



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**TESI DOCTORAL**

**ESTUDI DEL MECANISME D'INHIBICIÓ DE LA VIA WNT EN  
RABDOMIOSARCOMA:  
EL PAPER ONCOGÈNIC DE DICKKOPF-1**

**Irina Giralt Buch**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2019**



**Tesi doctoral**

**ESTUDI DEL MECANISME D'INHIBICIÓ DE LA VIA WNT EN  
RABDOMIOSARCOMA:**

**EL PAPER ONCOGÈNIC DE DICKKOPF-1**

Memòria presentada per

**Irina Giralt Buch**

Per optar al grau de

**Doctora en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina**

**Tutora:** Anna Maria Bassols Teixidó

**Directors:**

Dra. Soledad Gallego Melcón

Dr. Josep Roma Castanyer

**Doctoranda:** Irina Giralt Buch

**Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2019**



La cura no és suficient  
Giulio J. D' Angio



A tots els petits lluitadors





Als meus pares



# AGRAÏMENTS



Els anys de tesi han fet que creï molts llaços amb moltes persones increïbles, i per tant, són moltes les persones a les que he d'agrair l'ajuda, els moments viscuts o simplement els "bon dia" amb un somriure que animen a qualsevol.

Per començar he d'agrair al Dr. Josep Sánchez de Toledo, la Dra. Soledad Gallego i al Dr. Josep Roma per donar-me l'oportunitat de fer la tesi al grup d'oncologia pediàtrica i sobretot per l'ajuda i el suport que m'han donat aquests anys. Pepe, gràcies per donar-me l'oportunitat de viure aquesta experiència, gràcies per haver cregut i confiat en mi. Gràcies per la teva proximitat, per comptar sempre amb la gent del laboratori i per compartir amb nosaltres moments especials. Gràcies també per les trobades al Camp Nou, per compartir opinions tan mèdiques com futbolístiques, ha estat un plaer conèixer la magnífica persona que ets. Gracias Sole, por confiar en mí, por interesarte en todo lo que hacemos en el laboratorio y ayudarnos siempre, por darnos la vista clínica de los proyectos y así hacerlos más translacionales. Gracias por todo lo que me has enseñado estos años, ha sido un placer trabajar contigo. Gràcies Pep, per confiar en mi i per donar-me l'oportunitat de començar un projecte al laboratori. Gràcies per ensenyar-nos a espavilar, per tota l'ajuda i consells que m'has donat dia a dia. Gràcies també pels farts de riure als sopars de grup, ja he après que seient al teu costat la nit acaba més alegre!

Ana, mi Almazancyto! Gràcies, per ajudar-me tant amb la tesi, per tota la paciència que has tingut amb mi, gràcies per tot el que m'has ensenyat, tan a nivell professional com personal. Gràcies per tots els consells que m'has donat, els de millorar experiments/escriptura o el de: *Irina, al metro no et maregis eh!* Gràcies per tots els moments juntes, des dels cafès per desestressar-nos fins a les festes de l'Era (passant, evidentment, pels soparets al manubri o per acabar xopes anant al metro). Gràcies per confiar en mi, per haver-me acceptat al nucli dur, per les confessions al picknik de Vall d'Hebron, pels dies de compres boges online i pels dies de revisar els *backgrounds* de les fotos de l'Era. Gràcies per cada dilluns, per explicar-nos les bogeries fetes els caps de setmana, per fer-me al·lucinar i petar de riure. Gràcies per tots els *dichus* que m'has ensenyat, ha estat gratificant millorar el meu vocabulari gràcies a tu (des del vigatà al català antic). Gràcies per transmetre'm el teu positivisme, per valorar-me i animar-me a provar nous riscos, gràcies per transmetre'm la teva seguretat, mil gràcies per ser com ets. Gràcies perquè encara que estiguis a Vic sembla que estiguem juntes diàriament. Com diuen els Amics de les arts, vigila, que només d'entrar hi ha sempre el dinosaure, els ossos (óssos) d'un gegant, furiós desafiant entomant flaixos. I més al fons, per ordre cronològic, els dos neandertals encara esparverats mirant la *vaca*, no s'han mogut ni un pam. Gran cançó que recorda mil moments amb tu. Gràcies per ser una amiga.

Carla, gràcies. Gràcies per haver-me ensenyat les tècniques del lab de la manera més amena possible, gràcies per la teva naturalitat, per haver-me fet sentir una més del grup des de que vaig entrar per la porta. Gràcies pels assajos de proliferació, per ser la millor profe de conducció de Visions, per no enfadar-te ni que et tiréssim una p96 plena, per ser tu. Gràcies per confiar en mi, per ser la meva còmplice, per ajudar-me a minimitzar els problemes i ensenyar-me que si es solucionen amb diners no són problemes. Gràcies per ensenyar-me a improvisar, per canviar de plans a últim moment i fer bogeries.<sup>9</sup> Gràcies per tots aquests anys, per tots els moments i converses dins i fora del lab, gràcies per animar-me a seguir

amb tot el que m'he proposat i per animar-me sempre a afrontar les pors. Gràcies per creure en mi. Gràcies per acollir-me a la meva segona casa, gràcies pels caps de setmana a Vic, començar una nit amb tu és sempre una aventura. Gràcies per confiar en mi, gràcies per deixar-me la Flam i per les vacances juntes, realment el temps amb tu passa volant i t'omple d'energia. Gràcies a tu també Jaume, per haver-me acollit sovint al pis i haver-me fet desconnectar de tot. Com diu Txarango: *ja sé que ens trencarem, que ens caurà a terra el món, ja sé que plorarem i que podem perdre-ho tot. Per sempre no hi ha res i el tren del temps no frena. Tinc un desig només: que tot valgui la pena.* Haver-te conegut, haver compartit aquests anys, haver confiat en mi, haver-te fet amiga meva no té preu i val molt la pena.

Isaac, mil gràcies, per ser el tècnic més divertit, per ajudar-me sempre, per convertir-te en un gran amic. Gràcies per tots els moments que hem viscut al lab: des d'espantar-me quan tirava alguna cosa per la pica, deixar-te fer mil i un pentinats (amb aphanorffs si feia falta), convertir-te en un ninot de playmobil, el mític WE ARE SAD, o haver compost una cançó per mi. Gràcies per haver-me introduït al món de l'slakline i l'escalada, sempre és divertit provar coses noves amb tu, gràcies per cuidar-me durant aquests anys. Gràcies per acompanyar-me a fer bogeries transitòries com marxar a fer una ferrada a Broto (o fer la de Sant Feliu de nit), muntar la tribu dels *psicobos*, fer-te samarretes frikis o atrevir-te a venir a poblenou a veure Juego de tronos. Gràcies també per tot el vocabulari que m'has ensenyat i ara ja utilitzo com si res: epep! Disgustus! Tarde doc! No ho tindriem! Fem una birra tonta? El *buenobueno* encara no te l'he sentit massa. Gràcies sobretot per animar-me sempre a anar més enllà, a atrevir-me a tot, a fer-me veure que si jo m'ho proposo, ho acabo aconseguint. T'he trobat a faltar els últims mesos, m'hagués agradat poder compartir tot el camí amb tu, tot i això gràcies per pensar en mi des de Colòmbia i enviar-me la teva energia positiva (a vegades en forma de postal) i els teus ànims. Gràcies per atabalar-me i per voler berenar amb mi.

Gracias Patri! Por estar siempre a mi lado, gracias por estos años juntas. Gracias por ser mi compañera de aventuras, mi barrilete (o baulete). Gracias por todos tus consejos, por toda la ayuda, por tenderme una mano siempre que lo he necesitado. Gracias por tener paciencia conmigo, por entenderme y valorarme. Pero gracias sobre todo por ser mi amiga, estos años han sido mucho más fáciles contigo, gracias por las fiestas, por las locuras, por las historias que si te las cuentan, no te las crees, pero contigo pasan. Gracias por escucharme, dar-me ánimos y ayudar a que espabile para poder con todo. Gracias por todos los momentos divertidos en el lab, ya sea desde intoxicarnos con el etanol limpiando campanas, las mojitas, hacer mitones para las vías ferradas, ir a recoger plantitas o hacer algún fotomontaje de cualquier estupidez. Gracias por el "*que, que tal el finde?*" de cada lunes, las historias que venían después han sido cada vez mejores. Gracias por dejarte matar en el improshow, un momento que nunca olvidaré. Gracias por tu positivismo y por tu energía, he aprendido mucho de ti. Como dicen els Catarres: "*Per tu, jugo a daus amb el perill, ballo sobre lava per tu, aguantaré tota la nit sense dormir*". Muchos ánimos con la tesis, ya sabes que me tienes cerca para lo que necesites!

Natalia, gràcies, per tota la paciència que has tingut amb mi, per estar disposada a ajudar-me sempre que ho he necessitat, per fer-me petar de riure amb les teves

històries mil. Mai oblidaré el que a Sabadell significa Churruca, i vigilaré sempre si trencen coses perquè no em baixin el sou! Gràcies per les teves frases cèlebres com: *a veces me canso de tener tan mala suerte*. Gràcies per ser a part de companya del lab, ser amiga, per escoltar-me i donar-me ànims quan no podia amb tot, per aconseguir treure'm un somriure sempre, o fins i tot una riallada quan realment pensava que no ho faria. Gràcies per ser la millor companya d'SPF, per liar-te amb els valors de les potes, per les varies liades que hem passat allà dins. Gràcies per voler provar les teles amb mi, ha estat molt guai compartir amb tu aquesta afició, i ha estat també molt gratificant veure com superes les pors i cada dia vas una mica més amunt de la tela. Amb la tesi és el mateix, pas a pas fins que arribis a dalt de tot, allà dalt pot fer por quedar-s'hi, realment veure tot el que has aconseguit des de dalt és sorprenent. Però no dubtis, tirat a la piscina i demostra que pots amb tot i més, que pots amb tot el que et proposis. Ja saps que la tesi no és un camí fàcil, però la família que tenim a OP fa molt més tranquil el trajecte que suposa. Moltíssima sort en el final de la tesi, molts ànims guapa!

Gràcies també als estudiants de carrera i màster que han passat per OP. Gràcies Alba, per ser la única veterinària que ha tingut valor per entrar a OP. Encara que fossin pocs mesos va ser molt intens i divertit. Mesos plens de riures, innocència i festetes. Gràcies també per la teva frase mítica: *O una cosa o l'altra, però els extrems no!* Ha marcat un abans i un després a OP!

Gràcies a la meva estudiant preferida, Judit. Gràcies per haver triat OP i perquè els astres s'alineessin i estiguessis aquells mesos amb mi. Em vas ensenyar moltes coses encara que no t'ho semblés, em vas ajudar a fer un pas més cap al final de la tesi. Et desitjo el millor en l'etapa PhD, ja saps que em tens per tot el que necessitis.

Gracias Ana Belén (Anabel para los amigos) y Fernando, por ayudarme en todo durante los últimos meses. Gracias por ayudarme a mejorar mi castellano y hacerme reír cuando decía cualquier estupidez en Catañol. ¡Muchos ánimos en vuestras nuevas etapas!

Guillem, la nova incorporació d'OP, moltes gràcies per la teva entrada triomfal al grup amb *Volaré!* Ànims amb les sopetes de cèl·lules que faràs durant la tesi. Molta sort en l'etapa que acabes de començar!

Gràcies a OP2! Aquest temps no hauria estat igual sense vosaltres, fem un gran equip junts!

Miquel, Peaso Mikel, gràcies per estar disposat a ajudar-me sempre i per tots els teus consells durant aquests anys. Gràcies també per ensenyar-me la teva cara divertida, per fer-nos petar de riure amb els teus comentaris i amb el teu riure contagiós. Aquests anys al teu costat han estat molt divertits, gràcies per fer-me més amens i divertits els dies!

Aroa Aroa! Mil gràcies per estar al meu costat aquests anys. Gràcies per tota l'ajuda, suport i per ser un amiga, per poder confiar en tu. Gràcies per ser la millor companya de farres OP i pels teus comentaris, a vegades innocents a vegades directes. Gràcies per estar sempre disposada a tot, fins a arribar a posar-te un airbag de bicicletes. Ets un sol!



Gràcies Laieta, per ser com ets. Gràcies per fer-me petar de riure amb les teves magnífiques traduccions al castellà/italià, per les teves habilitats en imitació de sorolls, per ser la reina dels torpos i per ser una gran companya de vies ferrades! Gràcies per totes les converses, per escoltar-me i donar-me el teu punt de vista, per confiar en mi, gràcies per les nostres confessions. Gràcies també per totes les festes, bogeries, birres i vhirres, per l'esquiada, per ser una *psicoloba*, per les notes de veu a les tantes, per ser famosa, per les putivuelts a l'Era del sot, per ser la millor DJ (DJParís!!) i la pitjor GPS jajajajaja. Gràcies per fer-me el dia a dia millor, vals molt!

Luz! Una pena que no hayas estado en el final de mi tesis, aun así me ha encantado haber podido compartir unos años a tu lado. Gracias por tu locura, por tus comentarios, siempre los clavas y me haces reír tanto! Gracias por cada momento a tu lado, por entrar corriendo a cultivos para explicarnos el maravilloso chiste de ladrillito. Gracias por el bodrrio, nos llenó de ánimos y alegría a todos! Gracias por toda la ayuda que me has dado, por tener paciencia y explicarme las técnicas que yo desconocía. Gracias por los ánimos que me has dado en NY, eres la mejor!

Calores! Moltes gràcies per tot, ha estat un plaer compartir aquests anys amb tu. Vas arribar molt tranquil·let però m'ha encantat veure la teva vena fiestera (los chupitos de fuego), la teva vena de telenovela (como te atreviste a cachetearme!? O CASO CERRADO!), la teva vena de cantant (marmite! Viva el marmite!), la teva vena d'actor de teletienda (aaaaarhhhh!), la teva vena d'entrevistador (muestra A: un boquerón que es? Desarrolla! MUY BIEN!), la teva vena de meteoròleg (sensacionios), la teva vena mallorquina (ere un aparatu com un microbús) i sobretot la teva vena d'imitador de veus de personatges. Has fet més divertides les reunions de grup amb les teves liades (melamona), moltes gràcies per tots els moments junts. Els teus comentaris m'han animat moltíssim sempre, no canviïs mai! Molts ànims amb el que et proposis!

Marc, gràcies per animar-me els dies amb els teus comentaris, les teves catalanades (carrer Llephant) i les traduccions del reaggeton al català a cultius. Gràcies per ensenyar-me que les pipetes s'autoclaven i que la centrífuga pot estar *resfriada*. Gràcies també per enrecordar-te SEMPRE de les cagades de tothom, anava bé una dosi de recordatori d'alguna d'elles per animar el dia. Gràcies per tots els moments divertits que m'has fet passar aquests anys, realment han estat sempre necessaris. Ah! I gràcies pels *coulants*, no hagués pogut acabar la tesi sense l'energia que em van donar! Molts ànims amb la tesi!

Gràcies Ari per la teva tranquil·litat, és necessiten més persones com tu a OP o acabaran tots bojós! Ha estat un plaer compartir un màster i una tesi al teu costat. Gràcies per ensenyar-me a que a vegades cal perdre la vergonya per poder aconseguir el que una vol. Gràcies pels cogombres enormes que m'has regalat, amb aquests regals es feia més gratificant anar al lab. Molta sort amb la recta final guapa!!

Grazie Roby! Per essere la meglio insegnante d'Italiano, per essere la Regina e la topina di OP. Grazie per la tua lasagna, la tua pizza e la parmigiana, da sempre danno forza per mettere fine a ciò che proponi. Grazie per il viaggio a Roma, è un piacere viaggiare con la regina. Grazie per avermi fatto pisciare a dosso da ridere con le tue storie (cacca negli occhi, burkini, bucco nel pantalone...!). Perdonami per

il mio italiano, finora solo so parolacce, devo migliorare, quindi devi essere il mio insegnante per un altro anno di più! Grazie per venire a Barcellona, per avermi aiutato in tutto, per essere una amica. Ti voglio bene!

Núria, encara que només fossin uns mesos, el fet de compartir lab/despatx amb tu va fer que fóssim amigues. Gràcies per animar-me les tardes, per acollir-me com una més amb la teva colla d'escaladors professionals (gràcies a tu també Sergi, per posar a prova el meu equilibri en l'escalada), per ensenyar-me a ballar *pole dance* i per tots els moments viscuts aquest temps!! Jolis al carril, carril, carril carril! T'estimo guapa!

Gràcies també a l'equip de metges d'oncologia pediàtrica, en especial al Pablo, a l'Anna Llord i a la Raquel. Gràcies per venir a les reunions i donar-vos el punt de vista clínic, però sobretot gràcies per la feina que feu.

Gràcies també als veïns del lab, sobretot als del lab 209 que arriben d'hora per obrir-me la porta del 208. Gràcies Anna per formar part de la comissió de seguiment i ajudar-me a tirar endavant el projecte. Blanca, Júlia, Eli, Mireia, Núria, Carlos, Laura, Irene, Lucia i Christian, gràcies pels somriures i els "Bon dia!" amb energia diaris, per les converses pel passadís i per ser els millors veïns! Gràcies Alfonso per compartir els "cotilleos" amb mi, per fer-me riure i per ser el meu fotògraf personal quan faig cafès d'amagat. Gràcies Tati per haver triat el mateix màster que jo i haver-me avisat que havia escollit un gran grup per fer les pràctiques. Gràcies també per les estones al despatx comentant qualsevol tonteria, i sobretot gràcies per fer més amena la tesi acompanyant-me a escalar i ajudant-me a arribar mica a mica més amunt! Gràcies Gabri per haver seguit cuidant de mi després de la carrera, va ser una sort trobar-te al VHIR. Les estones de "xafardeo" i de desfogar-se quan algun experiment no sortia eren les millors, aquest últim any t'he trobat una mica a faltar, sort que ens hem anat posant al dia al 2D2!

Gràcies a la família de cultius, primer a la Elena, Laura, Koen i Jorge. Cada vegada que entrava i hi éreu algun de vosaltres era un show diferent. Gracias Koen por los juegos de sillas, y las conversaciones aleatorias en cultivos! Gràcies Laura per esperar que hi fos jo i defensar la tesi, la primera que vaig veure, un gran moment! Gràcies també per tots els moments que han vingut després, ensenyar-me la cata de vins del born i el soparet a la teva illa, ets un encant! Gracias Elena, por todas las VHIRRES y cenas organizadas, las tesis sin ti no valen la pena, has ayudado mucho a la felicidad de los becarios (y sobretodo la mía) durante estos años!

Gràcies Maria, per aparèixer a cultius sempre que et necessitava. Ha estat un plaer compartir la sala amb tu, gràcies per les converses que hem tingut, per escoltar-me quan en cagava en tot i per animar-me en la recta final. Gràcies també per ser una gran companya d'escalada, espero seguir-te veient ja sigui pujant muntanyes com escalant! Ànims amb la teva recta final!

Gracias Elena, mi canaria favorita! Por hacerme reír cada vez que pasaba por delante de tu lab, por tus piropos sobre mis piernas, por ser la alegría del pasillo. Gracias Maria José por tus ánimos, por las conversaciones en el pasillo durante el fin de semana, por entenderme.

Eulàlia i Rosa, gràcies per la vostra paciència amb tots nosaltres, per l'ajuda i el suport durant aquest temps. Gràcies Núria, per animar-me els matins amb els teus bon dia, ets un sol! Gràcies Pili, Rai, Paco i Andrés pels vostres bons dies i bona tarda diaris, per tenir sempre un somriure per mi, per animar-me els dies al VHIR, per totes les converses i riures que hem tingut a la recepció, gràcies per fer-me somriure els dies que no tenia forces, però sobretot per avisar-me sempre que hi havia un paquet NO-LABORAL per qualsevol del lab. Sou el millor de Collserola!

Gràcies també a la gent del Mediterrània. Gràcies Edu, per haver-te apuntat a anglès amb mi i fer així els dies més animats! Gràcies per la *seal skin*, i el *horn of ale*, han estat imprescindibles per la meva tesi!! Gràcies Romero i Damir, per totes les VHIRRES i sopars al vostre costat, un plaer haver compartit aquests anys amb vosaltres!

Gràcies Jordi Barquinero, per la confiança que has dipositat en mi, per fer més amens els dies d'ELISPOT i pels ànims que m'has donat per acabar la tesi. M'ha encantat haver compartit una part d'aquests anys amb tu, ets un "jefe" d'admirar!

Gràcies als membres de la UAT. Gràcies Irene per fer més amenes les hores al citòmetre, i per fer-me entendre una petita part de l'ampli món que suposa la citometria. Gràcies Marta per les hores al confocal, per les converses que hem tingut, per tota l'ajuda que m'has donat i per oferir-me un mocador o una bata quan gairebé estàvem congelades! Gràcies Norber per ajudar-me amb el sorting, per les converses i riures als temps morts, una llàstima haver-te conegut al final de la tesi.

I no em puc deixar a la més important del Mediterrània, GRÀCIES MERI! No m'hagués imaginat que trobaria algú com tu en aquesta etapa. Gràcies pels viatges en MeriFurgo o en Sagalés cap a Vic, per totes les converses, riures i soparets que hem compartit. Ha estat realment un plaer tenir algú com tu a prop durant aquest temps, m'has fet riure quan més ho he necessitat, gràcies per la teva xispa! Gràcies Xevi, per tatuar-te orenetes, per tenir sempre un comentari divertit a la boca, i per discutir amb mi els fitxatges del Barça, espero que t'adonis aviat que ens hem de vendre el Messi! Gràcies als dos per fer-me sentir una Vigatana més i per haver-me regalat la Índia!

Gràcies també al Diego Arango i al Jose Ramon Bayascas per formar part de la meva comissió de seguiment. Gràcies per fer-me passar els nervis parlant sobre qui tenia més comissions per avaluar aquell Juliol, però sobretot gràcies per tota l'ajuda que m'heu proporcionat i els consells que m'heu donat.

A part de les magnífiques persones amb les que he compartit el dia a dia, he d'agrair també a la meva família i amics tot el suport que m'han donat.

He d'agrair a AFANOC, sobretot a la Irene, per deixar-me formar part d'aquest món, per fer-me els dilluns millors! Gràcies també al grup de dilluns tarda (Núria, Carmen, Àlex, Pilar i Raquel) per preocupar-se per la feina que estava fent, heu estat una gran companyia en aquesta etapa i si seguim coincidint, en la pròxima també, fem un gran equip!

Gràcies a les meves nenes. Les més boniques, les que hi són sempre i des de sempre. Gràcies Laia, per ser la meva consciència, per donar-me sempre l'opinió

més sensata, per tots els ànims que m'has donat, per tot l'interès que has mostrat, per escoltar-me quan t'explicava que era un *Western blot* (apa que no et va anar bé pel MIR però!!). Gràcies pels concerts juntes, pels mesos que hem compartit al pis juntes i les tonteries que hem arribat a fer i dir. Gràcies per les nits de sèries o pelis de por, gràcies per fer-me riure Sípia! Gràcies per ser una gran amiga. Gràcies per l'últim concert juntes, com diuen ells: *La vida no es lo que yo diga, pero confía en mí. La vida no es lo que te pida, así que sé feliz! Quiere bien y acertarás con todo lo demás. Llegó, por fin, la tempestad.*

Amanda, Boo, gràcies, mil gràcies, per haver-me aguantat des de sempre, per ser la millor amiga des dels 3 anys i fins ara. Gràcies per tots aquests anys, però sobretot gràcies per tot el suport que m'has donat aquests anys, per animar-me a no tirar la tovallola, per ensenyar-me a fer valenta i forta, per ajudar-me a afrontar les pors que he tingut, per ser com una germana. Gràcies pels CDs que m'has fet pel Polito, m'animaven els trajectes i era com si anés amb tu. Gràcies per acollir-me a Eivissa, venir-te a veure sempre m'ha ajudat a seguir endavant i a donar-me la tranquil·litat que necessitava (gràcies a tu també Ramon, per deixar que vingués a emprenyar-vos uns dies). I recorda: *si fueras solo la mitad, me sobraria otra mitad, cuesta creer que eres de verdad. Yo te quiero para toooda la vida!*

Gràcies Andrea, per ser un gran suport al final de la tesi, pels dies de platja improvisats, per les hores xerrant preguntant-nos el perquè de tot, per les festes al teu costat, sempre és més divertit quan fem les bogeries juntes. Gràcies per ser sempre la companya dels plans bojos improvisats.

Gràcies a les bioquímiques sexys, gràcies per haver-me aguantat durant la carrera i aquests anys de tesi. Gràcies Olga, l'any que vam viure juntes va ser un dels millors de la meua vida. He trobat a faltar tenir-te a prop durant la tesi, sort que has vingut de visita, gràcies per ser-hi sempre a les bogeries màximes com és pujar als búnkers amb el peu enguixat, que faria sense tu?!! Et vuic molt guapa!! Gràcies Shaki, pels ànims que m'has donat durant aquest temps, per ser-hi sempre amb un somriure i transmetre'm la teua tranquil·litat. Gràcies per les paneres d'hummus que m'has donat, ha ajudat molt a la felicitat del laboratori i als ànims per seguir. Gràcies pels viatges express, pels lios amb els cotxes de lloguer, per les festes boges i tots els moments que hem compartit aquest temps, han estat experiències necessàries sempre! Gracias Nico, por ser un atrevido y hacerme reír con las historietas de "Aurora en casa". Gràcies Laura, per ser la que més entén el que significa fer una tesi, per les birres espontànies quan no podia més, pels teus consells, i sobretot pels ànims que m'has donat per seguir i acabar. Gràcies per haver-nos convidat a Amsterdam, va ser un viatge que em va omplir d'energia per encarar la recta final. Molts ànims per tu ara, tu pots amb tot i més. Gràcies a tu també Ruben, pels ànims, pels cotilleos CRG-VHIR, i per tenir sempre un somriure preparat, ets un sol!

Gràcies Josep, per l'any que vàrem viure junts, sense dubte has estat un company de pis excel·lent. Gràcies per escoltar les meves batalletes cada nit, per animar-me a aprofitar cada oportunitat que se'm presentés. Gràcies per cuidar-me, animar-me i preparar-me sorpreses quan em vaig trencar el peu. Gràcies per fer el ruc amb mi mentre cuinàvem o ens rentàvem les dents, van ser uns mesos genials al teu costat!

Gràcies als amics del poble, aquests anys sense vosaltres no haurien estat el mateix. Gràcies Jordi i Tere, per haver-me portat mil diumenges fins a Barcelona, gràcies per interessar-vos pel que feia i per fer-me sempre desconnectar del laboratori. Gràcies David i Glòria, per animar-me i fer-me riure aquests anys. Gràcies Inés, per les mil converses anant cap a la city, per preguntar-me i entendre el que significava fer i escriure una tesi, per ensenyar-me que és ser forta i poder amb tot, gràcies per tot, t'admiro molt. En especial vull agrair la tesi al Xavier, gràcies per haver-me demanat sempre què feia i entendre-ho, per advertir-me que no era fàcil però que jo podria. Gràcies per posar-me al dia de les últimes tecnologies en la ciència, tot el que m'explicaves era sempre interessant. Llàstima que no hagi pogut ser-hi al final, sé que estàs orgullós de mi. L'únic doctor que havia conegut des de petita, el doctor que més he admirat a nivell personal i professional; mai pensava que arribaria a ser com tu. Gràcies per tot el que m'has ensenyat Xavier.

Gràcies Pol, Miki i Carlota, per tots els ànims que m'heu donat, per fer-me riure, per fer millors les setmanes que ens veiem. Gràcies Miki per confiar en mi, per escoltar-me i aconsellar-me. Gràcies per les abraçades que em fas sempre que ens veiem, m'omplen d'energia. Pol, mil gràcies, per ser-hi sempre, per fer-me desconnectar veient el Barça al bar o animar-me amb les teves històries sobre patins. Carlota, gràcies, per tot el suport, consells, ajuda i ànims que m'has donat aquests anys. Gràcies per ensenyar-me a ser valenta al teu costat i fer i acabar el camí que suposa la tesi, gràcies per acollir-me a Suècia, les estones al teu costat valen or. Gràcies per ser la germana petita, la que sempre m'anima a fer més tonteries, la que sempre es preocupa per mi, la que sempre es recorda de mi allà on sigui i la que sempre dóna els millors consells. Molts ànims amb la teva tesi, ja saps que em tens al teu costat pel que sigui.

Gràcies Rub i Joan per aguantar-me aquests anys. Gràcies per les tardes a la plaça del sol, gràcies per haver-vos interessat en el que feia al lab i haver entès així que un Western no és una pel·lícula de l'Oest o que els mol·luscs també poden treballar en un institut de recerca.

Gràcies també als amics del màster que m'han seguit aguantant aquest temps. Gràcies Judith, per haver-te quedat a Barcelona, per escoltar-me i per transmetre'm la felicitat que desprens, et vuic molt guapa! Gràcies Anna, pels dies de bàsquet, els berenars a horta i les birres a Vall Hebrón. Ah! I gràcies pels plans improvisats, sempre són els millors! Gracias Henry por pasarte al VHIO a hacer el posdoc, me ha encantado verte más a menudo y salir a comer juntos. Gracias por los animos que me has dado, eres todo un ejemplo a seguir!

Gràcies Gemma, per ser com ets, per haver fet l'últim any de la meva tesi curt! Gràcies per haver-me ensenyat el món del circ, per ser una gran professora de teles, trapezi i corda, però sobretot gràcies per fer-me oblidar la tesi els dimecres, per fer-me riure mentre ens penjàvem i per les birres de després! M'ha encantat haver seguit compartint moments juntes després del màster! Aprofito també per donar gràcies a la Yoli, per fer-me els dimecres divertits i per treure'm la por de tirar-me al buit! Gràcies a tu també Anna, sempre seràs la millor profe de fer el sonso i una gran col·laboradora del grup d'onco pediàtrica (m'ha encantat enviar-te notetes dins dels paquets)!

Gracias Robert, por haber aparecido en el inicio de esta etapa. Gracias por haber estado en la India justo cuando iba yo y empezar así una gran amistad. Gracias por haber seguido a mi lado estos 4 años, gracias por las idas y venidas BCN-Palma han sido de gran ayuda para seguir adelante.

Gràcies Marc, per atrevir-te a fer una birra amb 3 boges desconegudes quan et piquen a casa. Gràcies per fer-me oblidar la tesi quan estic al teu costat, per ser, a part d'amic, un magnífic professor d'escalada. Gràcies per animar-me a provar sempre vies noves, per confiar en mi i fer-me veure que si jo ho vull, puc ser gran (no tant com tu, evidentment jajajaja). Gràcies també per fer-me riure amb les teves històries i els teus registres musicals, gràcies per ser com ets, per estar tant fort i ser tant delicat a la vegada. Gràcies per l'energia que desprens. Gràcies per animar-me aquests últims mesos, has estat un gran suport cada dijous al Sharma. Gràcies per recordar-te del nom del gen clau de la tesi, m'ha encantat que t'interessessis pel que feia i que m'animessis a tirar endavant.

Finalment gràcies a la família, per tots els ànims que m'heu donat, per ser-hi en els moments més difícils, i aconseguir sempre que tornés a somriure i a tenir forces per tot i més.

Gràcies Josep Maria, per ser el millor padrinet, la xocolata de la mona ha estat indispensable per fer-me més feliç aquests anys. Gràcies també per deixar-me venir amb tu al camp (i pel frankfurt de després també!) i veure que si ells poden aconseguir una remuntada aparentment impossible, jo també puc amb la tesi. Gràcies a tu també Elisenda.

Gràcies Josep, per ser el tiet més guai de tots, el que confia en mi i em porta a fer vies ferrades, per ensenyar-me a no tenir por de res i a trepitjar fort, per animar-me a fer tot el que em proposi i ensenyar-me a que si jo ho vull, no tinc límits. Gràcies Mercè, per enrecordar-te de mi sempre, pels sopars increïbles que has fet (no únicament les cloïsses, també els musclos, el llamàntol i sobretot l'arròs negre), pel viatge en veler, va ser magnífic i em va donar els ànims necessaris per acabar la tesi. Gràcies per ser la meva segona mare, per preocupar-te sempre per mi i donar-me la teva opinió i ànims sempre que els he necessitat. Gràcies als dos per tots els viatges que hem fet aquest temps, pels sopars improvisats, pels cubatilles els caps de setmana, per treure'm de casa quan em vaig trencar el peu, però sobretot per contar amb mi sempre. Agraïxo molt que sempre penseu en mi, ja sigui per saber com estic com per planejar viatges, sou genials!

Gràcies als cosins bojos de la família Giralt, Marta, Marina i Marc. Gràcies Marta, per ser a part de cosina, veïna, amiga i còmplice durant aquests anys. Gràcies per tots els moments que hem tingut a Lazareto, gràcies pels sopars organitzats, per les nits de Juego de tronos, pels vermuts a qualsevol hora i per les hores de conversa explicant-nos la vida, per presentar-me als teus amics bojos del gimnàs, i per les visites express al pis per ensenyar-me modelitos nous. Aquests petits moments són els que em feien adonar de la gran etapa que estava passant. Gràcies Marina, per venir a poblenou de visita sovint, amb mil històries divertides per explicar, t'he trobat a faltar com a veïna. Gràcies per fer-me riure tant, gràcies per interessar-te per la tesi, Vall d'Hebron sempre ens ha unit. Gràcies també al Xavi Bolton, per fer-me petar de riure sempre que et tinc al costat. Gràcies Marc, per ser el millor veí de sota (encara que t'hagi incordiat amb els esternuts cada matí

durant aquests anys). Gràcies per escoltar-me sempre, per tenir sempre una estona per mi, per tots els viatges que hem fet, són els que reconforten per seguir endavant, gràcies per confiar en mi. Gràcies també per fer-me forta cada dia, per ensenyar-me que si aprenc a riure'm de mi, tot pot ser molt més divertit. T'admiro molt. Gràcies també al Víctor, per ser el millor guia turístic als viatges i dj del trajecte Can Pona-BCN. Gràcies per animar-me aquests quatre anys, us estimo moltíssim cosinets!

Als avis paterns, Esteve i Maria Teresa, allà on sigueu sé que esteu orgullosos de mi, m'hagués agradat compartir aquests 4 anys a poblenou amb vosaltres. A tu també Maite, quan no he tingut prou forces per tirar endavant he pensat en vosaltres i sovint heu estat el motor que m'ha fet seguir. Gràcies.

Gràcies tieta Mar i tiet Vicenç, per fer divertits els diumenges, pel viatge a Cantabria i pels ànims que m'heu donat aquests anys. Gràcies tieta Marina alias tieta "Croa" per acompanyar-me els diumenges en tren fins a Barcelona, i per ser la tieta divertida i boja que sempre he admirat. Gràcies a tu també tiet Oriol.

Gràcies cosinets, Nina, Vlad i Afri! Gràcies per fer-me oblidar de la tesi quan estava amb vosaltres, gràcies pels Nadals bojos amb vosaltres! Gràcies Vlad per les abraçades fortes que em fas, són les que m'han animat a seguir. Gràcies Nina per ser la meva còmplice, per estar amb mi cada diumenge i aguantar-me encara que fes mala cara o estigués agoviada. Gràcies també per transmetre'm la teva tranquil·litat quan l'he necessitat i per fer el boig amb mi quan ha tocat. Gràcies Afri, encara que t'he tingut lluny, m'has animat moltíssim amb les visites que ens has anat fent i les que t'he fet. Gràcies també als més petits de la família, Leire i Eneko, "Peko" per la família, per dibuixar-me un somriure cada vegada que us veia o us sentia, i per fer-me treure el nen petit que duc a dins. Us estimo moltíssim!!!

Als avis materns, Valentí i Montserrat, gràcies per fer-me oblidar els mals moments cada diumenge. Per animar-me cada dia del que ha durat la tesi quan us trucava i em deïeu que tot estava bé, que havíeu vist un metge de vall d'Hebron a la tele (i evidentment si el coneixia) i que a veure quan venia a veure-us. Gràcies per fer-me costat aquests anys, i encara que possiblement no entengueu res del que faig, gràcies per demanar-me sempre com m'anava al laboratori. Gràcies per estar orgullosos de mi i dir-ho als quatre vents, m'heu fet més forta.

Enano, gràcies. Gràcies per haver-me fet desconnectar de tot quan estic amb tu, gràcies per animar-me sempre, per fer els problemes més petits quan et tinc al costat. Gràcies per les visites al pis, gràcies per les festes, gràcies per les confessions, gràcies per escoltar-me, per demanar-me consell i valorar-lo, gràcies per ser el millor germà. Gràcies per fer-me riure, per tocar la guitarra i així treure'm un somriure sempre. Gràcies per totes les tonteries que hem arribat a fer junts, i per totes les que ens queden. T'estimo un munt Richard!

Papas, gràcies, per tot. Mama, gràcies, per ser el meu suport incondicional, per animar-me sempre, per no deixar que caigui i toqui fons mai, gràcies per escoltar-me i gràcies per ajudar-me sempre. Papa, gràcies per ser-hi sempre, per voler compartir cada moment amb mi, per ajudar-me amb cada dificultat que he tingut. Gràcies perquè encara que a vegades hagi pres decisions en que no estaves d'acord, m'has ajudat i t'has preocupat perquè tot vagi sempre bé. Gràcies als dos

## AGRAÏMENTS

per valorar-me, per fer-me més forta, per haver confiat en mi cegament, per haver-me animat a acabar tot el que m'he proposat sobretot quan he perdut la força per seguir. Gràcies per ser el meu exemple, per haver-me ensenyat que tot i que el camí que suposa la vida no és fàcil, cal seguir endavant, afrontar les pors i trepitjar fort per aconseguir tot allò que em proposi. Gràcies per fer-me valenta. Gràcies per tot el que m'heu donat, gràcies per estar orgullosos de mi, jo també ho estic molt de vosaltres. Us estimo molt, aquesta tesi és per vosaltres.

Gràcies també a tots els que no anomeno però m'heu ajudat, aconsellat o simplement m'heu arrencat un somriure.





# RESUM



El rabdomiosarcoma (RMS) és el sarcoma de teixits tous més comú en nens i adolescents, representant aproximadament un 5% dels càncers pediàtrics. Histològicament, el RMS es classifica en dos subtipus principals, l'alveolar (RMSa) i l'embrionari (RMSe), els quals difereixen en presentació clínica, resposta a tractament i pronòstic. El RMSa presenta pitjor pronòstic i es caracteritza per la presència de translocacions específiques, mentre que el RMSe no presenta translocacions característiques i té un millor pronòstic.

La via de senyalització Wnt està involucrada en múltiples processos del desenvolupament embrionari i la seva desregulació està relacionada amb diversos tipus de càncer. A diferència de la majoria de tumors, la via Wnt està inhibida en RMS i té un paper supressor-tumoral, presentant un paper clau en el procés de diferenciació cel·lular. Tot i això, el mecanisme pel qual la via Wnt es troba inactiva en RMS segueix essent, en gran mesura, desconegut. En aquesta tesi s'estudia la causa de la inactivació de la via Wnt i la seva implicació en l'oncogènesi del RMS. Concretament, es posiciona Dickkopf-1 (DKK-1) com un dels inhibidors claus de la inhibició de la via Wnt en RMS. Per primer cop, es determinen els efectes de la inhibició de DKK-1 en la inhibició de proliferació cel·lular i en la inducció de la diferenciació miogènica en RMS. Addicionalment, resultats preliminars suggereixen una possible implicació de DKK-1 en l'establiment de metàstasis. S'ha analitzat la participació de DKK-1 en l'oncogènesi del RMS mitjançant la seva inhibició genètica i la inhibició farmacològica utilitzant l'inhibidor comercial WAY-262611. De manera interessant, en aquest treball es descriu la correlació entre l'expressió de DKK-1 i el pitjor pronòstic dels pacients amb RMS.

En resum, aquesta tesi descriu el paper oncogènic de DKK-1 en RMS, posicionant-lo com una possible diana terapèutica per al desenvolupament de noves alternatives terapèutiques en aquesta malaltia.



# ÍNDEX



## ÍNDEX

<b>ABREVIATURES</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>21</b>
1. Càncer infantil	23
1.1. Sarcomes	26
1.1.1. Rabdomiosarcoma	28
1.1.1.1. Epidemiologia	28
1.1.1.2. Presentació clínica	29
1.1.1.3. Diagnòstic	31
1.1.1.4. Factors de risc	31
1.1.1.5. Histopatologia i alteracions genètiques	32
1.1.1.6. Etiologia i evolució molecular	37
1.1.1.7. Factors pronòstic i estadiatge	39
1.1.1.8. Tractament	41
2. Via de senyalització Wnt	43
2.1. Història de la via Wnt	43
2.2. Via de senyalització Wnt canònica	44
2.2.1. Lligands Wnt	44
2.2.2. Receptors de la via Wnt	45
2.2.3. $\beta$ -catenina	45
2.2.4. Factors de transcripció	46
2.2.5. Antagonistes i agonistes de la via Wnt	47
2.2.6. Senyalització canònica	52
2.3. Via de senyalització Wnt no canònica	54
2.4. El paper de la via de senyalització Wnt en el desenvolupament del múscul	57
2.5. El paper de la via de senyalització Wnt en càncer	58
2.5.1. El paper de la via de senyalització Wnt canònica en càncer	59
2.5.1.1. El paper dels inhibidors de la via de senyalització Wnt en càncer	60
2.5.2. El paper de la via de senyalització Wnt no canònica en càncer	62
2.6. El paper de la via de senyalització Wnt en RMS	63



2.7. Activadors de la via Wnt	65
2.7.1. Activadors de la via Wnt aplicats en assaigs clínics	67
<b>II. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>69</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>73</b>
1. Mostres tumorals	75
2. Cultius cel·lulars	75
2.1. Línies cel·lulars	75
2.2. Subcultiu cel·lular	76
2.3. Comptatge cel·lular	76
2.4. Criopreservació i descongelació	77
3. Tractament farmacològic amb un inhibidor de DKK-1	78
4. Plasmidis, transfecció, producció lentiviral i infecció	78
4.1. Plasmidis	79
4.2. Transfecció i producció lentiviral	80
4.3. Infecció	81
5. Anàlisi de l'expressió gènica	81
5.1. Extracció d'ARN	81
5.2. Retrotranscripció	82
5.3. PCR convencional	82
5.4. Seqüenciació	83
5.5. Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa	84
5.6. Base de dades	85
6. Extracció i detecció de proteïnes	86
6.1. Extracció de proteïnes	86
6.2. Fraccionament cel·lular	86
6.3. Quantificació de proteïnes	87
6.4. Preparació de mostres	88
6.5. SDS-PAGE	88
6.6. Western blot	89
7. Assaig luciferasa	91

8. Assajos de proliferació cel·lular	94
9. Immunocitoquímica	94
10. Assaig d'invasió Transwell	96
11. Assaig de clonogenicitat	97
12. Citometria de flux	97
12.1. Assaig de cicle cel·lular	98
12.2. Separació cel·lular	98
13. Model animal	99
13.1. Model ortotòpic: injecció de cèl·lules amb infra-expressió de <i>DKK-1</i>	99
13.2. Model ortotòpic: tractament amb WAY-262611	100
13.3. Model d'implantació de metàstasis: injecció de cèl·lules amb infra-expressió de <i>DKK-1</i>	100
13.4. Model d'implantació de metàstasis: tractament amb WAY-262611	101
14. Anàlisi estadístic	102
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>103</b>
1. <i>DKK-1</i> és l'inhibidor de la via Wnt més expressat en línies cel·lulars i tumors de RMS	105
1.1. Expressió dels inhibidors de la via Wnt en línies cel·lulars de RMS	105
1.1.1. Expressió de <i>DKK-1</i> en línies cel·lulars de RMS	108
1.2. Expressió dels inhibidors en tumors de RMS	108
1.2.1. Expressió de <i>DKK-1</i> en tumors de RMS i la seva possible implicació clínica	110
2. La presència de <i>DKK-1</i> correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en RMS	115
2.1. L'expressió de <i>DKK-1</i> correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en tumors de RMS	115
2.2. La infra-expressió de <i>DKK-1</i> en línies cel·lulars de RMS promou l'activació de la via Wnt	116
3. L'activació de la via Wnt causa la reducció del creixement cel·lular <i>in vitro</i>	120
4. La infra-regulació de <i>DKK-1</i> causa l'augment de l'expressió dels gens implicats en la diferenciació miogènica <i>in vitro</i>	122

5. Anàlisi de la depleció de <i>DKK-1</i> en la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS <i>in vitro</i>	128
6. La depleció de <i>DKK-1</i> causa la reducció de la capacitat clonogènica de les cèl·lules de RMS <i>in vitro</i>	129
7. La depleció de <i>DKK-1</i> no té efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID	130
8. Anàlisi dels efectes de la infra-regulació de <i>DKK-1</i> en la capacitat d'implantació de metàstasis de les cèl·lules de RMS en ratolins Nude	131
9. El tractament amb l'inhibidor farmacològic de <i>DKK-1</i> , WAY-262611, redueix el creixement cel·lular i augmenta la diferenciació de cèl·lules de RMS	132
9.1. El tractament amb WAY-262611 causa l'activació de la via Wnt <i>in vitro</i>	132
9.2. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció del creixement cel·lular <i>in vitro</i>	135
9.3. El tractament amb WAY-262611 augmenta l'expressió dels gens de diferenciació miogènica <i>in vitro</i>	136
9.4. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció de la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS <i>in vitro</i>	140
9.5. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció de la capacitat clonogènica de les cèl·lules de RMS <i>in vitro</i>	141
9.6. El tractament amb WAY-262611 no té efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID	142
9.7. Anàlisi del tractament amb WAY-262611 en la capacitat d'implantació de metàstasis de les cèl·lules de RMS en ratolins Nude	143
<b>V. DISCUSSIÓ</b>	<b>145</b>
1. <i>DKK-1</i> és l'inhibidor més expressat en línies cel·lulars i tumors de RMS	147
2. La presència de <i>DKK-1</i> correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en RMS	149
3. El paper de <i>DKK-1</i> en el creixement de les cèl·lules de RMS	151
4. El paper de <i>DKK-1</i> en la diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS	156
5. El paper de <i>DKK-1</i> en la capacitat invasiva i clonogènica de les cèl·lules de RMS	158
6. <i>DKK-1</i> i supervivència en RMS: implicacions terapèutiques	160

<b>VI. CONCLUSIONS</b>	<b>163</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>167</b>
<b>VIII. ANNEXOS</b>	<b>217</b>
ANNEX 1. Autenticació de línies cel·lulars	219
ANNEX 2. Publicacions	225



# ABREVIATURES



°C	Grau centígrad
µg	Microgram
µL	Microlitre
µm	Micròmetre
µM	Micromolar
ACTD	Actinomicina D
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADR	Adriamicina
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
Amp	Ampicil·lina
AMP	Monofosfat d'adenosina
APC	Adenomatous polyposis coli
APCDD1	Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
ARN	Àcid ribonucleic
ARNi	ARN d'interferència
ARNm	ARN missatger
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosinatrifosfat
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Base pair
BUB1B	Mitotic checkpoint serine/threonine kinase BUB1 beta
BCOR	BCL6 corepressor
BSA	Bovine Serum Albumin
CaMK2	Proteïna-cinasa II calci/calmodulina-dependent
CCND1	Ciclina D1



cDNA	Complementary DNA
CFM	Ciclofosfamida
CK1 $\alpha$	Casein kinase 1 $\alpha$
cm	Centímetre
CRD	Cysteine-rich domain
Ct	Threshold cycle
CTCF	Corrected total cell fluorescence
CTNNB1	$\beta$ -catenina
CTP	Trifosfat de citidina
DAAM1	Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimetil sulfòxid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphates
ddNTP	Didesoxinucleòtids
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
Dsh	Dishevelled
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum

FBXW7	F-Box and WD repeat domain containing 7
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FKHR	Forkhead
FOXO1	Forkhead box protein O1
FSC	Forward scatter
Fz	Frizzled receptor
g	Gram
GFP	Green fluorescent protein
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase-3 beta
GTP	Trifosfat de guanosina
h	Hora
HAT	Histone acetyltransferase
HB	Hepatoblastoma
HD	Homodomain
HDAC	Histone deacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Hh	Hedgehog
HMG	High mobility group
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	Horseradish peroxidase
ICCC-3	International Classification of Childhood Cancer third edition
ICR	International Classification of Rhabdomyosarcoma
ICQ	Immunocitoquímica
IFO	Ifosfamida
Ig	Immunoglobulina

IGEPAL	Octylphenoxyethoxyethanol
IGF	Insulin-like growth factor
IGFII	Insulin-like growth factor II
IGFBP	Insulin-like growth factor binding proteins
INO80D	INO80 complex subunit D
Int-1	Integration 1
IP	Iodur de propidi
IRES	Internal ribosomal entry site
IRS	Intergroup Rhabdomyosarcoma Study
JNK	c-Jun N-terminal kinases
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
kg	Kilogram
Kny	Glypican 4/6 homolog Knypek
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDL	Low-density lipoprotein
LEF	Lymphoid-enhancing factor
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting
LRP	LDL Receptor-related Proteins 5/6
LTR	Long terminal repeat
M	Molar
mA	MiliAmper
MB	Medulloblastoma
MEM	Minimum essential medium

MESD	Mesoderm development LRP chaperone
mg	Mil·ligram
min	Minut
mL	Mil·lilitre
mm	Mil·límetre
mM	Milimolar
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MRFs	Myogenic regulators factors
MSC	Mesenchymal stem cell
MYCN	N-myc proto-oncogene protein
Myf5	Myogenic factor 5
MYOD	Myoblast determination protein
NCOA1	Nuclear receptor coactivator 1
NF1	Neurofibromin 1
ng	Nanogram
NK	Natural killer
nM	Nanomolar
nm	Nanòmetre
OMS	Organització Mundial de la Salut
p	p-valor
pb	Parell de bases
P53	Cellular tumor antigen p53
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAX	Paired box protein
PBS	Phosphate buffered saline

PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Paired domain
PDE	Fosfodiesterasa
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PLC	Fosfolipasa C
Porc	Porcupine
PP <sub>i</sub>	Pirofosfat
PTCH1	Patched 1
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RB1	Retinoblastoma 1
RE	Reticle endoplasmàtic
REIC	Reduced expression in immortalized cell
RGS	Regulator of G protein signaling
RISC	RNA-induced silencing complex
RMS	Rabdomiosarcoma
RMSa	Rabdomiosarcoma alveolar
RMSe	Rabdomiosarcoma embrionari
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNTI	Registro Nacional de Tumores Infantiles

ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	Revolucions per minut
RRE	Rev response elements
Rspo	R-spondin
RT	Retrotranscripció
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
RYK	Receptor-like tyrosine kinase
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEHOP	Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas
seg	Segon
SEM	Standard error of the mean
sFRP	Secreted frizzled-related protein
sgy	Soggy
SHH	Sonic hedgehog
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SmoM2	Smoothened Mutant 2
SNC	Sistema nerviós central
SNS	Sistema nerviós simpàtic
SPF	Specific-pathogen-free
SSC	Side scatter
SV40	Simian virus 40
TAC	Tomografia axial computeritzada
TAD	Transactivation domain

## ABREVIATURES

TBP	TATA binding protein
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline and Tween 20
TCF	T-cell factor
TEMED	N,N,N,N'-tetrametil-diamina
TEP	Tomografia amb emissió de positrons
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TLE1	Transducin-like enhancer protein 1
TNM	Tumor-nodes-metastasis
TP53	Cellular tumor antigen p53
TPBG	Trophoblast glycoprotein
TTP	Trifosfat de timidina
U	Unitat
UA	Unitat arbitrària
ULBP	UL16 binding protein 1
URL	Unitats relatives de luciferasa
V	Volts
VANGL	Van Gogh like protein
VCR	Vincristina
VHIR	Vall d'Hebron Institut de Recerca
VSV-G	Vesicular stomatitis virus envelope G protein
Waif1	Wnt-activated inhibitory factor 1
WAY-262611	(1-(4-(Naphthalen-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine
WD	WIF domain
Wg	Wingless

## ABREVIATURES

WIF1	Wnt inhibitory factor 1
Wls	Wntless
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
WRE	Wnt responsive element
WTX	Wilms tumour gene on the X chromosome
ZNRF3	Zinc and ring finger 3





# I. INTRODUCCIÓ



## 1. Càncer infantil

El terme càncer fa referència a un conjunt de malalties que es caracteritzen per la divisió i el creixement anormal de les cèl·lules en gairebé qualsevol teixit; les quals poden disseminar a altres parts del cos. En condicions normals, les cèl·lules creixen i es divideixen quan el cos les necessita, i també moren quan pateixen danys o envelleixen, essent reemplaçades per cèl·lules noves. No obstant, les cèl·lules tumorals tenen aquest procés descontrolat, és a dir, quan haurien de morir degut a la seva anormalitat, sobreviuen i, a més a més, es formen cèl·lules noves amb la característica de dividir-se indefinidament, formant així els tumors.

El càncer en la infància és una malaltia poc freqüent que es dona en nens d'entre 0-18 anys; representant entre un 1.5% i un 2% de tots els càncers. Les taxes d'incidència mundial de càncer infantil oscil·len entre 50 i 200 casos per milió de nens a l'any en tot el planeta (1). Concretament, a Espanya cada any es diagnostiquen entre 900-950 casos de càncer en nens, dels quals uns 200 són a Catalunya (2). A Espanya, la incidència de tumors en aquesta població presenta un pic a les edats d'entre 1 i 9 anys, i torna a augmentar a partir dels 17 anys (2).

El diagnòstic precoç i el tractament apropiat són dos factors claus per a la cura del càncer infantil. La supervivència ha anat augmentant fins a dia d'avui gràcies a la quimioteràpia, el tractament multidisciplinari, els assaigs clínics, la investigació translacional i les col·laboracions a nivell nacional i internacional, entre altres. Així doncs, actualment, la supervivència als 5 anys després del diagnòstic de càncer en nens és d'aproximadament el 80% (3-6). Tot i la seva infreqüència i elevada supervivència, el càncer en nens és la principal causa de mort per malaltia en infants d'entre 1-14 anys (7).

No es coneixen les causes de la majoria de càncers infantils. Tot i l'existència d'altres causes, es creu que la majoria de càncers en la infància, així com en els adults, sorgeixen del resultat de mutacions en gens que causen un creixement cel·lular descontrolat. En adults, les mutacions genètiques es poden explicar amb l'exposició a factors ambientals (com el fum del tabac o la radiació ultraviolada del sol, entre moltes altres). Per contra, en nens el temps d'exposició als factors ambientals no és suficient perquè aquests puguin ser els causants de les

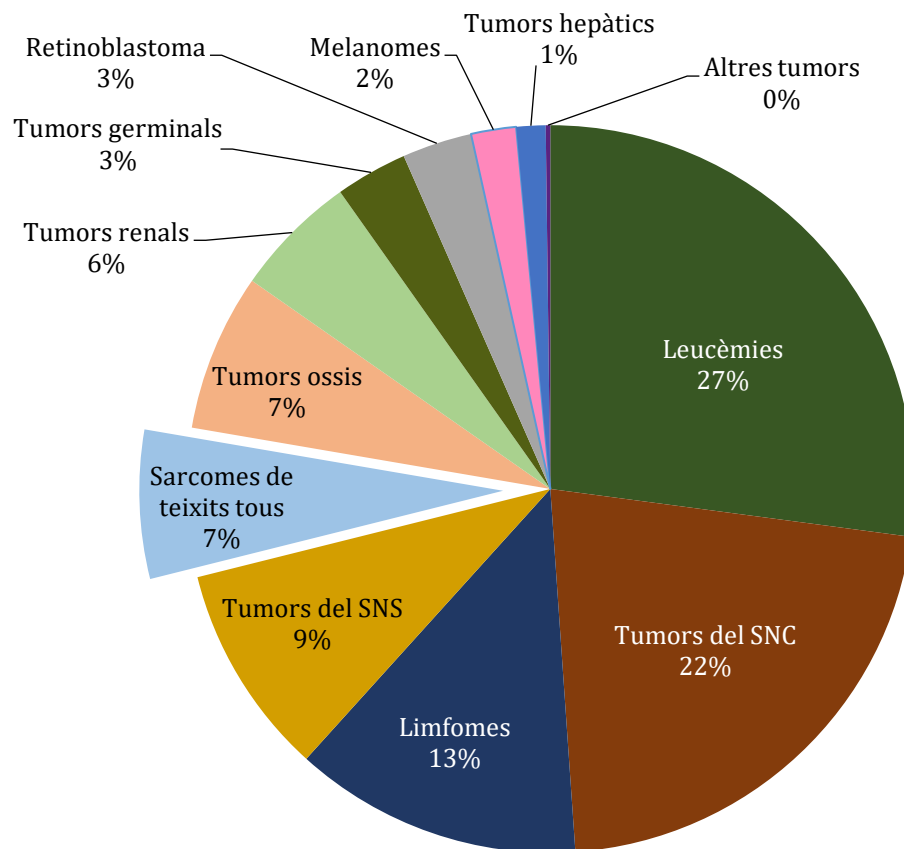
mutacions. En nens, pràcticament no existeixen els carcinomes, la majoria presenten tumors originats durant el desenvolupament embrionari. En aquest cas, la cèl·lula d'origen del tumor presentaria mutacions en gens involucrats en el desenvolupament normal del teixit i tan sols dues mutacions podrien ser suficients per al desenvolupament i progressió del tumor (8). No obstant, els tumors pediàtrics poden, també, no presentar mutacions, presentar-ne més de dues o presentar translocacions cromosòmiques, entre altres.

Els càncers infantils es classifiquen en base a la seva localització anatòmica. L'origen d'aquests tumors es pot trobar a nivell hematològic, mesenquimal o del sistema nerviós. Els càncers hematològics són els càncers de la sang, de la medul·la òssia i del sistema limfoide, els tumors cerebrals són càncers intracranials del sistema nerviós central (SNC) i els tumors sòlids són càncers extracranials no hematològics. Els tumors sòlids poden sorgir de qualsevol de les tres capes germinals que formaran l'embrió: mesoderm, endoderm o ectoderm. El retinoblastoma i el neuroblastoma, per exemple, deriven dels llinatges cel·lulars de l'ectoderm, el rabdomiosarcoma i l'osteosarcoma dels llinatges del mesoderm i l'hepatoblastoma dels llinatges de l'endoderm (9). La tercera edició de la classificació internacional del càncer pediàtric (ICCC-3, *International Classification of Childhood Cancer third edition*) classifica els càncers infantils en 12 categories (Taula I1) (10).

Segons el Registre Espanyol de Tumors Infantils (RNTI-SEHOP), el càncer infantil més freqüent en nens de 0-14 anys en el període de 1990-2016 varen ser les leucèmies (27.1%) (Figura I1). Els segueixen els tumors del SNC (21.8%), els limfomes (12.8%), els neuroblastomes i altres tumors de cèl·lules nervioses perifèriques (9.4%), els tumors ossis (7%) i els sarcomes de parts toves (6.6%). Entre els menys freqüents hi trobem els tumors hepàtics i les neoplàsies epitelials malignes i melanomes malignes (11,12).

**Taula I1. Classificació internacional del càncer infantil segons la ICCC-3.** Taula basada en (10).

	Grups diagnòstics
I	Leucèmies, malalties mieloproliferatives i malalties mielodisplàsiques
II	Limfomes i neoplàsies reticuloendotelials
III	SNC i neoplàsies intracranials i intraespinals
IV	Neuroblastoma i altres tumors de cèl·lules nervioses perifèriques
V	Retinoblastoma
VI	Tumors renals
VII	Tumors hepàtics
VIII	Tumors ossis malignes
IX	Sarcomes de parts toves i sarcomes extra ossis
X	Tumors de la línia germinal, tumors trofoblàstics i neoplàsies de les gònades
XI	Altres neoplàsies epitelials malignes i melanomes malignes
XII	Altres i neoplàsies malignes inespecífiques

**Figura I1. Percentatges de casos registrats al Registre Espanyol de Tumors Infantils (RNTI-SEHOP) entre 1990-2016.** Imatge basada en Peris-Bonet et al. (11).

En el càncer en la infància, el diagnòstic precoç és un factor crític per a la millora de les taxes de supervivència. Per a la detecció, diagnòstic i estratificació del càncer en la infància és necessària la biòpsia del tumor o de medul·la òssia, preferiblement abans del tractament. L'obtenció de la biòpsia sol ajudar-se de les tècniques d'imatge com el TAC (tomografia axial computeritzada), l'exploració per TEP (tomografia amb emissió de positrons), imatges per ressonància magnètica o ecografia, entre altres.

### **1.1. Sarcomes**

Els sarcomes són tumors rars que sorgeixen en els teixits connectius, incloent el greix, músculs, vasos sanguinis, teixits profunds de la pell, nervis, ossos i cartílag (13). Representen menys de l'1% del tumors sòlids dels adults i aproximadament el 20% dels tumors sòlids pediàtrics, i la majoria es presenten inicialment com indolors sense símptomes clínics característics (14–16).

Hi ha més de 50 subtipus histològics de sarcomes, que sovint estan associats a unes característiques clíniques i un pronòstic únics, dividits en dues categories principals: sarcomes ossis i sarcomes de parts toves (15). Els sarcomes ossis són tumors infreqüents, representant un 7% de tots els tumors pediàtrics (11). Es poden dividir en osteosarcomes, condrosarcomes, sarcoma d'Ewing, altres sarcomes ossis especificats i altres sarcomes ossis no especificats, essent els més freqüents l'osteosarcoma i el sarcoma d'Ewing.

Els sarcomes de parts toves poden aparèixer en la infància o en l'edat adulta, representant un 1.5% de tots els tumors malignes en adults i un 7.4% dels càncers infantils (17). A Espanya, la incidència de sarcomes de parts toves és del 5.9% (11). La ICC-3 classifica els sarcomes de parts toves en 5 subgrups, essent el rhabdomyosarcoma el més freqüent (12). A la Taula I2 es recullen els diferents subgrups i la incidència corresponent (11).

**Taula I2. Classificació i incidència dels sarcomes de parts toves i sarcomes extra ossis a Espanya entre 1990-2016.** Taula basada en (11).

IX	Sarcomes de parts toves i sarcomes extra ossis	Incidència (%)
IXa	Rabdomiosarcomes	57.4
IXb	Fibrosarcomes, tumors de les beines nervioses perifèriques i altres neoplàsies fibroses	8.7
IXc	Sarcoma de Kaposi	0.1
IXd	Altres sarcomes de teixits tous especificats	28
IXe	Altres sarcomes de teixits tous no especificats	5.8

L'origen dels sarcomes roman al mesoderm, per tant, no estan restringits a una localització específica i poden sorgir en qualsevol part del cos (18); tot i que tres quartes parts dels tumors estan localitzats a les extremitats i un 10% a la paret del tronc i al retroperitoneu (15).

L'etiologia de la majoria dels tumors de parts toves benignes i malignes és incerta. Està altament acceptat que els sarcomes són causats per mutacions genètiques en progenitors mesenquimals o cèl·lules mare, però l'origen cel·lular precís de la majoria dels tumors encara és desconegut. La majoria de sarcomes de teixits tous semblen sorgir *de novo*, sense cap factor causant aparent. En pocs casos s'han pogut relacionar factors genètics i ambientals, irradiació, infeccions virals i deficiència immunitària amb el desenvolupament de sarcomes de teixits tous malignes (15).

Els sarcomes de parts toves es poden dividir en quatre categories segons el seu creixement i la seva capacitat d'invasió (15):

- Benignes. La majoria no són recurrents i gairebé sempre es curen per escissió local completa.
- Intermedi (localment agressius). Els sarcomes d'aquesta categoria tendeixen a ser localment recurrents i s'associen a un patró de creixement localment destructiu.
- Intermedi (rarament metastàtics). Són localment agressius, però s'han descrit casos amb l'habilitat de donar lloc a metàstasis distants (<2%).



- Malignes. A més a més del potencial de creixement i recurrència, tenen un risc significatiu de metàstasis distants (20-100%), el qual depèn del tipus i el grau histològic.

Els sarcomes de parts toves benignes, tan en adults com en nens, són relativament freqüents, amb una alta taxa de curació després de l'escissió quirúrgica, mentre que els tumors de parts toves malignes són rars amb una incidència anual de 6 casos per 100.000 persones (17).

### **1.1.1. Rbdomiosarcoma**

El rbdomiosarcoma (RMS) és un tumor maligne embrionari derivat de cèl·lules mesenquimals primitives, anomenades rbdomioblasts, la diferenciació de les quals a cèl·lules del múscul estriat madur és incompleta (19). El RMS és un càncer infantil agressiu, i és el sarcoma de parts toves més comú en nens i adolescents (20).

#### **1.1.1.1. Epidemiologia**

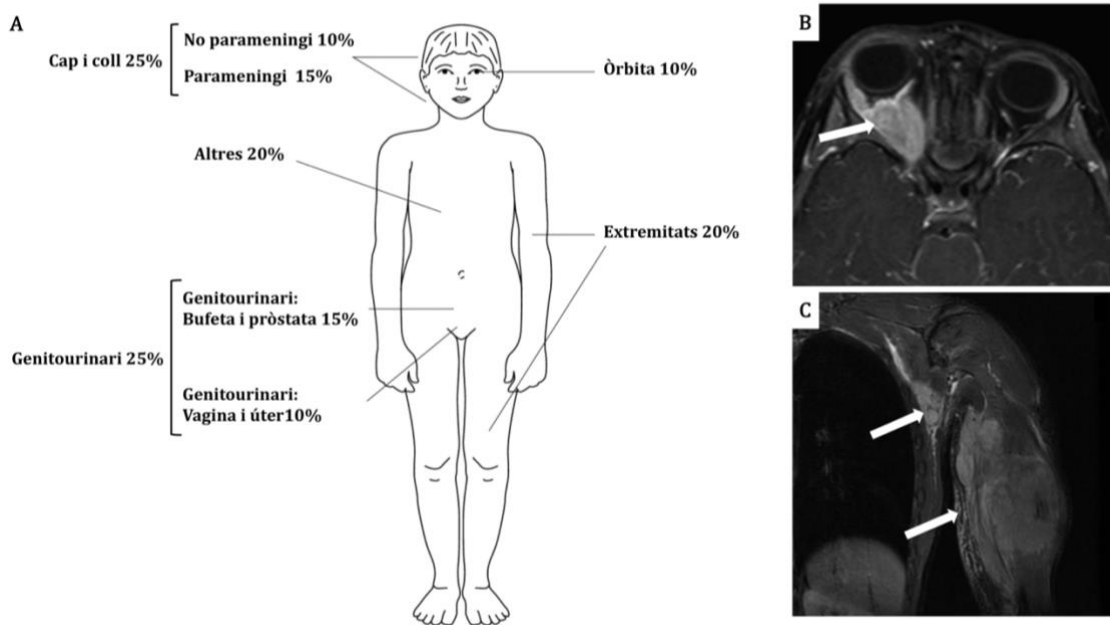
El RMS representa aproximadament el 5% dels tumors malignes de nens i adolescents, i la seva incidència anual és de 5.3 casos per milió de nens menors de 15 anys (19). El RMS en adults és una malaltia rara. La incidència del RMS és més elevada en nens d'entre 1 i 4 anys i en adolescents d'entre 15 a 19 anys (21). S'ha descrit una major predominança en el sexe masculí (1.4 vegades més comú en sexe masculí que en sexe femení) (22). La incidència depèn també del subtipus histològic, mostrant diferències entre els subtipus principals (23).

Els assaigs clínics duts a terme per *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS) han ajudat a entendre la biologia dels tumors i a millorar la supervivència dels pacients amb RMS (24–27). El pronòstic dels pacients amb RMS localitzat ha millorat notablement en les tres últimes dècades, tan a Europa com als EUA, gràcies a la inclusió de la majoria dels pacients en assaigs clínics de grups cooperatius,

presentant actualment el 60-70% de supervivència lliure de malaltia als 5 anys del diagnòstic (19,28). No obstant, aproximadament un 15% dels pacients amb RMS presenten metàstasis al moment del diagnòstic (26). Tot i els tractaments multimodals agressius utilitzats actualment que inclouen tan quimioteràpia convencional com quimioteràpia a altes dosis amb suport de progenitors hematopoètics, aquests pacients amb RMS metastàtic tenen un pronòstic molt desfavorable amb una supervivència lliure de malaltia als 5 anys inferior al 20-29% (19,29,30). Així doncs, els futurs assaigs clínics en teràpies moleculars poden ser molt beneficiosos per millorar el pronòstic i la supervivència d'aquests pacients.

#### **1.1.1.2. Presentació clínica**

La presentació clínica i els símptomes del RMS són variables i estan influenciats pel lloc d'origen del tumor primari, l'edat del pacient i la presència o absència de malaltia metastàtica (19,31). Les localitzacions més freqüents inclouen el cap i el coll, el tracte genitourinari, les extremitats i l'òrbita (Figura I2) (19,31). La simptomatologia varia segons la localització del tumor; quan es localitza al cap i coll (25% dels casos) i és parameningi (15%) la manifestació és epistaxis o aparició d'una massa a la fossa nasal, en canvi, si no és parameningi (10%) es manifesta com una massa palpable. Quan el tumor es localitza a la bufeta o a la pròstata (15% dels casos), la manifestació clínica associada és obstrucció urinària, quan es localitza a la vagina o a l'úter (10% dels casos) es manifesta amb sagnat vaginal o un tumor a la vulva. Si la localització són les extremitats (20%) es manifesta com una massa palpable i en el cas de l'òrbita (10%) es manifesta amb exoftàlmies. Altres simptomatologies poden ser l'observació d'una massa abdominal o toràcica, icterícia o vessament pleural (19).



**Figura 12. Localitzacions del RMS.** A: Localitzacions més freqüents del RMS (figura adaptada de (21)). Imatges obtingudes mitjançant ressonància magnètica d'un tumor de RMS orbital (B) (32) i d'un tumor de RMS de tronc i extremitat superior (C), en la qual s'observa una massa polilobulada i hipertensa a la paret toràcica i al braç (33).

Altres localitzacions del RMS inclouen el tronc, paret toràcica, regió perianal/anal i abdomen, incloent el tracte biliar i el retroperitoneu (25,34). S'ha descrit també que els tumors localitzats a les mans i peus poden ser més agressius que els localitzats a les extremitats, essent més propensos a mostrar una histologia alveolar i a la propagació metastàtica a llocs inusuals (35). Els tumors de RMS també es poden localitzar al múscul orbital, esdeveniment que es dona en pacients menors d'un any, pertanyent al subtipus histològic embrionari i presentant normalment un bon pronòstic, tot i que la disseminació a cervell pot empitjorar la supervivència (22).

Les taxes de recidiva del tumor varien segons la localització d'aquest, presentant la freqüència més elevada quan el tumor es localitza a les extremitats (47%), i la més baixa quan es localitza al tracte genitourinari (12%) (36). Per altra banda, estudis recents han situat la taxa de metastàsis distals en aproximadament el 37%, essent els llocs de disseminació més freqüents els ossos, els pulmons i els nòduls limfàtics (37). En aquest estudi, Kim et al. descriuen que els tumors situats a les extremitats tendeixen a metastatitzar als nòduls limfàtics (37).

### 1.1.1.3. Diagnòstic

El RMS es pot localitzar en qualsevol part de l'organisme incloent llocs on no hi ha múscul esquelètic madur; és un tipus de tumor que pertany a la categoria de tumors infantils de cèl·lules petites, rodones i blaves (19,30,31).

El diagnòstic del RMS es basa en la utilització de la microscòpia, la immunohistoquímica i tècniques de diagnòstic molecular per tal de detectar la presència de cèl·lules del llinatge miogènic característic del RMS. Gràcies a la microscòpia es pot caracteritzar el RMS per la presència d'estriacions creuades típiques del múscul esquelètic (31). La immunohistoquímica detecta proteïnes del múscul esquelètic, tals com miogenina, MyoD, actina específica de múscul, miosina, desmina i mioglobina (19,31,38). L'aplicació del diagnòstic molecular permet detectar la presència de translocacions cromosòmiques específiques característiques del subtipus histològic alveolar, ajudant així al millor diagnòstic del subtipus histològic de RMS (31).

### 1.1.1.4. Factors de risc

L'etiologia del RMS és desconeguda, la majoria de casos de RMS semblen ser esporàdics, no obstant, en un petit percentatge de casos els factors genètics tenen un paper important en aquesta neoplàsia. Per exemple, els pacients amb RMS presenten anomalies congènites al SNC i a l'aparell genitourinari amb major freqüència que la població general. Per altra banda, els pacients amb síndrome de Wiedemann-Beckwith, síndrome de Gorlin, neurofibromatosis tipus I, síndrome de Li-Fraumeni i síndrome alcohòlic fetal presenten una major incidència de RMS (19,31).

En alguns casos, aquests síndromes associats a predisposició de RMS presenten mutacions inactivadores en gens supressors de tumors. Per exemple, en el cas del síndrome de Li-Fraumeni hi ha mutacions germinals en *TP53* (39-41). Altres mutacions germinals relacionades amb l'aparició de RMS són les de *RB1* en el

diagnòstic del retinoblastoma (42) o el cas del blastoma pleuropulmonar que presenta mutacions en *DICER1* (43,44).

Altres síndromes associen el RMS amb malformacions. Entre els menys freqüents hi ha el síndrome d'aneuploïdia en mosaic variegada (mutacions en *BUB1B*) (45) o el síndrome de càncer per no reparació dels errors d'aparellament (46). Pel que fa al síndrome de Wiedemann-Beckwith, pocs casos s'han relacionat amb l'aparició de RMS (pèrdua d'heterozigositat al cromosoma 11p15) (47,48). En el síndrome de Gorlin, les mutacions en *PTCH1* s'han relacionat amb l'aparició de RMS (49).

Els síndromes amb més risc d'aparició de RMS són els que tenen mutacions germinals en *HRAS* i constitueixen el síndrome de Costello; el 25% dels nens afectats amb aquest síndrome desenvolupen RMS (50,51). Aquesta forta associació remarca la importància de la via RAS en RMS (52). Aquesta via també ha estat relacionada amb el síndrome de Noonan (mutacions en *PTPN11*) (51,53) i en neurofibromatosis tipus I (mutacions en *NF1*) (52,54-57).

#### **1.1.1.5. Histopatologia i alteracions genètiques**

L'any 1995 es va crear la Classificació Internacional del Rbdomiosarcoma (ICR; de l'anglès *International Classification of Rhabdomyosarcoma*), en la qual es varen establir 4 subtipus de RMS segons criteris histològics i pronòstic. El RMS botrioide i de cèl·lules fusiformes amb bon pronòstic, el RMS embrionari amb pronòstic intermedi i el RMS alveolar i el RMS pleomòrfic amb pronòstic dolent (58).

En la quarta edició de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) - *Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* - es va modificar el sistema de classificació del RMS (59). Aquestes modificacions varen incloure l'eliminació del subtipus botrioide com a un diagnòstic independent, classificant-lo com a RMS embrionari. A més, es va establir el RMS esclerosant/de cèl·lules fusiformes com a un nou subtipus histològic. Així doncs, la classificació dels subtipus principals de RMS inclou: alveolar, embrionari, esclerosant/de cèl·lules fusiformes i pleomòrfic (Taula I3) (58).

**Taula 13. Localització, pronòstic, edat de presentació i freqüència segons el subtipus histològic.** Taula basada en (20,22,30,58).

Subtipus	Mutacions	Pronòstic	Edat	Freqüència	Localització
<b>Alveolar (RMSa)</b>		Dolent	Adolescents	20%	Extremitats, tronc
	<i>PAX3-FOXO1</i>	Molt dolent	Adolescents	60% dels RMSa	
	<i>PAX7-FOXO1</i>	Intermedi	< Adolescents	20% dels RMSa	
	Negatiu	Intermedi		20% dels RMSa	
<b>Embrionari (RMSe)</b>		Intermedi	< de 10 anys	70%	Cap i coll, tracte genitourinari
	LOH			80% dels RMSe	
<b>Esclerosant /de cèl·lules fusiformes</b>		Bo	Adults joves	10%	Regió paratesticular, cap i coll
<b>Pleomòrfic</b>		Dolent	Adults	-	Extremitats

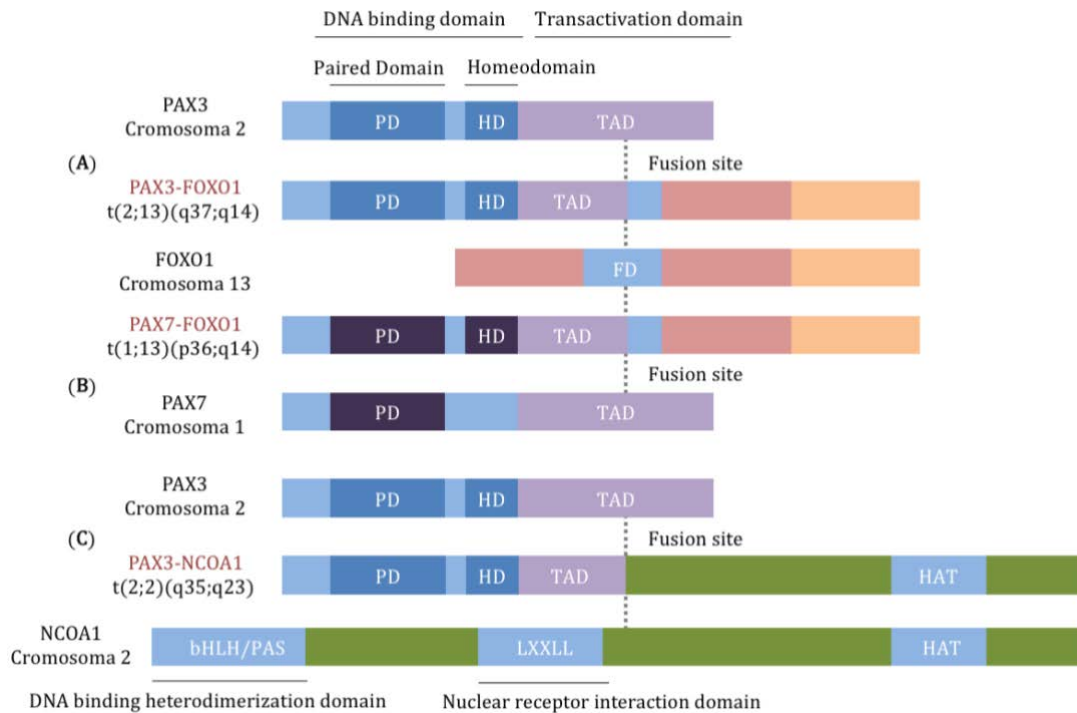
Els dos subtipus majoritaris de RMS, l'alveolar (RMSa) i l'embrionari (RMSe), tenen alteracions citogenètiques completament diferents que poden jugar un paper important en la patogènesi dels tumors. Estudis realitzats als EUA, situen la supervivència dels pacients amb RMSa als 5 anys del diagnòstic en el 52%, mentre que la supervivència dels pacients amb RMSe és del 80% (60). El subtipus de RMS embrionari predomina en homes (1.5 vegades més que en dones), i presenta un pic d'incidència entre 0 i 4 anys (aproximadament 4 casos per milió); la incidència del subtipus alveolar és relativament constant (1 cas per milió) i no mostra predilecció de gènere (34).

El RMSa representa aproximadament un 20% dels casos de RMS, apareix més freqüentment en nens de més de 10 anys i es localitza majoritàriament a les extremitats, el tronc i la regió perianal (23,57). La majoria d'aquests tumors (aproximadament un 75%) presenten una fusió entre el gen *FOXO1* (cromosoma 13) i el gen *PAX3* o *PAX7*, localitzats als cromosomes 2 i 1, respectivament (Figura 13) (28,61). En aproximadament el 55% dels casos, es dona la translocació

característica entre el braç llarg del cromosoma 2 i el braç llarg del cromosoma 13, referit com t(2;13)(q35;q14) (62). Aquesta translocació genera la fusió del gen *PAX3*, gen que regula la transcripció durant el desenvolupament primerenc neuromuscular, amb el gen *FOXO1*, un membre de la família de factors de transcripció *forkhead* (FKHR) (63). La variant t(1;13)(p36;q14) fusiona el gen *PAX7* localitzat al cromosoma 1 amb *FOXO1*, corresponent a un 23% dels casos. *PAX7* és un factor de transcripció que regula la miogènesi mitjançant el control de la proliferació de les cèl·lules precursors. En els dos casos es genera un factor de transcripció quimèric amb el domini d'unió a l'ADN dels gens *PAX* i el domini transactivador de *FOXO1*. La proteïna de fusió generada presenta una activitat de *PAX* augmentada, resultant en una activació inapropiada de la transcripció de gens que contribueixen a un fenotip transformat amb efectes oncogènics, que inclouen la inhibició de la diferenciació miogènica i de l'apoptosi (19,29,64).

*PAX3-FOXO1* induïx la transcripció de gens tals com el factor de creixement de fibroblasts 4 (*FGFR4*, de l'anglès *Fibroblast growth factor 4*) i el gen del factor de creixement insulínic tipus 2 (*IGF2*, de l'anglès *Insulin-like growth factor 2*), activant així l'eix RTK/RAS/PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) (65). Estudis recents descriuen que la proteïna de fusió *PAX3-FOXO1* tindria com a dianes directes oncògens com *MYCN*, *FGFR4*, *ALK* o *IGF2*, gens que contribueixen a la transformació dels mioblasts i a la formació del tumor mitjançant l'estimulació de la proliferació i la inhibició de la diferenciació miogènica i l'apoptosi (66,67). Tot i això, s'ha demostrat que la translocació *PAX3-FOXO1* no és tumorigènica per si sola, calen mutacions addicionals en gens com *TP53*, *RB1* o *RAS* (68,69).

Recentment, s'ha descrit una nova translocació, t(2;2)(q35;p23), que genera una proteïna de fusió entre *PAX3* i el receptor coactivador nuclear NCOA1 (Figura I3) (22,70,71). Aquesta proteïna de fusió tindria propietats transactivadores semblants a *PAX3-FOXO1* (70). També s'ha descrit una fusió entre els gens *PAX3* i *INO80D* (65), tot i que encara no es coneixen els efectes d'aquestes translocacions recentment descrites en la progressió del RMSa. Els casos associats amb la fusió de *PAX7* tendeixen a aparèixer en pacients més joves i podrien associar-se a una supervivència lliure d'esdeveniments més llarga que en les fusions *PAX3* (28).



**Figura 13. Diagrama de translocacions cromosòmiques en RMSa.** A i B: Translocacions que fusionen *FOXO1*, localitzat al cromosoma 13, amb *PAX3* (cromosoma 2) o *PAX7* (cromosoma 1), respectivament. C: Translocació que fusiona *PAX3* (cromosoma 2) i *NCOA1* (cromosoma 2) amb propietats transactivadores semblants a *PAX3-FOXO1*. Abreviatures: PD: *Paired domain*, HD: *homeodomain*, TAD: *transactivation domain*, HAT: *histone acetyltransferase*. Figura adaptada de (22).

El 25% restant dels RMSa presenten la histologia clàssica alveolar però no mostren cap translocació característica (30,61,72). Els tumors alveolars negatius per la fusió s'assemblen als RMSe i tenen un pronòstic similar als pacients amb RMSe (73).

El RMSe representa entre el 60-70% dels casos de RMS (23). Aquests tipus de tumors es presenten principalment en nens de 0 a 5 anys, poden aparèixer en qualsevol localització però típicament sorgeixen en la regió del cap i el coll o al tracte genitourinari (34,57). El RMSe normalment té un comportament menys agressiu i presenta també millor pronòstic (29). No presenta translocacions específiques però és freqüent la pèrdua d'heterozigotat (LOH, de l'anglès *loss of heterozygosity*) del cromosoma 11 al locus 11p15, amb pèrdua d'informació genètica materna i duplicació de la informació genètica paterna (19,74,75). Aquesta LOH es dona en un 80% dels casos de RMSe i suggereix una pèrdua o



inactivació d'un gen supressor de tumors (29,30). En aquesta regió es localitza el gen *IGF2*, gen que està sobre-expressat en RMS, la funció del qual és estimular el creixement cel·lular (29,74). S'ha descrit també que el RMSe presenta pèrdua d'empremta genètica (LOI, de l'anglès *loss of imprinting*), amb una reexpressió de l'al·lel matern silenciats del gen *IGF2* (76). Tan la LOH com la LOI resulten en una sobre-expressió del gen *IGF2*.

Una tercera part dels casos de RMSe presenten mutacions en gens de la via de senyalització RAS (*NRAS*, *KRAS*, *HRAS* i *NF1*). Menys freqüentment es troben mutacions en *FGFR4*, *PI3KCA*, *CTNNB1*, *FBXW7* i *BCOR* (65,77). En aquest subtipus també s'han descrit guanys i pèrdues en certs cromosomes. Els guanys es donen al cromosoma 8 majoritàriament (72%) i als cromosomes 2, 7, 11, 12, 13 i 20 i les pèrdues als cromosomes 9 i 10 (57).

S'han descrit similituds entre el RMSe i el RMSa sense fusió. Un exemple és l'augment de l'expressió d'*IGF2*, descrit tan en tumors de RMSe com en tumors de RMSa negatius per la fusió *PAX-FOXO1* (78). L'augment del número de còpies de *FGFR1* s'ha associat amb guanys al cromosoma 8, tan en RMSe com en RMSa negatius per la fusió gènica (73).

Els tumors botrioides són tumors embrionaris que es formen sota la superfície mucosa de cavitats buides/orificis del cos tals com la vagina, la bufeta, la cavitat nasofaríngia i el tracte biliar, representant un 10% de tots els RMS (34). Generalment s'associen a un bon pronòstic.

El RMS de cèl·lules fusiformes es dona en homes joves i es localitza majoritàriament a l'àrea paratesticular i a la regió de cap i coll (79,80). És un subtipus que presenta bon pronòstic (80). Les cèl·lules tumorals que formen el RMS de cèl·lules fusiformes presenten un citoplasma eosinofílic i fibril·lar, mimetitzant fibres musculars positives per marcadors musculars com la desmina i la mioglobina (79). El RMS esclerosant s'ha considerat una variant del subtipus de RMS de cèl·lules fusiformes. Apareix en adults i es localitza majoritàriament a les extremitats i a la regió de cap i coll (58). Els tumors d'aquest subtipus presenten un elevat grau de hialinització i formació de matriu extracel·lular; també es

caracteritza per compartir característiques clinico-patològiques amb els subtipus alveolar i embrionari (81).

El RMS pleomòrfic és una variant rara de RMS que es dona majoritàriament en homes de mitjana edat. Apareix normalment a les extremitats inferiors, presentant metàstasis en un 50-60% dels casos. El pronòstic per aquest subgrup és desfavorable, aproximadament el 70% dels pacients moren degut a la malaltia. La histologia del RMS pleomòrfic es caracteritza per cèl·lules tumorals atípicament grans, pleomòrfiques, sovint multinucleades amb un citoplasma eosinofílic i nuclis pleomòrfics barrejats amb un número variant de rabdomioblasts positius per marcadors miogènics (82).

#### **1.1.1.6. Etiologia i evolució molecular**

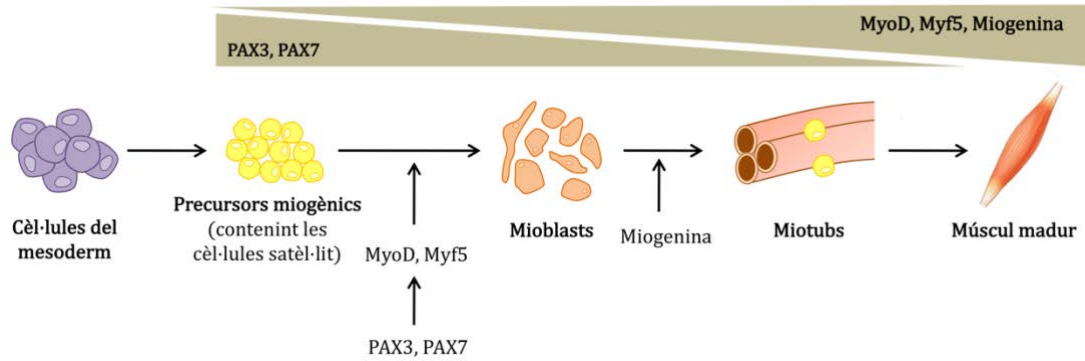
Els dos subtipus majoritaris, l'alveolar i l'embrionari, presenten característiques clíniques i moleculars diferents, fet que indica que podrien sorgir mitjançant mecanismes biològics diferents. Alguns estudis han demostrat la presència de poblacions cel·lulars del tipus cèl·lula mare en RMS, les quals són anomenades fracció de població secundària (de l'anglès *side-population fraction*), tot i que encara no es coneix la significança clínica d'aquesta població cel·lular (83). L'origen cel·lular del RMS, per tant, és encara controvertit.

El subtipus alveolar podria sorgir de cèl·lules no musculars, com les cèl·lules mare mesenquimals, amb la capacitat de convertir-se en llinatge múscul-esquel·lètic (84). Estudis clàssics de desenvolupament en ratolins mostren que *PAX3* promou el compromís a llinatge múscul-esquel·lètic i *PAX3-FOXO1* indueix l'expressió de gens miogènics en fibroblasts no miogènics (85). Donada la importància de les mutacions involucrades en l'origen del RMS, el fracàs per induir RMS en models experimentals no exclou una cèl·lula no miogènica expressora de *PAX3* o *PAX7* com a origen de la malaltia. A més, expressant directament *PAX3-FOXO1* en cèl·lules mare mesenquimals de ratolí es generen tumors de RMS només amb presència de l'antigen T de SV40, el qual inactiva els gens supressors de tumors *p53* i *RB* (68). No obstant, aquesta hipòtesi no contempla els casos de RMS negatius per la fusió,

suggerint així altres orígens no miogènics. Drummond et al. han creat recentment un model de RMS de cap i coll exclusivament, que resulta de l'activació de SmoM2 (forma constitutivament activa del receptor Smoothened de la via Hedgehog) en progenitors endotelials. Aquest treball confirma que l'activació de la via Hedgehog promou l'expressió aberrant de factors de transcripció específics de la miogènesi, causant així l'origen del RMS (86).

El RMS podria sorgir també directament del múscul esquelètic, fet que confirmaria un origen miogènic. En aquest cas, les cèl·lules d'origen inclourien els mioblasts embrionaris, les cèl·lules satèl·lit (precursors miogènics que resideixen al voltant de les miofibres madures) o els miòcits transformats en algun estadi de la miogènesi (85). Les cèl·lules satèl·lit es trobarien quiescents fins estar preparades per proliferar en resposta a estímuls patològics. L'elevada expressió de *PAX7* descrita en tumors RMSe és consistent amb el seu origen en les cèl·lules satèl·lit (87). L'origen miogènic, però, no contempla els casos de RMS que no sorgeixen en múscul esquelètic. Aquest origen, per tant, no explicaria els tumors que sorgeixen en llocs on normalment no hi trobem múscul esquelètic (per exemple, la bufeta urinària), o per exemple, pels sarcomes indiferenciats derivats de la mesènquima que no es poden associar a un llinatge de teixit específic.

L'explicació de l'origen miogènic es trobaria en l'embrió, on les cèl·lules del mesoderm generen cèl·lules miogèniques (cèl·lules formadores de múscul), la majoria de les quals es diferencien per a produir fibres musculars estriades sota el control dels factors de transcripció miogènics *PAX3* i *PAX7*, entre altres (Figura I4) (88,89). No obstant, un subconjunt d'aquestes cèl·lules miogèniques escapa de la diferenciació terminal a l'embrió i forma una única població mononuclear anomenada cèl·lules satèl·lit, les quals es troben retingudes a la làmina basal que envolta les fibres musculars madures (90). Com els precursors normals, les cèl·lules de RMS expressen *PAX3*, *PAX7* i *MRFs* (de l'anglès *myogenic regulatory factor*) (20). *PAX3* i *PAX7* marquen tan la formació del múscul com de les cèl·lules de la cresta neural, però pel fet que al RMS li manquen els trets de diferenciació neural, l'expressió de *PAX3*, *PAX7* i *MRFs* s'han interpretat com indicadors de l'origen múscul-esquelètic del RMS (90).



**Figura I4. Esquema de la miogènesi esquelètica.** Els factors de transcripció miogènics PAX3, PAX7, MYOD, MYF5 i miogenina, són claus en l'especificació de les cèl·lules del mesoderm a múscul madur. Figura adaptada de (90).

### 1.1.1.7. Factors pronòstic i estadiatge

El pronòstic dels nens amb RMS depèn de l'edat, la localització del tumor primari, la mida del tumor i la seva resectabilitat, la presència de metàstasis, l'afectació ganglionar i la histologia (24–27,61). Entre els pacients amb pronòstics desfavorables, les recaigudes són un fenomen comú.

Els factors pronòstics més importants en RMS són (19):

- **Histologia.** Favorable: embrionari. Desfavorable: alveolar.
- **Estadi** (classificació IRS). Favorable: grup I. Desfavorable: grups II-III.
- **Afectació ganglionar.** Favorable: no afectació (NO). Desfavorable: afectació ganglionar (N1).
- **Localització.** Favorable: òrbita, cap i coll no parameningi, genitourinari no bufeta-pròstata. Desfavorable: la resta de localitzacions.
- **Mida.** Favorable:  $\leq 5$ cm. Desfavorable:  $> 5$ cm.
- **Edat.** Favorable  $< 10$  anys. Desfavorable:  $\geq 10$  anys.
- **Resectabilitat del tumor:** els pacients sense tumor residual després de la cirurgia (grup I) tenen una supervivència del 90% als 5 anys, els que tenen malaltia microscòpica (grup II) tenen aproximadament un 80% de supervivència als 5 anys i els que tenen elevada malaltia residual (grup III) presenten un 70% de supervivència als 5 anys (34).

Els pacients afectats de RMS es classifiquen en grups que difereixen en el risc de recaiguda per a l'estratificació del tractament. L'avaluació de l'extensió de la malaltia és un punt crític perquè la teràpia i el pronòstic depenen del grau de massa que ha difós més enllà del tumor primari. El sistema més utilitzat en l'estadiatge és la classificació en grups clínics desenvolupat per l'IRS l'any 1972 (Taula I4) (19,31). Aquest sistema reconeix quatre categories de la malaltia basant-se en la resecció del tumor, l'extensió del tumor i l'evidència de metàstasis.

**Taula I4. Sistema de classificació en grups clínics segons l'IRS.** Taula basada en (19).

Grup	Descripció
I	Malaltia localitzada completament extirpada
A	Confinada al múscul o òrgan d'origen
B	Afectació per contigüïtat, infiltració fora del múscul o òrgan d'origen
II	Extirpació macroscòpica total amb evidència d'extensió locoregional
A	Tumor amb resecció macroscòpica total i residu microscòpic
B	Malaltia regional amb afectació ganglionar extirpada completament sense residu microscòpic
C	Malaltia regional amb afectació ganglionar i extirpació macroscòpica total però amb evidència de malaltia microscòpica residual i/o afectació al gangli més distal de la resecció
III	Extirpació incompleta amb malaltia residual macroscòpica
A	Només després de la biòpsia
B	Després de la resecció del tumor amb >50% romanent
IV	Malaltia metastàtica present al diagnòstic (pulmons, fetge, ossos, medul·la òssia, cervell, músculs i ganglis a distància)

Un altre sistema d'estadiatge és el TNM (*tumor-nodes-metastasis*), aquest sistema inclou l'avaluació de la localització de la malaltia, l'extensió local, la mida, l'afectació dels ganglis i la presència de metàstasis (Taula I5). Aquesta estratificació ha demostrat un elevat valor predictiu de l'evolució dels pacients amb RMS (91,92).

Taula I5. Estadiatge TNM del RMS. Taula adaptada de (31,34).

Estadi	Localització	T-invasivitat	T-mida	N	M
I	Òrbita	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a o b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Cap i Coll	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a o b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Genitourinari	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a o b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
II	Bufeta/ Pròstata	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a	N <sub>0</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Extremitats	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a	N <sub>0</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Crani Parameningi	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a	N <sub>0</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Altres	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a	N <sub>0</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
III	Bufeta/ Pròstata	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	Extremitats	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Crani Parameningi	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
	Altres	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	b	N <sub>0</sub> N <sub>1</sub> o N <sub>x</sub>	M <sub>0</sub>
IV	Totes	T <sub>1</sub> o T <sub>2</sub>	a o b	N <sub>0</sub> o N <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
Definicions					
	T=tumor			N=nòduls	M=metàstasis
	T <sub>1</sub> : confinat al lloc d'origen anatòmic			N <sub>0</sub> : no afectats	M <sub>0</sub> : no metàstasis
	T <sub>2</sub> : estès			N <sub>1</sub> : afectats	M <sub>1</sub> : metàstasis
	a: ≤ 5cm de diàmetre			N <sub>x</sub> : desconegut	
	b: > 5cm de diàmetre				

### 1.1.1.8. Tractament

Els tractaments actuals del RMS inclouen la cirurgia, la radioteràpia i la quimioteràpia. La radioteràpia s'utilitza per controlar la malaltia residual local microscòpica o macroscòpica, mentre que la quimioteràpia s'utilitza per la citoreducció primària i per la malaltia metastàtica (31). Malgrat les aproximacions agressives que inclouen la cirurgia, la quimioteràpia i la radioteràpia, el pronòstic dels pacients amb malaltia metastàtica continua essent dolent.

Els principis generals del tractament són (19):

- Quimioteràpia. Tots els pacients diagnosticats de RMS han de rebre quimioteràpia. Els règims més àmpliament utilitzats són VAC: vincristina (VCR), actinomicina D (ACTD), ciclofosfamida (CFM); IVA: similar a VAC però amb ifosfamida (IFO) en lloc de CFM; VACA: VAC més adriamicina (ADR) alternat amb ACTD; VAIA: IVA amb ADR alternant amb ACTD.

Els pacients de baix risc es tracten amb VAC, tot i que les dosis de CFM són baixes; els pacients de risc intermedi reben una teràpia similar amb dosis més elevades de CFM juntament amb quimioteràpèutics addicionals i el pacients d'alt risc reben la mateixa teràpia que els de baix risc juntament amb irinotecan, etoposide i doxorubicina (34). En aquest últim grup també s'estan estudiant agents biològics.

- Cirurgia. És recomanable l'extirpació quirúrgica inicial de tumor en tots els pacients amb tumors resecables en un intent d'aconseguir una exèresis amb marges lliures de tumor (Grup I IRS). En cas que la cirurgia inicial no sigui possible o es previngui que serà mutilant, es recomana iniciar la quimioteràpia i realitzar la cirurgia després dels cicles inicials de radioteràpia.
- Radioteràpia. Es recomana radioteràpia per a tots els pacients en els quals la cirurgia radical no sigui possible o que després de la cirurgia persisteixen restes microscòpiques i macroscòpiques. La radioteràpia s'ha de realitzar amb aparells d'elevat voltatge, ha de ser conformada i la dosi i camps són decidits en funció de l'edat, localització, histologia i estadi.

Actualment, s'estan intentant incloure agents quimioterapèutics nous per al tractament del RMS. No obstant, varis agents que han mostrat activitat en estudis preclínic (trabectedin, cixutumumab i temsirolimus) no són efectius en assaigs clínics (93). Així doncs, existeix la necessitat de noves teràpies per a la reducció de l'índex de mortalitat i la millora de la qualitat de vida dels pacients.

## 2. Via de senyalització Wnt

La via de senyalització Wnt està involucrada en diversos processos del desenvolupament, tals com la proliferació cel·lular, la diferenciació i les interaccions epiteli-mesènquima en un ampli rang de teixits. Durant els primers estadis de l'embriogènesi, la via Wnt s'encarrega de la formació de l'eix corporal (94). Més endavant, és una via necessària per al desenvolupament de múltiples òrgans com el cervell, el ronyó, les glàndules mamàries, el tracte reproductiu, el múscul, els vasos sanguinis i les dents, entre d'altres (95). La via de senyalització Wnt pot ser de dos tipus: la via canònica, la qual és dependent de  $\beta$ -catenina, i la via no canònica, independent de  $\beta$ -catenina. La desregulació de la via causa defectes en el desenvolupament i pot ser causant de malalties com el càncer o l'Alzheimer.

### 2.1. Història de la via Wnt

L'any 1982, Nusse i Varmus varen identificar el proto-oncogèn de ratolí *int-1* (de l'anglès *integration 1*), fruit d'infectar ratolins amb el virus de tumor mamari de ratolí amb l'objectiu de descriure les mutacions causants d'aquests tumors (96,97). *Int-1*, el gen murí que varen descriure era similar al gen *Wingless (wg)* de *Drosophila melanogaster* (98,99). L'any 1991, varen canviar la nomenclatura dels gens *int* per *Wnt*. Es varen descriure 10 gens *Wnt* en ratolí (*Wnt-1*, *Wnt-2*, *Wnt-3*, *Wnt-3A*, *Wnt-4*, *Wnt-5A*, *Wnt-5B*, *Wnt-6*, *Wnt-7A* i *Wnt-7B*), tenint els tres primers homòlegs humans (*WNT-1*, *WNT-2* i *WNT-3*), tots ells codificant per polipèptids secretats d'aproximadament 40 kDa (100).

Posteriorment, es va descriure la importància dels gens *Wnt* en embrions de granota. En expressar de manera ectòpica els gens *Wnt* en embrions de granota es va induir la duplicació de l'eix embrionari en aquests embrions (101). Per altra banda, la deficiència dels gens *Wnt* va causar un desenvolupament anormal dels cervells en mamífers (102,103). McMahon et al. varen descriure que la mutació homozigota dels al·lels *Wnt-1* en ratolins causa l'absència de la major part del mesencèfal i del metencèfal en els primers dies de la gestació. En estadis més



avançats de la gestació, els fetus no presentaven mesencèfal ni cerebel i al néixer morien en les següents 24h, suggerint un paper de Wnt-1 en el desenvolupament d'una regió específica del SNC (102).

## 2.2. Via de senyalització Wnt canònica

La via de senyalització Wnt canònica s'activa mitjançant la unió dels lligands Wnt als receptors de la via (Frizzled i les proteïnes 5 i 6 associades a receptors LDL). Aquesta unió causa l'activació de la proteïna Dishevelled, la qual és capaç d'inactivar el complex que inhibeix la proteïna efectora de la via ( $\beta$ -catenina), promovent la seva translocació a nucli on activa els gens diana de la via.

### 2.2.1. Lligands Wnt

El gen *wg*, codificant pel lligand Wnt, es va identificar per primera vegada en *Drosophila melanogaster* degut a una mutació que transformava l'ala en una duplicació del nòtum (tòrax) (104). Posteriorment, es va descriure que les mutacions que inactiven completament la funció del gen *wg* són mutacions recessives que afecten al segment de polaritat i són letals per l'embrió (105,106).

Els lligands Wnt es troben altament conservats entre els éssers vius. En mamífers existeixen 19 lligands Wnt, els quals són glicoproteïnes riques en cisteïnes d'aproximadament 350-400 aminoàcids que contenen un pèptid senyal a l'N-terminal per a la seva secreció (107). Són proteïnes insolubles degut a la seva modificació per l'addició d'un àcid gras mono-insaturat (àcid palmític) unit a la Cys77 (108). Posteriorment, es varen descriure altres modificacions, com per exemple la unió de l'àcid palmitoleic a una serina altament conservada (Ser209) de Wnt3a (109). En el cas de Wnt5a, s'han descrit modificacions degudes a la unió d'àcid palmític a la Cys104 (110).

Per a la secreció dels lligands, és necessària la seva associació amb la proteïna Porcupine (Porc) al reticle endoplasmàtic (RE), donat que li transfereix l'àcid

palmític (111,112). Posteriorment, les proteïnes transmembrana Wntless (Wls) s'uneixen específicament a les proteïnes Wnt per a transferir-les a la membrana plasmàtica per a la seva secreció (113).

### 2.2.2. Receptors de la via Wnt

Hi ha dues famílies de receptors de la senyalització Wnt/ $\beta$ -catenina: els receptors Frizzled (Fz) i les proteïnes 5 i 6 associades a receptors LDL (LRP5 i LRP6; de l'anglès *LDL Receptor-related Proteins 5/6*), coneguts com a Arrow en *Drosophila* (114–117).

Les proteïnes Fz pertanyen a la família de proteïnes acoblades a proteïnes G; són receptors amb 7 dominis transmembrana amb una extensió a l'N-terminal anomenada domini ric en cisteïnes (CRD, de l'anglès *cysteine-rich domain*) on s'uneixen directament els lligands Wnt (114,118). El genoma humà manté 10 gens *FZ*, la majoria dels quals tenen capacitats variables per activar  $\beta$ -catenina quan es troben co-expressats amb LRP5/6 (119). Els receptors Fz estan involucrats tan en la via canònica com en la no canònica.

Els receptors LRP5 i LRP6 presenten una homologia del 70% entre ells, i una homologia del 45% a Arrow (120). Són receptors transmembrana que tenen un domini extracel·lular amb 4 tàndems de repetició de propulsors  $\beta$ /factor de creixement epidèrmic (EGF, de l'anglès *epidermal growth factor*), seguit de tres repeticions LDLR tipus A (120). La xaperona MESD és essencial pel correcte plegament del domini extracel·lular de LRP5/6 (121). Els dos LRPs tenen funcions diferents, LRP6 és essencial per a l'embriogènesi, mentre que LRP5 és dispensable en l'embriogènesi però crític per l'homeòstasi de l'os en adults (107).

### 2.2.3. $\beta$ -catenina

La  $\beta$ -catenina, proteïna codificada pel gen *CTNNA1* en humans i homòloga a la proteïna Armadillo en *Drosophila*, és l'efector central de la via Wnt canònica

(107,122). En absència de lligand, la  $\beta$ -catenina citosòlica forma un complex amb les proteïnes Caseïna cinasa  $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), GSK-3 $\beta$  (de l'anglès, *glycogen synthase kinase-3 beta*), Axina i Adenomatosis Poliposis Coli (APC) (123–125). Aquest complex es manté gràcies a la proteïna estructural Axina, la qual utilitza diferents dominis per interaccionar amb GSK-3 $\beta$ , CK1 $\alpha$  i  $\beta$ -catenina i regula la fosforilació de  $\beta$ -catenina per a la seva posterior ubiquitinització (126). Per a la degradació de  $\beta$ -catenina citosòlica cal la fosforilació de seu extrem N-terminal. La lligasa d'ubiquitines  $\beta$ -TrCP reconeix aquesta fosforilació i procedeix a la ubiquitinització de  $\beta$ -catenina (127). Un cop s'activa la via i el complex és inhibit per la proteïna Dishevelled,  $\beta$ -catenina s'acumula al citoplasma i es transloca a nucli on s'uneix a altres factors de transcripció, permetent la transcripció dels gens diana de la via (128).

#### 2.2.4. Factors de transcripció

La família de factors de transcripció d'unió a l'ADN *TCF/LEF* (de l'anglès *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor*) són les principals proteïnes associades a  $\beta$ -catenina implicades en la regulació dels gens efectors (129,130). En humans existeixen 4 gens *TCF/LEF* (*TCF1*, *TCF3*, *TCF4* i *LEF1*), tot i que l'*splicing* alternatiu i l'ús de promotors diferents produeixen un gran nombre de variants de *TCF* amb propietats diferents (129,130). Les proteïnes TCF són del grup de factors d'unió a l'ADN d'alta mobilitat (HMG; de l'anglès *high mobility group*); s'uneixen a una seqüència consens de l'ADN referida com a WRE (de l'anglès *Wnt responsive element*), CCTTTGWW (on W representa tan T com A), causant una curvatura a l'ADN que pot alterar l'estructura local de la cromatina (107). *TCF1* i *TCF4* actuen tan de repressors com d'activadors, *LEF1* sovint és un activador transcripcional, mentre que *TCF3* és majoritàriament un repressor (129,130).

La interacció del repressor Groucho (TLE1 en humans) amb TCF inhibeix l'expressió gènica ja que promou la desacetilació d'histones i la compactació de la cromatina. L'estabilització i l'acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina induïda pels lligands Wnt desplaça Groucho i es forma el complex TCF- $\beta$ -catenina. El complex

recluta altres coactivadors (tals com Legless i Pygopus) per a la posterior expressió dels gens diana de la via Wnt (131–133).

### 2.2.5. Antagonistes i agonistes de la via Wnt

Hi ha diverses famílies de proteïnes que antagonitzen i modulen la senyalització Wnt (resumits a la Taula I6). Les proteïnes sFRP, WIF1 i Cerberus s'uneixen als lligands Wnt de manera extracel·lular, i en el cas dels sFRPs també als receptors Fz, actuant així com antagonistes de les vies canònica i no canònica (Figura I5-A). Les proteïnes Tiki i APCDD1 són proteïnes transmembrana que s'uneixen també als lligands Wnt; APCDD1, a més, té la capacitat d'unir-se als receptors LRP. Una altra família d'antagonistes són aquelles proteïnes que inhibeixen els receptors LRP, entre les quals es troben les famílies de proteïnes DKK, SOST, Wise, MESD, Waif i IGFBP-4; les proteïnes IGFBP-4 també s'uneixen als receptors Fz per inhibir la seva funció. La família de proteïnes Shisa forma l'últim grup d'antagonistes encarregats de la inhibició dels receptors Fz. Les famílies d'antagonistes més estudiats són els sFRP i els DKK.

**Taula I6. Principals antagonistes de la via Wnt.**

Nom antagonista	Gens humans	Proteïna que inhibeix	Localització	Referència
sFRP	<i>sFRP (1-5)</i>	Wnt i Fz	Solubles	(134)
WIF1	<i>WIF1</i>	Wnt	Solubles	(135)
Cerberus	<i>CER1</i>	Wnt	Solubles	(136)
Tiki	<i>TIKI (1-2)</i>	Wnt	Transmembrana	(137)
APCDD1	<i>APCDD1</i>	Wnt i LRP	Transmembrana	(138)
DKK	<i>DKK (1-4)</i>	LRP	Solubles	(139)
SOST	<i>SOST</i>	LRP	Solubles	(140,141)
Wise	<i>SOSTDC1</i>	LRP	Solubles	(142)
MESD	<i>MESD</i>	LRP	RE	(121)
Waif	<i>TPBG</i>	LRP	Transmembrana	(143)
IGFBP-4	<i>IGFBP4</i>	LRP i Fz	Solubles	(144)
Shisa	<i>SHISA (2-9)</i>	Fz	Transmembrana	(145,146)

Les proteïnes sFRP (de l'anglès *secreted Frizzled related proteins*) juntament amb *Sizzled*, *Sizzled2* i *Crescent*, identificats en *Xenopus* i *Zebrafish* (147), formen una família d'antagonistes de la via Wnt. En mamífers s'han descrit 5 membres de la família sFRP (*sFRP1*, *sFRP2*, *sFRP3* (també anomenat *FRZB*), *sFRP4* i *sFRP5*). Les proteïnes sFRP s'uneixen als lligands Wnt i als receptors Fz de manera semblant a com ho fan els lligands Wnt (134,148–150). Aquests antagonistes tenen un CRD similar al dels receptors Fz; aquesta homologia crea una competència entre els sFRP i els receptors Fz per la unió dels lligands Wnt, disminuint, per tant, la unió Wnt-Fz (151). Per altra banda, els sFRP també poden formar complexos no funcionals amb Fz mitjançant el domini CRD, reduint així el nombre de receptors Fz disponibles a la membrana cel·lular (151–153). Alguns sFRPs tenen també activitat independent de Wnt regulant proteïnases extracel·lulars (153).

Les proteïnes WIF1 (de l'anglès *Wnt inhibitory factor 1*), codificades pel gen *WIF1*, s'uneixen als lligands Wnt inhibint la seva funció. Són proteïnes secretades que s'assemblen a la porció extracel·lular Derailed/RYK dels receptors Wnt transmembrana (135). Aquestes proteïnes no comparteixen similituds amb el domini CRD de Fz o dels sFRP, però sí que presenten una seqüència senyal a l'extrem N-terminal anomenada domini WIF (WD, de l'anglès *WIF domain*) altament conservat entre espècies i present també a la família RYK (de l'anglès *receptor-like tyrosine kinase*) (154). S'ha descrit que poden unir-se als lligands Wnt tan de la via canònica com de la via no canònica, unint-se específicament als lligands Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9a i Wnt11 (155).

Un altre inhibidor dels lligands Wnt és Cerberus (Cer), descrit per primera vegada en *Xenopus* per la seva implicació en l'organitzador d'Spemann (136). L'organitzador d'Spemann és l'àrea embrionària de la gàstrula dels amfibis capaç d'induir la diferenciació específica durant el desenvolupament d'aquests. Cerberus és una proteïna codificada pel gen *CER1* i presenta un domini anomenat *Cystine-knot*, domini sovint present en les citocines (156). És un antagonista dels senyals Wnt, Nodal i de les proteïnes morfogèniques òssies (BMP, de l'anglès *bone morphogenetic protein*) (157). Tiki1 és una metaloproteasa transmembrana antagonista dels lligands Wnt, actua mitjançant la seva acció proteasa eliminant 8 residus amino-terminals dels lligands Wnt (137). Aquest procés genera oligòmers

de Wnt oxidats amb menor capacitat d'unió als receptors. APCDD1 (de l'anglès *adenomatosis polyposis coli down-regulated 1*) és una glicoproteïna unida a la membrana i és també un gen diana de la via Wnt (138). Recentment, s'ha descrit que pot interaccionar *in vitro* amb Wnt3a i LRP5 inhibint la senyalització Wnt (158).

Les proteïnes Dickkopf (DKK) són antagonistes solubles del co-receptor LRP5/6 i estan considerats inhibidors específics de la via Wnt/ $\beta$ -catenina. DKK representa una família de proteïnes solubles, tenint, per tant, una senyalització tan autocrina com paracrina (159). Existeixen 4 gens *DKK* en humans (*DKK-1*, *DKK-2*, *DKK-3* i *DKK-4*) els quals presenten dos dominis CRD, en aquests dominis, les posicions de 10 residus de cisteïna estan altament conservats entre els membres de la família (139). La unió DKK-LRP es dona mitjançant un lloc d'unió no necessari per a les interaccions LRP-Fz o LRP-Wnt; al unir-se DKK-LRP6 s'impedeix la formació del complex Fz-LRP6, inhibint així la senyalització (160,161). L'expressió de *DKK-1* predomina en l'embriogènesi, mentre que l'expressió de *DKK-2* i *DKK-3* predomina en teixits adults; el patró d'expressió de *DKK-4* segueix essent incert (162).

El membre de la família més estudiat és *DKK-1*, el qual va ser identificat per primera vegada en *Xenopus laevis* com a proteïna secretada i necessària per a la inducció de la formació del cap mitjançant la inhibició de la via Wnt (163). L'any 1999, l'homòleg humà de *DKK-1* es va aïllar i caracteritzar bioquímicament (164). L'expressió de *DKK-1* com a organitzador d'Spemann es va descriure als estadis primerencs de la gàstrula de la granota. També s'ha descrit la seva expressió en el mesoderm paraxial i en la formació de les vèrtebres, i juntament amb *SHH* (lligand de la via Hedgehog; de l'anglès *Sonic Hedgehog*) en la formació i manteniment de la cresta ectodèrmica apical, component crític per la formació de les extremitats (165,166). Els ratolins *DKK-1*<sup>-/-</sup> moren al néixer i manquen de la majoria d'estructures del cap, incloent els ulls o els placodes olfactius (167). *DKK-1* és un potent inhibidor de la via Wnt, s'uneix amb elevada afinitat al receptor LRP6 (160,168). Aquesta unió però, no promou ni la internalització ni la degradació del receptor LRP6, sinó que indueix un canvi conformacional que impedeix la unió dels lligands Wnt (169,170). *DKK-1* també s'uneix a les proteïnes transmembrana Kremen impedit la senyalització Wnt (171). Mao et al. descriuen la formació d'un

complex ternari Kremen2-LRP6-DKK, el qual és ràpidament internalitzat i degradat, fet que redueix la presència dels receptors LRP a la membrana cel·lular i inhibeix la senyalització Wnt (171). No obstant, DKK-1 també s'ha relacionat amb l'activació de  $\beta$ -catenina de manera independent de la via Wnt, tot i que encara és un mecanisme poc estudiat (172). Per altra banda, Caneparo et al. expliquen la implicació de DKK-1 en la modulació dels moviments de la gastrulació regulant la via Wnt canònica i la via Wnt independent de  $\beta$ -catenina. Els autors demostren la unió entre DKK-1 i Kny (de l'anglès *glypican 4/6 homolog Knypek*); Kny és un component de la via no canònica PCP (de l'anglès *Planar Cell Polarity*) (172).

DKK-2 coopera amb els receptors Fz en el desenvolupament de l'eix corporal (173). Aquest inhibidor necessita la presència de Kremen2 per a inhibir la senyalització Wnt. En canvi, la seva interacció amb Kremen1 no té cap funció en la infra-regulació de la senyalització Wnt (174). DKK-3, inhibidor que presenta homologia de seqüència amb Soggy (*sgy*; un gen específic d'espermatòcits), per contra, no interacciona amb els receptors LRP o Kremen (139,171). Tot i que encara és desconegut el paper de DKK-3 en la inhibició de la via Wnt, s'ha descrit que DKK-3 té efectes sobre la via TGF- $\beta$  (de l'anglès *transforming growth factor- $\beta$* ) (175). La inhibició causada per DKK-4 és similar a la que realitza DKK-1, i Kremen2 promou també l'efecte inhibidor de DKK-4 (139,174).

SOST/Sclerostin actua com a lligand del receptor LRP5/6 inhibint la seva funció (140,141). SOST interromp la formació del complex Fz8-LRP6 (140). Les proteïnes Wise, les quals comparteixen homologia de seqüència amb SOST, interaccionen amb el co-receptor LRP6 inhibint la senyalització Wnt (142). Aquestes proteïnes interaccionen amb LRP6 mitjançant una de les nanses que formen els nusos de cistines (176). Les proteïnes Wise també poden inhibir la via Wnt mitjançant la retenció dels receptors LRP6 al reticle endoplasmàtic (177).

Les proteïnes MESD (de l'anglès *Mesoderm development LRP chaperone*) són xaperones essencials per al transport de LRP5/6 a la superfície cel·lular (121). MESD pot unir-se als receptors LRP6 i antagonitzar així la unió dels lligands (178–180). La regió C-terminal de MESD constitueix el domini d'unió de LRP5/6, impedit la unió dels lligands als receptors LRP (181). Un altre inhibidor de la via

Wnt canònica és Waif1/5T4 (de l'anglès *Wnt-activated inhibitory factor 1*), una proteïna transmembrana amb repeticions riques en leucines a la part extracel·lular codificada pel gen *TPBG* (de l'anglès *trophoblast glycoprotein*) (143). Waif1 és una proteïna que s'uneix als receptors LRP6 i impedeix la unió dels lligands. Aquesta proteïna, per altra banda és capaç d'activar la via Wnt no canònica (143). Un altre inhibidor és IGFBP-4, de la família de les proteïnes transportadores del factor de creixement similar a la insulina IGFBP (de l'anglès *insulin-like growth factor binding proteins*) (144). IGFBP-4 s'uneix directament als receptors LRP6 i Fz8, bloquejant la unió de Wnt3a (144).

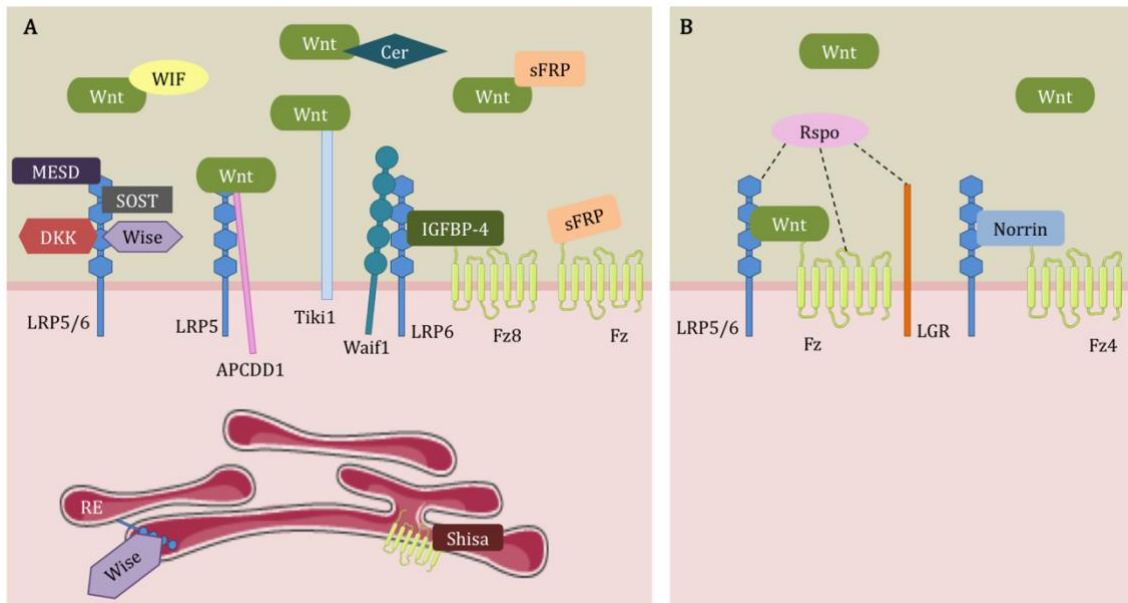
Les proteïnes Shisa representen una altra família d'antagonistes de la via Wnt, consten de 9 subfamílies en vertebrats (145,146). Comparteixen un domini CRD, un pèptid senyal, un segment transmembrana i una regió rica en prolines a l'extrem C-terminal (146). Les proteïnes Shisa atrapen les proteïnes Fz al RE, impeding la seva maduració i arribada a la superfície cel·lular (182).

Els agonistes de la via Wnt també actuen de moduladors de la senyalització. Els principals agonistes de la via Wnt són els mateixos lligands Wnt, altres famílies d'agonistes són les proteïnes Norrin i R-spondin (Rspo) (Figura I5-B). Les proteïnes Norrin són factors secretats que consisteixen en un domini de nus de cistines (183). Norrin, encara que no tingui homologia amb la seqüència dels lligands Wnt, és un lligand específic del CRD de Fz4. Actua mitjançant la seva unió a Fz4 i LRP5/6 activant la senyalització Wnt durant la vascularització retinal (184).

Les proteïnes Rspo mostren sinergia amb Wnt, Fz i LRP6 (185,186). En humans hi ha 4 gens que codifiquen per les proteïnes Rspo (*RSP01-4*). Tot i que el mecanisme és controvertit, interaccionen amb LRP6 i Fz8 (186,187). L'activitat de les proteïnes Rspo depèn de la presència dels lligands Wnt i LRP6 (188). Recentment, s'ha descrit que aquestes proteïnes s'uneixen als receptors LGR4 i LGR5 (de l'anglès *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*), activant tan la via canònica com la via no canònica de polaritat cel·lular (189). S'ha demostrat que les proteïnes Rspo s'uneixen a la part extracel·lular de l'inhibidor dels receptors de la via ZNRF3 (de l'anglès *zinc and ring finger 3*), fent que ZNRF3 i LGR4 formin un complex i s'elimini ZNRF3 de la membrana cel·lular (190). Rspo al inhibir-lo causa



un augment dels receptors LRP6 i Fz a la membrana. Per contra, recentment s'ha descrit que les proteïnes Rspo poden activar la senyalització Wnt sense els receptors LGR (191,192).



**Figura 15. Antagonistes i agonistes de la via Wnt.** **A:** Antagonistes de la via Wnt. La família de proteïnes Cer, WIF i sFRP s'uneixen directament als lligands Wnt, les proteïnes sFRP també s'uneixen a Fz. La família de proteïnes DKK i SOST/Wise s'uneixen al receptor LRP5/6, impedit la formació del complex Fz-LRP6. Wise també pot unir-se als receptors LRP6 al RE i retenir-los. Les proteïnes MESD i Waif1 poden unir-se als receptors LRP6, impedit la unió dels lligands. APCDD1 s'uneix als receptors LRP5 i als lligands Wnt per inhibir la senyalització. IGFBP-4 s'uneix als receptors LRP6 i Fz8 per impedir la unió dels lligands Wnt. Les proteïnes Shisa atrapen el receptor Fz al RE. **B:** Agonistes de la via Wnt. Els lligands Wnt són els principals agonistes de la via mitjançant la seva unió als receptors LRP5/6 i Fz. La família de proteïnes Norrin actua de manera similar a Wnt però s'uneixen específicament al receptor Fz4. Les proteïnes Rspo actuen mitjançant la seva unió a LRP5/6, als receptors Fz i/o als receptors LGR. Figura adaptada de (107).

### 2.2.6. Senyalització canònica

Quan la via Wnt canònica està inactiva,  $\beta$ -catenina es troba al citoplasma on s'associa amb el complex CK1 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , Axina i APC (123–125). L'Axina és la proteïna estructural encarregada de mantenir el complex format degut a la seva capacitat d'interacció amb els components del complex (Figura I6) (126). L'Axina és també l'encarregada de coordinar la fosforilació seqüencial de  $\beta$ -catenina a la serina 45 per part de la CK1 $\alpha$ . Posteriorment, GSK-3 $\beta$  fosforila  $\beta$ -catenina a la treonina 41, la serina 37 i la serina 33 (126,193,194). La fosforilació de  $\beta$ -catenina

a les serines 33 i 37 genera un lloc d'unió per la ligasa d'ubiquitines  $\beta$ -Trcp E3, conduint a la ubiquitinització i degradació de  $\beta$ -catenina (107,195). L'Axina conté també un domini regulador de la senyalització de la proteïna G (RGS; de l'anglès *regulator of G protein signaling*) que interacciona amb APC, una proteïna estructural que s'uneix per si sola a  $\beta$ -catenina (126). A part de fosforilar  $\beta$ -catenina, GSK-3 $\beta$  i CK1 $\alpha$  també fosforilen Axina i APC, induint així una major associació d'Axina i APC amb  $\beta$ -catenina, augmentant la seva fosforilació i posterior degradació (126).

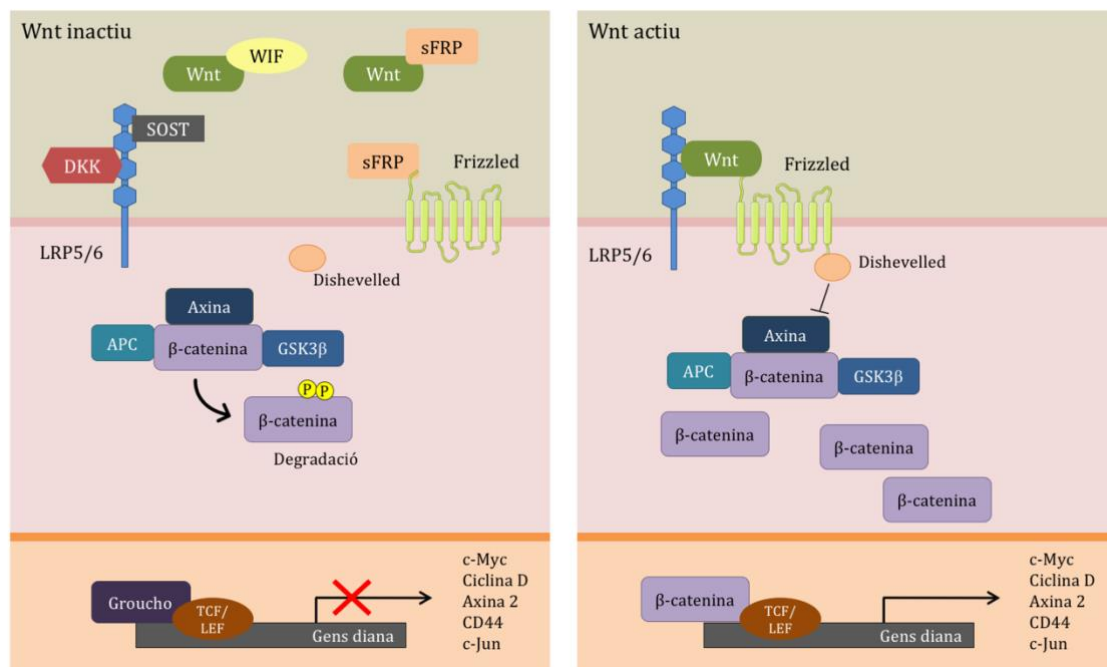
Altres proteïnes tals com WTX (de l'anglès *Wilms tumour gene on the X chromosome*) intervenen en la degradació de  $\beta$ -catenina. Aquesta proteïna s'uneix a  $\beta$ -catenina, Axina, APC i  $\beta$ -Trcp per promoure la ubiquitinització de  $\beta$ -catenina (196). Una altra proteïna d'unió a Axina, anomenada Diversin, pot facilitar la degradació de  $\beta$ -catenina mitjançant el reclutament de CK1 $\epsilon$  per fosforilar  $\beta$ -catenina (197).

Per a l'inici de la senyalització Wnt és necessària la unió dels lligands Wnt als receptors Fz i LRP5/6 (Figura I6). Els lligands Wnt de la via canònica són Wnt1, Wnt3a i Wnt8 (107). La unió dels lligands Wnt als receptors promou l'activació de Dishevelled (Dsh), una proteïna citoplasmàtica expressada de manera ubiqüa (198,199). Dsh interacciona directament amb els receptors Fz, mitjançant la unió del domini PDZ de Dsh, a una seqüència interna conservada de la regió C-terminal de Fz (200). PDZ és un domini comú en proteïnes de senyalització utilitzat en l'ancoratge de receptors de membrana a components del citoesquelet. Diverses cinases, tals com PAR-1, fosforilen Dsh per tal d'activar-la (199,201). No obstant, encara es desconeix el mecanisme pel qual la unió de Wnt a Fz activa la interacció del receptor amb Dsh i com es controla la fosforilació de Dsh. Dsh actua inactivant GSK-3 $\beta$ ; aquesta inactivació permet que la  $\beta$ -catenina activa s'acumuli al citoplasma i es fosforili al residu de serina 552 induint la seva translocació a nucli (202).

En absència dels lligands Wnt, els factors de transcripció *TCF/LEF* es troben interaccionant amb Groucho, el qual impedeix la transcripció dels gens diana i, per tant, inhibeix la senyalització Wnt (203). L'efecte inhibidor de Groucho està mediat

per la histona deacetilasa (HDAC, de l'anglès *histone deacetylase*) (204). Concretament, la HDAC Rpd3 forma un complex amb Groucho mitjançant el domini ric en glicina/prolina de Groucho, potenciant l'acció repressora d'aquest (204).

Un cop  $\beta$ -catenina es transloca a nucli, desplaça físicament Groucho del TCF/LEF causant l'activació dels gens diana (131,205). Els gens diana de la via inclouen *c-MYC*, *CCND1* (ciclina D1), *AXIN2*, *CD44* i *c-JUN* (206–210). Molts d'aquests gens, com *Ciclina D1* o *c-MYC*, tenen papers crucials en el creixement cel·lular, la proliferació i la diferenciació, i es troben desregulats en varis tipus de càncer (211).



**Figura 16. Representació de la via de senyalització Wnt canònica.** La via Wnt es troba inactiva degut a la inhibició dels lligands Wnt mitjançant els inhibidors sFRP o els WIF, o bé per la inhibició del co-receptor LRP5/6 mitjançant els inhibidors DKK o SOST. La  $\beta$ -catenina es troba formant un complex amb APC, Axina i GSK-3 $\beta$ , la qual fosforila  $\beta$ -catenina i promou la seva degradació. La via s'activa quan els lligands Wnt s'uneixen als receptors LRP5/6 i Frizzled, fet que activa la proteïna Dishevelled i aquesta inhibeix el complex APC-Axina-GSK-3 $\beta$ - $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina s'acumula al citoplasma i posteriorment es transloca a nucli on activa els gens diana de la via, tals com *c-Myc*, *Ciclina D*, *Axina 2*, *CD44* o *c-Jun*, entre altres. Imatge adaptada de (107).

### 2.3. Via de senyalització Wnt no canònica

La via de senyalització Wnt no canònica regula el desenvolupament i l'homeòstasi dels teixits, per exemple, aquesta senyalització està implicada en la regulació de la

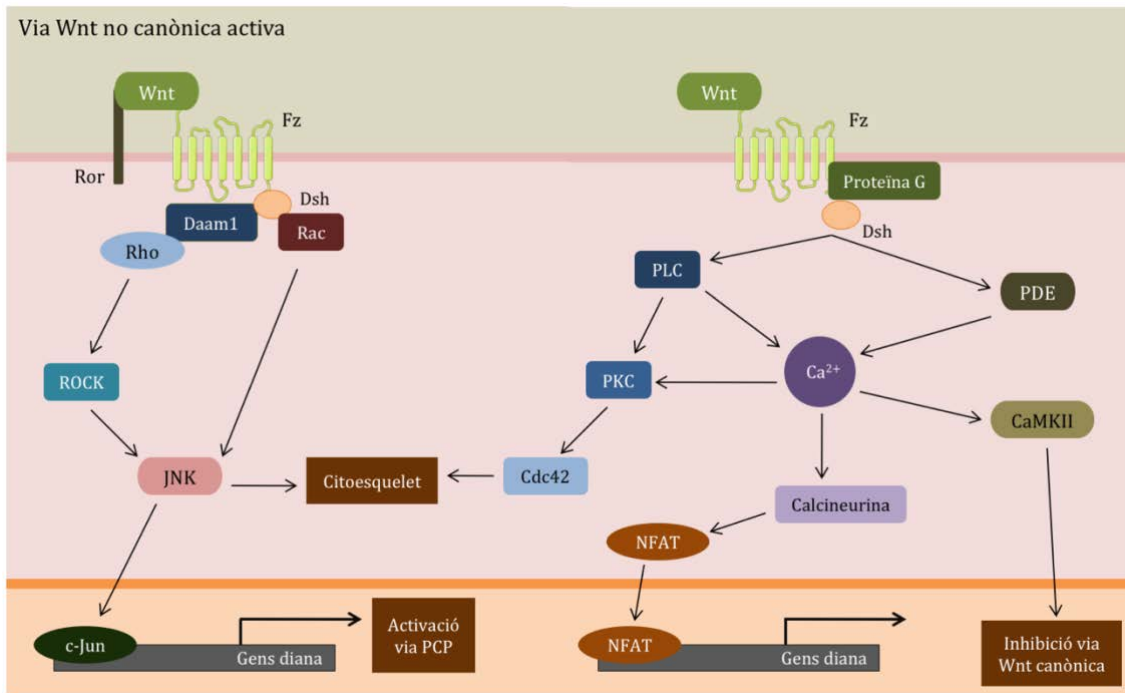
formació de l'os o del ronyó (212,213). S'han descrit desregulacions de la via en malalties com el síndrome de Down o el càncer (214). La via no canònica pot transduir el senyal Wnt mitjançant la via de polaritat cel·lular o bé mitjançant la via  $Ca^{2+}$ , en ambdós casos, utilitzant els receptors Fz.

L'any 1991 es va identificar Wnt5a en *Xenopus*, l'expressió ectòpica del qual en embrions de granota causava defectes en el desenvolupament del cap i la cua (215,216). Els efectes causats per Wnt5a diferien dels generats per Wnt1 suggerint, per tant, que la via de senyalització no era idèntica. Posteriorment, es va descriure que l'expressió de Wnt5a augmentava els nivells del  $Ca^{2+}$  intracel·lular de manera independent dels nivells de  $Ca^{2+}$  extracel·lular, suggerint l'activació d'una via de senyalització diferent (217).

Wnt5a és un dels lligands principals de la via Wnt no canònica. No obstant, els lligands Wnt4 i Wnt11 també hi estan involucrats. Els receptors Fz implicats en la via no canònica són Fz2, Fz3, Fz6 i Fz7 (218). Els receptors Ror (de l'anglès *Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*) també estan implicats en la senyalització de la via no canònica (219).

Dsh és la proteïna central en la mediació dels esdeveniments tan de la via canònica com la no canònica. En la via no canònica de polaritat cel·lular (PCP), la unió dels lligands Wnt als receptors Fz promou l'activació de Dsh, la qual s'uneix també als receptors Fz per activar la senyalització. Per altra banda, la via també es pot activar mitjançant la unió dels lligands Wnt5a als receptors Ror (219). Aquesta unió activa certes GTPases, tals com Rho i Rac, les quals activen les cinases JNK (de l'anglès *c-Jun N-terminal kinases*) (Figura I7) (220). Més recentment, s'ha descrit la necessitat de Daam1 (de l'anglès *dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*) per a l'activació de Rho (221). Daam1 s'uneix tan a Dsh com a Rho i regula la formació del complex Dsh-Rho (221). Posteriorment, Rho activa ROCK (de l'anglès *Rho-associated protein kinase*), un mediador de les vies de senyalització dependents de Rho, per activar les cinases JNK (222). Finalment, les cinases JNK s'encarreguen de l'activació de la via PCP mitjançant la fosforilació i activació del factor de transcripció c-Jun (223,224). La via PCP és l'encarregada de mantenir la forma de la cèl·lula ja que regula el citoesquelet (225).

En aquesta via també hi ha altres proteïnes implicades com Flamingo, Strabismus (en vertebrats anomenat VANGL, de l'anglès *Van Gogh Like protein*), Diego i Prickle, les quals són proteïnes citoplasmàtiques que s'associen a la membrana en la senyalització PCP (226).



**Figura 17. Representació de la via de senyalització Wnt no canònica.** La unió dels lligands Wnt als receptors Fz i Ror promou l'activació de Dsh, la qual pot activar les GTPases Rho i Rac. Per a l'activació de Rho cal la unió de Dsh amb Damm1 i Rho. La formació del complex Dsh-Rho promou l'activació de ROCK, proteïna capaç d'activar les cinases JNK. Rac pot activar també les cinases JNK, les quals poden tenir funcions tan en el citoesquelet com en l'activació del factor de transcripció c-Jun i activar així la via PCP. Per altra banda, la unió dels lligands Wnt als receptors Fz pot causar la unió al receptor d'una proteïna G i de Dsh, promovent així un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular mitjançant les proteïnes PLC i PDE. L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  pot activar la CaMKII i inhibir la via Wnt canònica o pot activar la calcineurina, proteïna que causa la translocació del factor de transcripció NFAT al nucli, activant així els gens diana. Les proteïnes PLC poden també activar les proteïnes PKC per finalment activar Cdc42 i tenir efectes al citoesquelet de les cèl·lules. Figura basada en (218).

En la via no canònica de  $\text{Ca}^{2+}$ , els receptors Fz després d'unir-se als lligands Wnt activen proteïnes G, les quals regulen l'activitat de PDE (fosfodiesterases), PLC (fosfolipasa C) i p38 (Figura 17) (227). L'activació d'aquestes proteïnes causa un augment del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, el qual activa tan la proteïna cinasa C (PKC, de l'anglès *protein kinase C*) com la CaMKII (proteïna-cinasa II calci/calmodulina-dependent) (228,229). La PKC activa la GTPasa Cdc42, una proteïna essencial per a

la remodelació del citoesquelet d'actina en la via PCP (230). Una altra proteïna activada per l'augment del  $\text{Ca}^{2+}$  és la calcineurina, una proteïna fosfatasa capaç d'activar el factor de transcripció NFAT (231). El factor de transcripció NFAT exerceix funcions crucials en el desenvolupament i en el sistema immune ja que s'han descrit interaccions amb els promotors de certes interleucines (232,233). Per altra banda, la via Wnt no canònica pot actuar com antagonista de la via Wnt canònica, tan per la via de la CaMKII, mitjançant la fosforilació de TCF, com per la regulació de NFAT (231,234).

#### **2.4. El paper de la via de senyalització Wnt en el desenvolupament del múscul**

La via Wnt canònica es troba activa durant la miogènesi fetal i feblement activa al múscul adult (235). La via de senyalització Wnt, per tant, està implicada en la miogènesi ja sigui durant l'embriogènesi com en la miogènesi adulta (236). Durant el desenvolupament embrionari, la via està involucrada en el control de l'expressió dels MRF, necessaris per a la diferenciació miogènica. En el múscul esquelètic adult la via Wnt regula la diferenciació de les cèl·lules mare del múscul, anomenades cèl·lules satèl·lit. La via Wnt regula la funció de MyoD i miogenina, essent l'activitat de l'última essencial per a la diferenciació terminal en el procés de la miogènesi (237–239). Recentment, s'ha descrit la interacció de  $\beta$ -catenina amb MyoD per regular la seva activitat transcripcional (240).

L'any 1961 es varen descobrir les cèl·lules satèl·lit al voltant de les fibres del múscul esquelètic, les quals s'activen per diferenciar-se gràcies a l'expressió de les vies de senyalització Notch, Wnt i Hedgehog (Hh) (241–243). Les cèl·lules satèl·lit embrionàries expressen *PAX3* i *PAX7*, l'expressió dels quals va disminuint gradualment a mesura que la diferenciació miogènica avança per a donar lloc a l'expressió de *Myf5*, *MyoD* i *miogenina* per a la formació dels miofibrils (244,245). Les cèl·lules de la superfície de l'ectoderm i el tub neural utilitzen l'expressió dels lligands *Wnt1*, *Wnt3a*, *Wnt4* i *Wnt6* per regular l'expressió de *PAX3* i *PAX7* en les cèl·lules premiogèniques (246). Durant la miogènesi embrionària, els lligands *Wnt1*, *Wnt3a* i *Wnt4* s'expressen a les regions dorsals del tub neural i juntament

amb la senyalització de SHH al notocordi, indueixen la miogènesi de les somites (75). Els lligands Wnt poden activar la miogènesi mitjançant l'expressió de Myf5 i MyoD, realitzada per Wnt1 o Wnt7a/Wnt6, respectivament (247). Wnt1 activa la miogènesi mitjançant l'activació de la via canònica i Wnt7a mitjançant la via no canònica (248,249).

Per la regeneració del múscul esquelètic, les cèl·lules satèl·lit, localitzades quiescents entre la làmina basal i les miofibres, s'activen amb senyals de dany per generar noves miofibres (250,251). Un cop activades, les cèl·lules satèl·lit expressen els factors miogènics MRF, tals com MyoD, Myf5 i miogenina, per aconseguir la diferenciació terminal de les cèl·lules (252,253). Tanmateix, la via Wnt regula la diferenciació i la regeneració de les cèl·lules satèl·lit. Wnt7a és capaç d'activar la divisió de les cèl·lules satèl·lit mitjançant l'activació de la via no canònica PCP (254). Per altra banda, la diferenciació de les cèl·lules satèl·lit es dona mitjançant un canvi d'expressió de la via Notch a la via Wnt canònica (236). S'ha descrit que l'activació de la via Wnt canònica, ja sigui mitjançant l'aplicació de Wnt3a, inhibidors de GSK-3 $\beta$  o activadors comercials de la via Wnt o Rspo, promou la diferenciació miogènica (185,236,255–257). Per tal d'estudiar la implicació de la via Wnt en el control de la diferenciació miogènica de les cèl·lules satèl·lit, Bernardi et al. varen descriure que la sobre-expressió de Wnt4 en els primers estadis de diferenciació causa una activació de la via Wnt canònica i un augment de Myf5 (258). Per tant, la via Wnt és essencial per a la diferenciació de les cèl·lules pre-miogèniques, la formació dels miotubs i finalment, la formació del múscul madur.

## **2.5. El paper de la via de senyalització Wnt en càncer**

La via Wnt, entre les seves funcions, s'encarrega de regular la renovació de les cèl·lules mare, fet pel qual la seva desregulació ha estat sovint relacionada amb diversos tipus de càncer (108). Als inicis del descobriment de la via ja es varen relacionar els lligands Wnt amb la tumorigènesi mamària en ratolins (97). Posteriorment, s'ha evidenciat el paper de la desregulació de la via en el creixement tumoral i en la capacitat invasiva i metastàtica. Per altra banda, alguns

components de la via, tals com  $\beta$ -catenina, sFRP, DKK, ciclina D1 o c-myc, entre altres, s'han estudiat com a biomarcadors de diagnòstic i/o pronòstic de la malaltia (259,260).

### 2.5.1. El paper de la via de senyalització Wnt canònica en càncer

La via Wnt sovint es troba activada en diversos tumors degut a mutacions en components de la via. En càncer de colon s'han descrit mutacions en *APC* i en el gen codificant per  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), essent les dues mutacions mutualment excloents (261,262). S'han descrit també mutacions en ambdós gens en tumors gastrointestinals, melanoma, càncer de fetge i carcinomes d'ovari causant una activació anormal de la via (263). En càncer de mama triple negatiu no s'han descrit mutacions en *CTNNB1* però els tumors presenten igualment una activació de la via i, com a conseqüència, un pitjor pronòstic (264). En carcinoma hepatocel·lular s'ha descrit que la mutació del gen *AXIN1*, a més a més de mutacions en *APC* i *CTNNB1*, contribueix al creixement del tumor (265).

Les desregulacions en aquesta via de senyalització s'han relacionat també amb càncer en la infància. En el hepatoblastoma (HB) s'han detectat mutacions en *CTNNB1* i en *APC* en casos esporàdics de la malaltia, i en menys freqüència en *AXIN1* (266–268). En el nefroblastoma (tumor de Wilms) i en pancreatoblastoma, s'han descrit mutacions en *CTNNB1* (269,270). En medul·loblastoma (MB) s'han descrit mutacions en *APC* en casos esporàdics de la malaltia i, en menys freqüència, s'han detectat mutacions en *CTNNB1* (271,272). Aquestes mutacions es relacionen amb el creixement tumoral i podrien relacionar-se inclús amb el pronòstic. La desregulació de la senyalització per Wnt podria causar malalties hematològiques, com per exemple la leucèmia, donat que s'ha ressaltat la importància de les proteïnes Wnt en la regulació del desenvolupament de les cèl·lules T, la seva activació i la maduració de les cèl·lules dendrítiques (273). Tal com es detalla més endavant en l'apartat 2.6, aquesta via de senyalització també s'ha relacionat amb el creixement del RMS degut a la seva implicació en la diferenciació de les cèl·lules miogèniques. Així doncs, l'estudi de la implicació de la via Wnt en tumors



pediàtrics podria conduir al descobriment de noves estratègies terapèutiques pel seu tractament.

#### **2.5.1.1. El paper dels inhibidors de la via de senyalització Wnt en càncer**

Degut a l'activació de la via Wnt en múltiples tipus de tumors, els inhibidors de la via s'han descrit generalment com gens supressors de tumors. El silenciament o la baixa expressió dels inhibidors de la via - sFRP, DKK i WIF1 - s'han descrit en certs tipus de tumors. S'han descrit metilacions en els gens de *sFRP* en tumors de pròstata, càncer de mama, càncer d'ovari i càncer colorectal, entre altres, fet que sovint està relacionat amb mal pronòstic, amb la tumorigènesi, l'agressivitat del tumor o la presència de metàstasis (274–279). La baixa expressió dels gens *DKK*, ja sigui degut a la metilació dels promotors o degut a altres mecanismes, s'ha descrit en casos de càncer colorectal, càncer renal, carcinoma hepatocel·lular o càncer gàstric, entre altres (280–283). El silenciament degut a metilacions al gen *WIF1* també s'ha descrit en certs tipus de càncer tals com càncer de pulmó, càncer colorectal, càncer de mama o càncer de bufeta, entre altres (284–287). El silenciament epigenètic d'aquests inhibidors indueix la proliferació cel·lular i l'augment de la invasió, i sovint es relaciona amb el pronòstic dels pacients, essent en certs casos marcador epigenètic de diagnòstic o pronòstic.

La baixa expressió de DKK-3 s'ha descrit en múltiples càncers tals com càncer de pulmó, carcinoma renal o hepatocarcinoma, entre d'altres (288–290). Recentment, s'ha descrit el possible ús del vector adenovíric amb el gen humà REIC (de l'anglès *reduced expression in immortalized cell*)/DKK-3 (Ad-REIC) com a teràpia gènica per pacients amb càncer (291). Aquest vector codifica pel gen supressor de tumors DKK-3, l'expressió del qual indueix apoptosi i redueix el creixement tumoral, atribuint-li així propietats anti-tumorals (291). En aquesta línia, estudis clínics amb aquest vector s'estan realitzant per pacients amb càncer de pròstata.

Estudis més recents relacionen els inhibidors de la via Wnt menys estudiats amb el creixement de certs tumors, assenyalant-los com a gens supressors de tumors. Per

exemple, el gen *APCDD1* s'ha descrit silenciada epigenèticament en osteosarcoma, contribuint així en el procés d'invasió i metastàsis (292). En càncer de pròstata s'ha evidenciat la reducció de l'expressió de *SOST* promovent les metastàsis a os (293). Per altra banda, el gen *Wise/SOSTDC1* s'ha descrit infra-regulat en càncer de pulmó tenint efectes en el creixement del tumor (294). En càncer de mama, el tractament amb *MESD* disminueix la migració i la invasió cel·lular (295). Els treballs que relacionen els esmentats inhibidors amb la tumorigènesi són escassos. No obstant, actualment s'està estudiant més la seva implicació en la progressió tumoral.

La baixa expressió dels inhibidors de la via Wnt també s'ha evidenciat en certs tumors infantils. Els gens *sFRP* presenten una baixa expressió en tumors com leucèmies, MB o NBL (296–301). A més, s'ha descrit una baixa expressió de *DKK* en leucèmies, tumors de Wilms, MB i NBL, relacionant la baixa expressió amb un pitjor pronòstic (302–311). Un altre exemple és el gen *WIF1*, el qual es troba metilada en osteosarcoma, leucèmia i NBL (303,312–316). El silenciament de *SOST* en retinoblastoma i osteosarcoma promou la proliferació i la invasió cel·lular (317,318).

Contràriament, en certs casos, els inhibidors de la via Wnt realitzen funcions d'oncogens. S'han detectat nivells elevats d'*sFRP* en càncer de pròstata, càncer gàstric, càncer renal, mieloma múltiple i càncer de pulmó, entre altres (319–328). L'elevada expressió de *DKK* en pacients amb càncer d'estómac, mieloma múltiple, càncer hepàtic, càncer de mama, càncer de pròstata o càncer de pulmó s'ha correlacionat amb un pitjor pronòstic (329–338). Altrament, expressions elevades de l'inhibidor *SOST* també s'han detectat en mieloma múltiple (339,340).

En càncer infantil existeixen poques investigacions que relacionin els antagonistes de la senyalització Wnt amb funcions oncogèniques. Un exemple de l'existència d'aquesta relació és el cas de l'osteosarcoma i el gen *sFRP2*, el qual es troba sobre-expressat en tumors, augmentant la capacitat invasiva de les cèl·lules (341). Aquest estudi descriu també que la infra-expressió de *sFRP2* disminueix la capacitat invasiva *in vitro*. En RMS s'ha descrit la sobre-expressió del gen *sFRP3*, i que el seu bloqueig inhibeix el creixement cel·lular (342). En HB i tumors de Wilms

s'ha descrit una elevada expressió de DKK-1, relacionant la seva expressió amb la inhibició de la via en aquests tumors (306). Una elevada expressió de DKK-1 s'ha descrit també en sèrum de pacients amb osteosarcoma, relacionant l'expressió del gen amb el pronòstic i inclús seleccionant-lo com a diana terapèutica de la malaltia (343,344). En NBL, nivells elevats de DKK-1 es varen descriure en pacients amb malaltia metastàtica i amb baixa resposta a la quimioteràpia (345). Un altre cas és la sobre-expressió del gen DKK-2 en sarcoma d'Ewing, en aquest tumor DKK-2 està implicat en la invasió i la osteòlisis causada pel tumor (346).

La via Wnt, per tant, té efectes duals segons el tipus de tumor, podent ser una via pro-tumorigènica o anti-tumorigènica. Així doncs, són necessaris més estudis per a una millor comprensió del paper de la desregulació de la via Wnt en tumors adults i pediàtrics.

### **2.5.2. El paper de la via de senyalització Wnt no canònica en càncer**

El paper de la via de senyalització Wnt no canònica en càncer és encara controvertit. Pocs estudis relacionen la implicació de la via no canònica durant el creixement tumoral. Malgrat aquesta carència d'estudis, el lligand principal de la via no canònica, Wnt5a, s'ha trobat sobre-expressat en varis tipus de tumors com per exemple càncer de pulmó, càncer de mama, càncer de pròstata, tumors gàstrics i càncer de pàncrees, entre altres (347). S'ha estudiat la possible implicació de Wnt5a en la migració i invasió cel·lular, tot i que s'ha descrit que pot tenir funcions tan d'oncogèn com de gen supressor tumoral depenent del tumor (347). Més concretament, en melanoma metastàtic s'ha descrit la implicació de Wnt5a en l'activació de PKC, promovent així la invasió cel·lular (348).

Un altre component de la via no canònica que s'ha trobat alterat en múltiples tumors és el receptor Fz6. Per exemple, en glioblastoma, els pacients amb nivells elevats de Fz6 es relacionen amb un pitjor pronòstic i risc de recurrència (349,350). En càncer de mama, Fz6 està freqüentment amplificat i la inhibició de la seva expressió redueix la invasió i la metàstasi *in vivo* (351). Un altre estudi descriu el paper de Fz6 en NBL, on l'expressió del receptor està relacionada amb

una major agressivitat del tumor concloent que Fz6 podria ser un bon marcador d'agressivitat en NBL (352). En càncer de còlon i en carcinoma de cèl·lules escamoses s'ha descrit també una sobre-expressió del receptor relacionant així l'expressió de Fz6 amb la progressió d'aquest tumor (353,354).

*VANGL1* és un altre component de la via Wnt no canònica que ha estat relacionat amb la tumorigènesi. En carcinoma hepatocel·lular s'ha identificat una elevada expressió del gen *VANGL1*, fet que l'ha posicionat com a possible diana terapèutica (355). A més a més, s'ha descrit la implicació de *VANGL1* en el creixement d'altres tumors com el càncer de mama (356). Més recentment, s'ha descrit que la sobre-expressió de *VANGL2* en càncer de mama està associada a un pitjor pronòstic (357). Altres components de la via com per exemple *VANGL2*, *Celsr1*, *Prickle1*, *Fz3*, *Fz7*, *Dsh2*, *Dsh3* o la *CK1ε* es troben sobre-expressats en pacients amb leucèmia (358). Tot i que ja s'han relacionat alguns dels components de la via amb la malaltia, es necessiten més estudis per definir la seva implicació en el comportament de les cèl·lules tumorals.

## 2.6. El paper de la via de senyalització Wnt en RMS

El primer estudi que va relacionar la via Wnt amb el RMS va descriure una baixa expressió de  $\beta$ -catenina en línies cel·lulars de RMS en comparació amb mioblasts control (359). Aquesta disminució de l'expressió de  $\beta$ -catenina en RMS, però, no resultava de la presència de mutacions en l'exó 3 de *CTNNB1*, localització més comú de les mutacions de *CTNNB1* (360). Aquest estudi va concloure que els tumors de RMS analitzats no presenten mutacions en  $\beta$ -catenina. A més a més, varen determinar que  $\beta$ -catenina té una localització majoritàriament citoplasmàtica, fet que indicaria que no té efectes en la tumorigènesi del RMS pediàtric (360). Posteriorment, es va descriure una infra-regulació de la via Wnt en RMSe. Concretament, en aquest subtipus de RMS es va demostrar que l'activació de la via utilitzant LiCl indueix la diferenciació miogènica, resultat mesurat mitjançant el marcador de diferenciació MyoD (361). Més endavant, Shukla et al. varen descriure mutacions en l'exó 3 del gen *CTNNB1* en un 3.3% de RMSe, tot i que no varen validar l'acumulació nuclear d'aquesta (362). Seguidament, un altre estudi

va identificar també mutacions en *CTNNB1* en un 7% de tumors de RMSe, i en un 20% dels casos es va detectar acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina (363). No obstant, en aquest estudi es va determinar que les mutacions en *CTNNB1* per si soles no indueixen tumorigènesi o diferenciació. Posteriorment, es varen demostrar els efectes de l'addició del lligand Wnt3a als cultius cel·lulars sobre la diferenciació (364). En aquest estudi, Annavarapu et al. varen demostrar una reducció de la proliferació en línies cel·lulars de RMS després del tractament amb Wnt3a. També varen descriure un augment dels marcadors de diferenciació miogènica: MyoD1, miogenina i Myf5 (364). És a dir, la via Wnt es troba inhibida en RMS i la seva activació promou la diferenciació de les línies cel·lulars de RMS, reduint com a conseqüència la proliferació cel·lular.

L'estudi de l'expressió dels marcadors de miodiferenciació va analitzar l'expressió de miogenina en la línia cel·lular RH30 (RMSa). Aquest estudi revela la fosforilació directa de la miogenina causada per GSK-3 $\beta$  *in vitro*, provocant la inhibició de la seva funció i causant un fenotip proliferatiu d'aquestes cèl·lules (365). En estudis posteriors es va induir l'activació de la via Wnt mitjançant inhibidors de GSK-3 $\beta$ , mostrant una disminució de la proliferació i la inducció de la diferenciació de les cèl·lules propagadores de tumors de RMSe *in vitro* i *in vivo* (366). S'ha descrit també que l'inhibidor de la via Wnt *sFRP3* està sobre-expressat en línies cel·lulars de RMSa i que el seu bloqueig inhibeix el creixement i indueix la diferenciació de les línies cel·lulars de RMSa *in vitro* i *in vivo* (342). En aquest estudi també descriuen que els efectes del bloqueig de *sFRP3*, juntament amb el tractament amb quimioteràpia VCR, és més efectiu en la reducció del tumor de RMSa *in vitro* i *in vivo*. L'estudi més recent que relaciona la via Wnt i el RMS descriu que el 50% dels tumors, tan RMSa com RMSe, sobre-expressen el factor de transcripció de la via LEF1 (367). Dräger et al. descriuen la implicació de LEF1 en la supressió de la proliferació, la migració i la invasió en línies cel·lulars de RMS, tan *in vitro* com *in vivo*, induint la miodiferenciació de les cèl·lules tumorals.

Recentment, s'ha descrit la implicació de la via Wnt no canònica PCP, concretament de VANGL2, en el creixement i la recidiva de les cèl·lules propagadores de tumors en RMS (368). En aquest estudi, Hayes et al. varen comprovar l'elevada expressió

de *VANGL2* en la majoria de RMS i que el seu bloqueig produïa efectes inhibidors de proliferació i induïa diferenciació *in vitro* i *in vivo*.

## 2.7. Activadors de la via Wnt

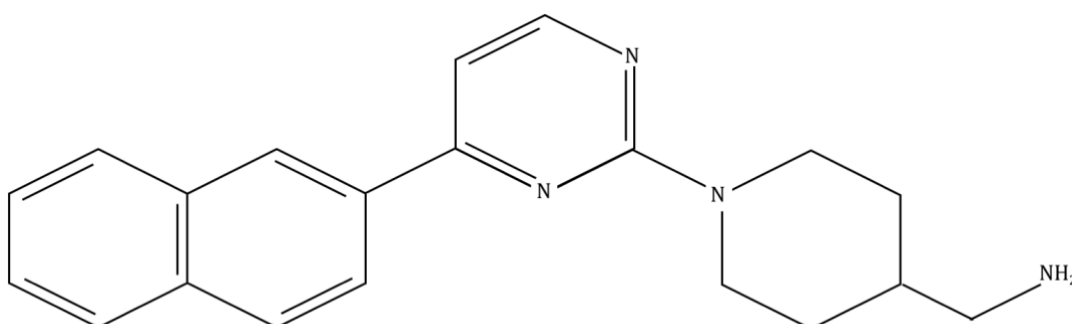
La desregulació de la via Wnt és freqüentment la causa de certes malalties. Amb la finalitat d'estudiar els efectes causats per aquesta desregulació sovint es necessiten mecanismes capaços d'activar o inhibir la via. L'activació de la via Wnt pot aconseguir-se mitjançant la incubació de les línies cel·lulars amb proteïnes Wnt purificades (comercialment disponibles) o amb medi condicionat provinent de línies cel·lulars productores de lligands Wnt (disponibles a l'ATCC: Wnt3a (CRL-2647) i Wnt5a (CRL-2814)). Recentment, s'han generat anàlegs de les proteïnes Wnt, heterodimeritzadors de Fz-LRP5/6 solubles en aigua, els quals són capaços d'activar la senyalització de  $\beta$ -catenina (369). L'ús dels agonistes de la via Wnt (Rspo i Norrin), també constitueix una aproximació per activar la via Wnt (184,185).

Per altra banda, hi trobem els inhibidors dels components de la via, com per exemple el LiCl, el qual inhibeix l'activitat de GSK-3 $\beta$  promovent així la translocació de  $\beta$ -catenina a nucli (361,370). S'han descrit altres inhibidors farmacològics que inhibeixen GSK-3 $\beta$ , tals com BIO, CHIR99021 o *sotrastaurin*, activant així la via Wnt canònica (366,371–373).

Existeixen també inhibidors comercials de les proteïnes sFRP o DKK utilitzats per activar la via Wnt. Un exemple són els inhibidors de sFRP1, CAS 915754-88-0 (Calbiochem) o WAY-316606 (ApexBio) (374). Bodine et al. varen descriure l'elevada afinitat d'unió del compost a sFRP1, estimulants així l'activació de la via canònica i promovent la formació òssia (374). Una altra manera d'inhibir aquestes proteïnes és mitjançant anticossos, per exemple s'han generat anticossos bloquejants de sFRP5 capaços d'activar la senyalització Wnt (375).

En el cas de DKK, l'inhibidor NCI8642 és capaç de bloquejar la interacció entre DKK-1 i LRP6 (376). L'inhibidor de DKK-1 anomenat *1-(4-(Naphthalen-2-*

*yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine*, més conegut com a WAY-262611, és un compost que al inhibir DKK-1 promou la interacció Wnt3a-LRP5. La seva funció és inhibir la formació del complex DKK-1-LRP5-Kremen, impedit així la internalització dels receptors LRP5 i activant la via Wnt. Pelletier et al. varen descriure per primera vegada els efectes del compost en la inhibició de DKK-1 i la posterior activació de la via Wnt, amb efectes addicionals en la formació d'os (Figura I8) (377). Diversos estudis remarquen la capacitat d'aquest últim compost per inhibir DKK-1 i activar conseqüentment la via de senyalització Wnt (378,379).



**Figura I8. Estructura de l'inhibidor de DKK-1:** WAY-262611 ((1-(4-(Naphthalen-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine). Imatge adaptada de (377).

S'han descrit també efectes del compost en la diferenciació cel·lular dels osteoblasts en cèl·lules provinents de mieloma múltiple, representant així una possible teràpia per a aquesta malaltia (380). Per altra banda, s'ha relacionat l'activació de la via Wnt, mitjançant WAY-262611, amb una reducció de la transició mesènquima-epiteli (381). Altres estudis evidencien el requeriment l'expressió endògena de DKK-1 per a la formació del mesoderm i que la seva inhibició no permet la formació de la capa germinal (382). A més, certs estudis relacionen l'aplicació del compost amb l'activació del creixement de les cèl·lules estrellades hepàtiques (HSC, de l'anglès *hepatic stellate cells*) i la inhibició de la lipogènesi en aquest tipus cel·lular (383). Altres investigacions evidencien el paper de WAY-262611 en artritis reumatoide, el qual inhibeix la migració dels sinoviòcits, unes cèl·lules similars a fibroblasts localitzades al líquid sinovial de les articulacions (384). Aquest estudi explica la capacitat de WAY-262611 per inhibir DKK-1, suprimint així la localització citoplasmàtica de  $\beta$ -catenina i inhibint les vies de

senyalització relacionades amb FAK (de l'anglès *focal adhesion kinase*). Per altra banda, un altre estudi va demostrar l'eficàcia del compost en la protecció de la infecció per *Leishmania major* en ratolins (385).

S'han realitzat diversos estudis amb anticossos contra DKK-1 per tal d'activar la via. Un exemple és el cas de RH2-18, un anticòs monoclonal humà contra DKK-1 capaç d'activar la via Wnt i constituir un possible tractament per l'osteoporosi (386). Un altre anticòs contra DKK-1 és BHQ880, el qual inhibeix el creixement i les metàstasis de l'osteosarcoma (344). Aquest anticòs neutralitzant de DKK-1 es troba en assaigs clínics per al tractament del mieloma múltiple (387). Així doncs, existeixen diversos estudis que evidencien el paper de DKK-1 en diversos tumors, assenyalant-lo com una diana terapèutica.

### **2.7.1. Activadors de la via Wnt aplicats en assaigs clínics**

Els estudis dels antagonistes de la via Wnt que es troben en assaigs clínics són escassos ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). No ha estat fins recentment que s'han iniciat diversos assaigs clínics implicant els inhibidors de la via més estudiats. Actualment, s'està avaluant el paper dels antagonistes sFRP i DKK com a biomarcadors de diagnòstic i pronòstic en càncer (388).

La inhibició de DKK-1 mitjançant anticossos monoclonals per al tractament de certs tumors ha mostrat efectes prometedors *in vitro* i *in vivo* (389,390). L'anticòs monoclonal neutralitzant de DKK-1, anomenat DKN-01, està essent avaluat en assaigs clínics per al seu ús com a monoteràpia o en combinació amb altres agents quimioteràpics per al tractament de certs tumors (Taula I7) (391). L'anticòs BHQ880, el qual també inhibeix DKK-1, es troba en assaigs clínics per al tractament del càncer (387,390). Actualment, s'estan avaluant els efectes dels esmentats anticossos en pacients. Tot i que la tolerància d'ambdós anticossos és bona, encara s'estan estudiant els beneficis clínics del seu ús com a possible teràpia en càncer (391,392). Finalment, s'ha investigat l'aplicació de vacunes contra DKK-1, les quals s'utilitzen cèl·lules dendrítiques per presentar DKK-1 a les cèl·lules



immune anti-canceroses perquè posteriorment siguin capaces d'atacar les cèl·lules de mieloma (393,394).

**Taula I7. Inhibidors de DKK-1 en assaigs clínics.**

Nom compost	# assaigs totals	# assaigs oberts	Tumors estudiats
DKN-01	6	3	Carcinoma hepatocel·lular, mieloma múltiple, tumors sòlids, càncer de pulmó, càncer d'esòfag, càncer d'endometri, càncer d'úter, càncer d'ovari, càncer de vesícula biliar, carcinoma del sistema biliar (intrahepàtic i extrahepàtic)
BHQ880	3	-	Mieloma múltiple
Vacuna DKK-1	1	1	Mieloma múltiple

\* dades extretes de [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) a data de 17 d'octubre 2018

Altres assaigs clínics avaluen la inhibició d'antagonistes de la via en altres malalties. Un exemple és la inhibició de SOST mitjançant un anticòs anomenat Blosozumab per al tractament de l'osteoporosi (395). Dos altres anticossos monoclonals contra SOST són BPS804 i Romosozumab, els quals estan essent avaluats en assaigs clínics per al tractament de la mateixa malaltia (396,397).

Tot i haver-se iniciat assaigs clínics en certs antagonistes de la via Wnt, la majoria d'ells no estudien les aplicacions en càncer. Recentment, s'han començat a estudiar les possibles aplicacions dels antagonistes com a biomarcadors, però és només la inhibició de DKK-1 la que està essent estudiada en múltiples tumors.

## II. HIPÒTESI I OBJECTIUS



Tot i l'aplicació dels tractaments més intensius, aproximadament el 30% dels pacients amb RMS moren degut a la malaltia. Concretament, els pacients amb malaltia residual després de la cirurgia, juntament amb els pacients metastàtics, representen una població més propensa a les recidives i amb menor supervivència. Els pacients amb RMS metastàtic segueixen tenint un mal pronòstic, presentant una supervivència als 5 anys de tan sols el 20%. Malgrat els pacients amb malaltia localitzada tinguin un millor pronòstic, presentant una supervivència d'aproximadament el 70%, el 30% dels pacients amb malaltia localitzada experimentaran recidives. Així doncs, el desenvolupament de noves teràpies específiques contra aquesta malaltia, juntament amb la teràpia convencional, podrien ser beneficioses per millorar les taxes de supervivència actuals.

No obstant, els components cel·lulars que regulen processos cel·lulars com la proliferació o la metàstasi en RMS segueixen essent en gran mesura desconeguts. Per tal de desenvolupar noves teràpies pel tractament del RMS, cal identificar les molècules implicades en aquests processos. En RMS, l'activació de la via Wnt sovint s'ha relacionat amb el procés de diferenciació, atribuint-li així un paper supressor-tumoral. Tot i això, el mecanisme d'inactivació de la via Wnt en RMS continua essent desconegut. Per tant, hipotetitzem que la identificació de les molècules responsables de la inhibició d'aquesta via en RMS pot permetre el descobriment de noves dianes terapèutiques amb el potencial de millorar la supervivència dels pacients amb aquesta malaltia.

**Objectiu principal:** determinar el paper de DKK-1 sobre la inhibició de la via Wnt en RMS i establir els efectes anti-oncogènics del seu bloqueig.

Per tal de complir l'objectiu principal s'han establert objectius parcials:

1. Determinar l'expressió dels inhibidors de la via Wnt en tumors i línies cel·lulars de RMS.
2. Determinar l'efecte de la inhibició de DKK-1 en les cèl·lules de RMS.

- 2.1. Analitzar els efectes de la infra-regulació gènica de l'inhibidor *DKK-1* mitjançant shRNA sobre l'estat d'activació de la via Wnt, la proliferació, la diferenciació i la invasió de les cèl·lules de RMS *in vitro*.
- 2.2. Estudiar l'efecte de l'activació de la via Wnt, mitjançant la inhibició farmacològica de DKK-1, sobre la proliferació, la diferenciació i la invasió de cèl·lules de RMS *in vitro*.
3. Determinar l'efecte de la inhibició de DKK-1, tan genètica com farmacològica, sobre el creixement tumoral i la implantació de metàstasis *in vivo*.

### III. MATERIALS I MÈTODES



## 1. Mostres tumorals

Les mostres tumorals es varen obtenir de la col·lecció privada del nostre grup d'investigació (Instituto de Salud Carlos III, número de col·lecció C.0002311). Les mostres de tumors primaris es varen utilitzar per l'extracció i anàlisi d'ARN i proteïna, tal com es detalla als apartats 5.1 i 6.1. Prèviament, es va obtenir el consentiment informat d'acord amb la declaració de Hèlsinki de tots els pacients o dels seus tutors legals. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

## 2. Cultius cel·lulars

### 2.1. Línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars de RMS es varen cultivar en *Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts* (MEM; Biowest), suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS, de l'anglès *Fetal bovine serum*; Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvat sòdic, 1% d'aminoàcids no essencials, 100U/mL de penicil·lina i 0.1mg/mL d'estreptomicina (tots els reactius provinents de Biowest). Totes les línies cel·lulars es varen adquirir a la *American Type Culture Collection* (ATCC), excepte les línies cel·lulars RD i RH18 que varen ser cedides pel Dr. Beat Schäfer i la línia CW9019 que es va generar al laboratori de la Dra. Jaclyn Biegel. A la Taula M1 es detallen les característiques de línies cel·lulars de RMS utilitzades (veure l'autenticació de les línies cel·lulars a l'Annex 1).

**Taula M1. Característiques del panell de línies cel·lulars de RMS.** Taula basada en (398).

Nom	Histologia	Translocació	Origen
<b>RH30</b>	Alveolar	<i>PAX3-FOXO1</i>	Medul·la òssia (metàstasi)
<b>RH4</b>	Alveolar	<i>PAX3-FOXO1</i>	Pulmó (metàstasi)
<b>CW9019</b>	Alveolar	<i>PAX7-FOXO1</i>	Desconegut
<b>RH18</b>	Alveolar	-	Perineu
<b>HTB82</b>	Embrionari	-	Braç
<b>RD</b>	Embrionari	-	Pelvis
<b>RUCH2</b>	Embrionari	-	Vagina



Les línies cel·lulars HEK 293T, adquirida a l'ATCC i utilitzada per la producció de partícules lentivirals, i la línia cel·lular L-Wnt3a productora del lligand Wnt3a, cedida pel Dr. Diego Arango, es varen cultivar en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) enriquit amb glucosa, L-glutamina i piruvat (Thermo Fisher Scientific), suplementat amb 10% d'FBS (Sigma-Aldrich), 1% d'aminoàcids no essencials, 100U/mL de penicil·lina i 0.1mg d'estreptomicina (tots els reactius provinents de Biowest).

Totes les línies cel·lulars es varen mantenir en incubadors de camisa d'aigua a 37°C, en una atmosfera de 95% d'aire i 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Subcultiu cel·lular

Les línies cel·lulars es varen subcultivar a una confluència del 80% per tal d'evitar la inhibició de creixement per contacte. Per a la realització dels subcultius, es va descartar el medi, es va realitzar un rentat amb PBS (de l'anglès, *phosphate buffered saline*; Sigma-Aldrich), seguidament es va afegir tripsina-EDTA (àcid etilendiamintetraacètic) al 0.05% en DPBS (de l'anglès, *Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Capricorn scientific) i els cultius es varen incubar a 37°C durant 5min per tal que la tripsina tingués el major efecte i les cèl·lules es desenganxessin. Per inhibir l'efecte de la tripsina, es va afegir medi fresc al 10% d'FBS. Es va recollir la suspensió cel·lular i es va centrifugar durant 5min a 1500rpm. El *pellet* cel·lular obtingut es va resuspendre en medi complet segons la dilució desitjada i es va sembrar en una nova placa de cultiu.

## 2.3. Comptatge cel·lular

Es va realitzar el recompte cel·lular en els experiments que requerien sembrar un número exacte de cèl·lules. Els cultius cel·lulars es varen tripsinitzar i les cèl·lules es varen comptar en una càmera de Neubauer. Es varen afegir aproximadament 15µL de la suspensió cel·lular en cada càmera de comptatge i es varen comptar el

número de cèl·lules presents en els 8 requadres. Per calcular el número total de cèl·lules es va seguir la següent fórmula:

$$\text{Núm. total de cèl·lules} = \frac{\text{Núm. cèl·lules en 8 requadres}}{8} \cdot 10^4 \cdot \text{dilució utilitzada} \cdot \text{volum suspensió cel·lular}$$

#### 2.4. Criopreservació i descongelació

La criopreservació té com a objectiu mantenir la viabilitat cel·lular a baixes temperatures (-80°C o -196°C) durant molt temps. Les temperatures baixes alenteixen les reaccions bioquímiques donades en les cèl·lules, incloent les reaccions que duen a la mort cel·lular. Per preservar la viabilitat de les cèl·lules criopreservades cal utilitzar substàncies crioprotectors com el dimetil sulfòxid (DMSO) i un procediment esglaonat de congelació. El DMSO és un dissolvent polar capaç d'entrar a les cèl·lules ràpidament degut al seu baix pes molecular, prevenint així la formació de grans cristalls de gel a l'interior de les cèl·lules. Aquest, però, és tòxic a temperatura ambient, requerint rapidesa en el procés de congelació i descongelació.

Per a la congelació, les cèl·lules es varen tripsinitzar i el *pellet* obtingut es va resuspendre en medi de congelació format per medi complet al 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). La suspensió cel·lular es va afegir en criovials (1mL/criovial; Thermo Fisher Scientific), aquests es varen introduir en un contenidor Nalgene Mr. Frosty Freezing (Thermo Fisher Scientific), el qual es va congelar a -80°C. El contenidor aconseguix un gradient de temperatura decreixent de -1°C/min, velocitat òptima per la conservació de les cèl·lules. 24h després, els criovials es varen introduir en un tanc de nitrogen líquid (-196°C).

Per a la descongelació, els criovials provinents del tanc de nitrogen líquid es varen introduir al bany a 37°C; per tal d'evitar la toxicitat del DMSO, la suspensió cel·lular es va diluir en medi complet abans de la descongelació total. Les cèl·lules es varen centrifugar durant 5min a 1500rpm obtenint un *pellet* que es va resuspendre en medi complet i es va sembrar en noves plaques de cultius.

### 3. Tractament farmacològic amb un inhibidor de DKK-1

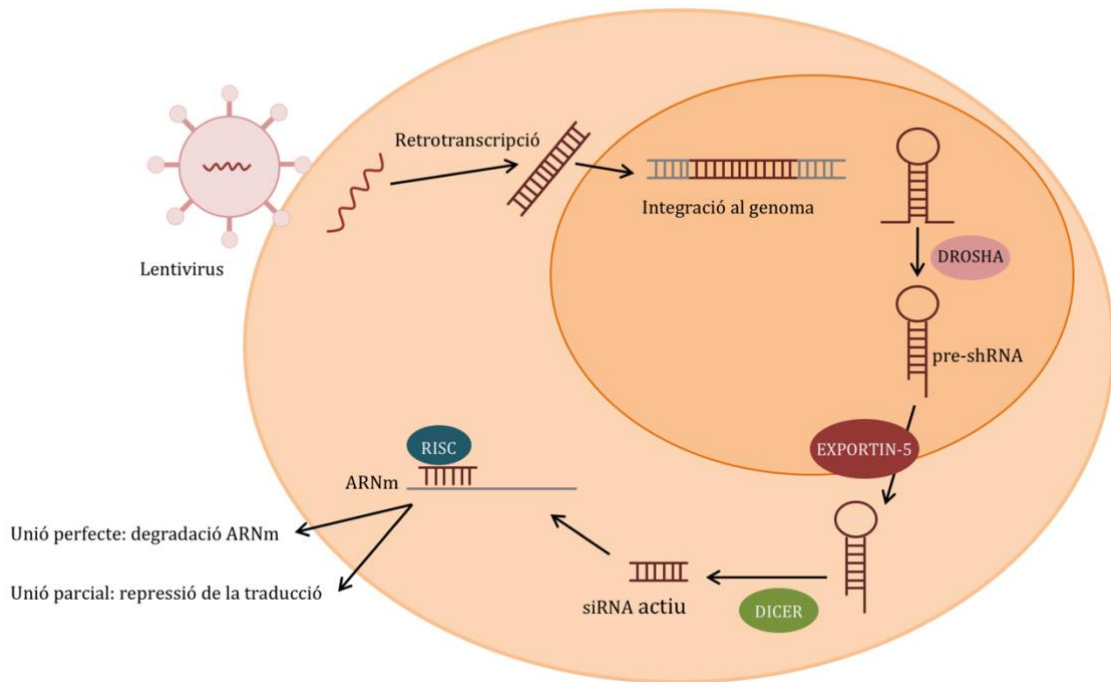
Per la inhibició farmacològica de DKK-1 es va seleccionar l'inhibidor (1-(4-(Naphthalen-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine, anomenat també WAY-262611 (Calbiochem, Merck). Aquest compost bloqueja l'efecte de DKK-1 contra la interacció entre Wnt3a i LRP5.

L'inhibidor va ser subministrat en forma de sal d'hidroclorur, es va reconstituir a una concentració de 50mM amb DMSO i es va mantenir a -20°C fins al moment de la seva utilització. Per a la selecció de la concentració mínima efectiva es varen utilitzar les següents concentracions: 0.008µM, 0.04µM, 0.2µM, 1µM i 5µM. Per als següents experiments, es va seleccionar una concentració de 0.2µM i 48h de tractament previ; les cèl·lules control es varen tractar amb el volum equivalent del vehicle DMSO.

### 4. Plasmidis, transfecció, producció lentiviral i infecció

Per a reduir l'expressió de *DKK-1* es va utilitzar la tecnologia shRNA (de l'anglès *short hairpin RNA*). Els shRNA utilitzen el mecanisme dels ARN d'interferència (ARNi), els quals són capaços de degradar específicament un determinat ARN missatger (ARNm) per complementarietat de seqüència. Concretament, els shRNA es transfecten en vectors plasmídics que s'integren a les cèl·lules diana mitjançant vectors vírics. Breument, el pre-shRNA, una molècula de cadena senzilla en forma de forquilla (*hairpin*), es forma al nucli sota el control dels promotors de l'ARN polimerasa III, i són processats per l'ARNasa DROSHA i la proteïna DGCR8. Seguidament, s'exporta al citoplasma mitjançant la proteïna EXPORTIN-5, on la ribonucleasa DICER processa els shRNA formant ARN petits d'interferència (siRNA; de l'anglès *small interfering RNA*). Posteriorment, el siRNA s'uneix al complex RISC (*RNA-induced silencing complex*), el qual localitza la molècula d'ARNm complementària a la cadena guia. En el cas de complementarietat perfecte es degrada l'ARNm, i en cas de complementarietat parcial impedeix la traducció de l'ARNm. Tan amb complementarietat perfecte o parcial, els shRNA provoquen la

infra-expressió del gen diana degradant el seu ARNm o bé impedit la seva traducció (399) (Figura M1).



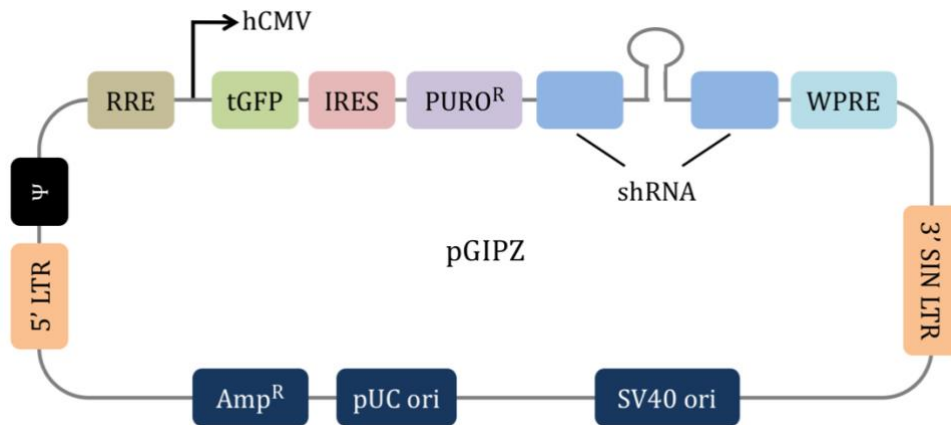
**Figura M1. Esquema del mecanisme d'infra-regulació gènica mitjançant shRNA.** Els lentivirus s'encarreguen d'integrar els shRNA al genoma de la cèl·lula diana, els quals són processats per DROSHA, generant els pre-shRNA. Els pre-shRNA s'exporten al citoplasma mitjançant la proteïna EXPORTIN-5; allà són processats per la nucleasa DICER generant així els siRNA actius. Una cadena dels siRNA serà utilitzada com a cadena guia pel complex RISC, el qual s'unirà a l'ARNm diana permetent la degradació de l'ARNm (complementarietat perfecta) o bé inhibint la seva traducció (complementarietat parcial). Abreviatures: shRNA (*short hairpin RNA*), siRNA (*small interfering RNA*) i ARNm (ARN missatger). Imatge i text basats en (400).

#### 4.1. Plasmidis

La infra-regulació del gen *DKK-1* es va realitzar mitjançant la transducció vírica d'shRNA clonats al vector lentiviral pGIPZ (Dharmacon). Es varen transfectar els vectors lentivirals a la línia cel·lular HEK 293T per a la generació dels lentivirus. La línia HEK 293T prové de ronyó embrionari humà i és una línia que es transfecta molt fàcilment. Per a la producció dels lentivirus es varen co-transfectar els vectors lentivirals següents:

1. El vector lentiviral pGIPZ codificant per l'shRNA d'interès (Figura M2).

2. El vector psPAX2, el qual conté les seqüències necessàries per a l'empaquetament de partícules víriques: *gag* (proteïnes estructurals de la càpsida), *pol* (retrotranscriptasa, integrasa i proteasa), *rev* (senyal d'exportació del nucli al citoplasma) i *tat* (incrementa el nivell de transcripció de l'ARN bicatenari).
3. El vector pMD2G, el qual forma l'embolcall del virus i conté la seqüència de la proteïna VSV-G (de l'anglès *vesicular stomatitis virus envelope G*) que permet la transducció a qualsevol tipus cel·lular.



**Figura M2. Representació esquemàtica dels elements principals del plasmidi pGIPZ.** hCMV (promotor humà citomegalovirus; permet la forta expressió del transgèn), tGFP (turbo GFP (*green fluorescent protein*); per la visualització de la transducció), PURO<sup>R</sup> (resistència a puromicina; per a la selecció de les cèl·lules que expressen el vector), IRES (*Internal ribosomal entry site*; permet l'expressió dels gens turboGFP i resistència a la puromicina en un sol transcrit), shRNA (*short hairpin RNA*; infra-regulació gènica del gen d'interès), 5'LTR (*5' long terminal repeat*; promotor del genoma retroviral), 3' SIN LTR (*3' self-inactivating long terminal repeat*; augmenta la seguretat del lentivirus), Ψ (seqüència d'empaquetament *psi*; permet l'empaquetament del genoma viral), RRE (*Rev response elements*; incrementa el títol mitjançant l'eficiència d'empaquetament del genoma viral) i WPRE (*posttranscriptional regulatory element*; incrementa l'expressió del transgèn en les cèl·lules diana). Imatge modificada de Dharmacon (<http://dharmacon.horizondiscovery.com/rnai/shrna/gipz-lentiviral-shrna/>).

## 4.2. Transfecció i producció lentiviral

Per cada shRNA es varen sembrar 4 milions de cèl·lules HEK 293T en plaques de 100mm de diàmetre amb un pre-revestiment de gelatina. A les 24h, i a una confluència del 70%, es varen co-transfectar els vectors amb Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions del fabricant. Es varen co-transfectar 12μg del vector shRNA-pGIPZ, 8μg del vector psPAX2 i 4μg del vector pMD2G. Per a una millor transfecció, es va utilitzar el medi de cultiu Opti-MEM

(Gibco) i 4h després de la transfecció, es va canviar el medi de cultiu pel medi de les cèl·lules diana, en aquest cas MEM sense antibiòtic. Entre les 36-48h posteriors, es va recollir el medi de les cèl·lules transfectades i es va centrifugar durant 5min a 1000rpm, eliminant així les restes cel·lulars. Posteriorment, es va filtrar el sobrenedant que contenia les partícules virals amb un filtre de 45µm (VWR) i es va utilitzar directament per infectar les línies cel·lulars de RMS o es va conservar a una temperatura de -80°C.

### 4.3. Infecció

Per a la infecció es varen sembrar cèl·lules de RMS en plaques de 60mm. Al dia següent, i a una confluència del 40%, es va canviar el medi per una dilució 1/2 del sobrenedant amb partícules víriques en medi MEM sense antibiòtic. A les 24h de la infecció, es va canviar el medi per medi MEM sense antibiòtic i a les 72h post infecció es varen seleccionar amb puromicina les cèl·lules infectades (1µg/mL; Sigma-Aldrich). La infecció de les cèl·lules es va confirmar mitjançant la visualització de la GFP (de l'anglès *green fluorescent protein*) amb el microscopi invertit d'epifluorescència (Nikon Eclipse TE2000-S), utilitzant la longitud d'ona de la llum blava per a la seva excitació (475nm) i provocant la seva emissió a llum verda (508nm). Es va avaluar l'eficiència de la infra-regulació dels shRNA mitjançant *Western blot* (apartat 6.6). Els vectors seleccionats varen ser: V2LHS\_19944 (sh#1) i V3LHS\_412074 (sh#2), tots provinents de Dharmacon.

## 5. Anàlisi de l'expressió gènica

### 5.1. Extracció d'ARN

Es va extreure l'ARN total de les línies cel·lulars i de les mostres de tumors de RMS utilitzant el kit *RNeasy Mini* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. L'ARN obtingut es va quantificar mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

## 5.2. Retrotranscripció

La retrotranscripció (RT) consisteix en sintetitzar ADN complementari (cDNA, de l'anglès *complementary DNA*) a partir d'un motlle d'ARN. Les retrotranscriptases utilitzen el motlle d'ARNm i, mitjançant encebadors complementaris a l'extrem 3' de l'ARNm, generen la primera cadena de cDNA.

Es varen incubar 2µg d'ARN amb 1µg d'encebadors aleatoris (*random primers*, Invitrogen) durant 5min a 70°C al termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Les mostres es varen posar ràpidament en gel per evitar la formació d'estructures secundàries. Posteriorment, es varen afegir 5µL del M-MLV (de l'anglès *Moloney Murine Leukemia Virus*) 5x *reaction buffer* (Promega), 1.25µL de desoxirribonucleòtids trifosfat 10mM (dNTPs; Thermo Fisher Scientific) i 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Es varen incubar al termociclador durant 1h a 37°C per a l'elongació del cDNA i es va congelar el cDNA obtingut a -20°C fins a ser utilitzat.

## 5.3. PCR convencional

La PCR (reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès *polymerase chain reaction*) és una tècnica que permet l'amplificació *in vitro* d'un fragment específic d'ADN. La PCR es basa en tres etapes: la desnaturalització de l'ADN, la hibridació dels encebadors i l'elongació.

Les condicions per la PCR convencional varen ser: una temperatura de desnaturalització de 94°C durant 10min, 38 cicles a 94°C durant 30seg per a la desnaturalització, 61°C durant 30seg per a l'anellament dels encebadors i 72°C durant 30seg per a l'elongació, una fase final a 72°C durant 7min i finalment una baixada a 4°C (al termociclador 2720 Thermal Cycler). Es va utilitzar TaqGold Buffer (1x), MgSO<sub>4</sub> (1.5ng/mL), dNTPs (0.2mM), TaqGold Roche (1U), els encebadors *forward* i *reverse* (0.2µM cadascun) juntament amb 1µL de cDNA. Es va utilitzar el gen endogen *TBP* (*TATA binding protein*) com a gen control. Els encebadors utilitzats estan detallats a la Taula M2.

Per a la visualització dels productes de PCR, es varen córrer les electroforesis en gels al 2% d'agarosa (iNtRON Biotechnology) i 0.05% de bromur d'etidi (Panreac Applichem) diluïts en tampó TAE 1x (Tris-acetat-EDTA; 40mM Tris (pH 7.6), 20mM àcid acètic, 1mM EDTA). El bromur d'etidi és un agent intercalant que s'utilitza com a marcador d'àcids nucleics ja que al exposar-se a llum ultraviolada emet la seva fluorescència com llum visible de color vermell - ataronjat. Es varen utilitzar 10µL dels marcadors 100bp i 1kb (GeneON) per a determinar el pes en pb (parell de bases) del producte obtingut de les PCR. Es va córrer el gel durant 30min a 120V en tampó TAE 1x. Les fotografies dels gels es varen realitzar amb el documentador de gels *Gel Doc XR+ with Image Lab Software* (Bio-Rad).

**Taula M2. Encebadors utilitzats en la PCR convencional.**

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b><i>sFRP1</i></b>	5'-TTGAACATCTCTGTGCCAGC-3'	5'-GCACAAGTCTCTTCAGGTCC-3'
<b><i>sFRP2</i></b>	5'-GAATACCAGAACATGCGGCT-3'	5'-CTCGTCTAGGTCATCGAGGC-3'
<b><i>sFRP3</i></b>	5'-TATACCAGCTCTGGCTGCCT-3'	5'-TTCGAGTTCCTGCCAGACTT-3'
<b><i>sFRP4</i></b>	5'-GCCTGGGACAGCCTATGTAA-3'	5'-TCTGTACCAAAGGGCAAACC-3'
<b><i>sFRP5</i></b>	5'-TGGAGCCCAGAAAAAGAAGA-3'	5'-GCAGGGGTAGGAGAACATGA-3'
<b><i>DKK-1</i></b>	5'-ATCATAGCACCTTGGATGGG-3'	5'-CCTGAGGCACAGTCTGATGA-3'
<b><i>DKK-2</i></b>	5'-AGTACCCGCTGCAATAATGG-3'	5'-GAAATGACGAGCACAGCAAAA-3'
<b><i>DKK-3</i></b>	5'-TTATTGGCTGCTTTGCCTCT-3'	5'-GAGCAACACTGCTGGATGAA-3'
<b><i>DKK-4</i></b>	5'-AGCTCTGGTCTGGACTTCA-3'	5'-AGCACAGAACGGCTTCTCAT-3'
<b><i>TBP</i></b>	5'-GGGGAGCTGTGATGTGAAGT-3'	5'-CCAGGAAATAATTCTGGCTCA-3'

#### 5.4. Seqüenciació

La seqüenciació és una tècnica utilitzada per a conèixer l'ordre exacte de les bases que formen una molècula d'ADN. Per a la seqüenciació del gen *DKK-1* en tumors, i determinar així les isoformes de l'*splicing*, es va córrer l'electroforesi en gels d'agarosa (apartat 5.3). Un cop realitzada la fotografia del gel amb el documentador de gels *Gel Doc XR+* (Bio-Rad) es va procedir a tallar la banda desitjada i a eluir l'agarosa. Per a l'elució de l'agarosa es va utilitzar el *QIAquick Gel Extraction kit* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Posteriorment, es va



purificar l'ADN seguint el protocol del kit *Nucleic acid and protein purification* (Macherey-Nagel). Finalment, es va seqüenciar el gen *DKK-1* utilitzant l'encebador *forward* de *DKK-1* (5'-ATCATAGCACCTTGGATGGG-3'). Les mostres varen ser seqüenciades a l'empresa MacroGen mitjançant el mètode Sanger (Abi 3730XL, Thermo Fisher Scientific).

El mètode Sanger es basa en sintetitzar una cadena d'ADN complementària a una cadena simple utilitzada com a motlle en presència d'ADN polimerasa, els quatre 2' desoxinucleòtids que formen la seqüència de l'ADN (dATP, dGTP, dCTP i dTTP) i quatre didesoxinucleòtids (ddATP, ddGTP, ddCTP i ddTTP). Els didesòxinucleòtids no tenen el grup 3'-OH i, per tant, no permeten l'addició del nucleòtid consecutiu. Quan s'uneix un d'ells, la polimerasa interromp la síntesi de la nova cadena, obtenint fragments seqüenciats de diferent mida (401). Actualment s'utilitzen ddNTPs marcats amb quatre fluoròfors diferents i es coneix com a mètode Sanger automatitzat.

### 5.5. Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa

La qPCR (reacció en cadena de la polimerasa quantitativa, de l'anglès *quantitative polymerase chain reaction*) es va utilitzar per l'anàlisi d'expressió d'ARNm, utilitzant la tecnologia de sondes TaqMan (Thermo Fisher Scientific). Aquesta tecnologia permet mesurar la quantitat d'ADN mitjançant l'emissió de fluorescència, essent aquesta proporcional a la quantitat d'ADN amplificat. El cicle en el qual es comença a detectar la fluorescència s'anomena Ct (de l'anglès, *threshold cycle*) i és inversament proporcional a la concentració inicial d'ADN de la mostra.

La qPCR es va realitzar en plaques de 384 pous (Applied Biosystems) en un volum final de 10µL per pou, realitzant triplicats per cada mostra i sonda. Aquest volum inclou 0.5µL de cDNA, 5µL de Master Mix (la qual conté l'ADN polimerasa, els dNTPs, MgCl<sub>2</sub> i el tampó de reacció), 0.5µL de la sonda TaqMan i 4µL d'H<sub>2</sub>O DEPC (de l'anglès *diethyl pyrocarbonate*); tots els reactius de Thermo Fisher Scientific. Es varen realitzar 40 cicles d'amplificació en el termociclador amb detecció de

fluorescència ABI PRISM 7900HT (Life Technologies). El programa d'amplificació utilitzat va consistir en 50°C durant 2min, 95°C durant 10min, 40 cicles de 95°C durant 15seg i 60°C durant 1min. A la Taula M3 es detallen les sondes TaqMan utilitzades, utilitzant el gen *TBP* com a control intern. L'anàlisi de dades es va realitzar amb el *software 7900HT Sequence Detection Systems 2.3* (Applied Biosystems). Els nivells relatius de cada ARNm analitzat es varen quantificar mitjançant el mètode comparatiu  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (402).

**Taula M3. Sondes TaqMan utilitzades en la qPCR.**

Gen	Sonda
<i>DKK-1</i>	Hs00183740_m1
<i>CD44</i>	Hs00174139_m1
<i>Ciclina D1 (CCND1)</i>	Hs00765553_m1
<i>c-Myc (MYC)</i>	Hs00153408_m1
<i>Axin2</i>	Hs00610344_m1
<i>DR1 (TBP)</i>	Hs00172424_m1

## 5.6. Base de dades

Es varen analitzar bases de dades de *microarrays* per determinar els nivells d'expressió de gens d'interès en tumors i línies cel·lulars. Per a l'anàlisi d'expressió en línies cel·lulars de RMS es va consultar la plataforma d'anàlisi de dades GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), utilitzant el perfil d'accés anomenat GSE8840 (*Effect of genomic imbalances on gene expression in rhabdomyosarcoma*). Per establir correlacions entre els nivells d'expressió dels gens d'interès i diversos paràmetres clínics es va consultar la plataforma *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). En concret, es varen consultar les bases de dades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a", en la qual consten dades d'expressió de 147 tumors de RMS i la "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" on consten dades d'expressió de 186 tumors de RMS.

## 6. Extracció i detecció de proteïnes

### 6.1. Extracció de proteïnes

L'extracció de proteïnes provinents de tumors de RMS es va realitzar amb un *Pellet Pestle Motor* (Sigma-Aldrich) en tampó de lisis *Pierce RIPA* (Thermo Fisher Scientific) suplementat amb inhibidors de proteases *Complete Tablets Mini EASYpack* (Roche). Per a l'extracció de proteïnes provinents de cultius cel·lulars, es va realitzar un rentat amb PBS de les cèl·lules prèviament cultivades, i posteriorment es va utilitzar una rasqueta (*scraper*) per tal de desenganxar les cèl·lules amb el mateix tampó de lisis. Tot el procés d'extracció es va realitzar en gel per tal d'evitar la degradació de les proteïnes. Els homogenats obtinguts es varen incubar durant 3min a una temperatura de 95°C per tal d'inactivar les proteases i desnaturalitzar l'ADN i les proteïnes. Posteriorment, es va homogeneïtzar la mostra proteica amb una xeringa i es varen centrifugar les mostres a 15000rpm durant 10min a 4°C per descartar les restes cel·lulars. Els sobrenedants amb l'extracte proteic d'interès es varen congelar a -20°C.

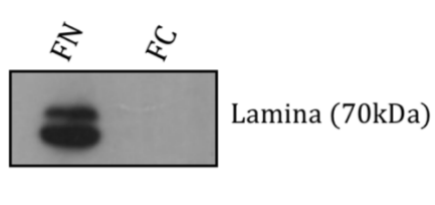
### 6.2. Fraccionament cel·lular

Per la separació de les fraccions citosòliques i nuclears, les cèl·lules es varen cultivar en plaques de 100mm. Després de realitzar un rentat amb PBS, les cèl·lules es varen recollir en 0.5mL de PBS i es varen centrifugar a 1200rpm durant 5min. Es va retirar el sobrenedant, el *pellet* obtingut es va resuspendre en 1mL de TBS (tampó Tris salí) i es varen centrifugar durant 15seg a màxima velocitat. Després de descartar el sobrenedant, el *pellet* es va resuspendre en 400µL de tampó A (Taula M4) i es va mantenir en gel durant 15min. El tampó A és un tampó hipotònic d'homogeneïtzació utilitzat per a trencar la membrana cel·lular però mantenint la membrana nuclear intacta. Posteriorment, es varen afegir 25µL de IGEPAL (octylphenoxypolyethoxyethanol; Sigma-Aldrich) al 10% i es va agitar durant 10seg amb el vòrtex. Es varen centrifugar les mostres durant 60seg a màxima velocitat, el sobrenedant que contenia la fracció citoplasmàtica es va congelar a -20°C. Es varen afegir 60µL de tampó de lisi *Pierce RIPA* al *pellet* que

contenia la fracció nuclear i es va centrifugar durant 10min a 15000rpm. El sobrenedant contenint la fracció nuclear es va congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es va comprovar l'eficàcia de la tècnica mitjançant *Western blot* (apartat 6.6) (Figura M3).

**Taula M4. Tampó hipotònic d'homogeneïtzació.**

Tampó A
10mM Hepes pH 7.9
10mM KCl
0.1mM EDTA
0.1mM EGTA
Còctel inhibidor de proteases (Roche)



**Figura M3. *Western blot* de la fracció nuclear (FN) i la fracció citoplasmàtica (FC).** L'absència de la proteïna nuclear lamina en la fracció citosòlica i presència en la fase nuclear indica un correcte fraccionament.

### 6.3. Quantificació de proteïnes

La quantificació de proteïna es va realitzar mitjançant el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad) basat en el mètode Lowry. El mètode Lowry és un mètode colorimètric per a la valoració quantitativa de proteïnes, en la qual la intensitat de color és proporcional a la concentració de proteïnes. La quantificació de proteïnes es va realitzar mitjançant la comparació amb una recta patró de 0-2mg/mL de BSA (albúmina de sèrum boví; de l'anglès *Bovine Serum Albumin*) dissolt en aigua per obtenir la relació entre l'absorbància i la concentració de proteïna. Es varen incubar les mostres proteiques a  $95^{\circ}\text{C}$  durant 5min i es va realitzar una dilució 1/5 en  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriorment, es varen afegir  $5\mu\text{L}$ /pou (3 pous per mostra) en plaques de 96 pous (Thermo Fisher Scientific). A continuació, es varen afegir  $25\mu\text{L}$  per pou de la barreja dels reactius S (solució surfactant) i A (solució alcalina tartrat de coure)

en una proporció 1/50. Es varen afegir 200µL per pou del reactiu B (reactiu Folin) i es va deixar incubar durant 15min a temperatura ambient. Finalment, es va llegir l'absorbància a 750nm mitjançant l'espectrofotòmetre BioTek Epoch (BioTek) i es va determinar la concentració de proteïna continguda a les mostres extrapolant els resultats obtinguts en la recta patró.

#### **6.4. Preparació de mostres**

Es varen preparar les mostres amb la mateixa quantitat de proteïna segons els volums calculats en la determinació de la concentració proteica, afegint les quantitats proporcionals d'H<sub>2</sub>O i de tampó de càrrega Laemmli (250mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol i 0.5% bromofenol blau) al 10% de ditiotreitòl 1M (DTT) (tots els reactius de Sigma-Aldrich). El DTT s'utilitza per a reduir els ponts disulfur presents entre els grups tiol dels residus de cisteïna. Les proteïnes s'han d'unir a l'SDS (dodecilsulfat sòdic, de l'anglès *Sodium dodecyl sulfate*), un detergent aniònic que serveix per a formar complexos desnaturalitzats carregats negativament. La quantitat d'SDS unit a les proteïnes és proporcional a la seva mida, ja que s'uneix en una proporció aproximada d'una molècula d'SDS per dos residus d'aminoàcids. Si la proteïna té dues o més subunitats diferents, es separaran degut al tractament amb SDS i apareixerà una banda individual per cada una. La relació final càrrega/massa queda constant per les diferents proteïnes i aquestes es separen en base a les seves diferències de pes molecular, a menys mida més mobilitat de la proteïna i a la inversa.

#### **6.5. SDS-PAGE**

L'electroforesi és la tècnica mitjançant la qual es separen les biomolècules en un gel quan es sotmeten a un camp elèctric. L'electroforesi de proteïnes en gels amb una matriu de poliacrilamida en presència d'SDS (SDS-PAGE) és una de les tècniques més utilitzada per caracteritzar barreges complexes de proteïnes.

Els gels de poliacrilamida estan formats per la polimerització de l'acrilamida i el monòmer entrecruador bisacrilamida, en una reacció iniciada pel TEMED (N,N,N,N'-tetrametil-diamina) i el persulfat amònic. El radical persulfat activa el TEMED, el qual a la vegada activa el monòmer d'acrilamida per a que polimeritzi. A aquesta barreja s'afegeix el 10% d'SDS per a garantir les condicions desnaturalitzants. La porositat dels gels ve determinada per les proporcions de poliacrilamida i bisacrilamida. La majoria de proteïnes es separen bé en gels del 5 al 12% d'acrilamida, essent el menor percentatge una major mida de porus, per tant, millor per les proteïnes de major mida, i a la inversa.

Per a augmentar la resolució de la tècnica, s'utilitza el sistema discontinu de tampons, en el qual és necessari un gel separat en dues parts: *stacking* (apilament) i *resolving* (resolutiu). El gel *stacking* o d'apilament, té un porus major i un pH més àcid (format per Tris-HCl 1M pH 6.8) per tal de concentrar totes les proteïnes en una banda i que comencin a migrar pel gel *resolving* o resolutiu (format per Tris-HCl 1.5M pH 8.8) a la vegada.

Es va carregar la mateixa concentració de proteïna en cada pou del gel i en un carril 10µL del marcador del pes molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad) per a poder relacionar les bandes del gel amb el seu pes molecular. Les electroforesis es varen realitzar en cubetes d'electroforesi *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad) amb tampó d'electroforesi (250mM Tris, 1.92M glicina, 1% SDS) a un amperatge constant de 35mA/gel.

## 6.6. Western blot

El *Western blot* és una tècnica utilitzada per identificar proteïnes específiques presents en una barreja complexa de proteïnes provinents de teixits o d'extractes cel·lulars. Les proteïnes desitjades es detecten mitjançant l'ús d'anticossos primaris específics que reconeixen la proteïna d'interès.

Després de la separació de les proteïnes contingudes a l'extracte mitjançant SDS-PAGE, es varen transferir a membranes absorbents de PVDF (fluorur de

polivinilidè, de l'anglès *polyvinylidene fluoride*) amb porus de 0.45µm (GE Healthcare Life Sciences), prèviament activades amb metanol (100%). La transferència es va realitzar en cassets, on es va col·locar una esponja, 2 papers Whatman (Fisher Scientific), el gel, la membrana de PVDF, 2 papers Whatman i una esponja. Els cassets es varen introduir en cubetes *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) amb tampó de transferència (10% tampó Tris/glicina (25mM Tris i 129mM glicina), 20% metanol i 70% H<sub>2</sub>O), i es varen transferir a 400mA durant 2h a 4°C.

Posteriorment, les membranes es varen bloquejar en TBS-T (tampó Tris salí amb Tween-20, de l'anglès *Tris-Buffered Saline and Tween-20*; 200mM Tris-HCl, 150mM NaCl i 0.1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich)) al 5% de BSA en agitació, durant 1h a temperatura ambient. El bloqueig és necessari per impedir la unió inespecífica dels anticossos utilitzats posteriorment. A continuació, les membranes es varen incubar durant tota la nit a 4°C amb la dilució d'anticòs primari desitjada en tampó de bloqueig (Taula M5). Es varen realitzar 3 rentats de 10min amb TBS-T en agitació per a eliminar l'excés d'anticòs primari i, posteriorment, es varen incubar les membranes durant 1h a temperatura ambient amb la dilució en tampó de bloqueig del seu anticòs secundari corresponent (Taula M6). Es varen realitzar 3 rentats de 10min amb TBS-T en agitació per eliminar l'excés d'anticòs secundari i es varen incubar les membranes amb *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare Life Sciences) durant 5min pel revelat. Aquest reactiu està compost per una solució de peròxid i una de luminol. El luminol, al reaccionar amb l'enzim HRP (peroxidasa de rave, de l'anglès *horseradish peroxidase*) unit a l'anticòs secundari, s'oxida en presència de peròxid en una reacció que genera llum. La llum emesa durant la reacció es va detectar amb *SuperRx Fuji Medical X-Ray Films* (Fujifilm) i la màquina reveladora Curix 60 (AGFA).

La quantificació del *Western blot* es va realitzar amb el *software* Image J, normalitzant els valors d'expressió proteica amb el control de càrrega utilitzat en cadascun dels experiments (actina o lamina).

Taula M5. Especificacions dels anticossos primaris.

Anticòs primari	Pes molecular	Espècie	Dilució	Referència	Casa comercial
DKK-1	28 kDa	Conill	1:250	4687S	Cell Signaling
$\beta$ -catenina	92 kDa	Ratolí	1:1000	610154	BD Biosciences
Ciclina D1	36 kDa	Ratolí	1:200	sc-8396	Santa Cruz Biotechnology
c-Myc	50 kDa	Ratolí	1:10	-	Dr. Diego Arango*
Axin2	94 kDa	Conill	1:1000	ab109307	Abcam
Miogenina	36 kDa	Ratolí	1:250	556358	BD Pharmingen
MyoD1	45 kDa	Ratolí	1:1000	Ab16148	Abcam
FAK	125 kDa	Conill	1:1000	3285S	Cell Signaling
Lamina	75 kDa	Conill	1:1000	sc-20681	Santa Cruz Biotechnology
Actina	43 kDa	Cabra	1:10000	sc-1616	Santa Cruz Biotechnology

\*Anticòs generat i cedit pel Dr. Diego Arango (VHIR).

Taula M6. Especificacions dels anticossos secundaris.

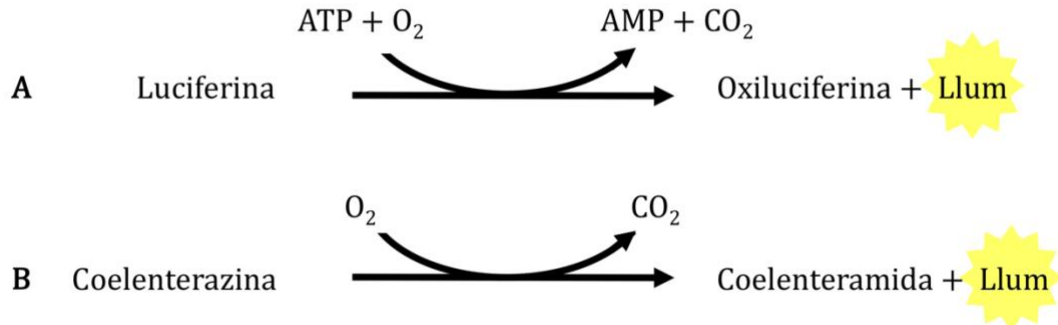
Anticòs secundari	Dilució	Referència	Casa comercial
Anti-Ig cabra	1:2000	P0449	Dako
Anti-Ig ratolí	1:2000	P0260	Dako
Anti-Ig conill	1:5000	A0545	Sigma-Aldrich

## 7. Assaig luciferasa

L'assaig luciferasa es va utilitzar per a mesurar el grau d'activació de la via Wnt després de la inhibició de DKK-1. Aquest assaig es basa en la producció de bioluminescència a partir de la reacció de luciferina i ATP (Figura M4-A). Consta de dues reaccions, la primera genera adenilat de luciferina i  $PP_i$  a partir de la luciferina i ATP. En la segona reacció, l'adenilat reacciona amb l'oxigen formant oxiluciferina, AMP i llum, amb una eficiència d'un fotó per luciferina oxidada (403). L'assaig es normalitza amb la producció de llum de la *Renilla* luciferasa, aquesta

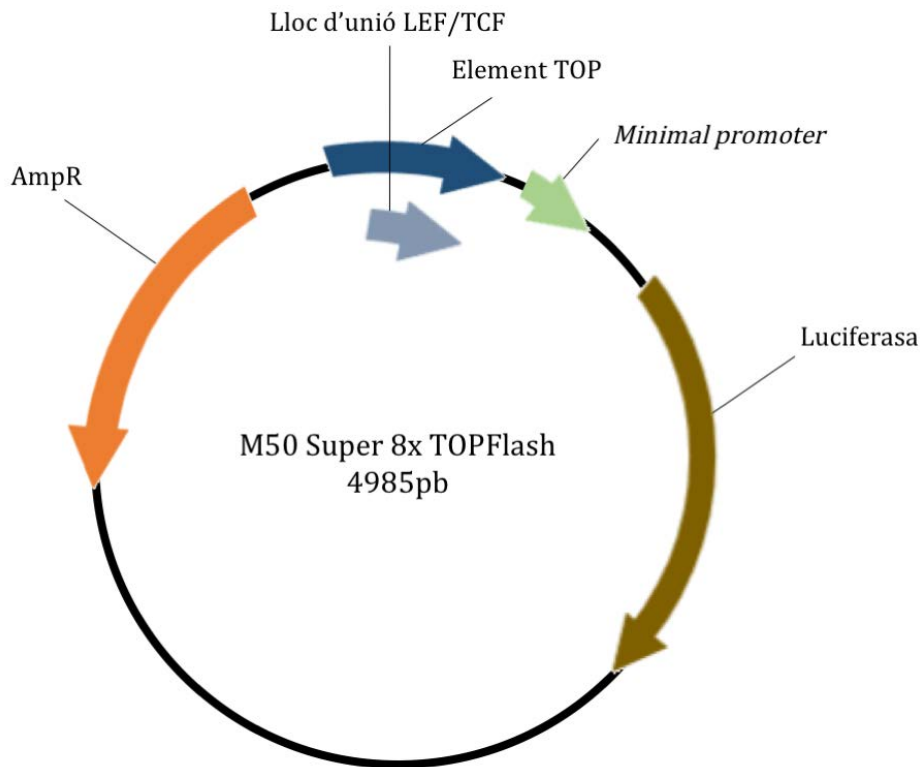


només necessita luciferina de coelenterat (coelenterazina) i  $O_2$  per a formar coelenteramida i llum (Figura M4-B).



**Figura M4. Reaccions de la luciferasa i la *Renilla* en la qual es basa l'assaig luciferasa. A:** Reacció de la luciferasa: la luciferina reacciona en presència d'ATP i  $O_2$  per a donar oxiluciferina i llum, alliberant també AMP i  $CO_2$ . **B:** Reacció de la *Renilla*: la coelenterazina reacciona en presència d' $O_2$  per a donar coelenteramida i llum, alliberant  $CO_2$ .

Es varen transfectar els vectors M50 Super 8x TOPFlash (plasmidi d'Addgene 12456) i M51 Super 8x FOPFlash (plasmidi d'Addgene 12457), dos plasmidis reporters de l'activitat luciferasa deguda a l'activació de la via TCF4/ $\beta$ -catenina. El plasmidi M50 Super 8x TOPFlash presenta set llocs d'unió a TCF/LEF-1 naturals i l'M51 Super 8x FOPFlash té els llocs d'unió mutats; aquests es troben sota el control d'un promotor viral que indueix l'expressió de la luciferasa (Figura M5). Ambdós plasmidis varen ser cedits pel Dr. Diego Arango per a avaluar l'activitat TCF4/ $\beta$ -catenina. El vector TOPFlash s'utilitza per mesurar l'activitat luciferasa a les cèl·lules d'interès, en aquest projecte es va utilitzar per a mesurar l'activitat de la via Wnt; per contra, el vector FOPFlash, es va utilitzar com a control negatiu de l'activitat luciferasa. També es va utilitzar el plasmidi *Renilla* luciferasa (pRL-TK; Promega) utilitzat com a control de la transfecció per a normalitzar els resultats.



**Figura M5. Representació esquemàtica del vector TOPFlash.** La imatge mostra els elements característics del vector TOPFlash: el gen de resistència a ampil·lina (AmpR), el lloc d'unió LEF/TCF, l'element TOP, el promotor de la luciferasa (*Minimal promoter*) i la luciferasa. Imatge basada en (<https://www.addgene.org/12456/>).

Es va sembrar la mateixa concentració de cèl·lules en plaques de 60mm de diàmetre amb medi MEM condicionat amb Wnt3a. A les 24h es va procedir a co-transfectar 3.125µg dels plasmidis TOPFlash o FOPFlash i 312.5ng del plasmidi *Renilla* luciferasa amb *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* (Roche), seguint les instruccions del fabricant. A les 4h de la transfecció es va canviar el medi per MEM sense antibiòtic i a les 24h de la transfecció es va substituir el medi per medi MEM condicionat amb Wnt3a. Per a la lectura de la luciferasa es varen tripsinitzar les cèl·lules i es va utilitzar el kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega), seguint les instruccions del fabricant. Es varen realitzar dues lectures mitjançant el lector de luminescència Appliskan (Thermo Scientific), la primera de l'activitat luciferasa, i la segona de l'activitat de la *Renilla* per tal de normalitzar els valors de luminescència. Cada condició es va analitzar per triplicat i en tres assaigs independents.

## 8. Assajos de proliferació cel·lular

Es va estudiar la capacitat proliferativa de les cèl·lules mitjançant el seu recompte. Les cèl·lules de les diferents condicions (shRNA o tractades amb WAY-262611) es varen sembrar a la mateixa concentració, considerant tres rèpliques per cada condició i dia. Es varen tripsinitzar les cèl·lules a dies 3, 5 i 7, es varen resuspendre en 10mL de *Coulter Isoton II Diluent* (Beckman Coulter) i es va realitzar el recompte cel·lular amb el comptador de partícules *Z Series Coulter Counter* (Beckman Coulter). Cada condició es va analitzar per triplicat i en tres assaigs independents.

Per a determinar de la  $IC_{50}$  de l'inhibidor de DKK-1, WAY-262611, es va sembrar la mateixa concentració de cèl·lules en plaques de 96 pous, tractades amb les diferents concentracions d'inhibidor (5 rèpliques per condició). Es va canviar el medi diàriament i als 5 dies es varen fixar les plaques. Es va realitzar un rentat de la placa amb PBS i posteriorment es va fixar amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 30min. Després de descartar el PFA, es va realitzar un rentat amb PBS i es varen tenyir les cèl·lules presents als pous amb cristall violeta (Sigma-Aldrich) al 0.5% en H<sub>2</sub>O durant 15min. El cristall violeta és un colorant que s'utilitza per tenyir cèl·lules al punt final de certs experiments. Finalment, es va rentar la placa amb PBS fins a treure l'excés de cristall violeta i es va deixar assecar durant tota la nit. Per a la lectura de l'absorbància es va afegir àcid acètic (Thermo Fisher Scientific) al 15% per a dissoldre el cristall violeta i es va mesurar l'absorbància a 590nm mitjançant l'espectofotòmetre BioTek Epoch (BioTek).

## 9. Immunocitoquímica

La immunocitoquímica (ICQ) és una tècnica utilitzada per a la detecció d'epítops proteics en cèl·lules en cultiu. Per a la seva detecció, s'utilitza un anticòs secundari conjugat a un enzim que emet fluorescència.

Per realitzar els assaigs d'immunofluorescència es varen sembrar les cèl·lules en plaques de 12 pous sobre cobreobjectes. 24h després, es varen realitzar dos

rentats amb PBS fred i es varen fixar les cèl·lules amb metanol (100%) fred durant 2min. Posteriorment, es varen realitzar 4 rentats amb PBS per eliminar l'excés de metanol i es varen incubar les mostres amb glicina 0.1M diluïda en PBS durant 10min per eliminar el soroll de fons de la posterior incubació amb l'anticòs secundari. Es va procedir a fer dos rentats amb PBS i permeabilitzar les membranes cel·lulars amb 0.1% de TritóX-100 (Amersham Biosciences) diluït en PBS durant 5min. Després de tres rentats amb PBS, es varen bloquejar les mostres amb PBS-FBS al 10% durant 30min i es varen afegir els anticossos primaris diluïts en PBS-FBS al 5% durant 2h a temperatura ambient. Es varen realitzar tres rentats amb PBS-FBS al 5%, es va afegir l'anticòs secundari durant 45min i es varen incubar durant 15min amb 5ng/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) dissolt en PBS-FBS (5%) per marcar els nuclis cel·lulars. A la Taula M7 es detallen els anticossos primaris i els anticossos secundaris corresponents utilitzats en la ICQ. Es varen realitzar tres rentats més i es varen muntar les preparacions amb glicerol-PBS al 50%.

**Taula M7. Anticossos utilitzats en la ICQ.**

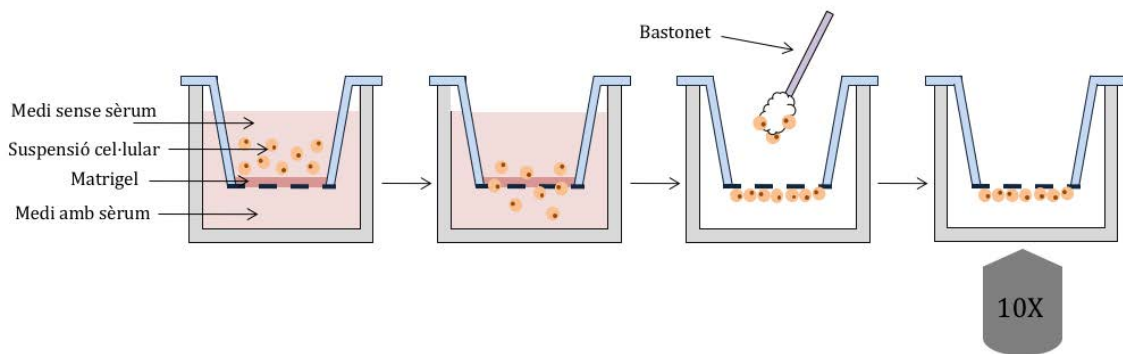
Anticòs primari	Anticòs secundari (Invitrogen)
Anti-MyoD (Santa Cruz Biotechnology)	Alexa fluor 568 donkey anti-goat IgG
Anti-Myogenin (BD Pharmingen)	Alexa fluor 647 goat anti-mouse IgG

Les cèl·lules es varen visualitzar mitjançant microscòpia de fluorescència en un microscopi confocal espectral FV1000 (Olympus). Es varen realitzar 5 fotografies per cobreobjectes, amb duplicats per cada condició i es varen fer triplicats independents de cada assaig. Per a quantificar la fluorescència emesa al nucli de les cèl·lules es va utilitzar el *software* Fiji (ImageJ). Es va realitzar el marcatge nuclear (Hoechst 33342) per a delimitar l'àrea de quantificació de fluorescència i es va calcular la densitat de fluorescència integrada en l'àrea del nucli. Per a calcular la CTCF (de l'anglès, *corrected total cell fluorescence*) es va quantificar la densitat de fluorescència del soroll de fons de la imatge (mitjana de 5 valors) i es va seguir la següent fórmula:

$$CTCF = \text{densitat de fluorescència integrada a nucli} - (\text{àrea del nucli} \times \text{soroll de fons})$$

## 10. Assaig d'invasió Transwell

La capacitat d'invasió de les cèl·lules es va quantificar *in vitro* mitjançant l'assaig *Transwell*. Aquest assaig s'utilitza per a estudiar la capacitat d'invasió de les cèl·lules, les quals han de degradar la matriu extracel·lular per tal d'envair l'estroma i extravasar per establir metàstasis distals. En aquesta tècnica es promou la invasió de les cèl·lules mitjançant quimiotaxis en un sistema de dues cambres separades per una membrana porosa recoberta per *Matrigel* (per a mimetitzar la matriu extracel·lular). Les cèl·lules tumorals a avaluar es sembren a la cambra superior amb medi sense sèrum i a la cambra inferior s'afegeix medi ric en sèrum. Les cèl·lules amb capacitat invasiva creuraran el *Matrigel* i la membrana situant-se a la superfície inferior d'aquesta (Figura M6).



**Figura M6. Imatge representativa de l'assaig d'invasió *Transwell*.** Els *Transwell* estan formats per dues cambres separades per una membrana porosa recoberta per *Matrigel*, la qual serveix per mimetitzar la matriu extracel·lular. A la cambra inferior s'afegeix medi amb sèrum i a la cambra superior s'afegeix la suspensió cel·lular desitjada amb medi sense sèrum per tal de generar un gradient de sèrum. Les cèl·lules amb capacitat invasiva són capaces de degradar el *Matrigel* i travessar la membrana pel seus porus, quedant-se a la part inferior d'aquesta. Posteriorment, es fixen les cèl·lules i es retiren les restes de cèl·lules i *Matrigel* de la part superior mitjançant l'ajuda d'un bastonet. Finalment, es tenyeixen els nuclis de les cèl·lules invasores amb Hoechst 33342 i es visualitzen en un microscopi d'epifluorescència.

Es va realitzar l'experiment en plaques de 24 pous amb membranes de policarbonat de 8µm de porus (Corning). Les membranes es varen recobrir amb 25µL de *Matrigel Growth Factor Reduced* (Corning) diluït prèviament a una dilució 1/3 en medi sense sèrum; es varen incubar a 37°C durant 20min per tal que es solidifiqués el *Matrigel*. Posteriorment, es varen sembrar 10<sup>5</sup> cèl·lules resuspeses en 100µL de medi sense sèrum a la cambra superior. A la cambra inferior es varen

afegir 600µL de medi al 10% d'FBS i es varen incubar a 37°C durant 24h. Transcorregut aquest temps, es va aspirar el contingut de la cambra superior i es varen fixar les cèl·lules amb PFA al 4% en PBS, posant 100µL a la cambra superior i 600µL a la inferior. Es varen fer 3 rentats amb PBS, un d'ells amb l'ajuda d'un bastonet per tal d'eliminar les cèl·lules que no han envaït i de *Matrigel* de la cambra superior. Es varen tenyir les cèl·lules que havien envaït la membrana amb el colorant fluorescent Hoechst, el qual tenyeix els nuclis ja que s'intercala a l'ADN i permet així el comptatge de les cèl·lules amb capacitat invasiva. Es varen utilitzar 5ng/mL de Hoechst 33342 durant 10min i després de tres rentats amb PBS es varen obtenir fotografies de 5 camps representatius de cada membrana amb un microscopi invertit d'epifluorescència (Nikon Eclipse TE2000-S). Es varen realitzar triplicats de cada condició i es varen fer tres rèpliques independents de cada assaig.

### **11. Assaig de clonogenicitat**

Per a l'assaig de formació de clons, es varen sembrar 1000 cèl·lules en una placa de 100mm i es varen incubar durant dues setmanes a 37°C. Posteriorment, es varen tenyir amb cristall violeta (Sigma-Aldrich) al 0.5% i es varen deixar assecar durant tota la nit. Finalment, es varen comptar els clons formats a cada placa. Es varen realitzar triplicats de cada condició i es varen fer tres rèpliques independents de cada assaig.

### **12. Citometria de flux**

La citometria de flux és una tècnica utilitzada per determinar les característiques de les cèl·lules presents en una mostra com la viabilitat, la morfologia cel·lular, la presència de marcadors d'interès. El fonament de la tècnica es basa en fer passar les cèl·lules alineades a través d'un làser i mesurar la llum dispersada per cadascuna, per poder-la així correlacionar amb els paràmetres que s'estan analitzant. Quan les cèl·lules passen pel làser, es generen dues deteccions inicials: la dispersió frontal (FSC, de l'anglès *forward scatter*) i la dispersió lateral (SCC, de

l'anglès *side scatter*). La primera indica la morfologia o mida de les cèl·lules i la segona és proporcional a la complexitat cel·lular, és a dir, ens informa de l'estructura cel·lular interna.

Els citòmetres de flux capaços de separar les cèl·lules que contenen una característica d'interès dins d'un grup heterogeni, s'anomenen FACS (de l'anglès *fluorescence-activated cell sorting*). L'anàlisi de dades i gràfics generats es realitza mitjançant *software* dissenyats específicament per la citometria de flux (404,405).

### 12.1. Assaig de cicle cel·lular

Es va analitzar l'estat del cicle cel·lular de les cèl·lules després de la infra-regulació de *DKK-1* mitjançant citometria de flux. Per a realitzar l'assaig, es va recollir el medi i es varen tripsinitzar les cèl·lules. Després de realitzar un rentat amb PBS, es varen fixar 1 milió de cèl·lules en 1mL d'etanol al 70% a -20°C durant 15min. Posteriorment, es varen centrifugar les cèl·lules durant 10min a 1500rpm i es varen realitzar dos rentats amb 1mL de PBS per a eliminar l'etanol. Es varen incubar les cèl·lules amb 1mg/mL de iodur de propidi (IP; Sigma-Aldrich) i 100µg/mL d'RNasa A (Sigma-Aldrich) en PBS durant tota la nit a 4°C. L'IP és un colorant fluorescent que s'intercala en les cadenes dobles d'ADN però és impermeable a la membrana cel·lular, per tant, només entra en les cèl·lules mortes. Les cèl·lules es varen analitzar amb el citòmetre FacsCalibur (Becton Dickinson). L'anàlisi dels resultats es va realitzar amb el *software FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software).

### 12.2. Separació cel·lular

Es va utilitzar la citometria de flux per a detectar i separar les cèl·lules GFP positives en la mostra d'interès posterior als models animals descrits als apartats 13.3 i 13.4. Es varen marcar les cèl·lules a estudiar amb IP (dilució 1:100) en PBS i es varen filtrar mitjançant filtres de 30µm (Sysmex CellTrics) per tal de separar els agregats de teixits presents a la mostra. Finalment, mitjançant el

separador cel·lular digital d'alta velocitat FacsAria (Becton Dickinson) es varen detectar i separar les cèl·lules GFP positives de les mostres. Com a control es va utilitzar un teixit sense cèl·lules GFP positives.

L'anàlisi dels resultats es va realitzar amb el *software FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software). Amb els marcatges realitzats es varen poder separar la població dels eritròcits presents a les mostres, i seleccionar només la població de cèl·lules vives. De la població de cèl·lules vives es varen seleccionar finalment les cèl·lules GFP positives presents a la mostra.

### 13. Model animal

Els ratolins femella SCID (de l'anglès *severe combined immunodeficiency*) i els ratolins femella Nude es varen adquirir a Charles River Laboratories i es varen estabular en condicions SPF (lliures de patògens específics, de l'anglès *specific-pathogen-free*) amb aigua i menjar *ad libitum*. Tots els protocols varen ser aprovats prèviament pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal del VHIR (CEEA 30/14). Els ratolins SCID (CB17/Icr-Prkdc(scid)/IcrIcoCrl), degut a la mutació en Prkdc<sup>scid</sup>, no tenen immunitat adaptativa, presenten doncs una deficiència severa en limfòcits T i B però sí que presenten cèl·lules NK (*Natural Killer*), macròfags i granulòcits. Els ratolins Nude (BALB/c Nude J (CByJ.Cg-Fox1nu/Crl)) no tenen timus i, per tant, són incapaços de produir limfòcits T, però sí que presenten limfòcits B i cèl·lules NK.

#### 13.1. Model ortotòpic: injecció de cèl·lules amb infra-expressió de *DKK-1*

Es varen utilitzar cèl·lules de la línia RD transduïdes prèviament de manera estable amb el vector lentiviral codificant per l'shRNA contra *DKK-1* més efectiu i el vector control (apartat 4). 7 dies post infecció, es varen injectar 1 milió cèl·lules en el múscul gastrocnemi de l'extremitat esquerra posterior del ratolí (n=5 ratolins/condició). Cada setmana es varen pesar els ratolins i es va monitorar el creixement tumoral utilitzant un peu de rei digital. Després del sacrifici dels



ratolins mitjançant dislocació cervical, els tumors es varen pesar i mesurar. El volum tumoral es va expressar com la diferència entre el volum del tumor i el volum de l'extremitat contralateral. El volum dels tumors es va calcular segons la fórmula d'una esfera (on L és llargària i A és amplària del tumor):

$$\text{Volum del tumor} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{L + A}{4}\right)^3$$

### **13.2. Model ortotòpic: tractament amb WAY-262611**

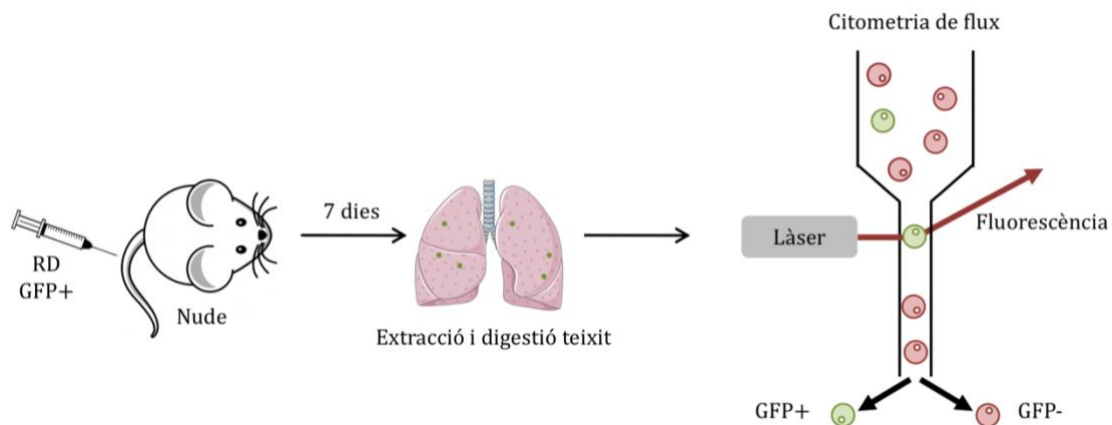
Per a testar *in vivo* l'efecte de l'inhibidor farmacològic de DKK-1 (WAY-262611) sobre el creixement del tumor primari, es varen injectar 1 milió de cèl·lules de la línia cel·lular RD en el múscul gastrocnemi de ratolins SCID, prèviament tractades a una concentració de 0.2µM durant 48h de WAY-262611. Els ratolins es varen dividir en 3 grups (n=5 ratolins/condició) i es varen tractar diàriament amb l'inhibidor a dues dosis (2.5mg/kg i 10mg/kg) mitjançant una injecció subcutània; els ratolins del grup control es varen tractar amb el mateix volum de vehicle (DMSO). Es va reconstituir l'inhibidor al 15% de DMSO en Clorur de sodi Meinsol 9mg/mL (Fresenius Kabi España). Es va controlar el pes dels ratolins diàriament i es va monitorar el creixement tumoral mitjançant un peu de rei digital. Després del sacrifici dels ratolins mitjançant dislocació cervical, els tumors es varen pesar i mesurar. El volum tumoral es va expressar com la diferència entre el volum del tumor i el volum de l'extremitat contralateral. El volum dels tumors es varen calcular segons la fórmula d'una esfera, detallada en apartat 13.1.

### **13.3. Model d'implantació de metàstasis: injecció de cèl·lules amb infra-expressió de DKK-1**

Es varen utilitzar cèl·lules de la línia RD transduïdes prèviament de manera estable amb el vector lentiviral codificant per l'shRNA contra *DKK-1* més efectiu (apartat 4). 7 dies post infecció, es varen injectar 3 milions de cèl·lules a la vena de la cua

dels ratolins Nude (n=3 ratolins/condició). Cèl·lules transduïdes amb el vector buit pGIPZ varen ser injectades en els ratolins control.

Després de 7 dies, es varen sacrificar els animals mitjançant dislocació cervical, es varen recollir els pulmons (teixit diana de les metàstasis) i es va procedir a la seva disgregació. Es varen trossejar els pulmons amb l'ajuda d'un bisturí, un cop trossejats es va afegir col·lagenasa (Sigma-Aldrich) al 2.5% diluïda en medi de cultiu MEM i es va incubar durant 1h a 37°C en agitació intensa. Seguidament, es varen fer dos rentats amb PBS, i es va resuspendre el *pellet* amb PBS i IP (dilució 1:100; Sigma-Aldrich). Mitjançant el separador cel·lular digital d'alta velocitat FacsAria es varen detectar les cèl·lules GFP positives de les mostres (apartat 12.2) (Figura M7). Com a control per al citòmetre es va utilitzar un pulmó d'un ratolí control, és a dir, sense haver-li injectat cèl·lules tumorals.



**Figura M7. Esquema representatiu del model d'implantació de metàstasis.** Es va injectar la línia cel·lular de RMS RD amb l'expressió constitutiva de la proteïna GFP a la vena de la cua dels ratolins Nude. Després d'una setmana, es varen sacrificar els animals, es varen extreure i disgregar els pulmons (teixit diana de les cèl·lules metastàtiques) i, posteriorment, es va determinar el nombre de cèl·lules GFP positives mitjançant citometria de flux.

#### 13.4. Model d'implantació de metàstasis: tractament amb WAY-262611

Es varen utilitzar cèl·lules de la línia RD transduïdes prèviament de manera estable amb el vector control, ja que era necessària l'expressió de GFP per a la posterior selecció de les cèl·lules GFP positives amb el citòmetre. Prèviament, les cèl·lules es varen tractar amb l'inhibidor de DKK-1 (WAY-262611) a una concentració de 0.2µM durant 48h. Les cèl·lules control es varen tractar amb el vehicle (DMSO)

durant 48h. Es varen injectar 3 milions de cèl·lules a la vena de la cua dels ratolins Nude (n=3 ratolins/condició). Els ratolins d'aquest grup es varen tractar diàriament i de manera subcutània a una dosi de 10mg/kg de l'inhibidor fins al sacrifici. Es va reconstituir l'inhibidor al 15% de DMSO en Clorur de sodi Meinsol 9mg/mL (Fresenius Kabi España). Els ratolins control es varen tractar amb el volum equivalent del vehicle (DMSO).

El procediment de disgregació i anàlisi amb el separador cel·lular digital FacsAria varen ser els mateixos que els detallats als apartats 13.3 i 12.2.

#### **14. Anàlisi estadístic**

Les figures, taules i anàlisis estadístics es varen generar amb els *softwares* ImageJ, Fiji i GraphPad Prism. La significança estadística es va determinar mitjançant el *software* GraphPad Prism utilitzant els següents anàlisis estadístics:

- Prova T de Student: permet determinar les diferències entre les mitges de dos grups de dades que segueixen una distribució normal.
- Correlació de Pearson: mesura la relació lineal entre dues variables aleatòries quantitatives.

Es varen considerar valors significatius els que presentaven un p-valor<0.05, i els graus de significança es representen com \*p<0.05, \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

## IV. RESULTATS

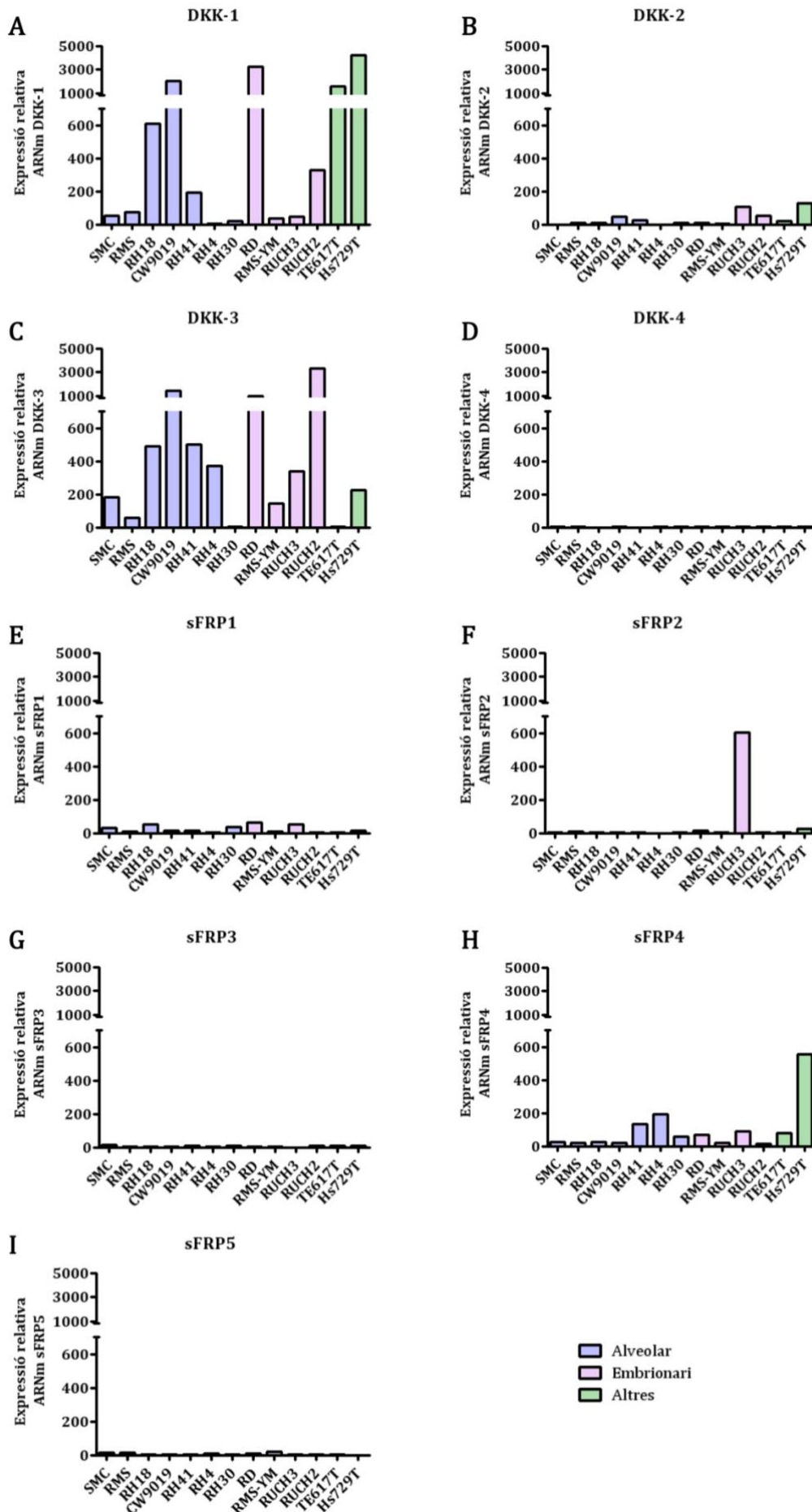


## 1. DKK-1 és l'inhibidor de la via Wnt més expressat en línies cel·lulars i tumors de RMS

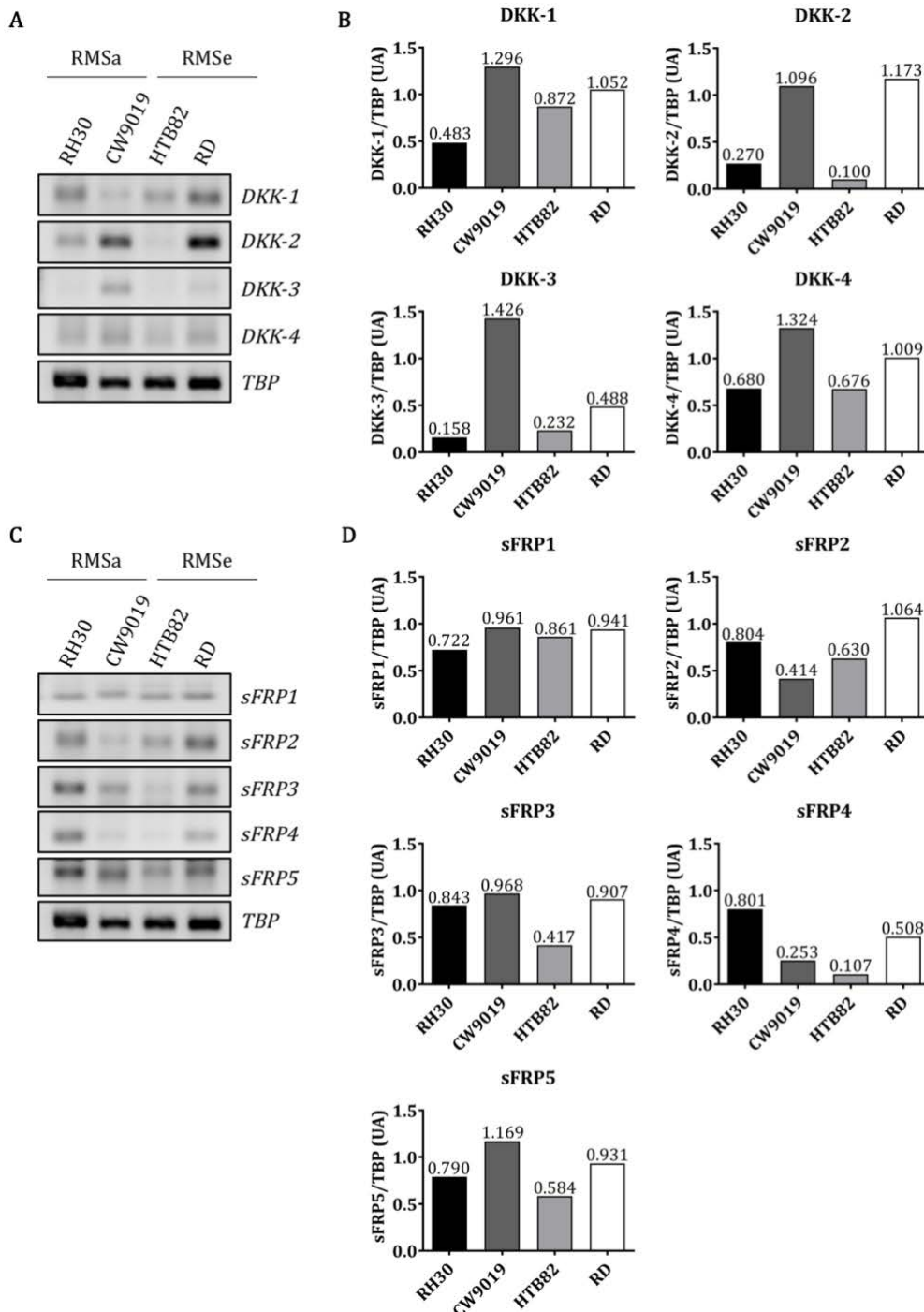
### 1.1. Expressió dels inhibidors de la via Wnt en línies cel·lulars de RMS

Es va analitzar l'expressió dels antagonistes de la via Wnt (*DKK(1-4)* i *sFRP(1-5)*) en bases de dades d'expressió gènica per tal de determinar si la inhibició de la via Wnt en RMS és deguda a la seva expressió. Les dades d'expressió d'aquests inhibidors en línies cel·lulars de RMS es varen extreure de la base de dades GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), concretament de l'estudi anomenat GSE8840 (*Effect of genomic imbalances on gene expression in rhabdomyosarcoma*) (Figura R1). Es varen analitzar línies de RMS corresponents als dos subtipus histològics: en blau es representen les línies cel·lulars corresponents al subtipus alveolar (SMC, RMS, RH18, CW9019, RH41, RH4 i RH30) i en rosa es representen les línies cel·lulars corresponents al subtipus embrionari (RD, RMS-YM, RUCH3 i RUCH2). També es varen analitzar les línies cel·lulars TE617T (origen desconegut) i Hs729T (subtipus pleomòrfic), les quals es representen en color verd. L'anàlisi de les dades obtingudes de la base de dades mostra una molt baixa expressió dels inhibidors *sFRP* en totes les línies cel·lulars de RMS analitzades. En canvi, s'observa una elevada expressió dels gens *DKK* en el panell de línies de RMS analitzades, concretament de *DKK-1* i *DKK-3* en la majoria de línies cel·lulars, suggerint que els gens *DKK* podrien ser els responsables de la inhibició de la via Wnt en RMS.

Amb la finalitat de confirmar els resultats obtinguts, es varen analitzar els nivells d'ARNm dels inhibidors *DKK* (Figura R2-A) i *sFRP* (Figura R2-C) en 4 línies de RMS mitjançant PCR convencional. Es varen analitzar dues línies cel·lulars de RMS alveolar (RH30 i CW9019) i dues línies cel·lulars de RMS embrionari (HTB82 i RD). Els resultats obtinguts mostren que l'inhibidor expressat de manera elevada i constant en totes les línies cel·lulars analitzades és *DKK-1*.



**Figura R1. Expressió dels inhibidors de la via Wnt, *DKK* i *sFRP*, en línies cel·lulars de RMS.** Representació dels valors d'expressió d'ARNm dels inhibidors de la via Wnt en un panell de línies de RMS extretes de la base de dades GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) (A-I). Les línies cel·lulars corresponent al subtipus alveolar es mostren en color blau, les línies cel·lulars corresponents al subtipus embrionari es mostren en color rosa i les línies cel·lulars corresponents a altres subtipus es mostren en color verd. A-D: Expressió dels inhibidors *DKK* (1-4); E-I: Expressió dels inhibidors *sFRP* (1-5).



**Figura R2. Les línies cel·lulars de RMS expressen els inhibidors de la via Wnt, *DKK* i *sFRP*.** Anàlisi de l'expressió d'ARNm dels inhibidors *DKK-1*, *DKK-2*, *DKK-3*, *DKK-4* (A) i *sFRP1*, *sFRP2*, *sFRP3*, *sFRP4* i *sFRP5* (C) en 4 línies cel·lulars de RMS, dues corresponents al subtipus alveolar (RH30 i CW9019) i dues corresponents al subtipus embrionari (HTB82 i RD) mitjançant PCR convencional. Es va utilitzar el gen *TBP* com a control de càrrega. B i D: Densitometries de les imatges obtingudes pels gens *DKK* (B) i *sFRP* (D).

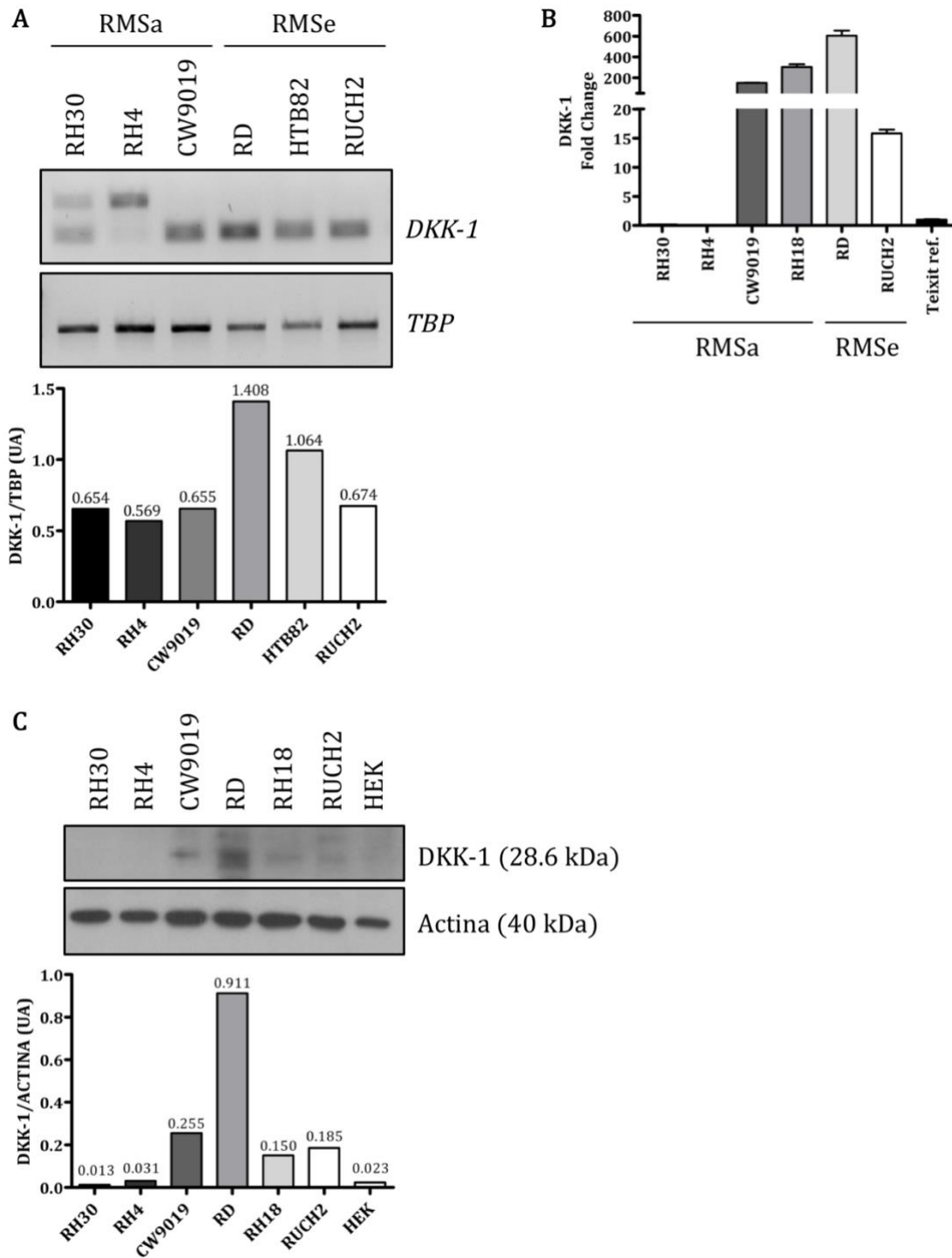


### 1.1.1. Expressió de DKK-1 en línies cel·lulars de RMS

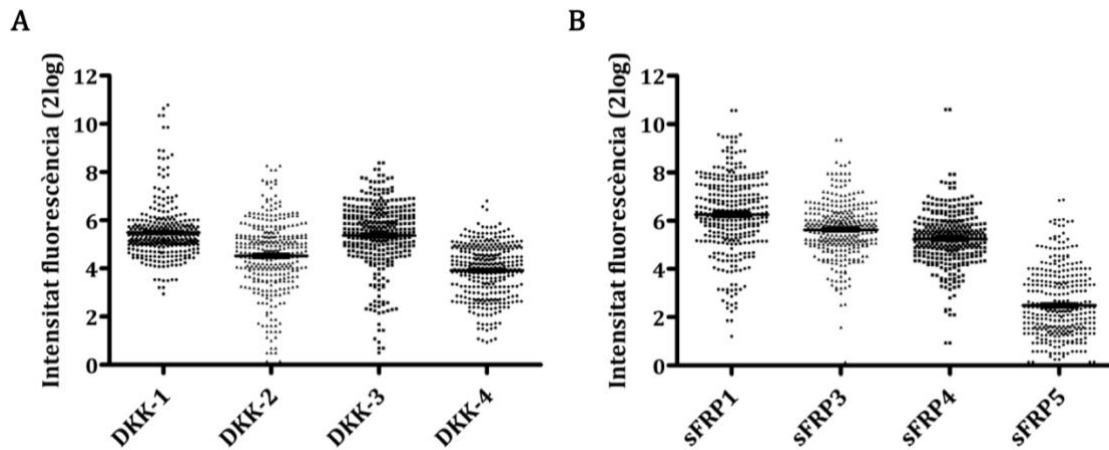
Després de determinar que l'inhibidor *DKK-1* és el més expressat en línies cel·lulars de RMS, es va realitzar un anàlisi de l'expressió de *DKK-1* en un panell més ampli de línies cel·lulars de RMS (Figura R3) mitjançant PCR convencional (Figura R3-A) i RT-qPCR (Figura R3-B), analitzant en el darrer cas el múscul sa com a teixit de referència. També es varen analitzar els nivells de proteïna *DKK-1* presents en les línies cel·lulars de RMS mitjançant *Western blot* (Figura R3-C), utilitzant la línia cel·lular HEK com a control positiu. Els resultats obtinguts mitjançant PCR convencional mostren expressió de l'inhibidor *DKK-1* en totes les línies cel·lulars de RMS analitzades, amb un augment d'expressió en les línies cel·lulars del subtipus embrionari. Els valors d'expressió obtinguts mitjançant RT-qPCR confirmen els resultats obtinguts prèviament. Els resultats del *Western blot* mostren una elevada expressió de *DKK-1* en les línies cel·lulars de RMS analitzades, obtenint una major expressió en la línia cel·lular CW9019 del subtipus alveolar i en la línia cel·lular RD del subtipus embrionari.

### 1.2. Expressió dels inhibidors en tumors de RMS

Amb la finalitat de determinar els nivells d'expressió dels inhibidors de la via Wnt en tumors de RMS, es va consultar la plataforma d'anàlisi de dades *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). Concretament, es varen consultar les bases de dades anomenades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" en la qual consten dades d'expressió gènica de 147 tumors de RMS i la "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" on consten dades de 186 tumors de RMS (Figura R4). Es va analitzar l'expressió dels gens *DKK* (Figura R4-A) i *sFRP* (Figura R4-B). Les bases de dades analitzades no contenen informació de l'expressió d'*sFRP2*. Els resultats obtinguts mostren una elevada expressió dels inhibidors de la via Wnt, mostrant una major expressió de *DKK-1*, *DKK-3* i *sFRP1*.



**Figura R3. L'inhibidor *DKK-1* està altament expressat en línies cel·lulars de RMS.** **A:** Anàlisi de l'expressió de l'inhibidor *DKK-1* en línies cel·lulars de RMS alveolar (RH30, RH4 i CW9019) i embrionari (RD, HTB82 i RUCH2) mitjançant PCR convencional. Es va utilitzar el gen *TBP* com a control de càrrega. **B:** Anàlisi mitjançant RT-qPCR dels nivells d'expressió de *DKK-1* en 6 línies cel·lulars de RMS, 4 corresponents a línies cel·lulars de RMS alveolar (RH30, RH4, CW9019 i RH18) i 2 corresponents a línies cel·lulars de RMS embrionari (RD i RUCH2). Els valors obtinguts estan expressats com  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ , normalitzats amb el gen endogen *TBP* i referits al teixit control (múscul sa). **C:** Imatge de *Western blot* i la seva corresponent densitometria que mostren l'expressió de *DKK-1* en les mateixes línies cel·lulars; la línia HEK es va utilitzar com a control positiu. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega.



**Figura R4. Expressió dels inhibidors de la via Wnt en tumors de RMS.** Expressió dels gens *DKK* (A) i *sFRP* (B), les línies horitzontals representen la mitja dels valors obtinguts  $\pm$  SEM. Les dades es varen extreure de les base de dades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" i la "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" utilitzant la plataforma d'anàlisi de dades genòmiques R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>).

### 1.2.1. Expressió de *DKK-1* en tumors de RMS i la seva possible implicació clínica

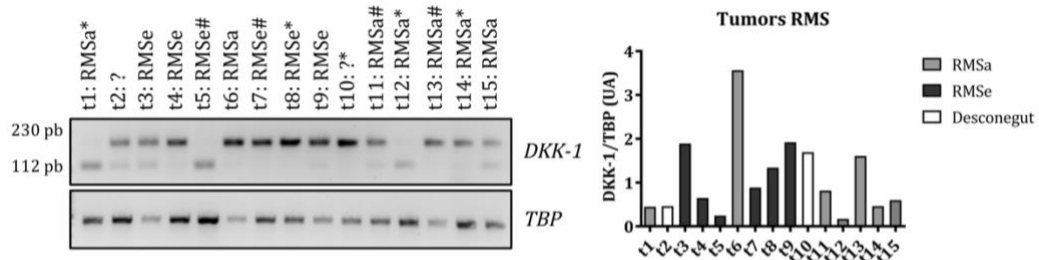
Primerament, es varen analitzar els nivells d'expressió d'ARNm de *DKK-1* en tumors de RMS mitjançant PCR convencional (Figura R5-A) per tal de confirmar la presència d'aquest gen en mostres de pacients. Els resultats mostren que *DKK-1* està altament expressat en tumors de RMS. Es varen obtenir dues bandes, una banda inferior esperada corresponent a 112pb i una banda superior inesperada corresponent a 230pb. Posteriorment, per descobrir l'origen de les dues bandes es va procedir a seqüenciar, mitjançant el mètode Sanger, el gen *DKK-1* en dues de les mostres on apareixia la banda superior, corresponents al subtipus embrionari (t4) (Figura R5-B) i al subtipus alveolar (t11) (Figura R5-C). En els dos casos, es va observar la falta de processament de l'intró número 3 de *DKK-1* corresponent a les 118pb addicionals (l'inici i el final de l'intró estan indicats amb fletxes negres en els dos casos). El tumor de RMSe (t4) inicia la no eliminació de l'intró a la base número 43 i finalitza a la base número 160 (Figura R5-B). El tumor de RMSa (t11) inicia el manteniment de l'intró a la base número 35 i finalitza a la base número 152 (Figura R5-C). El manteniment de l'intró inclou també la presència d'un codó d'aturada (TAG) indicat amb una fletxa vermella, en el cas del tumor de RMSe es

troba a la posició 66-68 (Figura R5-B) i en el cas del tumor de RMSa es localitza a la posició 58-60 (Figura R5-C).

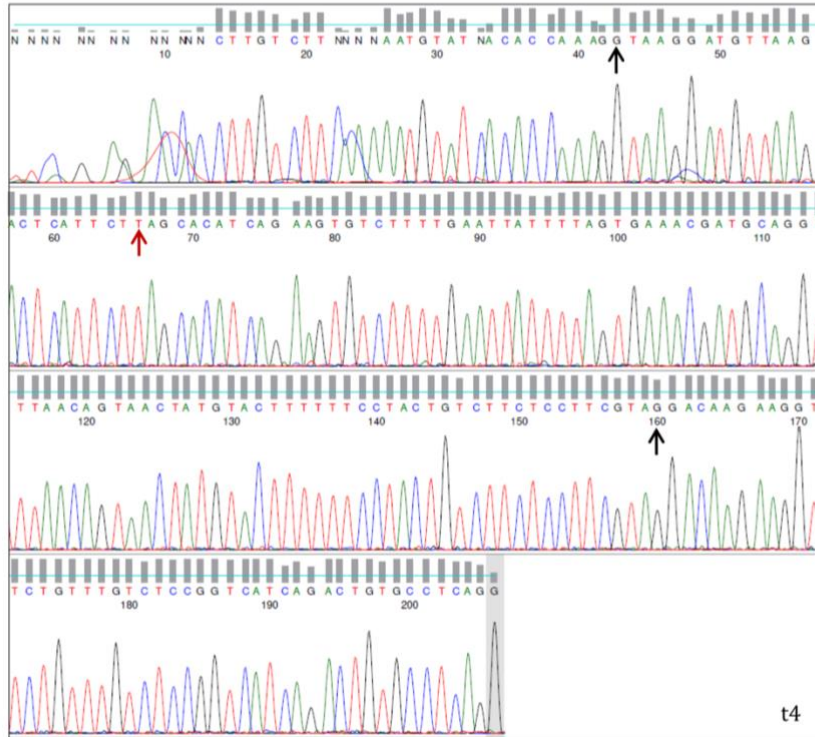
Seguidament, es va analitzar l'expressió de *DKK-1* mitjançant RT-qPCR en un conjunt de tumors de RMS (Figura R6), utilitzant múscul sa com a teixit de referència. Es va dividir la població de pacients segons si els tumors eren localitzats o metastàtics (Figura R6-A) i segons el subtipus histològic (Figura R6-B). Tot i que el número de tumors analitzats és baix degut a la baixa freqüència d'aquest tumor i a la poca mostra disponible per a recerca, els resultats suggereixen una tendència moderada d'una major expressió de *DKK-1* en el subgrup de tumors metastàtics i en els tumors de subtipus embrionari.

Posteriorment, es va analitzar l'expressió de *DKK-1* mitjançant la plataforma d'anàlisi de dades *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) (Figura R7). Es varen analitzar les bases de dades anomenades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" (expressió gènica de 147 tumors de RMS) (Figura R7-A) i "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" (expressió gènica de 186 tumors de RMS) (Figura R7-B). En ambdós casos es correlaciona l'expressió de l'inhibidor *DKK-1* i paràmetres clínics tals com la histologia del tumor, l'estat o l'estadi de la malaltia, entre altres.

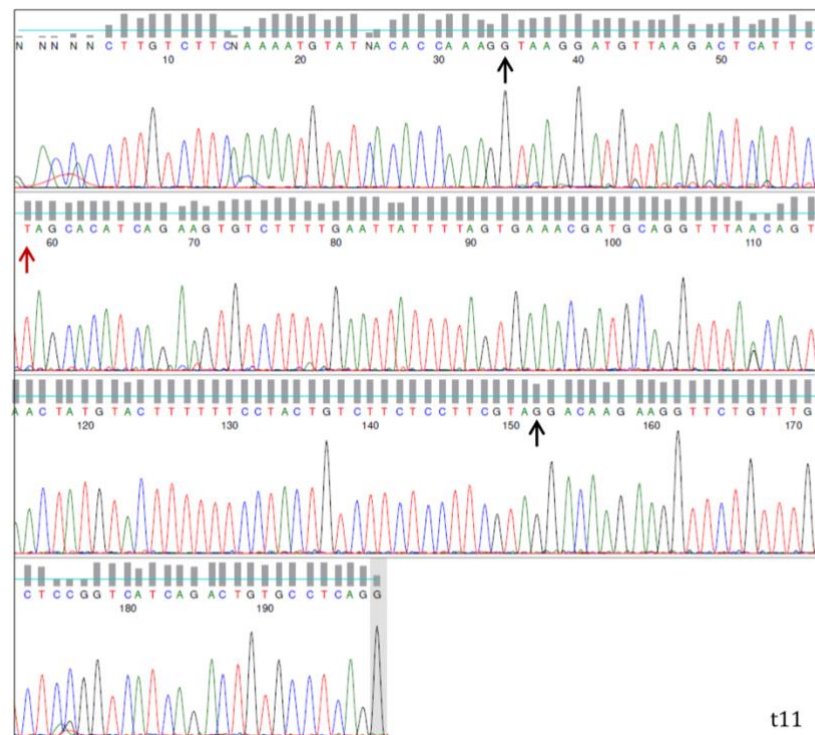
A



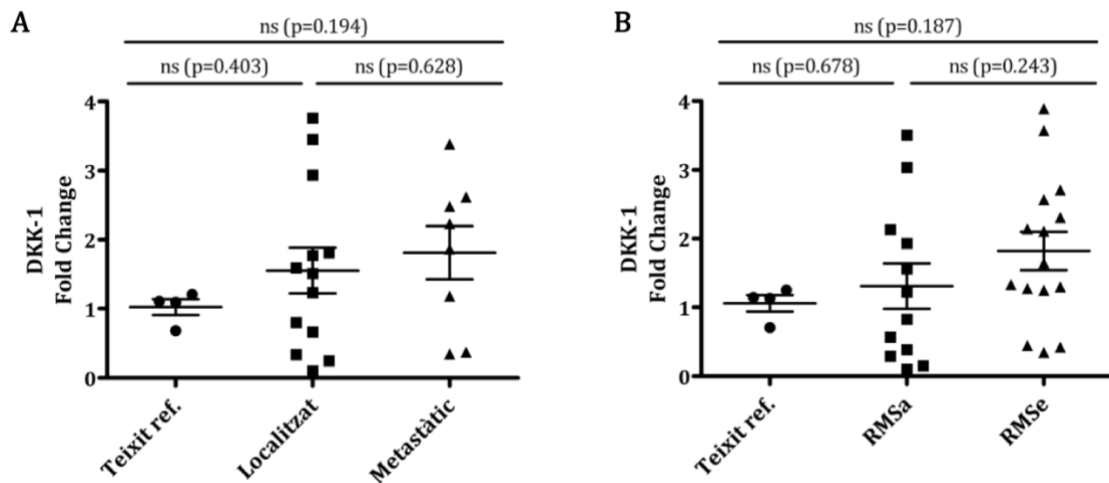
B



C

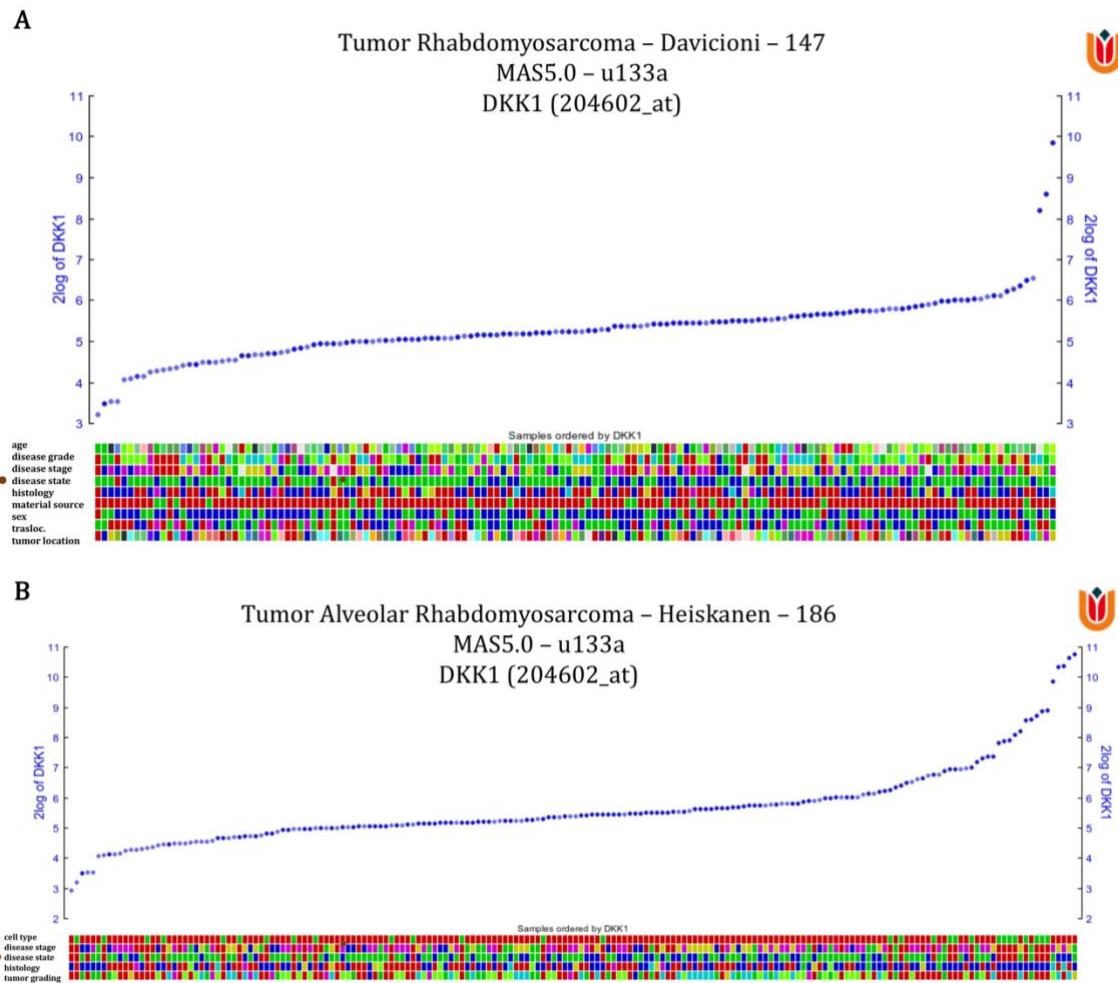


**Figura R5. L'inhibidor *DKK-1* està altament expressat en tumors de RMS.** **A:** Anàlisi de l'expressió de l'inhibidor *DKK-1* en tumors de RMS mitjançant PCR convencional i la seva corresponent densitometria. Es va utilitzar el gen *TBP* com a control de càrrega. Els tumors metastàtics s'indiquen amb (\*) i els tumors localitzats s'indiquen amb (#). Els (?) representen tumors de subtipus histològic indeterminat. Els tumors de RMSa amb la translocació *PAX3-FOXO1* són t1, t6, t13 i t14; t12 és el tumor de RMSa amb la translocació *PAX7-FOXO1*. Els tumors de RMSa negatius per la translocació són t11 i t15. **B i C:** Seqüenciació Sanger de dos tumors de RMS corresponents als dos subtipus histològics, on s'observa el manteniment de 118pb corresponents a l'intró 3 de *DKK-1*. **B:** Seqüenciació del tumor de RMSe (t4): a la base número 43 s'inicia la no eliminació de l'intró i a la base número 160 s'acaba (inici i final indicats amb fletxes negres). S'observa la incorporació d'un codó d'aturada (TAG) a la posició 66-68 (indicat amb una fletxa vermella). **C:** Seqüenciació del tumor de RMSa (t11): a la base número 35 s'inicia el manteniment de l'intró i a la base número 152 s'acaba (inici i final indicats amb fletxes negres). S'observa la incorporació d'un codó d'aturada (TAG) a la posició 58-60 (indicat amb una fletxa vermella).



**Figura R6. L'inhibidor *DKK-1* està altament expressat en tumors de RMS, concretament en tumors metastàtics i en el subtipus embrionari.** Anàlisi mitjançant RT-qPCR dels nivells d'expressió d'ARNm de *DKK-1* en tumors de RMS. Els valors estan expressats com  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i les línies horitzontals representen la mitja dels valors obtinguts. Anàlisi de l'expressió de *DKK-1* en tumors de RMS classificats com a tumors localitzats o metastàtics (n=21) (**A**) i classificats segons el subtipus alveolar (RMSa) o embrionari (RMSe) (n=27) (**B**). Els resultats es varen referir al teixit de referència (múscul sa).

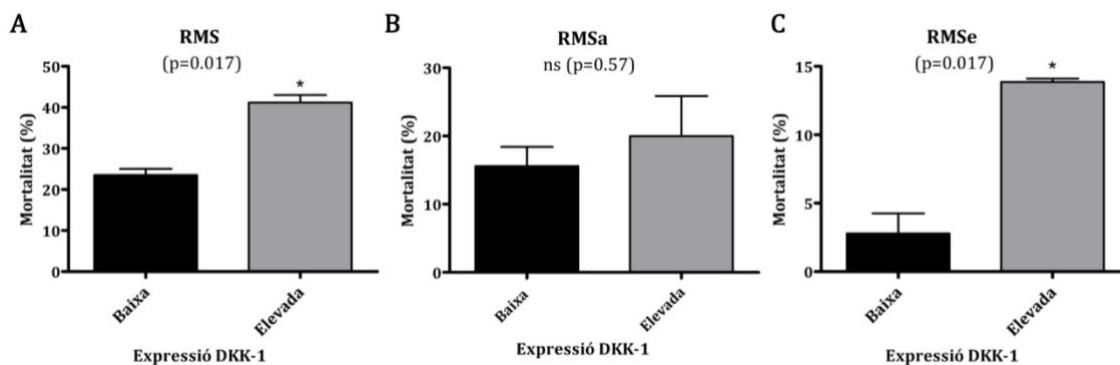




**Figura R7. Correlació de l'expressió de l'inhibidor *DKK-1* amb paràmetres clínics de pacients amb RMS.** Gràfics que mostren els nivells de *DKK-1* en tumors de RMS classificats segons paràmetres clínics com la histologia, l'estadi o l'estat de la malaltia. Les dades es varen extreure de les base de dades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" (A) i "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" (B) utilitzant la plataforma d'anàlisi de dades genòmiques R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>).

Ens vàrem centrar en el paràmetre d'estat de la malaltia (*disease state*; indicat amb un punt a la Figura R7), essent els requadres verds els pacients vius, els requadres blaus els pacients morts i els requadres vermells pacients amb un estat de la malaltia desconegut. Vàrem dividir el gràfic obtingut en dos, essent la meitat de l'esquerra els pacients amb nivells de *DKK-1* baixos i la meitat de la dreta els pacients amb nivells de *DKK-1* elevats (Figura R7). Al realitzar la separació de grups segons els nivells d'expressió de *DKK-1* es va observar una major mortalitat en els pacients amb nivells elevats de *DKK-1* (Figura R8-A). Classificant els pacients segons el subtipus histològic i els nivells d'expressió de *DKK-1* (baixos o elevats) es va observar un augment de la mortalitat en els grups d'elevada expressió tan al

subtipus histològic alveolar (Figura R8-B) com al subtipus histològic embrionari (Figura R8-C). Els resultats mostren una major mortalitat en el grup de tumors amb elevada expressió de *DKK-1*, significativa en el cas global i en el subtipus embrionari.



**Figura R8. L'expressió de *DKK-1* en tumors de RMS es correlaciona amb una major mortalitat.** **A:** Percentatge de mortalitat en pacients amb RMS segons el nivell d'expressió de *DKK-1*. **B i C:** Percentatge de mortalitat segons el nivell d'expressió de *DKK-1* i el subtipus histològic de RMS, alveolar i embrionari, respectivament. Les dades es varen extreure de les base de dades "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" i la "Tumor Alveolar Rhabdomyosarcoma-Heiskanen-186-MAS5.0-u133a" utilitzant la plataforma d'anàlisi de dades genòmiques *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). Significació estadística: \*p<0.05.

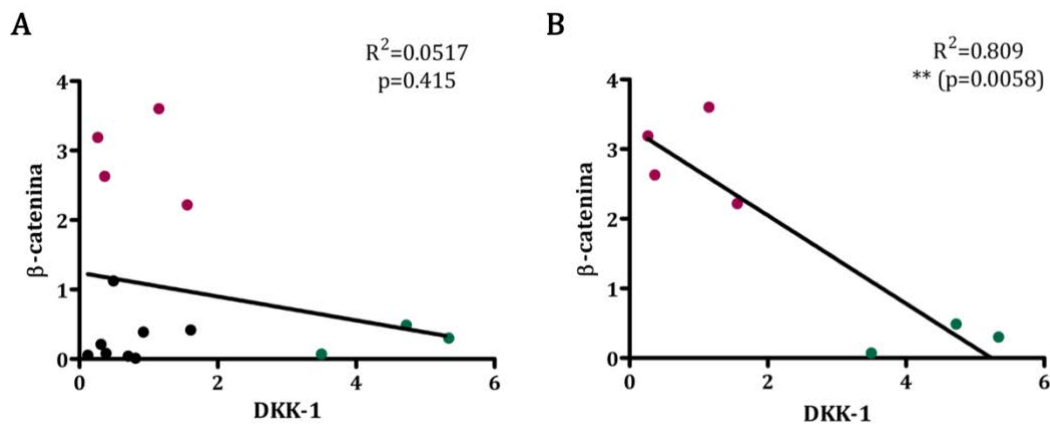
## 2. La presència de *DKK-1* correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en RMS

### 2.1. L'expressió de *DKK-1* correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en tumors de RMS

Amb la finalitat d'estudiar la relació de l'expressió de *DKK-1* i l'activació de la via Wnt en tumors de RMS, es va analitzar la correlació entre els nivells d'expressió proteica de *DKK-1* i la proteïna efectora de la via ( $\beta$ -catenina) (Figura R9). Els tumors amb elevada expressió de  $\beta$ -catenina i baixa expressió de *DKK-1* es mostren en color rosa, en negre s'indiquen els tumors amb nivells baixos d'ambdues proteïnes i en verd els tumors amb elevada expressió de *DKK-1* i baixa expressió de  $\beta$ -catenina. L'anàlisi de l'expressió proteica de *DKK-1* i  $\beta$ -catenina va mostrar una tendència de regressió lineal (Figura R9-A). Excloent de l'estudi els tumors que no expressen ni  $\beta$ -catenina ni *DKK-1*, s'obté una regressió lineal significativa (p=0.0058) (Figura R9-B). Aquest resultat suggereix que la presència



de DKK-1 causa la inhibició de la via Wnt ja que redueix els nivells de  $\beta$ -catenina en tumors de RMS.

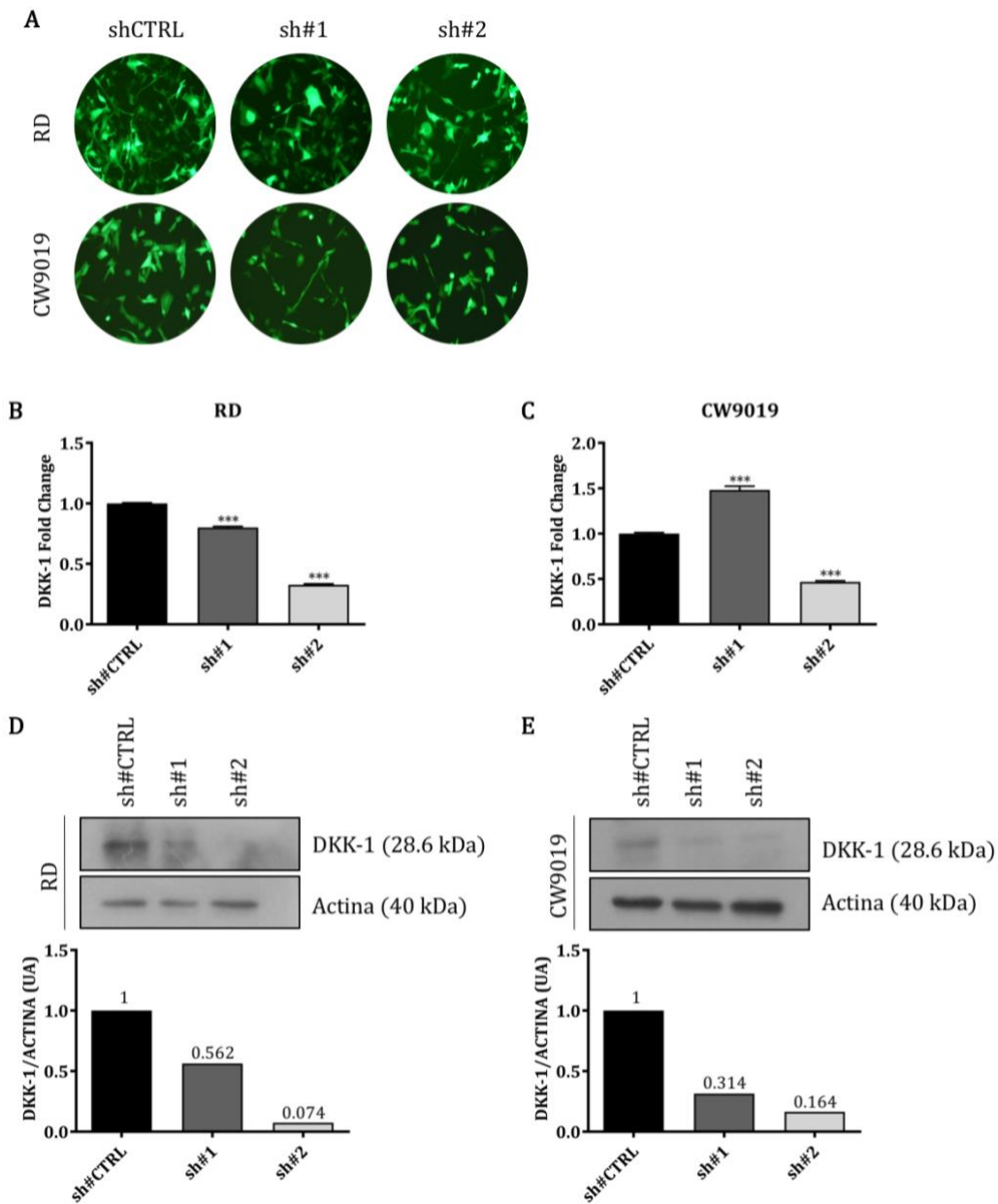


**Figura R9. L'elevada expressió de DKK-1 correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en tumors de RMS. A:** Correlació entre els nivells de proteïna  $\beta$ -catenina i DKK-1 en tumors de RMS. En color rosa es mostren els tumors amb elevada expressió de  $\beta$ -catenina i baixa expressió de DKK-1, en color verd els tumors amb elevada expressió de DKK-1 i baixa expressió de  $\beta$ -catenina i en color negre es mostren els tumors amb nivells baixos d'ambdues proteïnes. **B:** Representació de la correlació entre els nivells de proteïna  $\beta$ -catenina i DKK-1 en tumors de RMS, exclouent els tumors amb baixa expressió d'ambdues proteïnes. Significació estadística:  $**p<0.01$ .

## 2.2. La infra-expressió de *DKK-1* en línies cel·lulars de RMS promou l'activació de la via Wnt

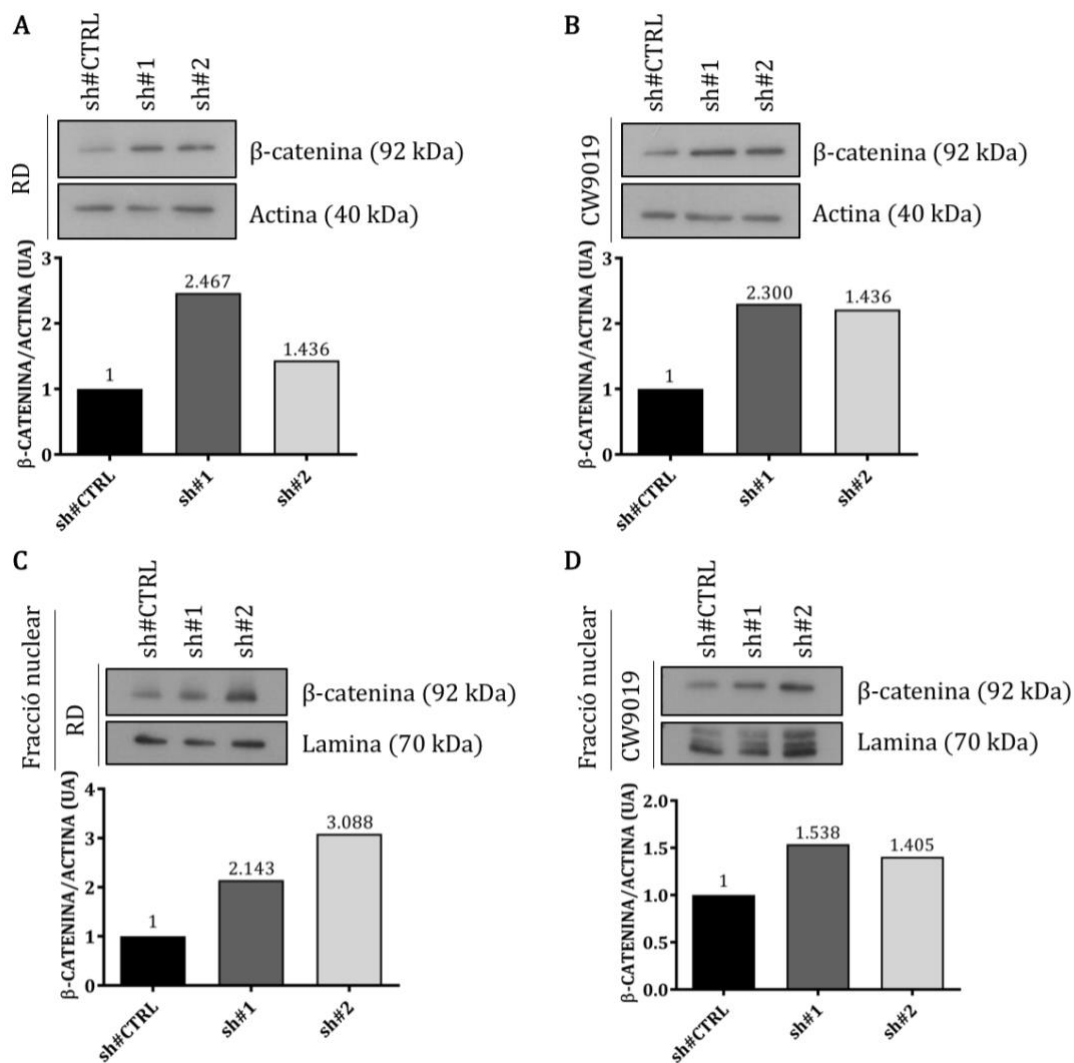
Amb la finalitat d'investigar la capacitat de DKK-1 per inhibir la via Wnt, es varen generar clons de dues línies cel·lulars de RMS (CW9019 i RD, corresponents als subtipus principals de RMS, alveolar i embrionari, respectivament) amb infra-regulació genètica de *DKK-1* mitjançant shRNA (Figura R10). Es va avaluar la integració del vector víric mitjançant l'expressió de la proteïna GFP amb un microscopi d'epifluorescència (Figura R10-A). Es va analitzar l'eficàcia d'inhibició dels diferents shRNA mitjançant RT-qPCR (Figura R10, B i C) i *Western blot* (Figura R10, D i E). Es varen seleccionar dos shRNA diferents i es va analitzar l'expressió gènica de *DKK-1* després de la seva infra-regulació, mostrant una reducció dels nivells d'ARNm de *DKK-1* en els dos shRNA en la línia cel·lular RD (Figura R10-B). La línia cel·lular CW9019 va mostrar reducció dels nivells d'ARNm de *DKK-1* en el cas de l'sh#2, però no en el cas de l'sh#1 (Figura R10-C). Es va analitzar l'eficàcia de la tecnologia analitzant els nivells de proteïna DKK-1 després de la infra-

regulació del gen (Figura R10, D i E). Els resultats obtinguts del *Western blot* després de la infra-regulació del gen *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 varen revelar una reducció dels seus nivells de proteïna mostrant una elevada eficàcia de la tècnica.



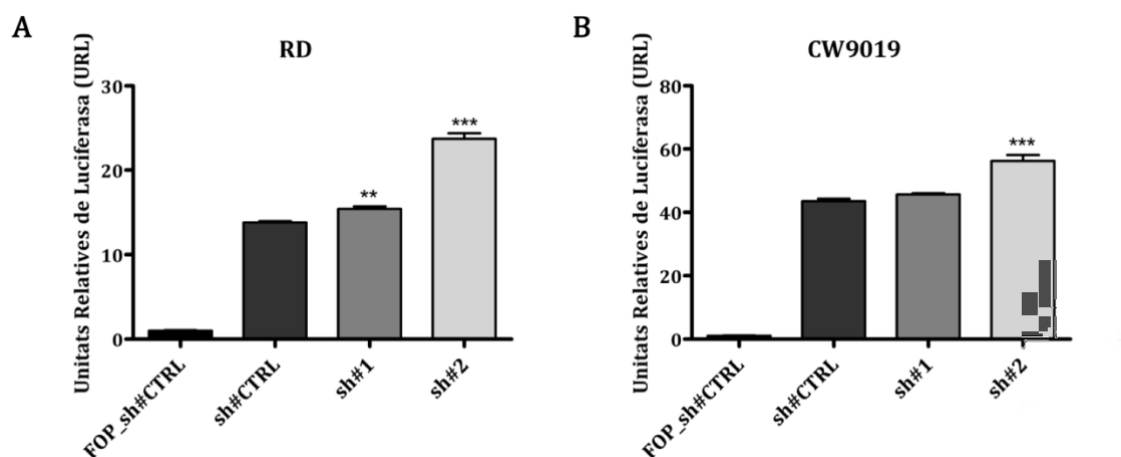
**Figura R10. Avaluació de la infra-regulació de *DKK-1* mitjançant shRNA en les línies cel·lulars RD (RMSe) i CW9019 (RMSa).** A: Imatges de l'expressió de la proteïna GFP després de la transducció lentiviral dels shRNA. B i C: Anàlisi d'RT-qPCR dels nivells d'expressió d'ARNm de *DKK-1* després de la seva infra-regulació en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els valors estan expressats com  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i normalitzats amb el gen endogen *TBP*. Es varen comparar els resultats amb els nivells d'ARNm de les cèl·lules control (cèl·lules transduïdes amb el control buit). D i E: Imatges de *Western blot* i les seves corresponents densitometries que confirmen la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els resultats de les densitometries es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \*\*\* $p < 0.001$ .

Posteriorment, es varen analitzar els nivells del gen efector de la via,  $\beta$ -catenina, per tal de comprovar l'efecte de la depleció gènica de *DKK-1* sobre l'activació de la via Wnt. Es va analitzar mitjançant *Western blot* el nivell d'expressió total de  $\beta$ -catenina després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R11, A i B). Els resultats obtinguts mostren un augment dels nivells de  $\beta$ -catenina totals després del bloqueig de *DKK-1*. Seguidament i amb l'objectiu de determinar la localització cel·lular de  $\beta$ -catenina, es va realitzar un subfraccionament cel·lular per a la posterior extracció de proteïna després de la infra-regulació de *DKK-1* (Figura R11, C i D). El resultat del subfraccionament va mostrar un augment de l'expressió de  $\beta$ -catenina nuclear, fet que indica una translocació d'aquesta proteïna a nucli. La localització nuclear de  $\beta$ -catenina suggereix que la infra-regulació de *DKK-1* es capaç d'activar la via Wnt en RMS.



**Figura R11. La infra-regulació genètica de *DKK-1* causa un augment del gen efector de la via Wnt,  $\beta$ -catenina.** A i B: Imatges de *Western blot* i les seves respectives densitometries que mostren un augment dels nivells de  $\beta$ -catenina total després de la infra-regulació de *DKK-1*, en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. C i D: Imatges de *Western blot* i les seves respectives densitometries que mostren un augment dels nivells nuclears de  $\beta$ -catenina després de la infra-regulació de *DKK-1*, en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els resultats de les densitometries es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). L'actina i la lamina es varen utilitzar com a control de càrrega.

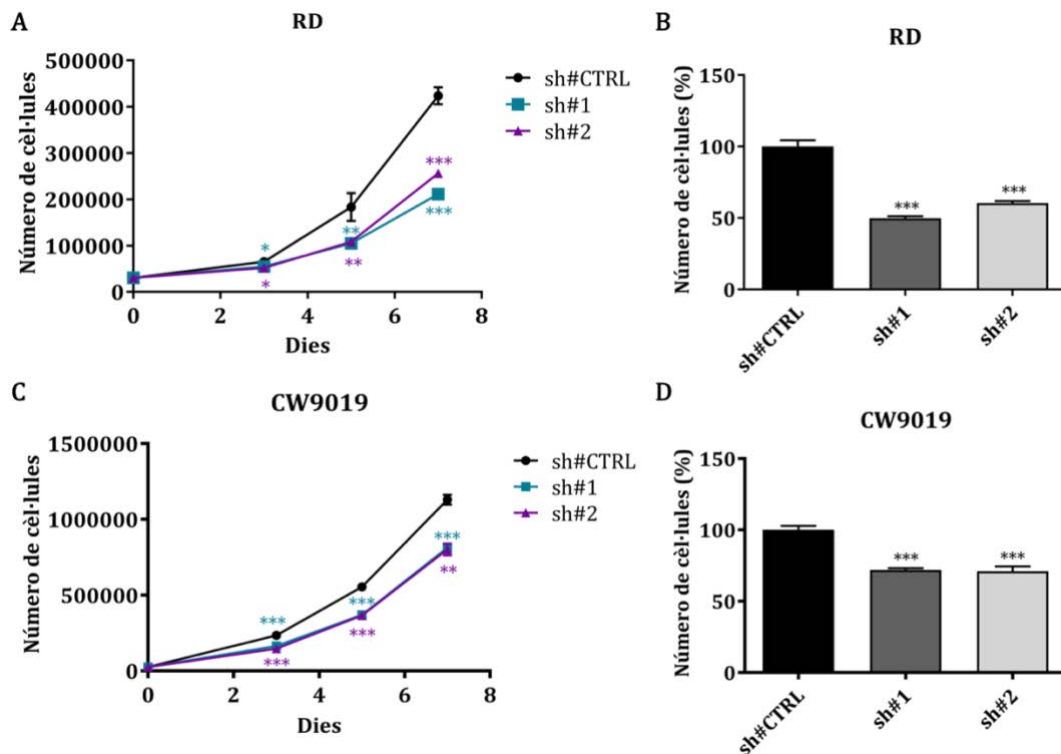
Es va realitzar l'assaig luciferasa per tal de comprovar el grau d'activació de la via Wnt després de la infra-regulació de *DKK-1* (Figura R12). Es varen transfectar, amb els plasmidis reporters de l'activitat luciferasa de  $\beta$ -catenina, les cèl·lules prèviament infectades amb l'shRNA de *DKK-1*. Posteriorment, es va procedir a realitzar la lectura de l'activitat luciferasa. Els resultats obtinguts mostren cert nivell d'activació basal de la via Wnt (mostrat per l'sh#CTRL) tan en la línia cel·lular RD (Figura R12-A) com en la línia cel·lular CW9019 (Figura R12-B). Els gràfics mostren també l'expressió del plasmidi control (FOPFlash) utilitzat com a control negatiu, obtenint en aquest cas valors pròxims a 0. Els resultats obtinguts en les dues línies cel·lulars mostren un augment de l'activitat luciferasa, més elevat en el cas de l'sh#2, després del bloqueig de *DKK-1*. L'augment de l'activitat luciferasa del promotor de  $\beta$ -catenina confirma l'activació de la via Wnt en ambdues línies cel·lulars.



**Figura R12. L'assaig luciferasa mostra un augment de la luminescència després de la infra-regulació de *DKK-1*.** Resultats obtinguts en la línia cel·lular RD (A) i en la línia cel·lular CW9019 (B). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). El vector FOPFlash es va utilitzar com a control negatiu de la tècnica. Significació estadística: \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

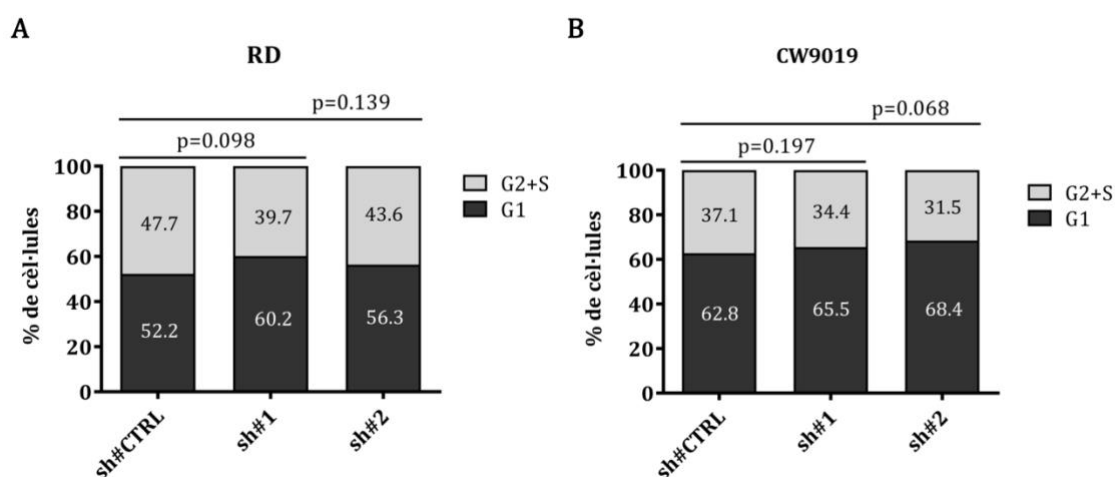
### 3. L'activació de la via Wnt causa la reducció del creixement cel·lular *in vitro*

Per determinar la implicació de *DKK-1* en el creixement cel·lular es va realitzar un assaig de creixement cel·lular després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R13). Es va analitzar la corba de creixement cel·lular per tal d'avaluar l'efecte de la privació de *DKK-1* sobre el creixement cel·lular després de 3, 5 i 7 dies en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R13, A i C, respectivament). Després de quantificar el creixement de les cèl·lules al final de l'experiment (dia 7), es va comprovar que la infra-regulació de *DKK-1* redueix significativament el creixement de la línia cel·lular RD (Figura R13-B) i de la línia cel·lular CW9019 (Figura R13-D). La infra-regulació de *DKK-1* va començar a causar una reducció significativa del creixement de les cèl·lules a dia 3 en les dues línies cel·lulars. Les diferències del creixement cel·lular es varen evidenciar més a dia 5. La infra-regulació de *DKK-1* en la línia cel·lular RD mostra una major reducció del creixement cel·lular, tenint efectes menors en la línia CW9019.



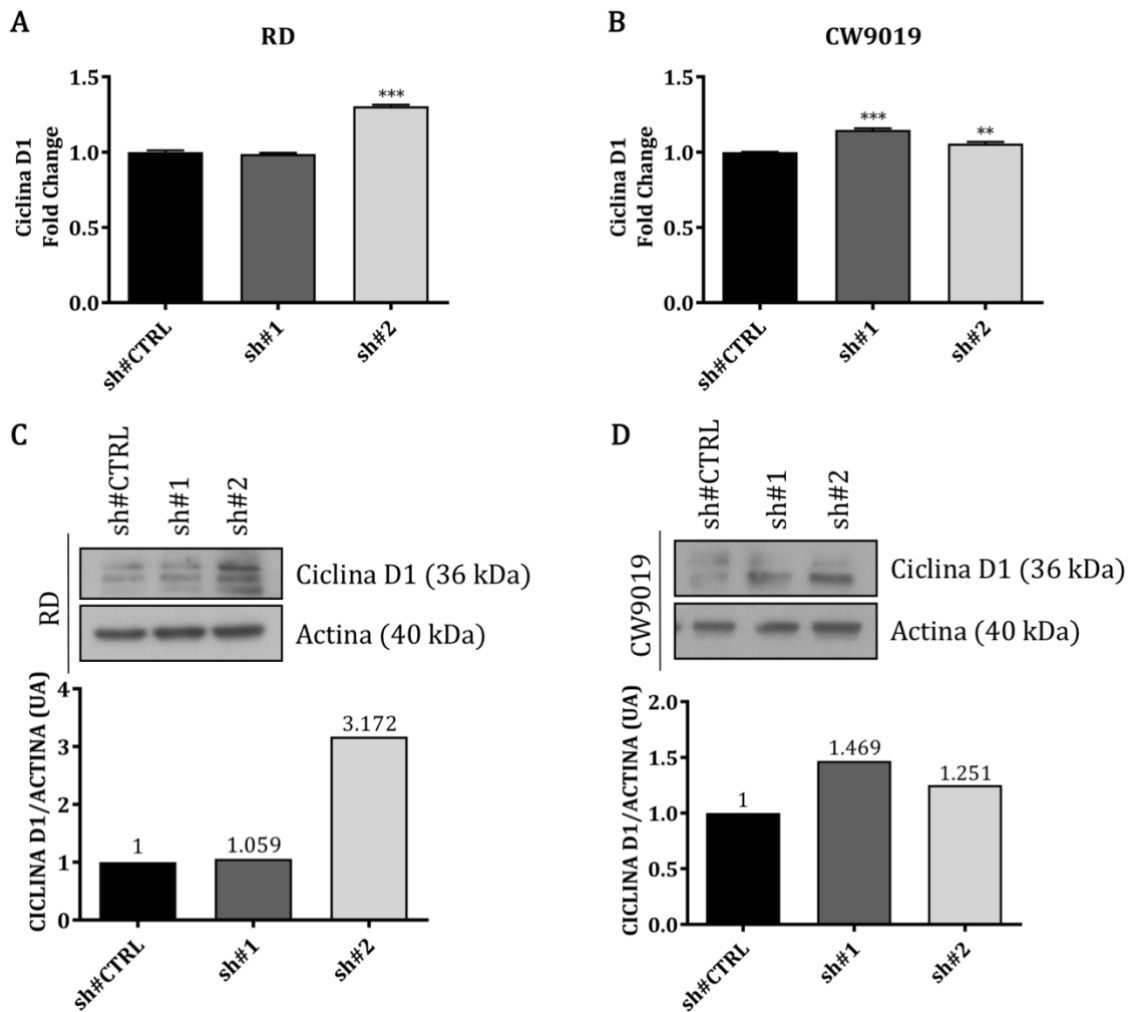
**Figura R13. El bloqueig de *DKK-1* causa la reducció del creixement cel·lular.** Les cèl·lules amb infra-regulació de *DKK-1* es varen sembrar a la mateixa concentració i es varen comptar després de 3, 5 i 7 dies. Es varen analitzar les corbes de creixement cel·lular de les línies RD (A) i CW9019 (C); es va quantificar la proliferació a dia 7 en les dues línies cel·lulars (B i D, respectivament). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  i \*\*\* $p < 0.001$ .

Seguidament, es va realitzar un assaig de cycle cel·lular mitjançant citometria de flux per tal d'estudiar la fase cel·lular en que es trobaven les cèl·lules després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R14). Els resultats obtinguts mostren un lleuger augment del número de cèl·lules en fase G1 després de la infra-regulació de *DKK-1*. Encara que els resultats obtinguts en aquest assaig no són significatius, el lleu increment de cèl·lules en fase G1 podria explicar, en part, la reducció del creixement cel·lular observada.



**Figura R14. La infra-regulació de *DKK-1* causa un lleu augment del percentatge de cèl·lules en la fase G1 del cycle cel·lular.** Percentatge de cèl·lules en les fases G1 i G2+S després del bloqueig de *DKK-1* en la línia cel·lular RD (A) i CW9019 (B). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit).

De manera concordant, es va observar un lleu augment dels nivells d'ARNm de ciclina D1 després de la infra-regulació de *DKK-1* (Figura R15, A i B). Es va confirmar també l'augment dels nivells de proteïna d'aquesta ciclina després de la infra-regulació de *DKK-1* en ambdues línies cel·lulars (Figura R15, C i D). Els resultats del *Western blot* mostren una doble banda de ciclina D1, la qual correspon a les formes fosforilada i no fosforilada de la ciclina. Els resultats obtinguts suggereixen una aturada en la fase G1 del cycle cel·lular, punt del cycle en el qual la ciclina D1 s'acumula abans d'entrar a la fase G2.

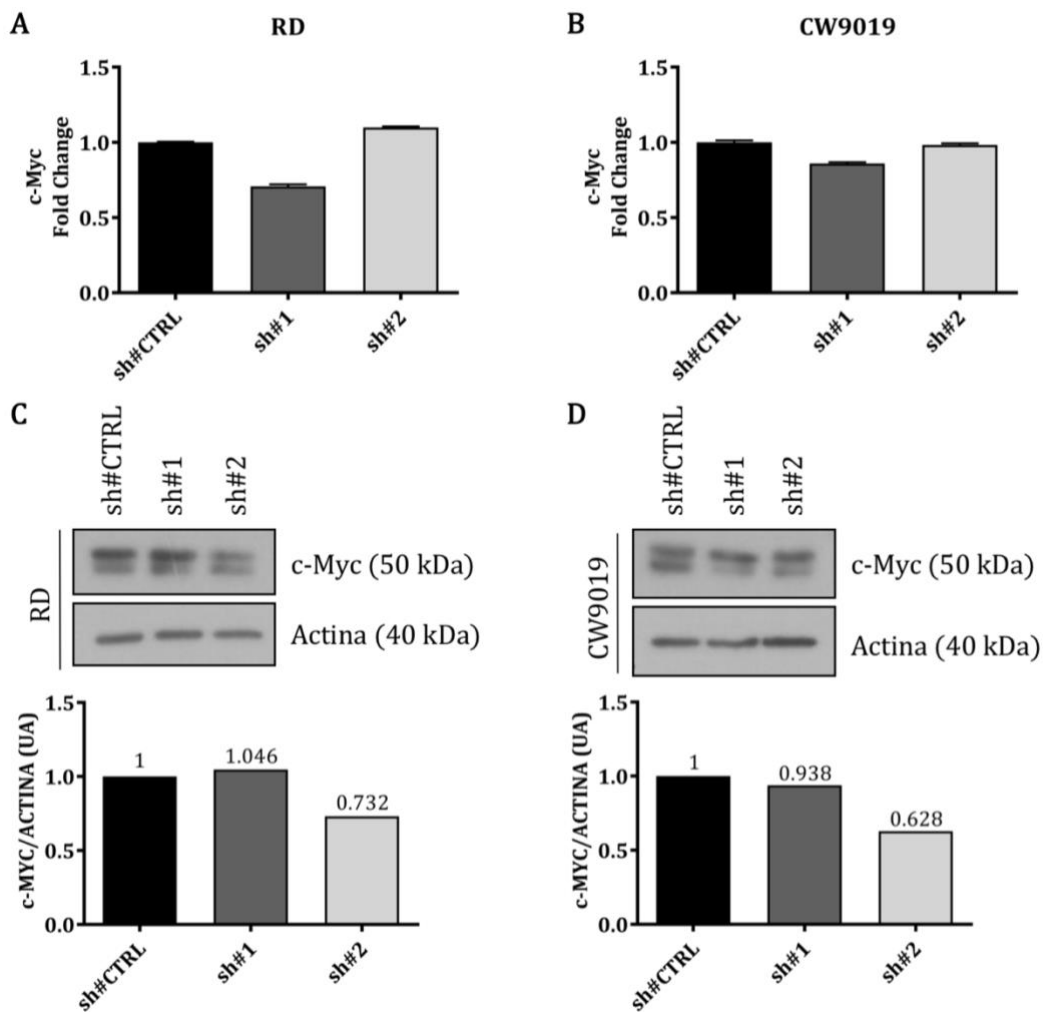


**Figura R15. El bloqueig de *DKK-1* incrementa els nivells de ciclina D1.** A i B: Anàlisi mitjançant RT-qPCR del nivell d'expressió de *ciclina D1* després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els valors estan expressats com  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i normalitzats amb el gen endogen *TBP*. C i D: Imatges de *Western blot* i les seves corresponent densitometries que mostren l'expressió de ciclina D1 després del bloqueig de *DKK-1*. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

#### 4. La infra-regulació de *DKK-1* causa l'augment de l'expressió dels gens implicats en la diferenciació miogènica *in vitro*

Amb l'objectiu de determinar la implicació de la inhibició de *DKK-1* en RMS, es varen analitzar els nivells d'expressió dels gens diana de la via Wnt després de la depleció gènica de *DKK-1* (Figures R16 i R17). Es va analitzar l'expressió del gen diana de la via Wnt, *c-Myc*, després de la infra-regulació de *DKK-1*, mitjançant RT-qPCR (Figura R16, A i B) i mitjançant *Western blot* (Figura R16, C i D). Els resultats

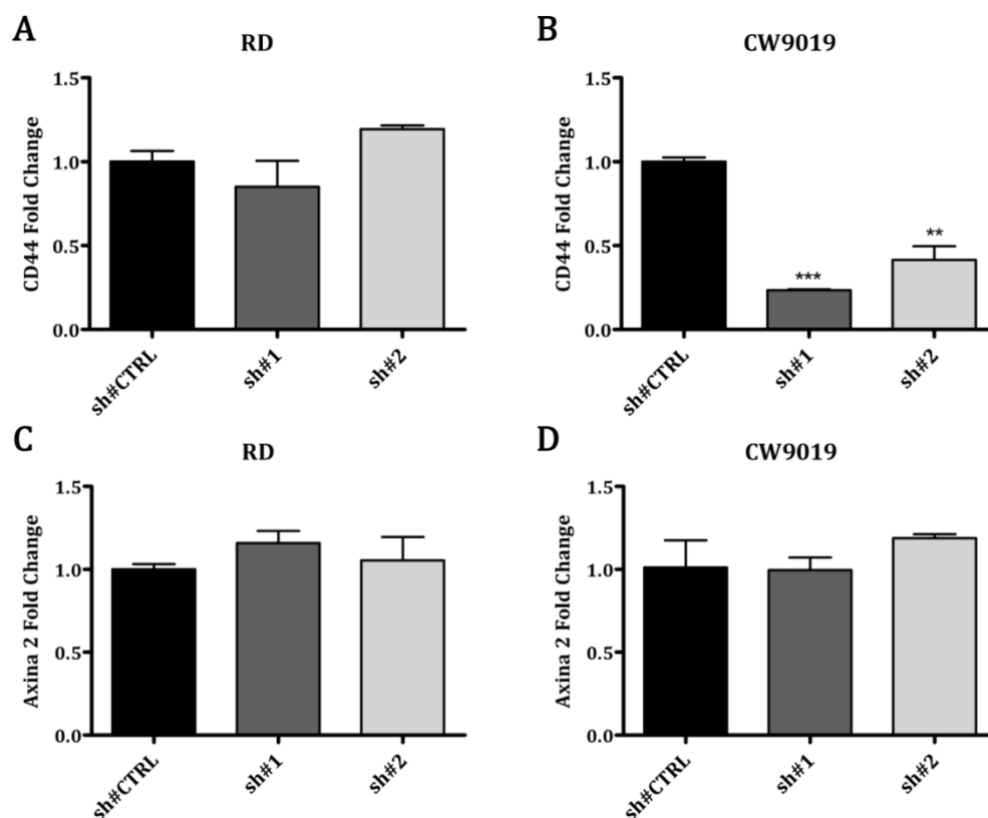
obtinguts en ambdós casos no mostren diferències o inclús una lleu disminució quan es comparen amb el control (línia cel·lular transduïda amb el vector buit).



**Figura R16.** L'anàlisi d'expressió del gen diana de la via Wnt, *c-Myc*, no mostra diferències d'expressió després de la depleció de *DKK-1*. **A i B:** Anàlisi mitjançant RT-qPCR dels nivells d'expressió de *c-Myc* després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els valors estan expressats com  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i normalitzats amb el gen endogen *TBP*. Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). **C i D:** Imatges de *Western blot* i les seves corresponents densitometries que mostren l'expressió de *c-Myc* després de la depleció de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. Els resultats de les densitometries es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit).

Es varen analitzar també els gens diana de la via, *CD44* (Figura R17, A i B) i *Axina 2* (Figura R17, C i D), mitjançant RT-qPCR després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019. Els nivells d'expressió dels dos gens no varen mostrar diferències o inclús una reducció dels nivells d'ARNm dels gens analitzats.

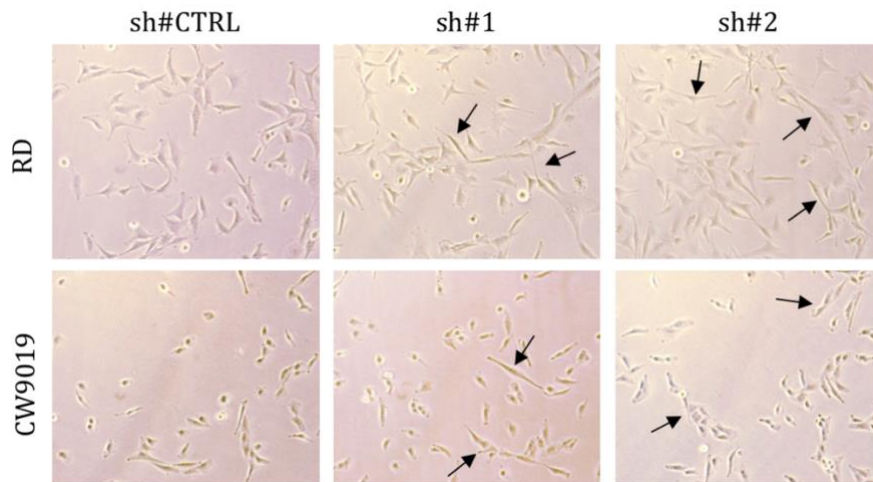




**Figura R17.** L'anàlisi d'expressió dels gens diana de la via Wnt després de la depleció de *DKK-1* no mostra diferències o mostra inclús una disminució dels gens involucrats en proliferació cel·lular. Anàlisi d'RT-qPCR dels nivells d'expressió de *CD44* (A i B) i *Axina 2* (C i D) després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD (A i C) i CW9019 (B i D). Els valors estan expressats com  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  i normalitzats amb el gen endogen *TBP*. Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \*\* $p < 0.01$  i \*\*\* $p < 0.001$ .

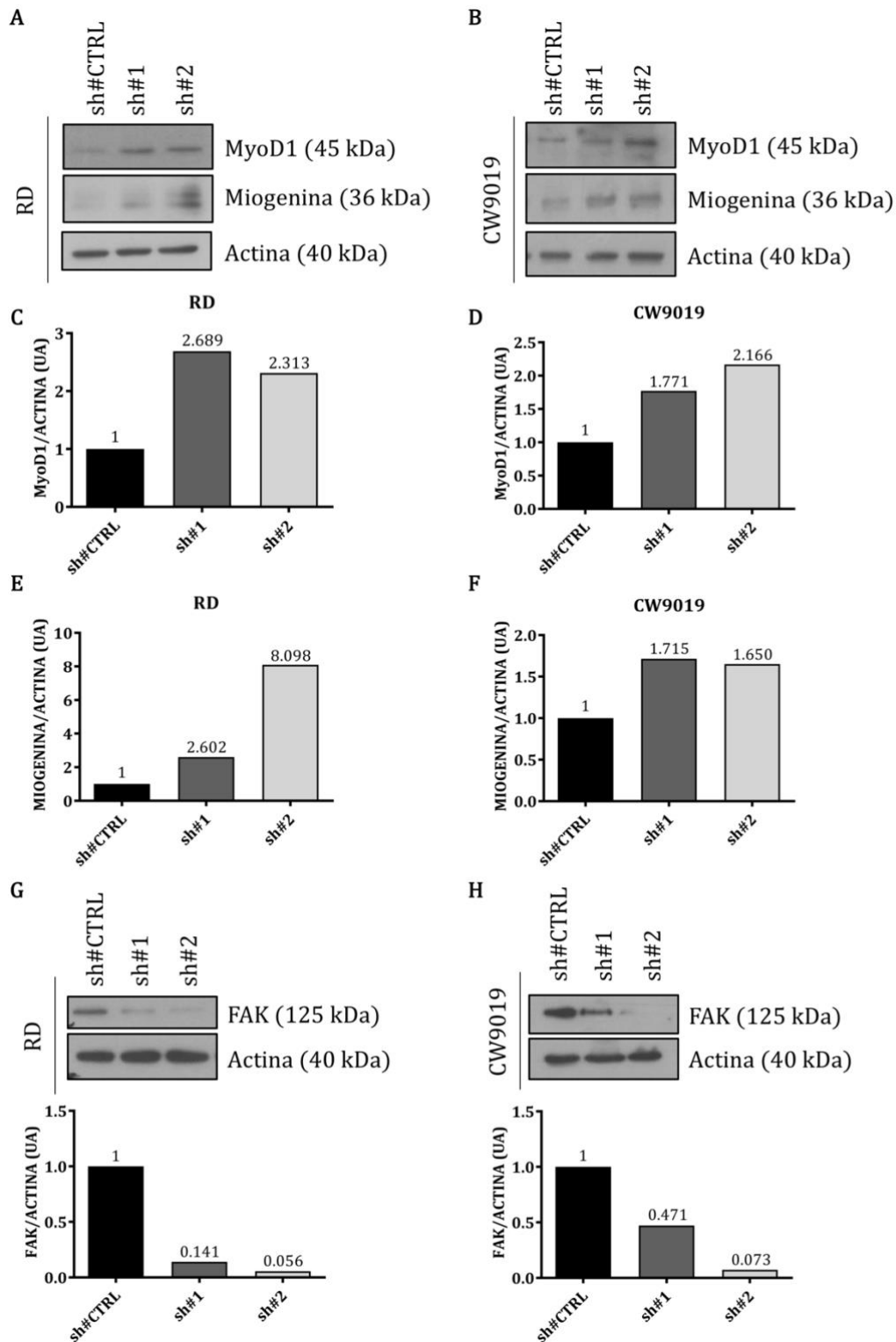
Les cèl·lules amb infra-expressió de *DKK-1* mostraven indicis de diferenciació miogènica, els quals consisteixen en un fenotip més fusiforme (Figura R18). Per tal de demostrar aquest fet, es va analitzar l'expressió dels dos gens principals involucrats en la diferenciació muscular, *MyoD1* i *miogenina*. Es varen analitzar els nivells proteics de *MyoD1* i *miogenina* mitjançant *Western blot* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R19, A-F). Es va observar que la infra-regulació de *DKK-1* indueix l'augment dels principals marcadors de diferenciació muscular *MyoD1* i *miogenina*. Es varen analitzar també els nivells d'expressió de la proteïna FAK, una cinasa d'adhesió focal associada als processos de diferenciació miogènica. L'expressió de la proteïna FAK es va analitzar mitjançant *Western blot*, en les línies cel·lulars RD i CW9019 després de la infra-regulació de *DKK-1* (Figura R19, G i H, respectivament). Els resultats obtinguts mostren una reducció dels nivells de

proteïna FAK en les dues línies cel·lulars analitzades després de la infra-regulació de *DKK-1*, essent major la reducció en la línia cel·lular RD. Aquests resultats suggereixen que la depleció de *DKK-1* pot activar els processos de diferenciació miogènica.

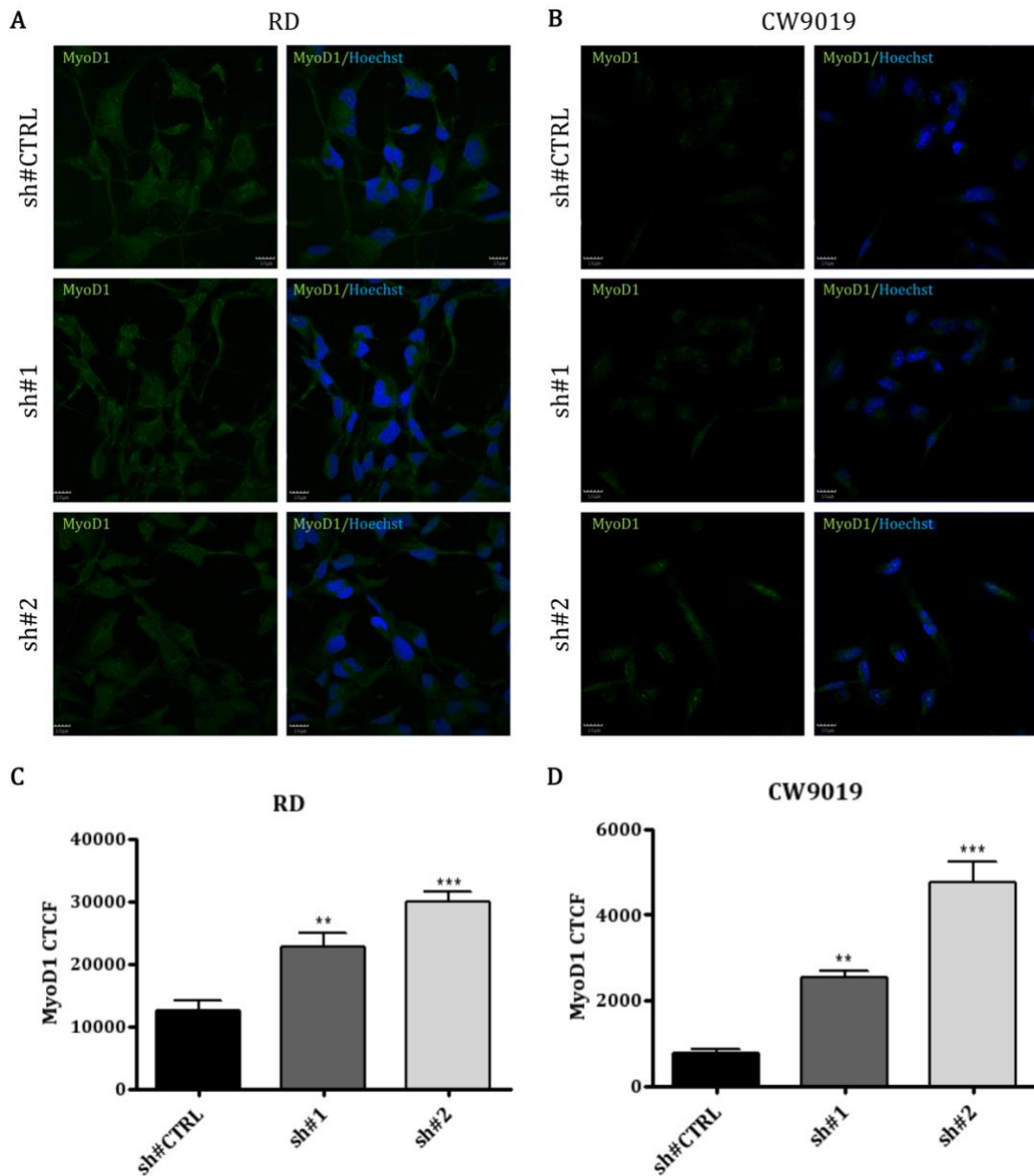


**Figura R18. Indicis de diferenciació miogènica en les cèl·lules que infra-expressen *DKK-1*.** Composició de fotografies de les línies RD i CW9019 després de la infra-expressió de *DKK-1*, en les quals es mostren indicis d'un fenotip més diferenciatiu (indicat amb fletxes).

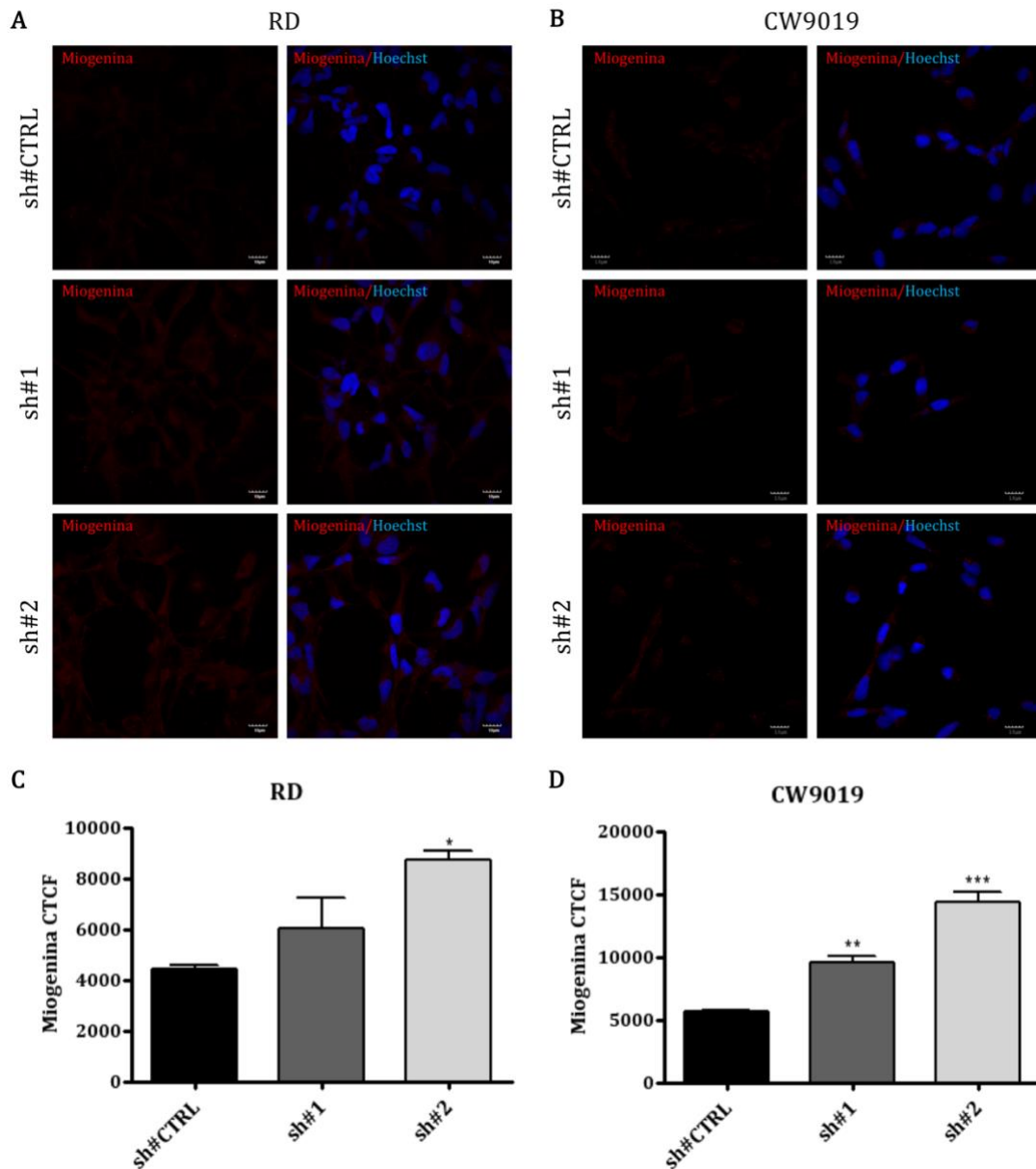
Amb l'objectiu de confirmar l'augment dels marcadors de diferenciació obtingut per *Western blot*, es varen avaluar els nivells de MyoD1 i miogenina mitjançant immunocitoquímica (ICQ) (Figures R20 i R21). Es va observar un augment dels nivells de MyoD1 després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R20, A i B, respectivament). Degut a que ambdues proteïnes són factors de transcripció i, per tant, presenten una localització nuclear, es va quantificar la intensitat de fluorescència emesa al nucli de les cèl·lules després de la infra-regulació de *DKK-1* obtenint un augment d'intensitat de la proteïna MyoD1 en comparació al control (Figura R20, C i D). L'anàlisi d'expressió de miogenina va mostrar resultats similars; es va observar un augment de l'expressió de miogenina després de la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R21, A i B, respectivament). La intensitat de fluorescència de miogenina emesa al nucli de les cèl·lules es va quantificar després d'infra-regular *DKK-1*. Els resultats obtinguts mostren un augment dels nivells de miogenina en comparació al control (Figura R21, C i D).



**Figura R19. La infra-expressió de *DKK-1* causa un increment dels marcadors de diferenciació miogènica. A i B:** Imatges de *Western blot* que mostren l'expressió de les proteïnes de diferenciació muscular, MyoD1 i miogenina, després de la infra-expressió de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. **C-F:** Densitometries del *Western blot* per les proteïnes MyoD (**C i D**) i miogenina (**E i F**) en les línies cel·lulars RD (**C i E**) i CW9019 (**D i F**). **G i H:** Imatges de *Western blot* i les seves corresponents densitometries que mostren l'expressió de la proteïna FAK en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. Els resultats obtinguts de les densitometries es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit).



**Figura R20. La depleció de *DKK-1* augmenta l'expressió del marcador de diferenciació miogènica *MyoD1*.** **A i B:** Immunocitoquímiques que mostren els nivells de *MyoD1* (marcatge en verd) en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els nuclis de les cèl·lules estan marcats en blau (Hoechst 33342). Barres: 10µm. **C i D:** Quantificació de la fluorescència emesa per *MyoD1* al nucli a les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Es va quantificar la intensitat de fluorescència amb el paràmetre CTFC (de l'anglès *Corrected Total Cell Fluorescence*). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

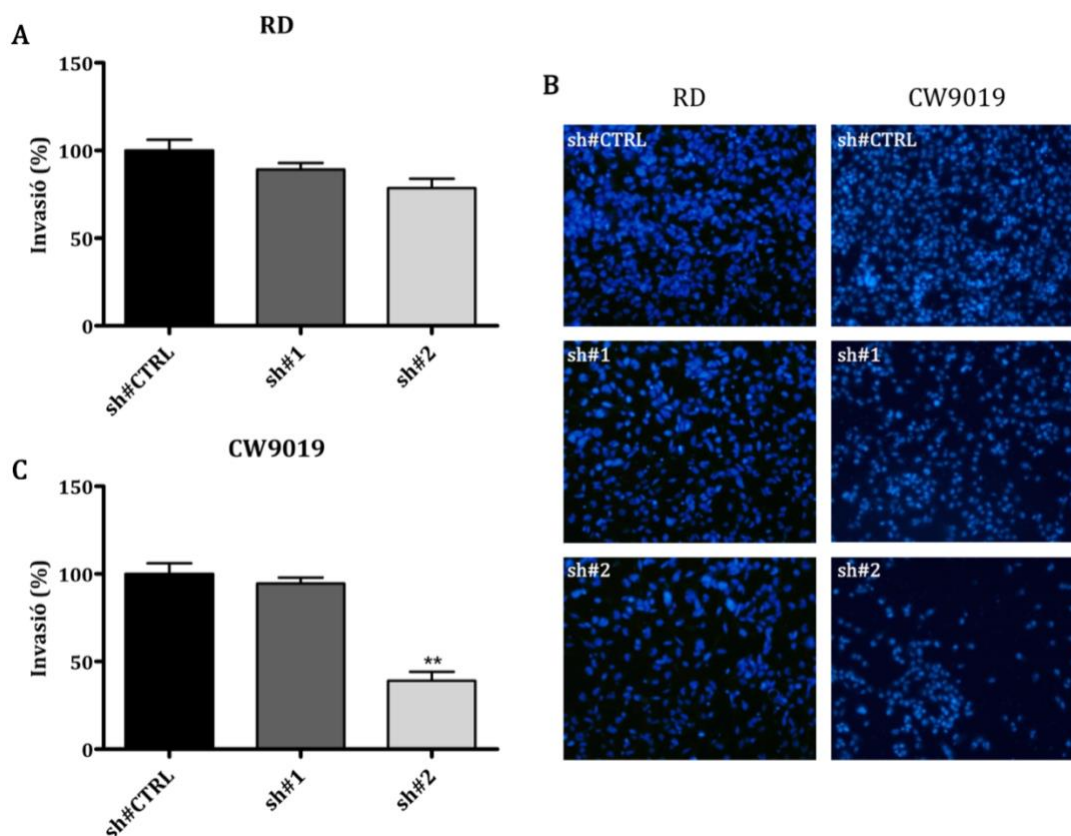


**Figura R21. La depleció de *DKK-1* augmenta l'expressió del marcador de diferenciació muscular miogenina. A i B:** Anàlisi immunocitoquímica dels nivells de miogenina (marcatge vermell) en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els nuclis de les cèl·lules estan marcats en blau (Hoechst 33342). Barres: 10µm. **C i D:** Quantificació de la fluorescència emesa al nucli per miogenina al nucli a les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Es va quantificar la intensitat de fluorescència amb el paràmetre CTCF (de l'anglès *Corrected Total Cell Fluorescence*). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Significació estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  i \*\*\* $p < 0.001$ .

## 5. Anàlisi de la depleció de *DKK-1* en la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS *in vitro*

Per tal de determinar el paper de *DKK-1* en la capacitat d'invasió de les cèl·lules de RMS, es va realitzar un assaig *Transwell*. Es va analitzar la capacitat invasiva de les

cèl·lules amb depleció de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R22). Es va observar una moderada reducció de la capacitat invasiva de les cèl·lules després de la infra-regulació de *DKK-1* en la línia cel·lular RD (Figura R22-A), essent significativa en el cas de l'sh#2 en la línia cel·lular CW9019 (Figura R22-C).



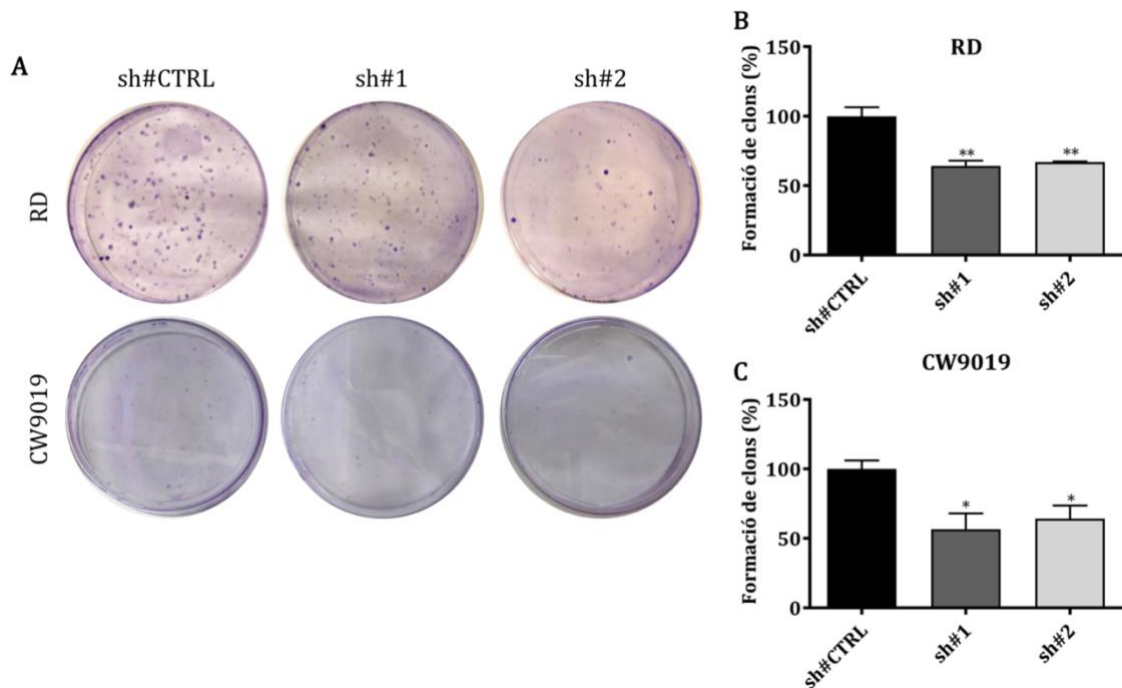
**Figura R22. Anàlisi de l'efecte de la depleció de *DKK-1* en la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS.** **A i C:** Assaigs d'invasió cel·lular *Transwell* posteriors a la infra-regulació de *DKK-1* en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els valors d'invasió estan expressats en percentatges referits als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit) i representen la mitja  $\pm$  SEM de 3 assaigs independents. Significació estadística: \*\* $p < 0.01$ . **B:** Composició de fotografies mostrant un camp representatiu de les membranes del *Transwell* de les línies cel·lulars RD i CW9019. Les cèl·lules amb capacitat invasiva es varen quedar adherides a la superfície inferior de les membranes *Transwell* i es varen tenyir amb Hoechst 33342.

## 6. La depleció de *DKK-1* causa la reducció de la capacitat clonogènica de les cèl·lules de RMS *in vitro*

Es va realitzar l'assaig de clonogenicitat per determinar la capacitat de les cèl·lules de RMS amb infra-regulació de *DKK-1* de formar clons (Figura R23). Es varen incubar 1000 cèl·lules per placa i es va determinar el número de clons formats després de dues setmanes d'incubació. Es va obtenir una disminució significativa



del número de clons formats després de la depleció de *DKK-1* en la línia cel·lular RD (Figura R23-B) i en la línia cel·lular CW9019 (Figura R23-C).

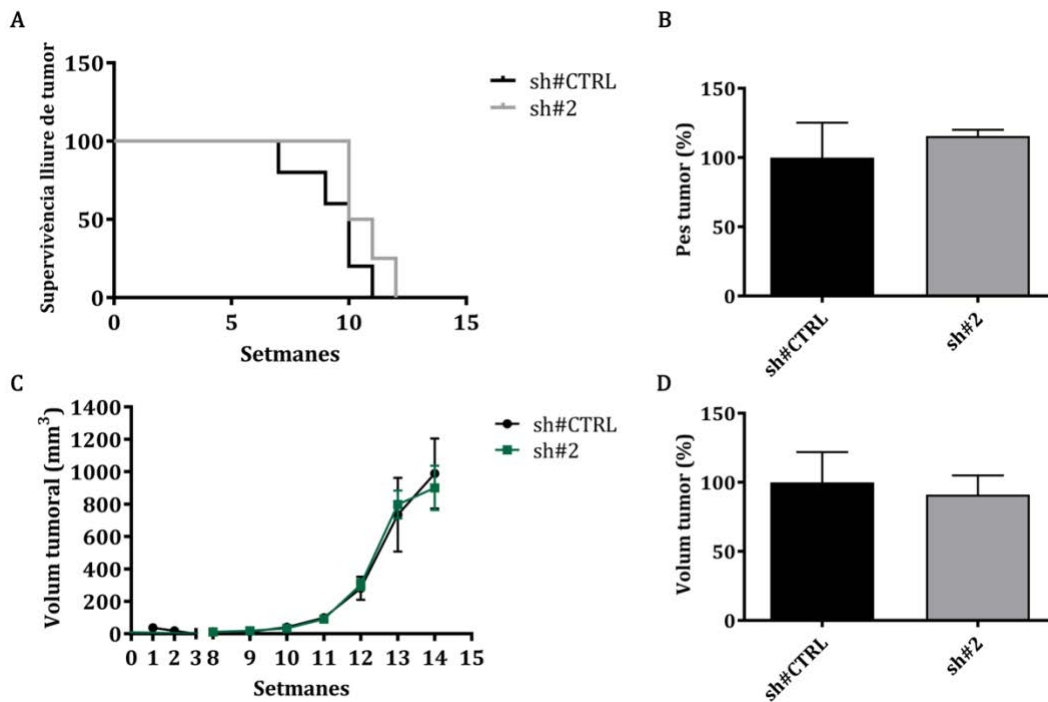


**Figura R23. La capacitat de formació de clons es veu reduïda després de la infra-regulació genètica de *DKK-1*.** **A:** Composició de fotografies de plaques representatives de cada condició mostrant els clons formats en les línies cel·lulars RD i CW9019. **B i C:** Quantificació dels clons formats, en les línies RD i CW9019 respectivament, després de la infra-regulació de *DKK-1*. Es varen sembrar plaques amb la mateixa quantitat de cèl·lules i es varen incubar durant dues setmanes. El nombre de clons formats estan expressats en percentatges referits als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit) i representen la mitja  $\pm$  SEM de 3 assaigs independents. Significació estadística: \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$ .

## 7. La depleció de *DKK-1* no té efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID

Per tal de determinar els efectes anti-proliferatius de la infra-regulació genètica de *DKK-1* en un model murí ortotòpic de RMS, es varen injectar 1 milió de cèl·lules de la línia cel·lular RD amb expressió estable de l'shRNA contra *DKK-1* més eficaç *in vitro* (sh#2) al múscul gastrocnemi de ratolins SCID. 14 setmanes després de la injecció, es varen sacrificar els animals i es varen comparar els tumors extirpats amb els tumors dels ratolins control (injectats amb la línia cel·lular RD transduïda amb el vector buit) (Figura R24). Tot i que no es varen observar diferències en la cinètica de creixement tumoral (Figura R24-C), es va observar un lleu retràs no

significatiu en l'aparició dels tumors (Figura R24-A). El pes i el volum promig dels tumors tampoc varen mostrar diferències significatives (Figura R24, B i D).



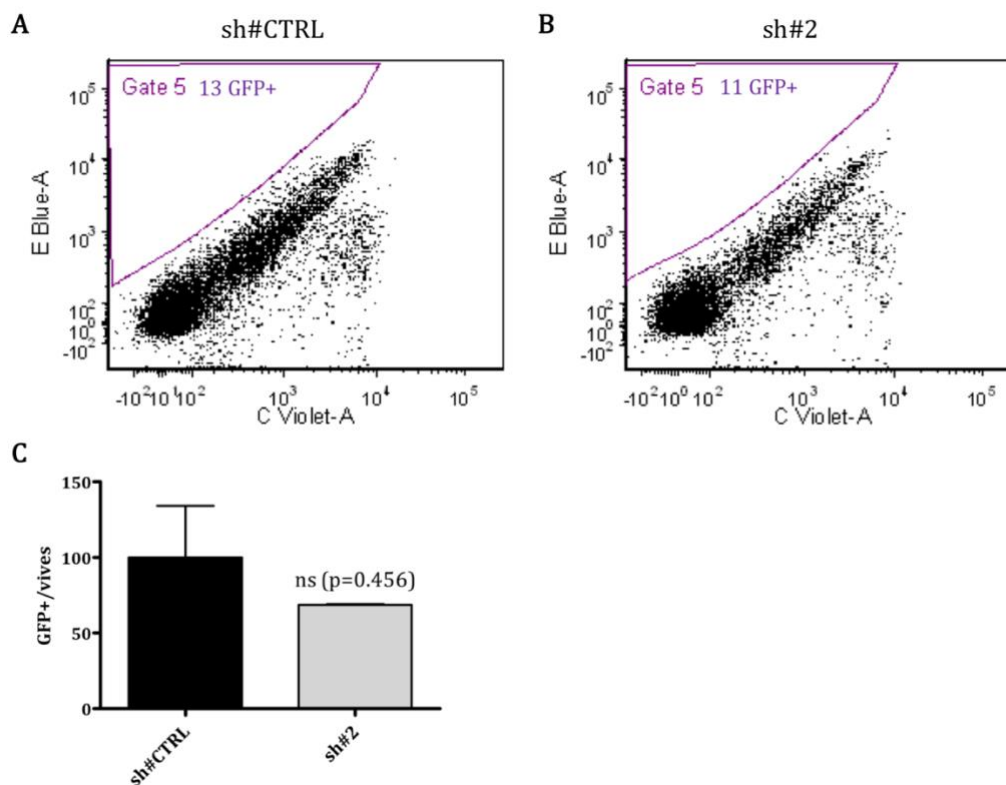
**Figura R24. La infra-regulació de *DKK-1* no causa efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID.** A: Gràfic de formació dels tumors en ratolins SCID. B: Pes promig dels tumors al punt final de l'estudi referit al grup control (tumors formats per cèl·lules transduïdes amb el vector buit). C: Cinètica del creixement tumoral expressada com el volum promig dels tumors generats per les cèl·lules amb infra-regulació de *DKK-1* i les cèl·lules transduïdes amb el vector buit (grup control). D: Volum dels tumors al punt final de l'estudi referit al grup control (tumors formats per cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Els resultats estan expressats com la mitja  $\pm$  SEM dels valors de 5 ratolins que formaven cada grup.

## 8. Anàlisi dels efectes de la infra-regulació de *DKK-1* en la capacitat d'implantació de metàstasis de les cèl·lules de RMS en ratolins Nude

Es va analitzar la capacitat d'implantació de les cèl·lules metastàtiques de RMS per tal d'avaluar els efectes de *DKK-1* en la formació de les metàstasis *in vivo*. Es varen injectar 3 milions de cèl·lules de la línia cel·lular RD amb l'expressió estable de l'shRNA contra *DKK-1* més eficaç *in vitro* (sh#2) a la vena de la cua dels ratolins Nude. Després de 7 dies, es varen sacrificar els animals i es va analitzar, mitjançant citometria de flux, el número de cèl·lules GFP+ implantades al pulmó (localització principal de les metàstasis) (Figura R25). Les cèl·lules GFP+ corresponien a les cèl·lules de RMS amb l'expressió estable de l'shRNA que havien extravassat i



implantat al pulmó. Els resultats varen mostrar una lleugera reducció en el nombre de cèl·lules GFP+ respecte el total de cèl·lules de pulmó vives presents a la mostra. No obstant, el resultat obtingut no és significatiu (Figura R25-C).



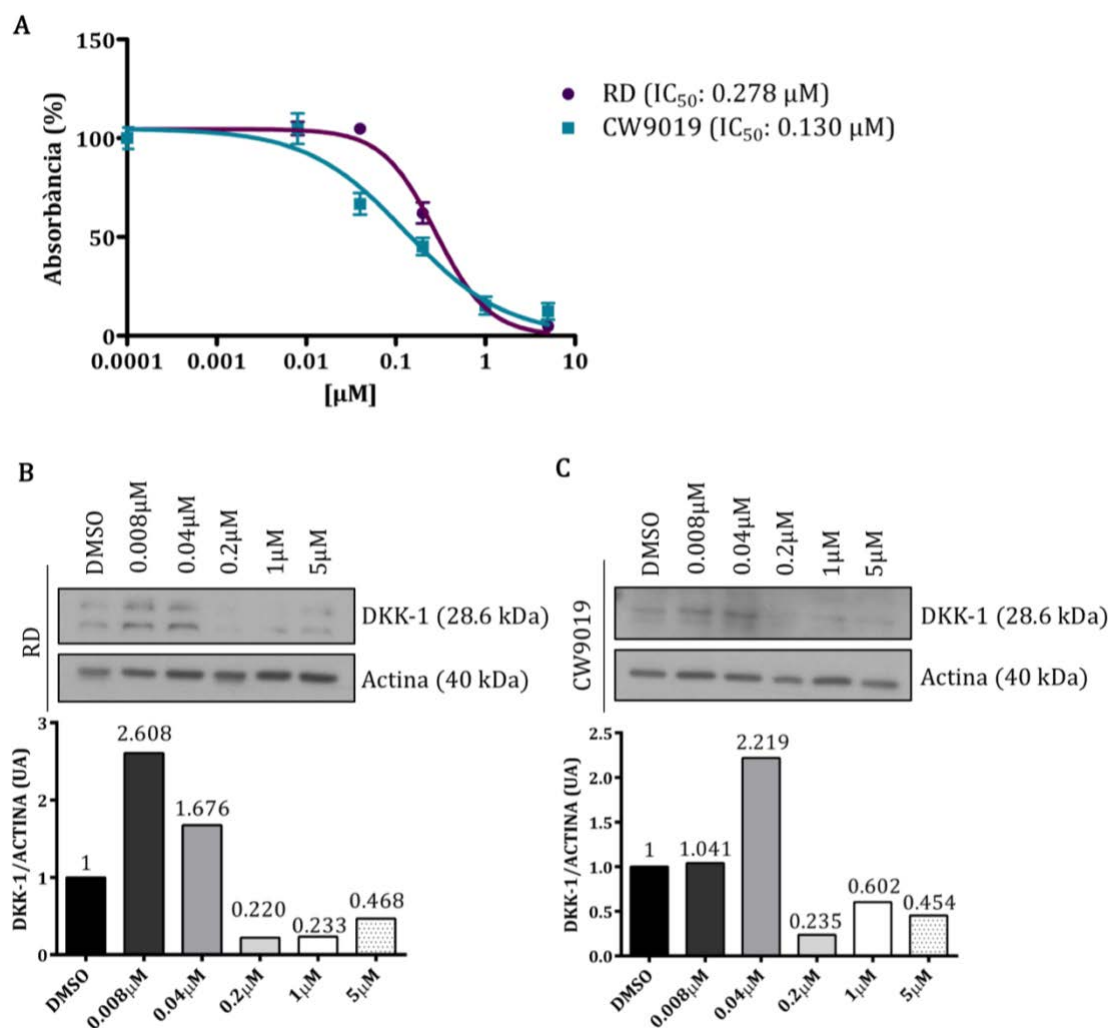
**Figura R25. Anàlisi dels efectes de la infra-regulació de *DKK-1* en la capacitat d'implantació de les metàstasis.** A i B: Gràfics obtinguts del citòmetre FACSaria on es mostren les cèl·lules GFP positives (eix Y: E Blue-A) respecte l'auto-fluorescència basal de les cèl·lules (eix X: C Violet-A). A: Cèl·lules GFP+ dels ratolins control (13 cèl·lules GFP+). B: Cèl·lules GFP+ dels ratolins injectats amb cèl·lules amb l'expressió estable de l'shRNA de *DKK-1* (sh#2) (11 cèl·lules GFP+). C: Número de cèl·lules GFP+ respecte les cèl·lules vives presents a la mostra. Els resultats es varen referir als valors obtinguts als controls. Els resultats estan expressats com la mitja  $\pm$  SEM dels valors de 3 ratolins que formaven cada grup.

## 9. El tractament amb l'inhibidor farmacològic de *DKK-1*, WAY-262611, redueix el creixement cel·lular i augmenta la diferenciació de cèl·lules de RMS

### 9.1. El tractament amb WAY-262611 causa l'activació de la via Wnt *in vitro*

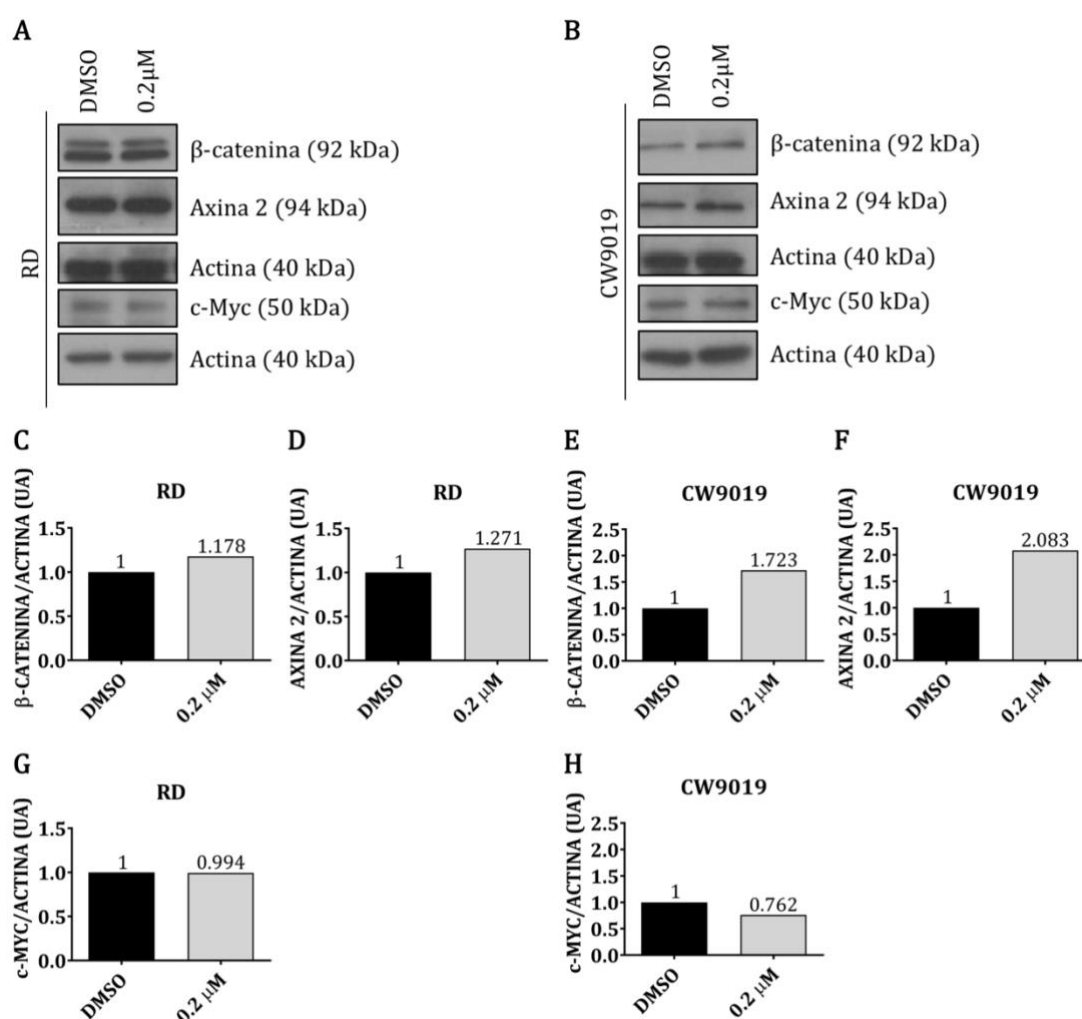
Es va seleccionar l'inhibidor de *DKK-1* anomenat WAY-262611 per tal de comprovar els efectes de l'activació farmacològica de la via Wnt en cèl·lules de RMS. Primer es va realitzar un assaig de creixement cel·lular per establir la IC<sub>50</sub>, la

concentració necessària per a reduir al 50% el creixement de les cèl·lules *in vitro*, i treballar amb la concentració mínima efectiva del fàrmac (Figura R26-A). La línia cel·lular RD va presentar una inhibició del 50% del creixement cel·lular a una concentració de WAY-262611 de 0.278 $\mu$ M, mentre que la línia cel·lular CW9019 va presentar la IC<sub>50</sub> a una concentració de 0.130 $\mu$ M. Posteriorment, es varen analitzar els nivells de proteïna de DKK-1 per comprovar l'eficàcia del fàrmac mitjançant *Western blot*. Es varen tractar les línies cel·lulars RD i CW9019 amb diferents concentracions del fàrmac i es va extreure proteïna passades 48h (Figura R26, B i C). Els resultats mostren una baixada d'expressió de DKK-1 a la concentració de 0.2 $\mu$ M, concentració similar a la IC<sub>50</sub> obtinguda en l'estudi de creixement cel·lular.



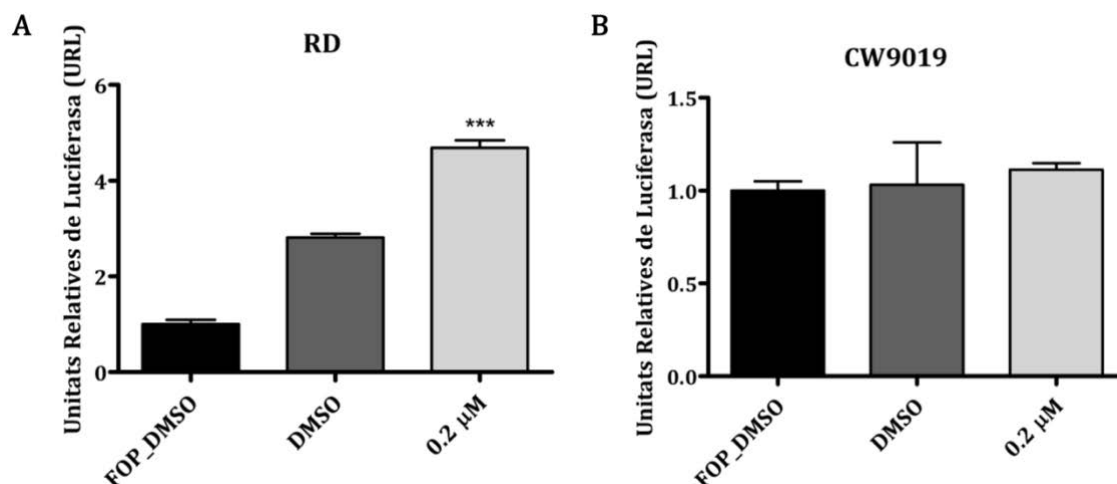
**Figura R26. Selecció de la dosi de l'inhibidor de DKK-1, WAY-262611.** A: Corba dosi resposta per determinar la IC<sub>50</sub> de l'inhibidor en les línies cel·lulars RD i CW9019. B i C: Imatges de *Western blot* i les seves corresponents densitometries que mostren els nivells de DKK-1 després del tractament amb diferents concentracions de l'inhibidor. Es va utilitzar l'actina com a control de càrrega. Els valors obtinguts de les densitometries estan referits als seus controls (cèl·lules tractades amb DMSO).

Es va procedir a tractar les cèl·lules a una concentració de 0.2µM durant 48h per tal d'analitzar l'expressió del gen efector (β-catenina) i dels gens diana de la via. Es varen analitzar els nivells d'expressió proteica de β-catenina, Axina 2 i c-Myc (Figura R27). En les dues línies cel·lulars analitzades es va comprovar l'augment de β-catenina i Axina 2, confirmant que el tractament activa l'expressió d'ambdues proteïnes. No obstant, l'increment en la línia cel·lular CW9019 és més clar (Figura R27-B) en comparació amb el lleu increment observat en la línia cel·lular RD (Figura R27-A). Per contra, no es va obtenir cap efecte en el gen diana de la via c-Myc en cap de les dues línies cel·lulars de RMS analitzades.



**Figura R27. El tractament amb WY-262611 augmenta els nivells de β-catenina i Axina 2, però no s'observen canvis en els nivells de c-Myc. A i B:** Imatges de *Western blot* que mostren l'expressió de β-catenina, Axina 2 i c-Myc després del tractament amb WY-262611 en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. Es varen comparar els resultats amb els nivells de proteïna de les cèl·lules control (cèl·lules tractades amb DMSO). **C-H:** Densitometries del *Western blot* de la línia cel·lular RD (**C**, **D** i **G**) i de la línia cel·lular CW9019 (**E**, **F** i **H**). Els valors estan referits als seus controls (cèl·lules tractades amb DMSO).

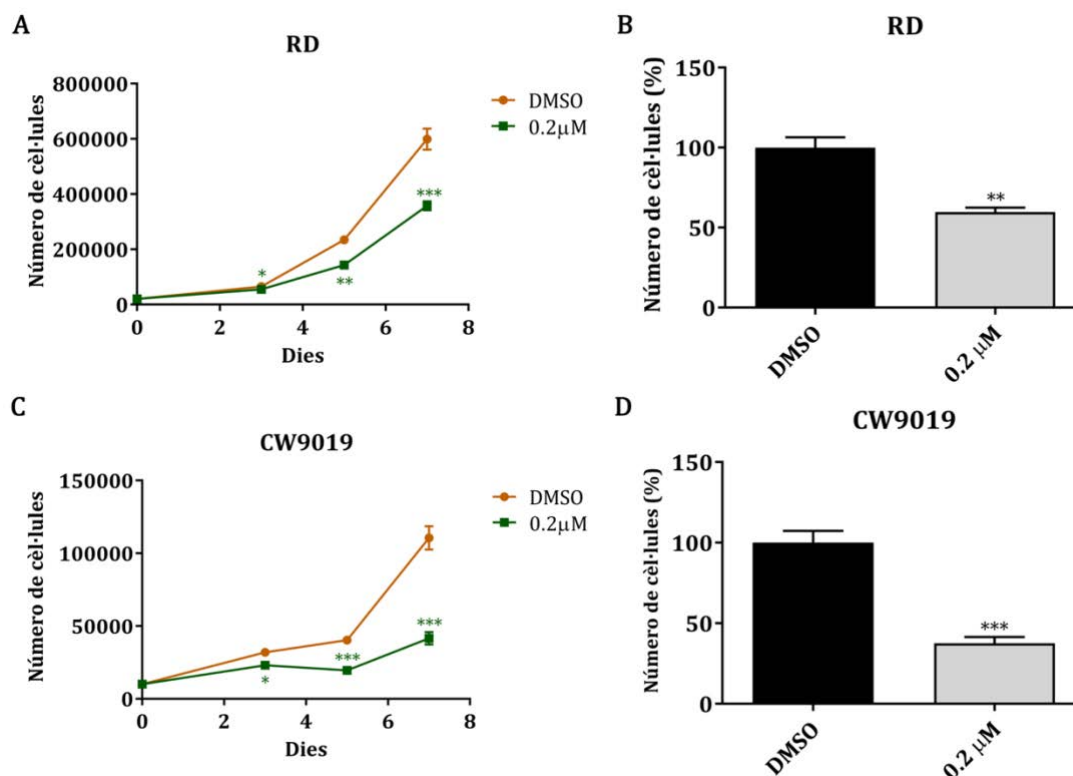
Posteriorment, es va analitzar l'activitat de la via Wnt després del tractament amb WAY-262611 mitjançant l'assaig luciferasa (Figura R28). En la línia cel·lular RD es va obtenir un augment significatiu de l'activitat luciferasa, suggerint una activitat de la via Wnt augmentada (Figura R28-A). En el cas de la línia CW9019, no s'observa cap augment significatiu de l'activitat luciferasa (Figura R28-B).



**Figura R28. La inhibició farmacològica de DKK-1 causa l'activació de la via Wnt en la línia cel·lular RD.** A i B: Assaig luciferasa, en el qual s'observa augment de la luminescència després del bloqueig de DKK-1 en la línia cel·lular RD (A) i en la línia cel·lular CW9019 (B). Els valors estan referits als seus controls (cèl·lules tractades amb DMSO). Significació estadística: \*\*\*p<0.001.

## 9.2. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció del creixement cel·lular *in vitro*

Amb l'objectiu de determinar la capacitat de l'inhibidor farmacològic de DKK-1 per reduir el creixement cel·lular, es va realitzar un assaig de recompte cel·lular després del tractament amb WAY-262611 durant 3, 5 i 7 dies en les línies cel·lulars CW9019 i RD (Figura R29). Es va analitzar la corba de creixement obtenint resultats significatius des del dia 3 (Figura R29, A i C). Al quantificar el creixement de les cèl·lules al final de l'experiment (dia 7), es va comprovar que el tractament amb l'inhibidor farmacològic redueix significativament el creixement de les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R29, B i D).

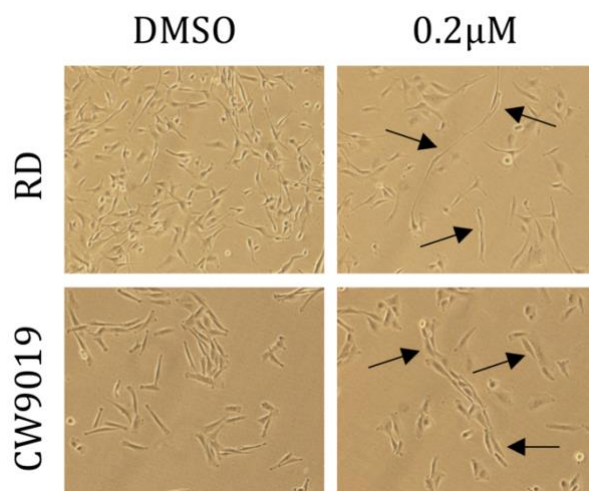


**Figura R29. El tractament farmacològic amb WAY-262611 redueix el creixement de les línies cel·lulars RD i CW9019. (A-D):** Es varen sembrar diverses plaques amb la mateixa concentració de cèl·lules, es varen tractar diàriament a una concentració de 0.2 μM i es varen comptar després de 3, 5 i 7 dies. Es varen analitzar les corbes de creixement cel·lular de les línies cel·lulars RD (A) i CW9019 (C); es va quantificar la proliferació a dia 7 en les dues línies cel·lulars (B i D, respectivament). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO)). Significació estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

### 9.3. El tractament amb WAY-262611 augmenta l'expressió dels gens de diferenciació miogènica *in vitro*

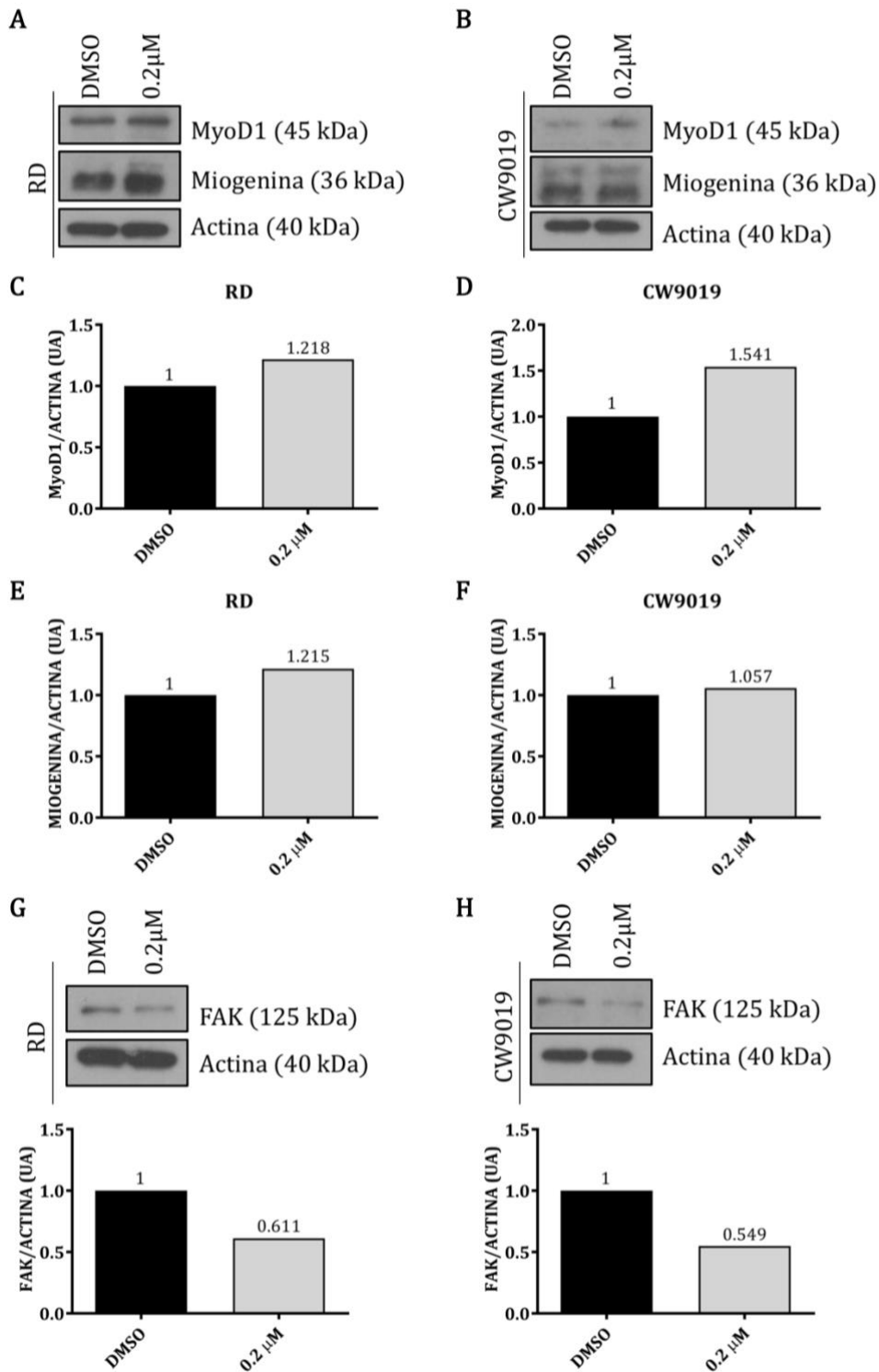
Les cèl·lules tractades amb WAY-262611 varen presentar canvis morfològics indicatius de diferenciació miogènica, tals com una morfologia més fusiforme (Figura R30). Per tal de confirmar aquest efecte, es varen comprovar els nivells de proteïna dels principals gens involucrats en la diferenciació muscular, MyoD1 i miogenina, obtinguts mitjançant *Western blot*, en cèl·lules tractades durant 48h amb WAY-262611 (Figura R31, A-F). El tractament amb WAY-262611 0.2 μM va causar l'augment dels dos marcadors de diferenciació muscular, MyoD1 i miogenina. Tot i que en les dues línies cel·lulars s'observa l'augment d'ambdues proteïnes, l'increment és major en el cas de la proteïna MyoD1. Els nivells

d'expressió proteica de FAK també es varen analitzar després del tractament durant 48h amb WAY-262611 en les línies cel·lulars RD i CW9019 mitjançant *Western blot* (Figura R31, G i H). El tractament amb WAY-262611 causa la reducció dels nivells de proteïna FAK en les dues línies cel·lulars analitzades, suggerint que WAY-262611 indueix l'expressió de gens de diferenciació miogènica.

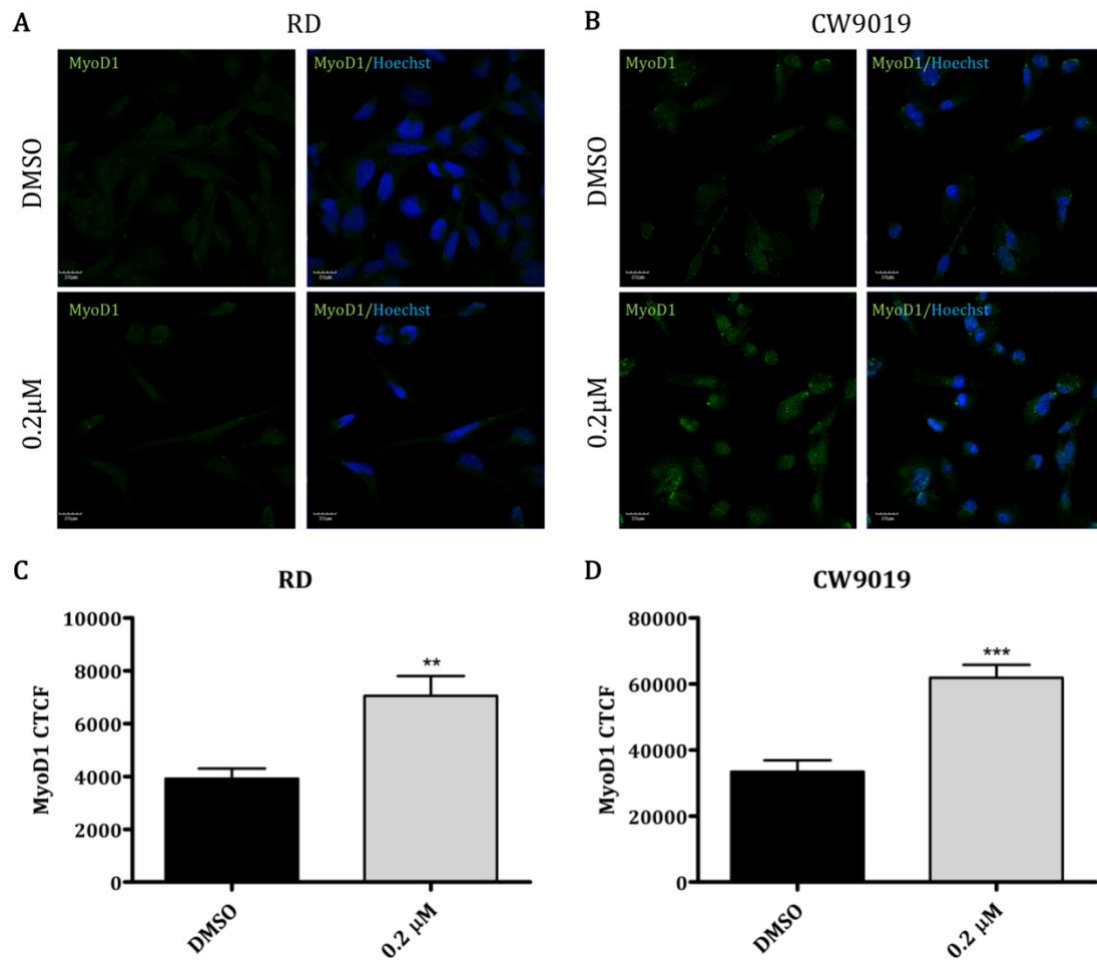


**Figura R30. El tractament amb WAY-262611 suggereix indicis de diferenciació miogènica.** Composició de fotografies que mostren indicis de diferenciació (indicat amb fletxes) en les línies cel·lulars RD i CW9019 després del tractament amb l'inhibidor farmacològic WAY-262611 (0.2µM, 48h).

L'augment dels marcadors de diferenciació obtingut per *Western blot* es va confirmar mitjançant l'anàlisi immunocitoquímic després del tractament amb WAY-262611 0.2µM durant 48h en les línies cel·lulars RD i CW9019. Es varen realitzar ICQ pels anticossos MyoD1 (Figura R32) i miogenina (Figura R33). Es va observar l'augment dels nivells de MyoD1 després del tractament amb l'inhibidor en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R32, A i B respectivament). Es va quantificar la intensitat de fluorescència emesa al nucli de les cèl·lules després del tractament amb l'inhibidor farmacològic, obtenint un augment significatiu dels nivells de MyoD1 en comparació al control en les dues línies cel·lulars analitzades (Figura R32, C i D). Es va realitzar el mateix experiment per analitzar els nivells de miogenina, observant també un augment d'aquesta proteïna després del tractament amb WAY-262611 en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura R33, A i B, respectivament). Es va quantificar la intensitat de fluorescència emesa al nucli de les cèl·lules després del tractament i es va obtenir un augment significatiu de la proteïna miogenina en comparació al control (Figura R33, C i D).

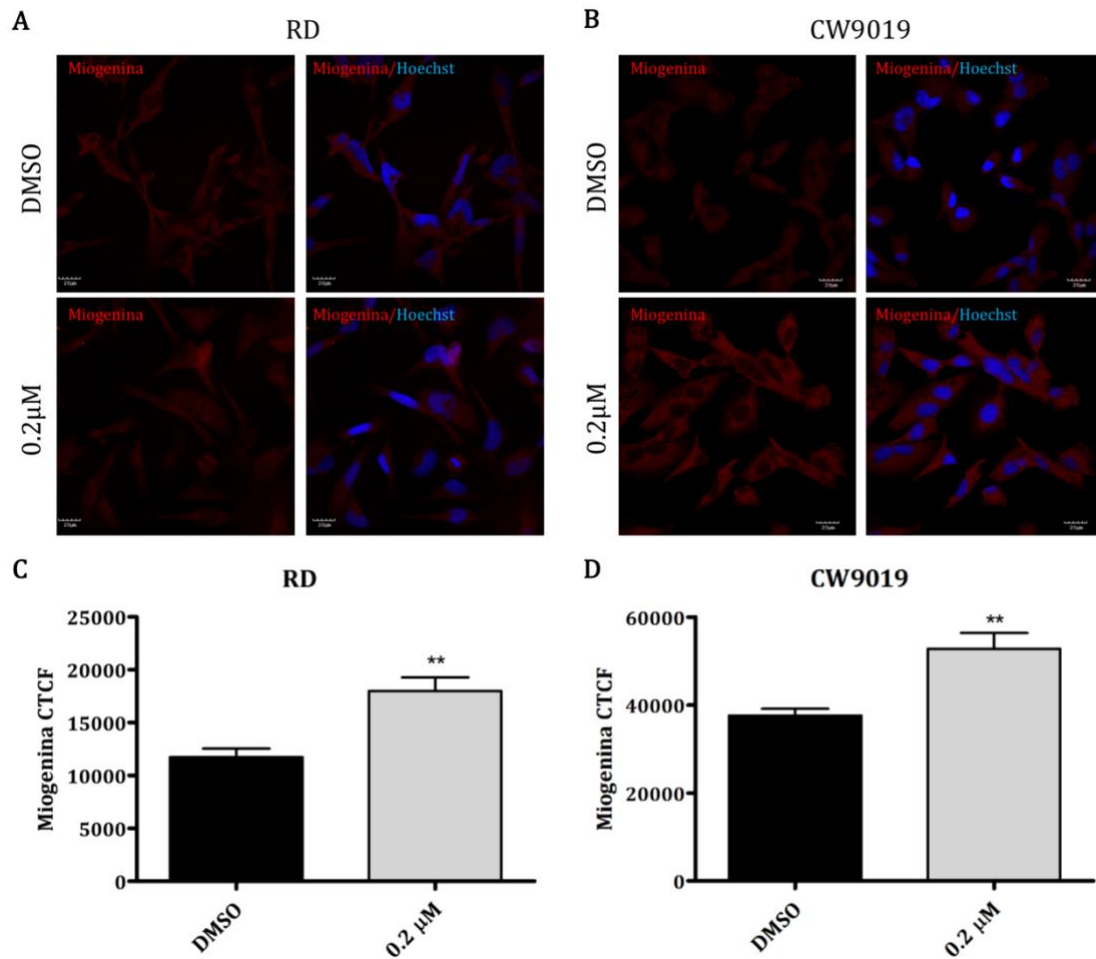


**Figura R31. El tractament amb l'inhibidor de DKK-1 augmenta els marcadors de diferenciació cel·lular.** A i B: Imatges de *Western blot* que mostren la inducció de les proteïnes de diferenciació, MyoD1 i miogenina, després del bloqueig farmacològic de DKK-1 (0.2 μM, 48h) en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. C-F: Densitometries de les imatges de *Western blot* que mostren els nivells de les proteïnes MyoD1 (C i D) i miogenina (E i F) en les línies cel·lulars RD (C i E) i CW9019 (D i F). G i H: Imatges de *Western blot* i les seves corresponents densitometries que mostren l'expressió de la proteïna FAK en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament, després del tractament amb 0.2 μM WY-262611 (48h). L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. Els resultats de les densitometries es varen referir als seus controls (cèl·lules tractades amb el vehicle (DMSO)).



**Figura R32. El tractament amb l'inhibidor de DKK-1 augmenta l'expressió del marcador de diferenciació muscular MyoD1.** A i B: Immunocitoquímiques que mostren els nivells de MyoD1 (marcatge en verd) en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els nuclis de les cèl·lules estan marcats en blau (Hoechst 33342). Barres: 10μm. C i D: Quantificació de la fluorescència emesa a nucli per l'anticòs MyoD1 a les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Es va quantificar la intensitat de fluorescència amb el paràmetre CTCF (de l'anglès *Corrected Total Cell Fluorescence*). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO)). Significació estadística: \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.



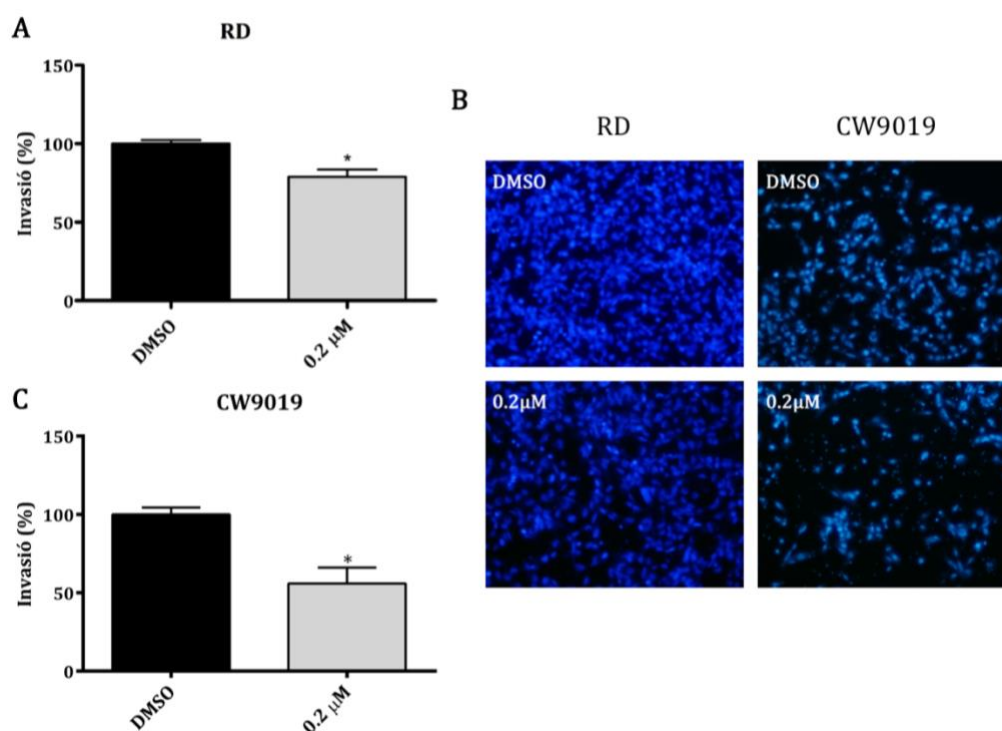


**Figura R33. El tractament amb l'inhibidor de DKK-1 augmenta l'expressió del marcador de diferenciació muscular miogenina.** A i B: Anàlisi immunocitoquímica de la proteïna miogenina (marcatge vermell) en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els nuclis cel·lulars estan marcats en blau (Hoechst 33342). Barres: 10μm. C i D: Quantificació dels nivells de miogenina provinent dels nuclis cel·lulars en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Es va quantificar la intensitat de fluorescència amb el paràmetre CTCF (de l'anglès *Corrected Total Cell Fluorescence*). Els resultats es varen referir als seus controls (cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO)). Significació estadística: \*\*p<0.01.

#### 9.4. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció de la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS *in vitro*

Es va estudiar la capacitat d'invasió de les cèl·lules després del tractament amb l'inhibidor farmacològic de DKK-1 mitjançant l'assaig d'invasió *Transwell*. Es va realitzar l'experiment en les línies cel·lulars RD i CW9019 prèviament tractades amb WAY-262611 a una concentració de 0.2μM durant 48h (Figura R34). Es va observar la reducció de la capacitat invasiva de les cèl·lules després del tractament

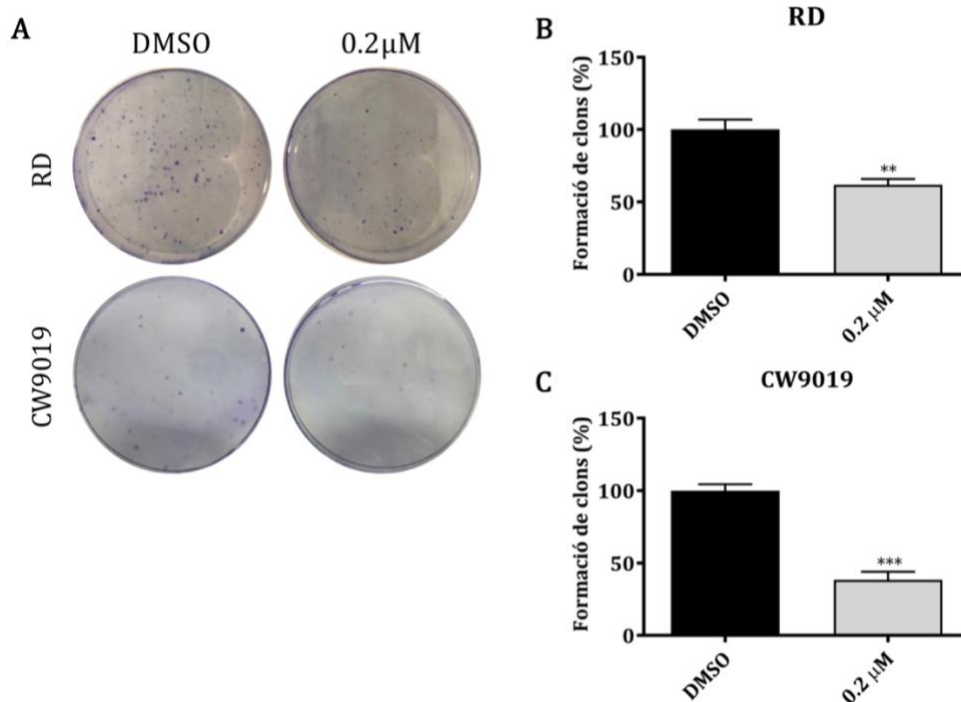
amb l'inhibidor farmacològic, essent significativa en les dues línies cel·lulars (Figura R34-A i C).



**Figura R34. El tractament amb WAY-262611 redueix la capacitat invasiva de les cèl·lules de RMS.** A i C: Assaigs d'invasió cel·lular *Transwell* de cèl·lules tractades amb l'inhibidor WAY-262611 durant 48h en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. Els valors d'invasió estan expressats en percentatges referits als seus controls (cèl·lules tractades amb el vehicle (DMSO) i representen la mitja  $\pm$  SEM de 3 assaigs independents. Significació estadística: \* $p < 0.05$ . B: Composició de fotografies mostrant un camp representatiu de les membranes *Transwell* corresponent a les línies RD i CW9019 tractades amb l'inhibidor farmacològic. Les cèl·lules amb capacitat invasiva es varen adherir a la superfície inferior de les membranes *Transwell* i es varen teñir amb Hoechst 33342.

### 9.5. El tractament amb WAY-262611 causa la reducció de la capacitat clonogènica de les cèl·lules de RMS *in vitro*

Es va realitzar l'assaig de clonogicitat per determinar la capacitat de les cèl·lules de RMS de formar clons després del tractament amb WAY-262611 (Figura R35). Es varen sembrar 1000 cèl·lules per placa i es varen incubar les plaques durant dues setmanes per a permetre la formació dels clons. El recompte dels clons va mostrar una reducció significativa del número de clons formats després del tractament amb el fàrmac en la línia cel·lular RD (Figura R35-B) i en la línia cel·lular CW9019 (Figura R35-C).

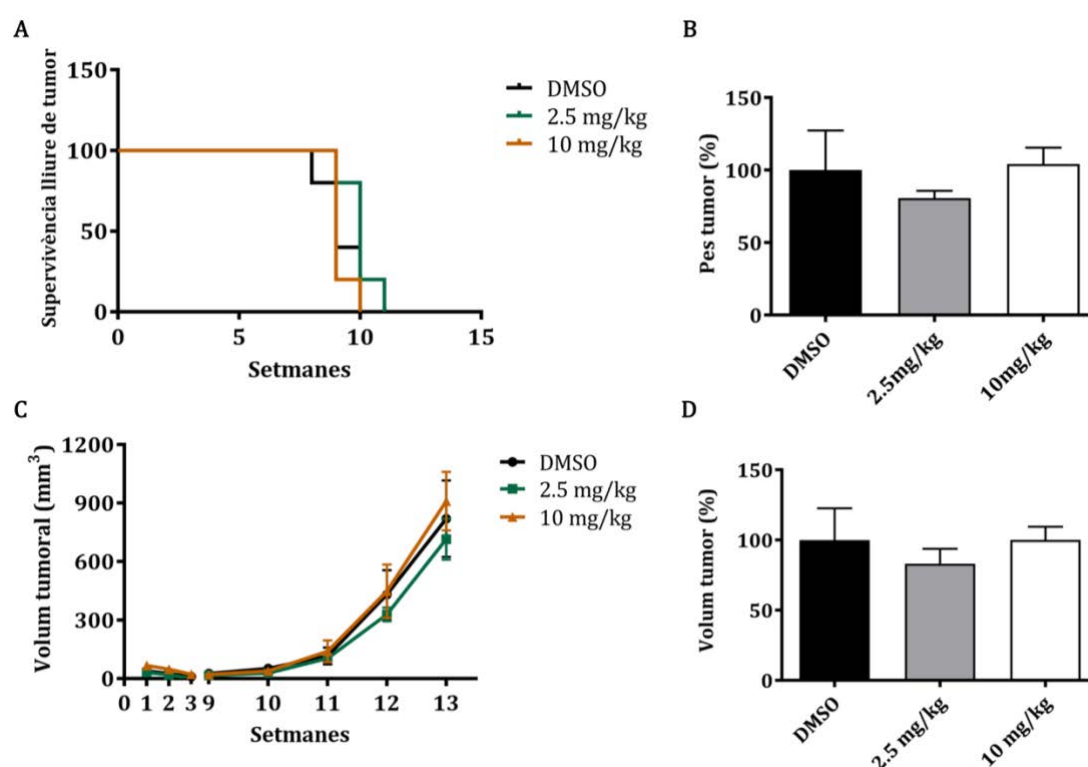


**Figura R35. La capacitat de formació de clons es veu reduïda després del tractament amb WAY-262611.** **A:** Composició de fotografies mostrant una placa representativa de cada condició (DMSO i WAY-262611 0.2 μM) amb els clons formats en la línia cel·lular RD i CW9019. **B i C:** Quantificació dels clons formats, en les línies RD i CW9019 respectivament, després del tractament amb WAY-262611. Es varen sembrar plaques amb la mateixa quantitat de cèl·lules i es varen incubar durant dues setmanes amb el seu corresponent tractament. Els resultats estan expressats en percentatge de clons referits als seus controls (cèl·lules tractades amb el vehicle (DMSO)) i representen la mitja ± SEM de 3 assaigs independents. Significació estadística: \*\*p<0.01 i \*\*\*p<0.001.

## 9.6. El tractament amb WAY-262611 no té efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID

Per determinar els efectes de l'inhibidor farmacològic de DKK-1 sobre el creixement tumoral en un model ortotòpic es varen injectar 1 milió de cèl·lules de la línia cel·lular RD, prèviament tractades durant 48h amb WAY-262611 0.2 μM, al múscul gastrocnemi de ratolins SCID. Pel grup control es varen utilitzar cèl·lules tractades amb el vehicle durant el mateix temps. Es varen establir tres grups d'animals: dos grups tractats amb dues dosis de WAY-262611 (2.5mg/kg i 10mg/kg) i un grup control (tractat amb el vehicle DMSO). 14 setmanes després de la injecció es varen sacrificar els animals i es varen extirpar els tumors (Figura R36). Es va analitzar la cinètica de creixement tumoral sense observar diferències (Figura R36-C). Tampoc es varen observar diferències significatives ni en el pes ni

en el volum promig dels tumors entre els grups tractats amb WAY-262611 respecte el grup control ni entre les diferents dosis avaluades de l'inhibidor, indicant que la inhibició de només DKK-1 no és suficient per a la reducció del creixement tumoral de RMS *in vivo* (Figura R36, B i D). Per altra banda, es varen pesar els animals diàriament per tal de comprovar possibles efectes tòxics del compost. No es varen obtenir diferències en el pes dels animals indicant que el compost no és tòxic a aquestes dosis.

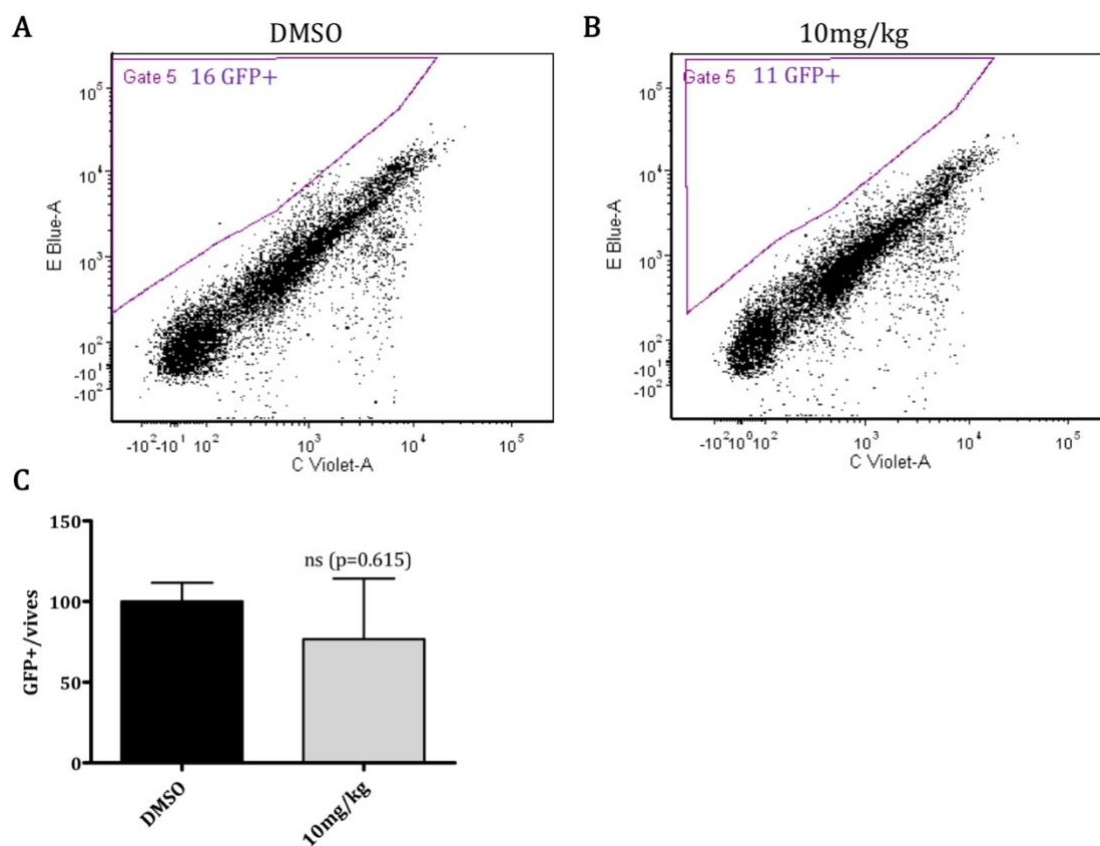


**Figura R36. El tractament amb l'inhibidor WAY-262611 no mostra efectes sobre el creixement tumoral en ratolins SCID.** **A:** Gràfic de formació dels tumors en ratolins SCID. **B:** Pes promig dels tumors al punt final de l'estudi referit al grup control (ratolins tractats amb DMSO). **C:** Cinètica del creixement tumoral expressada com el volum promig dels tumors generats en ratolins tractats amb WAY-262611 a dues dosis (2.5mg/kg o 10mg/kg) i els tractats amb DMSO (grup control). **D:** Volum dels tumors al punt final de l'estudi referit al grup control (ratolins tractats amb DMSO). Els resultats estan expressats com la mitja ± SEM dels valors de 5 ratolins que formaven cada grup.

### 9.7. Anàlisi del tractament amb WAY-262611 en la capacitat d'implantació de metàstasi de les cèl·lules de RMS en ratolins Nude

Es va estudiar la capacitat d'implantació de les cèl·lules metastàtiques *in vivo* després del tractament amb l'inhibidor farmacològic de DKK-1. Es varen injectar 3

milions de cèl·lules de la línia cel·lular RD amb l'expressió estable de GFP (vector lentiviral pGIPZ buit), prèviament tractades amb WAY-262611 0.2 $\mu$ M durant 48h, a la vena de la cua dels ratolins Nude. Els ratolins es varen tractar diàriament amb WAY-262611 (10mg/kg) i després de 7 dies es varen sacrificar els animals per a analitzar mitjançant citometria de flux el número de cèl·lules GFP+ implantades al pulmó (Figura R37). Tot i que els resultats varen mostrar una tendència de reducció del nombre de cèl·lules GFP+ respecte el total de cèl·lules vives presents a la mostra després del tractament amb WAY-262611, els resultats obtinguts no són significatius (Figura R37-C).



**Figura R37. Anàlisi del tractament amb WAY-262611 en la capacitat d'implantació de les cèl·lules de RMS *in vivo*.** Es varen injectar 3 milions de cèl·lules de RMS GFP positives pre-tractades amb WAY-262611 (0.2 $\mu$ M) o amb el vehicle DMSO durant 48h. **A i B:** Gràfics obtinguts del citòmetre FACSaria on es mostren les cèl·lules GFP+ (eix Y: E Blue-A) respecte l'auto-fluorescència basal de les cèl·lules (eix X: C Violet-A). **A:** Cèl·lules GFP+ dels ratolins tractats amb DMSO (16 cèl·lules GFP+). **B:** Cèl·lules GFP+ dels ratolins tractats amb WAY-262611 (10mg/kg) (11 cèl·lules GFP+). **C:** Número de cèl·lules GFP+ respecte les cèl·lules vives presents a la mostra. Els resultats es varen referir als valors obtinguts dels ratolins control. Els resultats estan expressats com la mitja  $\pm$  SEM dels valors de 3 ratolins que formaven cada grup.

## V. DISCUSSIÓ



La via de senyalització Wnt està desregulada en diversos tumors, presentant efectes sobre el creixement i la capacitat invasiva i metastàtica de les cèl·lules tumorals (262,264,269). Els primers estudis que varen relacionar la via Wnt amb el RMS varen concloure que la via està inactiva donada la baixa expressió de  $\beta$ -catenina i la localització citoplasmàtica d'aquesta. A més a més, no varen detectar la presència de mutacions en *CTNNB1* (359,360). Més endavant, es va confirmar la infra-regulació de la via Wnt en RMS, indicant també els efectes de l'activació de la via en la diferenciació miogènica (361). Els estudis més recents han demostrat que l'activació de la via Wnt, ja sigui per l'addició del lligand Wnt3a com per la inhibició de components de la via tals com GSK-3 $\beta$  o sFRP3, promou la diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS (342,364–367). Concretament, aquests estudis demostren la reducció de la proliferació cel·lular i la inducció de l'expressió dels reguladors miogènics MyoD1, miogenina i Myf5 (342,364,366).

Per tant, que la via Wnt es troba inhibida en RMS i que la seva activació promou la diferenciació cel·lular són fets altament acceptats. Tot i això, el mecanisme responsable de la inhibició d'aquesta via en RMS és encara incert. Determinar les molècules responsables de la inactivació de la via Wnt podria tenir un paper clau per al disseny de noves teràpies anti-oncogèniques en RMS.

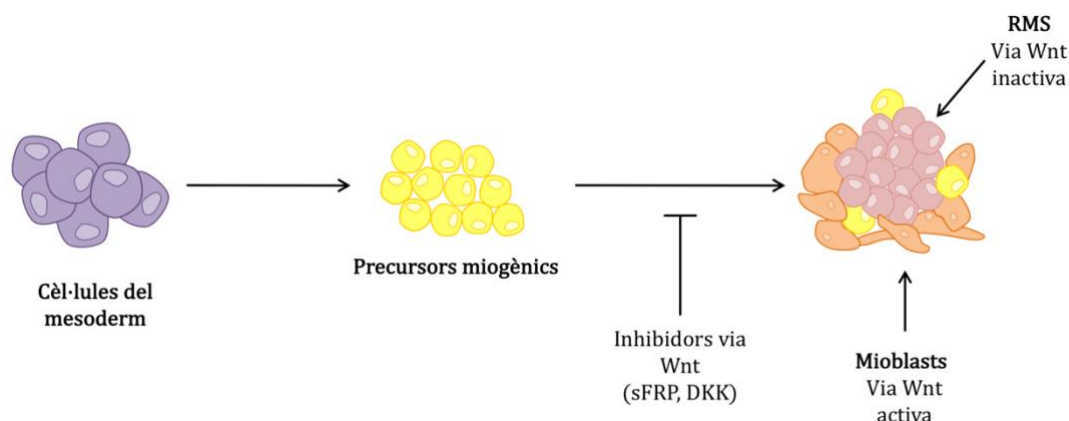
### **1. *DKK-1* és l'inhibidor més expressat en línies cel·lulars i tumors de RMS**

En aquest treball s'analitza per primera vegada l'expressió dels inhibidors de la via Wnt en RMS. Més concretament, aquesta tesi s'ha centrat en el paper dels antagonistes de la via Wnt en la tumorigènesi del RMS. Per tal de determinar la implicació dels antagonistes sFRP i DKK en la inactivació de la via Wnt en RMS, es varen analitzar els seus nivells d'expressió en línies cel·lulars i tumors de RMS. En l'anàlisi de línies cel·lulars de RMS es mostra una major expressió dels gens *DKK* en comparació amb els gens *sFRP*, especialment de *DKK-1*. Els resultats obtinguts de l'anàlisi d'expressió dels inhibidors en mostres tumorals revelen una elevada presència de la majoria dels antagonistes, mostrant una expressió elevada i constant dels gens *DKK*. No obstant, s'ha de tenir en compte que els resultats de l'expressió dels inhibidors en tumors prové de *microarrays* d'expressió on les



eficàcies d'unió de les diferents sondes dels gens analitzats no tenen perquè ser les mateixes i, per tant, no poden ésser comparades entre si. Malgrat aquest fet, l'expressió de *DKK-1* estava entre les més destacables i presentava una expressió elevada en pràcticament totes les línies cel·lulars analitzades, suggerint un paper preponderant d'aquest inhibidor de la via Wnt.

Així doncs, l'elevada expressió dels antagonistes suggereix que la inhibició de la via Wnt en RMS pot estar causada per la seva presència. En concordança amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, estudis anteriors han descrit la presència dels antagonistes de la via Wnt en RMS. Així, Kephart et al. varen descriure una elevada expressió dels inhibidors sFRP1, sFRP3, sFRP4 i DKK-2, tot i que l'estudi només es centra en línies cel·lulars de RMSa i mioblasts humans amb expressió de *PAX3-FOXO1* (342). De manera similar, Singh et al. varen descriure també la sobreexpressió d'antagonistes de la via, tals com sFRP2, sFRP4 i DKK-1, en línies cel·lulars de RMSe (361). Els resultats d'aquests estudis descriuen l'elevada expressió de diferents antagonistes de la via segons el subtipus histològic, suggerint una diferència entre el mecanisme d'inactivació de la via Wnt dependent del subtipus histològic. En aquesta tesi es confirma l'expressió dels inhibidors en ambdós subtipus histològics, demostrant que la seva presència pot ser la causa de la inactivació de la via Wnt i, per tant, podria estar involucrada en la formació del tumor (Figura D1).



**Figura D1. Representació del model proposat de la implicació de la inactivació de la Wnt en RMS.** Els tumors de RMS presenten una elevada expressió dels inhibidors de la via Wnt, fet que els posiciona com a possibles causants de la inhibició de la via. La inhibició de la via Wnt està relacionada amb l'absència de diferenciació en RMS. Per contra, la seva activació causaria la diferenciació dels precursors miogènics a mioblasts i, finalment, a la formació dels miotubs.

A més a més, l'anàlisi d'expressió de l'ARNm de *DKK-1* en mostres tumorals de RMS mitjançant PCR convencional va revelar per primera vegada dues isoformes de *DKK-1*. Després de seqüenciar la isoforma inesperada, es va comprovar el manteniment de l'intró número 3 de *DKK-1* (corresponent als 118pb addicionals). La no eliminació de l'intró inclou, dins la seva seqüència, la presència d'un codó d'aturada, no obstant, no s'ha detectat la presència de proteïnes truncades. Altrament, no s'ha descrit prèviament la presència de la mencionada isoforma de *DKK-1* en estudis anteriors. Aquesta nova isoforma està present tan en tumors de RMSa com de RMSe i no presenta una expressió diferencial entre els tumors localitzats o metastàtics. La isoforma està present en les línies cel·lulars de RMSa amb la translocació *PAX3-FOXO1* i en RMSa negatius per la translocació. A més a més, tan els tumors analitzats amb aquesta translocació com els RMSa negatius per la translocació mostren la presència d'ambdues isoformes. En canvi, el tumor de RMSa amb la translocació *PAX7-FOXO1* (t12) analitzat no mostra la presència de la isoforma, tampoc ho fa la línia cel·lular CW9019, la qual presenta també la mateixa translocació. Aquests resultats preliminars permeten hipotetitzar que aquesta nova isoforma de *DKK-1* podria conferir efectes oncogènics diferents segons el subtipus histològic i la presència de translocacions específiques. No obstant, caldrien més estudis per confirmar aquesta hipòtesi.

## **2. La presència de *DKK-1* correlaciona amb la inhibició de la via Wnt en RMS**

Aquest estudi descriu la caracterització funcional de l'estat d'activació de la via Wnt en tumors de RMS. Es va confirmar que els tumors amb nivells elevats de *DKK-1* presenten nivells baixos de  $\beta$ -catenina, suggerint que l'expressió d'aquest antagonista causa la inhibició de la via Wnt. També es va confirmar que els tumors amb nivells baixos de *DKK-1* mostraven nivells elevats de  $\beta$ -catenina, suggerint en aquest cas que la via Wnt està activa, i que, per tant, el creixement del tumor recauria en altres vies de senyalització cel·lular independents de  $\beta$ -catenina. En aquest sentit, en càncer gàstric s'ha descrit que l'elevada expressió de *DKK-1* es relaciona amb una pitjor supervivència, malgrat no s'observi una correlació entre l'expressió de *DKK-1* i  $\beta$ -catenina (330).

A més a més, es varen comparar els resultats obtinguts mitjançant PCR convencional i l'expressió de proteïna en tumors de RMS. Els tumors que expressen l'intró 3 (nova isoforma de DKK-1) tenen nivells més elevats de DKK-1 i, conseqüentment, la via inactivada. Per contra, el tumor amb la translocació *PAX7-FOXO1* (t12) presenta nivells baixos tan de  $\beta$ -catenina com de DKK-1, suggerint en aquest cas, que en la tumorigènesi estan involucrades altres vies de senyalització o altres inhibidors. El tumor analitzat que no presenta l'intró 3 (t5), presenta nivells baixos de DKK-1 i elevats de  $\beta$ -catenina, indicant que l'absència de l'inhibidor podria ser la causa d'una major activació de la via Wnt i, per tant, de l'acumulació del gen efector de la via ( $\beta$ -catenina). No obstant, tot i que aquests resultats suggereixen un possible paper específic d'aquesta isoforma, caldrien més estudis per determinar la implicació del manteniment de l'intró 3 en la inactivació de la via Wnt i en la tumorigènesi del RMS.

Per tal de determinar els efectes de l'activació de la via Wnt en RMS, es va procedir al bloqueig de DKK-1 mitjançant dues metodologies: la tecnologia d'shRNA i la inhibició farmacològica. Es varen comprovar els efectes sobre l'activació de la via Wnt en les línies cel·lulars RD i CW9019, corresponents als subtipus embrionari i alveolar de RMS, respectivament. La reducció dels nivells de proteïna DKK-1 va confirmar l'eficàcia d'ambdues metodologies. La infra-regulació de *DKK-1* mitjançant shRNA va mostrar una baixada de l'ARNm degut a la unió perfecte entre l'shRNA i l'ARN diana, excepte amb l'sh#1 en la línia cel·lular CW9019. En aquest cas, es dedueix que la unió entre l'shRNA i l'ARN diana era parcial i es va inhibir només la traducció, explicant doncs l'increment dels nivells d'ARNm de DKK-1 i la reducció dels nivells de proteïna. La inhibició farmacològica de DKK-1 mitjançant WAY-262611 es va confirmar per una baixada dels nivells de proteïna de DKK-1. WAY-262611 és un inhibidor que no disminueix els nivells d'ARNm de DKK-1 ja que actua a nivell de proteïna. En aquesta línia, s'ha descrit que el fàrmac redueix els nivells proteics de DKK-1 (384,406). Concretament, WAY-262611 actua bloquejant la unió de DKK-1 al receptor LRP5, permetent la unió dels lligands Wnt als receptors i activant així la via Wnt (377).

La caracterització de l'activació de la via Wnt posterior al bloqueig de DKK-1 es va realitzar de dues maneres: comprovant els nivells proteics de  $\beta$ -catenina i

mitjançant l'assaig luciferasa. Els resultats obtinguts en ambdós assaigs varen confirmar l'activació de la via: es varen confirmar nivells més elevats de la proteïna efectora de la via Wnt,  $\beta$ -catenina, i una major activitat luciferasa posterior a la inhibició de DKK-1, confirmant que DKK-1 és una proteïna clau per la inhibició de la via Wnt en RMS. En l'assaig luciferasa després de la inhibició farmacològica no s'observa un augment del grau d'activació de la via en la línia cel·lular CW9019, suggerint que els dos subtipus histològics poden diferir en la capacitat d'activació de la via. La baixa senyalització Wnt en cèl·lules de RMS va requerir l'ús de medi condicionat amb Wnt3a per a realitzar l'assaig luciferasa. S'ha evidenciat que l'addició de Wnt3a al medi de cultiu de les línies cel·lulars de RMS és suficient per induir l'activitat luciferasa de  $\beta$ -catenina (364). En càncer de colon, per exemple, s'ha descrit la implicació de la secreció dels lligands Wnt, tan per part de les cèl·lules tumorals com per part de l'estroma, en la proliferació i la supervivència de les cèl·lules tumorals (407). En aquest estudi, Voloshanenko et al. descriuen que, tot i les mutacions en *APC* o *CTNNB1*, la reducció dels lligands Wnt en cultiu cel·lular disminueix l'activació de la via Wnt. Aquesta disminució de la senyalització Wnt es rescata mitjançant l'addició de Wnt3a recombinant. Així doncs, l'addició del lligand Wnt3a al medi de cultiu podria ser la causant dels nivells endògens d'activació de la via Wnt observats en aquesta tesi. Tot i aquesta expressió basal de la via Wnt en les línies cel·lulars de RMS analitzades, la inhibició de DKK-1 augmenta el grau d'activació de la via, posant en relleu la importància de l'antagonista en la inhibició de la via Wnt.

### **3. El paper de DKK-1 en el creixement de les cèl·lules de RMS**

Aquest treball descriu els efectes funcionals de la inhibició de DKK-1 sobre el creixement de les cèl·lules de RMS. La infra-regulació genètica de *DKK-1* mitjançant shRNA en les línies cel·lulars RD i CW9019 causa la reducció del creixement cel·lular. La inhibició farmacològica de DKK-1 en les esmentades línies cel·lulars provoca efectes similars. Aquests resultats indiquen que l'activació de la via Wnt mitjançant la inhibició de DKK-1 té efectes en la reducció del creixement cel·lular.

El lleuger augment de cèl·lules en fase G1 del cicle cel·lular posterior a la depleció genètica de *DKK-1* suggereix que la disminució de la proliferació observada podria ser deguda, en part, a una aturada del cicle cel·lular. Aquest fet pot ser causat per l'increment observat en els nivells de ciclina D1. La ciclina D1 té un paper central en la regulació del cicle cel·lular, concretament en la progressió G1/S. La ciclina D1 s'acumula durant la fase G1 del cicle cel·lular però la baixa estabilitat d'aquesta ciclina fa que es degradi i les cèl·lules entrin a la fase S (408,409). Essent per tant, l'acumulació de la ciclina D1 un indicador de l'arrest del cicle cel·lular en la fase G1. Donat que la ciclina D1 és un gen diana de la via Wnt (410), el model que proposem en aquesta part de la tesi és que l'activació de la via Wnt, mitjançant la inhibició de *DKK-1*, promou l'expressió i acumulació de ciclina D1. Aquesta acumulació de ciclina D1 en les cèl·lules de RMS amb la via Wnt activa, provoca que s'aturin a la fase G1, donant lloc a la reducció en la proliferació cel·lular (Figura D2).

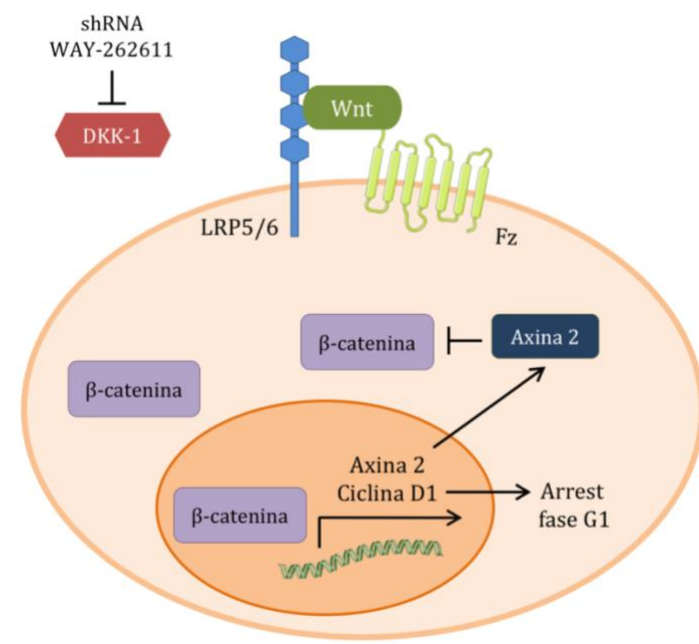
Per altra banda, s'ha descrit que *DKK-1* augmenta la proliferació cel·lular i disminueix l'expressió de  $\beta$ -catenina, permetent que les cèl·lules re-entrin al cicle cel·lular mitjançant la inhibició de la via Wnt canònica (411). En aquest estudi, portat a terme en cèl·lules mare mesenquimals (MSC, de l'anglès *mesenchymal stem cell*), Gregory et al. descriuen la implicació de *DKK-1* en la disminució de l'expressió de  $\beta$ -catenina, la qual s'encarrega de regular les unions adherents, reduint els contactes entre cèl·lules necessaris per la diferenciació cel·lular i fent que les cèl·lules re-entrin al cicle cel·lular. Els resultats obtinguts en aquesta tesi suggereixen que *DKK-1* pot tenir la mateixa funció en RMS, és a dir, l'expressió de *DKK-1* causaria una reducció de l'expressió de  $\beta$ -catenina, reduint els contactes entre cèl·lules i permetent que les cèl·lules de RMS poguessin re-entrar al cicle cel·lular. Per tant, la inhibició de *DKK-1* i l'augment de  $\beta$ -catenina aturaria aquesta re-entrada al cicle cel·lular inhibint així la proliferació. No obstant, en altres tumors no s'han descrit els efectes de la inhibició de *DKK-1* en el cicle cel·lular.

Així doncs, el paper anti-oncogènic de l'activació de la via Wnt en RMS està caracteritzat per la reducció del creixement cel·lular. Per tal d'analitzar les causes, es varen estudiar els canvis en els gens diana causats per l'activació de la via Wnt. Es va procedir a analitzar els nivells d'expressió dels principals gens diana de via

– *c-Myc*, *CD44* i *Axina 2* – després de la inhibició de *DKK-1*. Els resultats obtinguts no varen mostrar diferències o inclús es va detectar una disminució de l'expressió de *c-Myc*, *CD44* i *Axina 2* després de la depleció genètica de *DKK-1* en comparació al control (cèl·lules transduïdes amb el vector buit). Per altra banda, la inhibició de *DKK-1* mitjançant *WAY-262611* no va causar canvis en el gen diana *c-Myc*, però sí que va provocar un augment del gen diana *Axina 2*. En aquest sentit, Jho et al. varen descriure que *Axina 2* és un gen diana de la via Wnt que actua com a regulador negatiu d'aquesta (412). Així doncs, l'activació de la via Wnt promou l'expressió d'*Axina 2*, la qual està involucrada en limitar la duració i/o intensitat de la senyalització Wnt mitjançant la inhibició de  $\beta$ -catenina. En concordança amb l'estudi de Jho et al., altres treballs descriuen que l'activació de la via Wnt en RMS mitjançant el tractament amb *Wnt3a* no altera l'expressió dels gens diana *c-MYC*, *c-JUN*, *SLUG*, però sí d'*Axina 2* (364). A part de la funció d'*Axina 2* com a regulador negatiu de la via Wnt, diversos estudis relacionen la seva expressió amb la diferenciació muscular (413,414). Figeac et al. descriuen l'augment d'expressió d'*Axina 2* durant la diferenciació miogènica en comparació als nivells d'expressió en cèl·lules amb activitat proliferativa. En aquesta tesi s'observa un augment d'expressió d'*Axina 2* posterior al tractament amb *WAY-262611*. Aquest augment podria venir donat per l'increment de diferenciació miogènica causat pel bloqueig de *DKK-1* i per tal de contrarestar la intensitat de l'activació de la via Wnt causada pel tractament amb *WAY-262611*.

En resum, la inhibició de *DKK-1* causa l'activació de la via Wnt mediada per  $\beta$ -catenina sense mostrar efectes en l'expressió dels gens diana *c-Myc* i *CD44*. No obstant, els resultats obtinguts no varen ser sorprenents ja que *c-Myc* i *CD44* són gens relacionats amb una major proliferació (206,209,415). En concordança amb aquest fet, Li et al. varen descriure un augment de *c-Myc* després del tractament amb *WAY-262611*, el qual varen relacionar amb una major proliferació (379). Tanmateix, els resultats mostrats en aquesta tesi suggereixen que l'activació de la via Wnt té efectes anti-proliferatius, essent normal que els nivells de *c-Myc* no variïn. Per altra banda, Mylona et al. descriuen el paper de *CD44* en la diferenciació dels mioblasts, demostrant que la inhibició de *CD44* augmenta la diferenciació i redueix la motilitat dels mioblasts (416). En aquesta tesi es mostra la disminució

de CD44 en la línia cel·lular de RMSa (CW9019), però no en la línia cel·lular de RMSe (RD). Aquest resultat suggereix que l'activació de la via Wnt en RMS pot activar diferents gens diana anti-oncogènics segons el subtipus histològic. Així doncs, la inhibició de DKK-1 és capaç d'activar la via Wnt, sense causar efectes en els gens pro-oncogènics (Figura D2). Per tant, el fet que la inhibició de DKK-1 no activi l'expressió dels gens diana de la via Wnt involucrats en el creixement cel·lular és indicatiu que l'activació de la via Wnt en RMS té efectes anti-oncogènics.



**Figura D2. Representació del mecanisme proposat de la reducció del creixement cel·lular en RMS.** La inhibició de DKK-1 promou l'activació de la via Wnt permetent que  $\beta$ -catenina es transloqui al nucli i activi els gens diana *Axina 2* i *ciclina D1*. La proteïna *Axina 2* és un regulador negatiu, el qual inhibeix  $\beta$ -catenina, contrarestant els efectes produïts per l'activació de la via Wnt. L'activació de la via causa la transcripció de *ciclina D1*, promovent la seva acumulació i el conseqüent arrest a la fase G1 del cicle cel·lular.

Tot i que els efectes sobre la proliferació de la infra-regulació de *DKK-1* i la seva inhibició mitjançant WAY-262611 varen ser prometedors *in vitro*, els efectes observats sobre el creixement tumoral *in vivo* no varen ser els esperats. Malgrat que l'aparició dels tumors en els ratolins injectats amb cèl·lules de RMS amb la infra-regulació de *DKK-1* va ser lleugerament posterior a la dels control, no es va observar una disminució significativa del creixement tumoral en cap dels dos models *in vivo*. Destacar que el tractament amb WAY-262611 no va mostrar

toxicitat en les dosis emprades. Aquest resultat obre la porta a futurs estudis amb dosis superiors d'aquest inhibidor per tal de comprovar si es reproduïxen els efectes sobre proliferació observats amb el fàrmac *in vitro*.

El fet que en el model animal no s'hagin obtingut els resultats esperats indica que el creixement tumoral *in vivo* està afectat per l'estroma, és a dir, per altres components de la via Wnt i/o altres vies de senyalització. Possiblement, la depleció de només un antagonista de la via Wnt no és suficient per activar-la i reduir el creixement tumoral *in vivo*. Com s'ha descrit en aquest treball, existeixen múltiples inhibidors de la via Wnt (com per exemple la família d'inhibidors sFRP, DKK o WIF, entre altres). Així doncs, els efectes de la depleció de DKK-1 podrien estar compensats per la presència dels altres inhibidors de la via Wnt. Les famílies d'antagonistes DKK i sFRP representen un grup d'inhibidors solubles. S'ha descrit que les cèl·lules de l'estroma expressen aquests inhibidors, exercint com a reguladors de la via Wnt en les pròpies cèl·lules de l'estoma (regulació autocrina) com en les cèl·lules tumorals adjacents (regulació paracrina) (159,417). En mieloma múltiple, per exemple, s'ha descrit que les cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia expressen nivells elevats de DKK-1, i que, a més a més, la capacitat d'unió als receptors es veu augmentada en comparació a les cèl·lules de l'estroma dels controls sans (418). Més recentment, D'Amico et al. descriuen també la implicació de les cèl·lules de l'estroma en la inducció de l'expressió de DKK-1, exercint efectes immuno-supressors durant el creixement tumoral (419). A més a més, s'ha descrit l'expressió d'altres inhibidors tals com DKK-3 o els antagonistes sFRP a l'estroma de certs tumors (417,420–422). Així doncs, suggerim que els efectes observats *in vivo* podrien estar afectats per l'expressió d'altres inhibidors de la via Wnt en les cèl·lules del tumor i de l'estroma o inclús per mecanismes compensatoris d'altres vies, els quals contribuirien a inhibir la via Wnt en les cèl·lules tumorals.

Hi ha escassetat d'estudis sobre el paper de DKK-1 *in vivo*. No obstant, en colangiocarcinoma s'ha descrit que la inhibició de *DKK-1* mitjançant shRNA disminueix la formació de tumors *in vivo* (423). A més a més, diversos estudis proposen la inhibició de DKK-1 mitjançant anticossos com a tractament del mieloma múltiple (390). No obstant, la majoria de treballs que descriuen la funció



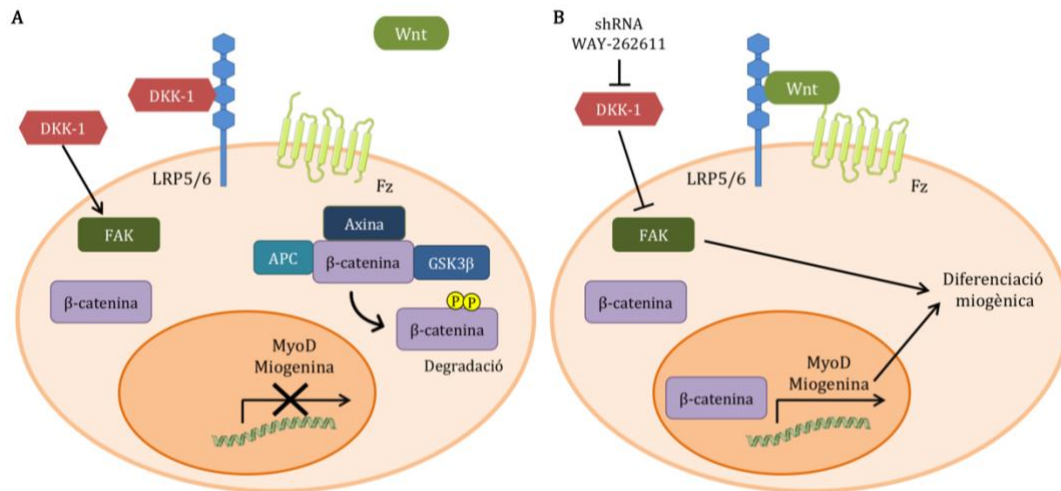
oncogènica de DKK-1 tan sols indiquen la seva importància com a biomarcador de diagnòstic i/o pronòstic i no es descriuen els efectes de la seva inhibició (332,334,424). Així doncs, tot i que els efectes causats per DKK-1 *in vitro* són prometedors, la seva implicació en el creixement tumoral *in vivo* és encara en gran part desconeguda degut a la possible participació de l'estroma. Per tant, caldria un estudi més exhaustiu del paper de la inhibició de DKK-1 en RMS per tal de determinar els seus efectes *in vivo*.

#### **4. El paper de DKK-1 en la diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS**

Després d'observar indicis de diferenciació en les cèl·lules amb inhibició de DKK-1, tan amb shRNA com amb l'inhibidor farmacològic, es va caracteritzar l'expressió dels dos marcadors miogènics principals: MyoD1 i miogenina. MyoD1 i miogenina són dos factors determinants de la miogènesi, MyoD s'expressa a les cèl·lules progenitores per establir el llinatge de múscul esquelètic, mentre que la miogenina s'expressa als mioblasts per tal de regular la diferenciació de les cèl·lules musculars (425). Es va confirmar un augment de l'expressió tan de MyoD1 com de miogenina després de la inhibició de DKK-1, tan mitjançant la inhibició genètica com farmacològica. Les immunocitoquímiques varen revelar un augment de l'expressió d'ambdós marcadors a nucli. Aquest resultat concorda amb estudis recents que descriuen la interacció de  $\beta$ -catenina amb MyoD i miogenina per activar la seva activitat transcripcional (Figura D3) (240). Concretament, Kim et al. demostren que perquè es doni la diferenciació miogènica és necessària la interacció directa de  $\beta$ -catenina amb MyoD i miogenina i no amb els factors TCF/LEF (240). A més, s'ha descrit l'expressió d'ambdós marcadors a nucli durant la diferenciació miogènica, tot i que la miogenina es localitzi també al citoplasma als estadis finals d'aquesta (426). En RMSa es va descriure la capacitat de GSK-3 $\beta$ , el qual s'encarrega de fosforilar i induir la degradació de  $\beta$ -catenina, per fosforilar i reprimir l'expressió de miogenina *in vitro*, confirmant així l'habilitat de GSK-3 $\beta$  per inhibir la diferenciació miogènica en RMS (365). En aquest estudi, Dionyssiou et al. varen descriure que la repressió de la funció de la miogenina causava un fenotip proliferatiu de les cèl·lules de RMS. Així doncs, en RMS la via Wnt es pot trobar

inhibida ja sigui per l'acció repressora de GSK-3 $\beta$  o per l'elevada presència d'inhibidors de la via, els quals tindrien els mateixos efectes: inhibir la diferenciació miogènica. Els resultats obtinguts en aquesta tesi suggereixen que l'activació de la via Wnt, causada per la inhibició de DKK-1, promou la interacció de  $\beta$ -catenina amb MyoD i miogenina, induint l'expressió d'aquests factors de transcripció i la conseqüent diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS.

Per altra banda, l'anàlisi de l'expressió de FAK, cinasa associada als processos de diferenciació, mostra una reducció de la seva expressió després de la inhibició de DKK-1 tan genètica com farmacològicament. En la línia dels resultats obtinguts, s'ha postulat que la inhibició de FAK té un paper essencial en la miogènesi esquelètica. Concretament, s'ha descrit que l'expressió ectòpica de FAK promou la proliferació cel·lular de mioblasts, mentre que inactivant el lloc d'activació de FAK s'indueix la diferenciació i la formació dels miotubs multinucleats (427). A més a més, s'ha descrit que els nivells de proteïna FAK disminueixen durant la miogènesi a causa de la seva ubiquitinació i posterior degradació (428). En aquest estudi, Nguyen et al. descriuen que durant la miogènesi els nivells d'expressió de FAK disminueixen per tal de donar lloc al procés de diferenciació. Contràriament, els nivells de fosforilació de FAK augmenten, suggerint que l'increment de fosforilació promou la seva degradació. No obstant, els autors conclouen que la degradació de FAK és independent de la seva fosforilació, essent encara desconeguda la relació entre la fosforilació de FAK i la diferenciació miogènica (428). En RMS s'ha descrit que FAK està present i fosforilat en tumors i línies cel·lulars de RMSa i RMSe (429). En aquest estudi, Waters et al. comproven que la inhibició de FAK disminueix la supervivència cel·lular, la invasió i la migració *in vitro*, mentre que *in vivo* redueix el creixement tumoral (429). Per altra banda, en un estudi d'artritis reumatoide s'ha descrit també que DKK-1 induïx l'activació de la via de senyalització de FAK, i que la seva inhibició fa que els nivells de FAK es redueixin (384). Malgrat que en RMS s'hagi descrit que FAK està involucrada en la invasió i la migració cel·lular, els resultats obtinguts en aquesta tesi suggeririen que FAK, a part dels efectes descrits per altres autors en la capacitat de proliferació i la migració, té també efectes en la diferenciació miogènica de les cèl·lules tumorals i que aquest darrer mecanisme estaria mediat per DKK-1 (Figura D3).



**Figura D3. Representació del mecanisme proposat de la relació de la via Wnt amb la diferenciació miofènica de les cèl·lules de RMS.** **A:** En presència de l'inhibidor DKK-1, la via Wnt està inactiva.  $\beta$ -catenina es troba formant un complex amb APC, Axina i GSK-3 $\beta$ , el qual la fosforila i promou la seva degradació. La degradació de  $\beta$ -catenina no permet la seva interacció amb MyoD i miogenina, inhibint així la diferenciació miofènica i promovent la proliferació. Per altra banda, DKK-1 té també la capacitat d'activar FAK. L'expressió de FAK inhibeix la diferenciació miofènica i induïx la proliferació de les cèl·lules de RMS. **B:** La inhibició de DKK-1 causa la reducció dels nivells de FAK induïnt així la diferenciació miofènica. A més a més, la inhibició de DKK-1 i la conseqüent activació de la via Wnt, permet la interacció de  $\beta$ -catenina amb MyoD i miogenina per tal d'iniciar el procés de diferenciació miofènica.

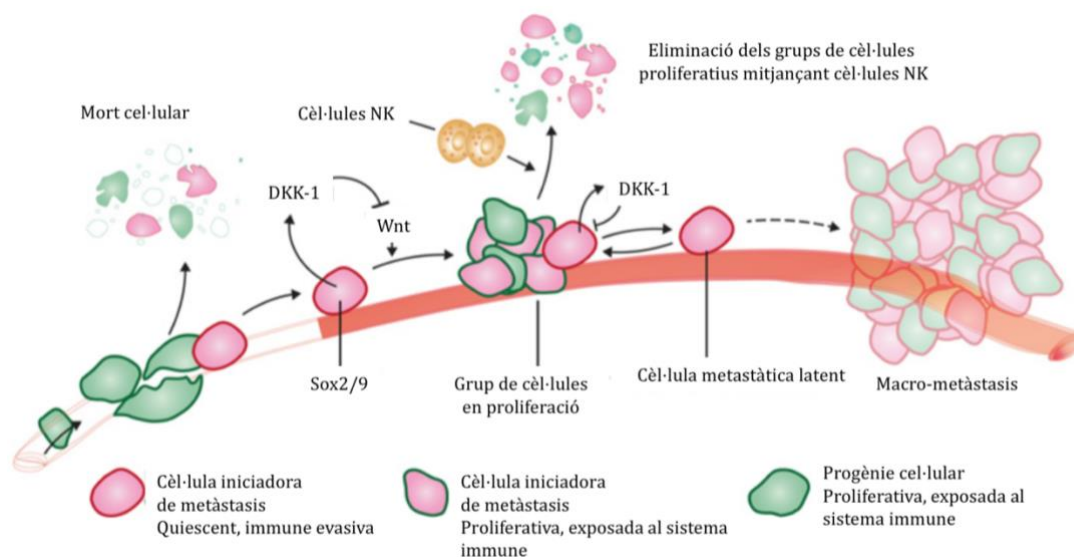
## 5. El paper de DKK-1 en la capacitat invasiva i clonogènica de les cèl·lules de RMS

La implicació de DKK-1 en els mecanismes de metàstasi està ben establerta en certs tumors, tals com el càncer d'ovari o el càncer de pulmó (430,431). Estudis en càncer de pròstata conclouen també que la inhibició de DKK-1 redueix la capacitat metastàtica ja que l'activació de la via Wnt promou l'activitat osteoblàstica del teixit diana de les metàstasis (432). Per altra banda, Choe et al. descriuen que WAY-262611 redueix la capacitat de migració dels sinoviòcits, unes cèl·lules similars a fibroblasts localitzades al líquid sinovial de les articulacions (384). En RMS, però, no s'ha descrit la implicació de l'activació de la via Wnt en la capacitat invasiva. Els resultats mostrats en aquest treball indiquen una reducció moderada de la capacitat invasiva *in vitro* després de la inhibició de DKK-1, tan genètica com farmacològicament. Possiblement, aquesta reducció de la invasió pot ser una conseqüència del major grau de diferenciació d'aquestes cèl·lules després del tractament i no a una reducció directa de la seva capacitat invasiva.

Els assaigs de formació de clons es varen realitzar per tal de determinar la implicació de DKK-1 en les cèl·lules iniciadores de RMS. Els resultats dels assaigs de clonogenicitat mostren una reducció en la capacitat de la formació de clons després de la inhibició de DKK-1 tan mitjançant shRNA com WAY-262611. No obstant, atribuïm com a causa més probable de la reducció de la formació de clons al procés de diferenciació en RMS. Les cèl·lules amb la inhibició de DKK-1, inclosa la subpoblació de cèl·lules mare amb capacitat de generar nous clons, mostren una major diferenciació presentant, per tant, una menor capacitat d'invasió i de clonogenicitat. A més, la relació entre l'activació de la via Wnt i la diferenciació de les cèl·lules mare està ben establerta (433). En aquest estudi, Davidson et al. conclouen que l'activació de la via Wnt en cèl·lules mare embrionàries humanes no indueix l'auto-renovació, sinó que promou la diferenciació cel·lular. Bukowska et al., per altra banda, varen confirmar que l'activació de la via Wnt promou la formació de clons més petits i diferenciats, i que redueix l'expressió dels marcadors de cèl·lules mare mesenquimals (434). Tenint en compte aquests resultats, suggerim que l'activació de la via Wnt en RMS pot tenir efectes similars, una major diferenciació de les cèl·lules metastàtiques i de les cèl·lules iniciadores de tumor, contribuint així a la disminució de la capacitat metastàtica.

En consonància amb els resultats obtinguts mitjançant l'assaig d'invasió, un altre punt prometedor d'aquesta tesi és l'estudi de la implantació de metàstasis en RMS. La implicació de DKK-1 en l'establiment de les metàstasis ha estat prèviament estudiada (435–437). Malladi et al. descriuen que l'expressió de DKK-1 provoca un estat de quiescència a les cèl·lules canceroses, induint la infra-expressió dels lligands de les cèl·lules NK, tals com CD155 i ULBP. Aquest mecanisme els permet evadir el sistema immune i tenir l'oportunitat de formar metàstasis (435) (Figura D4). Amb la finalitat de comprovar la implicació de DKK-1 en el procés de metàstasis en RMS, es varen injectar cèl·lules de RMS a la vena de la cua de ratolins immunodeprimits i es va comptar el número de cèl·lules implantades al pulmó (teixit diana de les metàstasis). Al bloquejar DKK-1, ja sigui mitjançant shRNA com mitjançant WAY-262611, es va observar una tendència de reducció de la capacitat d'implantació de cèl·lules de RMS metastàtiques a pulmó. Tot i la reducció en la capacitat d'implantació de metàstasis observada, aquesta no és significativa, fet

que indica que són necessaris més estudis per tal de confirmar el paper de DKK-1 en la implantació de metàstasis en RMS. A més a més, l'estroma podria causar efectes compensatoris mitjançant l'expressió d'altres inhibidors de la via Wnt o inclús mitjançant la influència d'altres vies de senyalització cel·lular. Malgrat haver-hi mecanismes compensatoris, els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren una lleugera disminució de la capacitat d'implantació de metàstasis i, per tant, suggereixen que DKK-1 pot estar implicat en la implantació de les metàstasis en RMS.



**Figura D4. Imatge esquemàtica de la implicació de DKK-1 en l'establiment de les metàstasis.**

La majoria de la progènie cel·lular exposada al sistema immune mor durant els processos d'extravasació degut a l'estrès mecànic o metabòlic. No obstant, les cèl·lules canceroses latents enriquides amb Sox2/Sox9 entren en quiescència evadint així el sistema immune. Aquest subgrup de cèl·lules té una capacitat superior d'establir metàstasis ja que un cop expressen DKK-1 són capaces d'atenuar la resposta als senyals Wnt, entrant així en quiescència. Les cèl·lules quiescents infra-regulen l'expressió dels lligands de cèl·lules NK a la superfície cel·lular, evadint així la vigilància del sistema immune. Les cèl·lules latents metastàtiques que sobreviuen poden ser capaces de formar les macrometàstasis. Imatge i text adaptats de (435).

## 6. DKK-1 i supervivència en RMS: implicacions terapèutiques

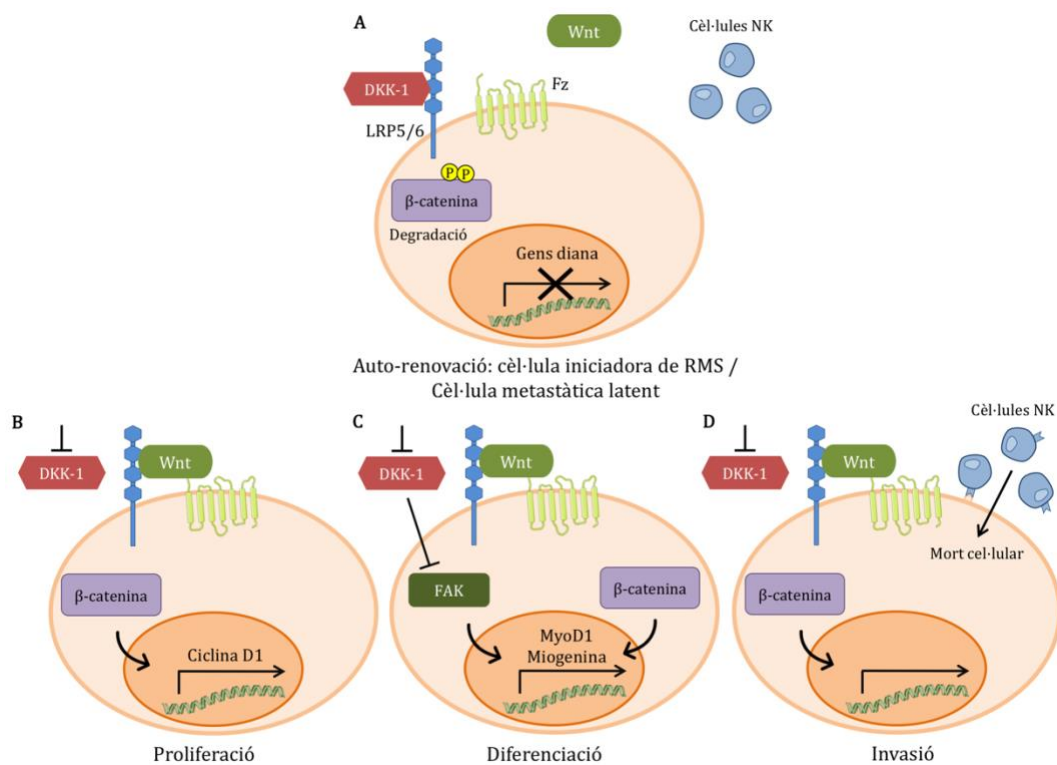
La correlació observada entre l'expressió de *DKK-1* i la supervivència dels pacients amb RMS és altament interessant per la clara implicació translacional que li aporta aquesta proteïna. L'anàlisi d'expressió de *DKK-1* en tumors de RMS va mostrar una major expressió d'aquest antagonista de la via Wnt en el subgrup de tumors metastàtics en comparació amb tumors localitzats i en el subgrup de tumors de

RMSe en comparació amb tumors de RMSa. Per a realitzar un estudi més exhaustiu, es va analitzar l'expressió de DKK-1 en dades genètiques extretes de dues bases de dades d'expressió gènica de tumors de RMS. En aquest anàlisi es va obtenir una correlació significativa entre l'expressió de DKK-1 i la mortalitat dels pacients amb RMS. És a dir, els pacients amb una elevada expressió de DKK-1 presenten una major mortalitat. Altrament, es va analitzar la correlació entre el subtipus histològic de RMS i la supervivència. Tenint en compte el subtipus histològic, els pacients amb RMSe i nivells elevats de DKK-1 presentaven una mortalitat molt superior a aquells pacients amb RMSe i baixa expressió de DKK-1 (aproximadament 5 vegades més), suggerint que DKK-1 podria ser un marcador de mal pronòstic en RMSe. Els pacients amb RMSa i elevada expressió de DKK-1 també presenten una major mortalitat en comparació als pacients amb RMSa i baixa expressió de DKK-1 (1.2 vegades més), però la diferència no és significativa. Estudis recents en altres càncers tals com càncer gàstric, mieloma múltiple, càncer de pulmó i osteosarcoma, entre altres, descriuen que l'elevada expressió de DKK-1 correlaciona amb un pitjor pronòstic dels pacients, atribuint-li un paper en la tumorigènesi i/o en la capacitat metastàtica del tumor (259,330,344,438-440).

En resum, les cèl·lules de RMS presenten una elevada expressió d'algun dels inhibidors de la via Wnt, especialment de DKK-1. La inhibició de la senyalització Wnt permet la proliferació i l'auto-renovació de les cèl·lules tumorals i imposa un estat de latència de les cèl·lules metastàtiques que els permet evadir el sistema immune i implantar-se en els òrgans diana (Figura D5-A). La implicació de DKK-1 en el bloqueig de la diferenciació miogènica i en l'establiment de les metàstasis, el posicionen com a una possible diana terapèutica en RMS. Així doncs, la inhibició de DKK-1 podria ser una bona estratègia terapèutica en RMS, ja que causa l'activació de la via Wnt i redueix l'oncogenicitat de les cèl·lules tumorals, induint la seva diferenciació. L'activació de la via redueix la proliferació de les cèl·lules de RMS, possiblement causant una petita variació del cicle cel·lular en la fase G1, tal i com indica l'acumulació de la ciclina D1 (Figura D5-B). A més a més, la inhibició de DKK-1 promou la diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS, induint l'expressió dels gens involucrats en la diferenciació miogènica i bloquejant l'expressió de FAK (Figura D5-C). L'activació de la senyalització Wnt inhibeix la

invasió cel·lular i resultats preliminars suggereixen que la inhibició de DKK-1 podria interferir en la implantació de les cèl·lules de RMS en òrgans distals (Figura D5-D).

En els pacients amb RMS que presenten una elevada expressió de DKK-1, la inhibició d'aquesta proteïna i la consegüent activació de la via Wnt, podria tenir efectes anti-proliferatius, d'inducció de la diferenciació de les cèl·lules tumorals i inclús de reducció de la capacitat metastàtica de les cèl·lules de RMS. Per tant, la inhibició de DKK-1 es posiciona com una nova possibilitat terapèutica per a millorar la supervivència d'aquells pacients amb RMS que presenten una inhibició de la via Wnt deguda a l'elevada expressió de DKK-1.



**Figura D5. Esquema general dels mecanismes oncogenics proposats per a DKK-1 en RMS. A:** Les cèl·lules de RMS presenten una elevada expressió de l'inhibidor de la via Wnt DKK-1, mecanisme responsable de la inhibició de la via Wnt. Aquesta inhibició causa tan l'auto-renovació com un estat de latència de cèl·lules metastàtiques, estat que els hi permet evadir el sistema immune (cèl·lules NK) i implantar-se en òrgans diana. **B-D:** La inhibició de DKK-1 causa l'activació de la via Wnt, acumulant  $\beta$ -catenina al citoplasma i permetent la seva translocació a nucli, on activarà els gens diana. **B:** L'activació de la via Wnt causa la reducció de la proliferació de cèl·lules de RMS degut a l'acumulació de ciclina D1 i la consegüent aturada en fase G1 del cycle cel·lular. **C:** La translocació de  $\beta$ -catenina al nucli causa també l'activació de la diferenciació miogènica de les cèl·lules de RMS, en la qual també contribueix la inhibició de FAK com a resultat de la inhibició de DKK-1. **D:** L'activació de la via Wnt causa també la reducció de la invasió cel·lular i de la implantació de metastàsis, possiblement deguda a l'atac causat per les cèl·lules NK sobre les cèl·lules que infra-exprimen DKK-1.

## VI. CONCLUSIONS





**Primera.** Les línies cel·lulars i els tumors de RMS presenten una elevada expressió d'algun dels inhibidors de la via Wnt - sFRP i DKK -, especialment de l'inhibidor DKK-1.

**Segona.** L'expressió de DKK-1 correlaciona amb una menor activació de la via Wnt en tumors de RMS.

**Tercera.** La infra-regulació genètica i la inhibició farmacològica de DKK-1 en línies cel·lulars de RMS corresponents als dos subtipus histològics, augmenten els nivells d'activació de la via Wnt.

**Quarta.** La depleció genètica i la inhibició farmacològica de DKK-1 redueixen la proliferació de les cèl·lules de RMS *in vitro*. No obstant, per si sols no són capaços de reduir el creixement tumoral *in vivo* ja que pot estar afectat per la participació de l'estroma i de mecanismes compensatoris.

**Cinquena.** Tan la infra-regulació genètica com el tractament amb l'inhibidor farmacològic de DKK-1 indueixen la diferenciació de les cèl·lules de RMS, confirmada per l'increment de MyoD i miogenina.

**Sisena.** El tractament amb WAY-262611 i la depleció genètica de DKK-1 redueixen la capacitat d'invasió de les cèl·lules de RMS *in vitro*.

**Setena.** Tan la infra-regulació genètica de DKK-1 com el tractament amb WAY-262611 redueixen la capacitat de formació de clons de les cèl·lules de RMS *in vitro*, suggerint un paper clau d'aquesta proteïna en la diferenciació de les cèl·lules iniciadores de RMS.

**Vuitena.** Resultats preliminars suggereixen que la inhibició de DKK-1 podria interferir en el procés d'implantació de les cèl·lules de RMS en òrgans distals.

**Novena.** Els pacients amb RMS i nivells elevats de DKK-1 presenten una major mortalitat, indicant un possible ús de DKK-1 com a marcador de mal pronòstic en RMS.

**Onzena.** Una teràpia basada en la inhibició de DKK-1 es posiciona com una interessant alternativa terapèutica per pacients amb RMS que presenten una sobre-expressió d'aquest inhibidor de la via Wnt. L'aplicació d'aquesta estratègia terapèutica promouria la diferenciació miogènica de les cèl·lules tumorals, inhibint la seva proliferació i capacitat invasiva, conferint doncs una millora en la supervivència d'aquest subgrup de pacients amb RMS.

## VII. BIBLIOGRAFIA



1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2018 Jul 12];127(12):2893–917. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>
2. Peris-Bonet R, Salmeron D, Martinez-Beneito MA, Galceran J, Marcos-Gragera R, Felipe S, et al. Childhood cancer incidence and survival in Spain. *Ann Oncol* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Oct 12];21(Supplement 3):iii103-iii110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427353>
3. Fernández-Plaza S, Sevilla J, Madero L. Tratamiento del cáncer en pediatría : estado actual y expectativas futuras. *Pediatr Integr* [Internet]. 2004;8(6):501–10. Available from: [http://www.sepeap.org/imagenes/secciones/Image/\\_USER\\_/Cancer\\_tratamiento\\_expectativas\(1\).pdf](http://www.sepeap.org/imagenes/secciones/Image/_USER_/Cancer_tratamiento_expectativas(1).pdf)
4. Gatta G, Zigon G, Capocaccia R, Coebergh JW, Desandes E, Kaatsch P, et al. Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Oct 12];45(6):992–1005. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804908009003>
5. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EURO CARE-5—a population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Oct 12];15(1):35–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314616>
6. Ramis R, Gómez-Barroso D, Tamayo I, García-Pérez J, Morales A, Pardo Romaguera E, et al. Spatial Analysis of Childhood Cancer: A Case/Control Study. Carpenter DO, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 20 [cited 2017 Oct 12];10(5):e0127273. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25992892>
7. Peris Bonet R. Incidencia y supervivencia del cáncer infantil. *Rev Española Pediatría* [Internet]. 2008 [cited 2017 Oct 12];64(5):342–56. Available from: <https://medes.com/publication/46412>
8. Pritchard-Jones K. Genetics of childhood cancer. *Br Med Bull* [Internet]. 1996 Oct [cited 2017 Oct 12];52(4):704–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039727>
9. Chen X, Pappo A, Dyer M. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. *Oncogene* [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 12];34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4522402/pdf/onc2014474a.pdf>
10. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer* [Internet]. 2005 Feb 14 [cited 2017 Oct 12];103(7):1457–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15712273>

11. R Peris Bonet, E Pardo Romaguera, I Ríos Martín, N Sayas Sánchez, S Valero Poveda. Registro Español de Tumores Infantiles. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980 - 2015. 2016;1-75. Available from: [http://www.uv.es/rnti/pdfs/Informe\\_RETI-SEHOP\\_1980-2015.pdf](http://www.uv.es/rnti/pdfs/Informe_RETI-SEHOP_1980-2015.pdf)
12. Berlanga P, Vicente ML, Cañete A, Alberich C, Castel V. Cancer in children and adolescents in Spain: incidence, treatment setting and provider specialty. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2016 Jan 25 [cited 2017 Sep 25];18(1):27-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108409>
13. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2010 Apr 23 [cited 2017 Oct 7];3(4):416-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490332>
14. Thway K. Pathology of Soft Tissue Sarcomas. *Clin Oncol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Oct 12];21(9):695-705. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0936655509002374>
15. C.D.M. Fletcher, K. Unni FM. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Cancer*. 2002;177(3):1365-76.
16. Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The Epidemiology of Sarcoma. *Clin Sarcoma Res* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2017 Oct 12];2(1):14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036164>
17. Ferrari A, Sultan I, Huang TT, Rodriguez-Galindo C, Shehadeh A, Meazza C, et al. Soft Tissue Sarcoma Across the Age Spectrum: A Population- Based Study from the Surveillance Epidemiology and End Results Database. 2011 [cited 2017 Oct 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4261144/pdf/nihms432582.pdf>
18. Lahat G, Lazar A, Lev D. Sarcoma Epidemiology and Etiology: Potential Environmental and Genetic Factors. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Oct 12];88(3):451-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514694>
19. Gallego S. Sarcomas de partes blandas. In: Manual práctico de hematología y oncología pediátricas. España: Ergon; 2010. p. 303-12.
20. Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones K, Shipley J. Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 1999 Dec [cited 2017 Oct 13];26(4):275-85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534762>
21. McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* [Internet]. 2003 Apr [cited 2017 Nov 20];88(4):354-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651771>

22. Sun X, Guo W, Shen JK, Mankin HJ, Hornicek FJ, Duan Z. Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 20];2015:232010. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sarcoma/2015/232010/>
23. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 1995 Aug [cited 2017 Nov 8];13(8):2123–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636557>
24. Maurer HM, Beltangady M, Gehan EA, Crist W, Hammond D, Hays DM, et al. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer* [Internet]. 1988 Jan 15 [cited 2017 Nov 7];61(2):209–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3275486>
25. Maurer HM, Gehan EA, Beltangady M, Crist W, Dickman PS, Donaldson SS, et al. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II. *Cancer* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2017 Oct 22];71(5):1904–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8448756>
26. Crist W, Gehan EA, Ragab AH, Dickman PS, Donaldson SS, Fryer C, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 1995 Mar [cited 2017 Nov 16];13(3):610–30. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1995.13.3.610>
27. 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* [Internet]. 2001 Jun 15 [cited 2017 Nov 7];19(12):3091–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408506>
28. Missiaglia E, Williamson D, Chisholm J, Wirapati P, Pierron G, Petel F, et al. *PAX3/FOXO1* Fusion Gene Status Is the Key Prognostic Molecular Marker in Rhabdomyosarcoma and Significantly Improves Current Risk Stratification. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 May 10 [cited 2017 Nov 8];30(14):1670–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454413>
29. 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* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 Nov 8];174(2):550–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010613132>
30. Dasgupta R, Rodeberg DA. Update on rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2012 Feb [cited 2017 Nov 18];21(1):68–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248972>
31. Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist* [Internet]. 1999 [cited 2017 Oct 14];4(1):34–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10337369>



32. Kralik SF, Haider KM, Lobo RR, Supakul N, Calloni SF, Soares BP. Orbital infantile hemangioma and rhabdomyosarcoma in children: differentiation using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *J AAPOS Off Publ Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* [Internet]. 2017 Nov 4 [cited 2017 Dec 29];0(0). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113884>
33. Córdoba Rovira SM, Clemente EJI. Rbdomiosarcoma infantil. *Radiologia* [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 29];58(6):481–90. Available from: [www.elsevier.es/rx](http://www.elsevier.es/rx)
34. Williams RF, Fernandez-Pineda I, Gosain A. Pediatric Sarcomas. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Nov 7];96(5):1107–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27542645>
35. Miller D V., Coffin CM, Zhou H. Rhabdomyosarcoma Arising in the Hand or Foot: A Clinicopathologic Analysis. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2004 Apr 17 [cited 2018 Oct 29];7(4):361–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383931>
36. Dantonello TM, Int-Veen C, Winkler P, Leuschner I, Schuck A, Schmidt BF, et al. Initial Patient Characteristics Can Predict Pattern and Risk of Relapse in Localized Rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jan 20 [cited 2017 Dec 27];26(3):406–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202417>
37. Kim JR, Yoon HM, Koh K-N, Jung AY, Cho YA, Lee JS. Rhabdomyosarcoma in Children and Adolescents: Patterns and Risk Factors of Distant Metastasis. *Am J Roentgenol* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Dec 27];209(2):409–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28590782>
38. Tsokos M. The role of immunocytochemistry in the diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1986 Sep [cited 2017 Nov 8];110(9):776–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3530185>
39. Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1969 Dec [cited 2017 Oct 22];43(6):1365–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5396222>
40. Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, Li FP, Malkin D. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* [Internet]. 1995 Apr 1 [cited 2017 Oct 22];95(4):1606–11. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/117834>
41. Trahair T, Andrews L, Cohn RJ. Recognition of Li Fraumeni syndrome at diagnosis of a locally advanced extremity rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 Oct 22];48(3):345–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.20795>
42. Rodjan F, Graaf P de, Brisse HJ, Verbeke JILM, Sanchez E, Galluzzi P, et al.

- Second cranio-facial malignancies in hereditary retinoblastoma survivors previously treated with radiation therapy: clinic and radiologic characteristics and survival outcomes. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 May [cited 2017 Oct 22];49(8):1939–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913000488>
43. Doros L, Yang J, Dehner L, Rossi CT, Skiver K, Jarzembowski JA, et al. DICER1 mutations in embryonal rhabdomyosarcomas from children with and without familial PPB-tumor predisposition syndrome. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Oct 22];59(3):558–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180160>
  44. Tomiak E, de Kock L, Grynspan D, Ramphal R, Foulkes WD. DICER1 mutations in an adolescent with cervical embryonal rhabdomyosarcoma (cERMS). *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Oct 22];61(3):568–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.24826>
  45. Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Nov 10 [cited 2017 Oct 22];36(11):1159–61. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1449>
  46. Kratz CP, Holter S, Etzler J, Lauten M, Pollett A, Niemeyer CM, et al. Rhabdomyosarcoma in patients with constitutional mismatch-repair-deficiency syndrome. *J Med Genet* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2017 Oct 22];46(6):418–20. Available from: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2008.064212>
  47. Samuel DP, Tsokos M, DeBaun MR. Hemihypertrophy and a poorly differentiated embryonal rhabdomyosarcoma of the pelvis. *Med Pediatr Oncol* [Internet]. 1999 Jan [cited 2017 Oct 22];32(1):38–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917751>
  48. Smith AC, Squire JA, Thorner P, Zielenska M, Shuman C, Grant R, et al. Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2001 [cited 2017 Oct 22];4(6):550–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826361>
  49. Cajaiba MM, Bale AE, Alvarez-Franco M, McNamara J, Reyes-Múgica M. Rhabdomyosarcoma, Wilms tumor, and deletion of the patched gene in Gorlin syndrome. *Nat Clin Pract Oncol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 Oct 22];3(10):575–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncponc0608>
  50. Gripp KW, Scott CI, Nicholson L, McDonald-McGinn DM, Ozeran JD, Jones MC, et al. Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. *Am J Med Genet* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2017 Oct 22];108(1):80–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857556>

51. Kratz CP, Rapisuwon S, Reed H, Hasle H, Rosenberg PS. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2017 Oct 22];157(2):83–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21500339>
52. Crucis A, Richer W, Brugières L, Bergeron C, Marie-Cardine A, Stephan J-L, et al. Rhabdomyosarcomas in children with neurofibromatosis type I: A national historical cohort. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2015 Oct [cited 2017 Oct 22];62(10):1733–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.25556>
53. Jongmans MCJ, Hoogerbrugge PM, Hilkens L, Flucke U, van der Burgt I, Noordam K, et al. Noonan syndrome, the SOS1 gene and embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. 2010 Jul [cited 2017 Oct 22];49(7):635–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20461756>
54. Ferrari A, Bisogno G, Macaluso A, Casanova M, D'Angelo P, Pierani P, et al. Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. *Cancer* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2017 Oct 22];109(7):1406–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17330850>
55. Varan A, Şen H, Aydın B, Yalçın B, Kutluk T, Akyüz C. Neurofibromatosis type 1 and malignancy in childhood. *Clin Genet* [Internet]. 2016 Mar [cited 2017 Oct 22];89(3):341–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073032>
56. Pinto N, Hawkins DS. Second Malignant Neoplasms in Rhabdomyosarcoma: Victims of Our Own Success or an Underlying Genetic Predisposition Syndrome? *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Oct 22];63(2):189–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26505490>
57. Parham DM, Barr FG. Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2017 Oct 7];20(6):387–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113309>
58. Rudzinski ER, Anderson JR, Hawkins DS, Skapek SX, Parham DM, Teot LA. The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2017 Nov 10];139(10):1281–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25989287>
59. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fourth Edition [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 10]. 468 p. Available from: <http://apps.who.int/bookorders/WHP/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&cdcol=70&codcch=4005>
60. Belyea B, Kephart JG, Blum J, Kirsch DG, Linardic CM. Embryonic signaling

- pathways and rhabdomyosarcoma: contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting. *Sarcoma* [Internet]. 2012 [cited 2017 Dec 29];2012:406239. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sarcoma/2012/406239/>
61. Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* Gene Fusions Are Prognostic Indicators in Alveolar Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2017 Nov 7];20(11):2672–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039929>
  62. Turc-Carel C, Lizard-Nacol S, Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E. Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 1986 Jan 15 [cited 2017 Oct 14];19(3–4):361–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3943053>
  63. 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* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2017 Oct 14];53(21):5108–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221646>
  64. Roma J, Masià A, Almazán-Moga A, Rebull M, Velasco P, Gallego S, et al. Translocaciones cromosómicas en los sarcomas de partes blandas: de la biología molecular a la aplicación clínica. *An Pediatría* [Internet]. 2012 Feb [cited 2017 Dec 28];76(2):103.e1-103.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075174>
  65. Shern JF, Chen L, Chmielecki J, Wei JS, Patidar R, Rosenberg M, et al. Comprehensive Genomic Analysis of Rhabdomyosarcoma Reveals a Landscape of Alterations Affecting a Common Genetic Axis in Fusion-Positive and Fusion-Negative Tumors. *Cancer Discov* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2017 Nov 17];4(2):216–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24436047>
  66. Pandey PR, Chatterjee B, Olanich ME, Khan J, Miettinen MM, Hewitt SM, et al. *PAX3-FOXO1* is essential for tumour initiation and maintenance but not recurrence in a human myoblast model of rhabdomyosarcoma. *J Pathol* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 Nov 16];241(5):626–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4867>
  67. Cao L, Yu Y, Bilke S, Walker RL, Mayeenuddin LH, Azorsa DO, et al. Genome-Wide Identification of *PAX3-FKHR* Binding Sites in Rhabdomyosarcoma Reveals Candidate Target Genes Important for Development and Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Aug 15 [cited 2017 Dec 28];70(16):6497–508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663909>
  68. Ren Y-X, Finckenstein FG, Abdueva DA, Shahbazian V, Chung B, Weinberg KI, et al. Mouse Mesenchymal Stem Cells Expressing *PAX-FKHR* Form Alveolar Rhabdomyosarcomas by Cooperating with Secondary Mutations. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Aug 15 [cited 2017 Oct 13];68(16):6587–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701482>

69. Naini S, Etheridge KT, Adam SJ, Qualman SJ, Bentley RC, Counter CM, et al. Defining the cooperative genetic changes that temporally drive alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2017 Dec 29];68(23):9583–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-6178>
70. 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* [Internet]. 2004 Aug 15 [cited 2017 Nov 10];64(16):5539–45. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-0844>
71. Sumegi J, Streblov R, Frayer RW, Dal Cin P, Rosenberg A, Meloni-Ehrig A, et al. Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to members of the nuclear receptor transcriptional coactivator family. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Nov 9];49(3):224–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.20731>
72. Barr FG, Qualman SJ, Macris MH, Melnyk N, Lawlor ER, Strzelecki DM, et al. Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Res* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2017 Nov 8];62(16):4704–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183429>
73. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès 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* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2017 Nov 10];28(13):2151–8. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.26.3814>
74. Scrabble H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Sheng WW, Soukup S, et al. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 1989 Sep [cited 2017 Oct 14];1(1):23–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2487144>
75. Münsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2018 Sep 3];9(23):2911–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498788>
76. Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ. Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2018 Aug 7];94(1):445–8. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/117344>
77. Zhu B, Davie JK. New insights into signalling-pathway alterations in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2015 Jan 20 [cited 2017 Nov

- 8];112(2):227–31. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211658>
78. Makawita S, Ho M, Durbin AD, Thorner PS, Malkin D, Somers GR. Expression of insulin-like growth factor pathway proteins in rhabdomyosarcoma: IGF-2 expression is associated with translocation-negative tumors. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2017 Nov 10];12(2):127–35. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2350/08-05-0477.1>
79. Cavazzana AO, Schmidt D, Ninfo V, Harms D, Tollot M, Carli M, et al. Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1992 Mar [cited 2017 Dec 28];16(3):229–35. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1599014>
80. Carroll SJ, Nodit L. Spindle Cell Rhabdomyosarcoma: A Brief Diagnostic Review and Differential Diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2013 Aug [cited 2017 Dec 29];137(8):1155–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899074>
81. Kumar A, Singh M, Sharma MC, Bakshi S, Sharma BS. Pediatric sclerosing rhabdomyosarcomas: a review. *ISRN Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Dec 28];2014:640195. Available from:  
<https://www.hindawi.com/archive/2014/640195/>
82. Mentzel T, Kuhnen C. Spindle cell rhabdomyosarcoma in adults: clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven new cases. *Virchows Arch* [Internet]. 2006 Nov 8 [cited 2017 Dec 28];449(5):554–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013628>
83. Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia Enhances Tumor Stemness by Increasing the Invasive and Tumorigenic Side Population Fraction. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Jul [cited 2017 Nov 9];26(7):1818–30. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467664>
84. Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I, Ziman M. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Lett* [Internet]. 2009 Jul 8 [cited 2017 Oct 13];279(2):126–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008039>
85. Huh WW, Skapek SX. Childhood Rhabdomyosarcoma: New Insight on Biology and Treatment. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2010 Nov 7 [cited 2017 Nov 9];12(6):402–10. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20820958>
86. Drummond CJ, Hanna JA, Garcia MR, Devine DJ, Heyrana AJ, Finkelstein D, et al. Hedgehog Pathway Drives Fusion-Negative Rhabdomyosarcoma Initiated From Non-myogenic Endothelial Progenitors. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Jan 8 [cited 2018 Jan 17];33(1):108–124.e5. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153561081730524X>

87. Tiffin N, Williams RD, Shipley J, Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2017 Nov 9];89(2):327–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865925>
88. Barr FG, Fitzgerald JC, Ginsberg JP, Vanella ML, Davis RJ, Bennicelli JL. Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines. *Cancer Res* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2018 Aug 7];59(21):5443–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10554014>
89. Almazán-Moga A, Roma J, Molist C, Vidal I, Jubierre L, Soriano A, et al. Optimization of rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry. *Cytometry A* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Aug 7];85(12):1020–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.22514>
90. Hettmer S, Wagers AJ. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med* [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 Oct 13];16(2):171–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20134473>
91. Pedrick TJ, Donaldson SS, Cox RS. Rhabdomyosarcoma: the Stanford experience using a TNM staging system. *J Clin Oncol* [Internet]. 1986 Mar [cited 2017 Oct 14];4(3):370–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3950676>
92. Lawrence W, Gehan EA, Hays DM, Beltangady M, Maurer HM. Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-II). *J Clin Oncol* [Internet]. 1987 Jan [cited 2017 Oct 14];5(1):46–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3543238>
93. Baruchel S, Pappo A, Krailo M, Baker KS, Wu B, Villaluna D, et al. A phase 2 trial of trabectedin in children with recurrent rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma and non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas: a report from the Children's Oncology Group. *Eur J Cancer* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Nov 10];48(4):579–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804911007647>
94. Wodarz A, Nusse R. MECHANISMS OF WNT SIGNALING IN DEVELOPMENT. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 1998 Nov [cited 2018 Jan 17];14(1):59–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9891778>
95. Koesters R, von Knebel Doeberitz M. The Wnt signaling pathway in solid childhood tumors. *Cancer Lett* [Internet]. 2003 Aug 20 [cited 2018 Jan 17];198(2):123–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957350>
96. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* [Internet]. 1982 Nov [cited 2018 Aug 7];31(1):99–109. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297757>
97. Nusse R. The int genes in mouse mammary tumorigenesis and in normal development. *Ciba Found Symp* [Internet]. 1990 [cited 2018 Aug 8];150:212-22; discussion 222-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2164908>
  98. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* [Internet]. 1984 [cited 2018 Aug 9];307(5947):131-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6318122>
  99. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* [Internet]. 1987 Aug 14 [cited 2018 Aug 7];50(4):649-57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3111720>
  100. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* [Internet]. 1991 Jan 25 [cited 2018 Aug 7];64(2):231. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1846319>
  101. McMahon AP, Moon RT. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* [Internet]. 1989 Sep 22 [cited 2018 Aug 8];58(6):1075-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673541>
  102. McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* [Internet]. 1990 Sep 21 [cited 2018 Aug 8];62(6):1073-85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205396>
  103. Thomas KR, Capecchi MR. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* [Internet]. 1990 Aug 30 [cited 2018 Aug 8];346(6287):847-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2202907>
  104. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* [Internet]. 1976 Feb [cited 2018 Aug 7];48(2):461-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/815114>
  105. Babu P. Early developmental subdivisions of the wing disk in *Drosophila*. *Mol Gen Genet* [Internet]. 1977 Mar 16 [cited 2018 Aug 7];151(3):289-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/865482>
  106. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* [Internet]. 1980 Oct 30 [cited 2018 Aug 7];287(5785):795-801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6776413>



107. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Jul [cited 2018 Jan 18];17(1):9–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580709002573>
108. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* [Internet]. 2003 May 27 [cited 2018 Aug 9];423(6938):448–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717451>
109. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, et al. Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Dev Cell* [Internet]. 2006 Dec [cited 2018 Aug 10];11(6):791–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141155>
110. Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A. Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J* [Internet]. 2007 Mar 15 [cited 2018 Sep 20];402(3):515–23. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20061476>
111. Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* [Internet]. 1996 Dec 15 [cited 2018 Aug 9];10(24):3116–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985181>
112. Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2000 Mar [cited 2018 Aug 9];25(3):111–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694878>
113. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. *Cell* [Internet]. 2006 May 5 [cited 2018 Aug 9];125(3):509–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678095>
114. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh J-C, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* [Internet]. 1996 Jul 18 [cited 2018 Aug 8];382(6588):225–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717036>
115. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2018 Aug 8];407(6803):535–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/35035124>
116. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2018 Aug 8];407(6803):530–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/35035117>

117. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, et al. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2018 Aug 8];407(6803):527–30. Available from: <http://www.nature.com/articles/35035110>
118. Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* [Internet]. 2001 Jul 5 [cited 2018 Aug 8];412(6842):86–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/35083601>
119. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2018 Sep 20];63(6):1256–72. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.63.6.1256>
120. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* [Internet]. 2004 Apr 15 [cited 2018 Jan 18];131(8):1663–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084453>
121. Hsieh J-C, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, et al. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell* [Internet]. 2003 Feb 7 [cited 2018 Aug 8];112(3):355–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581525>
122. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* [Internet]. 1989 Jun [cited 2018 Sep 27];8(6):1711–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2788574>
123. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* [Internet]. 1998 May 7 [cited 2018 Aug 8];8(10):573–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9601641>
124. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta -catenin and promotes GSK-3beta -dependent phosphorylation of beta -catenin. *EMBO J* [Internet]. 1998 Mar 2 [cited 2018 Aug 8];17(5):1371–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482734>
125. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* [Internet]. 1993 Dec 10 [cited 2018 Aug 8];262(5140):1734–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8259519>
126. Kimelman D, Xu W.  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions

- from a structural perspective. *Oncogene* [Internet]. 2006 Dec 4 [cited 2018 Jan 19];25(57):7482–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143292>
127. Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* [Internet]. 2003 Jun [cited 2018 Sep 27];11(6):1445–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820959>
128. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* [Internet]. 1996 Sep [cited 2018 Sep 27];59(1):3–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892228>
129. Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* [Internet]. 2006 Dec 4 [cited 2018 Jan 19];25(57):7492–504. Available from: <http://www.nature.com/articles/1210056>
130. Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2018 Jan 19];120(Pt 3):385–93. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.03363>
131. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2005 Apr 13 [cited 2018 Jan 19];12(4):364–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb912>
132. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* [Internet]. 2002 Apr 5 [cited 2018 Sep 19];109(1):47–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955446>
133. Parker DS, Jemison J, Cadigan KM. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* [Internet]. 2002 Jun [cited 2018 Sep 19];129(11):2565–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015286>
134. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Jun 4 [cited 2018 Aug 8];274(23):16180–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347172>
135. Hsieh J-C, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2018 Aug 8];398(6726):431–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201374>
136. Bouwmeester T, Kim S-H, Sasai Y, Lu B, Robertis EM De. Cerberus is a head-

- inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* [Internet]. 1996 Aug 15 [cited 2018 Aug 16];382(6592):595–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757128>
137. Zhang X, Abreu JG, Yokota C, MacDonald BT, Singh S, Coburn KLA, et al. Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell* [Internet]. 2012 Jun 22 [cited 2018 Aug 23];149(7):1565–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412006381>
  138. Takahashi M, Fujita M, Furukawa Y, Hamamoto R, Shimokawa T, Miwa N, et al. Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2002 Oct 15 [cited 2018 Aug 23];62(20):5651–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384519>
  139. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2018 Aug 8];238(2):301–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570958>
  140. Semenov M, Tamai K, He X. SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jul 22 [cited 2018 Aug 9];280(29):26770–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908424>
  141. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin Binds to LRP5/6 and Antagonizes Canonical Wnt Signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 May 20 [cited 2018 Aug 9];280(20):19883–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778503>
  142. Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, et al. Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* [Internet]. 2003 Sep [cited 2018 Aug 8];130(18):4295–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900447>
  143. Kagermeier-Schenk B, Wehner D, Ozhan-Kizil G, Yamamoto H, Li J, Kirchner K, et al. Waif1/5T4 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and activates noncanonical Wnt pathways by modifying LRP6 subcellular localization. *Dev Cell* [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2018 Aug 23];21(6):1129–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580711004679>
  144. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* [Internet]. 2008 Jul 4 [cited 2018 Aug 23];454(7202):345–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18528331>
  145. Furushima K, Yamamoto A, Nagano T, Shibata M, Miyachi H, Abe T, et al. Mouse homologues of Shisa antagonistic to Wnt and Fgf signalings. *Dev Biol* [Internet]. 2007 Jun 15 [cited 2018 Aug 23];306(2):480–92. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607002291>

146. Pei J, Grishin N V. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. *Cell Signal* [Internet]. 2012 Mar [cited 2018 Aug 23];24(3):758–69. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656811003573>
147. Collavin L, Kirschner MW. The secreted Frizzled-related protein Sizzled functions as a negative feedback regulator of extreme ventral mesoderm. *Development* [Internet]. 2003 Feb [cited 2018 Aug 16];130(4):805–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506010>
148. Hoang B, Moos M, Vukicevic S, Luyten FP. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Oct 18 [cited 2018 Aug 8];271(42):26131–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824257>
149. Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, et al. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Apr 1 [cited 2018 Aug 8];94(7):2859–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096311>
150. Dennis S, Aikawa M, Szeto W, d'Amore PA, Papkoff J. A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci* [Internet]. 1999 Nov [cited 2018 Aug 8];112 ( Pt 21):3815–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523516>
151. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, et al. SARP: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Dec 9 [cited 2018 Aug 16];94(25):13636–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391078>
152. Yan J, Jia H, Ma Z, Ye H, Zhou M, Su L, et al. The evolutionary analysis reveals domain fusion of proteins with Frizzled-like CRD domain. *Gene* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2018 Aug 16];533(1):229–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135643>
153. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Feb 26 [cited 2018 Jan 18];121(6):737–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18322270>
154. Patthy L. The WIF module. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2000 Jan [cited 2018 Aug 16];25(1):12–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637605>
155. Surmann-Schmitt C, Widmann N, Dietz U, Saeger B, Eitzinger N, Nakamura Y, et al. Wif-1 is expressed at cartilage-mesenchyme interfaces and impedes Wnt3a-mediated inhibition of chondrogenesis. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Oct 15 [cited 2018 Aug 23];122(Pt 20):3627–37. Available from:

- <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.048926>
156. Biben C, Stanley E, Fabri L, Kotecha S, Rhinn M, Drinkwater C, et al. Murine Cerberus Homologue mCer-1: A Candidate Anterior Patterning Molecule. *Dev Biol* [Internet]. 1998 Feb 15 [cited 2018 Aug 16];194(2):135–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501024>
  157. Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, et al. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* [Internet]. 1999 Feb 25 [cited 2018 Aug 23];397(6721):707–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067895>
  158. Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, et al. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* [Internet]. 2010 Apr 15 [cited 2018 Aug 23];464(7291):1043–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08875>
  159. Hartung N, Benary U, Wolf J, Kofahl B. Paracrine and autocrine regulation of gene expression by Wnt-inhibitor Dickkopf in wild-type and mutant hepatocytes. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2017 Dec 13 [cited 2018 Nov 9];11(1):98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29029622>
  160. Semënov M V, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* [Internet]. 2001 Jun 26 [cited 2018 Aug 9];11(12):951–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448771>
  161. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* [Internet]. 2001 May 17 [cited 2018 Oct 15];411(6835):321–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357136>
  162. Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, Zuniga A, Bock D, Poustka A, et al. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev* [Internet]. 1999 Sep [cited 2018 Aug 10];87(1–2):45–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10495270>
  163. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* [Internet]. 1998 Jan 22 [cited 2018 Jan 24];391(6665):357–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450748>
  164. Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, et al. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Jul 2 [cited 2018 Jan 24];274(27):19465–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383463>
  165. MacDonald BT, Adamska M, Meisler MH. Hypomorphic expression of Dkk1 in

- the doubleridge mouse: dose dependence and compensatory interactions with Lrp6. *Development* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2018 Aug 10];131(11):2543–52. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01126>
166. Grotewold L, Theil T, R  ther U. Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development. *Mech Dev* [Internet]. 1999 Dec [cited 2018 Jan 24];89(1–2):151–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559490>
167. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, et al. Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Aug 10];1(3):423–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702953>
168. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2018 Aug 8];3(7):683–6. Available from: [http://www.nature.com/articles/ncb0701\\_683](http://www.nature.com/articles/ncb0701_683)
169. Sem  nov M V, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2018 Jan 23];283(31):21427–32. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M800014200>
170. Matoba K, Mihara E, Tamura-Kawakami K, Miyazaki N, Maeda S, Hirai H, et al. Conformational Freedom of the LRP6 Ectodomain Is Regulated by N-glycosylation and the Binding of the Wnt Antagonist Dkk1. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Jan 3 [cited 2018 Sep 4];18(1):32–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716317077>
171. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature* [Internet]. 2002 Jun 26 [cited 2018 Jan 23];417(6889):664–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050670>
172. Caneparo L, Huang Y-L, Staudt N, Tada M, Ahrendt R, Kazanskaya O, et al. Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2018 Sep 4];21(4):465–80. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.406007>
173. Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol* [Internet]. 2000 [cited 2018 Aug 10];10(24):1611–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137016>
174. Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* [Internet]. 2003 Jan 2 [cited 2018 Aug 8];302(1–2):179–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527209>

175. Pinho S, Niehrs C. Dkk3 is required for TGF- $\beta$  signaling during *Xenopus* mesoderm induction. *Differentiation* [Internet]. 2007 Dec [cited 2018 Aug 23];75(10):957–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490412>
176. Lintern KB, Guidato S, Rowe A, Saldanha JW, Itasaki N. Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Aug 21 [cited 2018 Aug 23];284(34):23159–68. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.025478>
177. Guidato S, Itasaki N. Wise retained in the endoplasmic reticulum inhibits Wnt signaling by reducing cell surface LRP6. *Dev Biol* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2018 Aug 23];310(2):250–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160607012274>
178. Li Y, Chen J, Lu W, McCormick LM, Wang J, Bu G. Mesd binds to mature LDL-receptor-related protein-6 and antagonizes ligand binding. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Oct 25 [cited 2018 Aug 22];118(22):5305–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263759>
179. Li Y, Lu W, He X, Bu G. Modulation of LRP6-mediated Wnt signaling by molecular chaperone Mesd. *FEBS Lett* [Internet]. 2006 Oct 2 [cited 2018 Aug 22];580(22):5423–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16989816>
180. Lu W, Liu C-C, Thottassery J V., Bu G, Li Y. Mesd Is a Universal Inhibitor of Wnt Coreceptors LRP5 and LRP6 and Blocks Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Cancer Cells. *Biochemistry* [Internet]. 2010 Jun 8 [cited 2018 Aug 22];49(22):4635–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20446724>
181. Lin C, Lu W, Zhang W, Londoño-Joshi AI, Buchsbaum DJ, Bu G, et al. The C-Terminal Region Mesd Peptide Mimics Full-Length Mesd and Acts as an Inhibitor of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Cancer Cells. El-Rifai W, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 28 [cited 2018 Sep 7];8(2):e58102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469146>
182. Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa Promotes Head Formation through the Inhibition of Receptor Protein Maturation for the Caudalizing Factors, Wnt and FGF. *Cell* [Internet]. 2005 Jan 28 [cited 2018 Jan 18];120(2):223–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680328>
183. Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann M, et al. Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat Genet* [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2018 Aug 23];5(4):376–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8298646>
184. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and



- Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2018 Jan 18];116(6):883–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035989>
185. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* [Internet]. 2004 Oct [cited 2018 Jan 18];7(4):525–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580704002813>
  186. Nam J-S, Turcotte TJ, Smith PF, Choi S, Yoon JK. Mouse Cristin/R-spondin Family Proteins Are Novel Ligands for the Frizzled 8 and LRP6 Receptors and Activate  $\beta$ -Catenin-dependent Gene Expression. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 May 12 [cited 2018 Aug 8];281(19):13247–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543246>
  187. Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, Mucenski ML, Scott WJ, Whitsett JA. R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* [Internet]. 2008 Mar 6 [cited 2018 Jan 18];135(6):1049–58. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.013359>
  188. Binnerts ME, Kim K-A, Bright JM, Patel SM, Tran K, Zhou M, et al. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Sep 11 [cited 2018 Aug 23];104(37):14700–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702305104>
  189. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang Y-L, Kazanskaya O, Ingelfinger D, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* [Internet]. 2011 Sep 30 [cited 2018 Aug 22];12(10):1055–61. Available from: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2011.175>
  190. Hao H-X, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* [Internet]. 2012 Apr 29 [cited 2018 Aug 23];485(7397):195–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575959>
  191. Lebensohn AM, Rohatgi R. R-spondins can potentiate WNT signaling without LGRs. *Elife* [Internet]. 2018 Feb 6 [cited 2018 Aug 22];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29405118>
  192. Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, Bosso-Lefèvre C, Khatoor M, Thi Tran H, et al. RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. *Nature* [Internet]. 2018 May 16 [cited 2018 Aug 22];557(7706):564–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29769720>
  193. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2018 Aug 8];16(9):1066–76. Available from:

- <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.230302>
194. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* [Internet]. 1996 Jun 15 [cited 2018 Aug 8];10(12):1443–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666229>
  195. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2018 Aug 8];16(13):3797–804. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/16.13.3797>
  196. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* [Internet]. 2007 May 18 [cited 2018 Jan 19];316(5827):1043–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science/1141515>
  197. Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer H-J, Huelsken J, et al. The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2018 Jan 19];16(16):2073–84. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.230402>
  198. Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S. Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Jul 23 [cited 2018 Aug 8];274(30):21464–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10409711>
  199. Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R. The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* [Internet]. 1995 May 1 [cited 2018 Aug 8];9(9):1087–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744250>
  200. Wong H-C, Bourdelas A, Krauss A, Lee H-J, Shao Y, Wu D, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* [Internet]. 2003 Nov [cited 2018 Aug 8];12(5):1251–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636582>
  201. Sun T-Q, Lu B, Feng J-J, Reinhard C, Jan YN, Fantl WJ, et al. PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2018 Aug 8];3(7):628–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433294>
  202. Miller JR, Moon RT. Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J Cell Biol* [Internet]. 1997 Oct 6 [cited 2018 Aug 8];139(1):229–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314542>

203. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, et al. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* [Internet]. 1998 Oct 8 [cited 2018 Aug 8];395(6702):604–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/26982>
204. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev* [Internet]. 1999 Sep 1 [cited 2018 Aug 8];13(17):2218–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485845>
205. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* [Internet]. 1996 Aug 15 [cited 2018 Aug 8];382(6592):638–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757136>
206. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* [Internet]. 1998 Sep 4 [cited 2018 Aug 10];281(5382):1509–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727977>
207. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2018 Aug 10];398(6726):422–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/18884>
208. Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Chan V, Jefferson AB, Guo L, et al. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/  $\beta$ -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001 Dec 18 [cited 2018 Aug 10];98(26):14973–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752446>
209. Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, et al. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Aug 10];154(2):515–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010652972>
210. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Feb 16 [cited 2018 Aug 10];96(4):1603–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990071>
211. Roma J, Almazán-Moga A, Sánchez de Toledo J, Gallego S. Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network. *Sarcoma* [Internet]. 2012 [cited 2018 Jan 19];2012:695603. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sarcoma/2012/695603/>
212. Piters E, Boudin E, Van Hul W. Wnt signaling: A win for bone. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2018 Oct 16];473(2):112–6.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364235>

213. Merkel CE, Karner CM, Carroll TJ. Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2007 Sep 28 [cited 2018 Oct 16];22(11):1825–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554566>
214. Fuentes JJ, Genescà L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Pérez-Riba M, Estivill X, et al. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2018 Aug 14];9(11):1681–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861295>
215. Christian JL, Gavin BJ, McMahon AP, Moon RT. Isolation of cDNAs partially encoding four *Xenopus* Wnt-1/int-1-related proteins and characterization of their transient expression during embryonic development. *Dev Biol* [Internet]. 1991 Feb [cited 2018 Aug 14];143(2):230–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991549>
216. Moon RT. In pursuit of the functions of the Wnt family of developmental regulators: Insights from *Xenopus laevis*. *BioEssays* [Internet]. 1993 Feb [cited 2018 Aug 14];15(2):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471061>
217. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT. Modulation of Embryonic Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2018 Aug 14];182(1):114–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9073455>
218. Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* [Internet]. 2010 Dec [cited 2018 Aug 14];90(4):243–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21181886>
219. Green JL, Kuntz SG, Sternberg PW. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2018 Aug 22];18(11):536–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848778>
220. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* [Internet]. 1998 Jul 10 [cited 2018 Aug 14];94(1):109–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674432>
221. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* [Internet]. 2001 Dec 28 [cited 2018 Aug 14];107(7):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779461>
222. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* [Internet]. 1996 May 1 [cited 2018

- Aug 14];15(9):2208–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641286>
223. Minden A, Lin A, Smeal T, Dérijard B, Cobb M, Davis R, et al. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1994 Oct [cited 2018 Aug 14];14(10):6683–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935387>
224. Weber U, Paricio N, Mlodzik M. Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Development* [Internet]. 2000 Aug [cited 2018 Aug 14];127(16):3619–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903185>
225. Wong LL, Adler PN. Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1993 Oct [cited 2018 Oct 15];123(1):209–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408199>
226. Seifert JRK, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2007 Feb [cited 2018 Aug 16];8(2):126–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230199>
227. Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang H. Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* [Internet]. 2002 Dec 6 [cited 2018 Aug 14];298(5600):2006–10. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1073776>
228. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* [Internet]. 1999 Jul 1 [cited 2018 Aug 14];9(13):695–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395542>
229. Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* [Internet]. 2003 May 26 [cited 2018 Aug 14];161(4):769–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771126>
230. Schlessinger K, McManus EJ, Hall A. Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol* [Internet]. 2007 Jul 30 [cited 2018 Aug 14];178(3):355–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646398>
231. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* [Internet]. 2002 May 16 [cited 2018 Aug 14];417(6886):295–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015605>
232. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2018 Aug 14];5(6):472–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928679>

233. Rao A, Luo C, Hogan PG. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1997 Apr [cited 2018 Aug 14];15(1):707–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143705>
234. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Aug 14];23(1):131–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482967>
235. Kuroda K, Kuang S, Taketo MM, Rudnicki MA. Canonical Wnt signaling induces BMP-4 to specify slow myofibrogenesis of fetal myoblasts. *Skelet Muscle* [Internet]. 2013 Mar 5 [cited 2018 Sep 27];3(1):5. Available from: <http://skeletalmusclejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2044-5040-3-5>
236. Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2008 Jan 10 [cited 2018 Aug 31];2(1):50–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590907002238>
237. Ridgeway AG, Petropoulos H, Wilton S, Skerjanc IS. Wnt Signaling Regulates the Function of MyoD and Myogenin. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Oct 20 [cited 2018 Aug 10];275(42):32398–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915791>
238. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* [Internet]. 1993 Aug 5 [cited 2017 Oct 7];364(6437):501–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393145>
239. Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold H-H, Klein WH, et al. Myogenin's Functions Do Not Overlap with Those of MyoD or Myf-5 during Mouse Embryogenesis. *Dev Biol* [Internet]. 1995 Nov [cited 2018 Aug 31];172(1):37–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589813>
240. Kim C-H, Neiswender H, Baik EJ, Xiong WC, Mei L.  $\beta$ -Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2018 Aug 10];28(9):2941–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316399>
241. Cossu G, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Buffa V, Sonnino C, et al. Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2000 [cited 2018 Aug 31];44(6):699–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11061434>
242. Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*

- [Internet]. 2002 Sep [cited 2018 Aug 31];3(3):397–409. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361602>
243. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* [Internet]. 1961 Feb [cited 2018 Aug 31];9:493–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13768451>
244. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, et al. Integrated Functions of Pax3 and Pax7 in the Regulation of Proliferation, Cell Size and Myogenic Differentiation. Herman C, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Feb 16 [cited 2018 Sep 27];4(2):e4475. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221588>
245. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jan 4 [cited 2018 Sep 3];120(1):11–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051632>
246. Otto A, Schmidt C, Patel K. Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo. *Anat Embryol (Berl)* [Internet]. 2006 Aug 28 [cited 2018 Sep 3];211(4):293–310. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-006-0083-3>
247. Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, et al. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* [Internet]. 1998 Nov [cited 2018 Aug 30];125(21):4155–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753670>
248. Borello U, Berarducci B, Murphy P, Bajard L, Buffa V, Piccolo S, et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2018 Sep 3];133(18):3723–32. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02517>
249. Brunelli S, Relaix F, Baesso S, Buckingham M, Cossu G. Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev Biol* [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2018 Sep 3];304(2):604–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275805>
250. Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2018 Aug 31];16(4–5):575–84. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952105000856>
251. Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G, Bader CR. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* [Internet]. 1996 Mar [cited 2018 Aug 31];60(1):47–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8935928>

252. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 31 [cited 2018 Aug 31];75(7):1351–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269513>
253. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esuimi E, Li S, Nonaka I, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* [Internet]. 1993 Aug 5 [cited 2018 Aug 31];364(6437):532–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393146>
254. Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scimè A, Rudnicki MA. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2009 Jun 5 [cited 2018 Sep 4];4(6):535–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590909001489>
255. Rochat A, Fernandez A, Vandromme M, Molès J-P, Bouschet T, Carnac G, et al. Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2004 Oct [cited 2018 Sep 4];15(10):4544–55. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e03-11-0816>
256. van der Velden JLJ, Langen RCJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW, Schols AMWJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2006 Feb [cited 2018 Sep 4];290(2):C453–62. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00068.2005>
257. Han XH, Jin Y-R, Seto M, Yoon JK. A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Mar 25 [cited 2018 Sep 4];286(12):10649–59. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.169391>
258. Bernardi H, Gay S, Fedon Y, Vernus B, Bonnieu A, Bacou F. Wnt4 activates the canonical  $\beta$ -catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2011 May [cited 2018 Sep 3];300(5):C1122–38. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00214.2010>
259. Liu J-T, Guo W-B, Sun J-Y. Serum Dickkopf-1 acts as a new biomarker in human breast cancer. *Minerva Med* [Internet]. 2017 Aug [cited 2018 Sep 5];108(4):334–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28248066>
260. Pishvaian MJ, Byers SW. Biomarkers of WNT signaling. *Cancer Biomark* [Internet]. 2007 [cited 2018 Oct 30];3(4–5):263–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917155>
261. Fodde R, Khan PM. Genotype-phenotype correlations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 1995 [cited 2018 Aug 10];6(3–6):291–303. Available from:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012588>
262. Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Aug 10];9(1):15–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072352>
  263. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2003 Jun 5 [cited 2018 Sep 25];1653(1):1–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X03000052>
  264. Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, et al.  $\beta$ -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Mod Pathol* [Internet]. 2011 Feb 12 [cited 2018 Aug 16];24(2):209–31. Available from: <http://www.nature.com/articles/modpathol2010205>
  265. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2018 Sep 25];24(3):245–50. Available from: [http://www.nature.com/articles/ng0300\\_245](http://www.nature.com/articles/ng0300_245)
  266. Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Jul 15 [cited 2018 Aug 10];56(14):3320–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8764128>
  267. Yang A, Sisson R, Gupta A, Tiao G, Geller JI. Germline *APC* mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2018 Apr [cited 2018 Aug 10];65(4):e26892. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251405>
  268. Udatsu Y, Kusafuka T, Kuroda S, Miao J, Okada A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Aug 10];17(7):508–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11666046>
  269. Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* [Internet]. 2000 Nov 15 [cited 2018 Aug 10];60(22):6288–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11103785>
  270. Tanaka Y, Kato K, Notohara K, Nakatani Y, Miyake T, Ijiri R, et al. Significance of aberrant (cytoplasmic/nuclear) expression of beta-catenin in pancreatoblastoma. *J Pathol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2018 Aug 10];199(2):185–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533831>
  271. Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, et al. APC Mutations in Sporadic Medulloblastomas. *Am J Pathol* [Internet]. 2000 Feb [cited 2018 Aug 10];156(2):433–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666372>
272. Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2018 Aug 10];59(4):333–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759189>
  273. Staal FJT, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2018 Aug 16];8(8):581–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617885>
  274. Perry AS, O’Hurley G, Raheem OA, Brennan K, Wong S, O’Grady A, et al. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2013 Apr 15 [cited 2018 Aug 16];132(8):1771–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915211>
  275. García-Tobilla P, Solórzano SR, Salido-Guadarrama I, González-Covarrubias V, Morales-Montor G, Díaz-Otañez CE, et al. SFRP1 repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms. *Gene* [Internet]. 2016 Nov 30 [cited 2018 Aug 16];593(2):292–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27570179>
  276. Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2008 Mar 19 [cited 2018 Aug 16];98(6):1147–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283316>
  277. Kardum V, Karin V, Glibo M, Skrtic A, Martic TN, Ibisevic N, et al. Methylation-associated silencing of SFRP1 gene in high-grade serous ovarian carcinomas. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Aug 16];31:45–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29146058>
  278. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2002 Jun 6 [cited 2018 Aug 16];31(2):141–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992124>
  279. Qi J, Zhu Y-Q, Luo J, Tao W-H, Zhang J-M. [Hypermethylation and regulation of expression of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* [Internet]. 2007 Nov [cited 2018 Aug 16];29(11):842–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18396643>
  280. Rawson JB, Manno M, Mrkonjic M, Daftary D, Dicks E, Buchanan DD, et al. Promoter methylation of Wnt antagonists *DKK1* and *SFRP1* is associated with opposing tumor subtypes in two large populations of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* [Internet]. 2011 May [cited 2018 Aug 17];32(5):741–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304055>
281. Guo C-C, Zhang X-L, Yang B, Geng J, Peng B, Zheng J-H. Decreased expression of Dkk1 and Dkk3 in human clear cell renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* [Internet]. 2014 Jun [cited 2018 Sep 5];9(6):2367–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676838>
  282. Liang L, He H, Lv R, Zhang M, Huang H, An Z, et al. Preliminary mechanism on the methylation modification of Dkk-1 and Dkk-3 in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol* [Internet]. 2015 Feb 26 [cited 2018 Sep 5];36(2):1245–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344678>
  283. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, et al. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* [Internet]. 2007 Dec [cited 2018 Aug 23];28(12):2459–66. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgm178>
  284. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. Wnt Inhibitory Factor-1 Is Silenced by Promoter Hypermethylation in Human Lung Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Jul 15 [cited 2018 Sep 6];64(14):4717–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256437>
  285. Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I, Saadallah-Kallel A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, et al. Downregulation of WIF-1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma: clinical significance. *Tumor Biol* [Internet]. 2014 Aug 16 [cited 2018 Sep 6];35(8):7975–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833087>
  286. Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, Schüffler PJ, Hartmann A, Knüchel R, et al. Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2018 Sep 5];9(1):217. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19570204>
  287. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Kawamoto K, Hirata H, et al. Combination Analysis of Hypermethylated Wnt-Antagonist Family Genes as a Novel Epigenetic Biomarker Panel for Bladder Cancer Detection. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2018 Sep 6];12(7):2109–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609023>
  288. Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2018 Sep 6];19(1):117–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408931>
  289. Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, et al. Decreased Expression of REIC/Dkk-3 in Human Renal Clear Cell Carcinoma. *J Urol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2018 Sep 6];171(3):1314–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14767340>

290. Yang B, Du Z, Gao Y-T, Lou C, Zhang S-G, Bai T, et al. Methylation of Dickkopf-3 as a prognostic factor in cirrhosis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Feb 14 [cited 2018 Sep 5];16(6):755–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135726>
291. Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Nagahara T, Iwamuro M, et al. Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent for pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2016 Aug 29 [cited 2018 Sep 6];23(8):278–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468808>
292. Han W, Liu J. Epigenetic silencing of the Wnt antagonist APCDD1 by promoter DNA hyper-methylation contributes to osteosarcoma cell invasion and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Sep 9 [cited 2018 Aug 23];491(1):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28698141>
293. Sebastian A, Hum N, Hudson B, Loots G. Cancer–Osteoblast Interaction Reduces Sost Expression in Osteoblasts and Up-Regulates lncRNA MALAT1 in Prostate Cancer. *Microarrays* [Internet]. 2015 Oct 29 [cited 2018 Sep 7];4(4):503–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27600237>
294. Liu L, Wu S, Yang Y, Cai J, Zhu X, Wu J, et al. SOSTDC1 is down-regulated in non-small cell lung cancer and contributes to cancer cell proliferation. *Cell Biosci* [Internet]. 2016 Dec 14 [cited 2018 Sep 7];6(1):24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087917>
295. Ma J, Lu W, Chen D, Xu B, Li Y. Role of Wnt Co-Receptor LRP6 in Triple Negative Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *J Cell Biochem* [Internet]. 2017 Sep [cited 2018 Sep 7];118(9):2968–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28247948>
296. Wang H, Wang X, Hu R, Yang W, Liao A, Zhao C, et al. Methylation of SFRP5 is related to multidrug resistance in leukemia cells. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2014 Feb 17 [cited 2018 Aug 16];21(2):83–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434572>
297. Xu C, Shen J, Shen S, Fu H, Zhu Y, Chen L. [The significance of methylation status of secreted frizzled-related protein gene promoter in acute leukemia]. *Zhonghua nei ke za zhi* [Internet]. 2010 Sep [cited 2018 Aug 16];49(9):769–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092449>
298. Shen J-Z, Xu C-B, Fu H-Y, Wu D-S, Zhou H-R, Fan L-P. Methylation of secreted frizzled related protein gene in acute leukemia patients in China. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2011 [cited 2018 Aug 16];12(10):2617–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320963>
299. Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, et al. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2018 Aug 16];142(5):745–53. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18537968>
300. Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, Smith CA, Taylor MD, Rutka JT. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene* [Internet]. 2010 May 8 [cited 2018 Aug 16];29(20):3017–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208569>
  301. Li Z, Xu Z, Xie Q, Gao W, Xie J, Zhou L. miR-1303 promotes the proliferation of neuroblastoma cell SH-SY5Y by targeting GSK3 $\beta$  and SFRP1. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2016 Oct [cited 2018 Aug 17];83:508–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434867>
  302. Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, Shimada M, Fukagawa S, Tsuboi K, et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2018 Sep 4];138(5):624–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17686056>
  303. Griffiths EA, Gore SD, Hooker C, McDevitt MA, Karp JE, Smith BD, et al. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2010 Sep 26 [cited 2018 Sep 4];51(9):1711–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795789>
  304. Hou H-A, Kuo Y-Y, Liu C-Y, Lee MC, Tang J-L, Chen C-Y, et al. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* [Internet]. 2011 Dec 17 [cited 2018 Sep 4];105(12):1927–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095226>
  305. Pamuk GE, Uyanik MS, Pamuk ON, Maden M, Tapan U. Decreased dickkopf-1 levels in chronic lymphocytic leukemia and increased osteopontin levels in non-Hodgkin's lymphoma at initial diagnosis: Could they be playing roles in pathogenesis? *Hematology* [Internet]. 2015 Jun [cited 2018 Sep 5];20(5):267–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271869>
  306. Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kühne T, Goodyer CG, et al. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* [Internet]. 2003 Mar [cited 2018 Aug 10];83(3):429–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649343>
  307. Vibhakar R, Foltz G, Yoon J, Field L, Lee H, Ryu G, et al. Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma1. *Neuro Oncol* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2018 Sep 4];9(2):135–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329407>
  308. Valdora F, Banelli B, Stigliani S, Pfister S, Moretti S, Kool M, et al. Epigenetic Silencing of DKK3 in Medulloblastoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Apr 8

- [cited 2018 Sep 4];14(4):7492–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567267>
309. Koppen A, Ait-Aissa R, Koster J, Øra I, Bras J, van Sluis PG, et al. Dickkopf-3 expression is a marker for neuroblastic tumor maturation and is down-regulated by MYCN. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Dec 4 [cited 2018 Sep 5];122(7):1455–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059033>
310. Koppen A, Ait-Aissa R, Hopman S, Koster J, Haneveld F, Versteeg R, et al. Dickkopf-1 is down-regulated by MYCN and inhibits neuroblastoma cell proliferation. *Cancer Lett* [Internet]. 2007 Oct 28 [cited 2018 Sep 4];256(2):218–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643814>
311. De Brouwer S, Mestdagh P, Lambertz I, Pattyn F, De Paepe A, Westermann F, et al. Dickkopf-3 is regulated by the MYCN-induced miR-17-92 cluster in neuroblastoma. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2018 Sep 5];130(11):2591–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796614>
312. Kansara M, Tsang M, Kodjabachian L, Sims NA, Trivett MK, Ehrich M, et al. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2018 Aug 23];119(4):837–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307728>
313. Rubin EM, Guo Y, Tu K, Xie J, Zi X, Hoang BH. Wnt Inhibitory Factor 1 Decreases Tumorigenesis and Metastasis in Osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2018 Sep 6];9(3):731–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197388>
314. Chim CS, Fung TK, Wong KF, Lau JS, Liang R. Infrequent Wnt inhibitory factor-1 (Wif-1) methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* [Internet]. 2006 Sep [cited 2018 Aug 23];30(9):1135–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427695>
315. Xu M-M, Yang Y-L, Geng Y-H, Li J, Ma Y, Zhang F, et al. [Methylation Status and mRNA Expression of DKK-3 and WIF-1 in Acute Myeloid Leukemia Patients]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* [Internet]. 2017 Oct [cited 2018 Sep 6];25(5):1314–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29070101>
316. Zhang J, Zhou B, Liu Y, Chen K, Bao P, Wang Y, et al. Wnt inhibitory factor-1 functions as a tumor suppressor through modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* [Internet]. 2014 Jun 28 [cited 2018 Sep 6];348(1–2):12–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561119>
317. Wu T, Wang L-N, Tang D-R, Sun F-Y. SOST silencing promotes proliferation and invasion and reduces apoptosis of retinoblastoma cells by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Gene Ther* [Internet]. 2017 Jul 15 [cited

- 2018 Sep 7];24(7):399–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28485721>
318. Zou J, Zhang W, Li X-L. Effects of SOST Gene Silencing on Proliferation, Apoptosis, Invasion, and Migration of Human Osteosarcoma Cells Through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2017 Jun 28 [cited 2018 Sep 7];100(6):551–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28246931>
319. Joesting MS, Perrin S, Elenbaas B, Fawell SE, Rubin JS, Franco OE, et al. Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Nov 15 [cited 2018 Aug 22];65(22):10423–30. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-0824>
320. Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, et al. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2018 Aug 17];201(2):204–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517837>
321. Sandsmark E, Andersen MK, Bofin AM, Bertilsson H, Drabløs F, Bathen TF, et al. SFRP4 gene expression is increased in aggressive prostate cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 27 [cited 2018 Aug 17];7(1):14276. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29079735>
322. Qu Y, Ray PS, Li J, Cai Q, Bagaria SP, Moran C, et al. High levels of secreted frizzled-related protein 1 correlate with poor prognosis and promote tumourigenesis in gastric cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 Nov [cited 2018 Aug 17];49(17):3718–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927957>
323. Lin H, Yang G, Ding B, Zhang M, Zhang M, Yan F, et al. Secreted frizzled-related protein 1 overexpression in gastric cancer: Relationship with radiological findings of dual-energy spectral CT and PET-CT. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 7 [cited 2018 Aug 17];7(1):42020. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28169332>
324. Hirata H, Hinoda Y, Ueno K, Majid S, Saini S, Dahiya R. Role of Secreted Frizzled-Related Protein 3 in Human Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2018 Aug 16];70(5):1896–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160027>
325. Saini S, Liu J, Yamamura S, Majid S, Kawakami K, Hirata H, et al. Functional Significance of Secreted Frizzled-Related Protein 1 in Metastatic Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2018 Aug 17];69(17):6815–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723665>
326. Yamamura S, Kawakami K, Hirata H, Ueno K, Saini S, Majid S, et al. Oncogenic Functions of Secreted Frizzled-Related Protein 2 in Human Renal Cancer.

- Mol Cancer Ther [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2018 Aug 16];9(6):1680–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501806>
327. Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2018 Aug 22];106(9):3160–5. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-12-4940>
328. Xiao X, Xiao Y, Wen R, Zhang Y, Li X, Wang H, et al. Promoting roles of the secreted frizzled-related protein 2 as a Wnt agonist in lung cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2015 Nov [cited 2018 Aug 17];34(5):2259–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26323494>
329. Zhuang G-F, Tan Y, Zeng J-T, Zhang J-W, Tang J, Zeng S-P, et al. Expression of serum Dickkopf-1 in gastric cancer patients. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2018 Sep 5];8(10):870–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522305>
330. Hong SA, Yoo SH, Lee HH, Sun DS, Won HS, Kim O, et al. Prognostic value of Dickkopf-1 and  $\beta$ -catenin expression in advanced gastric cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Dec 2 [cited 2018 Sep 5];18(1):506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29720122>
331. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Dec 25 [cited 2018 Aug 10];349(26):2483–94. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa030847>
332. Sato N, Yamabuki T, Takano A, Koinuma J, Aragaki M, Masuda K, et al. Wnt Inhibitor Dickkopf-1 as a Target for Passive Cancer Immunotherapy. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2018 Sep 5];70(13):5326–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551066>
333. Désert R, Mebarki S, Desille M, Sicard M, Lavergne E, Renaud S, et al. “Fibrous nests” in human hepatocellular carcinoma express a Wnt-induced gene signature associated with poor clinical outcome. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Sep 4];81(Pt A):195–207. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272516302345>
334. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, Doriath V, Body JJ, Clézardin P, et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* [Internet]. 2007 Oct 8 [cited 2018 Aug 10];97(7):964–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/6603959>
335. Rachner TD, Thiele S, Göbel A, Browne A, Fuessel S, Erdmann K, et al. High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 2014 Dec 2 [cited 2018 Sep 4];14(1):649. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182503>



336. Pei Y, Yao Q, Yuan S, Xie B, Liu Y, Ye C, et al. GATA4 promotes hepatoblastoma cell proliferation by altering expression of miR125b and DKK3. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Nov 22 [cited 2018 Sep 5];7(47):77890–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27788486>
337. Xu W, Pang K, Zhou Z-G, Chen Y-F, Mo T, Li M, et al. Dickkopf 2 promotes proliferation and invasion via Wnt signaling in prostate cancer. *Mol Med Rep* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 Sep 5];14(3):2283–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27431620>
338. Zenzmaier C, Heitz M, Klocker H, Buck M, Gardiner RA, Berger P. Elevated levels of Dickkopf-related protein 3 in seminal plasma of prostate cancer patients. *J Transl Med* [Internet]. 2011 Nov 10 [cited 2018 Sep 5];9(1):193. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071168>
339. Brunetti G, Oranger A, Mori G, Specchia G, Rinaldi E, Curci P, et al. Sclerostin is overexpressed by plasma cells from multiple myeloma patients. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2011 Nov [cited 2018 Sep 7];1237(1):19–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082361>
340. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J* [Internet]. 2011 Jun 24 [cited 2018 Sep 7];1(6):e27–e27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829171>
341. Techavichit P, Gao Y, Kurenbekova L, Shuck R, Donehower LA, Yustein JT. Secreted Frizzled-Related Protein 2 (sFRP2) promotes osteosarcoma invasion and metastatic potential. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Dec 8 [cited 2018 Aug 17];16(1):869. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27821163>
342. Kephart JJG, Tiller RGJ, Crose LES, Slemmons KK, Chen P-H, Hinson AR, et al. Secreted Frizzled-Related Protein 3 (SFRP3) Is Required for Tumorigenesis of PAX3-FOXO1-Positive Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2018 Aug 30];21(21):4868–80. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1797>
343. Lee N, Smolarz AJ, Olson S, David O, Reiser J, Kutner R, et al. A potential role for Dkk-1 in the pathogenesis of osteosarcoma predicts novel diagnostic and treatment strategies. *Br J Cancer* [Internet]. 2007 Dec 6 [cited 2018 Sep 4];97(11):1552–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987039>
344. Goldstein SD, Trucco M, Guzman WB, Hayashi M, Loeb DM. A monoclonal antibody against the Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 inhibits osteosarcoma metastasis in a preclinical model. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Apr 19 [cited 2018 Sep 21];7(16):21114–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049730>
345. Granchi D, Corrias MV, Garaventa A, Baglio SR, Cangemi G, Carlini B, et al. Neuroblastoma and bone metastases: Clinical significance and prognostic

- value of Dickkopf 1 plasma levels. *Bone* [Internet]. 2011 Jan [cited 2018 Sep 4];48(1):152–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603237>
346. Hauer K, Calzada-Wack J, Steiger K, Grunewald TGP, Baumhoer D, Plehm S, et al. DKK2 Mediates Osteolysis, Invasiveness, and Metastatic Spread in Ewing Sarcoma. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Jan 15 [cited 2018 Sep 6];73(2):967–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204234>
347. Pukrop T, Binder C. The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2008 Mar 19 [cited 2018 Aug 16];86(3):259–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00109-007-0266-2>
348. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2002 Apr [cited 2018 Aug 16];1(3):279–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086864>
349. Hirano H, Yonezawa H, Yunoue S, Habu M, Uchida H, Yoshioka T, et al. Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2014 Apr 9 [cited 2018 Aug 16];31(2):85–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10014-013-0153-1>
350. Huang T, Alvarez AA, Pangeni RP, Horbinski CM, Lu S, Kim S-H, et al. A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Oct 4 [cited 2018 Aug 16];7:12885. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms12885>
351. Corda G, Sala G, Lattanzio R, Iezzi M, Sallese M, Fragassi G, et al. Functional and prognostic significance of the genomic amplification of frizzled 6 (FZD6) in breast cancer. *J Pathol* [Internet]. 2017 Feb [cited 2018 Aug 16];241(3):350–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4841>
352. Cantilena S, Pastorino F, Pezzolo A, Chayka O, Pistoia V, Ponzoni M, et al. Frizzled receptor 6 marks rare, highly tumorigenic stem-like cells in mouse and human neuroblastomas. *Oncotarget* [Internet]. 2011 Dec 4 [cited 2018 Aug 16];2(12):976–83. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/410>
353. Kim B-K, Yoo H-I, Kim I, Park J, Kim Yoon S. FZD6 expression is negatively regulated by miR-199a-5p in human colorectal cancer. *BMB Rep* [Internet]. 2015 Jun [cited 2018 Aug 16];48(6):360–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772759>
354. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, et al. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2018 Aug 16];126(4):869–81. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15328621>
355. Yagy R, Hamamoto R, Furukawa Y, Okabe H, Yamamura T, Nakamura Y. Isolation and characterization of a novel human gene, VANGL1, as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2018 Aug 16];20(6):1173–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011995>
  356. Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, Muster J, Allison KH, Angers S, et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene* [Internet]. 2012 Aug 9 [cited 2018 Aug 16];31(32):3696–708. Available from: <http://www.nature.com/articles/onc2011528>
  357. Puvirajesinghe TM, Bertucci F, Jain A, Scerbo P, Belotti E, Audebert S, et al. Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2–JNK signalling in breast cancer. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Jan 12 [cited 2018 Aug 16];7:10318. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26754771>
  358. Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, et al. The Planar Cell Polarity Pathway Drives Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia by the Regulation of B-Lymphocyte Migration. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2018 Aug 16];73(5):1491–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23338609>
  359. Charrasse S, Comunale F, Gilbert E, Delattre O, Gauthier-Rouvière C. Variation in cadherins and catenins expression is linked to both proliferation and transformation of Rhabdomyosarcoma. *Oncogene* [Internet]. 2004 Mar 22 [cited 2018 Aug 31];23(13):2420–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691446>
  360. Bouron-Dal Soglio D, Rougemont A-L, Absi R, Giroux L-M, Sanchez R, Barrette S, et al. Beta-catenin mutation does not seem to have an effect on the tumorigenesis of pediatric rhabdomyosarcomas. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2018 Aug 30];12(5):371–3. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2350/08-11-0553.1>
  361. Singh S, Vinson C, Gurley CM, Nolen GT, Beggs ML, Nagarajan R, et al. Impaired Wnt signaling in embryonal rhabdomyosarcoma cells from p53/c-fos double mutant mice. *Am J Pathol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 Aug 30];177(4):2055–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010602556>
  362. Shukla N, Ameer N, Yilmaz I, Nafa K, Lau C-Y, Marchetti A, et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2018 Aug 31];18(3):748–57. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-2056>

363. Chen X, Stewart E, Shelat AA, Qu C, Bahrami A, Hatley M, et al. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2013 Dec 9 [cited 2018 Aug 31];24(6):710–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153561081300490X>
364. Annavarapu SR, Cialfi S, Dominici C, Kokai GK, Uccini S, Ceccarelli S, et al. Characterization of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* [Internet]. 2013 Oct 2 [cited 2018 Aug 30];93(10):1090–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/labinvest201397>
365. Dionyssiou MG, Ehyai S, Avrutin E, Connor MK, McDermott JC. Glycogen synthase kinase  $\beta$  represses MYOGENIN function in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2014 Feb 27 [cited 2018 Aug 31];5(2):e1094. Available from: <http://www.nature.com/articles/cddis201458>
366. Chen EY, DeRan MT, Ignatius MS, Grandinetti KB, Clagg R, McCarthy KM, et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Apr 8 [cited 2018 Aug 30];111(14):5349–54. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1317731111>
367. Dräger J, Simon-Keller K, Pukrop T, Klemm F, Wilting J, Sticht C, et al. LEF1 reduces tumor progression and induces myodifferentiation in a subset of rhabdomyosarcoma. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2018 Aug 30];8(2):3259–73. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13887>
368. Hayes MN, McCarthy K, Jin A, Oliveira ML, Iyer S, Garcia SP, et al. Vangl2/RhoA Signaling Pathway Regulates Stem Cell Self-Renewal Programs and Growth in Rhabdomyosarcoma. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2018 Aug 31];22(3):414–427.e6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499154>
369. Janda CY, Dang LT, You C, Chang J, de Lau W, Zhong ZA, et al. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and  $\beta$ -catenin signalling. *Nature* [Internet]. 2017 May 3 [cited 2018 Sep 21];545(7653):234–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28467818>
370. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Aug 6 [cited 2018 Sep 21];93(16):8455–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710892>
371. Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2004 Sep [cited 2018 Sep 21];25(9):471–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15559249>
372. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, Lenzen S. Cytotoxicity and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in mouse embryonic stem cells

- treated with four GSK3 inhibitors. BMC Res Notes [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2018 Sep 21];7(1):273. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779365>
373. Verkaar F, Blankesteyn WM, Smits JFM, Zaman GJR.  $\beta$ -Galactosidase enzyme fragment complementation for the measurement of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. FASEB J [Internet]. 2010 Apr [cited 2018 Sep 21];24(4):1205–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940259>
374. Bodine PVN, Stauffer B, Ponce-de-Leon H, Bhat RA, Mangine A, Seestaller-Wehr LM, et al. A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. Bone [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2018 Sep 21];44(6):1063–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254787>
375. Rulifson IC, Majeti JZ, Xiong Y, Hamburger A, Lee KJ, Miao L, et al. Inhibition of secreted frizzled-related protein 5 improves glucose metabolism. Am J Physiol Metab [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2018 Sep 21];307(12):E1144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370851>
376. Iozzi S, Remelli R, Lelli B, Diamanti D, Pileri S, Bracci L, et al. Functional Characterization of a Small-Molecule Inhibitor of the DKK1-LRP6 Interaction. ISRN Mol Biol [Internet]. 2012 [cited 2018 Sep 21];2012:823875. Available from: <https://www.hindawi.com/archive/2012/823875/>
377. Pelletier JC, Lundquist JT, Gilbert AM, Alon N, Bex FJ, Bhat BM, et al. (1-(4-(Naphthalen-2-yl)pyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)methanamine: A Wingless  $\beta$ -Catenin Agonist That Increases Bone Formation Rate. J Med Chem [Internet]. 2009 Nov 26 [cited 2018 Aug 30];52(22):6962–5. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm9014197>
378. Enochson L, Stenberg J, Brittberg M, Lindahl A. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. Osteoarthr Cartil [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Aug 30];22(4):566–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458414000430>
379. Li C, Wu W, Jiao G, Chen Y, Liu H. Resveratrol attenuates inflammation and reduces matrix-metalloprotease expression by inducing autophagy *via* suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in IL-1 $\beta$ -induced osteoarthritis chondrocytes. RSC Adv [Internet]. 2018 Jun 4 [cited 2018 Aug 30];8(36):20202–10. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8RA00993G>
380. Nierste BA, Glackin CA, Kirshner J. Dkk-1 and IL-7 in plasma of patients with multiple myeloma prevent differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. Am J Blood Res [Internet]. 2014 [cited 2018 Aug 30];4(2):73–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755907>
381. Choudhary P, Dodsworth BT, Sidders B, Gutteridge A, Michaelides C, Duckworth JK, et al. A FOXM1 Dependent Mesenchymal-Epithelial Transition

- in Retinal Pigment Epithelium Cells. HOU L, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2018 Aug 30];10(6):e0130379. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130379>
382. Kempf H, Olmer R, Haase A, Franke A, Bolesani E, Schwanke K, et al. Bulk cell density and Wnt/TGFbeta signalling regulate mesendodermal patterning of human pluripotent stem cells. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Dec 9 [cited 2018 Aug 30];7:13602. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms13602>
  383. Zhang F, Lu C, Xu W, Shao J, Wu L, Lu Y, et al. Curcumin raises lipid content by Wnt pathway in hepatic stellate cell. *J Surg Res* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Aug 30];200(2):460–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414021>
  384. Choe J-Y, Hun Kim J, Park K-Y, Choi C-H, Kim S-K. Activation of dickkopf-1 and focal adhesion kinase pathway by tumour necrosis factor  $\alpha$  induces enhanced migration of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2016 May [cited 2018 Aug 30];55(5):928–38. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/kev422>
  385. Chae W-J, Ehrlich AK, Chan PY, Teixeira AM, Henegariu O, Hao L, et al. The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* [Internet]. 2016 Feb 16 [cited 2018 Aug 30];44(2):246–58. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761316000327>
  386. Glantschnig H, Scott K, Hampton R, Wei N, McCracken P, Nantermet P, et al. A rate-limiting role for Dickkopf-1 in bone formation and the remediation of bone loss in mouse and primate models of postmenopausal osteoporosis by an experimental therapeutic antibody. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2018 Sep 21];338(2):568–78. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.111.181404>
  387. Iyer SP, Beck JT, Stewart AK, Shah J, Kelly KR, Isaacs R, et al. A Phase IB multicentre dose-determination study of BHQ880 in combination with anti-myeloma therapy and zoledronic acid in patients with relapsed or refractory multiple myeloma and prior skeletal-related events. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2018 Sep 21];167(3):366–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25139740>
  388. Xu C, Zeng X-H, Wang L, Tao S-Q, Wu Q-X, Zhu P, et al. sFRP-4, a potential novel serum marker for chronic hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* [Internet]. 2015 Apr [cited 2018 Aug 16];14(2):164–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25865689>
  389. Pozzi S, Fulciniti M, Yan H, Vallet S, Eda H, Patel K, et al. In vivo and in vitro effects of a novel anti-Dkk1 neutralizing antibody in multiple myeloma. *Bone* [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 Oct 31];53(2):487–96. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333523>
390. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2009 Jul 9 [cited 2018 Oct 17];114(2):371–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19417213>
  391. Bendell JC, Murphy JE, Mahalingam D, Halmos B, Sirard CA, Landau SB, et al. Phase I study of DKN-01, an anti-DKK1 antibody, in combination with paclitaxel (pac) in patients (pts) with DKK1+ relapsed or refractory esophageal cancer (EC) or gastro-esophageal junction tumors (GEJ). *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Oct 17];34(4\_suppl):111–111. Available from: [http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2016.34.4\\_suppl.111](http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2016.34.4_suppl.111)
  392. Ryan DP, Murphy J, Mahalingam D, Strickler J, Stein S, Sirard C, et al. PD-016 Current results of a phase I study of DKN-01 in combination with paclitaxel (P) in patients (pts) with advanced DKK1+ esophageal cancer (EC) or gastro-esophageal junction tumors (GEJ). *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2018 Oct 31];27(suppl 2):ii108.1-ii108. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdw200.16>
  393. Qian J, Yi Q. DKK1 as a novel target for myeloma immunotherapy. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012 Aug 27 [cited 2018 Sep 4];1(5):756–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934273>
  394. Qian J, Zheng Y, Zheng C, Wang L, Qin H, Hong S, et al. Active vaccination with Dickkopf-1 induces protective and therapeutic antitumor immunity in murine multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2012 Jan 5 [cited 2018 Oct 17];119(1):161–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049519>
  395. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, et al. A Randomized, Double-Blind Phase 2 Clinical Trial of Blososumab, a Sclerostin Antibody, in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2015 Feb [cited 2018 Oct 17];30(2):216–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbmr.2351>
  396. Seefried L, Baumann J, Hemsley S, Hofmann C, Kunstmann E, Kiese B, et al. Efficacy of anti-sclerostin monoclonal antibody BPS804 in adult patients with hypophosphatasia. *J Clin Invest* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2018 Oct 17];127(6):2148–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28436937>
  397. Lim SY, Bolster MB. Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017 [cited 2018 Oct 17];11:1221–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28458516>
  398. Hinson ARP, Jones R, Crose LES, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Human Rhabdomyosarcoma Cell Lines for Rhabdomyosarcoma Research: Utility and

- Pitfalls. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2018 Jul 19];3:183. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23882450>
399. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT-H, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2010 [cited 2018 Jul 20];629:141–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387148>
400. Lambeth LS, Smith CA. Short Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing. In 2013 [cited 2018 Jul 12]. p. 205–32. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-119-6\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-119-6_12)
401. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 Dec [cited 2018 Aug 2];74(12):5463–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>
402. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2018 Jul 11];25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
403. Wilson T, Hastings JW. BIOLUMINESCENCE. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 1998 Nov [cited 2018 Jul 30];14(1):197–230. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9891783>
404. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Jul 24];11(1):37–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10367281>
405. Betters DM. Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J Adv Pract Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2018 Aug 2];6(5):435–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069736>
406. Jia S, Zhou J, Fanelli C, Wee Y, Bonds J, Schneider P, et al. Small-molecule Wnt agonists correct cleft palates in Pax9 mutant mice in utero. 2017 [cited 2018 Aug 30]; Available from: <http://dev.biologists.org/content/develop/144/20/3819.full.pdf>
407. Voloshanenko O, Erdmann G, Dubash TD, Augustin I, Metzsig M, Moffa G, et al. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2018 Nov 27];4:2610. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162018>
408. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* [Internet]. 1993 May [cited 2018 Nov 14];7(5):812–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491378>
409. Yang K, Hitomi M, Stacey DW. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div* [Internet]. 2006 Dec 18 [cited 2018 Nov 14];1(1):32. Available from:



- <http://celldiv.biomedcentral.com/articles/10.1186/1747-1028-1-32>
410. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 May 11 [cited 2018 Jan 19];96(10):5522–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318916>
  411. Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The Wnt Signaling Inhibitor Dickkopf-1 Is Required for Reentry into the Cell Cycle of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jul 25 [cited 2018 Jan 24];278(30):28067–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740383>
  412. Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Feb [cited 2018 Aug 8];22(4):1172–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11809808>
  413. Figeac N, Zammit PS. Coordinated action of Axin1 and Axin2 suppresses  $\beta$ -catenin to regulate muscle stem cell function. *Cell Signal* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 Jan 23];27(8):1652–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866367>
  414. Huraskin D, Eiber N, Reichel M, Zidek LM, Kravic B, Bernkopf D, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling via Axin2 is required for myogenesis and, together with YAP/Taz and Tead1, active in Ila/Iix muscle fibers. *Development* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2019 Jan 23];143(17):3128–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578179>
  415. Rennoll S, Yochum G. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer. *World J Biol Chem* [Internet]. 2015 Nov 26 [cited 2018 Nov 15];6(4):290–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629312>
  416. Mylona E, Jones KA, Mills ST, Pavlath GK. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2018 Nov 15];209(2):314–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906571>
  417. Sathi GA, Inoue M, Harada H, Rodriguez AP, Tamamura R, Tsujigiwa H, et al. Secreted frizzled related protein (sFRP)-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2018 Aug 17];45(10):856–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19362047>
  418. Dun X, Jiang H, Zou J, Shi J, Zhou L, Zhu R, et al. Differential expression of DKK-1 binding receptors on stromal cells and myeloma cells results in their distinct response to secreted DKK-1 in myeloma. *Mol Cancer* [Internet]. 2010 Sep 16 [cited 2018 Nov 26];9:247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846389>

419. D'Amico L, Mahajan S, Capietto A-H, Yang Z, Zamani A, Ricci B, et al. Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer. *J Exp Med* [Internet]. 2016 May 2 [cited 2018 Sep 5];213(5):827–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27045006>
420. Zenzmaier C, Sampson N, Plas E, Berger P. Dickkopf-related protein 3 promotes pathogenic stromal remodeling in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2013 Sep [cited 2018 Sep 5];73(13):1441–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765731>
421. Yokota T, Oritani K, Garrett KP, Kouro T, Nishida M, Takahashi I, et al. Soluble frizzled-related protein 1 is estrogen inducible in bone marrow stromal cells and suppresses the earliest events in lymphopoiesis. *J Immunol* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2018 Nov 26];181(9):6061–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18941195>
422. Carmon KS, Loose DS. Secreted Frizzled-Related Protein 4 Regulates Two Wnt7a Signaling Pathways and Inhibits Proliferation in Endometrial Cancer Cells. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2018 Aug 17];6(6):1017–28. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-08-0039>
423. Shi X, Yu X, Wu W, Xu X, Wang J-Y, Xu L, et al. Dickkopf-1 expression is associated with tumorigenity and lymphatic metastasis in human hilar cholangiocarcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Oct 25 [cited 2018 Sep 4];7(43):70378–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27608843>
424. Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate* [Internet]. 2008 Sep 15 [cited 2018 Aug 10];68(13):1396–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561248>
425. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* [Internet]. 1989 Feb 24 [cited 2018 Nov 27];56(4):607–17. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867489905837>
426. Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, et al. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J Cell Biochem* [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2018 Oct 4];108(6):1302–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.22360>
427. Sastry SK, Lakonishok M, Wu S, Truong TQ, Huttenlocher A, Turner CE, et al. Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal. *J Cell Biol* [Internet]. 1999 Mar 22 [cited 2018 Oct 25];144(6):1295–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087271>

428. Nguyen N, Yi J-S, Park H, Lee J-S, Ko Y-G. Mitsugumin 53 (MG53) ligase ubiquitinates focal adhesion kinase during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Feb 7 [cited 2018 Oct 25];289(6):3209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24344130>
429. Waters AM, Stafman LL, Garner EF, Mruthyunjayappa S, Stewart JE, Mroczek-Musulman E, et al. Targeting Focal Adhesion Kinase Suppresses the Malignant Phenotype in Rhabdomyosarcoma Cells. *Transl Oncol* [Internet]. 2016 Aug [cited 2018 Oct 25];9(4):263–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936523316300481>
430. Wang S, Zhang S. Dickkopf-1 is frequently overexpressed in ovarian serous carcinoma and involved in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 2011 Aug 24 [cited 2018 Sep 4];28(6):581–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10585-011-9393-9>
431. Pang H, Ma N, Jiao M, Shen W, Xin B, Wang T, et al. The Biological Effects of Dickkopf1 on Small Cell Lung Cancer Cells and Bone Metastasis. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* [Internet]. 2017 Jan 2 [cited 2018 Sep 5];25(1):35–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28081731>
432. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2018 Aug 22];65(17):7554–60. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1317>
433. Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, et al. Wnt/ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Mar 20 [cited 2018 Nov 19];109(12):4485–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392999>
434. Bukowska J, Ziecik AJ, Laguna J, Gawronska-Kozak B, Bodek G. The Importance of the Canonical Wnt Signaling Pathway in the Porcine Endometrial Stromal Stem/Progenitor Cells: Implications for Regeneration. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2018 Nov 19];24(24):2873–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414529>
435. Malladi S, Macalinao DG, Jin X, He L, Basnet H, Zou Y, et al. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* [Internet]. 2016 Mar 24 [cited 2018 Aug 30];165(1):45–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015306>
436. Kuang H-B, Miao C-L, Guo W-X, Peng S, Cao Y-J, Duan E-K. Dickkopf-1 enhances migration of HEK293 cell by beta-catenin/E-cadherin degradation. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2018 Nov 16];14:2212–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273195>
437. Takahashi N, Fukushima T, Yorita K, Tanaka H, Chijiwa K, Kataoka H.

- Dickkopf-1 is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells and is involved in invasive growth. *Int J cancer* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2018 Sep 4];126(7):1611–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24865>
438. Mabile C, Ruysen-Witrand A, Degboe Y, Gennero I, Loiseau HA, Roussel M, et al. DKK1 and sclerostin are early markers of relapse in multiple myeloma. *Bone* [Internet]. 2018 Aug [cited 2018 Sep 5];113:114–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28993177>
439. Sakabe T, Azumi J, Umekita Y, Toriguchi K, Hatano E, Hirooka Y, et al. Expression of Cancer Stem Cell-associated DKK1 mRNA Serves as Prognostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* [Internet]. 2017 Sep 6 [cited 2018 Sep 5];37(9):4881–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870909>
440. Yao L, Zhang D, Zhao X, Sun B, Liu Y, Gu Q, et al. Dickkopf-1-promoted vasculogenic mimicry in non-small cell lung cancer is associated with EMT and development of a cancer stem-like cell phenotype. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 Sep 4];20(9):1673–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27240974>



## VIII. ANNEXOS



# ANNEX 1: Autenticació de línies cel·lulars







HUMAN CELL LINE STR PROFILE
-----------------------------

DATE:  
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):  
LABORATORY:

01.04.2016  
M110  
Genomics Core Facility.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.  
28029 Madrid  
00 34 91 585 44 74 (Tel.)      00 34 91 585 44 01 (Fax)  
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:  
Sample submitted by:

RH30 (ATCC® CRL-2061)  
Pilar Mancera Aroca  
Hospital Vall D' Hebron  
[pilar.mancera@vhir.org](mailto:pilar.mancera@vhir.org)

## STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED	EXPECTED	
D5S818	12,13	12,13
D13S317	11	11
D7S820	10	10
D16S539	12	12
vWA	17,18	17,18
TH01	9,9.3	9,9.3
TPOX	8,11	8,11
CSFIPO	10,11	10,11
D21S11	29,31.2	
Amelogenin	X,Y	X,Y
<b>RESULTS</b>		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

## TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with ≥80% match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
- The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified



HUMAN CELL LINE STR PROFILE
-----------------------------

DATE:  
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):  
LABORATORY:

01.04.2016  
M110  
Genomics Core Facility.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.  
28029 Madrid  
00 34 91 585 44 74 (Tel.)      00 34 91 585 44 01 (Fax)  
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:  
Sample submitted by:

RH4 (RH-41)  
Pilar Mancera Aroca  
Hospital Vall D' Hebron  
pilar.mancera@vhir.org

## STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED	EXPECTED	EXPECTED
D5S818	10,13	10,13
D13S317	8,9	8,9
D7S820	10,11	10,11
D16S539	12,13	12,13
vWA	16,17,18	16,18
TH01	7,9,3	7,9,3
TPOX	8,11	8,11
CSF1PO	11,12	11,12
D21S11	29,31	
Amelogenin	X	X
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

## TEST RESULTS:

Query profiles were sent against DSMZ database

Cell lines with  $\geq 80\%$  match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
- The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified



## HUMAN CELL LINE STR PROFILE

DATE:  
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):  
LABORATORY:

01.04.2016  
M110  
Genomics Core Facility.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.  
28029 Madrid  
00 34 91 585 44 74 (Tel.)      00 34 91 585 44 01 (Fax)  
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:  
Sample submitted by:

RD (ATCC® CCL-136)  
Pilar Mancera Aroca  
Hospital Vall D´Hebron  
[pilar.mancera@vhir.org](mailto:pilar.mancera@vhir.org)

### STR PROFILE DATA:

STR PROFILE	OBTAINED	EXPECTED
D5S818	11	11
D13S317	13	13
D7S820	8,12	8,12
D16S539	10,11	10,11
vWA	18	18
TH01	9,3	9,3
TPOX	9	9
CSF1PO	10,11	10,11
D21S11	28,29	
Amelogenin	X	X
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

### TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with  $\geq 80\%$  match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description  
The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified



HUMAN CELL LINE STR PROFILE
-----------------------------

DATE:  
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):  
LABORATORY:

01.04.2016  
M110  
Genomics Core Facility.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.  
28029 Madrid  
00 34 91 585 44 74 (Tel.)                      00 34 91 585 44 01 (Fax)  
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:  
Sample submitted by:

HTB-82(ATCC® HTB-82)  
Pilar Mancera Aroca  
Hospital Vall D' Hebron  
pilar.mancera@vhir.org

## STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED	EXPECTED	EXPECTED
D5S818	12	12
D13S317	11,12	11,12
D7S820	8,10	8,10
D16S539	11,12	11,12
vWA	15,17	15,17
TH01	8,9,3	8,9,3
TPOX	8,9	8,9
CSF1PO	10,13	10,13
D21S11	28,30	
Amelogenin	X	X
<b>RESULTS</b>		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

## TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with  $\geq 80\%$  match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description  
The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified

## ANNEX 2: Publicacions



**Publicacions acceptades:**

Almazán-Moga, A., Zarzosa, P., Molist, C., Velasco, P., Pyczek, J., Simon-Keller, K., **Giralt, I.**, Vidal, I., Navarro, N., Segura, M. F., Soriano, A., Navarro, S., Tirado, O. M., Ferreres, J. C., Santamaria, A., Rota, R., Hahn, H., Sánchez de Toledo, J., Roma, J., Gallego, S. (2017). Ligand-dependent Hedgehog pathway activation in Rhabdomyosarcoma: the oncogenic role of the ligands. *British journal of cancer*, 117(9), 1314-1325.

Almazán-Moga, A., Zarzosa, P., Vidal, I., Molist, C., **Giralt, I.**, Navarro, N., Soriano, A., Segura, M. F., Alfranca, A., Garcia-Castro, J., Sánchez de Toledo, J., Roma, J., Gallego, S. (2017). Hedgehog Pathway Inhibition Hampers Sphere and Holoclone Formation in Rhabdomyosarcoma. *Stem cells international*, 2017, 7507380.

Zarzosa P., Navarro N., **Giralt I.**, Molist C., Almazán-Moga A., Vidal I., Soriano A., Segura M.F., Hladun R., Villanueva A., Gallego S., Roma J. (2017). Patient-derived xenografts for childhood solid tumors: a valuable tool to test new drugs and personalize treatments. *Clinical and Translational Oncology*, 19(1), 44-50.







