la forma celular, a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, y así producir nuevas adhesiones en la superficie celular que permiten la movilidad e invasividad celular (219). Por eso no es de extrañar que, en este trabajo, se haya observado también un papel relevante de la N-Caderina en los procesos de migración celular. Se ha demostrado que la inhibición de la N-Caderina es suficiente para revertir el fenotipo móvil e invasivo típico de las células con una sobreactivación de la vía Notch a uno menos

móvil característico de células con activación endógena de la vía (véase **Figura R.17**). Además se ha observado que cuando las células de RMS son neutralizadas con el anticuerpo bloqueante de la N-Caderina pierden la direccionalidad intrínseca de migración y muestran movimientos celulares desorientados, provocando una disminución en la velocidad de cierre de la herida (véase **Figura R.17B y C**). Los mecanismos por los cuales la N-Caderina induce migración celular no sólo pueden ser debidos a cambios en el citoesqueleto de actina, sino que también se deben a la implicación de varias vías de señalización. Varios estudios han sugerido que los efectos pro-migratorios/invasivos de la N-Caderina se deben a la implicación de varias vías de señalización: el dominio extracelular de la N-Caderina interacciona con el FGFR y media la movilidad celular en células epiteliales y de cáncer de mama (119, 143); además se ha visto que la interacción entre N-Caderina y FGFR activa las MAPK-ERK, aumentando la expresión de MMP-9 y, por consiguiente, la invasión celular (140); el dominio JMD de la N-Caderina también está involucrado en el proceso de migración celular, cuando al unirse la catenina p120 se produce la activación de Rac y Cdc42 (130). Por lo tanto, Notch regularía positivamente la expresión de la N-Caderina, promoviendo su interacción con ligandos extracelulares, la cual proporcionaría las claves para definir la direccionalidad de la migración celular y activaría varias vías de señalización implicadas en procesos de invasión y migración celular.

Para verificar que esta conexión observada entre la vía Notch y la N-Caderina no era exclusiva de las líneas celulares de RMS, se analizó la expresión de la N-Caderina y del efector *downstream* Hes1 en muestras de tumor. A pesar del número reducido de muestras con el que contamos, al ser un tumor tan poco frecuente, los resultados mostraron una correlación entre la expresión de ambas proteínas, con un valor de correlación de Pearson de 0.584 ($p < 0.01$). Estos resultados sugieren una interdependencia entre la N-Caderina y Hes1, indicando la existencia de una conexión entre la vía Notch y la N-Caderina no sólo en líneas celulares si no también en tumores primarios.

D.2.3 La vía Notch regula la Integrina- α 9 confiriendo un fenotipo más invasivo en células de rhabdomyosarcoma

La Integrina- α 9 se ha implicado en procesos de migración e invasión en diferentes tipos celulares, tales como células madre hematopoyéticas, epiteliales y de meduloblastoma (154-157). Sin embargo, hasta el momento se desconocía la función de ésta en RMS. Este trabajo representa la primera descripción del potencial pro-invasivo de la Integrina- α 9 en RMS. Los resultados aquí presentes señalan la existencia de un mecanismo mediado por Notch capaz de

regular positivamente la expresión de la Integrina- α 9, la cual activa procesos de adhesividad e invasividad en células de RMS.

Estudios previos habían descrito el papel de la vía Notch en la regulación positiva de la adhesión celular a través de la activación de moléculas de la familia β 1 (194-196). Caiado F. y colaboradores demostraron que la vía Notch regulaba la expresión de la α 3 β 1 a nivel transcripcional, promoviendo la adhesión a componentes de la matriz y estimulando su movilidad en células de médula ósea (195). Sin embargo, no existían datos relevantes que esclarecieran el mecanismo molecular mediante el cual Notch regula la Integrina- α 9. En el trabajo desarrollado se ha demostrado que la activación o inhibición de la vía Notch ha producido una disminución o un aumento en la expresión de la Integrina- α 9 respectivamente (véase **Figura R.22, R.23 y R.24**). Además no sólo se ha señalado un papel relevante de la vía Notch en la regulación de la Integrina- α 9, si no que mediante estudios de unión al promotor se ha demostrado una interacción directa de los efectores *downstream* NICD y Hes1 con la región reguladora de ésta. Aunque por el momento no existe ninguna evidencia que haya descrito que el promotor de la Integrina- α 9 contenga dominios de unión característicos de la transcripción de la vía Notch dependiente de los factores de transcripción CSL o del efector *downstream* Hes1, nuestros resultados así lo sugieren. Al igual que sucedía con la N-Caderina, la vía Notch podría regular la expresión de la Integrina- α 9 a través del NICD y Hes1. Teniendo en cuenta que la vía Notch parece utilizar el mismo mecanismo para inducir la expresión de N-Caderina e Integrina- α 9, sería concebible que existiera un mecanismo capaz de modular la expresión de diferentes moléculas de adhesión, tales como la N-Caderina e Integrina- α 9, mediado por Notch. Además, las tres líneas celulares estudiadas pertenecen a diferentes subtipos de RMS, los cuales presentan grandes diferencias biológicas. El hecho de que se haya encontrado una conexión consistente entre la vía Notch y N-Caderina e Integrina- α 9 en estas tres líneas celulares, sugiere que el mecanismo aquí descrito puede ser un mecanismo general del RMS (y quizá de otras neoplasias) y no un mecanismo particular de un subtipo de éste.

La implicación de la Integrina- α 9 regulada por Notch, está involucrada en procesos de adhesión e invasión celular en RMS. En cuanto a la adhesión celular, únicamente se han tenido en cuenta las adhesiones intermedias o uniones a corto plazo, las cuales son necesarias para que se produzca la migración celular. Se ha demostrado, que en células donde se encontraba constitutivamente activada la vía Notch la inhibición de la Integrina- α 9 revertía el fenotipo a uno menos adhesivo, característico de células de RMS con una expresión endógena de la vía (véase **Figura R.25A**). Estos resultados sugieren un papel relevante de la Integrina- α 9 en la formación de adhesiones intermedias mediado por la activación de la vía Notch. Estudios

recientes que abordan la relación entre la adhesión celular y la movilidad, han demostrado que es necesario que existan un número limitado de uniones entre célula-ECM para generar movilidad celular. En teoría una reducción en la concentración de ligandos de la ECM, una reducción en la expresión de las integrinas en la superficie celular, o una reducción en la afinidad y avidéz de las integrinas podría permitir a las células formar menos uniones con el substrato y así permitir la migración celular (107). En este trabajo, se ha observado que la inhibición de la Integrina- α 9 en células con sobreexpresión de la vía Notch no afectaba a la movilidad celular, cuantificada a través de la velocidad de cierre de la herida, sugiriendo un papel poco relevante de esta molécula en la migración celular en RMS. Por contra, se ha observado un efecto notorio de esta molécula en la capacidad invasiva de células de RMS. Los resultados han mostrado que la inhibición de la Integrina- α 9 revertía el fenotipo invasivo de las células con sobreexpresión de la vía Notch a uno menos invasivo típico de las células con una activación endógena de la vía (véase **Figura R.25C**). En línea con nuestros resultados, otros autores han descrito la particular implicación de la Integrina- α 9 en procesos de invasión celular en otras neoplasias (162, 193, 220). Además se ha descrito un mecanismo molecular pro-invasivo específico de la Integrina- α 9, que regula la actividad de varias vías de señalización que son iniciadas mediante la actividad de la tirosina quinasa Src en cáncer de colon. Src puede interactuar directamente con la cola citoplasmática de la subunidad α 9, y así reclutar otras proteínas de señalización para inducir la migración celular (158). Src activa p130Cas y iNOs, con la subsiguiente activación de Rac1, la cual permite la formación del lamellipodium en células migratorias, y la producción de NO respectivamente (173, 174). NO, un subproducto del catabolismo de la L-arginina, regula la migración celular y la expresión de MMP-2, MMP-9 responsables de la degradación de la ECM (158). Aunque la Integrina- α 9 puede promover la migración celular independientemente de las FAK, se cree que éstas pueden contribuir en la amplificación de los efectos migratorios producidos por Src. Las FAK activan las Rac-GTPasa permitiendo la formación del lamellipodium en células migratorias y activando, a su vez, las vías de señalización ERK y JNK. Ambas vías promueven un aumento en la transcripción de genes que codifican para proteínas que aumentan la segregación de la MMP-2, la MMP-9 y del uPA, facilitando la degradación de la matriz imprescindible para la invasión celular (185). Por lo tanto, Notch regularía positivamente la expresión de la Integrina- α 9, promoviendo la adhesión de ésta con sus ligandos, al mismo tiempo que promovería la invasión celular activando varias vías de señalización, tales como las vías de señalización de la tirosina quinasa Src y de las FAK, implicadas en estos procesos celulares.

Además de indicar un papel relevante de la Integrina- α 9 en procesos de adhesión e invasión celular mediado por Notch en células de RMS, se ha observado que la vía Notch podría estar implicada en el control transcripcional de la Integrina- α 9 en células de RMS. Los resultados han mostrado que la inhibición de la vía reduce la expresión de la Integrina- α 9 causando una redistribución en su localización celular. En las células control la expresión de esta proteína se ha localizado principalmente en la membrana citoplasmática, sobre todo en la parte frontal de las células, mientras que en las células con inhibición de la vía Notch se ha visto ampliamente distribuida por todo el citoplasma y en la zona perinuclear (véase **Figura R.24**). La localización citoplasmática y de membrana celular sugiere que la Integrina- α 9 sufre procesos de internalización y transporte, típicos de células migratorias. Durante la migración celular, se requieren mecanismos eficientes para liberar las adhesiones de la parte trasera de la célula y formar nuevas adhesiones en el frente de avance. Las integrinas se pueden transportar por la membrana celular o por el citoplasma mediante vesículas, de forma individual o formando agregados entre ellas. El borde de la célula, particularmente la parte trasera, es el locus donde los agregados adhesivos tienden a desadherirse. Una vez allí, las integrinas se liberan y dispersan para ser utilizadas para formar nuevas adhesiones en la parte frontal de la célula, o, alternativamente, permanecen agregadas moviéndose a lo largo de la membrana celular hasta llegar al frente de la célula y formar nuevas adhesiones. Una fracción de integrinas provenientes de la parte posterior de la célula son internalizadas en vesículas endocíticas que se acumulan en la región perinuclear donde se eliminan. Para mantener unos niveles adecuados de integrinas se requiere de un mecanismo de reposición. Este mecanismo se basa en la biosíntesis de nuevas moléculas de integrinas (190, 192, 193). Nuestros resultados han mostrado que en células de RMS con inhibición de la vía Notch se observa una disminución en la expresión de Integrina- α 9 a nivel transcripcional y que los niveles de Integrina- α 9 resultantes se localizan principalmente en el citoplasma y en la zona perinuclear, sugiriendo que se está produciendo un transporte y eliminación de la Integrina- α 9 en este tipo de células. Contrariamente en células con una expresión endógena de la vía Notch, la Integrina- α 9 se localiza en la membrana celular, especialmente en la parte frontal de las células, apuntando que se está produciendo la formación de nuevas adhesiones en el frente de avance, necesario para que se produzca la migración celular. Teniendo en cuenta lo anteriormente comentado, hipotetizamos que la vía Notch podría estar implicada en el mecanismo de biosíntesis necesario para que se produzca el reciclaje de la Integrina- α 9 en RMS, permitiendo la formación nuevas adhesiones en el frente de avance de las células, las cuales activarían vías de señalización implicadas en el proceso de invasión celular.

Dada la correlación existente entre la vía de la Notch y la Integrina- α 9 en líneas celulares de RMS, se procedió a estudiar la existencia de dicha correlación en muestras de tumor de RMS. Los resultados han mostrado una correlación entre la expresión de Integrina- α 9 y el efector *downstream* Hes1, con un valor de correlación de Pearson de 0.771 ($p < 0.05$) (véase **Figura R.28**). Esta correlación observada en pacientes, confirma los hallazgos encontrados en las líneas celulares y sugiere que la activación de Notch podría estar influenciando la expresión de varias moléculas de adhesión en RMS, tales como N-Caderina e Integrina- α 9.

D.2.4 Regulación de los procesos de adhesividad, invasividad y movilidad celular mediada por Notch en células de RMS

Los resultados presentados sugieren la existencia de un mecanismo general capaz de activar procesos de adhesión, migración e invasión celular en los RMS mediado por Notch a través de la regulación positiva de varias moléculas de adhesión, tales como N-Caderina e Integrina- α 9.

El mecanismo mediante el cual la vía Notch regula las moléculas de adhesión N-Caderina e Integrina- α 9 parece ser el mismo para ambas moléculas, sugiriendo la existencia de un mecanismo general capaz de modular la expresión de diferentes moléculas de adhesión. Aunque no se haya podido esclarecer cuál es el mecanismo exacto mediante el cual la vía Notch activa estas moléculas de adhesión, se ha demostrado la implicación de los efectores *downstream* NICD y Hes1 en su activación transcripcional. En la **Figura D1** se muestran los posibles mecanismos de inducción de estas moléculas mediados por Notch. En el punto 1 de la **Figura D1**, se observa como el NICD interacciona con los factores de transcripción CSL, los cuales activan Hes1 u otro factor de transcripción desconocido que a su vez acaban activando las moléculas de adhesión N-Caderina e Integrina- α 9. En el punto 2 se ilustra la interacción del NICD con proteínas de unión al DNA independiente de los factores CSL, las cuales coordinan la activación transcripcional de la N-Caderina e Integrina- α 9 mediante el coactivador MAML1. Finalmente, en el punto 3 se representa la activación transcripcional de Hes1 independientemente de factores CSL, el cual interacciona directamente con el promotor de la N-Caderina e Integrina- α 9.

Se ha demostrado que el mecanismo mediante el cual la vía Notch induce la expresión de estas moléculas de adhesión está relacionado con la activación de procesos de adhesión, migración e invasión celular en células de RMS. Se ha observado que la N-Caderina está implicada, sobre todo, en procesos de adhesión y migración celular, especialmente en la regulación de la direccionalidad de la migración celular; mientras que la Integrina- α 9 parece ser más importante en procesos de invasión celular. Aunque se desconocen con claridad los

mecanismos mediante los cuales el aumento de expresión de N-Caderina e Integrina- $\alpha 9$ induce malignidad, se cree que podrían basarse en la interacción de éstas con sus ligandos y/o en la activación de varias moléculas de señalización, tales como el receptor FGFR, la cual, a su vez, activaría varias vías de señalización, como por ejemplo la vía de las Src/FAK inducida por la Integrina- $\alpha 9$ o las vías de la PI3K, Rho y Rac activadas por la N-Caderina (107, 190, 192, 183, 218).

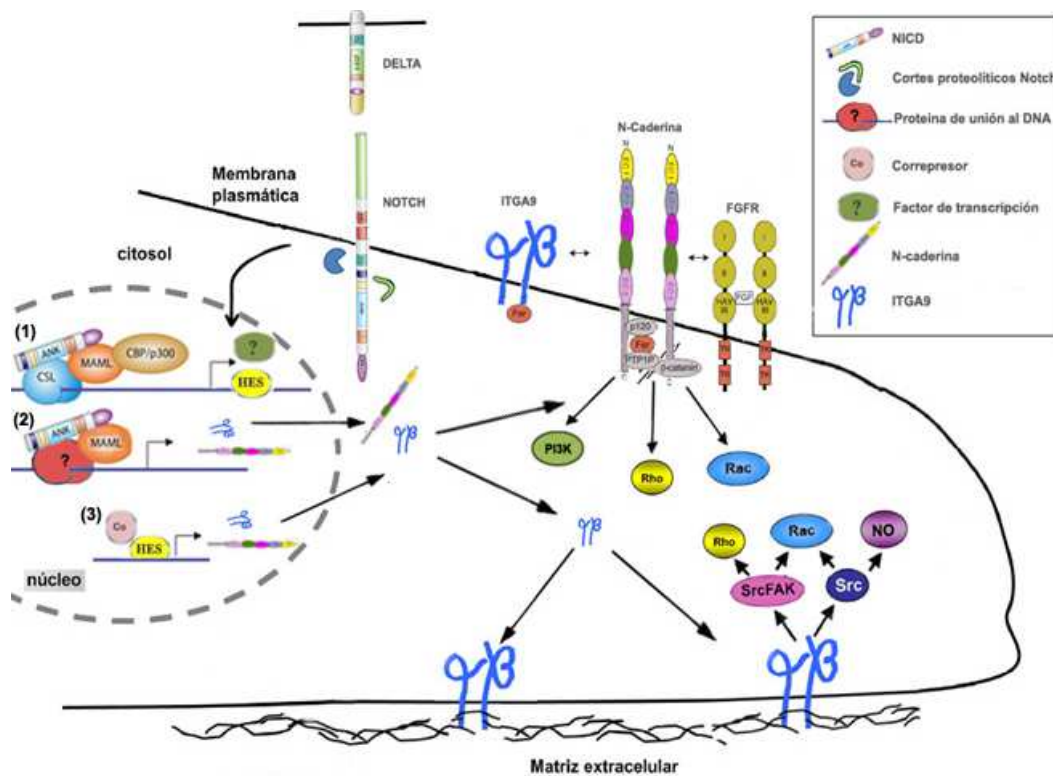


Figura D.1 Modelo propuesto de la regulación de procesos de adhesividad, invasividad y movilidad celular mediada por Notch en células de RMS. Se representa los posibles mecanismos de acción de la vía Notch para inducir procesos de adhesión, migración e invasión mediante la regulación positiva de moléculas de adhesión, tales como la N-Caderina e Integrina- $\alpha 9$ en células migratorias de RMS.

El hecho de que Notch regule los niveles de expresión de proteínas implicadas en la propagación de células tumorales, tal como la infra regulación de la E-caderina en tumores epiteliales (214) y la sobreexpresión de la N-Caderina e Integrina- $\alpha 9$ en tumores mesenquimales como el RMS, sustenta la hipótesis de que Notch actúa como regulador *upstream* de la señalización de procesos implicados en la diseminación del cáncer.

D.2.5 La inhibición de la vía Notch disminuye el crecimiento tumoral en un modelo murino de RMS

Aunque los resultados anteriormente comentados, demuestran la implicación de la vía Notch en la activación de los procesos que permiten la movilidad e invasividad *in vitro* en RMS, es

necesario un estudio más exhaustivo para dilucidar la implicación de la vía en el microambiente tumoral propio de pacientes de RMS. Por ello se creó un modelo murino de RMS para caracterizar la vía Notch *in vivo* y estudiar el posible uso de los GSIs como terapia complementaria dirigida contra las células neoplásicas de RMS.

Dados los resultados obtenidos *in vitro*, la hipótesis inicial planteada fue que la inhibición de la vía Notch podría reducir la formación de metástasis *in vivo*. El objetivo inicial era desarrollar un modelo murino de RMS alveolar con capacidad para generar metástasis espontáneamente, reproduciendo en múltiples aspectos el comportamiento de estos tumores en humanos. Los aRMS presentan un peor pronóstico que las formas embrionarias, y los pacientes con enfermedad diseminada alveolar tienen una tasa de supervivencia de cinco años, inferior al 30% (221, 222). Por ello, urge la necesidad de desarrollar nuevas terapias basadas en la reducción de metástasis en esta neoplasia. Aunque se han descrito varios modelos murinos de eRMS (223, 224), han sido pocos los autores que han desarrollado un modelo murino de aRMS con capacidad de generar metástasis espontáneamente. Keller C. y colaboradores describieron por primera vez un modelo murino de aRMS usando un sistema *knock-in* condicional del gen *PAX3-FKHR* (22). Sin embargo, y dado que se observó que la fusión de los genes *PAX3-FKHR* no era capaz de generar metástasis espontáneamente por sí sola (225-227), Keller C. y colaboradores necesitaron de otras modificaciones genéticas para desarrollar metástasis espontáneamente (22). Desde entonces, varios autores se han basado en esta metodología para generar modelos metastásicos de aRMs (228-230). Wysoczynski M. y colaboradores generaron un modelo murino de metástasis inoculando una subpoblación altamente metastásica de la línea celular RH30, seleccionada por aislamiento quimiotáctico repetitivo (231). Nosotros inoculamos células RH30-pEGFp-Luciferasa en los músculos gastrocnemius de las patas traseras, permitiendo el seguimiento a tiempo real del crecimiento del tumor (232). La inyección intramuscular en las patas traseras de los animales es una técnica comúnmente usada para inducir metástasis experimentales, las cuales generalmente conducen al desarrollo de metástasis pulmonares (233). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron metástasis durante el tiempo que transcurría entre la inyección de las células tumorales y el sacrificio de los animales (entre 5 y 6 semanas). Las razones por las cuales no ha sido posible generar este modelo de metástasis no están del todo claras. Pero una de las causas podría deberse al comportamiento específico de la línea celular RH30. La línea celular RH30 tiene una tasa proliferativa muy elevada, de tal modo que no se da el tiempo necesario para desarrollar el proceso de metástasis. Los animales inoculados con 1 millón de células RH30 tienen una velocidad media de crecimiento del tumor de 574,88 mm³/día. A esta velocidad de crecimiento

y siguiendo lo estipulado por el comité ético, los animales deben ser sacrificados entre las 5 y las 6 semanas después de la inoculación, tiempo insuficiente para que se produzca la diseminación celular. Estos datos sugieren, al igual que observaron Wysoczynski M. y colaboradores (231), que para desarrollar un modelo de metástasis espontáneo es necesario una selección previa de una subpoblación altamente metastásica de la línea celular RH30.

En este trabajo se ha descrito un modelo de tumor primario de RMS en ratones SCID y se ha demostrado que, mediante el uso del DAPT, se consigue una reducción de la activación de la vía Notch con la consiguiente reducción en la tasa de crecimiento del tumor. En concordancia con nuestros resultados, Belyea BC. y colaboradores demostraron que la inhibición farmacológica de la vía Notch, mediante GSIs, inhibe la proliferación y el crecimiento del tumor de eRMS *in vivo* (234). Se sabe que el tratamiento con GSIs produce cierta toxicidad gastrointestinal (235) que puede ser reducida, al menos en parte, con el tratamiento simultáneo de corticoides (92). A priori se creyó, en base a estudios previos realizados *in vitro*, que el fármaco GSI-XXI podían presentar un perfil terapéutico más favorable que el más comúnmente usado DAPT, ya que había mostrado ser efectivo a concentraciones más bajas. En el modelo generado se analizaron tanto el fármaco GSI-XXI como el DAPT. Sin embargo, a pesar de que el GSI-XXI mostró tener una actividad inhibidora importante *in vitro*, incluso a concentraciones muy bajas, no se observaron efectos *in vivo* a dosis equivalentes. A una dosis de 5 $\mu\text{mol/Kg}$, el DAPT ha mostrado tener efectos relevantes en el crecimiento del tumor, sin mostrar efectos adversos en el bienestar de los animales. Se ha observado que a los 28 días de tratamiento, el tamaño del tumor es significativamente menor que en el grupo control (véase **Figura R.31**).

Uno de los retos para el futuro, teniendo en cuenta los estudios *in vitro* realizados, es buscar nuevos inhibidores que bloqueen la actividad de N-Caderina e Integrina- $\alpha 9$, con el objetivo de observar si la co-administración de estos inhibidores junto con el DAPT produce efectos más contundentes en la progresión del tumor de RMS. Un posible candidato para estos futuros experimentos es el inhibidor farmacológico ADH-1. ADH-1 es un pentapéptido cíclico que mimetiza la secuencia natural HAVDV de la N-Caderina, inhibiendo su función. Varios autores han demostrado su actividad antitumoral en una gran variedad de modelos murinos, tales como modelos de mama, ovario, colón y pulmón. Se ha observado que ADH-1 ejerce un efecto antitumoral directo mediante el bloqueo de la funcionalidad de la N-Caderina expresada en células tumorales, inhibiendo la invasión e induciendo apoptosis (121). Por lo que respecta la Integrina- $\alpha 9$, se está valorando el uso de diferentes desintegrinas como posibles inhibidores de su funcionalidad. Las desintegrinas son una familia de polipéptidos purificados del veneno de

serpiente, ricas en motivos de cisteínas y de bajo peso molecular, las cuales contienen secuencias de aminoácidos específicos que inhiben eficazmente las interacciones normales de unión integrina-ligando. Por consiguiente, las desintegrinas bloquean las funciones adhesivas y actúan como inhibidores de la agregación plaquetaria. Los posibles candidatos para inhibir la funcionalidad de la Integrina- $\alpha 9$ son las desintegrinas diméricas con dominio MLDG (EC3, compuesta por los motivos VGD-MLD y EC6, formada por los motivos MLD-RGD) y los péptidos sintéticos AEIDGIEL y SVV4GLR. Marcinkiewicz C. y colaboradores demostraron que las desintegrinas diméricas con dominio MLDG eran capaces de inhibir la unión de la Integrina- $\alpha 9$ con el ligando VCAM-1, disminuyendo la migración de los neutrófilos. Contrariamente, estos autores demostraron que mientras las desintegrinas MLDG no eran capaces de bloquear la unión de la Integrina- $\alpha 9$ con los ligandos tenascina-C y osteoponina, los péptidos AEIDGIEL y SVV4GLR sí lo hacían (236). Otros autores han demostrado que la inhibición de la Integrina- $\alpha 9$ mediante las desintegrinas diméricas MLDG dificulta el proceso de angiogénesis en células de glioma (237) e inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos (238).

Relevancia Traslacional

Los pacientes afectados de Rabdomiosarcoma (RMS) con enfermedad diseminada continúan teniendo un mal pronóstico, a pesar del tratamiento con terapias intensivas. La principal causa de muerte de estos pacientes es la formación de metástasis a distancia. Este trabajo demuestra que la vía Notch está ampliamente expresada en RMS, y que su inhibición *in vitro*, usando los inhibidores de la γ -secretasa, disminuye la movilidad e invasividad de las células de RMS. Además se ha demostrado que la vía Notch actúa como regulador clave de mecanismos de adhesividad, movilidad e invasividad en células de RMS, mediante la regulación positiva de varias moléculas de adhesión, tales como N-Caderina e Integrina- α 9. Asimismo se ha observado que, mediante el uso del DAPT, se consigue una reducción de la activación de la vía Notch con la consiguiente reducción en la tasa de crecimiento del tumor *in vivo*. Por consiguiente, se propone la vía Notch, la N-Caderina y la Integrina- α 9 como candidatos para el desarrollo de terapias basadas en la reducción de metástasis en esta neoplasia.

CONCLUSIONES

1. La vía Notch está constitutivamente expresada y activada tanto en tumores como en líneas celulares de RMS.
2. La activación de la vía Notch correlaciona con un fenotipo metastásico en líneas celulares de RMS.
3. La vía Notch puede inhibirse farmacológicamente usando inhibidores de la γ -secretasa en líneas celulares de RMS.
4. La inhibición de la vía Notch reduce significativamente la movilidad e invasividad en células de RMS.
5. La inhibición de la vía Notch no tiene un efecto significativo en la progresión del ciclo celular.
6. La vía Notch regula procesos de adhesión, migración e invasión celular en RMS, y lo hace mediante la regulación positiva de varias moléculas de adhesión, tales como la N-Caderina e Integrina- α 9.
7. Existe una correlación significativa entre los niveles de expresión de Hes1 y N-Caderina, e Integrina- α 9 en RMS.
8. La inhibición de la vía Notch reduce el crecimiento tumoral en un modelo de xenotransplante murino de RMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.M.1 Líneas Celulares

M.M.1.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de RMS (RH30, CW9019 y HTB82) fueron crecidas en *Modified Eagle's medium* (MEM) (**Tabla M.M.1**). El medio fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato sódico, 1X de aminoácidos esenciales, 100 U/ml de penicilina y 0.2 mg/ml de estreptomina. Todos los reactivos fueron suministrados por Laboratorios PAA. Las líneas celulares se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*): RH30 (ATCC Cat No: CRL-2061), CW9019 (ATCC Cat No CRL-1598) y HTB82 (ATCC Cat No: A-204).

Línea Celular	Origen
RH30	Células de la médula ósea de un niño con RMS alveolar con translocación en PAX3-FOXO1
CW9019	Células de la médula ósea de un niño con RMS alveolar con translocación en PAX7-FOXO1
HTB82	Células de la médula ósea de un niño con RMS embrionario

Tabla M.M.1 Líneas celulares de RMS utilizadas. Tabla donde se muestran las líneas celulares utilizadas y su origen.

Las líneas celulares se crecieron en frascos de cultivo haciendo pases semanales. Para subcultivarlas las poblaciones celulares se disgregaron del plástico mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (0.5 mg/ml Tripsina, 0.22 mg/ml EDTA) (PAA) y se sembraron en placas para realizar los ensayos pertinentes o para su mantenimiento a 37°C en un incubador de camisa de agua con un 5% de CO₂.

La conservación de las líneas celulares se realizó por congelación progresiva en los respectivos medios complementados al 10% de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide ≥99.7% Hybri-Max*, Sigma-Aldrich). Primero se almacenaron las células a -80°C por un periodo de 24 horas y posteriormente se guardaron en nitrógeno líquido a -196°C.

M.M.1.2 Contaje celular

El número de células se adecuó a las necesidades de cada ensayo. Para determinarlo, una alícuota de la suspensión celular se diluyó con 1:10 de *Trypan Blue Solution 0.5%* (Sigma), el

cual es capaz de penetrar y teñir únicamente las células muertas. Se aplicaron 10 µl de la dilución a la cámara de conteo de *Neubauer* y se contaron las células vivas de cuatro campos independientes. El nº de células se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Nº cél.} = \text{promedio de las cél. 4 campos} \times 10^4 \times 10 \text{ (dilución)} \times \text{ml totales suspensión}$$

M.M.1.3 Tratamientos

Los GSIs testados fueron el DAPT (Sigma-Aldrich), GSI-X, GSI-XX y GSI-XXI (Calbiochem). Son péptidos estructuralmente muy similares, los cuales mimetizan la PS1, responsable del corte en la región S3 del receptor Notch, inhibiendo la formación del NICD y, por lo tanto, la activación de la vía (99, 100). Para su preparación, se diluyeron en DMSO y se añadieron al medio de cultivo a la concentración deseada. Las dosis fueron las siguientes: 25 µM para el DAPT, 200 nM para el GSI-X, 8 nM para el GSI-XX y 2 nM para el GSI-XXI. Los frascos no tratados fueron suplementados con un volumen equivalente de DMSO. Los tratamientos duraron 72 horas, cambiando el medio de cultivo suplementado con la dosis correspondiente de GSIs cada 24 horas.

M.M.1.4 Supervivencia celular

Para poder determinar la viabilidad celular se utilizó un método basado en la exclusión del yoduro de propidio (PI) por células vivas. La membrana de estas células forma una barrera con permeabilidad selectiva entre el contenido intracelular y el medio extracelular. Las células muertas pierden esta propiedad y por lo tanto incorporan el colorante, el cual se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos en una relación de 1 molécula de colorante por cada 4 o 5 pares de bases.

El protocolo aplicado consistió en tripsinizar las células y después de varios lavados con PBS (*Phosphate buffered saline*) frío se procedió con la tinción con PI a una concentración de 25 µg/ml. Rápidamente las muestras procesadas se pasaron por el citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences). Los resultados se analizaron con el software FCS Express (DeNovo Software).

M.M.1.5 Ensayo de ciclo celular

El análisis del ciclo celular se realiza por la técnica de citometría de flujo combinada con el marcaje de PI. El PI es un agente intercalante de las bases del DNA, de manera que emite señal directamente proporcional a la cantidad de DNA y consecuentemente, en la fase del ciclo en que se encuentran las células.

Se crecieron 10^6 células durante tres días en medio MEM suplementado con la cantidad apropiada de GSI o DMSO. Se tripsinizaron, se fijaron con un 70% de etanol-PBS, se trataron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAsa durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PI. Posteriormente se procesaron las muestras en el citómetro de flujo FACsCalibur (BD Biosciences) y se analizaron los resultados con el software FCS Express (DeNovo Software).

M.M.1.6 Ensayo de apoptosis

La apoptosis se analizó usando el kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II* (BD Biosciences). La tinción con *FITC Annexin V (Fluorescein isothiocyanate)* permite detectar la pérdida de integridad de la membrana que acompaña a las últimas etapas de la muerte celular resultante de cualquier proceso apoptótico. Normalmente la tinción con *FITC Annexin V* va acompañada de la tinción con PI, para permitir identificar las células en fase temprana de apoptosis (PI negativas y *FITC Annexin V* positivas).

Para llevar a cabo la tinción, las células se lavaron varias veces con PBS frío y se resuspendieron con tampón de unión provisto por el Kit a una concentración de 1×10^6 células/ml. Posteriormente se transfirieron 100 μl de la solución (1×10^5 células) a un tubo de 5 ml de cultivo y se añadió 1 μl de *FITC Annexin V* y 5 μl de PI. Suavemente se mezclaron las células y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se añadió 400 μl de tampón de unión 1X a cada tubo y se analizó la suspensión celular en el citómetro de flujo *FacsCalibur* (BD Biosciences).

M.M.1.7 Manipulación del DNA

Preparación de los vectores

La secuencia completa de cDNA del *dnMAML1*, *DELTA* y *HES1* fueron cedidos amablemente por la Dra. Anna Bigas (*Institut Municipal d'Investigació Mèdica*, Barcelona, España). La secuencia completa del NICD fue adquirida de la Dra. Rosanna Paciucci (*Institut de Recerca Hospital de la Vall d'Hebron*, Barcelona, España). La secuencia completa de cDNA de *HEY1* se obtuvo de Source BioScience (NH_MGC_7). Todos los cDNAs usados fueron clonados en el vector pCDNA 3.1(+), exceptuando el *dnMAML1* que fue clonado en el vector pEGFP.

Una vez preparado el inserto, el vector aceptor se linearizó con las mismas enzimas de restricción que las del inserto. Cuando se digirió con enzimas que generaron extremos cohesivos, el vector se desfosforiló mediante tratamientos con fosfatasa alcalina (CIP) (*Calf intestinal phosphatase*, New England BioLabs, NEB). El tratamiento con CIP permite eliminar los grupos fosfatos de los residuos de tirosina, serina y treonina de las muestras de interés.

Para llevar a cabo este proceso se resuspendió el vector en tampón NED (New England BioLabs, NEB) en una relación de 0.5 µg de DNA por 10 µl de tampón y se añadieron 0.5 unidades de CIP por cada microgramo de vector, incubando la mezcla durante 60 min. a 37°C. Posteriormente la fosfatasa se inactivó corriendo un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0.5 µg/ml (véase **Electroforesis de ácidos nucleicos**). El DNA se purificó con el *Kit QIAquick Gel Extraction* (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta obtener el fragmento de DNA purificado eluido con tampón TE. Una vez obtenidos el inserto y el vector, estos se cargaron en un gel de agarosa para comprobar la medida y la relación vector:inserto (véase **Electroforesis de ácidos nucleicos**) y, paralelamente, se cuantificaron mediante el espectrofotómetro *Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies Inc). Seguidamente se realizó la ligación con la ligasa T4 (New England Biolabs). La relación vector:inserto utilizada para la ligación dependió del tamaño del DNA. Aunque para tamaños convencionales (400-700 bp) se ligaron a una relación 1:1 para extremos cohesivos y a una relación 1:3 para extremos romos. La fórmula utilizada para determinar la cantidad de DNA de inserto necesaria para ligar con 50 ng de vector fue la siguiente:

$$X \text{ ng de inserto} = (Y \text{ bp de inserto}) \times (50 \text{ ng vector}) / (\text{tamaño en pb del vector})$$

donde X ng es la cantidad de producto de ligación de Y pares de bases (bp) para ser ligado en una relación 1:1 (vector:inserto).

El protocolo de la ligación consistió en incubar la cantidad de inserto calculada para x µg de vector con tampón de ligación 10X y la ligasa T4 (New England Biolabs) a temperatura ambiente durante 1 hora para extremos cohesivos o durante toda la noche para extremos romos. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes E. Coli DH-5α. La transformación se llevó a cabo mediante un proceso de choque térmico. Este proceso consistió en los siguientes pasos: i) incubación del producto de la ligación junto con las bacterias durante 30 min. en hielo, seguidos de una incubación a 42°C durante 90 segundos. ii) recuperación de las bacterias añadiendo 1 ml de LB (*Luria-Bertani*) o 500 µl de medio SOC (*Super optimal medium*), seguida de una incubación a 37°C en agitación durante 1 hora. iii) siembra de la mezcla en una placa de LB-1.5% agar con el antibiótico de selección (Ampicilina 150 mg/ml, Cloramfenicol 50 mg/ml). iv) selección de las colonias positivas para el inserto. Para la selección, se extrajo el DNA plasmídico de las colonias mediante el Kit de minipreps de Quiagen (Quiaprep Miniprep), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurar la correcta direccionalidad del inserto, se digirió el DNA plasmídico con las dianas de restricción

que se habían utilizado para linealizar el vector y se secuenciaron los fragmentos clonados mediante la tecnología Sanger, a través de *ABI PRISM 3100 Genetic analyzer* (Applied Biosystems).

Los tampones utilizados para este procedimiento fueron:

Medio LB	Medio SOC	Tampón TE
10 g/l Triptona	2% w/v Bacto-triptona	10 mM Tris-Cl
5 g/l Extracto de Levadura	0.5% w/v Extracto de levadura	1 mM EDTA
10 g/l NaCl	10 mM NaCl	
	2.5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	20 mM Glucosa	

M.M.1.8 Transfecciones

La transfección celular consiste en un método de introducción de DNA plasmídico dentro de las células eucariotas. Existen diversos métodos físico-químicos para introducir y expresar genes en las células, como electroporación, precipitación por fosfato cálcico, etc.

Los experimentos realizados se llevaron a cabo mediante el uso de métodos químicos basados en la formación de complejos capaces de introducirse en el citoplasma de la célula, por medio del mecanismo normal de endocitosis. En función del gen a introducir se utilizó el reactivo Fugene 6 (Roche), capaz de unirse al DNA formando complejos asimilables por la célula, o la LipofectaminaTM Plus Reagent (Invitrogen), método de lipofección basado en el recubrimiento de la molécula de ADN en un complejo de lípidos capaces de atravesar la membrana celular.

El protocolo a seguir cuando se utilizó el reactivo Fugene 6 (Roche) se especifica a continuación. Un día antes de realizar la transfección las células adheridas fueron tripsinizadas y se ajustó la concentración celular para que en el momento de la transfección estuvieran a un 50-80% de confluencia. Posteriormente se preparó la mezcla de transfección, mezclando una relación de 3 µl de reactivo/µg DNA plasmídico en un volumen X final de medio MEM sin suero (PAA), dependiendo de la superficie de la placa utilizada (**Tabla M.M.2**) y se incubó la mezcla durante 45 min. a temperatura ambiente. Pasado este periodo de incubación se cambió el medio de las células y se añadió 10 ml de medio DMEM (*Dubbecco's modified eagle's medium*) no complementado con FBS. Se añadió la mezcla de transfección al medio de cultivo y se dejó incubar las células durante 24-48 horas. Para realizar la transfección estable, al día siguiente de añadir la mezcla de la transfección a las células se redujo la densidad celular un 90%,

realizando un pase 1/10 con medio de cultivo fresco. 24 horas más tarde se procedió con el proceso de selección de las células que habían integrado el DNA, añadiendo el antibiótico de resistencia pertinente al medio de cultivo.

Placa de cultivo	Nº Células	Medio de cultivo	DNA	FuGene	Medio transfección
24-well	50000	20 µl	0.2 µg	0.6 µl	0.5 ml
12-well	100000	50 µl	0.5 µg	1.5 µl	1 ml
6-well	300000	100 µl	1.0 µg	3.0 µl	2 ml
10 cm \varnothing	1000000	600 µl	6.0 µg	18.0 µl	10 ml

Tabla M.M.2 Cantidades y volúmenes de transfección con FuGene 6. En la tabla se muestra las cantidades necesarias para llevar a cabo la transfección con FuGene6 según la placa de cultivo a utilizar.

El protocolo utilizado cuando se utilizó el reactivo Lipofectamina™ Plus Reagent (Invitrogen), fue similar al anterior. El día anterior a la transfección las células se sembraron a una confluencia del 70%. Posteriormente se mezcló el DNA y el reactivo en medio OPTI-MEM (Invitrogen-Life Technologies) y se incubó 15 min. a temperatura ambiente (**Tabla M.M.3**). Pasado este periodo de incubación se añadió OPTI-MEM a la mezcla y se aplicó a las células. Pasadas 4 horas de incubación se cambió el medio, utilizando DMEM suplementado con un 10% de FBS y se incubó durante 48 horas más.

Placa de cultivo	Nº Células	Medio de cultivo	DNA	Plus	Lipofectamine	Medio transfección
24-well	50000	25 µl	0.4 µg	4.0 µl	1.0 µl	0.25 ml
12-well	100000	50 µl	1.0 µg	6.0 µl	4.0 µl	1.0 ml
6-well	300000	100 µl	2.0 µg	8.0 µl	12 µl	2.0 ml

Tabla M.M.3 Cantidades y volúmenes de transfección con Lipofectamina™ Plus Reagent. En la tabla se muestra las cantidades necesarias para llevar a cabo la transfección con Lipofectamina™ Plus Reagent según la placa de cultivo a utilizar.

M.M.1.9 Extracción y análisis de RNA

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó basándose en una variante de la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi en 1987 (239) y adaptado al sistema de columnas comercializado por Quiagen (RNeasy mini/midi kit).

Cuando las células llegaron a la confluencia deseada, se procedió a la extracción de RNA. Primeramente se realizaron los procesos de lavado mediante la sustitución del medio de cultivo por una solución de PBS frío. Los procesos de lavado se repitieron varias veces. Posteriormente, se añadió a los frascos tampón RLT con 10 $\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol en una proporción de 350 μL por $\leq 5 \cdot 10^6$ células. Las células lisadas se recogieron con una rasqueta y se homogenizaron con una jeringa de 18-20 G. Posteriormente se añadió 1 volumen de etanol al 70% y se traspasó la solución a una columna cromatográfica de afinidad, provista por el kit. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizaron los procesos de lavados y elución por centrifugación de la columna.

La concentración de RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro *Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies Inc). La integridad del RNA se comprobó mediante la visualización en gel de agarosa al 2% o mediante el Bioanalyzer (Agilent Technologies 2100).

Electroforesis de ácidos nucleicos

Para visualizar el resultado de diferentes protocolos realizados sobre ácidos nucleicos (digestiones, amplificaciones y preparaciones) se utilizó la electroforesis en gel de agarosa estándar de grado medio (Ecogen). Se preparó en porcentajes que oscilaban entre el 0.7 al 2% en función del tamaño a separar. Para visualizar los ácidos nucleicos mediante luz ultravioleta (UV) se incorporó a los EtBr a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. La electroforesis se resolvió a diferencias de potencial entre 70 y 120 V.

Los tampones utilizados para estos procedimientos fueron:

TAE

40 mM Tris base pH 8.1

2 mM Ácido acético

0.2 mM EDTA

0.5 $\mu\text{g/ml}$ Bromur d'Etidi

Tampón de carga

5% Glicerol

0.021% Azul de bromofenol

0.021% Xilen cianol

0.02 M EDTA pH 8.0

Reverse Transcription (RT)

La transcripción inversa o RT permite obtener cDNA a partir de mRNA. En función del experimento a realizar se utilizó la transcriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen-Life Technologies) o la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen-Life Technologies). La transcriptasa inversa SuperScript II es una versión modificada de MMLV RT con menor actividad de RNasa H y con mayor estabilidad térmica, proporcionando mayor especificidad y rendimiento del cDNA obtenido. Además permite obtener cDNAs de longitudes mayores (hasta 12,3 kb) (www.invitrogen.com).

Para ensayos convencionales se utilizó la transcriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen-Life Technologies) según el procedimiento a continuación detallado. Se mezclaron 2 µg de RNA, 50-250 ng de *Random Primers* (Invitrogen-Life Technologies), 1 µl 10 mM *dNTP Mix* (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) (Invitrogen-Life Technologies) y agua estéril hasta un volumen total de 12 µl. Se procedió a la incubación de la mezcla durante 5 min. a 65°C y se puso rápidamente en hielo. Pasado este periodo de incubación se añadió a la mezcla 4 µl de tampón *First-Strand 5X* (Invitrogen-Life Technologies), 2 µl DTT (*Dithiothreitol*) 0.1 M (Invitrogen-Life Technologies) y 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT. Finalmente se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C en un termociclador Minicycler TM (MJ Research Inc.) y se inactivó la reacción incubando durante 15 min. a 70 °C en el mismo termociclador.

Para ensayos que requerían mayor precisión, se utilizó la transcriptasa inversa SuperScript II, según se detalla a continuación. Se mezclaron entre 5-10 µg de RNA, el cebador T7-d(T)₂₄ a una concentración de 2 pM, 1 µl 10 mM *dNTP Mix* (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) (Invitrogen-Life Technologies) y agua estéril hasta un volumen de 12 µl. Se procedió a la incubación de la mezcla durante 5 min. a 65°C y se puso rápidamente en hielo. Posteriormente se añadió a la mezcla 4 µl de tampón *First-Strand 5X* (Invitrogen-Life Technologies), 2 µl DTT 0.1 M (Invitrogen-Life Technologies) y 1 µl (200 unidades) de SuperScript II. Finalmente se incubó la mezcla durante 50 min. a 42°C y se inactivó la reacción incubando durante 15 min. a 70 °C.

Polymerase Chain reaction (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas. El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima

polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. La amplificación in vitro del DNA se logra en tres pasos básicos: desnaturalización del DNA (molde); hibridación o apareamiento de los cebadores y copia de las cadenas delimitadas por los cebadores. Estos tres pasos de desnaturalización, hibridación y polimerización se repiten “n” veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los oligos. Se trata de una amplificación exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sintetizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones (Dieffenbach, CW, Dveksler GS (eds) (2003)). Se utilizó el sistema de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen-Life Technologies), según el protocolo detallado a continuación. Se mezclaron 10 μL (1X) del tampón PCR 10X PCR, 2 μL de 10 mM de la mezcla de dNTPs (a una concentración de 0.2 mM cada dNTPs), 3 μL (1.5 mM) de MgCl_2 50 mM, 0.5 μM de cada sonda, 1–20 μL de DNA molde, 0.2–0.5 μL (1.0–2.5 unidades) de la Taq DNA Polymerase (5 U/ μL) y agua estéril hasta un volumen de 50 μL . Se incubó la mezcla durante 3 min. a 94°C para desnaturalizar el DNA y se procedió a la realización de entre 25-35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos; hibridación a 55°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 1 min. Finalmente se hizo una incubación de 10 min. a 72°C y se procedió al análisis de los productos amplificados mediante un gel de electroforesis de ácidos nucleicos (véase **Electroforesis de ácidos nucleicos**) o a la purificación del producto obtenido tal y como se especifica a continuación.

Purificación del producto de PCR

Los productos de PCR se purificaron mediante el *Kit High Pure PCR Purification* (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. Este protocolo se basa en la unión del cDNA a una columna de afinidad y consta de los siguientes pasos: unión del producto de PCR con el tampón de unión, aplicación en la columna y centrifugación, procesos de lavado y finalmente elusión del cDNA purificado.

Real Time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR consiste en el análisis de la cantidad de producto generado en cada ciclo de amplificación, mediante la detección de sondas marcadas con fluorescencia. La sonda es específica para cada secuencia y la señal que genera aumenta de manera directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. Esta cantidad de producto está directamente relacionada con la cantidad de cadenas de cDNA previas al inicio del proceso de PCR. La detección ciclo a ciclo del producto es posible gracias a la capacidad de los nuevos

termocicladores de PCR para detectar emisiones de fluorescencia. El proceso de RT-PCR consta de 3 fases bien diferenciadas (**Figura M.M.1**):

- a) Fase geométrica o exponencial: existe una elevada precisión entre la concentración de DNA y el ciclo de PCR.
- b) Fase lineal: no hay correlación entre la amplificación del DNA y el ciclo de PCR.
- c) Fase plateau: saturación de los reactivos y amplificación mínima.

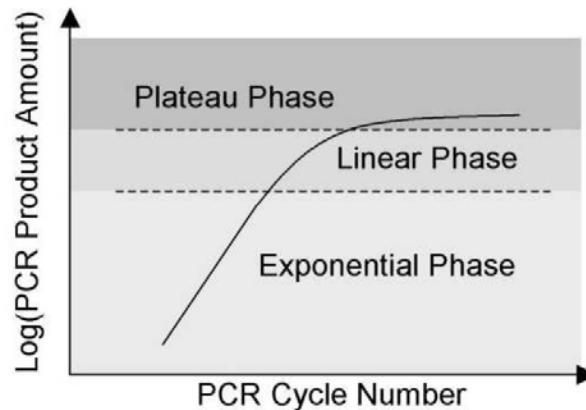


Figura M.M.1 Esquema que muestra las diferentes fases de la amplificación por PCR. En la fase geométrica existe una perfecta correlación entre la cantidad de DNA y el ciclo de PCR y es donde se pueden extrapolar los resultados obtenidos. (www.appliedbiosystems.com).

En la fase geométrica la eficacia de la reacción es máxima. Es en este punto donde se puede comparar si un gen se expresa más que otros. Para comprobar que la amplificación es proporcional a la cantidad de DNA inicial se realiza un banco de diluciones desde $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ hasta $1/1000$. Las curvas de amplificación de cada dilución indican el aumento progresivo de fluorescencia de los diferentes ciclos de PCR. Se establece un umbral de detección o *threshold* en el punto en que la curva permite una detección de fluorescencia superior al *background* dentro de la fase exponencial. El ciclo en el cual la amplificación del gen llega a este nivel se llama Ct (cycle threshold). Con los diferentes Cts, correspondientes a la cantidad de DNA, se obtiene una recta, la pendiente de la cual permite determinar la eficacia la PCR. Una pendiente de -3.32 indica que la eficacia de la PCR es del 100%, pudiéndose determinar así con exactitud los Cts de las muestras problemas y por tanto, su cantidad.

Se utilizó el sistema TaqMan®, que se basa en una sonda unida a un fluorocromo y a un *quencher*, uno en el extremo 5' (*reporter dye*) y otro en el extremo 3' (*quencher*). Cuando la Taq polimerasa replica una secuencia donde se encuentra la sonda, su actividad 5' exonucleasa rompe dicha sonda separando el fluorocromo del *quencher* y emitiendo así fluorescencia que puede ser detectada.

Los ensayos que se llevaron a cabo mediante RT-PCR fueron la cuantificación relativa entre muestras tratadas con GSIs y DMSO, y muestras transfectadas con diferentes componentes de la vía Notch y con el vector vacío. El objetivo era determinar las diferencias de expresión de las proteínas de interés. El gen endógeno utilizado fue el *TBP* (*TATA binding protein*). Se seleccionó después de testar una batería de cuatro genes, entre ellos el gen humano GAPDH, el de β -actina y el gen ribosomal 18S. El *TBP* mostró la expresión más constante y reproducible de los cuatro.

Todas las sondas estaban marcadas con TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) como *quencher* y con VIC[®] como *reporter*. Las sondas utilizadas fueron adquiridos de Applied Biosystems (**Tabla M.M.4**).

Gen	Nº Cat. Applied Biosystems
Hes1	Hs00172878_m1
Hey1	Hs00232618_m1
N-Caderina	Hs00983056_m1
Integrina- α 9	Hs00979865_m1
TBP	Hs00172424_m1

Tabla M.M.4 Nombre del gen y nº de catálogo de Applied Biosystems de las sondas utilizadas en los experimentos de RT-PCR.

El protocolo a seguir consistió en la mezcla de 2 μ L de cDNA con la *Master Mix Taqman[®] Universal (2X)* y los cebadores de cada gen (**Tabla M.M.4**). Se utilizó el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detector* (Applied Biosystem), con las siguientes condiciones de amplificación: 2 min. a 50°C, 10 min. 95°C para la activación de la *Taq polimerasa*, 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min. de extensión a 60°C.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado, descartando valores de Ct con una desviación superior a 0.380. Por otro lado, sólo se tuvieron en consideración las curvas de diluciones, cuya pendiente se ajustaba a los valores de 3.32 (± 0.2).

Sobre los resultados obtenidos se aplicó el método comparativo de Cts. Este método consiste en 3 procesos matemáticos:

- Δ Ct: Ct gen problema – Ct gen normalizador.
- $\Delta\Delta$ Ct: Δ Ct muestra problema – Δ Ct muestra control.
- Aplicación de la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor resultante nos da una idea de la expresión relativa de este gen, comparándola con la de una muestra calibradora.

M.M.1.10 Análisis de expresión génica mediante un sistema de arrays de oligonucleótidos

Los microarrays permiten estudiar de forma simultánea la expresión de miles de genes, abarcando incluso genomas completos, midiendo cualitativa y cuantitativamente los niveles de ARN mensajero. El funcionamiento de los microarrays de Affimetrix se basa en la capacidad de las moléculas de oligonucleótidos de hibridarse entre sí. Se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo. A partir de las células de interés se obtiene una muestra de ARN que se transcribe a RNA complementario (RNAC), las cuales se marcan con moléculas fluorescentes. A esta muestra marcada se la denomina sonda y se enfrentará a las dianas del microarray. Cada molécula de RNAC marcada de la sonda se moverá por difusión hacia la diana que contenga su molécula complementaria para hibridarse con ella y quedar fijada allí. Después de un tiempo para que la mayoría de las cadenas complementarias hibriden, el microarray se lava y se procede a hacer una medición relativa de la cantidad de RNAC de la sonda que ha quedado fijada en cada diana (240).

Se estudiaron los efectos del tratamiento con los GSIs en la expresión génica de las líneas celulares de RMS empleando un sistema de microarray humano (*Affymetrix Genechip Human Genome U133 plus*). Este sistema permitió el análisis simultáneo de 54675 genes y secuencias génicas expresadas (EST), incluyendo 62 genes control. Se extrajo el RNA total correspondiente a los cultivos de las líneas celulares tratadas y no tratadas. La extracción de RNA total se realizó mediante el *Kit RNeasy Mini Kit* (Qiagen), tal y como se detalla en el apartado **M.M.2.3 Extracción y Análisis de RNA**. Una vez extraído, la concentración del RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro *Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies Inc.). La integridad del RNA se verificó mediante el sistema de *Bioanalyzer* (Agilent Technologies 2100). Era importante que el RNA empleado en esta técnica fuera de muy buena calidad. Por eso, era imprescindible que la relación entre las medidas de absorbancia 260 y 280 nm fueran igual a 2 y que las bandas correspondientes a los RNA ribosómicos 28S y 18S fueran nítidas, indicando no degradación. Una vez comprobada la integridad del RNA se procedió a las síntesis del cDNA bicatenario correspondiente a 5-10 µg de RNA de la muestra, tal y como queda explicado en los apartados **Reverse Transcription (RT)** y **Polymerase Chain reaction (PCR)**. Posteriormente el cDNA bicatenario se purificó mediante el *Kit High Pure PCR Purification* (Roche) (véase **Purificación del producto de PCR**). Una vez purificado, se sometió a reacción de marcado con UTP y CTP biotinilados usando el *kit RNA Transcript Labelling* (Enzo Diagnostics) según se especifica a continuación. Se mezclaron entre

1-8 µg de CDNA, 4 µl de tampón de reacción 1X, 4 µl de ribonucleotidos marcados con biotina 10X, 4 µl de DTT 10X, 4 µl de la mezcla de inhibidores de RNAsa 10X, 2 µl de la polimerasa T7 RNA y agua desionizada hasta un volumen de 40 µl. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C. El producto de reacción se purificó usando una columna RNeasy (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante con alguna modificación especificada a continuación (véase **Extracción de RNA**). El volumen de la muestra se ajustó a un total de 80 µl con agua estéril. Se añadieron 280 µl de tampón RLT sin complementarlo con β-mercaptoetanol ya que puede producir ruido de fondo en el array. Se mezclaron los componentes y se añadió 340 µl de etanol (96-100%) homogenizando la solución. No se centrifugó y se procedió con el protocolo recomendado por Qiagen (véase **Extracción de RNA**). Finalmente, los cRNA marcados con biotina se hibridaron a 45°C durante 6-10 horas frente al sistema *Affimetrix Human Genome U133 plus 2.0*. Después de un lavado y marcado automático, los valores absolutos de expresión fueron calculados y normalizados desde el array escaneado usando el sistema *Affimetrix Microarray Suite*. Los cálculos estadísticos y la normalización de los datos se llevaron a cabo en la unidad de bioinformática y estadística del Institut de Recerca Vall d'Hebron. Para identificar los genes sobreexpresados o infraexpresados tras el tratamiento, primero se calcularon las medias de expresión del grupo control y luego la de las diferentes líneas celulares sometidas al tratamiento. Posteriormente se calcularon los valores de expresión diferencial entre los dos grupos (*fold change* o FC). En este caso, todos los genes con un FC relativo de al menos 1.5/-1.5 (los genes en los que el promedio de expresión génica estaba sobreexpresados/infraexpresados al menos un 50% en comparación con el control) fueron seleccionados. Los genes seleccionados se sometieron a un proceso de validación mediante RT-PCR y Western-blot, tal y como se detalla en los apartados **M.M.1.7 Extracción y Análisis de RNA** y **M.M.2.2 Extracción y Análisis de proteína**.

M.M.1.11 Extracción y análisis de proteína

Extracción de proteína

Cuando las células cultivadas llegaron a la confluencia deseada, se procedió a la extracción de proteína. Primeramente se realizaron los procesos de lavado mediante la substitución del medio de cultivo por una solución de PBS frío. Este procedimiento se repitió 2 ó 3 veces y se añadieron diferentes volúmenes según el tamaño de las placas. Las células se lisaron añadiendo el tampón adecuado según el experimento a realizar y se recogieron con una rasqueta. Se procedió a la homogenización de las muestras mediante el uso de una jeringa de insulina. Con el objetivo de desnaturalizar el DNA y las proteínas, las muestras se incubaron a

95°C durante 5 min. Los extractos se centrifugaron 10 min. a 20000 g y se descartaron los *pellets*, quedándose con el sobrenadante (extracto proteico total). Todas las extracciones se realizaron en hielo y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Sigma-Aldrich) a los tampones utilizados para evitar la degradación proteica. Para determinar la concentración de proteína se utilizó el *kit RC DC Protein Assay* (Bio-Rad) (véase **Cuantificación de proteína**).

Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína se utilizó el *kit RC DC Protein Assay* (Bio-Rad), el cual se basa en la determinación proteica mediante el método de Lowry (241). El método consistió en preparar un banco de diluciones de BSA (*Bovine serum albumin*) (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.7 y 2 mg/ml), mediante el cual se obtuvo una relación de concentración-absorbancia. De esta manera las absorbancias de las muestras se interpolaron con la recta patrón, obteniendo unos valores de concentración. El protocolo consistió en mezclar las muestras de interés o el BSA con los reactivos provistos por el Kit, incubar 15 min. a temperatura ambiente y leer las absorbancias a 720 nm mediante el espectrofotómetro con lector de *microplacas iEMS Reader MF* (LabSystems). Sólo se tuvieron en consideración las rectas patrones con una $r^2 \geq 0.9$. Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado. En función del experimento a realizar se utilizaron cantidades de proteína total entre 10-100 µg.

Los tampones utilizados para este procedimiento fueron:

Tampón de Lisis 1

50 mM Tris-HCl pH 7.4
150 mM NaCl
1 mM PMSF
1 mM EDTA 5 mg/ml leupeptin
1% Triton X-100
1% Sodium deoxycholate
0.1% SDS

Tampón de Lisis 2

50 mM Tris-HCl pH 7.4
1 mM EDTA
1% Triton X-100
0.5% DOC
1% SDS
150 mM NaCl

Análisis de proteínas por SDS-PAGE y Western-blot

El SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y el Western-blot son unas técnicas analíticas que detectan proteínas de forma específica mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales. Se utiliza la electroforesis unidimensional en geles de

poliacrilamida (SDS-PAGE) para separar las proteínas, las cuales son transferidas a un soporte membranoso donde se realiza la detección (242).

Se prepararon geles de 1.5 mm de grosor con el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) con un porcentaje variable de acrilamida en la parte separadora del gel, en función del tamaño de las proteínas a analizar (Tabla M.M.5).

Gel Separador 20 ml (2 geles)				Gel Concentrador 10ml (2 geles)
% poliacrilamida	8%	10%	15%	4%
Agua	9.3 ml	7.9 ml	4.6 ml	6.8 ml
Acrilamida/biscrilamida	5.3 ml	6.7 ml	10 ml	1.7 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml	
Tris-HCl 1 M pH 6.8				1.25 ml
10% SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.1 ml
10% APS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.1 ml
TEMED	0.012 ml	0.08 ml	0.08 ml	0.01 ml

Tabla M.M.5 Cantidades de las soluciones utilizadas en la preparación del gel separador y concentrador. En la tabla se muestra las cantidades utilizadas según el porcentaje del gel separador (izquierda) y concentrador (derecha) deseado.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) o nitrocelulosa mediante una segunda electroforesis con el aparato *Mini Trans Blot-Cell* (Bio-Rad) cubierto con el tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia se establecieron en función del peso molecular de las proteínas a estudiar. Para comprobar la eficacia del proceso, así como la cantidad de proteína total cargada en los diferentes carriles se tiñó con el colorante *Ponceau-S* (Sigma-Aldrich).

Para minimizar las uniones inespecíficas de anticuerpos primarios o secundarios a la membrana, se bloquearon estas uniones con una solución al 5% (w/v) de leche descremada o BSA en tampón TBS-0.1% Tween (TBST, *Tris buffered saline Tween*). Las membranas se incubaron un mínimo de 45 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en una solución del 5% de leche descremada o BSA en TBST toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente en agitación en función de la proteína a detectar. Las diluciones o concentraciones, así como las casas comerciales de origen son:

Anticuerpo	Especie	Dilución	Fabricante/ Nº Catálogo
Hes1	Rabbit	1:50	Millipore #AB5702
Notch1 (C-20)	Goat	1:1000	Santa Cruz #sc-6014
N-Caderina	Mouse	1:250	Sigma #C2542
Integrina- α 9	Mouse	1:125	Abnova #3E4
α -Tubulin	Mouse	1:2000	Cell Signaling #T5168

Tabla M.M.6 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western-blot. En la tabla se muestra la especie, la dilución y el nº de catálogo y fabricante de los anticuerpos utilizados.

Antes de incubar con el anticuerpo secundario se lavaron 3 veces las membranas con TBST durante 10 min. por lavado. Seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) a la dilución recomendada por el fabricante durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los sistemas de revelado quimioluminiscentes constan de dos productos: el sustrato de la enzima HRP, el cual emite luz al oxidarse en presencia de peróxido de hidrógeno y la enzima HRP; y un aumentador de esta emisión lumínica. Se utilizaron dos sistemas de revelado, de menor y mayor sensibilidad, en función de las características del anticuerpo primario: *ECLTM Western-blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) y *Supersignal West Dura Extended Detection Substrate* (Pierce-Thermo Scientific). El sistema es el mismo en ambos casos y consiste en incubar la membrana con ambos productos durante 5 min. La luminiscencia se detectó con una película radiográfica *Medical X-Ray Film Blue* (Afga Health Care) durante el tiempo requerido.

Los tampones utilizados para estos procedimientos fueron:

Ponceau-S:	TBST	Tampón Laemmli
0.5% Ponceau-S (w/v)	25 mM Tris-HCl pH 7.5	188 mM Tris-HCl pH 6.8
1% Ácido acético glacial	137 mM NaCl	30% (v/v) Glicerol
	0.1% (v/v) Tween-20	6% (v/v) SDS
		0.02% Azul de Bromofenol
Tampón de carga		Tampón de Transferencia
X μ l de muestra en función de los μ g deseados		60 mM Tris-Cl pH 6.8
DTT 10 mM de concentración final		386 mM Glicina
Tampón Laemmli 1X de concentración final		0.1% SDS

M.M.1.12 Inmunocitoquímica (IC)

Mediante la técnica de inmunocitoquímica se puede evaluar la localización subcelular de una determinada molécula. Mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos diferentes, la técnica permite el análisis simultáneo de localización de varias proteínas.

Para iniciar la técnica, se sembraron entre 3×10^4 - 5×10^4 células sobre cubreobjetos esterilizados previamente recubiertos con una solución de colágeno al 4% (BD Biosciences). 24 horas más tarde, las células fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes, tal y como se detalla en el apartado **M.M.1.5 Manipulación del DNA**. Después de 48 horas se procedió al estudio de las proteínas de interés.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Fabricante/ Nº Catálogo
Hes1	Rabbit	1:50	Millipore #AB5702
N-Caderina	Mouse	1:250	Sigma #C2542
Integrina- α 9	Mouse	1:125	Abnova #3E4

Tabla M.M.7 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de IC. En la tabla se muestra la especie, la dilución y el nº de catálogo y fabricante de los anticuerpos utilizados.

Los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS frío y las células se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 20 min. a temperatura ambiente. Después de cinco lavados con PBS se añadió 0.3% de Triton-X-100 durante 10 min. A partir de aquí los lavados se realizaron con PBS-0.01% Tween20. Las muestras fueron bloqueadas con 5% de FBS en una solución de PBS durante 30 min. Los cubreobjetos se incubaron con 50 μ l de la solución del anticuerpo primario pertinente (**Tabla M.M.7**) durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de 5 lavados más, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo en una cámara oscura durante 1 hora (AlexaFluor-647 o AlexaFluor-488) (*Molecular probes*). Los ácidos nucleicos fueron teñidos con 5 ng/ml de Hoechst33342 (Sigma). Después se volvieron a lavar 3 veces con PBS-0.01% Tween y 2 veces más con PBS solo. Los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con *Mowiol* o *Fluoromont G* (Sigma-Aldrich). Una vez montados, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min. y se procedió a la captura de imágenes o a su almacenamiento a 4°C hasta el momento de la captura. Se utilizó el microscopio confocal (FV1000, Olympus) y los resultados se analizaron mediante el *Software del Olympus Fluorview*. Las cuantificaciones fueron analizadas mediante

el software de *Image J* (NIH, accesibilidad gratuita en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Un mínimo de 100 células elegidas al azar fueron evaluadas para las cuantificaciones pertinentes.

M.M.1.13 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es un método experimental que permite determinar que proteínas se encuentran asociadas a regiones específicas del genoma. El método se basa en la capacidad del formaldehído de reaccionar con las aminas primarias localizadas tanto en los aminoácidos como en las bases de las moléculas de RNA y DNA, formando un *crosslink* covalente entre una proteína específica y el DNA sobre el cual se encuentra situada esta proteína. Posteriormente, las células son lisadas y los extractos sonicados con el fin de conseguir fragmentos de DNA de un tamaño menor. El complejo DNA-proteína es inmunoprecipitado mediante un anticuerpo específico contra la proteína de interés. El *crosslinking* se revierte por la aplicación de calor y la porción de DNA puede ser purificada e identificada por PCR, mediante el uso de sondas específicas (243).

El protocolo aplicado se llevó a cabo a partir de la línea celular RH30. Se procedió con el *crosslinking*, añadiendo 1 ml de solución de *crosslinking* 1X. Después de una incubación de 10 min a temperatura ambiente con agitación se paró la reacción, añadiendo 1/10 de la solución Stop. Después de dos lavados con PBS frío-0.5 mM de EDTA, se lisaron las células añadiendo 1 ml de tampón de lisis y se recuperaron mediante *scrapin*. Una vez lavada la solución celular con tampón de lavado, se añadió 600 µl de tampón de sonificación y se sonificaron en 15 pulsos de 1 segundo con una amplitud del 90%. Se hicieron 20 rondas por muestra dejando pasar al menos 30 segundos entre cada muestra; de esta forma se obtuvieron fragmentos de DNA entre 500-1000 pb. Tras una centrifugación a máxima rpm durante 15 min., se cuantificó la cantidad de cromatina obtenida por cuantificación de absorbancia a 260 nm. El preclarado de cromatina se realizó incubando cada una de las inmunoprecipitaciones con 40 µl de proteína G durante 2 horas a 4°C en agitación. Posteriormente se añadieron 5 mg de los anticuerpos específicos (**Tabla M.M.8**) a cada una de las muestras y éstas se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación. Al día siguiente se añadieron 40 µl de proteína G a 4°C durante 1 hora. El precipitado se lavó con los tampones de lavado 1, 2, 3 y tampón TE (especificados a continuación). Para eluir la proteína se incubó cada muestra con 100 µl de tampón de elución a 65°C durante 10 min., el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se dejó toda la noche a 65°C para revertir el *crosslinking*. Las muestras se purificaron mediante *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) (véase **Purificación del producto de PCR**). Una vez purificado el DNA se procedió a la realización de una PCR semicuantitativa, usando las sondas

complementarias a las regiones promotoras de los genes N-Caderina e Integrina- α 9 (**Tabla M.M.9**) (véase *Real Time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)*).

Anticuerpo	Especie	Dilución	Fabricante/ N° Catálogo
Hes1	Rabbit	5 mg	Millipore #AB5702
Notch1	Rabbit	5 mg	Santa Cruz Biotechnology #sc-6014
IgG	Rabbit	5 mg	Abcam #ab150073

Tabla M.M.8 Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de ChIP. En la tabla se muestra la especie, la dilución y el n° de catálogo y fabricante de los anticuerpos utilizados.

Primer	Promotor	Secuencia
N-Cad Forw	N-Caderina	5'-ACCCAGAGATCAAGGAGCTG-3'
N-Cad Rev	N-Caderina	5'-CTCCAATTCCACCTCCACAT-3'
ITGA9 Forw	Integrina- α 9	5'-GAGCTCAAAAAGTGCCCTCTC-3'
ITGA9 Rev	Integrina- α 9	5'-TGAGGGAGGAAAAAGAAGCA-3'

Tabla M.M.9 Listado de sondas utilizados en las PCRs de los experimentos de ChIP. En la tabla se muestra el promotor y la secuencia de las sondas utilizadas.

La composición de los tampones utilizados para este procedimiento fueron:

Solución de crosslinking (1X)

50 mM HEPES pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
0.5 mM EGTA
1% Formaldehído

Tampón de lisis

10 mM Tris pH 8.0
10% Tritó X-100 (Pierce-Thermo Scientific)
100 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Na-butirato
400 μ M β -glicerofosfato

Solución STOP

1.25 M Glicina
10 mM TRIS-HCl pH 8.0

Tampón de sonicación

10 mM Tris pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
0.5 mM EGTA
10 mM Na-butirato
300 nM Ortovanadato sódico

300 nM Ortovanadato sódico

1:500 Inhibidor de proteasas

Tampón de lavado 1 (3X)

50 mM Tris HCl

0.5% NP 40

2 mM EDTA

137 mM NaCl

10% Glicerol

Tampón de lavado 2 (3X)

50 mM Tris HCl

0.5% NP 40

2 mM EDTA

1 M NaCl

137 mM NaCl

Tampón de lavado 3 (2X)

50 mM Tris HCl

0.5% NP 40

2 mM EDTA

137 mM NaCl

10% Glicerol

250 mM LiCl

M.M.1.14 Ensayos funcionales**Ensayo de invasión**

La cámara de invasión Matrigel es un sistema *in vitro* para el estudio de la invasión celular. Se utilizaron cámaras de transwell con membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm (Corning Costar Corp), las cuales fueron tapizadas con Matrigel BDTM (BD-Biosciences).

Este estudio se realizó con dos objetivos: evaluar los efectos de los GSIs sobre la capacidad invasiva de las células de RMS y evaluar si el aumento de invasividad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de N-Caderina e Integrina- α 9.

El protocolo a seguir para evaluar los efectos de los GSIs se especifica a continuación. Las células pre-tratadas con los fármacos/DMSO fueron privadas de suero durante 24 horas para evitar observar efectos debidos al crecimiento celular. Posteriormente, se tripsinizaron y, después de varios procesos de lavado con PBS frío, se resuspendieron y se diluyeron en medio MEM con la cantidad apropiada de GSI. Con el objetivo de cultivar la misma cantidad de células en cada condición, previo al cultivo en el compartimento superior del pocillo de la cámara, se procedió a contar las células viables, tal y como ha quedado explicado en el apartado **M.M.2 Líneas Celulares**. Se cubrieron los compartimentos inferiores de la cámara con 500 μl de MEM 10% de FBS y la cantidad apropiada de GSI/DMSO. Las cámaras fueron incubadas a 37°C entre 6-48 horas en función de la línea celular a estudiar para permitir la migración celular. Pasado este tiempo de incubación, se procedió al análisis de la capacidad invasiva mediante dos métodos de análisis complementarios. El primer método se basó en la cuantificación de las células que habían migrado a la parte inferior del transwell mediante tinción con Hoechst 33342. Para ello, las membranas fueron lavadas con PBS, fijadas con 2% paraformaldehído-PBS durante 20 min. y teñidos con Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min. a temperatura ambiente. Las células que no migraron fueron retiradas de la superficie

superior del filtro con la ayuda de bastoncillos de algodón. Para contar las células que habían migrado a la parte inferior se utilizó un microscopio de fluorescencia (BX61 Olympus). Se analizaron cinco campos escogidos aleatoriamente de cada transwell. Una vez cuantificadas las células, se procedió a otro método de análisis basado en la tinción de las células situadas en el compartimiento inferior con 0.2% de cristal violeta. Después de la tinción, se procedió a la lisis de éstas con un 10% de ácido acético y se determinó la absorbancia a 590 nm. La absorbancia resultante era proporcional al número de células que habían migrado a la parte inferior. Todos los análisis se realizaron por triplicado en pocillos independientes.

Para evaluar si el aumento de invasividad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de la N-Caderina e Integrina- α 9, las líneas celulares transfectadas con Delta fueron privadas de suero durante 24 horas. Pasadas estas 24 horas, las células transfectadas se tripsinizaron, se cuantificaron y resuspendieron según la cantidad de células deseadas en medio MEM. A la suspensión celular se le añadió una concentración de 20 μ g/ml de anticuerpo neutralizante anti-N-Caderina (GC-4, Sigma) o anti-Integrina- α 9 (Y9A2, Chemicon International), y se le dejó incubar 30 min. en hielo. Las muestras control se trataron con la misma cantidad de anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Cell Signalling) como control isotópico. Después de esta incubación se cultivaron en el compartimiento superior del pocillo de la cámara. Se cubrieron los compartimentos inferiores de la cámara con 500 μ l de MEM 10% de FBS y la cantidad apropiada de anticuerpo. Las cámaras fueron incubadas a 37°C entre 6-48 horas. Pasado este tiempo de incubación, se procedió al análisis de la capacidad invasiva mediante los dos métodos complementarios tal y como se ha detallado en el párrafo anterior.

Ensayo de cierre de la herida

El ensayo de cierre de la herida permite evaluar las trayectorias de migración y la velocidad de cierre de la herida de las células. Este estudio se realizó con dos objetivos: evaluar los efectos de los GSIs en la velocidad de cierre de la herida de las células de RMS y evaluar si el aumento de movilidad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de la N-Caderina e Integrina- α 9.

Para evaluar el efecto de los GSIs en la velocidad de cierre de la herida, las células fueron crecidas hasta confluencia en presencia del GSI apropiado. Al menos 48 horas después del tratamiento se realizaron las incisiones con una punta de pipeta de 1 mm de grosor aproximadamente. El cierre de la herida se monitorizó por videomicroscopía durante 37.5 horas, tomando imágenes cada 15 min. mediante el equipo *cell-R Workstation* (Olympus) acoplado a un microscopio de campo claro. El área de la herida inicial se midió usando el

software de *Image J* y se capturaron imágenes seriadas de campos seleccionados al azar hasta que se cerró la herida. La velocidad de cierre se calculó a partir del cociente entre el área de la herida inicial y el tiempo requerido para cerrar la herida.

Para evaluar si el aumento de movilidad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de la N-Caderina e Integrina- α 9, se cultivaron 10^5 células en una placa de 24 pocillos. 24 horas más tarde las células fueron transfectadas con Delta o el vector vacío como control y se dejaron incubar 24 horas más. Posteriormente se añadió al medio celular 20 μ g/ml del anticuerpo neutralizante anti-N-Caderina (GC-4, Sigma) o anticuerpo neutralizante anti-Integrina- α 9 (Y9A2, Chemicon International) o el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Cell Signalling), y se dejó actuar durante 24 horas. Después de la incubación con los anticuerpos pertinentes, se realizaron las incisiones con una punta de pipeta de 1 mm de grosor y se procedió a la monitorización del cierre de la herida y al cálculo de la velocidad de cierre, tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Las trayectorias de migración se evaluaron usando el software de *Image J*. Se calculó el índice de direccionalidad (ID), definido como el cociente entre la distancia neta dividido por la distancia total recorrida por la célula. Para medir este parámetro se obtuvieron y analizaron las trayectorias recorridas por cada célula individual escogidas aleatoriamente durante un periodo de 37 horas.

Ensayo de adhesión en fibronectina y colágeno

El ensayo de adhesión permite evaluar la capacidad adhesiva de las células en diferentes sustratos. Este estudio se realizó con dos objetivos: evaluar los efectos de los GSIs en la capacidad adhesiva de las células de RMS y evaluar si el aumento de adhesividad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de la N-Caderina e Integrina- α 9.

Para evaluar los efectos del GSI-XXI en la capacidad de adhesión de las células, se cultivaron 3×10^5 en placas de 24 pocillos previamente cubiertas con colágeno o fibronectina (Cell BioLabs). Las células fueron incubadas a 37°C durante 15 min. (RH30), 30 min. (CW9019) o 1 hora (HTB82) en función de la línea celular. Una vez pasado este tiempo de incubación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS frío, fijadas con paraformaldehído al 4% (30 min. a temperatura ambiente) y teñidas con cristal violeta al 0.2%. Una vez las células fueron teñidas se lisaron con ácido acético al 10% y se determinó la absorbancia a 590 nm.

Para evaluar si el aumento de adhesividad al sobreactivar la vía Notch era debido al aumento de expresión de la N-Caderina e Integrina- α 9, las líneas celulares transfectadas con Delta o con el vector control se incubaron con medio de MEM en presencia de 20 μ g/ml del anticuerpo neutralizante anti-N-Caderina (GC-4, Sigma) o anticuerpo neutralizante anti-Integrina- α 9

(Y9A2, Chemicon International) durante 30 min. en hielo. Las muestras control fueron tratadas con anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (Cell Signalling) a la misma concentración, como control isotópico. Después de la incubación, 3×10^5 células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos y se procedió al análisis de la capacidad adhesiva tal y como se ha detallado en el párrafo anterior.

M.M.2 Muestras de Tumor

M.M.2.1 Obtención y mantenimiento de las muestras

Las muestras de los pacientes se analizaron mediante RT-PCR e inmunohistoquímica (IHC).

Para el análisis realizado mediante RT-PCR, se obtuvieron las muestras de tumor de una cohorte no seleccionada de 37 pacientes de RMS. 27 muestras procedían de pacientes remitidos para diagnóstico y tratamiento a la Unidad de Oncología del *Hospital Vall d' Hebron* y 10 fueron cedidos por el Dr. Albert Chetcuti (Banco de Tumores, Unidad de Investigación Oncológica, *Children's Hospital, Westmead, Australia*).

Para el análisis realizado mediante IHC, las muestras de tumor fueron recogidas de una cohorte no seleccionada de 19 niños con RMS y 2 muestras de cáncer de próstata que fueron utilizadas como control positivo. Se obtuvieron consentimientos informados de los padres o tutores legales en todos los casos de RMS infantil. La preparación de los 2 *tissue array* se llevaron a cabo por la Dra. Nuria Torán del Departamento de Patología del *Hospital Vall d' Hebrón*.

Las muestras para PCR a tiempo real se recogieron en fresco y fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su análisis. Las muestras para IHQ se recogieron en fresco y se fijaron en formol e incluyeron en parafina.

M.M.2.2 Extracción de RNA, RT y RT-PCR

La extracción de RNA se realizó mediante el sistema de columnas comercializado por Quiagen (RNeasy mini Kit). Primeramente el tejido fresco se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido y se procedió a la homogeneización de las piezas con el tampón de lisis RLT suplementado con 10 µl/ml de β-mercaptoetanol en una proporción de 300 µl por 0.5 mg de tejido. El tejido se disgregó empleando una jeringa de 18-20 G o en caso de mayor viscosidad el homogenizador *PolytronTM* (Glenmills). Se centrifugaron las muestras durante 3 min. a 12000 rpm, descartando el pelet. Posteriormente se añadió al sobrenadante 1 volumen de etanol al 70% y se traspasó la solución a una columna cromatográfica de afinidad provista por el kit. Se realizaron los procesos de lavado y elución por centrifugación de la columna siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro *Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies Inc). La integridad del RNA se comprobó mediante la visualización en gel de agarosa al 2% o mediante el Bioanalyzer (Agilent Technologies 2100).

Para la RT se utilizó la transcriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen-Life Technologies). Se mezclaron 1.5-2 µg RNA, 50-250 ng de *Random Primers* (Invitrogen-Life Technologies), 1 µl 10 mM *dNTP Mix* (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) (Invitrogen-Life Technologies) y agua estéril hasta un volumen total de 12 µl. Se procedió a la incubación de la mezcla durante 5 min. a 65°C y se incubó rápidamente en hielo. Pasado este periodo de incubación se añadió a la mezcla 4 µl de tampón *First-Strand 5X* (Invitrogen-Life Technologies), 2 µl DTT 0.1 M (Invitrogen-Life Technologies) y 1 µl (200 unidades) de M-MLV RT. Finalmente se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C en un termociclador Minicycler TM (MJ Research Inc.) y se inactivó la reacción incubando durante 15 min. a 70 °C en el mismo termociclador.

Gen	Nº Cat. Applied Biosystems
Notch 1	Hs01062014_m1
Notch 2	Hs01050708_m1
Notch 3	Hs00166432_m1
Notch 4	Hs00270200_m1
Hes1	Hs00172878_m1
Hey1	Hs00232618_m1
N-Caderina	Hs00983056_m1
Integrina-α9	Hs00979865_m1
TBP	Hs00172424_m1

Tabla M.M.10 Nombre del gen y nº de catálogo de Applied Biosystems de las sondas utilizadas en los experimentos de RT-PCR.

Para la RT-PCR, se mezclaron de 2 µL de cDNA con la *Master Mix Taqman® Universal (2X)* y los cebadores de cada gen (**Tabla M.M.10**). Se utilizó el termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detector* (Applied Biosystem), con las siguientes condiciones de amplificación: 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C para la activación de la *Taq polimerasa*, 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min. de extensión a 60°C. El gen endógeno utilizado fue el *TBP*. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado, descartando valores de Ct con una desviación superior a 0.380. Además sólo se tuvieron en consideración las curvas de diluciones, cuya pendiente se ajustaba a los valores de 3.32 (±0.2) (para más detalle véase **M.M.1.7 Extracción y análisis de RNA, RT-PCR**).

M.M.2.3 Análisis de expresión génica

Análisis en serie de la expresión génica (SAGE)

La técnica SAGE permite llevar a cabo un muestreo completo del transcriptoma, y tras el análisis estadístico de los resultados, identificar genes diferencialmente expresados entre dos situaciones de interés. El método se basa en que una secuencia de 10 bases (denominada *tag*) en una localización determinada del ARNm, es suficiente para identificar cada uno de los mensajeros que se expresan en una célula. El método es además capaz de proporcionar información cuantitativa sobre los niveles de expresión de cada gen (244).

Las librerías de SAGE se generaron a partir de cuatro muestras de RMS, como se describió en los trabajos realizados por el Dr. Schaaf (202) y las librerías de músculo esquelético normal se obtuvieron de una base de datos pública (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/SAGELibraryFinder>). El número de *tags* de cada librería fue normalizado a un total de 10^5 . La expresión diferencial entre los grupos de la muestra de interés se calculó mediante *G-pooled statistic* (para más detalle véase **Schaaf et al.2005**) (202). Los p-valores resultantes fueron corregidos mediante múltiples pruebas usando la tasa de falso descubrimiento de *Benjamini-Hochberg* (245).

Arrays de DNA complementario

Los microarrays permiten el análisis cualitativo y cuantitativo de los niveles de expresión de miles de genes, midiendo los niveles de ARN mensajero. Esta técnica se basa en la capacidad de las moléculas complementarias de ADN de hibridarse entre sí. El funcionamiento de esta técnica es muy similar al sistema de arrays de oligonucleótidos (véase **M.M.1.8 Análisis de expresión génica mediante un sistema de arrays de oligonucleótidos**). La diferencia principal es que en vez de emplear oligonucleótidos como dianas utiliza secuencias de cDNA (240).

Se utilizó un microarray que contenía 6144 clones de cDNA a partir de *40K Research Genetics EST library*, los cuales representaban aproximadamente 4200 grupos de genes, como se describió previamente (246). Se realizaron triplicados en la misma fila, utilizando 6 muestras de músculo esquelético normal y 22 de RMS. Se llevaron a cabo varios controles de calidad, incluyendo la optimización del marcaje y la eficiencia de hibridación, así como la determinación de la cantidad óptima de producto de PCR para ser detectada. El análisis de las imágenes se realizó mediante *Aida Image Analyzer* (v.3.44; RZPD, Alemania). Los análisis estadísticos y la normalización de la expresión del cDNA se llevaron a cabo usando el programa Lima (247) y mediante el *software R/Bioconductor* (248).

Arrays de oligonucleótidos de Affimetrix

Los datos crudos de los archivos del sistema de Affimetrix U133 CEL de 30 muestras de músculo esquelético fueron cedidos amablemente por el Dr. Welle (203, 204), mientras que los datos originales obtenidos mediante el sistema de Affimetrix U133A de 30 muestras de RMS se obtuvieron del estudio de Watchel et. al. (205), accesible en Array Express (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) con nº de accesos E-MEXP-121. Los análisis estadísticos y la normalización de la expresión se llevaron a cabo mediante el software R/Bioconductor (248). La expresión diferencial entre los grupos de muestras de interés (RMS vs. músculo esquelético) se evaluaron de nuevo mediante un test-T y mediante la tasa de falso descubrimiento de Benjamini-Hochberg (245).

Selección de genes

Para la selección de genes de cada plataforma se realizaron los siguientes pasos: i) presencia/ausencia de filtros (filtro de p/a); ii) eliminación de genes que no varían (filtro de variación); y iii) selección por el p-valor (filtro de significancia). El uso de los ajustes de filtro utilizados fue distinto para cada plataforma:

SAGE: i) Sólo se consideraron presentes los *tags* que una vez normalizados eran superiores a cinco en al menos una librería. ii) La variación en la expresión de un gen asociado a un *tag* fue determinado mediante el cálculo G-intrínseco (el p-valor de), el cual refleja la variación de un gen en el conteo de los *tags* en todas las librerías. Los *tags* con valores elevados de G-intrínseco en librerías del mismo grupo (Normal o Rabdomiosarcoma) fueron excluidos, ya que reflejaban genes con gran variación dentro de un mismo grupo. Por el contrario, en la comparación entre grupos (N vs R), sólo se consideraron los *tags* con valores elevados de G-intrínseco (p-valor significativo), los otros fueron excluidos. iii) Finalmente, se seleccionaron los *tags* significativos mediante el valor *G-pooled* FDR p-valor.

Arrays de cDNA: i) Los fragmentos purificados de todas las PCRs fueron confirmados mediante un gel de electroforesis. Los clones de cDNA con más de un producto se excluyeron del análisis. Se verificaron las secuencias de más de 1500 clones de cDNA. Un gen se consideró presente si la señal proveniente del spot excedía el umbral en al menos 3 arrays individuales. ii) Sólo los spots con un valor de SD (*standard deviation*) superior al umbral fueron considerados informativos (filtro de variación). iii) Finalmente, se seleccionaron los genes significativos mediante el p-valor FDR (*False Discovery Rate*).

Arrays de oligonucleótidos de Affymetrix: i) El algoritmo de presencia/ausencia de Affymetrix se utilizó para determinar la expresión (*absence* (A); *middle* (M), *present* (P)) de las sondas por muestra. Sólo se consideraron presentes las sondas etiquetadas con una P cuyo valor de expresión excedió el umbral en un número mínimo de muestras. ii) Se consideraron informativas las sondas con un valor de SD superior al umbral (filtro de variación). iii) Finalmente, se seleccionaron los genes significativos mediante el p-valor FDR. Los datos procesados de cada plataforma se combinaron en base a los símbolos HUGO (*Human Genome Organization*), permitiendo clasificar los resultados en función del nombre y símbolo del gen, independientemente de la plataforma que se utilizara. Sólo se seleccionaron los genes que cumplieran las reglas de filtrado y de significancia de cada plataforma en al menos dos de las plataformas estudiadas. La significancia de los genes seleccionados entre las diferentes plataformas se calculó mediante test de permutación (para más detalle véase **Schaaf et al. 2005**) (202).

M.M.2.4 Inmunohistoquímica (IHC)

La inmunohistoquímica es un método basado en las reacciones inmunoenzimáticas usando anticuerpos mono o policlonales para detectar proteínas de interés en células de tejidos.

Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas con alcoholes a concentraciones decrecientes. Posteriormente, se procedió al desenmascaramiento antigénico en horno microondas durante 5 min. en tampón citrato a pH 6 y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero fetal bovino al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente al antígeno a identificar (**Tabla M.M.11**). Después de tres lavados se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó DAB (Kit Dako 5007) durante 30 segundos o 1 min. en función del anticuerpo utilizado y se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas y montadas en medio de montaje rápido (DPX).

Las tinciones fueron evaluadas por dos observadores independientes, de acuerdo a una escala semicuantitativa (249) basada en la intensidad de la tinción y en el porcentaje de células positivas (**Tabla M.M.12**). La suma de la puntuación obtenida de los dos parámetros de la escala semicuantitativa (intensidad y porcentaje células positivas) proporcionó un valor final (0-7) que permitía la clasificación de las muestras según su nivel de tinción (negativa, leve, moderada o fuerte) (**Tabla M.M.13**).

Anticuerpo	Especie	Dilución	Fabricante/Nº de Catálogo
Hes1	Rabbit	1:200-1:1000	Millipore #AB5702
N-Caderina	Mouse	1:250	Sigma #C2542
Integrina- α 9	Mouse	1:125	Abnova #3E4

Tabla M.M.11 Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de IHC. En la tabla se muestra la especie, la dilución y el nº de catálogo y fabricante de los anticuerpos utilizados.

Puntuación	0	1	2	3	4
Intensidad	0	Débil	Moderada	Fuerte	
Células positivas, %	0	$\leq 25\%$	26-50%	51-75%	$\geq 75\%$

Tabla M.M.12 Interpretación de la IHC según intensidad y porcentaje de marcaje. La tabla muestra la puntuación estipulada según la intensidad y porcentaje de células positivas del marcaje.

Valor final de la IHC	Suma Puntuación
Tinción negativa	0-1
Tinción leve	2-3
Tinción moderada	4-5
Tinción fuerte	6-7

Tabla M.M.13 Valor final de la tinción. La suma de la puntuación obtenida de los dos parámetros de la escala semicuantitativa (intensidad y porcentaje células positivas) proporcionó un valor final (0-7) que permitía la clasificación de las muestras según su nivel de tinción (negativa, leve, moderada o fuerte).

El tampón utilizado para el desenmascaramiento de antígenos fue:

Tampón citrato

0.1 M de Ácido cítrico

0.1 M de Citrato sódico

M.M.3 Estudios *in vivo*. Formación de tumores en ratones**M.M.3.1 Transfección estable del vector pEGFP-luciferasa**

El vector pEGFP-luciferasa fue cedido por el Dr. Jaume Reventós (*Institut de Recerca Hospital de la Vall d'Hebron*, Barcelona, España). La transfección de la línea celular RH30 se llevó a cabo mediante Lipofectamina™ Plus Reagent (Invitrogen) (véase **M.M.1.6 Transfecciones**). Se incubaron 0.2 µg del plásmido pEGFP-luciferasa con un total de 100 µl de OptiMEM (Gibco) y 0.5 µl de lipofectamina durante 25 min. a temperatura ambiente. Pasados los 25 min., se añadió la mezcla a la línea celular RH30 cultivada en placas de 96 pocillos a una confluencia de 10⁵ células por pocillo y se dejó incubar 5 horas a 37°C. La transfección se paró al añadir 10% de suero fetal bovino en medio de DMEM (PAA). Pasadas 24 horas se pasaron las células a una dilución 1:10 con medio fresco DMEM y se les añadió geneticina (2 mg/ml) para seleccionar las células transfectadas. Las colonias resultantes de la transfección fueron seleccionadas mediante un citómetro de flujo separador de alta velocidad (FacsAria de BD) por detección de la proteína verde fluorescente pEGFP, obteniendo una población de células pEGFP positivas. Para validar la producción de bioluminiscencia, las células RH30 se testaron en un ensayo *in vitro* usando el instrumento *IVIS® Spectrum* (Caliper Life Sciences, MA.). Aproximadamente 2x10⁵ células se sembraron en una placa opaca de 96 pocillos. Se añadió a cada pocillo *D-luciferina* (Promega, Biotech Ibérica) a 300 µg/mL (50 µL) y antes de la captación de imágenes, las células se incubaron menos de 10 min. a 37°C. La producción de luz de cada clon de RH30 fue lineal y proporcional al número de células plaqueadas. Mediante la determinación de la actividad luciferasa se seleccionaron aquellos clones de RH30 que tenían mayor expresión de luciferasa, a partir de los cuales se realizaron los ensayos posteriores.

M.M.3.2 Generación del modelo de xenógrafo ortotópico en ratones SCID

Los estudios *in vivo* se realizaron de acuerdo con las directrices del protocolo diseñado por el comité de ético de experimentación animal del *Institut de Recerca Vall d'Hebron*. Se compraron ratones hembras de 4-6 semanas SCID beige de *Charles River Laboratories* (Wilmington, MA).

Para determinar el número de células, se inyectaron ortotópicamente en el músculo gastrocnemio de las extremidades posteriores 1x10⁶, 2x10⁶, 3x10⁶, 4x10⁶ y 5x10⁶ células tumorales RH30-pEGFP-Luciferasa (en 50 µl de suero fisiológico) en cinco ratones SCID respectivamente. Las extremidades izquierdas se utilizaron como control. Los animales fueron previamente anestesiados mediante inhalación con isofluorano (ABBOT Laboratories). Para

evaluar la concentración óptima de células a inocular utilizamos el índice de progresión del volumen del tumor, posteriormente detallado (véase **M.M.4.7 Análisis del patrón de crecimiento de los tumores in vivo**).

M.M.3.3 Determinación de la concentración óptima del fármaco

El DAPT (Sigma-Aldrich) se disolvió en una solución de DMSO. Para determinar la dosis adecuada dividimos aleatoriamente los ratones SCID, inoculados previamente con la línea celular RH30-GFP-Luciferasa, en cuatro grupos diferentes: tratamiento 1 (1 $\mu\text{mol/Kg/día}$), tratamiento 2 (5 $\mu\text{mol/Kg/día}$), placebo 1 (1 $\mu\text{mol/Kg/día}$ de DMSO) y placebo 2 (5 $\mu\text{mol/Kg/día}$ DMSO). Se les inyectó la preparación correspondiente a los ratones intraperitonealmente durante cinco semanas, empezando un día después de la inoculación. Para determinar la dosis efectiva evaluamos los niveles de expresión de Hes1 de los tumores de los ratones, tanto a nivel de RNA como de proteína. Consideramos un evento tóxico como aquel en que la pérdida de peso al final del tratamiento era $\geq 20\%$ al peso inicial del animal.

M.M.3.4 Tratamiento con DAPT

Una vez determinado el número de células y la concentración óptima del fármaco, se procedió a evaluar los efectos del tratamiento con DAPT. Se inyectaron ortotópicamente en el músculo gastrocnemio de las extremidades posteriores 1×10^6 células tumorales RH30-pEGFP-Luciferasa (en 50 μl de suero fisiológico) en 8 ratones SCID. Un día después de la inoculación, los ratones fueron aleatoriamente distribuidos en dos grupos (grupo control –tratados con DMSO- o grupo de estudio -tratados con GSI–). El GSI se preparó a 10 mM en DMSO. El día de la inyección, la droga fue diluida con EtOH-PBS al 30% hasta una concentración final de 5 $\mu\text{mol/Kg}$. Se procedió de la misma manera para preparar la solución placebo substituyendo la droga por DMSO. Se les inyectó la preparación correspondiente a los ratones intraperitonealmente durante cinco semanas, empezando un día después de la inoculación.

M.M.3.5 Sacrificio de los ratones y extracción de tumores

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical bajo anestesia por isofluorano. Se procedió a la extracción del tumor primario. Se pesó y se dividió en dos mitades, una para parafina (paraformaldehído) y otra para congelar (nieve carbónica).

M.M.3.6 Visualización del crecimiento de los tumores *in vivo*

Los animales fueron anestesiados mediante inhalación con 2% isoflurano. Para la visualización *in vivo* fue necesario un total de 150 mg de Luciferina/kg, administrada mediante dos inyecciones en la cavidad peritoneal. Pasados 10 min. de la inyección, se procedió a medir el flujo de fotones mediante el sistema *IVIS® Spectrum* (Caliper Life Sciences). El flujo de fotones es proporcional al número de células vivas que expresan luciferasa y se correlaciona con el tamaño del tumor (**Figura M.M.2**).

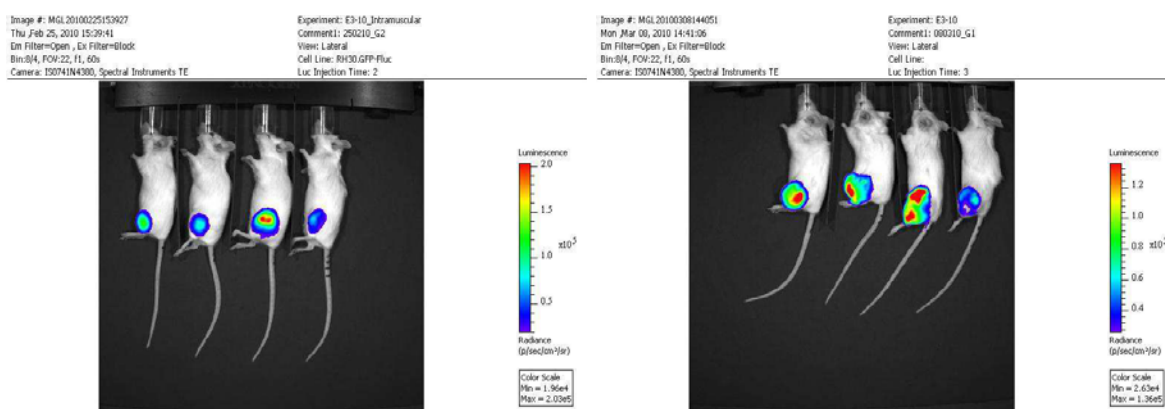


Figura M.M.2 Visualización del crecimiento de los tumores mediante el sistema *IVIS® Spectrum*. En la imagen se muestra el crecimiento de los tumores *in vivo* al final del tratamiento.

M.M.3.7 Análisis del patrón de crecimiento de los tumores *in vivo*

Los animales inoculados fueron periódicamente observados y clínicamente examinados. El volumen de los tumores se midió cada semana con un pie de rey y se calculó el volumen mediante la siguiente fórmula: $(4/3) \times \pi \times (r)^3$, donde “r” es el radio del tumor. El tiempo de observación global fue de un máximo de 35 días, dependiendo del tamaño del tumor. Los volúmenes relativos de los tumores fueron calculados según la siguiente fórmula: $V_{rel} = V_{dx}/V_{d0}$, donde V_{dx} es el volumen del tumor en el día x y V_{d0} es el volumen del tumor al inicio de la observación. Los valores medios y las desviaciones estándares fueron calculados y estadísticamente analizados en ambos grupos usando el test de la *T-Student*.

M.M.3.8 Análisis de RNA y proteína

Para analizar la inhibición de la vía Notch en los tumores de los ratones, se procedió a la extracción y análisis de RNA y de proteína tal y cómo se ha detallado en los apartados **M.M.1.7 Extracción y análisis de RNA** y **M.M.1.9 Extracción y análisis de proteína**.

REFERENCIAS

- (1) Malempati S, Hawkins DS. **Rhabdomyosarcoma: Review of the children's oncology group (COG) soft-tissue Sarcoma committee experience and rationale for current COG studies.** *Pediatr Blood Cancer* 2012 Feb 29.
- (2) R. Peris Bonet, S. Felipe Garcia, F. Fuentes García, R. Jordán Navarro, E Pardo Ramaguera, C. Giménez Tamarit. **Cáncer infantil en España. Estadísticas. 2011;** Available at: <http://www.uv.es/rnti/cifrasCancer.html>.
- (3) Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. **Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease.** *J Clin Oncol* 2001 Jun 15;19(12):3091-3102.
- (4) Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. **Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type.** *Cancer* 1995 Apr 15;75(8):2186-2195.
- (5) Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. **Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005.** *Cancer* 2009 Sep 15;115(18):4218-4226.
- (6) Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MC, Meyer WH, et al. **Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups.** *J Clin Oncol* 2008 May 10;26(14):2384-2389.
- (7) La Quaglia MP. **The surgical management of metastases in pediatric cancer.** *Semin Pediatr Surg* 1993 Feb;2(1):75-82.
- (8) Maurer HM, Gehan EA, Beltangady M, Crist W, Dickman PS, Donaldson SS, et al. **The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II.** *Cancer* 1993 Mar 1;71(5):1904-1922.
- (9) Barr FG. **Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma.** *J Pediatr Hematol Oncol* 1997 Nov-Dec;19(6):483-491.
- (10) Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, et al. **Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group.** *Am J Pathol* 2009 Feb;174(2):550-564.

- (11) Scrabble H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Sheng WW, Soukup S, et al. **Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma.** Genes Chromosomes Cancer 1989 Sep;1(1):23-35.
- (12) Leuschner I. **Spindle cell rhabdomyosarcoma: histologic variant of embryonal rhabdomyosarcoma with association to favorable prognosis.** Curr Top Pathol 1995;89:261-272.
- (13) Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC, Cavenee WK. **Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism.** Nature 1985 Jul 25-31;316(6026):330-334.
- (14) Newton WA,Jr, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ, Hamoudi AB, et al. **Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.** Cancer 1995 Sep 15;76(6):1073-1085.
- (15) Barr FG. **Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma.** Oncogene 2001 Sep 10;20(40):5736-5746.
- (16) Leonard H. Wexler. **Rhabdomyosarcoma.** 2004;1.
- (17) Qualman S, Lynch J, Bridge J, Parham D, Teot L, Meyer W, et al. **Prevalence and clinical impact of anaplasia in childhood rhabdomyosarcoma : a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group.** Cancer 2008 Dec 1;113(11):3242-3247.
- (18) Kodet R, Newton WA,Jr, Hamoudi AB, Asmar L, Jacobs DL, Maurer HM. **Childhood rhabdomyosarcoma with anaplastic (pleomorphic) features. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.** Am J Surg Pathol 1993 May;17(5):443-453.
- (19) Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, et al. **A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma.** Cytogenet Cell Genet 1987;45(3-4):148-155.
- (20) Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Downing JR, Naeve CW. **Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma.** Cancer Res 1993 Nov 1;53(21):5108-5112.

- (21) Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. **Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma.** *Cancer Res* 1994 Jun 1;54(11):2869-2872.
- (22) Keller C, Capecchi MR. **New genetic tactics to model alveolar rhabdomyosarcoma in the mouse.** *Cancer Res* 2005 Sep 1;65(17):7530-7532.
- (23) Turc-Carel C, Lizard-Nacol S, Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E. **Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma.** *Cancer Genet Cytogenet* 1986 Jan 15;19(3-4):361-362.
- (24) Williamson D, Missiaglia E, de Reynies A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, et al. **Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma.** *J Clin Oncol* 2010 May 1;28(13):2151-2158.
- (25) Davicioni E, Anderson JR, Buckley JD, Meyer WH, Triche TJ. **Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: a report from the children's oncology group.** *J Clin Oncol* 2010 Mar 1;28(7):1240-1246.
- (26) Ludolph DC, Konieczny SF. **Transcription factor families: muscling in on the myogenic program.** *FASEB J* 1995 Dec;9(15):1595-1604.
- (27) Vasyutina E, Lenhard DC, Birchmeier C. **Notch function in myogenesis.** *Cell Cycle* 2007 Jun 15;6(12):1451-1454.
- (28) Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. **Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells.** *J Cell Biol* 2000 Dec 11;151(6):1221-1234.
- (29) Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA. **MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle.** *Development* 1997 Dec;124(23):4729-4738.
- (30) Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, et al. **The formation of skeletal muscle: from somite to limb.** *J Anat* 2003 Jan;202(1):59-68.

- (31) Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, et al. **Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice.** Nature 2004 Sep 23;431(7007):466-471.
- (32) Sartorelli V, Caretti G. **Mechanisms underlying the transcriptional regulation of skeletal myogenesis.** Curr Opin Genet Dev 2005 Oct;15(5):528-535.
- (33) Conboy IM, Rando TA. **The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis.** Dev Cell 2002 Sep;3(3):397-409.
- (34) Hettmer S, Wagers AJ. **Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma.** Nat Med 2010 Feb;16(2):171-173.
- (35) Roma J, Masia A, Reventos J, Sanchez de Toledo J, Gallego S. **Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro.** Clin Cancer Res 2011 Feb 1;17(3):505-513.
- (36) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. **Notch signaling.** Science 1995 Apr 14;268(5208):225-232.
- (37) Mohr OL. **Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila.** Genetics 1919 May;4(3):275-282.
- (38) Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. **Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats.** Cell 1985 Dec;43(3 Pt 2):567-581.
- (39) Santos L, Leon-Galvan MF, Marino-Marmolejo EN. **Notch signaling pathway and new strategies in cancer treatment.** Salud Publica Mex 2006 Mar-Apr;48(2):155-165.
- (40) Zanotti S, Canalis E. **Notch and the skeleton.** Mol Cell Biol 2010 Feb;30(4):886-896.
- (41) Fleming RJ. **Structural conservation of Notch receptors and ligands.** Semin Cell Dev Biol 1998 Dec;9(6):599-607.
- (42) Heitzler P, Simpson P. **Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions.** Development 1993 Mar;117(3):1113-1123.

- (43) Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, et al. **Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes.** *Mol Cell Biol* 2006 Jun;26(12):4642-4651.
- (44) Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, et al. **A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.** *Mol Cell* 2000 Feb;5(2):207-216.
- (45) Allman D, Punt JA, Izon DJ, Aster JC, Pear WS. **An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis.** *Cell* 2002 Apr;109 Suppl:S1-11.
- (46) Wu J, Bresnick EH. **Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated.** *Trends Biochem Sci* 2007 Oct;32(10):477-485.
- (47) Radtke F, Raj K. **The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?** *Nat Rev Cancer* 2003 Oct;3(10):756-767.
- (48) Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. **Notch and disease: A growing field.** *Semin Cell Dev Biol* 2012 Feb 20.
- (49) Komatsu H, Chao MY, Larkins-Ford J, Corkins ME, Somers GA, Tucey T, et al. **OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during Caenorhabditis elegans vulval development.** *PLoS Biol* 2008 Aug 12;6(8):e196.
- (50) Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC. **Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats.** *Mol Cell Biol* 2004 Nov;24(21):9265-9273.
- (51) Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. **Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.** *Science* 1999 Apr 30;284(5415):770-776.
- (52) Kovall RA. **Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex.** *Curr Opin Struct Biol* 2007 Feb;17(1):117-127.
- (53) Sasamura T, Ishikawa HO, Sasaki N, Higashi S, Kanai M, Nakao S, et al. **The O-fucosyltransferase O-fut1 is an extracellular component that is essential for the constitutive endocytic trafficking of Notch in Drosophila.** *Development* 2007 Apr;134(7):1347-1356.

- (54) Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S. **Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats.** Development 1995 Aug;121(8):2633-2644.
- (55) Fryer CJ, White JB, Jones KA. **Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover.** Mol Cell 2004 Nov 19;16(4):509-520.
- (56) Fischer A, Gessler M. **Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors.** Nucleic Acids Res 2007;35(14):4583-4596.
- (57) Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, et al. **Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling.** Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Dec 5;97(25):13655-13660.
- (58) Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL, Bigas A. **RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells.** Development 2005 Mar;132(5):1117-1126.
- (59) Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. **Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease.** Nature 2005 Sep 8;437(7056):270-274.
- (60) Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, et al. **Notch signaling is essential for ventricular chamber development.** Dev Cell 2007 Mar;12(3):415-429.
- (61) Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. **Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling.** Nat Cell Biol 2004 Jun;6(6):547-554.
- (62) Yan B, Raben N, Plotz PH. **Hes-1, a known transcriptional repressor, acts as a transcriptional activator for the human acid alpha-glucosidase gene in human fibroblast cells.** Biochem Biophys Res Commun 2002 Mar 1;291(3):582-587.

- (63) Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK, et al. **Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase Ildelta-dependent neurogenic gene activation pathway.** Cell 2004 Dec 17;119(6):815-829.
- (64) Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. **Notch signaling: simplicity in design, versatility in function.** Development 2011 Sep;138(17):3593-3612.
- (65) Sanalkumar R, Dhanesh SB, James J. **Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates.** Cell Mol Life Sci 2010 Sep;67(17):2957-2968.
- (66) Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, et al. **Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway.** Development 1996 Dec;122(12):3765-3773.
- (67) Hayward P, Brennan K, Sanders P, Balayo T, DasGupta R, Perrimon N, et al. **Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity.** Development 2005 Apr;132(8):1819-1830.
- (68) Axelrod JD, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N. **Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled.** Science 1996 Mar 29;271(5257):1826-1832.
- (69) Munoz-Descalzo S, Sanders PG, Montagne C, Johnson RI, Balayo T, Arias AM. **Wingless modulates the ligand independent traffic of Notch through Dishevelled.** Fly (Austin) 2010 Jul 1;4(3).
- (70) Munoz-Descalzo S, Tkocz K, Balayo T, Arias AM. **Modulation of the ligand-independent traffic of Notch by Axin and Apc contributes to the activation of Armadillo in Drosophila.** Development 2011 Apr;138(8):1501-1506.
- (71) Sundaram MV. **The love-hate relationship between Ras and Notch.** Genes Dev 2005 Aug 15;19(16):1825-1839.
- (72) Fitzgerald K, Harrington A, Leder P. **Ras pathway signals are required for notch-mediated oncogenesis.** Oncogene 2000 Aug 31;19(37):4191-4198.
- (73) Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, et al. **Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells.** Nat Med 2002 Sep;8(9):979-986.

- (74) De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, et al. **Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding.** J Cell Sci 2004 Sep 15;117(Pt 20):4691-4703.
- (75) Hurlbut GD, Kankel MW, Lake RJ, Artavanis-Tsakonas S. **Crossing paths with Notch in the hyper-network.** Curr Opin Cell Biol 2007 Apr;19(2):166-175.
- (76) Sjolund J, Bostrom AK, Lindgren D, Manna S, Moustakas A, Ljungberg B, et al. **The notch and TGF-beta signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma.** PLoS One 2011;6(8):e23057.
- (77) Kluppel M, Wrana JL. **Turning it up a Notch: cross-talk between TGF beta and Notch signaling.** Bioessays 2005 Feb;27(2):115-118.
- (78) Dang TP. **Notch, apoptosis and cancer.** Adv Exp Med Biol 2012;727:199-209.
- (79) Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, et al. **c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma.** Genes Dev 2006 Aug 1;20(15):2096-2109.
- (80) Ingram WJ, McCue KI, Tran TH, Hallahan AR, Wainwright BJ. **Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling.** Oncogene 2008 Feb 28;27(10):1489-1500.
- (81) Roma J, Almazan-Moga A, Sanchez de Toledo J, Gallego S. **Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network.** Sarcoma 2012;2012:695603.
- (82) Buas MF, Kadesch T. **Regulation of skeletal myogenesis by Notch.** Exp Cell Res 2010 Nov 1;316(18):3028-3033.
- (83) Delfini MC, Hirsinger E, Pourquie O, Duprez D. **Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis.** Development 2000 Dec;127(23):5213-5224.
- (84) Kopan R, Nye JS, Weintraub H. **The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD.** Development 1994 Sep;120(9):2385-2396.

- (85) Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G. **Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1**. Cell 1995 Mar 24;80(6):909-917.
- (86) Wilson-Rawls J, Molkenin JD, Black BL, Olson EN. **Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C**. Mol Cell Biol 1999 Apr;19(4):2853-2862.
- (87) Hirsinger E, Malapert P, Dubrulle J, Delfini MC, Duprez D, Henrique D, et al. **Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation**. Development 2001 Jan;128(1):107-116.
- (88) Buas MF, Kabak S, Kadesch T. **The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis**. J Biol Chem 2010 Jan 8;285(2):1249-1258.
- (89) Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, et al. **TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms**. Cell 1991 Aug 23;66(4):649-661..
- (90) Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, et al. **Notch3 gene amplification in ovarian cancer**. Cancer Res 2006 Jun 15;66(12):6312-6318.
- (91) Gallahan D, Callahan R. **The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4)**. Oncogene 1997 Apr 24;14(16):1883-1890.
- (92) Zhang P, Yang Y, Zweidler-McKay PA, Hughes DP. **Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis**. Clin Cancer Res 2008 May 15;14(10):2962-2969.
- (93) Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, et al. **Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation**. Br J Cancer 2009 Jun 16;100(12):1957-1965.
- (94) Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, et al. **Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors**. Cancer Res 2006 Aug 1;66(15):7445-7452.

- (95) Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, et al. **A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis.** *Cancer Res* 2008 Jun 15;68(12):4727-4735.
- (96) Sang L, Collier HA, Roberts JM. **Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1.** *Science* 2008 Aug 22;321(5892):1095-1100.
- (97) Sang L, Roberts JM, Collier HA. **Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells.** *Trends Mol Med* 2010 Jan;16(1):17-26.
- (98) Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. **Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time.** *Nat Rev Cancer* 2011 May;11(5):338-351.
- (99) Merlino G, Khanna C. **Fishing for the origins of cancer.** *Genes Dev* 2007 Jun 1;21(11):1275-1279.
- (100) Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, Haruki N, Gonzalez A, Carbone DP, et al. **Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers.** *Cancer Res* 2007 Sep 1;67(17):8051-8057.
- (101) Freour T, Jarry A, Bach-Ngohou K, Dejoie T, Bou-Hanna C, Denis MG, et al. **TACE inhibition amplifies TNF-alpha-mediated colonic epithelial barrier disruption.** *Int J Mol Med* 2009 Jan;23(1):41-48.
- (102) Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. **Molecular interactions in cancer cell metastasis.** *Acta Histochem* 2010;112(1):3-25.
- (103) Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, et al. **The molecular architecture of focal adhesions.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:379-416.
- (104) Greenwood JA, Murphy-Ullrich JE. **Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility.** *Microsc Res Tech* 1998 Dec 1;43(5):420-432.
- (105) Gupta GP, Massague J. **Cancer metastasis: building a framework.** *Cell* 2006 Nov 17;127(4):679-695.
- (106) Fong Y, Coit DG, Woodruff JM, Brennan MF. **Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults. Analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients.** *Ann Surg* 1993 Jan;217(1):72-77.

- (107) Lynch L, Vodyanik PI, Boettiger D, Guvakova MA. **Insulin-like growth factor I controls adhesion strength mediated by alpha5beta1 integrins in motile carcinoma cells.** Mol Biol Cell 2005 Jan;16(1):51-63.
- (108) Christofori G. **Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression.** EMBO J 2003 May 15;22(10):2318-2323.
- (109) Makrilia NF, Kollias AF, Manolopoulos LF, Syrigos K. **Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer.** Cancer investigation JID - 8307154 1201.
- (110) Hanahan D, Weinberg R.A, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** Cell JID 0413066 0208.
- (111) Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. **Cell migration: integrating signals from front to back.** Science 2003 Dec 5;302(5651):1704-1709.
- (112) Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. **Cell migration as a five-step cycle.** Biochem Soc Symp 1999;65:233-243.
- (113) Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. **Cell migration at a glance.** J Cell Sci 2005 Nov 1;118(Pt 21):4917-4919.
- (114) Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. **Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?** Cancer Lett 2002 Feb 25;176(2):123-128.
- (115) Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. **Cadherin switch in tumor progression.** Ann N Y Acad Sci 2004 Apr;1014:155-163.
- (116) Derycke LD, Bracke ME. **N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling.** Int J Dev Biol 2004;48(5-6):463-476.
- (117) Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. **Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway.** Mol Biol Cell 2005 Sep;16(9):4386-4397.

- (118) Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH. **Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture.** *Cell Motil Cytoskeleton* 1997;38(4):351-364.
- (119) Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. **N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression.** *J Cell Biol* 1999 Nov 1;147(3):631-644.
- (120) Li K, He W, Lin N, Wang X, Fan QX. **N-cadherin knock-down decreases invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma in vitro.** *World J Gastroenterol* 2009 Feb 14;15(6):697-704.
- (121) Perotti A, Sessa C, Mancuso A, Noberasco C, Cresta S, Locatelli A, et al. **Clinical and pharmacological phase I evaluation of Exherin (ADH-1), a selective anti-N-cadherin peptide in patients with N-cadherin-expressing solid tumours.** *Ann Oncol* 2009 Apr;20(4):741-745.
- (122) Grunwald GB, Pratt RS, Lilien J. **Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells.** *J Cell Sci* 1982 Jun;55:69-83.
- (123) Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Ruegg C. **N-cadherin as a therapeutic target in cancer.** *Expert Opin Investig Drugs* 2007 Apr;16(4):451-465.
- (124) Wahl JK,3rd, Kim YJ, Cullen JM, Johnson KR, Wheelock MJ. **N-cadherin-catenin complexes form prior to cleavage of the proregion and transport to the plasma membrane.** *J Biol Chem* 2003 May 9;278(19):17269-17276.
- (125) Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, Kuzuya A, Kageyama T, Chonabayashi K, et al. **Presenilin 1 is involved in maturation and trafficking of N-cadherin to the plasma membrane.** *J Neurosci Res* 2003 Oct 15;74(2):184-191.
- (126) Ozawa M, Engel J, Kemler R. **Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function.** *Cell* 1990 Nov 30;63(5):1033-1038.
- (127) Nose A, Tsuji K, Takeichi M. **Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules.** *Cell* 1990 Apr 6;61(1):147-155.

- (128) Nelson WJ. **Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex.** Biochem Soc Trans 2008 Apr;36(Pt 2):149-155.
- (129) Cavallaro U, Dejana E. **Adhesion molecule signalling: not always a sticky business.** Nat Rev Mol Cell Biol 2011 Mar;12(3):189-197.
- (130) Magie CR, Pinto-Santini D, Parkhurst SM. **Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in Drosophila.** Development 2002 Aug;129(16):3771-3782.
- (131) Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, et al. **p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction.** Mol Cell Biol 2003 Apr;23(7):2287-2297.
- (132) Xu G, Craig AW, Greer P, Miller M, Anastasiadis PZ, Lilien J, et al. **Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer.** J Cell Sci 2004 Jul 1;117(Pt 15):3207-3219.
- (133) Nelson WJ, Nusse R. **Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.** Science 2004 Mar 5;303(5663):1483-1487.
- (134) Arregui C, Pathre P, Lilien J, Balsamo J. **The nonreceptor tyrosine kinase fer mediates cross-talk between N-cadherin and beta1-integrins.** J Cell Biol 2000 Jun 12;149(6):1263-1274.
- (135) Gavard J, Lambert M, Grosheva I, Marthiens V, Irinopoulou T, Riou JF, et al. **Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways.** J Cell Sci 2004 Jan 15;117(Pt 2):257-270.
- (136) Lambert M, Choquet D, Mege RM. **Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton.** J Cell Biol 2002 Apr 29;157(3):469-479.
- (137) Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C. **N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts.** J Cell Biol 2002 Sep 2;158(5):953-965.

- (138) Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper SD, Walsh FS, Doherty P. **Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth.** J Biol Chem 2001 Nov 23;276(47):43879-43886.
- (139) Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. **Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis.** J Cell Biol 2000 Feb 21;148(4):779-790.
- (140) Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. **A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor.** Cancer Cell 2002 Oct;2(4):301-314.
- (141) Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. **N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells.** Cancer Res 2001 May 1;61(9):3819-3825.
- (142) Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL. **Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization.** J Biol Chem 2002 Sep 6;277(36):32905-32914.
- (143) Kim JB, Islam S, Kim YJ, Prudoff RS, Sass KM, Wheelock MJ, et al. **N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility.** J Cell Biol 2000 Dec 11;151(6):1193-1206.
- (144) Fedor-Chaiken M, Meigs TE, Kaplan DD, Brackenbury R. **Two regions of cadherin cytoplasmic domains are involved in suppressing motility of a mammary carcinoma cell line.** J Biol Chem 2003 Dec 26;278(52):52371-52378.
- (145) Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, et al. **ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling.** EMBO J 2005 Feb 23;24(4):742-752.
- (146) Paradies NE, Grunwald GB. **Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function.** J Neurosci Res 1993 Sep 1;36(1):33-45.

- (147) Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, et al. **A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations.** Cell 2003 Sep 5;114(5):635-645.
- (148) Liu ZJ, Xiao M, Balint K, Smalley KS, Brafford P, Qiu R, et al. **Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression.** Cancer Res 2006 Apr 15;66(8):4182-4190.
- (149) Wang T, Holt CM, Xu C, Ridley C, P O Jones R, Baron M, et al. **Notch3 activation modulates cell growth behaviour and cross-talk to Wnt/TCF signalling pathway.** Cell Signal 2007 Dec;19(12):2458-2467.
- (150) Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ, Knudsen KA. **Rhabdomyosarcoma-derived cell lines exhibit aberrant expression of the cell-cell adhesion molecules N-CAM, N-cadherin, and cadherin-associated proteins.** Exp Cell Res 1993 Sep;208(1):84-93.
- (151) Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zhang W, Kang JS. **Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact.** J Cell Sci 2005 Jun 1;118(Pt 11):2355-2362.
- (152) Charrasse S, Comunale F, Gilbert E, Delattre O, Gauthier-Rouviere C. **Variation in cadherins and catenins expression is linked to both proliferation and transformation of Rhabdomyosarcoma.** Oncogene 2004 Mar 25;23(13):2420-2430.
- (153) Desgrosellier JS, Cheresch DA. **Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities.** Nat Rev Cancer 2010 Jan;10(1):9-22.
- (154) Singh P, Chen C, Pal-Ghosh S, Stepp MA, Sheppard D, Van De Water L. **Loss of integrin alpha9beta1 results in defects in proliferation, causing poor re-epithelialization during cutaneous wound healing.** J Invest Dermatol 2009 Jan;129(1):217-228.
- (155) Fiorilli P, Partridge D, Staniszewska I, Wang JY, Grabacka M, So K, et al. **Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation.** Lab Invest 2008 Nov;88(11):1143-1156.
- (156) Schreiber TD, Steinl C, Essl M, Abele H, Geiger K, Muller CA, et al. **The integrin {alpha}9{beta}1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell**

- adhesion, proliferation and differentiation.** Haematologica 2010 Feb 23 doi: 10.3324/haematol.006072 Epub 2010 Feb 23.
- (157) Oommen S, Gupta SK, Vlahakis NE. **Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin $\alpha 9\beta 1$: identification of a specific $\alpha 9\beta 1$ binding site.** J Biol Chem 2011 Jan 14;286(2):1083-1092.
- (158) Gupta SK, Vlahakis NE. **Integrin $\alpha 9\beta 1$: Unique signaling pathways reveal diverse biological roles.** Cell Adh Migr 2010 Apr-Jun;4(2):194-198.
- (159) Hynes RO. **Integrins: a family of cell surface receptors.** Cell 1987 Feb 27;48(4):549-554.
- (160) Hynes RO. **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** Cell 2002 Sep 20;110(6):673-687.
- (161) van der Flier A, Sonnenberg A. **Function and interactions of integrins.** Cell Tissue Res 2001 Sep;305(3):285-298.
- (162) Green LJ, Mould AP, Humphries MJ. **The integrin beta subunit.** Int J Biochem Cell Biol 1998 Feb;30(2):179-184.
- (163) de Melker AA, Sonnenberg A. **Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events.** Bioessays 1999 Jun;21(6):499-509.
- (164) Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. **Ligand binding to integrins.** J Biol Chem 2000 Jul 21;275(29):21785-21788.
- (165) Arihiro K, Kaneko M, Fujii S, Inai K, Yokosaki Y. **Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma.** Breast Cancer 2000 Jan;7(1):19-26.
- (166) Lydolph MC, Morgan-Fisher M, Hoye AM, Couchman JR, Wewer UM, Yoneda A. **Alpha9beta1 integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage.** Exp Cell Res 2009 Nov 15;315(19):3312-3324.

- (167) Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytela R, et al. **Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin.** J Biol Chem 1996 Nov 8;271(45):28485-28491.
- (168) Palmer EL, Ruegg C, Ferrando R, Pytela R, Sheppard D. **Sequence and tissue distribution of the integrin alpha 9 subunit, a novel partner of beta 1 that is widely distributed in epithelia and muscle.** J Cell Biol 1993 Dec;123(5):1289-1297.
- (169) Diamond MS, Springer TA. **The dynamic regulation of integrin adhesiveness.** Curr Biol 1994 Jun 1;4(6):506-517.
- (170) Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. **The leukocyte integrins.** J Biol Chem 2000 Aug 4;275(31):23409-23412.
- (171) Malek-Hedayat S, Rome LH. **Cloning and sequence of the cDNA encoding the rat oligodendrocyte integrin beta 1 subunit.** Gene 1995 Jun 9;158(2):287-290.
- (172) Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M, Zhong C. **Focal adhesion assembly.** Trends Cell Biol 1997 Sep;7(9):342-347.
- (173) Shattil SJ, Ginsberg MH. **Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology.** J Clin Invest 1997 Jul 1;100(1):1-5.
- (174) Hynes RO. **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** Cell 1992 Apr 3;69(1):11-25.
- (175) Horwitz AF. **Integrins and health.** Sci Am 1997 May;276(5):68-75.
- (176) Akiyama SK. **Integrins in cell adhesion and signaling.** Hum Cell 1996 Sep;9(3):181-186.
- (177) Brown PO, Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. **Integration In.** Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- (178) Carman CV, Springer TA. **Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?** Curr Opin Cell Biol 2003 Oct;15(5):547-556.
- (179) Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burridge K, Juliano RL. **Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases.** J Biol Chem 1994 Oct 28;269(43):26602-26605.

- (180) Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Cheresch DA. **Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo.** *J Cell Biol* 1995 Jul;130(2):441-450.
- (181) Ruoslahti E, Reed JC. **Anchorage dependence, integrins, and apoptosis.** *Cell* 1994 May 20;77(4):477-478.
- (182) Sanders RJ, Mainiero F, Giancotti FG. **The role of integrins in tumorigenesis and metastasis.** *Cancer Invest* 1998;16(5):329-344.
- (183) Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. **Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement.** *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5606-5613.
- (184) Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. **Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin.** *J Biol Chem* 1995 Jul 14;270(28):16995-16999.
- (185) Mitra SK, Schlaepfer DD. **Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells.** *Curr Opin Cell Biol* 2006 Oct;18(5):516-523.
- (186) Schwartz MA, Shattil SJ. **Signaling networks linking integrins and rho family GTPases.** *Trends Biochem Sci* 2000 Aug;25(8):388-391.
- (187) Daro E, van der Sluijs P, Galli T, Mellman I. **Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Sep 3;93(18):9559-9564.
- (188) Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I. **The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions.** *J Cell Biol* 1999 Apr 5;145(1):123-139.
- (189) Gupta SK, Vlahakis NE. **Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase.** *J Cell Sci* 2009 Jun 15;122(Pt 12):2043-2054.
- (190) Lauffenburger DA, Horwitz AF. **Cell migration: a physically integrated molecular process.** *Cell* 1996 Feb 9;84(3):359-369.

- (191) Grinnell F. Focal adhesion sites and the removal of substratum-bound fibronectin. *J Cell Biol* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2697-2706.
- (192) Bretscher MS. **Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells.** *Cell* 1996 Nov 15;87(4):601-606.
- (193) Bretscher MS. **Moving membrane up to the front of migrating cells.** *Cell* 1996 May 17;85(4):465-467.
- (194) Hodkinson PS, Elliott PA, Lad Y, McHugh BJ, MacKinnon AC, Haslett C, et al. **Mammalian NOTCH-1 activates beta1 integrins via the small GTPase R-Ras.** *J Biol Chem* 2007 Sep 28;282(39):28991-29001.
- (195) Caiado F, Real C, Carvalho T, Dias S. **Notch pathway modulation on bone marrow-derived vascular precursor cells regulates their angiogenic and wound healing potential.** *PLoS One* 2008;3(11):e3752.
- (196) Julich D, Geisler R, Holley SA, Tubingen 2000 Screen Consortium. **Integrin alpha5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis.** *Dev Cell* 2005 Apr;8(4):575-586.
- (197) Leong KG, Hu X, Li L, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, et al. **Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation.** *Mol Cell Biol* 2002 Apr;22(8):2830-2841.
- (198) Karsan A. **Notch and integrin affinity: a sticky situation.** *Sci Signal* 2008 Jan 15;1(2):pe2.
- (199) White JM. **ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions.** *Curr Opin Cell Biol* 2003 Oct;15(5):598-606.
- (200) Lafuste P, Sonnet C, Chazaud B, Dreyfus PA, Gherardi RK, Wewer UM, et al. **ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation.** *Mol Biol Cell* 2005 Feb;16(2):861-870.
- (201) Eto K, Puzon-McLaughlin W, Sheppard D, Sehara-Fujisawa A, Zhang XP, Takada Y. **RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction.** *J Biol Chem* 2000 Nov 10;275(45):34922-34930.

- (202) Schaaf GJ, Ruijter JM, van Ruissen F, Zwijnenburg DA, Waaijer R, Valentijn LJ, et al. **Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries.** *FASEB J* 2005 Mar;19(3):404-406.
- (203) Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Bhatt K, Shah B, et al. **Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women.** *Exp Gerontol* 2004 Mar;39(3):369-377.
- (204) Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Thornton CA. **Gene expression profile of aging in human muscle.** *Physiol Genomics* 2003 Jul 7;14(2):149-159.
- (205) Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, Stegmaier S, Treuner J, Simon-Klingenstein K, et al. **Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1.** *Cancer Res* 2004 Aug 15;64(16):5539-5545.
- (206) Villaronga MA, Bevan CL, Beldandia B. **Notch signaling: a potential therapeutic target in prostate cancer.** *Curr Cancer Drug Targets* 2008 Nov;8(7):566-580.
- (207) Kitagawa M, Oyama T, Kawashima T, Yedvobnick B, Kumar A, Matsuno K, et al. **A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters.** *Mol Cell Biol* 2001 Jul;21(13):4337-4346.
- (208) Hyde LA, McHugh NA, Chen J, Zhang Q, Manfra D, Nomeir AA, et al. **Studies to investigate the in vivo therapeutic window of the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY411,575) in the CRND8 mouse.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Dec;319(3):1133-1143.
- (209) Pollack SJ, Lewis H. Secretase inhibitors for **Alzheimer's disease: challenges of a promiscuous protease.** *Curr Opin Investig Drugs* 2005 Jan;6(1):35-47.
- (210) Gan ZH, Chen Y. **Notch signaling pathway and multiple myeloma.** *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009 Oct;17(5):1380-1383.
- (211) Mirandola L, Comi P, Cobos E, Kast WM, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R. **Notching from T-cell to B-cell lymphoid malignancies.** *Cancer Lett* 2011 Sep 1;308(1):1-13.

- (212) Floyd DH, Kefas B, Seleverstov O, Mykhaylyk O, Dominguez C, Comeau L, et al. **Alpha-secretase inhibition reduces human glioblastoma stem cell growth in vitro and in vivo by inhibiting Notch.** *Neuro Oncol* 2012 Oct;14(10):1215-1226.
- (213) Beel AJ, Sanders CR. **Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases.** *Cell Mol Life Sci* 2008 May;65(9):1311-1334.
- (214) Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottlinger EP. **Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition.** *EMBO J* 2004 Mar 10;23(5):1155-1165.
- (215) Borggreffe T, Oswald F. **The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes.** *Cell Mol Life Sci* 2009 May;66(10):1631-1646.
- (216) Martinez Arias A, Zecchini V, Brennan K. **CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development?** *Curr Opin Genet Dev* 2002 Oct;12(5):524-533.
- (217) Ronchini C, Capobianco AJ. **Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic).** *Mol Cell Biol* 2001 Sep;21(17):5925-5934.
- (218) Vial E, Sahai E, Marshall CJ. **ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility.** *Cancer Cell* 2003 Jul;4(1):67-79.
- (219) Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. **Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion.** *Dev Cell* 2002 Aug;3(2):259-270.
- (220) Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Hawkrigde AE, Issaka RB, Boudreau N, et al. **Integrin alpha9beta1 directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis.** *J Biol Chem* 2007 May 18;282(20):15187-15196.
- (221) Wexler LH, Ladanyi M. **Diagnosing alveolar rhabdomyosarcoma: morphology must be coupled with fusion confirmation.** *J Clin Oncol* 2010 May 1;28(13):2126-2128.
- (222) Arndt CA, Rose PS, Folpe AL, Laack NN. **Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence.** *Mayo Clin Proc* 2012 May;87(5):475-487.

- (223) Kikuchi K, Keller C. **The not-so-skinny on muscle cancer.** *Cancer Cell* 2012 Oct 16;22(4):421-422.
- (224) Hatley ME, Tang W, Garcia MR, Finkelstein D, Millay DP, Liu N, et al. **A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage.** *Cancer Cell* 2012 Oct 16;22(4):536-546.
- (225) Anderson MJ, Shelton GD, Cavenee WK, Arden KC. **Embryonic expression of the tumor-associated PAX3-FKHR fusion protein interferes with the developmental functions of Pax3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Feb 13;98(4):1589-1594.
- (226) Lagutina I, Conway SJ, Sublett J, Grosveld GC. **Pax3-FKHR knock-in mice show developmental aberrations but do not develop tumors.** *Mol Cell Biol* 2002 Oct;22(20):7204-7216.
- (227) Relaix F, Polimeni M, Rocancourt D, Ponzetto C, Schafer BW, Buckingham M. **The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo.** *Genes Dev* 2003 Dec 1;17(23):2950-2965.
- (228) Hosoyama T, Aslam MI, Abraham J, Prajapati SI, Nishijo K, Michalek JE, et al. **IL-4R drives dedifferentiation, mitogenesis, and metastasis in rhabdomyosarcoma.** *Clin Cancer Res* 2011 May 1;17(9):2757-2766.
- (229) Marshall AD, Grosveld GC. **Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis.** *Skelet Muscle* 2012 Dec 3;2(1):25-5040-2-25.
- (230) Seitz G, Armeanu-Ebinger S, Warmann S, Fuchs J. **Animal models of extracranial pediatric solid tumors.** *Oncol Lett* 2012 Nov;4(5):859-864.
- (231) Wysoczynski M, Miekus K, Jankowski K, Wanzeck J, Bertolone S, Janowska-Wieczorek A, et al. **Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas.** *Cancer Res* 2007 Mar 1;67(5):2131-2140.
- (232) Seitz G, Warmann SW, Fuchs J, Mau-Holzmann UA, Ruck P, Heitmann H, et al. **Visualization of xenotransplanted human rhabdomyosarcoma after transfection with red fluorescent protein.** *J Pediatr Surg* 2006 Aug;41(8):1369-1376.

- (233) Yamamoto S, Ooshima Y, Nakata M, Yano T, Matsuoka K, Watanabe S, et al. **Generation of gene-targeted mice using embryonic stem cells derived from a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** *Transgenic Res* 2012 Sep 9.
- (234) Belyea BC, Naini S, Bentley RC, Linardic CM. **Inhibition of the Notch-Hey1 axis blocks embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis.** *Clin Cancer Res* 2011 Dec 1;17(23):7324-7336.
- (235) Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. **Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents.** *Oncogene* 2003 Sep 29;22(42):6598-6608.
- (236) Marcinkiewicz C, Taooka Y, Yokosaki Y, Calvete JJ, Marcinkiewicz MM, Lobb RR, et al. **Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin alpha 9beta 1 with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin.** *J Biol Chem* 2000 Oct 13;275(41):31930-31937.
- (237) Walsh EM, Kim R, Del Valle L, Weaver M, Sheffield J, Lazarovici P, et al. **Importance of interaction between nerve growth factor and alpha9beta1 integrin in glial tumor angiogenesis.** *Neuro Oncol* 2012 Jul;14(7):890-901.
- (238) Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Terruggi CH, Selistre-de-Araujo HS, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. **Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling.** *Eur J Biochem* 2003 Dec;270(24):4799-4808.
- (239) Chomczynski P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-159.
- (240) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995 Oct 20;270(5235):467-470.
- (241) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951 Nov;193(1):265-275.
- (242) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4350-4354.

- (243) Benson LJ, Gu Y, Yakovleva T, Tong K, Barrows C, Strack CL, et al. **Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange.** J Biol Chem 2006 Apr 7;281(14):9287-9296.
- (244) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. **Serial analysis of gene expression.** Science 1995 Oct 20;270(5235):484-487.
- (245) Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. **Controlling the false discovery rate in behavior genetics research.** Behav Brain Res 2001 Nov 1;125(1-2):279-284.
- (246) Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J. **Independence and reproducibility across microarray platforms.** Nat Methods 2005 May;2(5):337-344.
- (247) Wettenhall JM, Smyth GK. **limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data.** Bioinformatics 2004 Dec 12;20(18):3705-3706.
- (248) Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** Genome Biol 2004;5(10):R80.
- (249) Massi D, Landriscina M, Piscazzi A, Cosci E, Kirov A, Paglierani M, et al. **S100A13 is a new angiogenic marker in human melanoma.** Mod Pathol 2010 Jun;23(6):804-813.

ANEXOS

A.1 Relación entre la activación de la vía Notch y las características clínicas y evolutivas de los pacientes de RMS

A.1.1 Caracterización de la expresión de los componentes de la vía Notch, N-Caderina e Integrina- α 9 mediante RT-PCR

Patient #	Histology	Metastasis	Outcome	Age	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4	Hes1	Hey1	CDH2	ITGA9
1	E	YES	D	F	2,32	1,39	2,34	0,35	7,21	4,61	-3,26	-
2	E	NO	A	F	1,18	5,03	1,02	1,73	4,56	4,90	-1,30	-
3	E	NO	A	F	5,66	2,04	0,18	0,06	4,55	1,08	-	-
4	E	NO	A	F	1,02	1,43	2,45	0,38	3,85	2,69	-	-
5	E	NO	D	F	2,2	1,32	4,8	-0,84	3,15	0,55	0,54	-
6	E	YES	D	U	2,93	2,29	2,5	0,58	2,48	1,82	-1,13	-
7	E	NO	A	F	-0,45	0,76	6,37	2,62	1,85	1,26	1,87	2,08
8	E	NO	A	U	0,08	2,76	3,97	-2,11	1,08	-4,64	0,15	-1,62
9	E	NO	A	F	1,54	1,28	0,62	0,79	0,84	0,82	-	1,84
10	E	NO	A	F	0,9	1,3	3,92	-1,91	0,40	-1,87	0,28	-1,15
11	E	NO	A	F	0,77	2,99	0,26	0,32	0,28	0,02	-	-
12	E	NO	A	F	3,01	0,56	2,61	-2,1	0,24	-1,94	-	-
13	E	NO	A	F	1,86	2,17	3,44	-2,47	-0,18	0,11	-4,98	3,12
14	E	NO	A	F	2,03	1,56	3,12	0,12	-0,24	1,65	-2,94	-
15	E	NO	D	F	-1,28	2,72	4,23	1,19	-0,32	1,26	-1,17	-
16	E	NO	A	F	0,4	0,78	1,91	-2,1	-0,44	-1,53	-	-
17	E	YES	D	F	0,48	0,43	3,62	-0,83	-0,90	-0,27	-0,53	0,53
18	E	YES	D	U	-2,72	1,31	5,09	-1,42	-1,08	1,37	-2,17	-
19	E	NO	A	F	1,48	1,64	1,24	-1,95	-1,57	-3,92	-4,40	-0,85
20	E	NO	A	F	6,23	0,3	-3,05	-1,06	-1,95	-0,42	0,94	2,07
21	E	NO	A	F	-9,02	2,33	3,31	2,68	-1,98	0,77	-3,36	-4,68
22	E	-	-	-	1,99	-1,26	-0,11	-15,16	-2,21	0,07	0,34	-0,25
23	E	NO	A	F	4,06	0,6	3,02	-0,45	-2,38	-2,40	-2,37	1,31
24	E	YES	D	U	-10,23	2,41	3,4	-1,36	-2,83	0,00	-2,87	0,95
25	E	NO	-	-	2,48	1,63	0,8	-1,13	-2,92	-2,86	-0,51	1,23
26	E	YES	D	U	-9,05	1,2	1,59	1,61	-6,00	-0,87	-2,89	1,80
27	A	NO	A	F	2,84	3,83	1,99	-1,34	0,38	1,68	-	-
28	A	NO	D	U	4,04	-1,35	2,86	-1	0,32	-0,54	-2,02	-
29	A	NO	D	U	2,19	2,52	3,85	1,87	-0,04	-0,50	0,02	-
30	A	NO	A	U	2,72	3,78	5,66	0,07	-0,98	-0,19	-4,98	1,33
31	A	NO	A	U	3,08	1,87	3,14	-2,34	-1,73	-0,05	-3,04	0,26
32	A	YES	D	U	1,23	1,67	3,75	-0,8	-1,74	0,09	-2,08	-0,59
33	A	YES	A	U	3,42	0,72	1,93	-1,82	-2,30	-2,35	-0,04	-0,11
34	A	NO	D	F	3,8	1,69	1,99	-0,48	-2,60	-2,39	1,17	-1,73
35	A	NO	A	F	2,01	1,62	2,81	-1,64	-3,09	-3,84	-0,36	-
36	A	NO	A	F	3,57	-0,42	1,62	-1,77	-3,51	-4,97	-0,70	1,17
37	A	NO	A	F	-14,13	0,2	0,15	-1,69	-4,26	0,12	-4,98	0,43
38	A	NO	D	U	-4,73	1,07	5,72	4,12	-4,37	0,44	0,18	1,43

Tabla A.1 Relación entre la expresión de los componentes de la vía Notch, N-Caderina e Integrina- α 9 y las características clínicas y evolutivas de 38 pacientes de RMS. Histología: A=aRMS, E=eRMS; Age: F=favorable: 1-10 y; U=unfavorable: <1y or >10y; Outcome: A=alive, D=deceased; Notch1-4, Hes1, Hey1, CDH2, ITGA9: valores $-\Delta$ CT.

A.1.2 Caracterización de la expresión de los componentes de la vía Notch mediante IHC

Relación del marcaje con la supervivencia y los factores pronósticos

Para relacionar el marcaje con las características clínicas del paciente se categorizó la inmunotinción como negativa (N) o positiva (P) en función del valor final, de 0 a 3 (tinción negativa/leve) o 3 a 7 (tinción moderada/fuerte) respectivamente (véase **M.M.2.4 Inmunohistoquímica, Tabla M.M.13) (Tabla A.2).**

Patient #	Metástasis	Histología	SLE	Loc	Edad	HES1	HEY1
1	DF	F	S	DF	F	P	P
2	F	DF	E	DF	F	P	N
3	DF	F	E	F	DF	P	P
4	0	F	0	F	DF	P	P
5	F	F	S	DF	F	P	N
6	F	F	S	DF	DF	P	N
7	F	F	S	F	F	P	N
8	F	F	S	DF	DF	P	P
9	F	DF	E	DF	DF	P	P
10	F	DF	S	DF	F	N	N
11	F	DF	S	DF	DF	P	N
12	F	F	S	DF	F	P	N
14	F	F	S	F	DF	P	P
15	F	F	S	F	DF	P	P
16	F	F	S	F	DF	P	P
17	F	F	S	F	DF	P	P
18	F	F	S	F	DF	P	N
19	F	F	S	DF	DF	P	P

Tabla A.2 Relación entre la activación de la vía Notch y los factores pronósticos del RMS en 19 pacientes de RMS. Factores pronósticos analizados: metástasis a distancia, tipo histológico, localización del tumor (Loc) y edad al diagnóstico (ed). DF: Desfavorable, F: favorable. 0: desconocido. SLE: supervivencia libre de enfermedad, S: superviviente, E: éxitus. Marcadores analizados: HES1, HEY1. P: marcaje positivo; N: marcaje negativo.

Según los criterios definidos en la siguiente tabla, se categorizó los factores pronósticos de los pacientes como favorables (F) o desfavorables (DF):

F. PRONÓSTICOS	FAVORABLES (F)	DESFAVORABLES (DF)
Edad al diagnóstico	< 10 años	> 10 años
Localización del tumor	órbita , genitourinario no vejiga ni próstata, cabeza y cuello no parameningeos	Resto de localizaciones
Tipo histológico	RMSe	RMSa
Metástasis a distancia	No	Si

Tabla A.3 Categorización de los factores pronósticos según criterios favorables (F) o desfavorables (DF).

Se incluyó la supervivencia (S) hasta la actualidad y el éxito (E) en el análisis de la evolución del paciente respecto a la activación de la vía Notch.

A.2 Publicaciones

A.2.1 Publicaciones del autor relacionadas con el trabajo de la tesis:

Roma J*, Masia A*, Reventos J, Sanchez de Toledo J, Gallego S. **Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro.** Clin Cancer Res 2011 Feb 1;17(3):505-513. *J. Roma and A. Masia contributed equally to this work

Masia A, Almazan-Moga A, Velasco P, Reventos J, Toran N, Sanchez de Toledo J, Roma J, Gallego S. **Notch-mediated induction of N-cadherin and α 9-integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells.** Br J Cancer 2012 Oct 9;107(8):1374-83.

Notch Pathway Inhibition Significantly Reduces Rhabdomyosarcoma Invasiveness and Mobility *In Vitro*

Josep Roma¹, Anna Masià^{1*}, Jaume Reventós¹, Josep Sánchez de Toledo², and Soledad Gallego^{1,2}

Abstract

Purpose: Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common type of soft tissue sarcoma in children and can be divided into two main subtypes: embryonal and alveolar RMS. Patients with metastatic disease continue to have very poor prognosis although aggressive therapies and recurrences are common in advanced localized disease. The oncogenic potential of the Notch pathway has been established in some cancers of the adult and in some pediatric malignancies.

Experimental Design: A real-time PCR assay was used to ascertain the expression of several Notch pathway components in a wide panel of RMS and cell lines. Four γ -secretase inhibitors (GSIs) were tested for pathway inhibition and the degree of inhibition was assessed by analysis of Hes1 and Hey1 expression. The putative effects of Notch pathway inhibition were evaluated by wound-healing, matrigel/transwell invasion, cell-cycle, and apoptosis assays.

Results: The Notch pathway was widely expressed and activated in RMS and underwent substantial inhibition when treated with GSIs or transfected with a dominant negative form of MAML1. RMS cells showed a significant decrease in its mobility and invasiveness when the Notch pathway was properly inhibited; conversely, its inhibition had no noticeable effect on cell cycle or apoptosis.

Conclusion: Pharmacological or genetic blockage of the pathway significantly reduced invasiveness of RMS cell lines, thereby suggesting a possible role of the Notch pathway in the regulation of the metastatic process in RMS. *Clin Cancer Res*; 17(3); 505–13. ©2010 AACR.

Introduction

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common type of soft tissue sarcoma in children. Regarding histopathological criteria, RMS can be divided into 2 main subtypes: embryonal and alveolar RMS (eRMS and aRMS, respectively). The majority of aRMS (80% to 85%) contain one of the reciprocal chromosomal translocations: either t(2;13)(q35;q14), or t(1;13)(p36;q14). These translocations generate the novel fusion genes *PAX3-FOXO1* and *PAX7-FOXO1*, respectively (1, 2). However, no characteristic translocations have been described in eRMS. The eRMS is typically characterized by loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 11 (11p15.5, Ref. 3) and gains in chromosomes 2, 7, 8, 11, 12, 13, and 17 are also common in this subtype (4).

The Notch signaling pathway is an evolutionary conserved pathway that plays a critical role in tissue development in

organisms ranging from nematodes to mammals. The highly conserved Notch gene family encodes 4 cell surface receptors (Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4). When the Notch receptor is activated by its ligands (Delta and Jagged in vertebrates), the Notch intracellular domain (NICD) is released by the γ -secretase complex (5) and translocates to the nucleus where it binds to CSL (CBF1-Su(H)-Lag1) transcription repressors, converting them into transcriptional activators. The targets of these transcription factors in vertebrates are typified by *Hes* and *Hey* genes (6, 7).

The oncogenic potential of the Notch pathway was first described in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) in the late 1980s (8). An abnormal upregulation of the Notch pathway has also been reported in ovarian (9), breast (10), and other cancers (11). With respect to pediatric malignancies, Notch signaling appears to contribute essentially to osteosarcoma metastasis (12) and proliferation (13); Notch signaling also promotes medulloblastoma cancer stem cell survival (14) and contributes to angiogenesis in neuroblastoma (15).

In the last decade, the use of pharmacological inhibitors of the γ -secretase complex, which inhibit activation of the 4 Notch receptors, has been reported. Gamma-secretase inhibitors (GSIs) block the generation of the active form of Notch: the NICD (16). In recent decades, several GSIs have been actively studied as potential inhibitors of the generation of the β -amyloid peptide associated with Alzheimer's disease (17). More recently, some

Authors' Affiliations: ¹Biomedical Research Unit and ²Pediatric Oncology and Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

J. Roma and A. Masià contributed equally to this work.

Corresponding Author: Soledad Gallego, Pediatric Oncology Unit, Hospital Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119, 08035 Barcelona, Spain; Phone: +34934893090; Fax +34934893089. E-mail: sgallego@vhebron.net

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0166

©2010 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Rhabdomyosarcoma (RMS) patients with metastatic disease continue to have very poor prognosis, despite the indication of aggressive therapies. Moreover, the major cause of death in these patients is the formation of distant metastases. This work states that the Notch pathway is broadly expressed in RMS tumors, and its inhibition *in vitro* using γ -secretase inhibitors clearly impairs the mobility and invasiveness of RMS cells. This work proposes the Notch pathway as a candidate for the development of targeted therapies focused on reducing metastases in this neoplasia.

GSI have begun to be studied in phase I trials for patients with advanced breast cancer and acute T-cell leukemias (18, 19).

The possible role of the Notch pathway in RMS remains unknown. Since the regulation of Notch signaling is involved in satellite cell activation and in cell fate determination during postnatal myogenesis (20) and since RMS are embryonal tumors whose cells exhibit gene expression profiles resembling those of fetal muscle cells (21), we hypothesized that the Notch pathway could play a major role in maintaining the immature muscle status characteristic of RMS. In the present work, Notch pathway expression and activation profiles were characterized for the first time in a wide panel of RMS tumors and cell lines. The reduction by several γ -secretase inhibitors in the oncogenic potential of RMS was evaluated by wound-healing, matrix/gel/transwell invasion, cell cycle, and apoptosis assays.

Methods

Tumor samples

Samples were collected from a nonselected cohort of 37 children with RMS. Twenty-seven samples were from patients referred for diagnosis and/or treatment at the Vall d'Hebron Hospital Oncology Unit and 10 were a kind donation from Dr Albert Chetcuti (Tumour Bank, Oncology Research Unit, Children's Hospital at Westmead, Australia). Informed consent has been previously obtained from all parents or legal guardians.

Cell cultures and drug treatments

Cells were cultured in MEM media with Earle's Salts (PAA Laboratories), supplemented with 10% FCS (PAA), 2 mM L-glutamine (PAA), 1 mM sodium pyruvate (PAA), 1 \times NEAA (PAA), 100 U/mL penicillin (PAA) and 0.1 mg/mL streptomycin (PAA), and maintained at 37°C in a 5% CO₂ water-jacketed incubator. All GSI inhibitors were diluted in DMSO and added to the culture media at the desired concentration. Doses were as follows: 25 μ M for DAPT, 200 nM for GSI-X, 8 nM for GSI-XX, and 2 nM for GSI-XXI. The untreated plates were supplemented with an equivalent volume of DMSO. The inhibitors GSI-X, GSI-XX, and GSI-XXI were purchased from Calbiochem and

DAPT from Sigma-Aldrich. Cell lines RH-30, CW-9019, and HTB-82 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC).

RNA isolation, retrotranscription and Real-time PCR

Total RNA was isolated using a Quick-prep micro RNA isolation kit (Qiagen, Valencia); RNA integrity was quantified and verified by an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). Samples of 2 μ g of total RNA were reverse-transcribed using random primers (Invitrogen). The reaction mixture was incubated for 60 minutes at 37°C with 200U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega). Real-time PCR was based on the TaqMan assay (Applied Biosystems). A 40-cycle PCR was performed to detect the 4 Notch receptors (assays Hs01062014_m1, Hs01050708_m1, Hs00166432_m1, and Hs00270200_m1 for Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4, respectively) and the effectors Hes1 and Hey1 (assays Hs00172878_m1 and Hs00232618_m1, respectively). The housekeeping gene TBP (assay Hs00172424_m1) was used as internal control. Quantification of relative levels of each mRNA analyzed was performed by the method of Livak and Schmittgen (22). All samples were tested in triplicate.

Western blot analysis and immunohistochemistry

Western blot: Cells were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL leupeptin, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) and incubated for 4 minutes at 90°C and the total protein content was measured (DC assay kit, Bio-Rad Laboratories). Following the addition of 5% β -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue, and 20% glycerol, 12.5 μ g of protein per lane were loaded in 12% SDS-PAGE and then blotted onto PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were then incubated with rabbit polyclonal antibody anti-Hes1 AB5702 (Millipore) diluted 1:1000, and anti- α -tubulin (Cell Signaling) diluted 1:2000 was used as a loading control.

Immunohistochemistry (IHC): Patient samples were obtained from the Vall d'Hebron Hospital Pathology Department (kindly provided by Dr. Nuria Toran). Paraffin-embedded tissues were sliced, deparaffinized, and rehydrated, followed by antigen retrieval in 10 mM citrate buffer (DAKO). Endogenous peroxidase activity was quenched using 1% hydrogen peroxide. Samples were blocked and incubated overnight with anti-Hes1 antibody (AB5702, Millipore) diluted 1:200. After incubation with peroxidase conjugated secondary antibody and peroxidase substrate, samples were counterstained with hematoxylin for 10 seconds, dehydrated, and mounted.

Wound-healing and transwell assays

For wound-healing assay, cells were grown until confluence in the presence of the appropriate GSI (48 hours). Cell monolayers were then scratched with a pipette tip and placed in complete growth medium with the appropriate

GSI. Over 37.5 hours, serial images of selected fields were acquired every 15 minutes by a live cell imaging cell-R workstation (Olympus) coupled to a bright-field microscope. The scratched area was measured using the ImageJ software (NIH, freely available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and the healing velocity was calculated as a quotient between the scratched area and time required for the wound to heal.

For the matrigel/transwell assay, cells were pretreated with GSI for 48 hours and harvested using trypsin. Once pretreated, 10^5 cells were resuspended in serum-free MEM media with the appropriate GSI and plated in the upper chamber previously coated with BD Matrigel™ (BD-Biosciences) in an 8 μ m pore size transwell (Corning). Following incubation at 37°C, remaining cells were removed from the upper chamber with a cotton swab, and cells migrated to the lower surface of the membrane were stained in 5 ng/mL of Hoechst33342. Cells were then stained with 0.2% crystal violet, lysed in 10% acetic acid, and the absorbance at 590 nm was determined as a value proportional to the number of cells on each membrane lower surface. All analyses were made in triplicate.

Cell cycle and apoptosis

One million cells were grown for 3 days in MEM media supplemented with the appropriate GSI or DMSO (control) and harvested with trypsin. For cell cycle, cells were fixed in 70% ethanol, treated with 100 μ g/mL RNase A, and stained for 1 hour at room temperature with 1 μ g/mL propidium iodide. Apoptosis was detected using the annexin-V apoptosis kit (BD Biosciences) following manufacturer's instructions. Cells were analyzed in a FacsCalibur cytometer (BD Biosciences).

Transfection with dnMAML1

Cells were transfected using FuGENE 6 transfection reagent (ROCHE) with dominant negative dnMAML1-GFP or GFP alone both cloned in the plasmidic vector pEGFP (Clontech Laboratories). Stably transfected cells were selected for vector incorporation over 3 weeks in MEM culture media containing 2.0 mg/mL G418 (Sigma-Aldrich).

Results

Notch pathway is consistently expressed and activated in RMS tumors

Expression of the 4 Notch receptors and 2 downstream effectors of the Notch pathway were studied by quantitative PCR in 37 RMS primary tumor samples. The results showed a wide distribution of the Notch receptors and downstream effectors in the RMS samples studied (Fig. 1). Levels of the RNAs studied in tumoral tissue (aRMS and eRMS) were compared with those of adult and fetal muscle (AM and FM, 2 pools of 3 samples were analyzed for both AM and FM). The most striking finding in tumors was the increase in the expression of Notch2, a receptor that showed very obvious upregulation in both aRMS and eRMS. Notch3

showed slight upregulation in both aRMS and eRMS not as clear as Notch2. Conversely, Notch1 and Notch4 showed no significant expression increase in RMS (Fig. 1A). Hes1 expression was slightly upregulated in eRMS compared with both adult and fetal muscle, while Hey1 showed an increase in aRMS and eRMS compared with adult muscle levels (Fig. 1A). IHC showed cytoplasmic and nuclear staining of Hes1 in a majority of RMS samples (Fig. 1B) compared with prostate carcinoma as positive control (23).

Notch pathway activation correlates with invasive phenotype in RMS cells

Although the RMS cell lines analyzed significantly expressed Notch1, Notch2, and Notch3, no significant association was observed between their expression and the oncogenicity of the 3 cell lines analyzed (data not shown). Conversely, when expression of the Notch downstream effectors Hes1 and Hey1 was studied in the 3 RMS cell lines, they showed low values in HTB-82 (derived from eRMS), moderate values in CW-9019 (aRMS with PAX7-FOXO1 translocation), and high values in RH-30 (aRMS bearing the PAX3-FOXO1 translocation). Thus, expressing results as a fold increase relative to the values found in HTB-82 (Fig. 2A), Hes1 showed 24.2-fold higher expression in CW-9019, and 37.5-fold higher in RH-30. The same increasing pattern was observed for Hey1 (12.3-fold higher in CW-9019 and 34.8-fold higher in RH-30). When the invasive capabilities of the 3 cell lines were tested by matrigel/transwell invasion assay (Fig. 2B), the results verified the correlation between the expression of the aforementioned Notch targets and the invasiveness of each cell line. Thus, invasiveness of the HTB-82 line was very low, with no significant invasion being found even at 48 hours. In contrast, the cell line CW-9019 showed noticeably invasive potential. At 8 hours, there was no significant invasion, but the number of cells migrated to the lower chamber rose considerably at 24 and 48 hours. Finally, the putatively most invasive cell line showed very high invasiveness detected as soon as at 8 hours. At longer times (24 and 48 hours), the invasion was so great that the lower chamber was saturated with cells and no significant differences were observed between 24 and 48 hours. When the wound-healing capability of the 3 cell lines was tested, the results revealed that while the RH-30 cell line completed the healing in approximately 18 hours, the CW-9019 cell line needed approximately 3 days to close the wound completely and the time required was even longer than a week for HTB-82. A significant image of each cell line was taken at 48 hours postwounding (Fig. 2C). At that time, cell line HTB-82 was very far from closing the wound, CW-9019 near to complete closure, and RH-30 was completely closed.

Notch pathway can be pharmacologically inhibited using γ -secretase inhibitors (GSIs) in RMS cells

The effects of the inhibitors on the Notch pathway were evaluated by quantification of Hes1 and Hey1 mRNA expression. Hes1 mRNA expression showed a significant

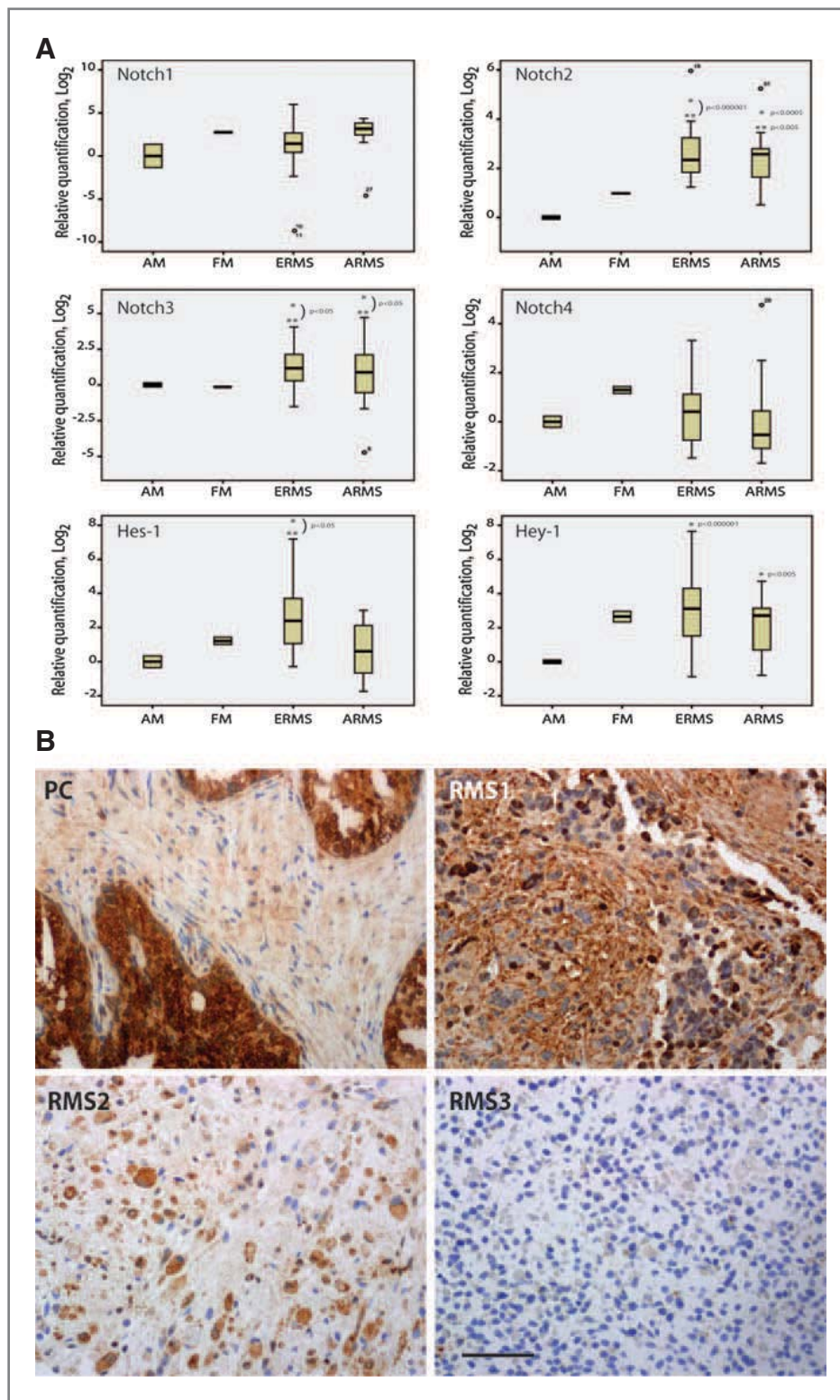
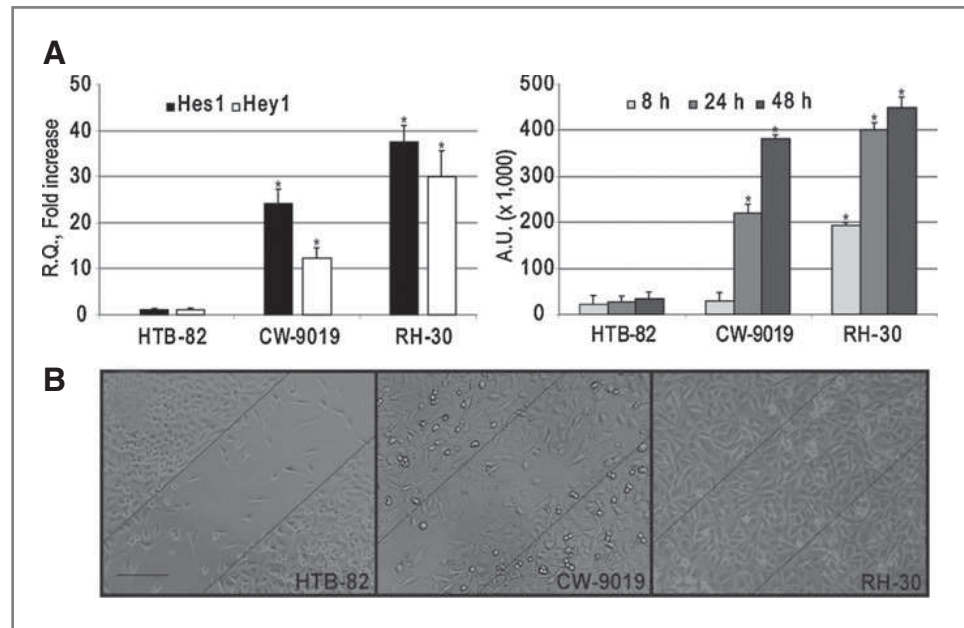


Figure 1. Notch pathway is widely expressed in RMS. A, box-plot depicting the expression of the 4 Notch receptors and expression of Hes1 and Hey1 assessed by real-time PCR in RMS tumors. Results are normalized using AM values as a baseline (value log₂ = 0). AM, adult muscle, FM, fetal muscle, ERMS, embryonal RMS, ARMS, alveolar RMS. Asterisks, mean values significantly higher than levels obtained in AM (*) or FM (**). B, Hes1 IHC in 3 samples of RMS (RMS 1, 2, and 3). Prostate carcinoma (PC) was used as positive control. Horizontal bar, 100 μm.

decrease in the 3 cell lines treated with DAPT (25 μM) GSI-XX (8 nM) and GSI XXI (2 nM). The GSI-X (200 nM) produced minor or null inhibition in the 3 cell lines analyzed (Fig. 3A). Hey1 expression showed a similar inhibition pattern, with a significant decrease in the 3 cell

lines treated with GSI-XX and GSI-XXI, while DAPT rendered only a significant reduction in Hey1 expression in the cell lines RH-30 and CW-9019. The GSI-X rendered a minor or null reduction, only significant in the cell line RH-30 (Fig. 3B).

Figure 2. Notch activation correlates with RMS cell-line invasiveness. A, relative quantification (RQ) of Hes1 and Hey1 in the 3 RMS cell lines HTB-82, CW-9019, and RH-30. B, evaluation of HTB-82, CW-9019, and RH-30 invasiveness in a matrigel/transwell assay at 8, 24, and 48 hours. *, in A and B, the value is significantly higher than the level obtained in the HTB-82 cell line with $P < 0.001$. C, representative pictures of the wound-healing assay taken 48 hours after wounding of the 3 RMS cell lines indicated. The 2 parallel lines on the images delimit the wounded zone. Horizontal bar, 100 μ m.



Although total inhibition was not achieved, Hes1 protein also decreased significantly when cells were treated with GSIs, especially with GSI-XXI (Fig. 3C). No significant effect was observed when cells were treated with GSI-X or DAPT (not shown).

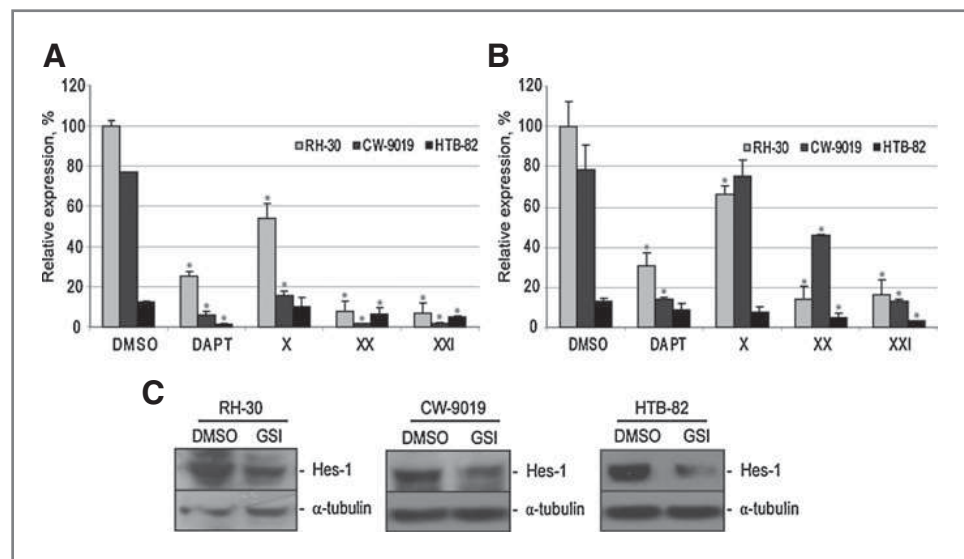
Notch pathway inhibition severely impairs cell mobility and invasiveness in RMS cells

When the 3 RMS cell lines were treated with GSIs, a significant reduction was observed in their mobility that could be measured in a wound-healing assay (Fig. 4). The delay observed is illustrated in Figure 4A for the cell line RH-30. Two images per treatment taken immediately post-wounding and 18 hours later are shown. It can be clearly seen that while cells treated with DMSO (control) closed

the wound in approximately 18h, cells treated with all GSIs, particularly with DAPT, GSI-XX, and GSI-XXI, did not. GSI-X, though presenting delay versus the control, showed a lesser effect on wound-healing time than the other 3 inhibitors tested. This lessening of wound-healing capability of cells treated with GSIs is demonstrated as a reduction in healing velocity to approximately half that of the control in the 3 cell lines treated with GSI-XX and GSI-XXI. DAPT produced significant inhibition; however, while the reduction in the RH-30 cell line was approximately half that of the control, the reduction in the other 2 cell lines was only moderate. Finally, with GSI-X treatment, the reduction was very slight or null for all 3 cell lines (Fig. 4B).

Furthermore, the 3 cell lines suffered severe impairment in the matrigel/transwell invasion assay when treated with

Figure 3. Notch activation could be significantly inhibited using GSIs in RMS cell lines. Effects of GSIs on mRNA expression of Hes1 (A) and Hey 1 (B) in RMS cell lines expressed as levels relative to untreated RH-30 (DMSO). Significance of differences compared to control: *, $P < 0.05$. All RNA measurements were taken in triplicate. C, effects of GSIs on Hes1 protein amount in the RMS cell lines RH-30 (20 μ g of protein/well), CW9019 (40 μ g of protein/well) and HTB-82 (80 μ g of protein/well). Alpha-tubulin was used as a protein loading control. GSI, γ -secretase inhibitor XXI.



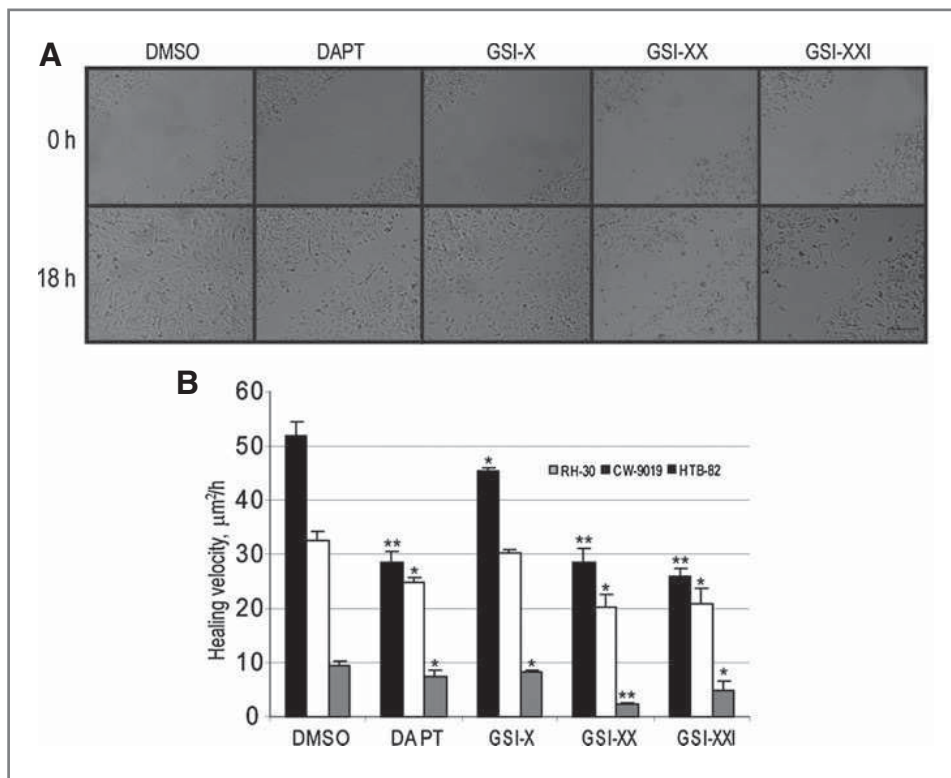


Figure 4. Inhibition of Notch activation severely impairs wound-healing. A, representative images of the wound-healing assay in presence of the indicated GSIs just after wounding (0 hour) and 18 hours later (18 hours) in the RH-30 cell line. Horizontal bar, 100 μm . B, effect of the GSIs on healing velocity in 3 RMS cell lines RH-30, CW-9019, and HTB-82. Each bar represents the mean of healing velocity in 8 independent samples in μm^2 per hour. Significance of differences with control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

some GSIs (Fig. 5), suggesting that the Notch pathway could also play a role in their invasiveness. In that assay, the observed effects of the 4 Notch inhibitors tested were also unequal. Thus, cells treated with GSI-X showed only a minor reduction in their invasiveness (slightly lower than 80% compared to the DMSO control). On the other hand, cells treated with GSI-XX and GSI-XXI showed a remarkable reduction in invasiveness in the 3 cell lines (all values under 30% compared to the control, respectively). Finally, DAPT produced cell-line dependent effects, with moderate effect on RH-30 invasiveness, but a remarkable effect on CW-9019 and HTB-82 (Fig. 5B).

Downregulation of Notch pathway has no noticeable effect on cell cycle and apoptosis

Notch pathway inhibition had no significant effect on cell cycling and apoptosis, and all the drugs applied (in a 3-day treatment) produced the same results in treated and nontreated RMS cells (data not shown), confirming that the inhibition observed in cell motility and invasion cannot be attributable to changes in cell proliferation or in apoptosis.

Specificity (dnMAML1)

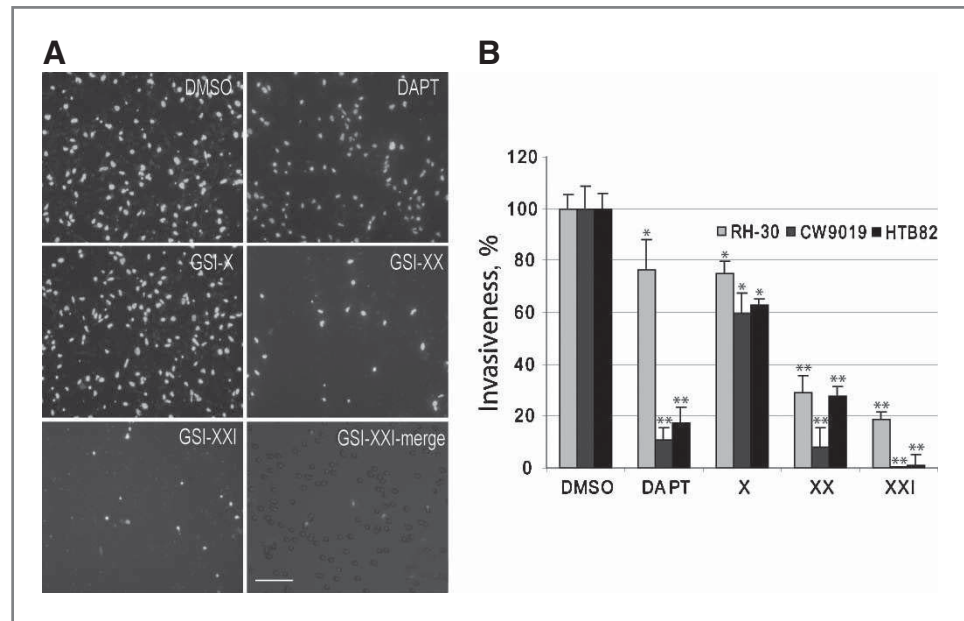
Seeking to rule out the possibility of the effects observed in cells treated with GSIs being attributable to the involvement of other pathways and therefore demonstrate that these effects resulted from specific Notch inhibition, we genetically manipulated Notch signaling activity by transfecting a construct containing dominant negative MAML1

(dnMAML1) or empty vector (pEGFP). MAML1 is a co-activator that cooperates with NICD and CSL transcription factors (CBF1, Su(H) and Lag-1) to activate transcription of Notch target genes (24,25). It has been demonstrated that truncated versions of MAML-1 can maintain an association with the complex that behaves in a dominant negative fashion and depresses transcription of Notch target genes (26). In the RH-30 cell line stably transfected with dnMAML1, Hes1 mRNA expression fell to under 30% of the levels found in controls (Fig. 6A). Likewise, the levels of Hes1 protein underwent a decrease in cells transfected with dnMAML1 (Fig. 6B). This attenuation of Hes1 expression produced effects on cell mobility and invasiveness. Thus, RH-30 cells (not transfected) or transfected with GFP alone (control) closed the wound significantly faster than cells transfected with dnMAML1. This lessening of wound-healing capability in cells transfected with dnMAML1 is demonstrated as a reduction in healing velocity (Fig. 6C). Finally, and paralleling the results previously shown with GSI treatments, the RH-30 cell line expressing the dnMAML1 underwent substantial inhibition of its invasiveness on a matrigel/transwell assay (Fig. 6D) which was seen to fall to a level under 20% of that of control cells.

Discussion

Notch signaling is known to play a fundamental role in the normal development of multicellular organisms, particularly in processes that imply cell-fate determination. More recently, some advances have been made in elucidating the

Figure 5. Inhibition of Notch activation severely impairs invasiveness in RMS cell lines. **A**, photocomposition showing 1 representative field per treatment on the lower surface of the transwell membrane in RH-30 cells. Cells were stained with Hoechst33342. The inhibitor is indicated in the upper right corner of each picture. Merged image: Hoechst33342 and visible light. **B**, bars represent the percentage of invasion for the 3 cell lines analyzed compared to the control (DMSO) when the GSI indicated below each bar were added to the media. Each bar represents the mean of 3 independent wells. Horizontal bar, 100 μ m. Significance of differences with control: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

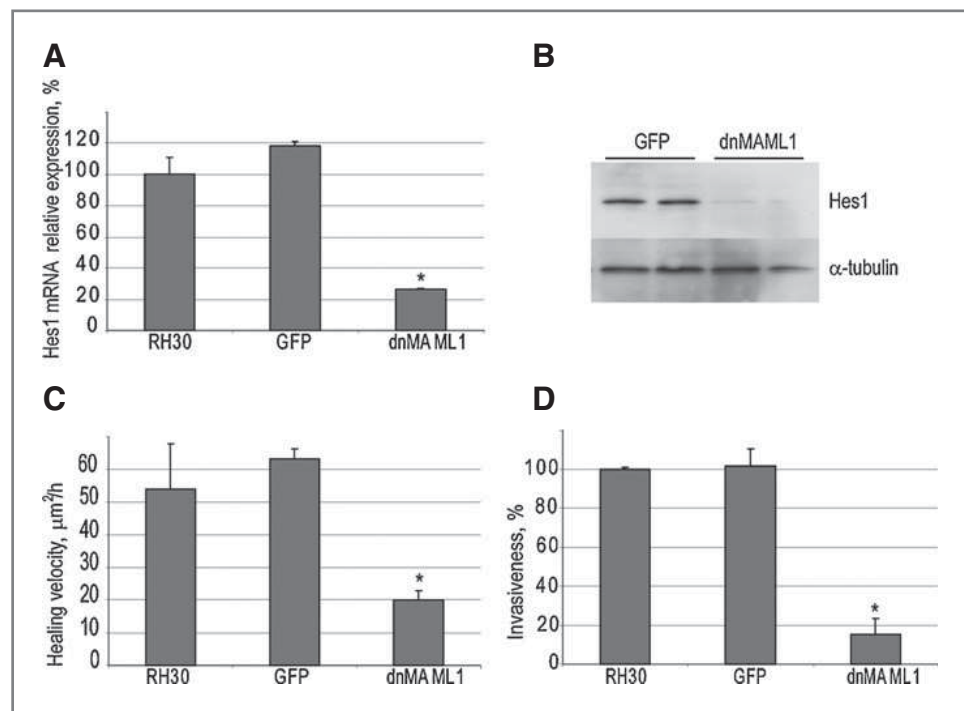


role of the Notch pathway in adult cancer. However, little is known on the role of the Notch pathway in the oncogenicity of pediatric tumors. Only very recent works on medulloblastoma (14), neuroblastoma (15), and osteosarcoma (12, 13) have clarified some aspects of the Notch pathway in these neoplasias; however, the overall role of this pathway in pediatric malignancies remains unclear. In addition, the possible role of the Notch pathway on the oncogenicity of RMS remains unknown. RMS patients with metastatic disease continue to have a very poor prognosis, although

aggressive therapies are indicated. Moreover, the major cause of death in these patients is the formation of distant metastasis. The cellular components that control metastasis in RMS should be identified before the development of targeted therapies focused on reducing metastasis in this neoplasia.

In this report, we provide evidence of Notch pathway expression and activation in RMS. One criterion to be met before a possible role of a pathway in a tissue can be considered is that this pathway must be expressed and

Figure 6. Effects of Notch downstream target silencing using dominant negative MAML1 (dnMAML1) in RH-30 cells. **A**, effects of dnMAML1 on Hes1 expression assessed by real-time PCR expressed as a percentage and compared to the control (RH-30). **B**, western blot showing the effect of dnMAML1 expression on Hes1 protein amount. Alpha-tubulin was used as a loading control. **C**, wound-healing assay showing the reduction in healing velocity in cells expressing dnMAML1. **D**, effects of dnMAML1 on matrigel/transwell invasion assay. In **A**, **C**, and **D**, *, significance of differences with control ($P < 0.005$).



activated in that tissue. It is noteworthy that all RMS tumors ($n = 37$) analyzed presented expression of several Notch receptors and downstream Notch targets. Upregulation of Notch2 was particularly striking while upregulation of Notch3, Hes1, and Hey1 was also significant.

The possible correlation between Notch pathway activation and the invasiveness and mobility of each RMS cell line analyzed is of particular interest. The HTB-82 cell line is derived from an eRMS, bears no translocation, and is associated with the most benign phenotype of the disease. Its invasiveness is minimal and Notch activation is practically absent. By contrast, the RH-30 cell line is derived from an aRMS bearing the PAX3-FOXO1 translocation (representing the most aggressive phenotype). This cell line presents a highly invasive phenotype in culture and is the cell line with the highest Notch pathway activation. Finally, the CW-9019 cell line is derived from an aRMS bearing the PAX7-FOXO1 translocation (moderately aggressive phenotype) and presents considerable invasiveness, although less than the RH-30 cell line. Its levels of Notch activation are also considerable and situated between the other 2 cell lines. These results raise the possibility that Notch pathway activation could be responsible for the triggering, at least in part, of metastatic mechanisms in the invasive cells, particularly in RMS cell lines. Using the 3 aforementioned RMS cell lines as models for the study of Notch activation and its possible role in the promotion of oncogenicity, some GSIs were used to test the effects of Notch inhibition on the oncogenicity of these cell lines. GSIs were first assayed for possible use as therapeutic agents in Alzheimer's disease (27). However, the use of GSIs reveals a concomitant Notch proteolytic inhibition and, over recent decades, these inhibitors have also been tested for anti-oncogenic effects (28). In the present work, we demonstrate the usefulness of several GSIs for Notch pathway inhibition in 3 RMS cell lines. One of the 4 drugs tested (GSI-X) produced only moderate inhibition but the other 3 drugs (DAPT, GSI-XX and GSI-XXI) yielded better results. This GSI-mediated Notch inhibition in the 3 cell lines analyzed—although total inhibition was not achieved—led to severe lessening of cell mobility and invasiveness *in vitro*, suggesting that the Notch pathway is responsible, at least partially, for the control of the mechanisms that allow cells to migrate and invade, thereby pointing to a possible future use of the drugs tested—particularly GSI-XX and GSI-XXI—as a therapeutic agents in the fighting against metastasis in RMS. Treatment with GSIs produces considerable gastrointestinal toxicity (29) that could be reduced, at least in part, by concurrent treatment with corticosteroids (30). Moreover, GSI-XX

and -XXI may have a more favorable therapeutic profile than the most commonly used DAPT, since they are effective at lower concentrations *in vitro*.

Around 55 membrane proteins are proteolyzed by γ -secretase (28), a fact to be borne in mind before the effects observed in γ -secretase inhibition are attributed to a single pathway. Therefore, in our opinion, all the results obtained should be validated using a γ -secretase independent inhibition methodology. For this reason, we provide a model in which Notch proteolysis remains untouched, while NICD cannot activate transcription of Notch target genes owing to the expression of a dominant negative MAML1 transcription factor. Using this methodology, the effects seen on cells were practically identical to those observed with GSI treatment, which confirms more specifically that Notch inhibition suffices to produce the effects described with GSI treatment, particularly on invasiveness.

Although our study demonstrates a critical role of the Notch pathway in the activation of the process that leads to cell mobility and invasiveness in cell culture, further study will be needed in RMS to elucidate its implications in the more intricate tumor microenvironment. In our opinion, one of the challenges for the future is to create RMS animal models to characterize the pathway *in vivo* and attempt the possible use of GSIs—while avoiding toxicity—as a possible complementary targeted therapy against RMS, particularly in cases with a high probability of relapse.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors wish to thank Ms Marta Valeri for technical support with the *in vivo* wound-healing assay, Ms Paqui Gallego for technical support with the real-time PCR assays and Ms Christine O'Hara for help with the English version of this manuscript.

Grant Support

This work was supported by grants from Institut Català d'Oncologia, Instituto de Salud Carlos III (RTICC, RD06/0020/1021), Asociación Española contra el cáncer-Catalunya contra el càncer, Fundació SMALL and Fundació FADAM.

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 January 21, 2010; revised July 19, 2010; accepted August 11, 2010; published OnlineFirst December 21, 2010.

References

- Barr FG, Gallili N, Holich J, Biegel JA, Rovera G, Emanuel BS. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcomas. *Nat Genet* 1993;3:113–7.
- Davis RJ, D'Cruz CM, Lowell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to the FOXO1 by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 1994;54:2869–72.
- Loh WE JR, Scrabble HJ, Livanos E, Arboleda MJ, Cavenee WK, Oshimura M, et al. Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1755–9.
- Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, et al. Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by

- comparative genomic hybridization: an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:337-44.
5. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* 2002;115:1095-7.
 6. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;268:225-32.
 7. Luo D, Renault VM, Rando TA. The regulation of notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:612-22.
 8. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 1999;10:547-58.
 9. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, et al. Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006;66:6312-8.
 10. Glahan D, Callahan R. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 1997;14:1883-90.
 11. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003;22:6598-608.
 12. Zhang P, Yang Y, Zweidler-McKay PA, Hughes DP. Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 2008;14:2962-9.
 13. Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, et al. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. *Br J Cancer* 2009;100:1957-65.
 14. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li Y, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 2006;66:7445-52.
 15. Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, et al. A Notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *J. Cancer Res* 2008;68:4727-35.
 16. Mizutani T, Taniguchi Y, Aoki T, Hashimoto N, Honjo T. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9026-31.
 17. Selkoe D, Kopan R. Notch and presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:565-97.
 18. Krop IE, Kosh M, Fearen I, Savoie J, Dallob A, Matthews C, et al. Phase I pharmacokinetic (PK), and pharmacodynamic (PD) trial of the novel oral Notch inhibitor MK-0752 in patients (pts) with advanced breast cancer (BC) and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2006;24:10574.
 19. Deangelo DJ, Stone RM, Silverman LB, Stock W, Attar EC, Fearen I, et al. A phase I clinical trial of the Notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. *J Clin Oncol* 2006;24:6585.
 20. Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 2002;3:397-409.
 21. Schaaf GJ, Ruijter JM, van Ruisen F, Zwijnenburg DA, Waaijer R, Valentijn LJ, et al. Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries. *FASEB J* 2005;19:404-6.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 2001;25:402-8.
 23. Scorey N, Fraser SP, Patel P, Pridgeon C, Dallman MJ, Djamgoz MB. Notch signalling and voltage-gated Na⁺ channel activity in human prostate cancer cells: independent modulation of in vitro motility. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2006;9:399-406.
 24. Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 1998;12:1751-62.
 25. Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD. MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for Notch receptors. *Nat Genet* 2000;26:484-9.
 26. Kitagawa M, Oyama T, Kawashima T, Yedvobnick B, Kumar A, Matsuno K, et al. A human protein with sequence similarity to *Drosophila* mastermind coordinates the nuclear form of Notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters. *Mol Cell Biol* 2001;21:4337-46.
 27. Pollack S, Lewis H. Secretase inhibitors for Alzheimer's disease: challenges of a promiscuous protease. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:35-47.
 28. Beel AJ, Sanders CR. Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1311-34.
 29. Barten DM, Meredith JE Jr, Zaczek R, Houston JG, Albright CF. γ -secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R D* 2006;7:87-97.
 30. Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, de Stanchina E, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2009;15:50-8.



El papel de la vía Notch en Rabdomiosarcoma

Anna Masià Fontana



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Full Paper

Notch-mediated induction of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells

A Masià¹, A Almazán-Moga¹, P Velasco², J Reventós¹, N Torán³, J Sánchez de Toledo², J Roma^{*,1} and S Gallego^{*,1,2}

¹Research Unit in Biomedicine and Translational and Pediatric Oncology, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119, Barcelona 08035, Spain; ²Pediatric Oncology and Hematology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

BACKGROUND: Rhabdomyosarcoma (RMS) is the commonest type of soft-tissue sarcoma in children. Patients with metastatic RMS continue to have very poor prognosis. Recently, several works have demonstrated a connection between Notch pathway activation and the regulation of cell motility and invasiveness. However, the molecular mechanisms of this possible relationship remain unclear.

METHODS: The Notch pathway was manipulated pharmacologically and genetically. The mRNA changes were analysed by quantitative PCR and protein variations by western blot and immunofluorescence. Finally, the capabilities of RMS cells to adhere, heal a wound and invade were assessed in the presence of neuronal cadherin (N-cadherin)- and $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies.

RESULTS: Cells treated with γ -secretase inhibitor showed lower adhesion capability and downregulation of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin. Genetic manipulation of the Notch pathway led to concomitant variations in N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin. Treatment with anti-N-cadherin-blocking antibody rendered marked inhibition of cell adhesion and motility, while anti- $\alpha 9$ -integrin-blocking antibody exerted a remarkable effect on cell adhesion and invasiveness.

CONCLUSION: Neuronal cadherin and $\alpha 9$ -integrin are postulated as leading actors in the association between the Notch pathway and promotion of cell adhesion, motility and invasion, pointing to these proteins and the Notch pathway itself as interesting putative targets for new molecular therapies against metastases in RMS.

British Journal of Cancer advance online publication, 13 September 2012; doi:10.1038/bjc.2012.411 www.bjcancer.com
© 2012 Cancer Research UK

Keywords: rhabdomyosarcoma; Notch; NCAD; ITGA9; invasion; soft-tissue sarcomas

Rhabdomyosarcoma (RMS), a malignant tumour of early onset, is the most common type of soft-tissue sarcoma in children. Regarding histopathological criteria, RMS can be divided into two main subtypes: embryonal and alveolar (eRMS and aRMS, respectively). The majority of aRMS (80–85%) contain one of the reciprocal chromosomal translocations: t(2;13)(q35;q14) or t(1;13)(p36;q14). These translocations generate the novel fusion genes *PAX3-FOXO1* and *PAX7-FOXO1*, respectively (Barr *et al*, 1993; Davis *et al*, 1994). However, no characteristic translocations have been described in eRMS. Patients with metastatic RMS have very poor prognosis and more intense therapies are thus indicated. Moreover, the major cause of death in these patients is the formation of distant metastases. The cellular components that control mobility, invasiveness and metastasis in RMS remain largely unknown. The molecules responsible for these processes should be identified before the development of targeted therapies focused on reducing metastasis in this neoplasia. Recently, we described the role of Notch pathway activation in controlling the migration and invasiveness processes in RMS (Roma *et al*, 2011). Similarly, the role of the Notch pathway in invasion and metastasis

has also been reported in osteosarcoma (Zhang *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2010; Engin *et al*, 2009) and some adult cancers, such as colon, prostate, cervical carcinoma and glioblastoma among others (Zayzafoon *et al*, 2004; Pang *et al*, 2010; Chigurupati *et al*, 2010; Christofori, 2011).

The acquisition of invasive properties by cancer cells during tumour progression is closely linked to changes in the expression of adhesion molecules that mediate the interaction of cancer cells with their surrounding cells and extracellular matrix. During tumour progression, malignant cells typically downregulate proteins that mediate adhesion to basal membrane and neighbouring cells and, at the same time, promote the expression of adhesion molecules that facilitate dynamic interaction with extracellular matrix components (Mariotti *et al*, 2007). A paradigmatic example of this phenomenon is the cadherin switch, frequently observed in the epithelial-mesenchymal transition of epithelial cancer cells (Cavallaro *et al*, 2002; Hazan *et al*, 2004). During this transition, E-cadherin expression is downregulated with concomitant enhancement of neuronal cadherin (N-cadherin) expression, which correlates with the acquisition of greater invasiveness and metastatic potential by malignant cells.

Neuronal cadherin (N-cadherin or cadherin-2) is a member of the classical type I cadherin family, which is critically involved in tissue development and maintenance. Like other classical type I cadherins, N-cadherin contains a large N-terminal extracellular domain composed of five tandem-repeated domains, a transmembrane segment

*Correspondence: Dr J Roma or Dr S Gallego;
E-mail: josep.roma@vhir.org or sgallego@vhebron.net
Received 23 March 2012; revised 26 June 2012; accepted 14 August 2012

and a cytoplasmic C-terminal domain able to interact with catenins (Mariotti *et al*, 2007). Although the mechanism by which increased N-cadherin expression promotes malignancy is not fully understood, in a subset of primary tumour cells, it is thought to promote adhesion of malignant cells to N-cadherin-expressing stromal or endothelial cells, thereby facilitating invasion and migration of tumour cells to distant sites (Sandig *et al*, 1997; Qi *et al*, 2005). Several experiments have demonstrated that the expression of N-cadherin suffices to promote invasion and metastasis in some cancers (Nieman *et al*, 1999; Hazan *et al*, 2000; Li *et al*, 2009).

The superfamily of integrins includes several transmembrane cell adhesion proteins that bind to extracellular matrix, cell surface and soluble ligands. All integrins act as heterodimers composed of α - and β - subunits. The α - and β - polypeptidic chains are distinct with no detectable homology between them (Takada *et al*, 2007). The heterodimer $\alpha 9 \beta 1$ has been implicated in several processes that entail dynamic interaction between cells and extracellular matrix, such as re-epithelialisation during cutaneous wound healing (Singh *et al*, 2009), cell adhesion in medulloblastoma and in hematopoietic progenitor cells (Fiorilli *et al*, 2008; Schreiber *et al*, 2009) and finally, cell migration in neoplastic and non-neoplastic cells (Gupta and Vlahakis, 2009; Oommen *et al*, 2011).

The main objective of this work was to demonstrate the existence of a connection between Notch pathway activation and the regulation of mechanisms underlying cell motility and invasiveness in RMS. It has been previously suggested that Notch1 and Notch3 signalling may promote an upregulation of N-cadherin expression in primary melanoma (Liu *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007); however, the molecular mechanisms of this possible relationship remain unclear. Moreover, as we demonstrated recently, the Notch pathway mediates RMS cell motility and invasiveness (Roma *et al*, 2011). The oncogenic potential of the Notch pathway was first described in acute T-cell lymphoblastic leukaemia in the late 1980s (Radtke *et al*, 1999). An abnormal upregulation of the Notch pathway has also been reported in ovarian (Park *et al*, 2006), breast (Glahan and Callahan, 1997) and other cancers (Nickoloff *et al*, 2003). With respect to paediatric malignancies, Notch signalling appears to contribute essentially to osteosarcoma metastasis (Zhang *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2010) and proliferation (Tanaka *et al*, 2009); Notch signalling also promotes medulloblastoma cancer stem cell survival (Fan *et al*, 2006) and contributes to angiogenesis in neuroblastoma (Funahashi *et al*, 2008). The four Notch receptors are synthesised as precursor proteins that are processed by furin-like enzymes in the *trans*-Golgi compartment. This cleavage leads to the production of a heterodimeric Notch receptor, which is further processed at the cell surface in a ligand-dependent manner by α - and γ -secretase. The α -secretase cleavage occurs at an extracellular site and removes the Notch ectodomain, whereas γ -secretase cleavage occurs in the Notch transmembrane domain, leading to the release of the intracellular Notch fragment (NICD) that translocates to the nucleus where it binds to CSL (CBF1-Su(H)-Lag1) transcription repressors, converting them into transcriptional activators. The targets of these transcription factors in vertebrates are typified by *Hes* and *Hey* genes (Artavanis-Tsakonas *et al*, 1999; Luo *et al*, 2005). The possible demonstration of a connection between Notch signalling and the expression of adhesion molecules may shed light on the unknown molecular mechanism of the Notch-mediated invasive phenotype of RMS cells and allow us to adopt new therapeutic approaches to the fight against metastases in this neoplasia.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, transfections and drug treatments

RH30, CW9019 and HTB82 RMS cell lines were grown in MEM medium with Earle's Salts, supplemented with 10% FCS, 2 m

M L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, $1 \times$ non-essential aminoacids, 100 U ml^{-1} penicillin and 0.1 mg ml^{-1} streptomycin (all culture reagents supplied by PAA Laboratories, Haidmannweg, Austria) and maintained at 37°C in a 5% CO_2 water-jacketed incubator. Full-length dnMAML1, Delta and Hes1 complementary DNAs (cDNAs) were generously provided by Dr Anna Bigas (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain). The full-length NICD cDNA was a kind gift from Dr Rosanna Paciucci (Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain). All cDNAs used were cloned into a pCDNA3.1 vector, except dnMAML1 that was cloned into a pEGFP vector. All cDNA transfections were carried out in parallel with the respective empty vector as a control. Transient transfections were performed using $8 \mu\text{g}$ of plasmid DNA and FuGENE 6 transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Roche, Basel, Switzerland). Transfection efficiency was approximately 70% for the three cell lines and was assessed by calculating the percentage of GFP-positive cells referred to the total of cells. Transfected cells were harvested between 48 and 72 h and processed for subsequent assays. Gamma-secretase inhibitor (GSI)-XXI (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was diluted in DMSO and added to the culture medium for 3 days at a final concentration of 4 nM as previously described (Roma *et al*, 2011). Control plates were supplemented with an equivalent volume of DMSO.

Complementary DNA microarrays

Microarrays were carried out using the Affymetrix microarray platform and the Genechip Human Gene 1.0 ST Array; 100 ng of total RNA were used per sample. Two plates of RH30 cells previously treated with GSI were compared with their control (DMSO). Quality of total RNA was assessed by Bioanalyzer Assay (Agilent). Chips were processed on an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 and Scanner 3000. Results were analysed using TMEV software (Saeed *et al*, 2006).

Western blotting

Cells were homogenised in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mg ml^{-1} aprotinin, 5 mg ml^{-1} leupeptin, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) and incubated for 4 min at 90°C . The total protein content was measured using the DC assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a 10% SDS-PAGE was performed and the resolved proteins were in turn transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were then incubated with anti-Hes1 polyclonal antibody AB5702 (Millipore, Billerica, MA, USA) diluted 1:200, anti-N-cadherin monoclonal antibody C2542 (Sigma, St Louis, MO, USA) diluted 1:1000, anti- $\alpha 9$ -integrin monoclonal antibody clone 3E4 (Abnova, Aachen, Germany) diluted 1:250 and anti-Notch1 (C-20) sc-6014 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:500. An anti- α -tubulin monoclonal antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) diluted 1:2000 was used as a loading control.

Immunofluorescence

Each well was plated with 3×10^5 cells on 12-mm round glass coverslips pre-coated with a 4% collagen-I solution (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). After 24 h, cells were transfected with the appropriate plasmids as described above. After 48 h, cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, incubated with 50 mM NH_4Cl and permeabilised with 0.1% Triton X-100. Samples were then blocked with 5% FCS prior to incubation with the following primary antibodies: anti-Hes1 AB5702 (Millipore) diluted 1:50, anti-N-cadherin C2542 (Sigma) diluted 1:250 and anti- $\alpha 9$ -integrin clone 3E4 (Abnova) diluted 1:125. Cells were then incubated with suitable secondary antibodies labelled with

AlexaFluor-647 or AlexaFluor-488 (Molecular probes, Eugene, OR, USA). Nuclei were stained with 5 ng ml^{-1} of Hoechst33342 (Sigma). Fluorescence was visualised in a FV1000 confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and quantified with Olympus Fluorview software. A minimum of 100 cells obtained from random selected fields was evaluated.

Immunohistochemistry

Patient samples ($n=9$) were obtained from the Vall d'Hebron Hospital Pathology Department (kindly provided by Dr Nuria Toran). Paraffin-embedded tissues were sliced, deparaffinised and rehydrated, followed by antigen retrieval in 10 mM citrate buffer (DAKO). Endogenous peroxidase activity was quenched using 1% hydrogen peroxide. Samples were blocked and incubated with antibodies against Hes1 (AB5702, Millipore), N-cadherin (C2542, Sigma) and $\alpha 9$ -integrin (3E4, Abnova), all diluted 1:200. After incubation with peroxidase-conjugated secondary antibody and peroxidase substrate, samples were counterstained with hematoxylin for 10 s, dehydrated and mounted. Labelling of each antibody was evaluated using a semiquantitative method regarding the percentage of positive cells ($\leq 25\%$, 26–50%, 51–75% and $> 75\%$ corresponding to a score of 1, 2, 3 and 4 respectively) and intensity of the labelling (0–3). The assigned final score (1–7) corresponds to the sum of the labelling and percentage of positive cell scores.

RNA isolation, retrotranscription and real-time PCR

RNA was isolated using the Quick-prep micro RNA isolation kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Valencia, CA, USA). Samples of $2 \mu\text{g}$ of total RNA were reverse transcribed using random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C with 200 U of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). A 40-cycle PCR based on the TaqMan assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was performed to detect N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin (Hs00983056_m1 and Hs00979865_m1 TaqMan assays, respectively). The downstream Notch effector Hes1 (assay Hs00172878_m1) was used to assess Notch activation. The housekeeping gene *TBP* (assay Hs00172424_m1) was used as internal control. Quantification of relative levels of each mRNA analysed was performed by the method of (Livak and Schmittgen, 2001). All samples were tested in triplicate.

Fibronectin and collagen adhesion assay

A total of 3×10^5 GSI-pre-treated cells per well was seeded in a 24-well plate previously coated with collagen or fibronectin. Cells were then incubated at 37°C for 15 min (RH30), 30 min (CW9019) or 1 h (HTB82), respectively, fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.2% crystal violet. Cells were then lysed in 10% acetic acid and the absorbance at 590 nm was determined as a value proportional to the number of cells adhered to the substrate. To establish the specificity of the assay for N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin, some wells were treated with $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ of either N-cadherin- (GC-4, Sigma) or $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies (Y9A2, Chemicon International, Temecula, CA, USA). The control wells were treated with an anti- α -tubulin monoclonal antibody (Cell Signaling) at the same concentration, as isotypic control. All measurements were taken in triplicate.

Transwell assay

Cells were trypsinised, seeded at 10^5 cells per well and incubated in the presence or absence of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ of either N-cadherin or $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies for 30 min on ice. Following the incubation, cells were plated in the upper chamber previously coated with BD Matrigel (BD Biosciences) in an $8\text{-}\mu\text{m}$ pore-size transwell (Corning). Basal medium containing 1% FBS in the

presence or absence of the aforementioned N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies was added to each well and incubated at 37°C for 6, 12 and 48 h (for RH30, CW9019 and HTB82 cell lines, respectively). The control wells were treated with $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti- α -tubulin monoclonal antibody (Cell Signaling). Remaining cells were removed from the upper chamber with a cotton swab, and cells migrated to the lower surface were stained with 0.2% crystal violet, lysed in 10% acetic acid and the absorbance at 590 nm was determined as a value proportional to the number of cells on the lower surface of each membrane. All analyses were made in triplicate.

Wound-healing assay

Cells were seeded on a 24-well plate (3×10^5 cells per well) and incubated in the presence or absence of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ of either N-cadherin- or $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies as described above. The control wells were treated with $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti- α -tubulin monoclonal antibody as isotypic control (Cell Signaling). A day later, cell monolayers were scratched with a pipette tip and placed in complete growth medium with or without the suitable blocking antibody. The initial scratched areas were measured using the ImageJ software (NIH, freely available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and serial images of random selected fields were acquired until the healing of the wounds was complete. Healing velocity was calculated as a quotient between the scratched area and the time required for the wound to heal. All analyses were made in triplicate.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Chromatin immunoprecipitation was performed following the manufacturer's (Millipore) instructions using $5 \mu\text{g}$ of polyclonal rabbit antibodies against Hes1 AB5702 (Millipore) and Notch1 sc-6014 (Santa Cruz Biotechnology). The same amount of rabbit immunoglobulin (IgG) was used as a control (Abcam). The co-immunoprecipitated DNAs were used for PCR to amplify N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin promoter regions. The primers used were as follows: N-cadherin promoter (forward 5'-ACCCAGAGA TCAAGGAGCTG-3'; reverse 5'-CTCCACTTCCACCTCCACAT-3') and $\alpha 9$ -integrin promoter (forward 5'-GAGCTCAAAAGTGCCCT CTC-3'; reverse 5'-TGAGGGAGGAAAAAGAAGCA-3').

RESULTS

Pharmacological inhibition of Notch signalling impairs cell adhesion in RMS cell lines

Cells treated with GSI showed a clear reduction in cell adhesiveness detected in either collagen- or fibronectin-coated plates (Figure 1). The effect produced by GSI-XXI on cell adhesiveness varied among the cell lines analysed and according to the coating of the plate surface; however, in general, treated cells showed a significant reduction in adhesion that ranged from 20 to 50% in fibronectin-coated plates (Figure 1A) and from 30 to 60% in collagen-coated plates (Figure 1B). Cell viability was assessed by flow cytometry with no substantial differences observed between GSI-treated and untreated (DMSO) cells (Supplementary Figure S1). These observations fitted our hypothesis that Notch pathway may be able to regulate some of the molecular processes that lead to cell adhesion and migration. However, they did not rule out the possibility that the effects observed may have been caused by effects of the drug on other pathways or directly on cell adhesion molecules.

Pharmacological inhibition of Notch signalling significantly reduces N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin expression

A cDNA microarray permitted preliminary identification of adhesion proteins downregulated under GSI treatment. Neuronal

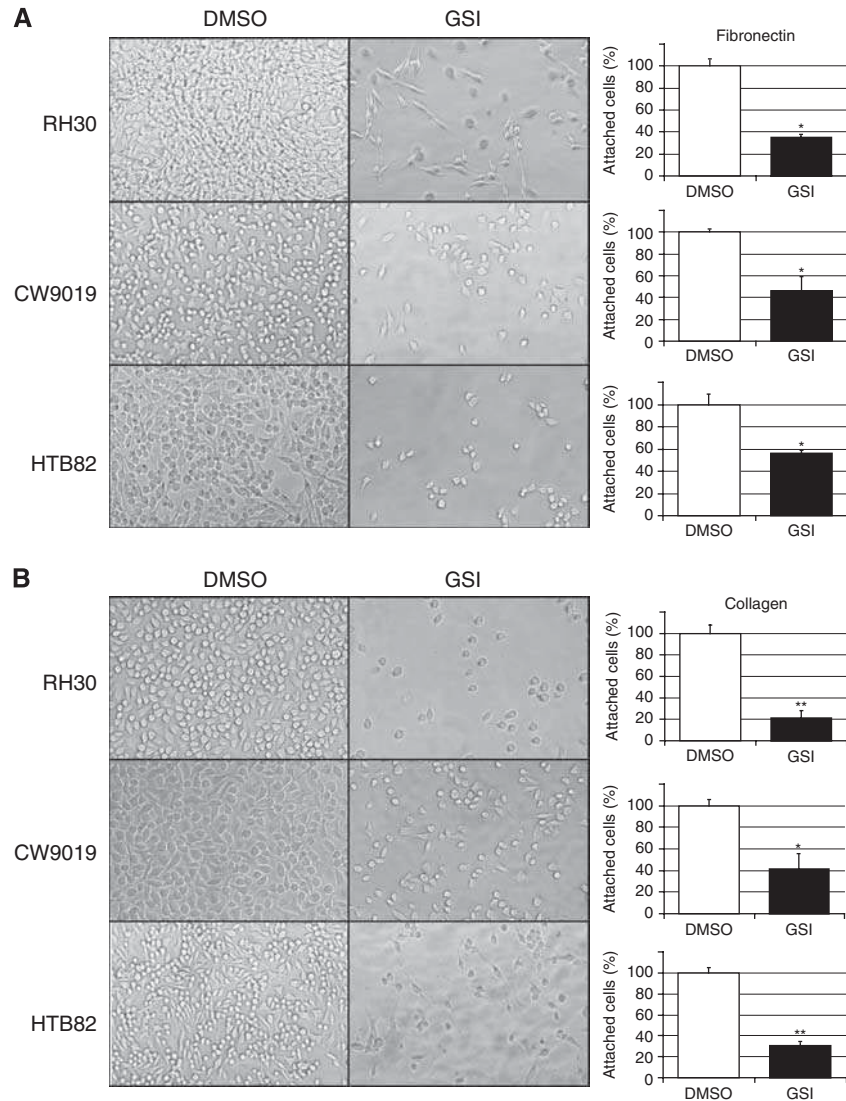


Figure 1 Cell adhesion to fibronectin- or collagen-coated plates. Images showing a representative field of attached cells for each cell line in the presence (GSI) or absence (DMSO) of γ -secretase inhibitor and plots representing the quantification of cells attached to fibronectin- (**A**) or collagen-coated (**B**) plates. All samples were evaluated in triplicate. Student's *t*-test significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

cadherin and $\alpha 9$ -integrin were selected for their downregulation under GSI treatment, their significant expression (other proteins downregulated but barely expressed in control samples were ruled out) and their previously well-established involvement in cell adhesion, motility and metastasis (Figure 2A). With the aim of confirming the results obtained in the cDNA microarray, we specifically analysed the expression of the two selected genes by western blotting and qRT-PCR. Western blotting (Figure 2B) revealed a reduction in both full-length N-cadherin and the CTF2 fragment levels. The CTF1 fragment was not detected in the RMS cell lines analysed (not shown), thereby suggesting a negligible role of this isoform in RMS. Levels of $\alpha 9$ -integrin were also reduced in cells treated with GSI. Levels of $\beta 1$ -integrin, the usual partner of $\alpha 9$ -integrin, showed no changes (not shown). The reduction in Hes1, as a marker of effective Notch inhibition in treated cells, is also shown in Figure 2B. Similarly, mRNA levels of both N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin showed statistically significant reductions in the three cell lines, down to between 60 and 85% for N-cadherin and to 20–50% for $\alpha 9$ -integrin, compared with untreated cells (100%). The mRNA expression of Hes1 was also analysed as a marker of correct Notch inhibition and showed a

statistically significant reduction, as expected, in cells treated with GSI (Figure 2C). Although pharmacological Notch inhibition was not complete, reductions in N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin expressions were significant, particularly for $\alpha 9$ -integrin.

Although these results confirmed the N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin reduction in cells treated with GSI, they failed to demonstrate unequivocally that the effects observed could be exclusively Notch-dependent.

Genetic modification of Notch pathway activation gives rise to a parallel regulation of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin

Seeking to rule out the possibility of the observed effects on cells treated with Notch inhibitors being attributable to the involvement of other pathways or to a direct effect of the drugs on N-cadherin or $\alpha 9$ -integrin – and therefore demonstrate that these effects resulted from specific Notch activation – we genetically manipulated Notch signalling activity by transfecting constructs containing the Notch ligand Delta1 (Delta) and a dominant negative form of MAML1 (dnMAML1). Activation of the Notch pathway by transfection of Delta promotes N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin

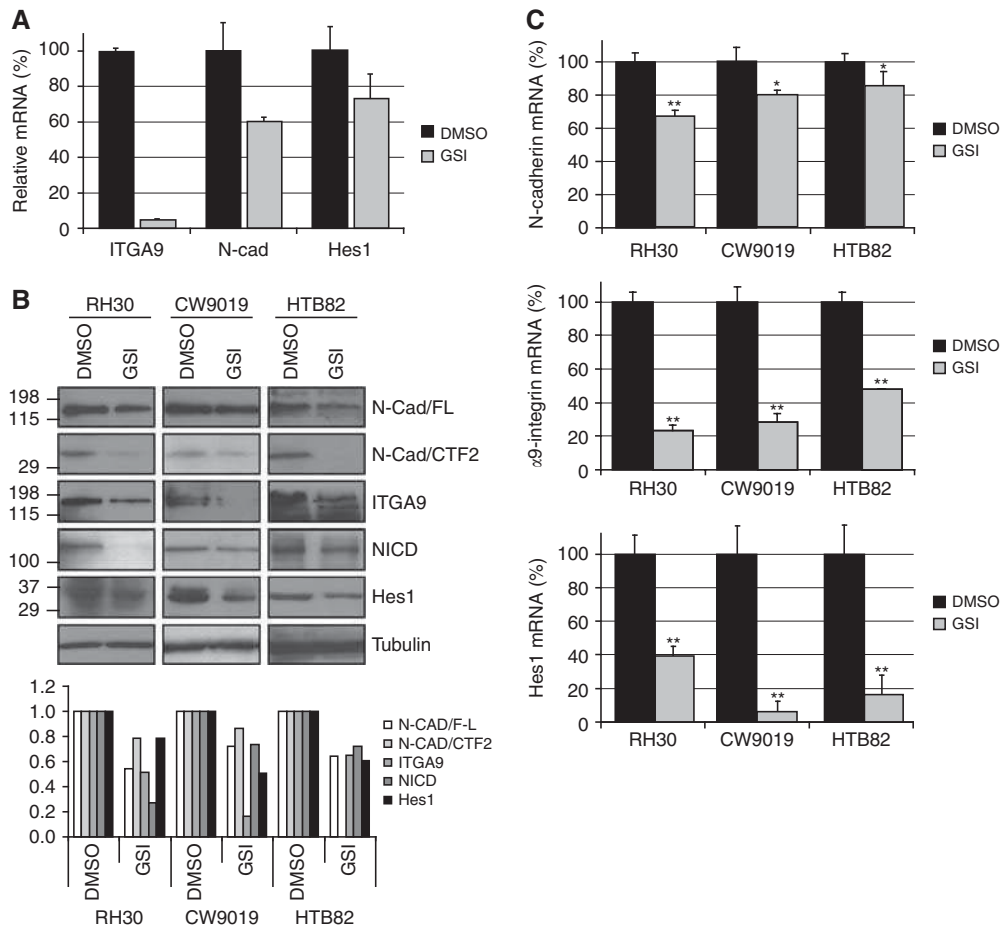


Figure 2 Pharmacological inhibition of Notch signalling significantly reduced N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin expression. **(A)** Complementary DNA (cDNA) expression microarray showing the relative levels of $\alpha 9$ -integrin (ITGA9), N-cadherin (N-Cad) and Hes1 expression in GSI-treated samples (GSI) compared with the control (DMSO). **(B)** Panel of western blots showing the effects of GSI on full-length N-cadherin (N-Cad/FL) and CTF2 fragment, $\alpha 9$ -integrin (ITGA9), NICD and Hes1 levels compared with untreated samples (DMSO). Alpha-tubulin was used as a loading control. Below the western blot composition, a plot depicting densitometric analysis of each band of the western blot. **(C)** Relative mRNA levels evaluated by quantitative PCR in the presence (GSI) or absence (DMSO) of γ -secretase inhibitor. Neuronal cadherin, $\alpha 9$ -integrin and Hes1 mRNA levels were evaluated in triplicate. Student's *t*-test significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

increases in both protein and mRNA levels (Figures 3A and C). Conversely, inhibition of the pathway by overexpression of the dominant negative dnMAML1 produces a parallel reduction in protein and mRNA levels of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin (Figures 3B and C). Western blot revealed the presence of full-length N-cadherin (N-Cad FL) and the CTF2 fragment, whereas the CTF1 fragment was not detected (not shown). Both forms of N-cadherin detected (N-Cad FL and CTF2) and $\alpha 9$ -integrin showed induction when the Notch pathway was activated (overexpression of Delta) and a clear reduction when repressed (overexpression of dnMAML1) (Figures 3A and B). No changes were observed in the amount of $\beta 1$ -integrin, the usual partner of $\alpha 9$ -integrin (not shown).

Immunofluorescence

Fluorescent immunocytochemistry against N-cadherin revealed moderate expression of this protein in non-transfected cells (Figures 4A and C). When cells underwent overactivation of the Notch pathway (by Delta1 transfection), N-cadherin expression was significantly increased in the three cell lines analysed and conserved the localisation pattern of the endogenous protein in each cell line. The staining was localised in cytoplasm and cell membrane in RH30 and CW9019 cell lines, but more prominently

in the nucleus in HTB82, which suggests a major presence of the CTF2 form in this cell line (also observed by western blot, Figure 3).

The distribution of $\alpha 9$ -integrin staining was general and showed prominent nuclear and cytoplasmic staining. As in the results found with N-cadherin transfections, RMS cells transfected with Delta also showed a statistically significant increase in $\alpha 9$ -integrin staining compared with controls (Figures 4B and C).

Specific anti-N-cadherin- and anti- $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies reduce invasive properties of RMS cells

Seeking to demonstrate that the role of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin is critical for the Notch-mediated increase in RMS cell capability to migrate and invade, we performed adhesion, wound-healing and invasion assays in the presence or absence of specific blocking antibodies against these two proteins. The main aim of these experiments was to demonstrate whether inhibition of N-cadherin and/or $\alpha 9$ -integrin suffices to compensate for the increases in adhesion, wound-healing and invasiveness detected in cells with constitutive Notch activation. Cells transfected with Delta or NICD showed an increase in their adhesion to fibronectin-coated plates, which could be reverted using either anti-N-cadherin- or anti- $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies (Figure 5A). The effects of the

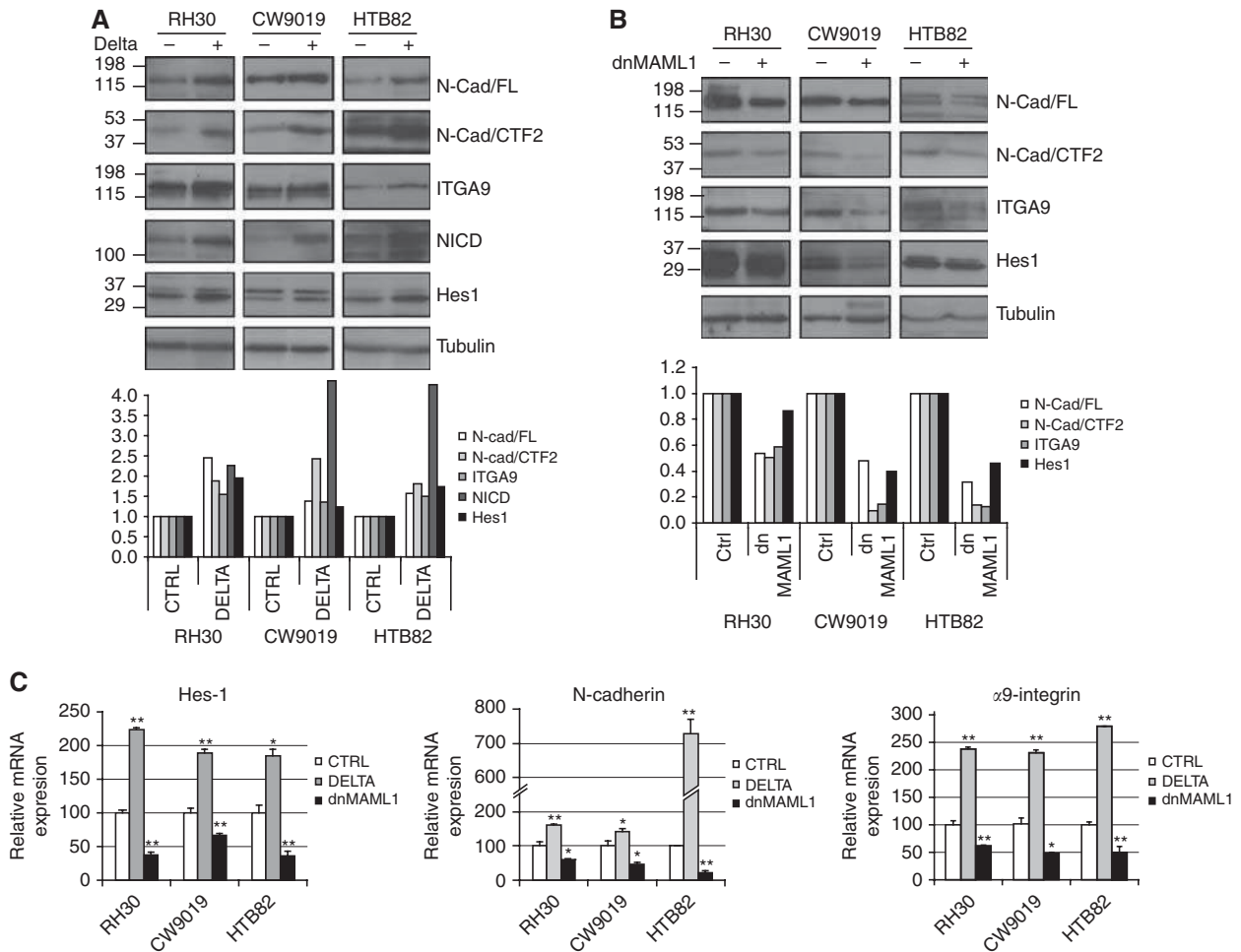


Figure 3 Genetic modifications of the Notch pathway influenced N-cadherin and α 9-integrin expression. Western blots showing the concomitant variations of Notch pathway activation (NICD and Hes1) and N-cadherin (N-Cad/FL and CTF2) and α 9-integrin (ITGA9) expression in RMS cells transfected with Delta (**A**) or dnMAML1 (**B**). Below each western blot composition, a plot depicting densitometric analysis of each band of the western blot. The variations associated with genetic modification of the Notch pathway (Delta and MAML1 transfections) observed in protein are also seen in the mRNAs of N-cadherin, α 9-integrin and Hes1 determined by quantitative PCR (**C**). All RNA measurements were taken in triplicate. Student's *t*-test significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

blocking antibodies on healing velocity differed for N-cadherin and α 9-integrin. Thus, while N-cadherin-blocking antibody gave rise to a significant reduction in healing velocity in the three cell lines analysed, the anti- α 9-integrin-blocking antibody did not promote any significant decrease in the capability of cells to heal a wound (Figure 5B). Finally, the effects observed with both antibodies on cell invasiveness in a matrigel/transwell assay also differed (Figure 5C). Interestingly, the α 9-integrin-blocking antibody produced marked invasiveness impairment in this assay, whereas only a very weak effect of N-cadherin-blocking antibody on invasiveness was observed.

Correlation among Hes1, N-cadherin and α 9-integrin in RMS archival tumour samples

Patient sections were stained using antibodies against Hes1, N-cadherin and α 9-integrin with the aim of demonstrating the correlation among these proteins observed in cultured RMS cell lines. The intensity of labelling was evaluated using a semiquantitative method as described above. The results obtained showed a correlation between the expression of Hes1 with both N-cadherin and α 9-integrin (Figure 6). Although the number of samples was limited ($n = 9$), the correlation between Hes1 and N-cadherin yielded a Pearson correlation of 0.584 ($P < 0.1$) and the correlation

for Hes1 and α 9-integrin a value of 0.771 ($P < 0.05$), thereby suggesting a dependency of Hes1 expression on N-cadherin and α 9-integrin. This correlation among these proteins confirms, in patients, the aforementioned findings in cultured cells and suggests that Notch activation may also influence the expression of these two adhesion proteins in tumours.

NICD and Hes1 bind to N-cadherin and α 9-integrin promoters

Chromatin immunoprecipitation assay revealed co-immunoprecipitation of both NICD and Hes1 with the N-cadherin and α 9-integrin promoter sequences. The control IgGs rendered no amplification (Figure 7). These results pointed to a direct binding of these Notch downstream effectors to the promoter regions of N-cadherin and α 9-integrin genes.

DISCUSSION

Rhabdomyosarcoma patients with metastatic disease continue to have poor prognosis and the major cause of death in these patients is the formation of distant metastases. The identification of molecular components and mechanisms that control metastasis in

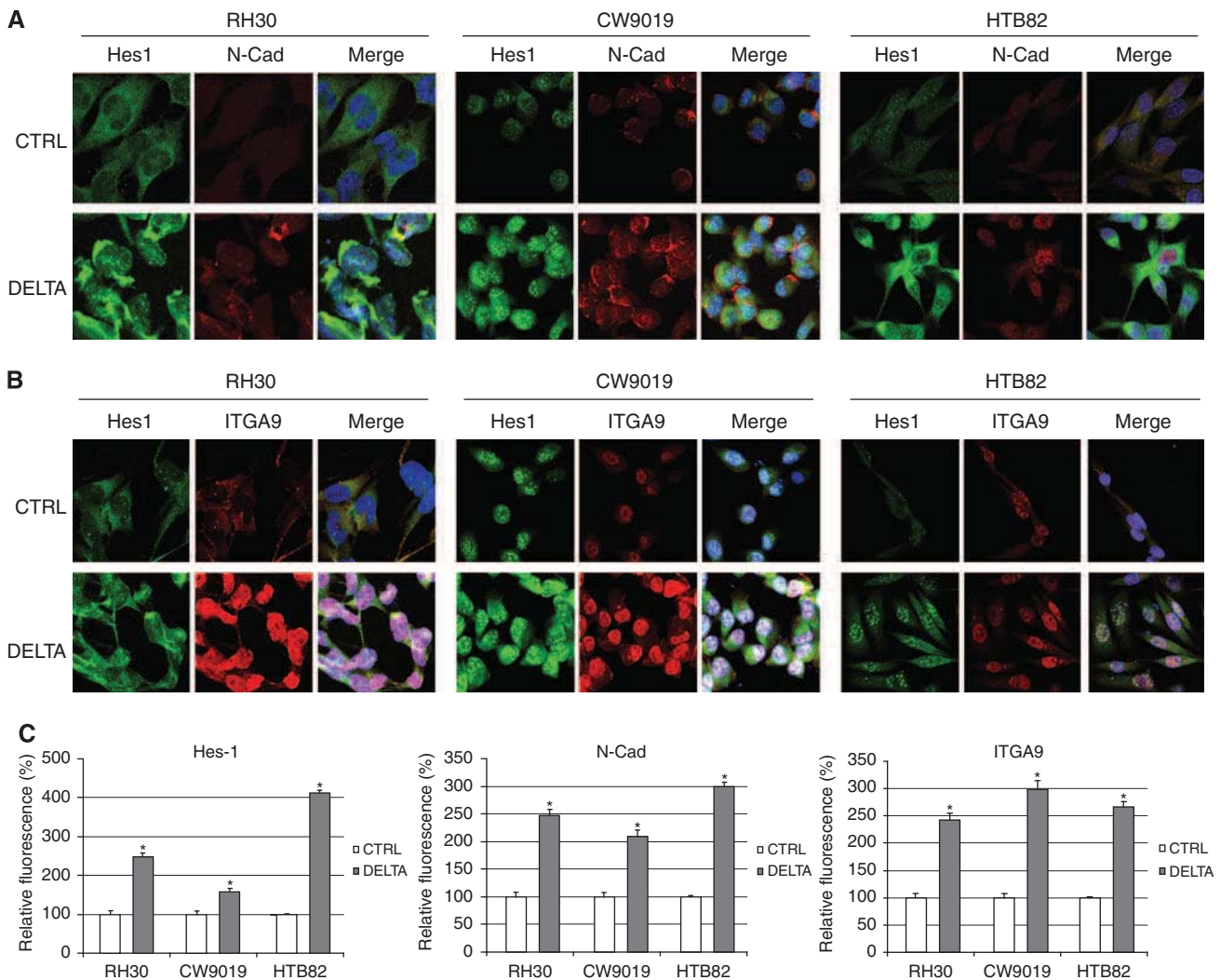


Figure 4 N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin immunocytochemistry. Immunocytochemistry with anti-Hes1 and N-cadherin (N-Cad) antibodies (**A**) or Hes1 and $\alpha 9$ -integrin (ITGA9) antibodies (**B**) in cells transfected with Delta or control vector (CTRL). Staining was as follows: Hes1 (green), N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin (red) and nuclei (blue). (**C**) Relative fluorescence quantification for Hes1, N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin. Student's *t*-test significance: **P* < 0.05.

RMS may be useful for developing targeted therapies focused on reducing metastasis in this neoplasia. Although the mechanism by which increased N-cadherin expression promotes malignancy is not fully understood, it is thought to promote adhesion of malignant cells to N-cadherin-expressing stromal or endothelial cells, thereby facilitating invasion and migration of tumour cells to distant sites (Sandig *et al*, 1997; Qi *et al*, 2005). Although several works have demonstrated that N-cadherin expression suffices to promote metastasis in some cancers (Nieman *et al*, 1999; Hazan *et al*, 2000; Li *et al*, 2009) and an aberrant N-cadherin expression has been described in RMS (Soler *et al*, 1993), no previous publications have shown the importance of N-cadherin for RMS invasiveness. Herein, a central role of N-cadherin in RMS cell adhesion and motility is demonstrated; furthermore, a new mechanism of N-cadherin induction, mediated by Notch pathway activation, is also proposed. Likewise, $\alpha 9$ -integrin – forming a heterodimer with $\beta 1$ -integrin – has previously been implicated in processes, such as cell migration, involving dynamic interaction among cells and their microenvironment (Gupta and Vlahakis, 2009; Oommen *et al*, 2011). However, its possible role in RMS remains unknown. Therefore, this work represents the first description of a pro-invasive role of $\alpha 9$ -integrin in RMS.

We and others recently implicated the Notch pathway in paediatric sarcoma motility and invasiveness (Zhang *et al*, 2008;

Roma *et al*, 2011); however, the molecular connection between the Notch pathway and the process that leads to cell adhesion remains largely obscure. A previous work described the requirement of Notch activation in the epithelial-to-mesenchymal transition of epithelial cells, which finally rendered a disassembly of E-cadherin junctions, thereby permitting an increase in cell motility (Zavadil *et al*, 2004). The results herein presented point to the existence of a Notch-mediated mechanism able to positively modulate the expression of adhesion proteins, such as N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin, which may drive motility and invasiveness in neoplastic cells, thereby permitting cancer progression. The three cell lines studied belong to different RMS subtypes and are known to have great biological differences. Two contain PAX/FOXO1 translocations and one bears no translocation. The fact that we consistently found a relationship between Notch and N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin in such different cell lines suggests that the mechanism here described is a general mechanism in RMS – and perhaps in other neoplasias – and not a mere characteristic of a particular RMS subtype. Therefore, Notch-controlled changes in the levels of proteins implicated in tumour cell spread, such as a down-regulation of E-cadherin in epithelial tumours (Zavadil *et al*, 2004) and an upregulation of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin in a mesenchymal tumour such as RMS, support the role of Notch as an upstream key signalling pathway in the control of cancer

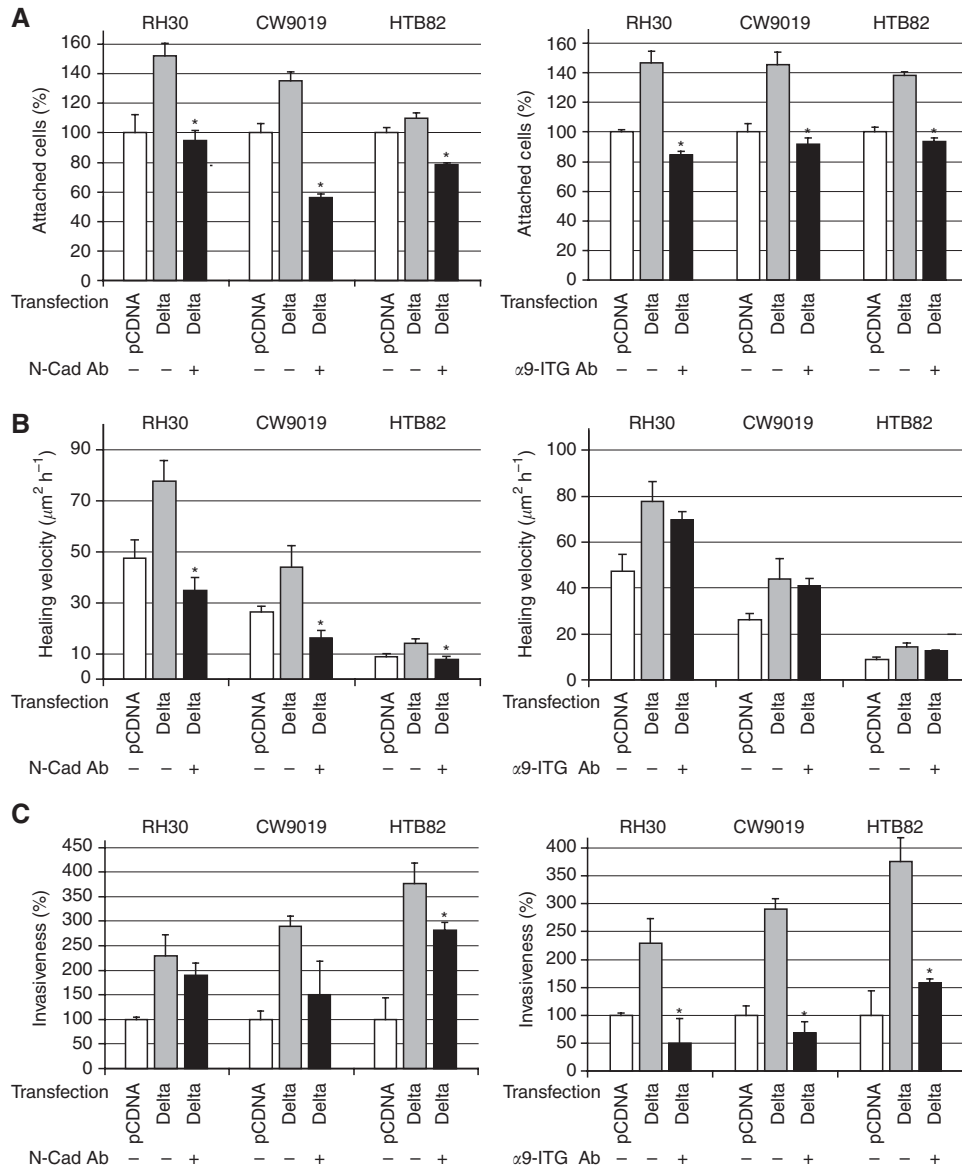


Figure 5 Anti-N-cadherin- and anti- $\alpha 9$ -integrin-blocking antibodies reduced invasive properties induced by Notch activation. Three RMS cell lines were transfected with the constructions indicated below the bottom of each bar (pCDNA, Delta) in the presence (+) or absence (-) of either N-cadherin-blocking antibody (N-Cad Ab) or $\alpha 9$ -integrin-blocking antibody ($\alpha 9$ -ITG Ab) as indicated in the figure. **(A)** Adhesion assay on fibronectin-coated plates. The percentage of cells attached was quantified per cell line and condition. **(B)** Wound-healing assay. All bars indicate the healing velocity of each cell line, transfection and treatment **(C)** Matrigel/Transwell assay. Invasiveness is represented as a percentage of cells in the lower compartment, compared with the control. The three assays were performed in three independent wells per cell line and condition. Student's *t*-test significance: **P* < 0.05.

dissemination. Furthermore, the promoter-binding study, herein provided, pointed to a direct interaction of Hes1 and NICD to N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin gene regulatory regions. NICD and Hes1 are known to be proteins able to bind directly (Hes1) or indirectly (NICD) to DNA, thereby influencing gene transcription. The binding of NICD to the N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin promoter regions strongly suggests a role in their transcriptional activation, as NICD is an archetypal transcriptional activator. On the other hand, Hes1 is a known transcriptional repressor; however, it may also act as a transcriptional activator of certain genes (Yan *et al*, 2002). It is not clear whether Hes1 can exert a repressive or activating role in the promoters of the two genes included in this study. It is also conceivable that the relative amounts of both NICD and Hes1 may cooperatively regulate – inducing or repressing, depending on their relative proportion – the expression of the N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin genes.

The use of pharmacological Notch pathway inhibitors, such as GSI, has been proposed as a therapeutic alternative in several cancers, focused essentially on reducing cell proliferation. Several GSIs have been actively studied as potential inhibitors of the generation of the β -amyloid peptide associated with Alzheimer's disease (Selkoe and Kopan, 2003). More recently, some GSIs have begun to be studied in phase I–II trials for patients with advanced breast cancer and acute T-cell leukaemias (Deangelo *et al*, 2006; Krop *et al*, 2006). Beyond the use of GSIs as anti-proliferation agents, the results of our experiments point to GSIs as compounds able to reduce the invasive features of tumour cells and, therefore, suitable for use in the fight against metastasis.

Taken together, the results of this work reveal that the Notch pathway has a significant role in the regulation of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin expression in RMS and, therefore, the Notch pathway should be considered a key regulator of the mechanisms, such as

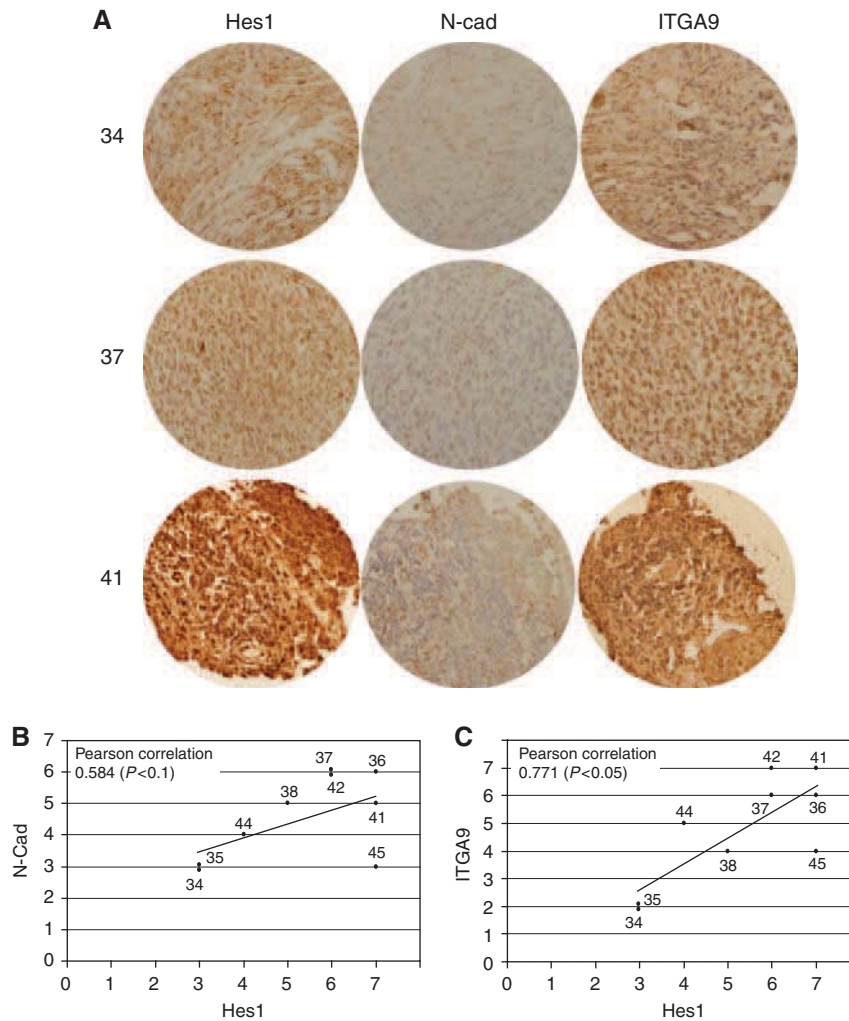


Figure 6 The expression of Hes1, N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin correlate in archival RMS tumour samples. **(A)** Representative sections of three patients (34, 37 and 41) stained with anti-Hes1, N-Cad and $\alpha 9$ -integrin antibodies. **(B)** and **(C)** Plots depicting the correlations between Hes1 and both N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin semiquantitative scores. Pearson correlation value and significance are shown in the upper left corner in each plot.

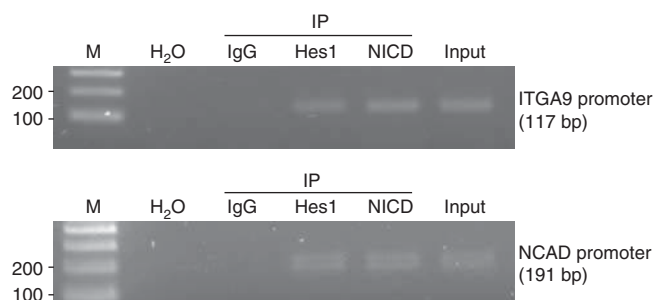


Figure 7 Binding of NICD and Hes1 to N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin promoters. Lysates from RH30 cells were analysed by ChIP assay using specific antibodies against Hes1, NICD and rabbit IgG as a control. Immunoprecipitated chromatin was amplified by PCR using N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin promoter region-specific primers. IgG: negative control rabbit IgG; Input: 5% of the sonicated cell lysate used for IP; H₂O: PCR negative control; M: 100 bp DNA ladder.

demonstrated, consequently pointing to these proteins as new candidates for target-specific therapies focused on reducing metastasis in this neoplasia.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ms Marta Rebull and Mr Isaac Vidal for laboratory technical support, Ms Marta Valeri for technical support with the *in vivo* wound-healing assay and confocal microscopy, Ms Paqui Gallego for technical support with the real-time PCR assays, Mr Ricardo Gonzalo for cDNA microarrays hybridisation and Ms Christine O'Hara for help with the English version of this manuscript. This work was supported by grants from Institut Català d'Oncologia (ICO), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0020/1021 and PI11/00740), Fundació la Marató de TV3, Asociación Española Contra el Cáncer, Fundació SMALL and Fundació A. BOSCH.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

REFERENCES

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **268**: 225–232
- Barr FG, Gallili N, Holich J, Biegel JA, Rovera G, Emanuel BS (1993) Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcomas. *Nat Genet* **3**: 113–117
- Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G (2002) Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* **176**(2): 123–128
- Chigurupati S, Venkataraman R, Barrera D, Naganathan A, Madan M, Paul L, Pattisapu JV, Kyriazis GA, Sugaya K, Bushnev S, Lathia JD, Rich JN, Chan SL (2010) Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* **70**(1): 418–427
- Christofori G. Metastatic colon cancer cells negotiate the intravasation notch (2011) *Cancer Cell* **19**(1): 6–8
- Davis RJ, D'Cruz CM, Lowell MA, Biegel JA, Barr FG (1994) Fusion of PAX7 to the FOXO1 by the variant t(1;13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* **54**: 2869–2872
- Deangelo DJ, Stone RM, Silverman LB, Stock W, Attar EC, Fearon I, Dallob A, Matthews C, Stone J, Freedman SJ, Aster J (2006) A phase I clinical trial of the Notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. *J Clin Oncol*. ASCO Annual meeting Proceedings **24**(18S): abstract 6585
- Engin F, Bertin T, Ma O, Jiang MM, Wang L, Sutton RE, Donehower LA, Lee B (2009) Notch signaling contributes to the pathogenesis of human osteosarcomas. *Hum Mol Genet* **18**(8): 1464–1470
- Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, Eberhart CG (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* **66**: 7445–7452
- Fiorilli P, Partridge D, Staniszewska I, Wang JY, Grabacka M, So K, Marcinkiewicz C, Reiss K, Khalili K, Croul SE (2008) Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation. *Lab Invest* **88**(11): 1143–1156
- Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M, Sharma A, Kanamaru E, Borisenko V, Desilva DM, Suzuki A, Wang X, Shawber CJ, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Kitajewski J (2008) A Notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *Cancer Res* **68**: 4727–4735
- Glahan D, Callahan R (1997) The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* **14**: 1883–1890
- Gupta SK, Vlahakis NE (2009) Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. *J Cell Sci* **122**(12): 2043–2054
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-Cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* **148**(4): 779–790
- Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K (2004) Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* **1014**: 155–163
- Krop IE, Kosh M, Fearon I, Savoie J, Dallob A, Matthews C, Stone J, Winer E, Freedman SJ, Lorusso P (2006) Phase I pharmacokinetic (PK), and pharmacodynamic (PD) trial of the novel oral Notch inhibitor MK-0752 in patients (pts) with advanced breast cancer (BC) and other solid tumors. *J Clin Oncol*. ASCO Annual meeting Proceedings **24**(18S): abstract 10574
- Li K, He W, Lin N, Wang X, Fan QX (2009) N-Cadherin knock-down decreases invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma in vitro. *World J Gastroenterol* **15**(6): 697–704
- Liu ZJ, Xiao M, Balint K, Smalley KS, Brafford P, Qiu R, Pinnix CC, Li X, Herlyn M (2006) Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res* **66**(8): 4182–4190
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* **25**(4): 402–408
- Luo D, Renault VM, Rando TA (2005) The regulation of notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 612–622
- Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Rüegg C (2007) N-Cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **16**(4): 451–465
- Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L (2003) Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **22**: 6598–6608
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999) N-Cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* **147**(3): 631–644
- Oommen S, Gupta SK, Vlahakis NE (2011) Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin alpha9beta1: identification of a specific alpha9beta1 binding site. *J Biol Chem* **286**(2): 1083–1092
- Pang RT, Leung CO, Ye TM, Liu W, Chiu PC, Lam KK, Lee KF, Yeung WS (2010) MicroRNA-34a suppresses invasion through down-regulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* **31**(6): 1037–1044
- Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, Kurman RJ, Eberhart CG, IeM Shih, Wang TL (2006) Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res* **66**: 6312–6318
- Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH (2005) Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* **16**(9): 4386–4397
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**: 547–558
- Roma J, Masià A, Reventós J, Sánchez de Toledo J, Gallego S (2011) Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clin Cancer Res* **17**(3): 505–513
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J (2006) TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* **411**: 134–193
- Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH (1997) Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**(4): 351–364
- Schreiber TD, Steinl C, Essl M, Abele H, Geiger K, Müller CA, Aicher WK, Klein G (2009) The integrin alpha9beta1 on hematopoietic stem and progenitor cells: involvement in cell adhesion, proliferation and differentiation. *Haematologica* **94**(11): 1493–1501
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* **26**: 565–597
- Singh P, Chen C, Pal-Ghosh S, Stepp MA, Sheppard D, Van De Water L (2009) Loss of integrin alpha9beta1 results in defects in proliferation, causing poor re-epithelialization during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* **129**(1): 217–228
- Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ, Knudsen KA (1993) Rhabdomyosarcoma-derived cell lines exhibit aberrant expression of the cell-cell adhesion molecules N-CAM, N-Cadherin, and cadherin-associated proteins. *Exp Cell Res* **208**(1): 84–93
- Takada Y, Ye X, Simon S (2007) The integrins. *Genome Biol* **8**(5): 215
- Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, Komiya S (2009) Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. *Br J Cancer* **100**: 1957–1965
- Wang T, Holt CM, Xu C, Ridley C, P O Jones R, Baron M, Trump D (2007) Notch3 activation modulates cell growth behaviour and cross-talk to Wnt/TCF signaling pathway. *Cell Signal* **19**(12): 2458–2467
- Yan B, Raben N, Plotz PH (2002) Hes-1, a known transcriptional repressor, acts as a transcriptional activator for the human acid alpha-glucosidase gene in human fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* **291**(3): 582–587
- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP (2004) Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* **23**(5): 1155–1165
- Zayzafoon M, Abdulkadir SA, McDonald JM (2004) Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem* **279**(5): 3662–3670
- Zhang P, Yang Y, Nolo R, Zweidler-McKay PA, Hughes DP (2010) Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene* **29**(20): 2916–2926
- Zhang P, Yang Y, Zweidler-McKay PA, Hughes DP (2008) Critical role of notch signalling in osteosarcoma invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* **14**(10): 2962–2969

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License.

