

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

**“Identificación De Genes Regulados Por PAX3-FKHR Que Presentan Una
Expresión Diferencial Entre Rabdomiosarcomas Alveolares y Embrionarios”**

T E S I S

**Para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias Médicas**

P R E S E N T A:

Gabriela Elisa Mercado Celis

**Tutor Principal:
Dr. Frederic G. Barr**

Comité Tutorial:

Dr. Roberto Rivera Luna

México, D.F.

Agosto 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***Esta tesis está dedicada a ti, mi Abby,
gracias por llegar a mi vida, tú cambiaste
el significado de lo que es importante e
imprescindible.....***

Gracias familia, no puedo imaginarme llegar hasta este momento sin todos ustedes, Mami gracias por aguantarme en los buenos, malos y pésimos días y por ser la mejor amiga y compañera de viaje que pudiera tener, Marili, gracias por todo tu apoyo y cariño a pesar de todo, Jorge y Livia, gracias por todos los cuatros, sin ellos no hubiera encontrado el camino otra vez.... Ale, gracias por confiar y creer en mí aun en el momento en que hubiera preferido darme por vencida. Gracias a mis fantásticos sobrinos, Camila por todos los abrazos y las pláticas y por hacerme ver que la vida no es un drama, Olmo y Lía por hacer la vida más divertida con sus risas, saltos y destrozos.

Thank you Fred for mentoring me, I learned as much from you as I did from the research project. Thank you for your guidance, and your patience (especially with my spanglish). I would have "never" accomplished the completion of this thesis with out your support and encouragement, especially on those days when nothing seems to be working... thank you, thank you, thank you!!

Gracias a todos mis profesores y amigos del Instituto Nacional de Pediatría, Dra. Rocío Cárdenas, Dr. Alberto Olaya y en especial al Dr. Roberto Rivera por todos sus consejos, gran parte de la decisión de tomar este camino se la debo a usted.

A todos mis amigos que han estado a mi lado por un minuto o por décadas... Fernanda, David, Ricardo, Ruth y Héctor cierren sus ojos y confíen....los adoro, gracias por quedarse cuando pudieron elegir alejarse. Maria, gracias por recordarme todos los días que es lo que más quiero. Charo, Leo y Fer después de dos décadas aquí estamos, los quiero amigos.

Gracias al Dr Higinio Arzate que literalmente me obligó a terminar esta tesis.

Also I would like to thank everyone in Barr's Lab, especially to Donna and Jenny, I don't know if I could have pulled this whole thing off without your extensive support and your teachings.

Índice General

	Número de Página
1. Resumen	8
2. Antecedentes	
2.1. Translocaciones cromosómicas y genes de fusión en cáncer	10
2.2. Translocaciones cromosómicas y genes de fusión en sarcomas	11
2.3. Rabdomyosarcoma; características histopatológicas, clínicas y genéticas.	12
2.4. Funciones biológicas de PAX3 y FKHR	14
2.4.1. PAX3	14
2.4.2. FKHR (FOX01A)	17
2.5. Estructura de PAX3-FKHR y consecuencias funcionales	18
2.6. Mecanismos moleculares de oncogénesis de PAX3-FKHR	19
2.7. Blancos transcripcionales de PAX3-FKHR	21
2.7.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento	22
2.7.2. Evasión de diferenciación terminal	22
2.7.3. Evasión de apoptosis	24
2.7.4. Invasión de tejido y metástasis	25
2.8. Eventos genéticos adicionales	26
2.9. Factores transcripcionales que colaboran con PAX3-FKHR	29
2.10. PAX3-FKHR vs. PAX7-FKHR	29
3. Justificación	31
4. Hipótesis	33
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos específicos	34
6. Metodología y Resultados	
6.1. Descripción general del estudio	35

6.2. Genes regulados por PAX3-FKHR/ER en un ambiente miogénico	36
6.2.1. Material y métodos	36
6.2.2. Resultados	41
6.3. Genes diferencialmente expresados entre RMSA y RMSE	46
6.3.1. Material y métodos	46
6.3.2. Resultados	49
6.4. Genes regulados por PAX3-FKHR/ER y diferencialmente expresados entre RMSA y RMSE	50
6.4.1. Materiales y métodos	50
6.4.2. Resultados	52
6.5. MYCN como un blanco biológicamente relevante de PAX3-FKHR	63
6.5.1. Materiales y métodos	65
6.5.2. Resultados	66
7. Discusión	77
8. Conclusiones	92
9. Referencias bibliográficas	94
10. Listado de abreviaturas	108
11. Publicaciones	110

Índice de figuras

Figura #	Títulos	Número de Página
1.	Estructura de las proteínas quiméricas PAX3/PAX7-FKHR	19
2.	Regulación de la expresión génica durante la miogénesis	24
3.	Diagrama general del estudio	35
4.	Sistema inducible PAX3-FKHR/ER	37
5.	Expresión de PAX3-FKHR en diferentes clonas RDP3FK/ER	42
6.	Curva dosis-respuesta de la actividad transcripcional de PAX3-FKHR/ER	43
7.	Validación de expresión por RT-PCR en tiempo real, ensayo dosis-respuesta	60
8.	Validación de la expresión por RT-PCR en tiempo real en muestras de RMSA	61
9.	Inducción de la expresión de MYCN por PAX3-FKHR	66
10.	Correlación de la expresión de MYCN con el subtipo de RMS y de acuerdo con la presencia del gen de fusión	67
11.	Comparación de la expresión de proteínas de MYCN en diferentes sistemas	68
12.	Ensayo de estabilidad del ARNm de MYCN	69
13.	Ensayo en el tiempo de la expresión de CXCR4 y MYCN inducidas por PAX3-FKHR	70
14.	Ensayo en el tiempo de la expresión de MYCN inducida por PAX3-FKHR en RD, RH6 y RH36	71
15.	Ensayo de cicloheximida	72
16.	Ensayo de reportero	74
17.	Análisis fenotípico de la actividad oncogénica de MYCN y PAX3-FKHR	76

Índice de Tablas

Tabla #	Títulos	Número de Página
1.	Genes de fusión en sarcomas	11
2.	Diferencias clínicas y genéticas entre RMSA y RMSE	14
3.	Blancos transcripcionales de PAX3-FKHR	21
4.	Genes regulados por PAX3-FKHR y con expresión diferencial en RMSA	53
5.	Anotaciones funcionales	56
6.	Análisis de promotores	62
7.	Expresión de MYCN en rabdomiosarcomas	64

1. Resumen

PAX3-FKHR es un gen de fusión que resulta como consecuencia de la translocación cromosómica t(2;13)(q35;q14). Este gen de fusión codifica un factor de transcripción quimérico que está expresado consistentemente y específicamente en la mayoría de los casos de rabdomiosarcomas alveolares (RMSA). Los RMSA junto con los rabdomiosarcoma embrionarios (RMSE), son las principales variedades histológicas de los rabdomiosarcomas (RMS). Este tumor se origina de células que asemejan el músculo esquelético. Los RMSA se distinguen de los RMSE por ser tumores agresivos con pobre pronóstico, los pacientes con RMSA se presentan al diagnóstico en estadios avanzados, frecuentemente tienen falta de respuesta a tratamiento y recaídas. La consistencia y especificidad de la expresión de *PAX3-FKHR* en RMSA sugieren que la proteína quimérica es uno de los principales eventos oncogénicos. Además, el análisis de datos clínicos en algunos estudios ha mostrado que la presencia de esta proteína podría estar asociada con el pronóstico. Sin embargo, el mecanismo por el cual *PAX3-FKHR* promueve la tumorigénesis de RMSA, no se comprende completamente. *PAX3-FKHR* codifica un factor de transcripción, el cual conserva la especificidad de unión a ADN de *PAX3*, y gana el potente dominio de transactivación de *FKHR*. La estructura de esta proteína sugiere que el mecanismo oncogénico de *PAX3-FKHR* es una ganancia de función, deregulando la expresión de genes cuyas funciones celulares facilitan la transformación y progresión de los RMSA. Por lo tanto, para comprender la biología y las características clínicas de los RMSA, es de vital importancia identificar los blancos transcripcionales de *PAX3/FKHR* y las vías en que intervienen.

Hipótesis: Los genes que son inducidos por la expresión del constructo inducible de *PAX3-FKHR* en un ambiente de RMSE y diferencialmente expresados en RMSA y RMSE, probarán ser blancos transcripcionales relevantes del factor de transcripción quimérico *PAX3-FKHR*.

Objetivo: Identificar y caracterizar un grupo de blancos transcripcionales de PAX3-FKHR en un ambiente miogénico que sean biológicamente relevantes para los RMSA.

Material y Métodos: Para poder identificar blancos transcripcionales tempranos de PAX3-FKHR que tuvieran una relevancia biológica, comparamos los perfiles de expresión de dos sistemas. El primero, un sistema celular inducible, el cual generamos a través de fusionar a PAX3-FKHR con el dominio modificado de unión a ligando del receptor de estrógenos (PAX3-FKHR/ER). La proteína de fusión se expresó en un ambiente miogénico utilizando líneas celulares de rhabdomyosarcoma embrionario (RD, RH36, SMS-CTR). El segundo sistema consistió en muestras de RMS, embrionarios y alveolares.

Resultados: El análisis de estos datos nos permitió identificar un grupo de 33 genes regulados por PAX3-FKHR que pudieran ser biológicamente relevantes en RMSA. El análisis de anotaciones funcionales mostró que estos genes están involucrados principalmente en la regulación de la transcripción y el desarrollo, particularmente en la neurogénesis. MYCN es un ejemplo interesante ya que es un factor de transcripción que participa en el desarrollo del sistema nervioso y además se ha implicado en la oncogénesis de otros tumores, por lo cual se decidió estudiarlo a profundidad. Los niveles de expresión de ARN y proteína fueron confirmados en experimentos independientes. Los resultados de inhibición con cicloheximida y ensayos de curso temporal fueron consistentes con la hipótesis de que PAX3-FKHR actúa directamente en la regulación de la transcripción del gene de MYCN. Los estudios funcionales establecieron que MYCN coopera con PAX3-FKHR potenciando su actividad oncogénica.

Conclusiones: Identificamos un grupo selecto de genes biológicamente relevantes que son modulados por PAX3-FKHR, y demostramos que PAX3-FKHR contribuye a la expresión de MYCN y a su vez MYCN colabora con la tumorigénesis de PAX3-FKHR.

2. Antecedentes

2.1 Translocaciones cromosómicas y genes de fusión en cáncer

El cáncer es una enfermedad genética de las células somáticas, con dos tipos de eventos iniciadores, inactivación de genes por delección, mutación o mecanismos epigenéticos, y la activación o desregulación de genes como consecuencia de mutaciones puntuales, amplificaciones o rearrreglos cromosómicos balanceados (RCB) (1). Los RCB, mayormente translocaciones cromosómicas, funcionan a través de uno de dos mecanismos alternativos, sobre-expresión de un gen normal en uno de los sitios de ruptura, o la creación de un gen quimérico a través de la fusión de partes de dos genes. Los genes híbridos conforman aproximadamente el 75% de los genes de fusión conocidos en desordenes malignos.

La primera translocación específica, identificada en un cáncer humano fue el cromosoma Filadelfia t(9;22)(q34;11), que genera el gen de fusión *BCR-ABL* y se expresa en leucemias mielógenas crónicas (CML). Desde la identificación de *BCR-ABL*, se han reportado 358 genes de fusión que involucran 337 genes diferentes, la mayoría en leucemias y sarcomas (1, 2), sin embargo, es probable que este evento genético también participe en la oncogénesis de tumores epiteliales, como es el caso del cáncer de próstata (3).

Los genes de fusión comparten varias características que se resumen a continuación; 1) la gran mayoría de estas alteraciones son específicas de tumor, 2) Solamente uno de los productos quiméricos se expresa consistentemente y a niveles elevados, 3) En algunos tumores existen variantes de las translocaciones; si este es el caso, uno de los dos genes es idéntico mientras que el compañero está relacionado cercanamente al otro gen, 4) Las proteínas quiméricas han mostrado que son eventos oncogénicos iniciadores, sin embargo, el gen de fusión no es suficiente para la tumorigénesis y se requieren eventos genéticos adicionales, 5) El 50% de los genes involucrados son factores de transcripción y

tirosin-cinasas, los cuales se distribuyen equitativamente entre desordenes hematológicos y tumores sólidos.

2.2 Translocaciones cromosómicas y genes de fusión en sarcomas

Los sarcomas son un grupo heterogéneo de neoplasias que son raras en adultos pero que representan el 20-25% de los casos de cáncer pediátrico. Desde una perspectiva genética, los sarcomas se dividen en dos grupos principalmente, sarcomas con cariotipos simples casi diploides con pocos rearrreglos cromosómicos, y sarcomas con cariotipos complejos (4). El 30% de los sarcomas se clasifican en el grupo de cariotipos simples. Este grupo de sarcomas presenta translocaciones cromosómicas específicas que resultan en la generación de genes de fusión, los cuales se muestran en la tabla 1. Los RMS, sarcomas de Ewing (SE) y sarcoma sinovial (SS) son algunos ejemplos que se incluyen en este grupo.

Tabla 1. Genes de fusión en sarcomas	
Tipo de tumor	Gen de fusión(s)
Sarcoma alveolar de partes blandas	<i>ASPSCR1-TFE3*</i>
Histiocitoma fibroso angiomatoide	<i>EWSR1-ATF1*</i> , <i>FUS-ATF1*</i>
Sarcoma indiferenciado de hueso	<i>EWSR1-POU5F1</i>
Condrosarcoma mixoide	<i>EWSR1-NR4A3*</i> , <i>TAF15-NR4A3*</i> , <i>TCF12-NR4A3</i> , <i>TFG-NR4A3</i>
Sarcoma de células claras	<i>EWSR1-ATF1*</i>
Dermatofibrosarcoma protuberans	<i>COL1A1-PDGFB*</i>
Tumor desmoplásico de células pequeñas	<i>EWSR1-WT1*</i> , <i>EWSR1-ERG</i>
Sarcoma de estroma endometrial	<i>JAZF1-PHF1*</i> , <i>JAZF1-SUZ12*</i> , <i>EPC1-PHF1</i>
Sarcoma de Ewing o tumor neuroectodérmico primitivo	<i>EWSR1-ERG*</i> , <i>EWSR1-ETV1*</i> , <i>EWSR1-ETV4*</i> , <i>EWSR1-FLI1*</i> , <i>EWSR1-FEV*</i> , <i>FUS-ERG*</i> , <i>EWSR1-ZNF278</i>
Sarcoma de tejidos blandos parecido a Ewing	<i>CIC-DUX4*</i>

Sarcoma fibromixioide de bajo grado	<i>FUS-CREB3L2*</i> , <i>FUS-CREB3L1</i>
Fibrosarcoma infantil	<i>ETV6-NTRK3*</i>
Tumor miofibroblástico inflamatorio	<i>CLTC-ALK*</i> , <i>CARS-ALK*</i> , <i>RANBP2-ALK*</i> , <i>TPM3-ALK*</i> , <i>ATIC-ALK</i> , <i>SEC31L1-ALK</i> , <i>TPM4-ALK</i>
Liposarcoma mixoide	<i>EWSR1-DDIT3*</i> , <i>FUS-DDIT3*</i>
Rabdomiosarcoma alveolar	<i>PAX3-FOXO1A*</i> , <i>PAX7-FOXO1A*</i> , <i>PAX3-MLLT7</i> , <i>PAX3-NCOA1</i>
Rabdomiosarcoma pleomórfico	<i>PAX3-FOXO1A</i>
Sarcoma sinovial	<i>SS18-SSX1*</i> , <i>SS18-SSX2*</i> , <i>SS18-SSX4*</i> , <i>SS18L1-SSX1</i>
Modificado de "The impact of translocations and gene fusions on cancer causation Felix Mitelman, Bertil Johansson and Fredrik Mertens, Nat. Rev.Can, 2007"	
*Genes de fusión recurrentes	

2.3 Rabdomiosarcoma; características histopatológicas, clínicas y genéticas.

Los rabdomiosarcomas (RMS), son el sarcoma de partes blandas más frecuente en pediatría, representan el 3.5% de todos los casos de cáncer entre niños de 0 a 14 años y el 2% entre adolescentes y adultos jóvenes de 15 a 19 años (5-7). Se considera que los RMS se originan de células pertenecientes al linaje músculo esquelético (8). De acuerdo a sus características histopatológicas los RMS se clasifican en dos subgrupos principales: alveolar (RMSA) y embrionario (RMSE) (9, 10). Además de presentar diferencias morfológicas, estos dos subgrupos se distinguen por su diferente comportamiento clínico y, por la presencia de alteraciones genéticas específicas (Tabla 2).

Los RMSE, están compuestos por células fusiformes pequeñas que se asemejan a los mioblastos en desarrollo en el feto de 7-10 semanas (11). Clínicamente, los RMSE se localizan, en cabeza y cuello, órbita y el sistema genitourinario. La edad de presentación generalmente es en menores de 10 años (representan el 42% de los casos de RMS entre los 0-4 años), y están asociados a un buen pronóstico (12, 13). Genéticamente, los RMSE presentan pérdidas o ganancias

cromosómicas pero se han asociado principalmente a la pérdida de heterocigocidad (LOH) en el locus 11p15.5 (14-17). En esta región se localizan varios genes supresores de tumor, los cuales incluyen H19, CDKN1C (p57/KIP2), y BWR1A, sin embargo, hasta el momento no se sabe cual de ellos participa específicamente en la oncogénesis de este tumor (18-21). También se ha descrito que en los RMSE es relativamente frecuente (36%) la presencia de rupturas cromosómicas en la región 1p11-1q11 (22).

Los RMSA por su parte, están caracterizados por células pequeñas, redondas, densamente compactas, con o sin un patrón alveolar (11, 23). Los RMSA se distribuyen equitativamente en pacientes pediátricos y adolescentes entre 0 y 19 años, y se localizan más frecuentemente en extremidades (12). Su comportamiento clínico, en general, es más agresivo, con una mayor frecuencia de metástasis al diagnóstico, recaídas tempranas, y mala respuesta al tratamiento (13).

Genéticamente, los RMSA, están asociados con amplificaciones de diferentes regiones cromosómicas (14, 15, 22), pero su característica principal es la presencia de la translocación recíproca, t(2; 13) (q35; q14) en el 55% de los casos o la variante t(1; 13) (p36; q14) en el 22% de los casos, en el 23% de los casos, no se identifica ninguna de las fusiones (24-26). Diversos estudios han demostrado que la presencia de estas translocaciones es constante y específica para los RMSA (27-30).

Wachtel y cols. identificaron una probable nueva variedad de translocación t(2;2)(q35;p23) (31), la cual fusiona a los genes PAX3 y NCOA1. La estructura de este gen de fusión sugiere que también, como PAX3-7/FKHR, es un factor transcripcional. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha reportado un caso con esta variedad de translocación.

Tabla 2. Diferencias clínicas y genéticas entre RMSA y RMSE		
	Alveolar	Embrionario
Frecuencia (12)	23%	57%
Edad (12)	Distribución equitativa (0-19 años)	< 10 (0-4 años)
Localización	Extremidades	Cabeza y cuello Sistema genitourinario, órbita
Alteraciones genéticas asociadas	t(2;13)(q35;q14) y t(1;13)(p36;q14)	LOH 11p15.5
Sobrevida libre de enfermedad (32)		
Grupos I – III (33)	66%	83%
Grupo IV (34)	15%	35%

2.4 Funciones biológicas de PAX3 y FKHR

Los genes localizados en los sitios de ruptura de la translocación 2;13 son PAX3 en el cromosoma 2 y FKHR en el cromosoma 13. PAX3 y FKHR codifican factores transcripcionales, por lo tanto, el gen de fusión formado como consecuencia de la translocación cromosómica crea un factor de transcripción quimérico el cual se compone del dominio N-terminal de unión a DNA de PAX3 y la región C terminal de transactivación de FKHR (35, 36).

2.4.1. PAX3

El gen PAX3 contiene 10 exones (99,1 kb), y codifica una proteína de 479 aa (52,9 kDa), la cual pertenece a la familia de factores de transcripción “paired box” y participa en la embriogénesis. Se han descrito nueve miembros de la familia en mamíferos. Los miembros de esta familia contienen un dominio de unión a DNA “paired box”, que es común para todos los miembros de la familia. La familia se clasifica en subgrupos (I al IV) de acuerdo a la presencia o ausencia de la región

octapeptídica, y la presencia, ausencia o truncamiento del homodominio, PAX3 y PAX7 pertenecen al grupo III.

El sitio de unión a ADN de PAX3 está compuesto por un sitio de reconocimiento paired box (GTT C/A C/T) adyacente a un sitio homeobox (ATTA) (37). El dominio paired box (PB) está codificado por los exones 2, 3 y 4, el homodominio (HD) por los exones 5 y 6, y el dominio de transactivación (DT) por los exones 6, 7 y 8. Ensayos *in vitro* (EMSA) y de transfección *in vivo*, han mostrado que ambos dominios, PD y HD se requieren para activar los blancos transcripcionales de Pax3, la unión de HD o PD causarían cambios conformacionales mutuamente, lo que permitiría la activación de la transcripción (38-40). Además, el dominio de transactivación tiene influencia en la especificidad de unión de PAX3; la sustitución del dominio de transactivación de Pax3 permite activar promotores que sólo contienen sitios HD (41). Asimismo, se ha descrito un elemento regulatorio negativo en la región N-terminal, el dominio R (represor). Este dominio inhibe selectivamente la transactivación de promotores que contienen elementos PD/HD (42).

Todos los miembros de los subgrupos II y III tienen patrones específicos de expresión temporal y espacial; estas proteínas están involucradas en la renovación de células madre durante del desarrollo fetal y la vida adulta, además, participan en el control transcripcional durante la embriogénesis (43). Pax3 y Pax7 se expresan en el sistema nervioso en desarrollo y en las somitas que dan origen a los progenitores del músculo esquelético. Pax3 se localiza principalmente en el dermomiótomo lateral y se expresa en las células que migran hacia el primordio de las extremidades (44-46). Durante la migración Pax3 inhibe la diferenciación terminal (47). Al terminar la migración, continúa un periodo de proliferación, y posteriormente a este período se inhibe la expresión de Pax3 y el programa de diferenciación miogénica es activado (48). La expresión de PAX3 en tejidos adultos está limitada a una subpoblación de células satélite.

La participación de Pax3 en los procesos de desarrollo de diversos órganos se ha corroborado en estudios de mutaciones germinales inducidas o espontáneas. En seres humanos las mutaciones de *PAX3* causan el Síndrome de Waardenburg tipo I, este síndrome está caracterizado por pérdida auditiva, *distopia cantorum*, anomalías de la pigmentación en cabello, piel y ojos. Otras características asociadas incluyen, hipoplasia de la musculatura de las extremidades, contractura de codos y dedos; anomalías cardíacas y defectos del tubo neural (49-51). En ratones, las mutaciones en los dominios funcionales de Pax3 dan como resultado el fenotipo “splotch”. Los ratones “splotch” tienen características similares al síndrome de Waardenburg tipo I. Los homocigotos mueren *in utero*, y presentan defectos del cierre del tubo neural y de la cresta neural (exencefalia, espina bífida, alteraciones de la pigmentación, defectos septales y disminución del número de células de Schwann). Adicionalmente, se pueden observar anomalías de costillas y escápula así como, una falta completa del desarrollo de la musculatura de las extremidades. Los heterocigotos tienen una presentación menos severa, estos ratones característicamente presentan una mancha blanca en el abdomen (52-56).

PAX3, además de ser parte del gen de fusión, se encuentra sobre-expresado en otras neoplasias como, melanoma, SE, RMSE, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, entre otros (57-59). Los genes (PAX2, PAX5, PAX8, PAX3 y PAX7) que comprenden los grupos II y III, se expresan en diversos tipos de cáncer y algunos de ellos forman parte de genes de fusión, como es el caso de PAX8-PPAR γ en carcinoma folicular de tiroides y PAX5-IGH en Linfoma No-Hodgkin. Los genes Pax de los subgrupos I y IV no están involucrados en cáncer o su expresión se asocia a un buen pronóstico. Por ejemplo, la baja expresión de PAX6 en gliomas astrocíticos malignos se asocia con un pronóstico desfavorable. Aun más, cuando PAX6 se sobre-expresa en líneas celulares de glioblastoma (U251HF) se inhibe el crecimiento e induce la muerte de estas células. Por otra parte, algunos estudios han reportado que la expresión de PAX9 se pierde o se reduce significativamente en carcinomas invasivos y en displasias epiteliales del esófago (60, 61). Las diferencias entre estos grupos pudieran estar causadas por

variaciones estructurales a través de la interacción de diferentes proteínas con las regiones del homodominio y el octapéptido.

2.4.2. FKHR (FOXO1A)

La proteína FKHR es un miembro de la familia de factores transcripcionales “forkhead”, la cual comprende 39 miembros los cuales están subdivididos en 19 subgrupos. FKHR pertenece al subgrupo FOXO que incluye otros tres miembros (FOXO3/FKHRL1, FOXO4/AFX y FOXO6). AFX y FKHRL1 forman parte de genes de fusión en leucemias agudas siendo su compañero MLL, (62-66). Las funciones celulares de las proteínas FOXO incluyen detención del ciclo celular, reparación del ADN, detoxificación, diferenciación celular (en mioblastos y adipocitos inhibe la diferenciación), muerte celular, atrofia, y metabolismo de la glucosa. (67, 68).

El gen de FKHR contiene 3 exones (110,92 kb) y codifica una proteína de 655 aa (69,7 kDa). FKHR contiene un dominio forkhead N-terminal de unión a ADN, una región de 110 aminoácidos localizada en la parte central de la molécula y un dominio de activación transcripcional C-terminal (69). Dependiendo del contexto del promotor y de las condiciones extracelulares, puede activar o reprimir la transcripción (70). Los factores FOXO están controlados por una variedad de proteínas a través de fosforilación, acetilación, ubiquitinación e interacciones proteína/proteína.

Las proteínas FOXO son uno de los mayores substratos de Akt en respuesta a estimulación celular. La unión de insulina y factores de crecimiento a sus receptores, reclutan y activan la vía de PI3K. Akt directamente fosforila a los factores de transcripción FOXO, particularmente FKHR es fosforilado en los sitios regulatorios, T24, S256 y S319. La fosforilación permite la relocalización de la proteína FOXO del núcleo al citoplasma. Otro mecanismo de regulación es la degradación de la proteína mediada por la vía ubiquitín-proteosoma. La fosforilación de S256 es el evento primario que estimula la ubiquitinación de FOXO1 (71).

2.5. Estructura de PAX3-FKHR y consecuencias funcionales

El sitio de ruptura de la translocación cromosómica t(2;13), consistentemente se localiza en el séptimo intrón de PAX3 y en el primer intrón de FKHR (72). El gen PAX3-FKHR codifica una proteína de 837 amino ácidos (97kDa). Como puede observarse en la figura 1, esta proteína quimérica contiene el dominio N-terminal de unión a ADN de PAX3 (PD y HD) y el dominio represor R, unido a la región C-terminal de FKHR, la cual incluye el dominio truncado de unión a ADN, una región conector de 330 amino ácidos y el dominio de transactivación (35, 36).

De acuerdo a la estructura de PAX3-FKHR, la proteína quimérica retiene la especificidad de unión a ADN de PAX3, sin embargo, PAX3-FKHR es un activador de la transcripción más potente comparado con PAX3 nativo, esto es debido a que el DT de FKHR es más potente que el DT de PAX3 (73, 74). Los niveles de expresión de ARNm de PAX3-FKHR y su expresión proteica están incrementados con respecto a PAX3 en células de RMSA, esta sobre-expresión se debe a un proceso independiente de número de copias, al parecer el aumento en la transcripción es consecuencia de la recombinación de elementos regulatorios por la translocación cromosómica (elemento positivo en la región 3' de FKHR) (75).

PAX3-FKHR tiene una localización nuclear permanente; una de las razones que se han sugerido es que Akt regula la actividad transcripcional inhibiendo su translocación nuclear a través de la fosforilación de tres sitios regulatorios en FKHR. La proteína de fusión conserva solamente dos de estos sitios (S256 y S319), por lo tanto el sitio de fosforilación faltante (T24) es suficiente para permitir a la proteína quimérica tener una localización nuclear permanente (76). Estudios previos han demostrado que la fosforilación de T24 induce la interacción con proteínas 14-3-3 las cuales secuestran a FKHR en el citosol, contribuyendo a la salida nuclear de este factor de transcripción (77, 78). En conjunto con la pérdida del sitio de fosforilación T24, el potente efecto de la señal de localización nuclear de PAX3 (SLN) puede facilitar la localización nuclear permanente de PAX3-FKHR. Finalmente, la translocación podría incrementar el potencial oncogénico al

regula los blancos de Pax3 (79). Sin embargo, la sobre expresión de Pax3 no recapitula las funciones oncogénicas de PAX3-FKHR, por lo tanto, debe activar genes blanco adicionales desregulando actividades celulares que no son controladas normalmente por Pax3 (80-82).

Recientemente se ha propuesto que la proteína de fusión adquiere la habilidad de activar genes blanco adicionales a través de modificar la actividad de sus dominios de unión a DNA, PD y HD (83). Los requisitos estructurales para la activación de PD difieren de los que requiere HD, se ha sugerido que en esta activación participan tres elementos, el dominio R, el dominio conector de FKHR, y el dominio de transactivación. El dominio R de Pax3 y el dominio conector de FKHR son requeridos por PD. Por el otro lado, el DT es crítico para HD (83). Dos ejemplos de genes regulados por este mecanismo son el gen PDGF α R, que es activado por un mecanismo dependiente de HD y miogenina cuya activación es dependiente de PD (80, 83).

Diversos estudios han demostrado que PAX3-FKHR es un paso clave en el proceso de oncogénesis de RMSA. A continuación se resumen los estudios funcionales más importantes que han dado las bases para considerar a PAX3-FKHR como un evento iniciador en el proceso de transformación de RMSA.

Primero, la expresión de la proteína quimérica PAX3-FKHR causa la transformación de fibroblastos de embrión de pollo y mioblastos (41, 84, 85). Por otra parte, cuando esta proteína es expresada en mioblastos murinos (C1212 y 10T1/2), causa la inhibición de la diferenciación terminal (47).

El silenciamiento del transcrito de fusión por medio de oligos antisentido o siARN da como resultado la reducción de la viabilidad celular a través de la inducción de la apoptosis (86, 87). Sin embargo, un estudio reciente mostró que cuando la expresión de PAX3-FKHR es inhibida utilizando siARN dirigidos contra la región de la fusión, y que por lo tanto evitan afectar la expresión de PAX3 o FKHR nativas, las células tumorales se arrestan en la fase G1, inhibiendo la tasa de proliferación celular en lugar de inhibir la apoptosis, además se observó la

reducción de los niveles de expresión de MET (un blanco conocido de PAX3 y PAX3-FKHR), disminución de la motilidad celular estimulada por HGF, la inducción de miogenina y la diferenciación muscular (88).

Sin embargo, la prueba irrefutable de la participación de PAX3-FKHR en la oncogénesis viene del primer modelo murino de RMSA (89). Este modelo es llevado por Pax3:Fkhr y se utilizaron técnicas condicionales de knock-in y knock-out. Los tumores originados en estos animales recapitulan el espectro de marcadores moleculares e histológicos que se observan en los RMSA humanos.

2.7. Blancos transcripcionales de PAX3-FKHR

Algunos grupos de investigación han intentado identificar blancos transcripcionales de PAX3-FKHR, tomando las ventajas de diferentes tecnologías. Sin embargo, hasta el momento sólo se han identificado algunos probables genes blanco PAX3-FKHR (Tabla 3) y sólo algunos de ellos han probado ser biológicamente relevantes. Algunos de los genes modulados por PAX3-FKHR se pueden asociar con características esenciales del fenotipo maligno como son, auto-suficiencia en señales de crecimiento, evasión de la diferenciación terminal, escape de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis (90).

Tabla 3. Blancos transcripcionales de PAX3-FKHR		
Gene	Función	Referencia
MyoD	Diferenciación miogénica	(91)
TFAP2B	Anti-apoptótica	(87)
MYOG	Diferenciación miogénica	(83)
CNR1		(82)
EPHA2	Protooncogén	
EPHA4		
BMP4	Apoptosis, miogénesis	
CXCR4	Migración, “homing” de la célula tumoral a hueso	(92)
Fath		(93)

Itm2A	Diferenciación	
FLT1	Proliferación celular, antagonista de VEGF	
TGFA	Mitogénesis, angiogénesis	
BVES	Desarrollo muscular, regeneración de músculo esquelético	
EN2	Desarrollo de sistema nervioso central	
GLUT4	Transporte de glucosa	(94)
IGF1R	Proliferación celular	(95)
IGFBP5 HSIX1 Slug	Supervivencia celular, diferenciación, apoptosis	(81)
MET	Proliferación celular, diferenciación, metástasis	(96)
PDGF α R	Proliferación celular, desarrollo	(80)

2.7.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento

PAX3-FKHR y no PAX3 puede activar PDGF α R a través del reconocimiento del sitio PD localizado en el promotor de PDGF α R (80). La expresión de PDGF α R está involucrada en el desarrollo de diversos linajes mesenquimales. PDGF participa en la modulación del desarrollo muscular a través de la activación de la proliferación de células precursoras musculares antes de su diferenciación a fibras musculares. La expresión del receptor de PDGF alcanza sus niveles más altos en precursores musculares y disminuye gradualmente a niveles no detectables en células musculares diferenciadas. La activación constitutiva de los receptores de PDGF puede, potencialmente, causar el crecimiento descontrolado de las células musculares, dando lugar a la formación de tumores a través de vías regulatorias autócrinas o parácrinas.

2.7.2. Evasión de diferenciación terminal

Las señales anti-crecimiento pueden bloquear la proliferación por dos mecanismos; las células pueden ser forzadas a un estado quiescente (G0) o pueden ser inducidas a estados postmitóticos, relacionados con la adquisición de características asociadas a la diferenciación (90).

Los diferentes subtipos histológicos de RMS asemejan a los diferentes estadios en la embriogénesis del músculo esquelético. La formación del músculo esquelético involucra dos pasos: (1) compromiso de los precursores mesodérmicos a mioblastos, y (2) diferenciación terminal de mioblastos a miotubos. Ambos pasos están regulados por los factores de transcripción miogénicos hélice-lazo-hélice básicos (bHLH), que incluyen Myf5, MyoD, miogenina y MRF4 (97-99). Myf5 y MyoD se expresan en mioblastos en proliferación, y miogenina y MRF4 son sólo detectados en mioblastos en diferenciación o en miotubos. Durante la miogénesis, Pax3 activa Myf5 y MyoD (Figura 2).

PAX3-FKHR induce un patrón de expresión miogénica, que incluye a los factores de transcripción MyoD, miogenina, Six1, Slug y otros genes involucrados en diferentes aspectos de la función muscular (81). Sin embargo, los RMSA escapan la diferenciación terminal a pesar de que muestran un fenotipo muscular.

Se ha sugerido que PAX3 y PAX3-FKHR funcionan como pangenes, de tal manera que las células adquieren ciertas características de diferenciación pero no la terminan. Finckenstein y cols., propusieron que la función de PAX3-FKHR como pangene está mediada, por lo menos en parte, a través de la inactivación transcripcional de MyoD por fosforilación (83, 91).

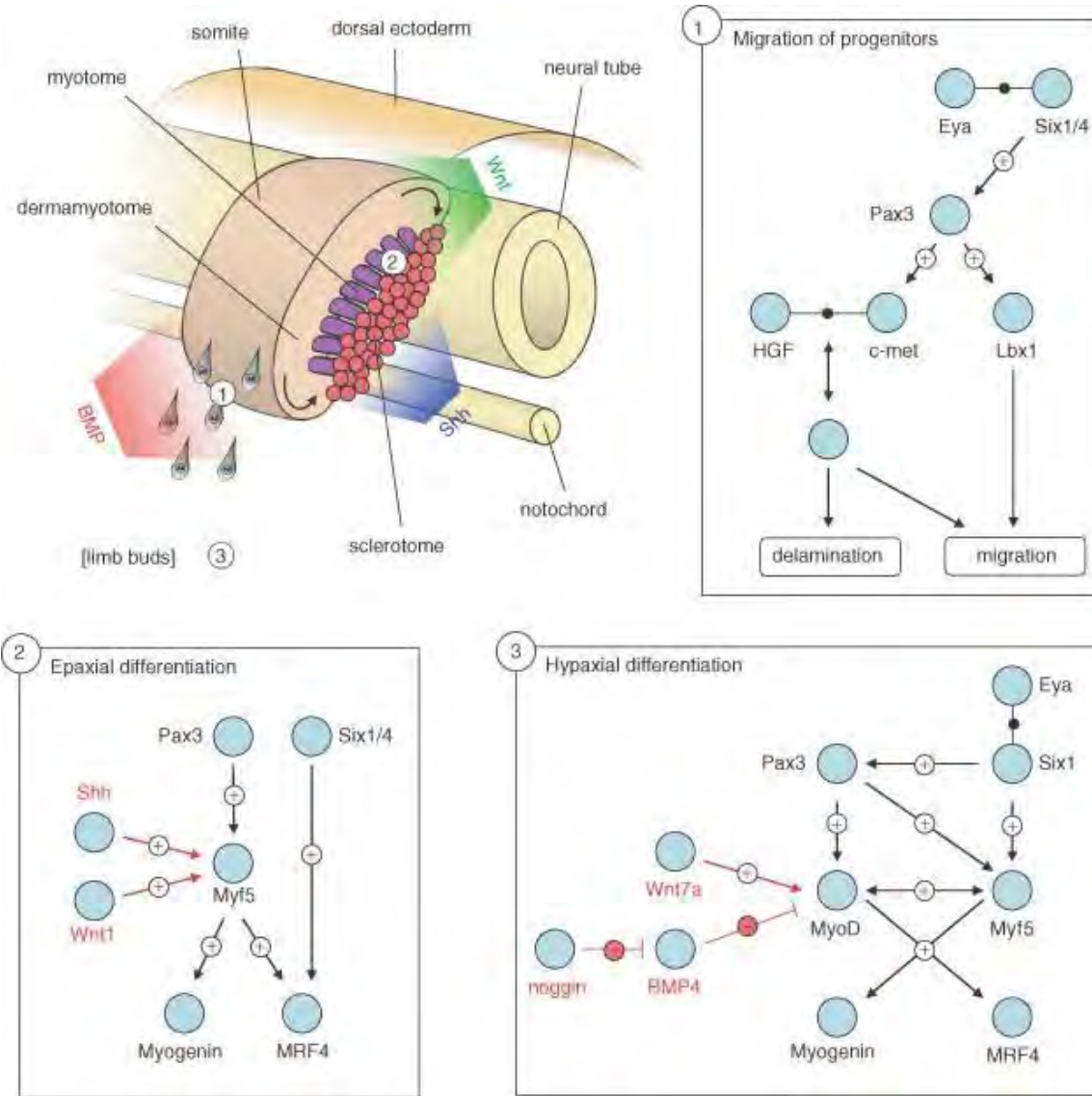


Figura 2. Regulación de la expresión génica durante la miogénesis
 Tomado de VG Punch *et al. WIREs Syst Biol Med* 2009.

2.7.3. Evasión de Apoptosis

Estudios previos han demostrado que el silenciamiento de PAX3-FKHR utilizando oligos antisentido o siARN da como resultado la disminución de la viabilidad celular a través de la inducción de la apoptosis (86). Algunos de los blancos transcripcionales de PAX3-FKHR se han asociado a esta capacidad.

Bcl-xl (BCL2L1) es una proteína anti-apoptótica, pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 y se ha implicado en la supervivencia de células de cáncer. Pax3 y PAX3-FKHR regulan transcripcionalmente a *BCL-XL*. La expresión ectópica de PAX3, PAX3/FKHR o BCL-XL puede rescatar a células tumorales de la apoptosis inducida por el tratamiento con oligos antisentido (100).

TFAP2B fue identificado como un blanco transcripcional directo de la proteína quimérica a través del silenciamiento de PAX3/FKHR utilizando siARN en líneas celulares de RMSA y comparando con el patrón de expresión de muestras de RMSA (87). Además, un estudio previo había demostrado que TFAP2B era un marcador inmunohistoquímico para RMSA positivos para la translocación (101). TFAP2B es un miembro de la familia de factores transcripcionales AP-2 y juega un papel importante en apoptosis y supervivencia de células epiteliales en conductos colectores y túbulos distales en tejidos embrionarios de ratón. La disminución de ARNm de TFAP2B en células de RMSA induce apoptosis tan eficientemente como la inhibición de PAX3/FKHR. Igualmente, la inducción de apoptosis a través del silenciamiento de PAX3/FKHR puede prevenirse a través de la sobre expresión de TFAP2B.

2.7.4. Invasión de tejidos y metástasis

Los RMSA son tumores agresivos, los pacientes frecuentemente presentan enfermedad diseminada al diagnóstico y uno de los sitios de metástasis que distingue a los RMSA de los RMSE, es la médula ósea. Dos blancos transcripcionales de PAX3-FKHR se han asociado con esta característica.

MET, es un protooncogén que codifica un receptor tirosín-cinasa y su ligando es HGF. Este receptor es un blanco transcripcional de PAX3 y PAX3-FKHR (88, 96, 102). Las respuestas celulares que desencadena MET son diversas e incluyen locomoción, quimiotaxis, adhesión e invasión. Durante el desarrollo tiene un papel primordial en el control del crecimiento y la supervivencia de células epiteliales, así

como en la migración de precursores miogénicos. MET se encuentra sobre-expresado en la mayoría de RMSA, y los niveles más elevados se asocian con muerte y estadios avanzados (103). Por otra parte; HGF, su ligando, es secretado por la médula ósea y ganglios linfáticos y se ha observado que la exposición de células de RMSA con HGF induce locomoción, formación de fibras de estrés, quimiotaxis, adhesión, invasión, y secreción de metaloproteinasas (104). Por lo tanto, es fácil pensar que este blanco podría participar directamente con la presencia de metástasis en la médula ósea.

CXCR4, fue identificado previamente como probable blanco transcripcional de PAX3-FKHR (92). CXCR4 se sobre-expresa en más del 75% de tumores, los cuales incluyen, mama, ovario, pulmón, colon, próstata, riñón, piel (melanoma), cerebro, esófago, páncreas, y varias formas de leucemia, y en tumores pediátricos como la leucemia aguda linfoblástica y los neuroblastomas. CXCR4 juega un papel importante en tres aspectos del cáncer: proliferación del tumor primario, migración de células tumorales, e invasión y establecimiento de metástasis en sitios distantes. SDF1 es el ligando de CXCR4 y en células de RMSA induce motilidad celular, adhesión, invasión y secreción de proteasas (105). Aun más, las células de RMSA tratadas con un inhibidor específico de molécula pequeña de CXCR4, T140 bloquea la adhesión y quimiotaxis en células de RMSA.

2.8. Eventos genéticos adicionales

La presencia de translocaciones recurrentes no es suficiente por si misma para crear la transformación maligna, se requieren eventos adicionales. La expresión de PAX3-FKHR en células murinas inmortalizadas a niveles que se encuentran normalmente en células de RMSA, da como resultado muerte celular o supresión del crecimiento. Este efecto se ha observado con otras proteínas de fusión. AML1-ETO causa detención del crecimiento en células mieloides y bloqueo de la diferenciación (106). Otro ejemplo es EWS-FLI1, el cual induce apoptosis y detención de crecimiento en células murinas embrionarias normales (106, 107). A

continuación se describen algunos de los eventos genéticos asociados al desarrollo de RMSA:

El locus de INK4a-ARF se localiza en el cromosoma 9p21 y codifica dos genes supresores de tumor distintos. El gen p16INK4A pertenece a la familia de reguladores del ciclo celular CDK, los cuales se unen a complejos ciclina-CDK y dan como resultado detención del ciclo celular en la fase G1, p16INK4A debe su efecto antiproliferativo a la unión e inhibición de CDK 4 y 6. p16INK4A es considerado un gen supresor de tumores, algunos de los mecanismos descritos para su inactivación incluyen deleciones, mutaciones o hipermetilación del promotor. Por otra parte, el producto del gen supresor p14ARF específicamente interactúa con “human double minute 2”, que resulta en la estabilización de p53 y arresto del ciclo celular en G1.

Estudios en modelos animales y celulares sugieren que la falta de P16INK4A es un evento colaborativo durante la transformación de RMSA (108-110). Por ejemplo, la expresión de shARN de PAX3-FKHR o p16INK4A shARN en células esqueléticas humanas primarias disminuye el intervalo de tiempo para la senescencia (111). Por otra parte, la pérdida simultánea de la función de Ink4a/ARF y la interrupción de la señalización de c-Met en ratones transgénicos Ink4a/ARF(-/-), induce RMS con alta penetrancia y corta latencia (112). Otro modelo de ratón de RMSA llevado por Pax3:Fkhr mostró que los ratones heterocigotos para Pax3:Fkhr tienen una baja frecuencia de tumores, pero los animales con una alteración adicional, ya sea en las vías de INK4a/ARF o Tp53, incrementan su frecuencia significativamente (89).

Las células de RMSA expresan niveles elevados IGF-II y se ha observado que mioblastos de ratón C2C12 transfectados con IGF-II y PAX3-FKHR modifican su morfología, no se diferencian e incrementan su tasa de proliferación (113). Los tumores que se derivan de las células transfectadas con IGF-II/PAX3-FKHR crecen más rápidamente comparados con aquellos tumores derivados de células transfectadas sólo con IGF-II o PAX3-FKHR. PAX3-FKHR induce que las células

C2C12 entren al ciclo celular y promueve la proliferación mientras que bloquea la miogénesis. Por el otro lado, IGF-II inhibe la diferenciación sin influenciar la proliferación (114).

Ren y colaboradores utilizaron células madre mesenquimales (supuestas células de origen de RMS) para identificar eventos colaborativos de PAX-FKHR (115). En dicho estudio se observó, como en otros estudios, que PAX-FKHR induce miogénesis a través de MyoD y miogenina. Sin embargo, PAX-FKHR solo no puede inducir la formación de colonias en agar suave ni tumores en ratón. Por el contrario, la expresión de un dominante negativo de p53 o de la región temprana de SV40, provocó la formación de tumores en algunas de las poblaciones que expresan PAX-FKHR. Asimismo, la activación adicional de la vía de señalización de Ras dio lugar a la formación de tumores malignos en todas las poblaciones. Los tumores analizados en este estudio tenían perfiles histológicos, inmunohistoquímicos y de expresión génica similares a los RMSA humanos (115).

La hibridación genómica comparativa (CGH) es una técnica que permite el tamizaje genómico completo para identificar pérdidas y ganancias en el número de copias del ADN. Los análisis genéticos por CGH pueden claramente identificar regiones genómicas asociadas con el fenotipo, y los genes involucrados en estas regiones podrían representar eventos colaborativos oncogénicos. Los estudios de CGH en tumores de RMSA han identificado diferentes regiones, sin embargo, las alteraciones genéticas más consistentes son regiones amplificadas en 2p24 (MYCN) y 12q13-15 (MDM2- CDK4) (14, 116, 117). Un análisis detallado de los eventos de amplificación que involucran estas regiones cromosómicas utilizando arreglos de números de copia de alta densidad mostró que la mínima región común de amplificación para el amplicón 2p24 es de 0.83 Mbp y los únicos dos genes localizados fueron, DDX1 y MYCN. Por otra parte, se encontraron dos eventos de amplificación en 12q13-15, 12q13.3-q14.1 y 12q15. La mínima región amplificada para el primer evento se refinó a 0.55 Mbp la cual contiene 27 genes (CDK4, CENTG1, DDIT3, DTX3, MBD6, PIP5K2C, etc.). En el caso de 12q15, la

mínima región común amplificada es de 2.2 Mbp y contiene 27 genes, incluyendo MDM2 (118).

2.9. Factores transcripcionales que colaboran con PAX3-FKHR

La transcripción resulta de interacciones moleculares que involucran la acción sinérgica de múltiples factores de transcripción. Los STAT son una familia de factores de transcripción que son activados por fosforilación en respuesta a diferentes factores de crecimiento y citocinas. La activación aberrante de STAT3 se ha reconocido en diversos tipos de cáncer, causando una regulación negativa de la respuesta inflamatoria y una inhibición de la comunicación entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa, permitiendo el crecimiento descontrolado del tumor. PAX3-FKHR forma un complejo con STAT3 que altera la activación de los blancos transcripcionales de STAT, la interacción de ambas proteínas se lleva a cabo a través de la secuencia de FKHR (119). La unión de estos dos factores de transcripción da como resultado una disminución en la expresión de MHC, y una alteración en las concentraciones de citocinas, lo cual permite la inhibición de células inflamatorias y la detección inmune.

2.10. PAX3-FKHR vs. PAX7-FKHR

El 10 a 15 % de los casos de RMSA presentan la translocación t(1;13) que fusiona los genes PAX7 y FKHR. Esta variante incluye el locus 1p36 que codifica para PAX7, que es un gen homólogo a PAX3, y el mismo locus de FKHR, generando el gen de fusión PAX7-FKHR (63). PAX3 y PAX7 pertenecen a la misma subfamilia de factores de transcripción.

Pax7 se localiza en el dermomiótomo medial y en conjunto con Pax3 participa en el establecimiento de la musculatura epiaxial (37, 120). Pax7 también participa en la supervivencia y migración de las células precursoras miogénicas que originan los músculos de la cabeza (121). Por último, Pax7 es el responsable del

crecimiento y regeneración del músculo esquelético adulto a través de asegurar la supervivencia de las células satélite (122). Los ratones “Knock out” Pax7, no tienen alteraciones en el desarrollo muscular prenatal, pero se observan anomalías maxilares y nasales (123). Los ratones homocigotos, mueren a las 3 semanas de nacimiento, y presentan disminución de las masas musculares, adelgazamiento del diafragma, y son significativamente más pequeños que los ratones heterocigotos o normales (121). Estas anomalías se han atribuido a la ausencia de células satélite, las cuales son necesarias para el crecimiento post-natal del músculo esquelético (124).

El tipo de fusión presente en los RMSA se ha asociado en algunos estudios con características clínicas distintivas. En pacientes con enfermedad metastásica se encontró una diferencia contundente en la supervivencia. Los pacientes con RMSA positivos para PAX7-FKHR presentaron una supervivencia global de 75% comparados con sólo el 8% en el grupo positivos para PAX3-FKHR (26). Además, más del 50% de los pacientes positivos para PAX3-FKHR presentaron metástasis a médula ósea y el 25% presentó metástasis a pulmón. Por el contrario, no hubo incidencia de estos sitios de metástasis en la cohorte de pacientes positivos para PAX7-FKHR.

3. Justificación

Los RMSA son tumores agresivos, la sobrevida para pacientes con respuesta marginal a quimioterapia y enfermedad metastásica es menor del 30% y no ha cambiado en más de dos décadas, por lo tanto, un mejor entendimiento de la biología de este tumor podría llevarnos al diseño de nuevas terapéuticas específicas para RMSA. Alteraciones genéticas consistentes y específicas se han identificado en la mayoría de los casos de RMSA. El 50% de los casos presentan la translocación cromosómica t(2;13), que une los genes PAX3 y FKHR. Estudios previos han demostrado que la presencia del gen de fusión PAX3-FKHR es una alteración genética fundamental para el desarrollo de RMSA y está asociada con un comportamiento clínico más agresivo. Este gen de fusión codifica un factor transcripcional quimérico, formado por la región N-terminal de PAX3 que contiene el sitio de unión a ADN, y por la región C-terminal de FKHR el cual contiene el dominio de activación transcripcional. Previamente se ha sugerido que el principal mecanismo oncogénico de PAX3-FKHR, es la exageración de su función normal como factor transcripcional resultando en la falta de regulación de sus blancos transcripcionales y de las vías en los que estos intervienen. Es por esto que en los últimos años se han realizado esfuerzos para identificar aquellos genes que son blancos transcripcionales de PAX3-FKHR. Este problema sólo se ha abordado limitadamente, los genes identificados son escasos, y la mayoría de ellos no ha demostrado ser relevante en un medio miogénico. Esto es debido a diferentes circunstancias, la primera es que el precursor celular específico de RMSA no se ha identificado completamente, por lo tanto, la mayoría de los estudios han utilizado subrogados como fibroblastos para identificar cambios en la expresión de genes individuales, sin embargo, existe evidencia que muestra que los blancos transcripcionales de factores de transcripción son célula-específicos. Además, algunos de los blancos identificados, al ser estudiados en el contexto de muestras tumorales han resultado ser no relevantes. La identificación de blancos transcripcionales de PAX3-FKHR debe ser estudiada en un ambiente celular similar y los blancos identificados deben ser validados en el ambiente tumoral. La

identificación de blancos transcripcionales de PAX3-FKHR podría tener importantes implicaciones clínicas; las proteínas identificadas pueden utilizarse como marcadores biológicos que podrán ayudar a un mejor diagnóstico y pronóstico. Además, aquellas intervenciones terapéuticas que sean dirigidas para inactivar las vías involucradas, representan nuevas oportunidades de tratamiento para los pacientes con RMSA que en un futuro podrían mejorar su supervivencia.

4. Hipótesis

Los genes que son inducidos por la expresión del constructo inducible de PAX3-FKHR en un ambiente miogénico y diferencialmente expresados en rhabdomiomas alveolares y embrionarios, probarán ser blancos transcripcionales relevantes del factor de transcripción quimérico PAX3-FKHR.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Identificar y caracterizar un grupo de genes que son blancos transcripcionales de PAX3-FKHR en un ambiente de RMSE y que se expresan de manera diferencial entre rhabdomiomas alveolares y embrionarios.

5.2. Objetivos específicos

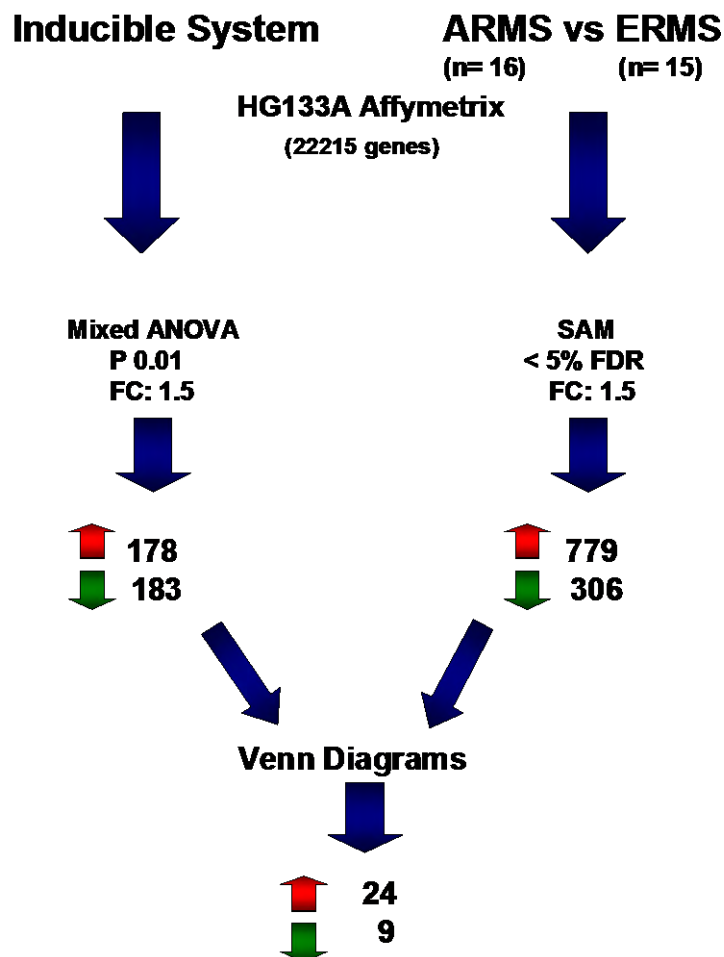
- 5.2.1. Identificar los cambios en el patrón de expresión genética mediados por PAX3-FKHR a través de la introducción de un constructo inducible en líneas celulares de rhabdomioma embrionario tratadas o no con 4-OHT, y analizadas por la técnica de microarreglos.
- 5.2.2. Identificar las diferencias en el patrón expresión genética en Rhabdomiomas Alveolares positivos para PAX3-FKHR con respecto a los hallazgos en Rhabdomiomas Embrionarios.
- 5.2.3. Identificar aquellos genes que su expresión está regulada por PAX3-FKHR y que a su vez muestran un patrón de expresión diferente al comparar rhabdomiomas alveolares y embrionarios.

6. Metodología y Resultados

6.1. Descripción general del estudio

Con el propósito de identificar blancos transcripcionales de PAX3-FKHR que sean relevantes en RMSA, comparamos los perfiles de expresión de dos grupos de muestras independientes (Figura 3). El primer grupo de muestras consistió en un sistema de cultivo celular donde se utilizan células de RMSE que expresan una forma inducible de PAX3-FKHR (P3FK/ER). El segundo grupo de muestras consistió en RMS tanto RMSE fusión negativos como RMSA positivos para PAX3-FKHR. La estrategia en general fue utilizar microarreglos de cADN para determinar los blancos transcripcionales de PAX3-FKHR en un sistema celular y comparar con las diferencias en perfiles de expresión entre los dos subtipos de RMS en el segundo sistema. Posteriormente estos dos grupos fueron comparados en un paso final para identificar aquellos genes inducidos por PAX3-FKHR que están diferencialmente expresados entre RMSA fusión negativos y RMSA fusión positivos.

Figura 3. Visión general del estudio



6.2. Genes regulados por PAX3-FKHR en un medio miogénico

La evidencia sugiere que los RMSA se originan como consecuencia de una falta de regulación del crecimiento y diferenciación de una célula músculo-esquelética. Para poder identificar genes regulados por esta oncoproteína es importante expresarla en la célula de origen del tumor, en este caso, como se comentó anteriormente, en un mioblasto. Sin embargo, cuando se inició este estudio no contábamos con mioblastos humanos inmortalizados, por este motivo decidimos utilizar líneas celulares de rhabdomyosarcoma embrionario, las cuales también se derivan de músculo esquelético pero no expresan los genes de fusión PAX3/PAX7-FKHR.

El constructo para la forma inducible de la proteína quimérica PAX3-FKHR (P3FK/ER) fue elaborado previamente en el laboratorio (92). Este constructo fue creado a través de fusionar PAX3-FKHR con el dominio de unión a ligando modificado del receptor de estrógenos (125). El mecanismo regulatorio de este sistema consiste en que en las células la proteína quimérica PAX3-FKHR/ER, se une a proteínas inhibitorias en la ausencia de su ligando (Figura 4). Cuando se agrega el ligando 4-hidroxitamoxifen (4-OHT), la proteína PAX3-FKHR/ER se libera y se transloca al núcleo donde se une a sus sitios de unión en el ADN, efectuando de esta manera, la regulación de sus genes blanco (125-130).

6.2.1. Material y Métodos

6.2.1.1. Diseño del Estudio

Esta fase del proyecto es un estudio experimental, que se puede clasificar como un estudio de laboratorio aleatorizado y controlado.

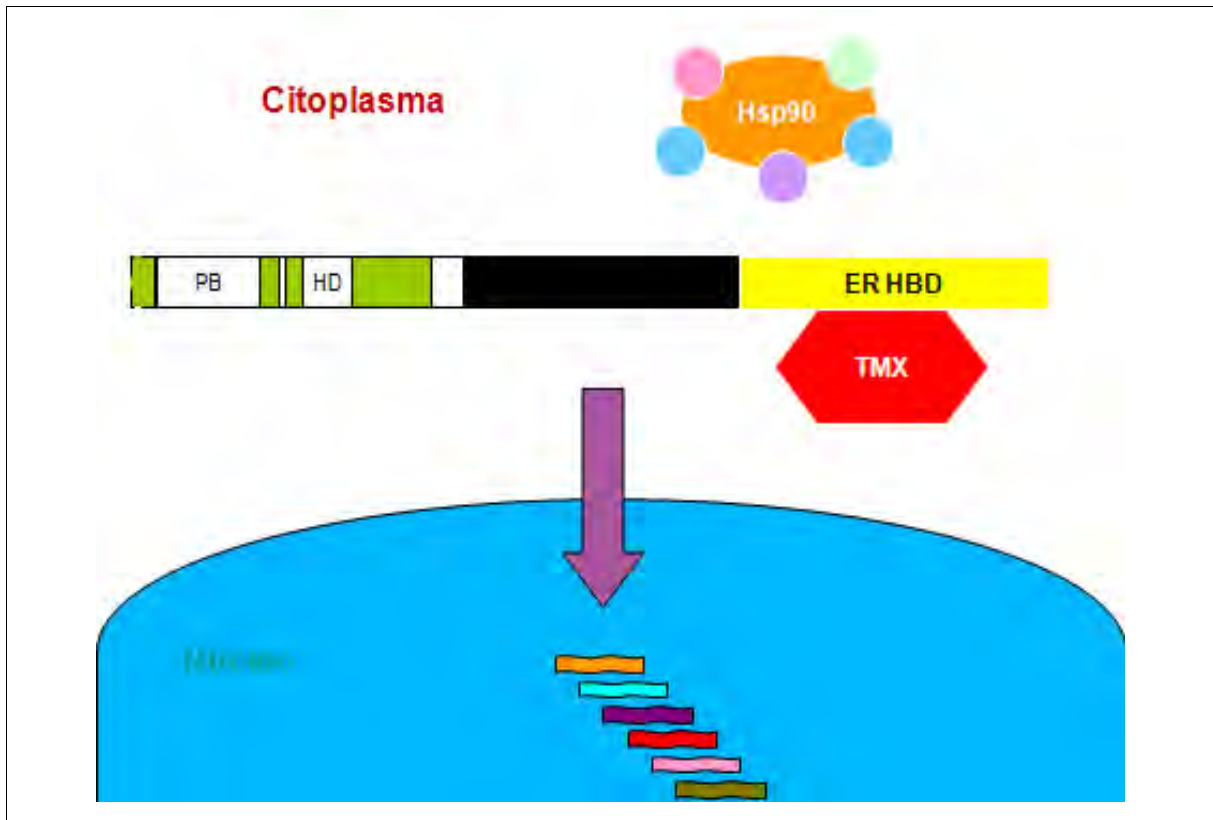


Figura 4. Sistema inducible PAX3-FKHR/ER. Este constructo fue creado a través de fusionar PAX3-FKHR con el dominio de unión a ligando modificado del receptor de estrógenos. La proteína quimérica PAX3-FKHR/ER, se une a proteínas inhibitorias en la ausencia de su ligando, al adicionar el ligando 4-hidroxi4-OHT (4-OHT), la proteína PAX3-FKHR/ER se libera y se transloca al núcleo donde se enlaza a sus sitios de unión en el ADN lo cual resulta en la regulación de sus genes blanco.

6.2.1.2. Cultivos Celulares

El mantenimiento de las líneas celulares humanas de RMSE (RD, SMS-CTR, RH6 y RH36), RMSA, (RH18, MP-4, SJCRH30 y RH28) y la línea celular de riñón embrionario humano 293 T, fueron cultivadas en DMEM (Gibco) con 10% de suero bovino fetal (HyClone), suplementado con penicilina, estreptomina y fungizone (Life Technologies). Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ y con una temperatura de 37°C.

6.2.1.3. Constructo, transfección y producción de retrovirus

Para generar este constructo, el codón de PAX3-FKHR se reemplazó a través de mutagénesis *in vitro* con un conector que contenía Sac II (131). Después de la inserción de un fragmento de 1 kb que contiene el dominio de unión a ligando ER en el sitio de SacII, el fragmento de PAX3-FKHR se removió como un fragmento SacI y se insertó a un vector retroviral bicistrónico, pK1. Este vector expresaba el gen de resistencia a puomicina como marcador de selección.

Después de la co-transfección transitoria en células 293T con el clon de pK1 y los plásmidos que codificaban para los genes gag-pol y env, las partículas retrovirales se colectaron, concentraron y posteriormente fueron usadas para infectar líneas celulares de RMSE.

Las células no infectadas se seleccionaron utilizando un medio que contenía puomicina (Clontech cat. 631360) (0.35 – 2 µg/ml) durante 72 hrs. Esta población policlonal se expandió y se dividió en alícuotas las cuales fueron congeladas para experimentos subsecuentes. Este procedimiento fue repetido varias veces para generar un total de cinco poblaciones independientes transducidas con P3FK/ER y controles transducidos con el vector vacío pK1.

6.2.1.4. Anticuerpos y análisis de western blot

Para monitorear el nivel de expresión de la proteína PAX3-FKHR/ER se realizó western blot con antisuero policlonal de PAX3. Los extractos celulares fueron preparados utilizando buffer RIPA (1 X PBS, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) y se agregaron los inhibidores de proteasas, 1µM, aprotinina 1µg/ml, pepstatina 2µg/ml, leupeptina 1µg/ml. Posteriormente, 40 µg de proteína fueron fraccionados en un gel NuPAGE 4-12% (Invitrogen), y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada por una hora en buffer PBS-Tween (63mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 75 mM NaCl, 0.1% Tween 20%, pH 7.4) con 5% de leche en polvo para bloquear la unión proteica no-específica. Posteriormente, las membranas fueron tratadas con el anticuerpo anti-PAX3 por

una hora, y a continuación con el anticuerpo secundario correspondiente. PAX3-FKHR fue visualizada por medio de quimioluminiscencia (Amersham).

6.2.1.5. Ensayo para medir actividad transcripcional (luciferase reporter assay)

Para verificar que los constructos estuvieran produciendo proteínas funcionales e inducibles, se midió la actividad transcripcional a través del método “dual luciferase” (Promega). Los experimentos de luciferasa se realizaron mediante transfección transitoria de células RD pK1 o RD PAX3-FKHR/ER con Fugene6 (Roche Applied Science). Las células fueron sembradas durante 24 hrs. previas al experimento a una densidad de $10^4/cm^2$ en placas de 24 pozos. Posteriormente, fueron transfectadas con 300 ng del reportero 6xPRS-9 y 15 ng del plásmido pRLTL. Los lisados celulares fueron medidos para la expresión de gen reportero de luciferasa de la luciérnaga. Las cantidades de lisado celular fueron normalizadas para eficiencia de la transfección, la cual fue determinada a través de la expresión de luciferasa de renilla. Los resultados fueron expresados en unidades absolutas de luciferasa.

6.2.1.6. Extracción de ARN

Para la purificación de ARN de las células, se utilizó el kit ARNeasy Mini kit (Qiagen cat. No. 74104) y se siguió el protocolo de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

6.2.1.7. Hibridación y Escaneo de los Microarreglos

El método de microarreglos se utilizó para identificar los genes modulados por PAX3-FKHR en un medio miogénico. Se utilizó el chip de Affymetrix HGU133A, este chip contenía 22,215 sondas representando 18,400 transcritos y variantes, entre los cuales se encontraban 14,500 genes adecuadamente caracterizados. La preparación de las sondas del ARN, hibridación y el escaneo se realizó en la

Facilidad de Microarreglos (Microarray core facility) de la Universidad de Pennsylvania. A continuación se resume la metodología que se siguió para el procesamiento de las muestras.

A partir de 5-10 µg de ARN total, se sintetizó su correspondiente cADN utilizando la transcriptasa reversa Superscript II, utilizando oligómeros poli(T) e incorporando el promotor T7. La síntesis de la segunda cadena se realizó por transcripción *in vitro* a partir del promotor T7 para amplificar linealmente cada transcrito e incorporar CTP o UTP biotinilado. Los productos ARNc se fragmentaron en 200 nucleótidos o menos, se desnaturalizaron a una temperatura de 99°C y se hibridaron durante 16 hrs. a 45°C al chip HGU133A. Los microarreglos se lavaron a baja (6X SSPE) y alta (100nM MES, 0.1 M NaCl) astringencia y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina. La fluorescencia se amplificó adicionado antiestreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de la tinción estreptavidina-ficoeritrina. Para recolectar la señal fluorescente se utilizó un scanner confocal fluorescente (GCS 2500 scanner) con una resolución de 3 µm después de una excitación a 570nm. Para cada microarreglo se calculó el promedio de la señal obtenida de dos escaneos secuenciales.

6.2.1.8. Análisis de datos de microarreglos

Los valores fueron normalizados y transformados a escala logarítmica con el programa GeneSpring. Los grupos fueron comparados utilizando la prueba Mixed Anova utilizando el programa Partekpro.

6.2.2. Resultados

6.2.2.1. Sistema inducible PAX3-FKHR/ER

La línea celular RD fue infectada con partículas virales que contenían el constructo PAX3-FKHR/ER o el vector vacío pK1. Con el fin de contar con replicas biológicas para el estudio de microarreglos, se realizaron 5 transducciones independientes de las cuales se seleccionaron tres. Esta selección se realizó en base a la expresión proteica de PAX3-FKHR/ER. Como se observa en la Figura 5, los tres clones mostraron una expresión de PAX3-FKHR/ER similar.

Posteriormente, se determinó si la proteína PAX3-FKHR/ER en las 3 diferentes clonas mostraba una función transcripcional inducible al tratar las células con el ligando 4-OHT. Para este experimento los clones RD pK1 y RD PAX3-FKHR/ER fueron transitoriamente transfectados con un constructo que contenía el gen reportero de luciferasa unido a los sitios de unión a ADN multimerizados de PAX3 (6xPRS-9). Se realizó la inducción de PAX3-FKHR/ER utilizando diferentes concentraciones de 4-OHT (Fig. 6). En cultivo celular, el rango de respuesta de 4-OHT para P3FK/ER fué de 1 – 100 mM, con una inducción máxima a 100 mM, la expresión del rango dinámico tuvo una variación de 1.2 > 23 veces. La actividad de luciferasa fue mínima en la región de dosis bajas (1 a 10 nM), seguida por un incremento importante a 30 nM, el cual se estabilizó a dosis de 100 nM. Es importante hacer notar que el sistema inducible presentó actividad basal sin tratamiento con 4-OHT, por lo tanto nuestro sistema inducible mostró filtración basal, sin embargo, la diferencia observada en la expresión génica entre el estado inducido y no-inducido fue significativo, por lo tanto consideramos que la filtración basal no contribuyó substancialmente a la actividad en el rango de dosis altas.

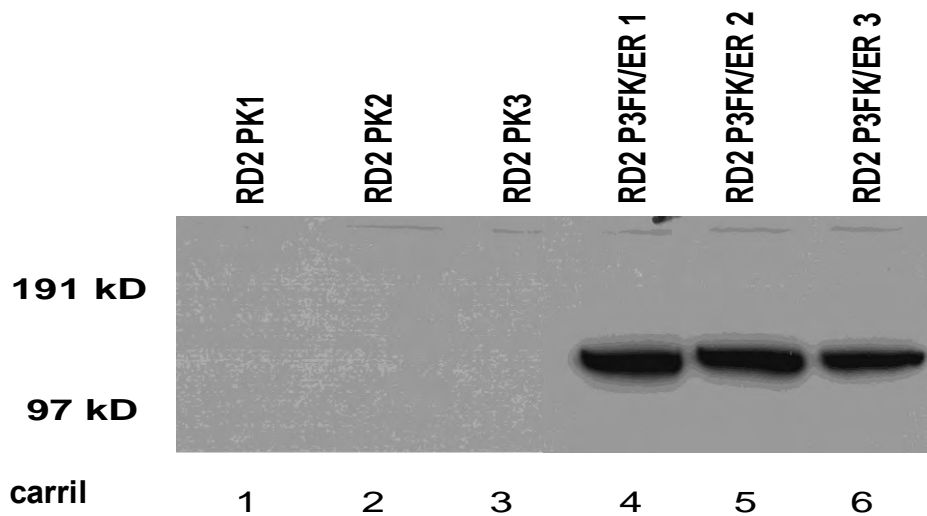


Figura 5. Expresión de PAX3-FKHR en diferentes clonas RDP3FK/ER. Las células RD crecieron en cajas de 10 cm. a una densidad de 1×10^6 durante 24 hrs. Cinco clonas de la línea celular RD fueron infectadas con PAX3-FKHR/ER o pK1. Tres clonas de cada grupo fueron seleccionadas, RD pK1 carriles 1,2,3 (carriles 1, 2, 3) y tres clonas RD P3FK/ER (carriles 4, 5, 6). Se obtuvieron los extractos celulares para analizar por ensayo de western blot la expresión de la proteína PAX3-FKHR. El resultado que se muestra es uno de 3 repeticiones.

Para seleccionar la dosis apropiada para tratar a las células de los experimentos para microarreglos, las células RD P3FK/ER fueron tratadas con diferentes concentraciones de 4-OHT (1 – 100 nM) durante 24 hrs y los niveles de expresión de CXCR4 y MET fueron cuantificados por qRT-PCR (CXCR4 y MET fueron identificados previamente en el laboratorio como blancos transcripcionales de PAX3-FKHR). Para todos los experimentos los controles fueron células transfectadas con vectores vacíos pK1 y fueron tratados con las mismas dosis de 4-OHT. La expresión de los transcritos de CXCR4 y MET es mínima a dosis bajas de 4-OHT (1 nM), sin embargo a dosis de 30 nM se obtuvo la expresión máxima, la cual se estabilizó con dosis de 100 nM. Además las células tratadas con dosis mas altas de 30 nM mostraron detención del crecimiento (No se muestran estos datos).

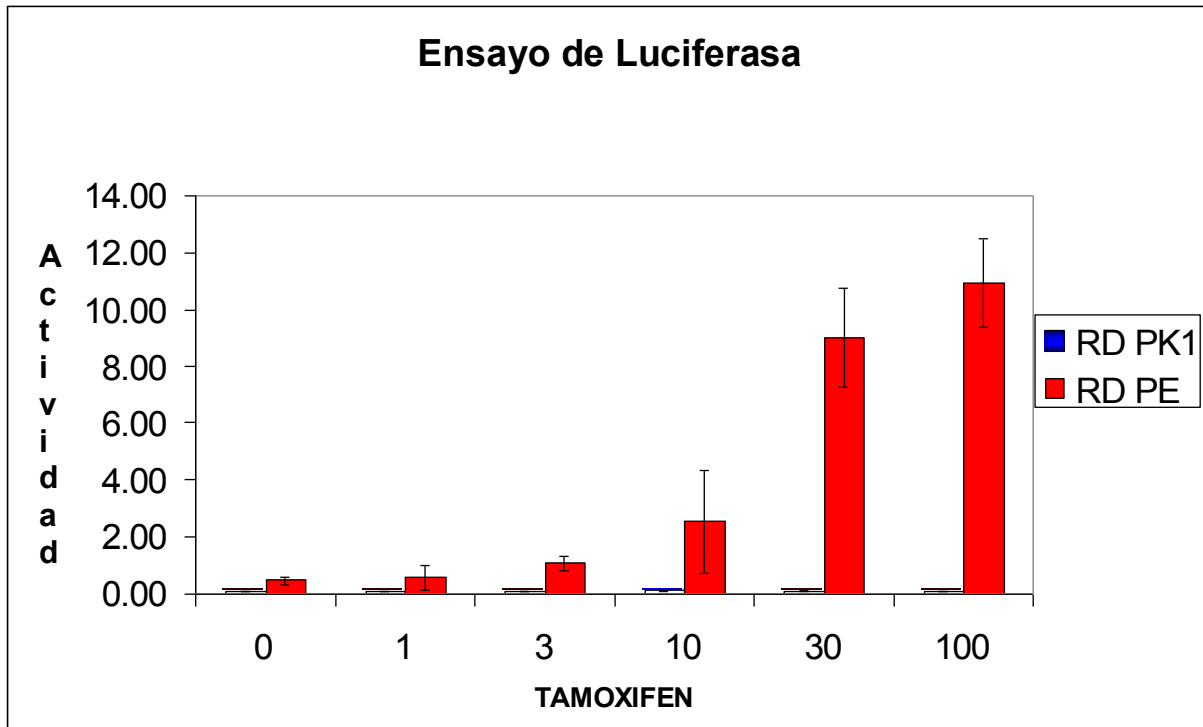


Figura 6. Curva dosis-respuesta de la actividad transcripcional de PAX3-FKHR/ER. La actividad de luciferasa fue medida en lisados celulares de RD pK1 y RD PAX3-FKHR/ER transfectados con el reportero Luc 6xPRS-9 y tratados con 4-OHT (0 – 100 nM).

6.2.2.2. Análisis de microarreglos

6.2.2.2.1 Análisis inicial de los datos

Para cuantificar los niveles de expresión de los genes se utilizó el programa Affymetrix Microarray Suite 5.0; para todos los parámetros del análisis se aplicaron los valores ya predeterminados en el programa. Los píxeles limítrofes se eliminaron, y el promedio de la intensidad de los píxeles dentro del percentil 75 se calculó para cada una de las sondas. Se definió como “background” el promedio del 2% de las intensidades más bajas de las sondas que se presenta en cada uno de los 16 sectores del microarreglo, este valor se restó de cada uno de los componentes de dichos sectores. Los pares de sondas se clasificaron en positivos

o negativos, para detectar la secuencia blanco, al comparar las señales del apareamiento perfecto y de apareamiento incorrecto. El número de pares de sondas que cumplieron con el umbral de discriminación predeterminado ($\tau = 0.015$) se utilizó para asignar cada gen a las categorías: presente, ausente o marginal, y se calculó un valor de p que reflejó la confianza para esta detección. El promedio de la fluorescencia de la sonda (el cual fue corregido para señal inespecífica al substrair el valor de la sonda con apareamiento incorrecto), fue calculado utilizando el estimado "One-step Tukey's Biweight". Este valor, que es una medida relativa del nivel de expresión, fue calculado para cada uno de los genes que se estudiaron. Se aplicó "Global scaling" para permitir la comparación de la señal de los genes entre múltiples microarreglos: en breve, después de la exclusión del 2% más alto y más bajo, el promedio total de la señal del chip fue calculado y se utilizó para determinar el factor que se requería para ajustar el promedio del chip a un valor arbitrario de 150. Todos los valores de las señales de un microarreglo se multiplicaron por este factor.

6.2.2.2.2. Normalización por Gene Spring

Los archivos fueron cargados en el software GeneSpring (Silicon Genetics, Inc.), para realizar la normalización de los niveles de expresión de cada replicado. Para la normalización decidimos utilizar GCRMA, este método utiliza el contenido de GC de las sondas en la normalización con RMA (Robust Multi-Array; lo cual da un valor para cada grupo de sondas en lugar de guardar la información del nivel de las sondas). El procedimiento de GCRMA se ajustó para el ruido de fondo y la unión no específica (NSB) tomando en cuenta el efecto de la unión más fuerte de los pares G/C (132, 133).

6.2.2.2.3. Genes diferencialmente expresados

Para identificar aquellos genes que son regulados por la oncoproteína PAX3-FKHR, se evaluó el perfil de expresión genética de las células RD PAX3-FKHR/ER por medio de la técnica de microarreglos utilizando como control, células transfectadas con el vector vacío. Ambas células fueron tratadas con 4-OHT

durante 24 hrs. a una concentración de 30 nM. Para poder realizar un análisis estadístico se utilizaron 3 replicas biológicas por tipo celular y por tratamiento. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Partek Pro (statistical analysis and interactive data visualization system). Utilizamos la prueba estadística Mixed Anova, la cual se basa en un diseño factorial que incluye tanto variables intra como inter sujetos. Las variables que se incluyeron fueron el tipo de constructo (PAX3-FKHR/ER o pK1), y el tipo de tratamiento (0 o 30 nM 4-OHT).

Con el propósito de identificar aquellos genes que cambian su expresión por el tratamiento con 4-OHT, se comparó el perfil genético de RD pK1 con y sin 4-OHT en este análisis, se encontró que no se expresó ningún gen de forma estadísticamente significativa. Posteriormente, se intentó identificar aquellos genes en los cuales la expresión cambiaba con niveles basales de PAX3-FKHR/ER, comparando RD pK1 vs. RD PAX3-FKHR y tampoco en este caso encontramos genes estadísticamente significativos. Por último, se comparó RD PAX3-FKHR/ER vs. RD PAX3-FKHR/ER + 4-OHT, de este listado de genes se seleccionaron sólo aquellos que tuvieran un valor de p menor de 0.01 y una diferencia absoluta de expresión de por lo menos 1.5. Finalmente, obtuvimos un total de 361 genes, de los cuales 178 estaban sobre-expresados y en 183 la expresión disminuyó al inducir PAX3-FKHR/ER.

6.3. Genes diferencialmente expresados entre rhabdomiosarcomas embrionarios y alveolares

El sistema inducible nos ayuda a identificar genes que modifican su expresión cuando P3FK/ER es activado. Sin embargo, estas utilizando un sistema subrogado, por lo tanto, es esperado que algunos de los genes identificados no sean relevantes en los RMSA. Por lo tanto, decidimos comparar los perfiles de expresión de tumores RMSA positivos para PAX3-FKHR y RMSE, esperamos que algunos de los genes que están diferencialmente expresados entre ambos subtipos representen blancos transcripcionales de PAX3-FKHR biológicamente importantes.

6.3.1. Materiales y Métodos

6.3.1.1. Diseño del Estudio

De acuerdo a la clasificación de Feinstein el presente estudio se puede clasificar como un estudio de casos y controles, transversal, analítico, y observacional.

6.3.1.2. Sujetos de estudio

Se colectaron biopsias de pacientes con rhabdomiosarcoma obtenidas con propósitos diagnósticos o terapéuticos en el Children's Hospital of Philadelphia, Memorial Sloan Kettering o el Hospital de la Universidad de Pensilvania. Muestras adicionales fueron obtenidas del "Cooperative Human Tissue Network".

6.3.1.3. Criterios de selección

Los siguientes criterios de inclusión y exclusión fueron utilizados para la selección de los sujetos de estudio:

Criterios de Inclusión

1. Hombres o mujeres de 0 a 17 años
2. Consentimiento informado firmado por los padres o tutores
3. Autorización por escrito para el uso y revelación de información protegida de salud
4. Diagnóstico confirmado de rhabdomioma alveolar y rhabdomioma embrionario por morfología e inmunohistoquímica
5. Diagnóstico molecular de genes de fusión

Criterios de Exclusión:

1. Calidad inadecuada del ARN
2. Confirmación por histopatología de tener menos de 70% de células tumorales en la muestra
3. Por lo menos 5 µg de ARN por muestra

6.3.1.4. Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra fue realizado utilizando la herramienta del centro de bioinformática MD Anderson. Los parámetros utilizados para el cálculo fueron el número de genes que se encontraron en el microarreglo, el número de falsos positivos que se estaba dispuesto a aceptar, cambios absolutos entre los dos grupos, el poder de la prueba (porcentaje de los genes diferencialmente expresados que es probable que serían detectados en este experimento) y un estimado de la desviación estándar de las mediciones de las intensidades de los genes en una escala logarítmica base dos. El número de genes fue 22,500, tasa de falsos positivos de 1% (225), el cambio absoluto 2, poder 0.8 y una desviación estándar de 0.7, el tamaño de muestra para estas condiciones es 12 para cada grupo (alfa 0.01). Nosotros incluimos 15 RMSE y 16 RMSA para nuestro análisis.

<http://bioinformatics.mdanderson.org/MicroarraySampleSize/MicroarraySampleSize.aspx>).

6.3.1.5. Histopatología

Las muestras de tejido fresco se obtuvieron durante la cirugía, se congelaron en nitrógeno líquido y fueron guardadas a -70°C . En total se evaluó el perfil de expresión genética de 31 casos, 16 RMSA positivos para PAX3-FKHR y 15 RMSE. Las secciones congeladas fueron teñidas con hematoxilina y eosina (HE) para confirmar que el contenido de células tumorales fuera de $> 80\%$.

6.3.1.6. Detección de los transcritos PAX3-FKHR

Los transcritos de PAX3-FKHR fueron detectados por medio de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) con sondas específicas o utilizando RT-PCR e hibridación diferencial después de slot blotting (25, 27).

6.3.1.7. Extracción de ARN

Para preparar ARN total del tejido tumoral, 50 – 100 mg de tejido congelado fueron homogenizados directamente con ARN STAT60TM (Tel-Test Inc.) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante para la purificación de ARN. El ARN precipitado fue resuspendido en H_2O y guardado a -70°C . La calidad de los ARN fue evaluado por medio de geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído y la concentración fue determinada por medio de espectrofotómetro. La proporción 260/280 fue mayor de 1.8 en todos los casos.

6.3.1.8. Hibridación, escaneo de los microarreglos y análisis inicial de los datos

La metodología seguida para la hibridación, así como para el escaneo y análisis inicial de los datos, fue la misma que se describió previamente para el apartado 6.2

6.3.1.9. Análisis de Tumores

Los valores fueron normalizados y transformados a escala logarítmica con el programa GeneSpring. Posteriormente, estos valores fueron comparados utilizando el programa SAM 2.1 (Significance Analysis of Microarrays). SAM utiliza un algoritmo de pruebas múltiples basado en permutaciones e identifica genes significativos con un índice variable de falsos positivos (FDR, false discovery rate) (134). SAM toma en cuenta las mediciones de expresión de cada gen así como una variable de respuesta para cada experimento. Se calcula el estadístico d_i para cada gen i , midiendo la fuerza de asociación entre la expresión de cada gen y la variable de respuesta. Los datos se permutan repetidamente para determinar si la expresión de cualquier gen es significativa con relación a la respuesta. Las pruebas de permutación, generalmente se llevan a cabo a través de cambiar repetidamente los niveles de las clases y realizando pruebas estadísticas t de todos los genes en los datos, de esta manera se captura mejor la estructura no conocida de los datos. Para establecer el nivel de significancia se toma en cuenta el valor delta, el cual es seleccionado por el usuario de acuerdo al índice de falsos positivos.

6.3.2. Resultados

6.3.2.1. Análisis de microarreglos.

Se compararon los perfiles de expresión de 31 muestras de RMS, 15 RMSE y 16 RMSA, estas últimas, positivas para el gen de fusión PAX3-FKHR, lo cual fue corroborado por RT-PCR y southern blot. Para este análisis utilizamos el programa SAM (Significance Analysis of Microarrays). Se realizaron 600 permutaciones, y se seleccionaron aquellos genes con un delta 0.85 o mayor y un índice de falsos positivos menor o igual a 5%. Además, utilizando el programa GeneSpring, se seleccionaron solo aquellos genes que tuvieran por lo menos una diferencia absoluta de 1.5 veces. Bajo estas condiciones identificamos 1,085 sondas que se encuentran diferencialmente expresados entre los dos subtipos morfológicos, 779 genes sobre expresados en RMSA y 306 sobre expresados en RMSE.

6.4. Genes regulados por PAX3-FKHR/ER y diferencialmente expresados entre rhabdomyosarcomas alveolares y embrionarios

“Los tejidos y tumores humanos son complejos y heterogéneos ya que están compuestos de diferentes tipos de células que tienen influencia entre cada una de ellas a través de vías de señalización parácrina e interacciones con la matriz extracelular. Por el otro lado, las líneas celulares consisten en poblaciones de células más o menos clonales que carecen de interacciones con otros tipos de células e interactúan con un soporte artificial como es el plástico. La adaptación celular a un microambiente *in vitro* probablemente involucra recalibraciones de varias vías celulares a través de alteraciones genéticas, alteraciones transcripcionales, y diversos cambios post-transcripcionales y en redes de señalización. Por lo tanto, el grado de representación de las líneas celulares de sus tipos celulares específicos puede variar (135).

Por estas razones, expuestas en el párrafo anterior, se esperaba que no todos los genes modificados por la inducción de P3FK/ER en líneas celulares de RMSE fueran blancos biológicamente relevantes en el ambiente del tumor *in vivo*. Nosotros hipotetizamos que sólo aquellos genes que se expresan consistentemente en RMSA pueden representar blancos importantes para la oncogénesis o la progresión. Por lo tanto, decidimos comparar los genes identificados por nuestro sistema inducible, con la lista de genes que mostraron diferencias de expresión entre RMSA y RMSE.

6.4.1. Material y Métodos

6.4.1.1. Análisis de microarreglos

Los genes diferencialmente expresados en el sistema inducible de cultivo celular y los genes diferencialmente expresados entre RMSA y RMSE, fueron identificados usando diagramas de Venn. Para estar seguros de que los niveles de expresión eran consistentes entre los tumores, los genes fueron también filtrados de acuerdo a los niveles de expresión de los datos crudos. Los genes sobre expresados

fueron seleccionados si los niveles de expresión eran mayores de 150 (ver análisis inicial de los datos) en por lo menos 14 de 16 muestras de RMSA, y en el caso de los genes con expresión disminuida, se seleccionados si los niveles de expresión eran mayores de 150 en por lo menos 13 de 15 muestras de RMSE.

6.4.1.2. Análisis Funcional

Para este análisis se utilizó el programa DAVID 2007 2.0. Esta herramienta está diseñado en base a "DAVID Gene Concept", el cual es un método basado en grafos, el cual permite aglomerar identificadores de genes/proteínas específicos de especie utilizando diversas bases de datos públicas que incluyen NCBI, PIR y Uniprot/SwissProt. Además, permite realizar un análisis estadístico, la calificación EASE, que es un método que identifica categorías funcionales sobre representadas en una lista de genes relativa a la representación dentro del proteoma de una especie dada.

6.4.1.3. Análisis de Promotores

La región UTR 5' (-1500 bp a + 250 bp) de los genes analizados fue obtenida de la base de datos ensemble utilizando el programa retrieve-ensembl-seq de la suite RSAtools (<http://embnet.ccg.unam.mx/rsa-tools>). Realizamos una búsqueda computacional para sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) basados en el escaneo de "position weight matrices" (PWM). Para este propósito, utilizamos matriz-scan (RSAtools) y las matrices disponibles en la base de datos de TRANSFAC (Bioinformatics Nacional Node <http://embnet.ccg.unam.mx/?q=node/4>). Esta búsqueda se llevó acabo para Pax3 (M00327, M00360) y para toda la familia de Pax (M00808) con un corte a un $p > 0.0001$ (136).

6.4.1.4. Análisis de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

La síntesis de cADN de muestras de ARN total se realizó utilizando transcriptasa reversa MultiScribe con hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). El cADN fue cuantificado por qRT-PCR utilizando el 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) y TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems). Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando como control interno al gen de la unidad 18s del ARN ribosomal (ARNr). Cada muestra fue probada por triplicado, y los datos fueron expresados como media \pm DS (desviación estándar). Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizadas con la prueba de Mann-Whitney. La significancia estadística se consideró con una $p < 0.05$ (dos colas).

6.4.2. Resultados

6.4.2.1. Genes presentes en ambos sistemas

La comparación de las listas de genes utilizando diagramas de Venn y la eliminación de genes redundantes, nos dio una lista de 39 genes, 29 genes sobreexpresados y 10 genes con expresión disminuida (Tabla 4). Esta lista de genes incluyó algunos genes que son blancos transcripcionales conocidos de PAX3-FKHR, como es MET y MYOD1 (91, 102). Los genes antes mencionados nos dieron una validación independiente de nuestro sistema.

6.4.2.2. Anotación funcional

Los genes incluidos fueron analizados para enriquecimiento significativo de diversas categorías funcionales. El análisis con la herramienta D.A.V.I.D. de los genes modulados por PAX3-FKHR y expresados en RMSA mostró tres grupos funcionales, desarrollo, modificaciones post-traduccionales (quinasas) y regulación de la transcripción (Tabla 5)

Tabla 4. Genes regulados por PAX3-FKHR y con expresión diferencial en RMSA

A. Genes sobre-expresados

Nombre Común	Función	Proceso	Cambio Absoluto	
			Inducible	Tumores
GREM1	Antagonista de BMP	miogénesis, neurogénesis	6.61	2.58
PRKAR2B	Subunidad regulatoria PKA		5.75	2.99
MYCN	Factor transcripcional	Desarrollo de cresta neural	3.31	4.05
DCX	Proteína asociada a microtúbulos	Migración neural	3.26	8.23
KCNN3	Transportador de K	Descarga neuronal	2.57	8.80
MET	Receptor de superficie	Motilidad, proliferación, desarrollo	2.38	2.47
NEBL	Ensamblaje del disco Z	Aparato contráctil muscular	2.35	2.69
MEG3	Desconocida		2.28	7.91
TM4SF10	Desconocida		2.23	2.39
TRIB3	Serina treonina cinasa	Hipoxia, desarrollo	2.10	2.14
RYR3	Canal liberador de Ca	Función muscular y desarrollo	2.09	4.64
GADD45A	Proteína ácida nuclear	Reparación ADN	2.02	2.33
CRMP1	Fosfoproteína citosolica	Desarrollo neural, orientación axonal	1.95	3.61

FOXF1	Factor transcripcional	Desarrollo de órganos	1.85	4.86
DZIP3	ARN binding ubiquitin ligase		1.76	2.39
MYOD1	Factor transcripcional	Desarrollo/diferenciación muscular	1.75	3.78
TCF7L2	Factor transcripcional	Desarrollo	1.74	2.04
QDPR	Enzima	Regeneración y mantenimiento de los pools de bioproteína	1.72	3.68
DAPK1	Serina/Treonina cinasa regulada por Calmodulina	Desarrollo/apoptosis/lesión	1.72	2.02
RPS27L	Proteína ribosomal		1.66	1.99
GTF3C1	Factor transcripcional general	Iniciación de la transcripción	1.65	1.52
NCOA1	Receptor nuclear coactivador	Desarrollo del cerebro	1.61	2.38
OSBPL8	Receptor	Metabolismo de lípidos	1.60	1.61
LYPLA3	Enzima catabólica lisosomal		1.50	1.53

B. Genes con expresión disminuida

DUSP4	Fosfatasa dual específica	Inhibe la cascada de MAPK	4.30	2.41
IGFBP3	Proteína unida a suero	Pro-apoptótica/inhibe el crecimiento	2.46	2.63

HEY1	Factor transcripcional bHLH	Desarrollo neural y vascular	2.10	2.70
NPTX2	Proteína secretoria	Formación de sinapsis	2.05	7.41
MAP2K1	Proteína cinasa dual específica	Vía Raf – crecimiento /diferenciación	2.01	1.62
ZFP36L2	Factor transcripcional		1.81	1.90
ENPP2	Enzima extracelular	Motilidad	1.72	2.49
EPHA4	Receptor tirosina cinasa	Desarrollo neural/migración de la cresta neural	1.61	4.03
PLAG1	Factor transcripcional Zinc finger		1.50	5.96

El grupo de desarrollo incluye catorce genes, HEY1, KCCN3, MYCN, TRIB3, DAPK1, MYOD1, DCX, GREM1, GADD45A, FOXF1, MAP2K1, MET, IGFBP3 y CRMP1, ocho de estos genes están involucrados con el desarrollo del sistema nervioso central (HEY1, KCNN3, MAP2K, DCX, MET, CRMP, GREM y MYCN). La mayor expresión dentro de este grupo fue de GREM1, un antagonista de BMP, seguido por un gen que codifica un factor de transcripción, MYCN. GREM1 funciona como un gen supresor de tumor, y está involucrado en carcinogénesis, se requiere para el crecimiento de las extremidades, desarrollo del patrón, regulación de la inhibición de FGF por BMP, induce transición epitelial a mesenquimal y tiene un papel potencial en la vitroretinopatía proliferativa, tiene actividad pro-angiogénica y se une directamente a células endoteliales, participa en la activación de cinasas extracelulares reguladas y es un antagonista de BMP's en el esqueleto, su delección o la disminución de su expresión sensibiliza a las células esqueléticas a las acciones de BMP y Wnt, e incrementa la formación de hueso.

MYCN codifica un factor de transcripción y juega un papel muy importante en el crecimiento y/o mantenimiento celular. KCNN3 es un receptor involucrado en motilidad, proliferación y desarrollo. DCX, una molécula de señalización que está involucrada en la migración neuronal dependiente de calcio, y en la unión y estabilización de microtúbulos; CRMP1, una enzima involucrada en el catabolismo de pirimidinas que se ha asociado a crecimiento neuronal. Uno de los genes en este grupo presentó expresión disminuida, HEY1, un factor de transcripción implicado en la decisión del destino celular, regulación de la inducción de la transición epitelial-mesenquimal en el endocardio por Notch, un proceso crítico para la formación de las válvulas y el séptum.

El segundo grupo incluye genes que codifican proteínas que participan en modificaciones post-traduccionales, 10 genes están asociados a este proceso biológico, seis de ellos son proteínas-cinasas (PRKAR2B, TRIB3, DAPK1, MET, MAP2K1, y EPHA4), excluyendo a PRKAR2B, codifican tirosin-cinasas, sin embargo, MAP2K1 y EPHA4 tienen una expresión disminuida.

El último grupo incluye genes que codifican proteínas que participan en la regulación de la transcripción (FOXF1, HEY1, NCOA1, GTF3C1, PLAG1, NMYC, TRB3, MYOD1, TCF7L2, y ZFP36L2). Cuatro de estos factores de transcripción pertenecen a la familia de factores transcripcionales hélice-lazo-hélice básicos (bHLH), los cuales tienen una influencia determinante en diversas vías del desarrollo.

Tabla 5. Anotaciones funcionales DAVID

Categoría	Termino	Cuenta	%	P	Bonferroni
GOTERM_BP_ALL	phosphate metabolic process	10	30.30%	0.00011	0.437533748
GOTERM_BP_ALL	phosphorus metabolic process	10	30.30%	0.00011	0.437533748
GOTERM_BP_ALL	protein amino acid	8	24.24%	0.00033	0.826313672

	phosphorylation				
GOTERM_MF_ALL	transcription regulator activity	10	30.30%	0.00074	0.882077636
UP_SEQ_FEATURE	Helix-loop-helix motif	4	12.12%	0.00079	0.999999654
INTERPRO	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH	4	12.12%	0.00091	0.995407404
GOTERM_BP_ALL	phosphorylation	8	24.24%	0.00116	0.997700361
GOTERM_BP_ALL	system development	11	33.33%	0.00131	0.998996631
GOTERM_BP_ALL	post-translational protein modification	10	30.30%	0.00187	0.999947093
SMART	HLH	4	12.12%	0.00195	0.694733016
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region:Basic motif	4	12.12%	0.00245	1
GOTERM_BP_ALL	cellular metabolic process	25	75.76%	0.00271	0.999999368
GOTERM_BP_ALL	primary metabolic process	25	75.76%	0.00284	0.999999683
GOTERM_BP_ALL	nervous system development	7	21.21%	0.00350	0.99999999
GOTERM_BP_ALL	biopolymer metabolic process	19	57.58%	0.00432	1
GOTERM_MF_ALL	binding	29	87.88%	0.00480	0.999999041
GOTERM_BP_ALL	developmental process	14	42.42%	0.00533	1
GOTERM_MF_ALL	transcription factor binding	5	15.15%	0.00538	0.999999821
GOTERM_BP_ALL	anatomical structure development	11	33.33%	0.00593	1
GOTERM_BP_ALL	protein modification process	10	30.30%	0.00597	1
SP_PIR_KEYWORDS	proto-oncogene	4	12.12%	0.00602	0.998404834
GOTERM_BP_ALL	cellular process	31	93.94%	0.00623	1
GOTERM_BP_ALL	cell differentiation	10	30.30%	0.00668	1
GOTERM_BP_ALL	cellular developmental process	10	30.30%	0.00668	1
GOTERM_MF_ALL	transcription factor activity	7	21.21%	0.00715	0.999999999

GOTERM_BP_ALL	GO:0043412~biopolymer modification	10	30.30%	0.00775	1
INTERPRO	IPR011598:Helix-loop-helix DNA-binding	3	9.09%	0.00835	1
GOTERM_BP_ALL	GO:0007275~multicellular organismal development	11	33.33%	0.01097	1
INTERPRO	IPR000719:Protein kinase, core	5	15.15%	0.01136	1
SMART	SM00220:S_TKc	5	15.15%	0.01283	0.999605824
UP_SEQ_FEATURE	domain:Protein kinase	5	15.15%	0.01312	1
GOTERM_BP_ALL	cell communication	15	45.45%	0.01551	1
GOTERM_MF_ALL	transcription cofactor activity	4	12.12%	0.01567	1
SP_PIR_KEYWORDS	tyrosine-protein kinase	3	9.09%	0.01581	0.999999958
GOTERM_BP_ALL	metabolic process	25	75.76%	0.01608	1
KEGG_PATHWAY	Colorectal cancer	3	9.09%	0.02328	0.991207541
SP_PIR_KEYWORDS	dna-binding	8	24.24%	0.02487	1
GOTERM_BP_ALL	behavior	4	12.12%	0.02559	1
GOTERM_MF_ALL	protein binding	19	57.58%	0.02651	1
GOTERM_MF_ALL	kinase activity	6	18.18%	0.02727	1
SP_PIR_KEYWORDS	Transcription	8	24.24%	0.02741	1
GOTERM_MF_ALL	protein kinase activity	5	15.15%	0.02832	1
GOTERM_BP_ALL	cell development	7	21.21%	0.03084	1
GOTERM_BP_ALL	organ development	7	21.21%	0.03495	1
SP_PIR_KEYWORDS	activator	4	12.12%	0.03548	1
UP_SEQ_FEATURE	active site:Proton acceptor	5	15.15%	0.03554	1
GOTERM_MF_ALL	transcription coactivator activity	3	9.09%	0.04116	1
GOTERM_BP_ALL	vasculogenesis	2	6.06%	0.04213	1
SP_PIR_KEYWORDS	kinase	5	15.15%	0.04287	1
SP_PIR_KEYWORDS	phosphotransferase	3	9.09%	0.04297	1
GOTERM_BP_ALL	muscle development	3	9.09%	0.04652	1
GOTERM_MF_ALL	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	5	15.15%	0.04797	1

GOTERM_MF_ALL	DNA binding	9	27.27%	0.04825	1
GOTERM_CC_ALL	transcription factor complex	3	9.09%	0.04916	1
GOTERM_MF_ALL	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	6	18.18%	0.04938	1
GOTERM_MF_ALL	protein-tyrosine kinase activity	3	9.09%	0.05059	1
GOTERM_MF_ALL	transferase activity	8	24.24%	0.05190	1
GOTERM_BP_ALL	biological regulation	16	48.48%	0.05250	1
GOTERM_BP_ALL	macromolecule metabolic process	20	60.61%	0.05320	1

6.4.2.3 Validación de resultados de microarreglos por medio de RT-PCR en tiempo real

Para cuantificar de una manera más precisa los niveles de los transcritos de los genes diferencialmente expresados identificados por microarreglos, se utilizó qRT-PCR con ARN's aislados de experimentos independientes de dosis- respuesta con células RD-P3FK/ER, líneas celulares de RMS, y una cohorte independiente de RMSA (n = 19) y RMSE (n = 19). Cinco genes representativos fueron seleccionados para validación incluyendo: 1) KCNN3, 2) MET, 3) RYR3, 4) MYCN, 5) TRB3). La expresión relativa de cada valor para cada gen en cada muestra se presenta como la media de las proporciones transformadas a logaritmos.

La inducción de los genes seleccionados para validación relativa a la dosis administrada de 4-OHT se muestra en la Fig. 7. En la ausencia de 4-OHT, se observaron niveles detectables de ARNm en todos los genes, aunque a bajas concentraciones, sin embargo, con la administración de una dosis de 4-OHT de 30 nm todos los genes mostraron un incremento de sus niveles de transcritos.

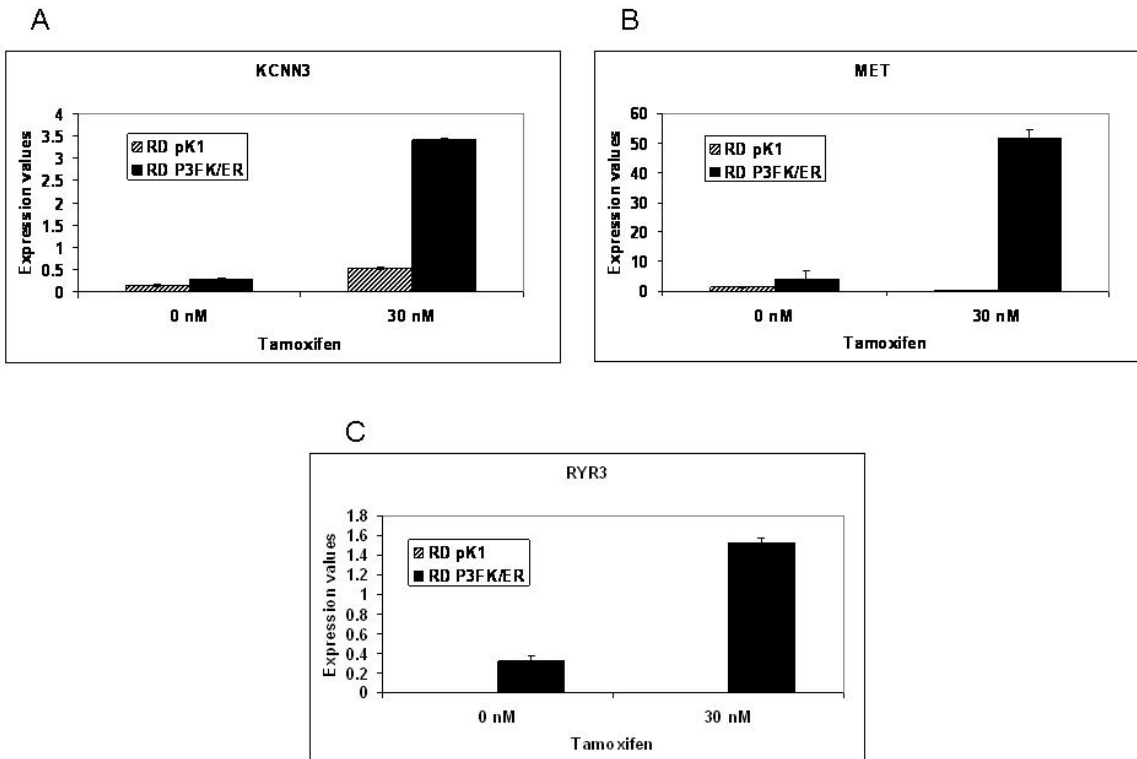


Figura 7. Validación de expresión por RT-PCR en tiempo real, ensayo de dosis-respuesta

Se realizó un análisis confirmatorio para los genes seleccionados modulados por PAX3-FKHR en una muestra independiente de tumores para probar si la diferencia de expresión fue significativa, los datos transformados a escala logarítmica fueron utilizados para el análisis estadístico (Figura 8). Este análisis mostró que KCNN3, RYR3, MYCN y TRB3 se encontraban diferencialmente expresados a niveles significativos cuando se compararon RMSA con RMSE ($p < 0.0001$, ANOVA con corrección de Bonferroni). No se encontraron cambios significativos en los niveles del transcrito de MET ($p = 0.0014$). Sin embargo, es importante comentar que estudios previos han mostrado sobre-expresión de MET en RMSE, por lo tanto la expresión de MET se puede inducir por mecanismos independientes a PAX3-FKHR (137).

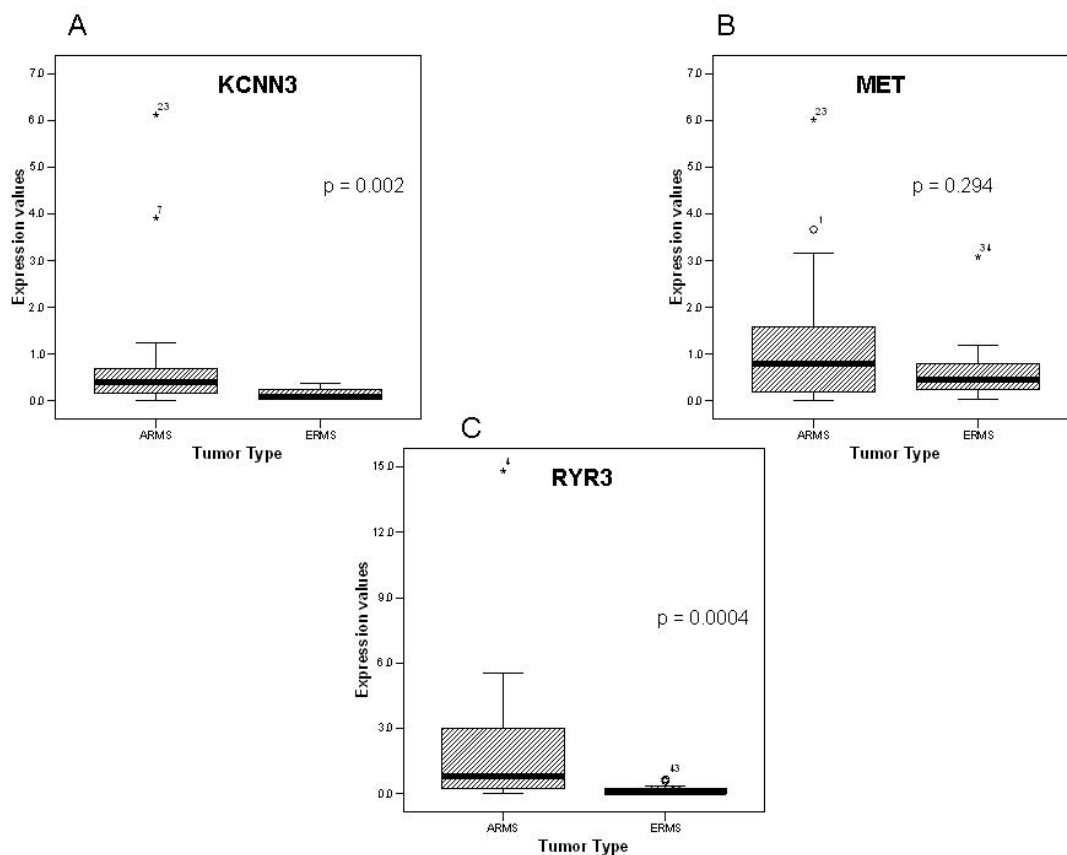


Figura 8. Validación de la expresión por RT-PCR en tiempo real en muestras de RMS

6.4.2.4. Análisis de promotores

El análisis de la región 5' UTR (-1500 pb a +250 pb) de los genes identificados utilizando matriz-scan y las matrices disponibles de TRANSFAC, mostró que 18 genes tenían sitios de unión para PAX3 y estos incluyeron GREM1, MYCN, MET, GADD45A, CRMP1, FOXF1, MYOD1, QDPR, DAPK1, RPS27L, OSBPL8, LYPLA3, DUSP4, NPTX2 y MAP2K1. Sin embargo, como es el caso de otros factores de transcripción, también es posible que PAX3-FKHR module la transcripción a través de un mecanismo independiente de sitio de unión, o a través de interacciones proteína-proteína. También es importante hacer notar que algunos de estos genes que no tienen un sitio de unión para PAX3, mostraron sitios de unión para otros genes PAX, como PAX5 (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de promotores

A. Genes sobre-expresados						
Nombre	ID ensembl	posición	hebra	score	secuencia	observaciones
GREM1	ENSG00000166923	-119	(+)	8.3	ggaatattTCACGttaagtgt	
PRKAR2B	ENSG00000005249					Pax-6 and Pax-8
MYCN	ENSG00000134323	-775	(+)	8.8	aatctgggTCACGgctgctcc	
DCX	ENSG00000077279					Pax-6, Pax-8 and Pax-2
KCNN3	ENSG00000143603					Pax-6, Pax-5, Pax-8
MET	ENST00000318493	-483	(+)	8.4	agactcggTCCCGcttatctc	
NEBL	ENSG00000078114					Pax-2, Pax-4, Pax-6 Pax-8
MEG3	ENSG00000214548					Pax-5, Pax-8
TM4SF10	ENSG00000147027					Pax-5, Pax-6
TRIB3	ENSG00000101255					Pax-4, Pax-8
RYR3	ENSG00000198838					Pax-6, Pax-8
GADD45A	ENSG00000116717	-733	(+)	8.3	agaccagcTCACGatttcca	
CRMP1	ENSG00000072832	-444	(-)	8.4	gggtacagCGTGAataaaggc	
FOXF1	ENSG00000103241	-1368	(-)	8.3	gatccgagCGTGGcgtgtgta	
		-807		8.3	tgcgatggTCACGaccgggag	
DZIP3	ENSG00000198919					Pax-2, Pax-6, Pax-8
MYOD1		-471	(+)	8.7	tccctctTCACGgtctcact	
TCF7L2	ENSG00000148737					No available promoter sequence
QDPR	ENSG00000151552	-1462	(+)	8.4	atgtagtTCACGttcttatt	
DAPK1	ENSG00000196730	-21	(-)	8.8	tggtaggCGTGAcagtttat	
RPS27L	ENSG00000185088	-732	(-)	8.4	caaaaagCGAGAccttgct	
		-985	(+)	8.6	gcatgctgTCACGcgccgta	
GTF3C1	ENSG00000077235					Pax-4, Pax-6 Pax-8
NCOA1	ENSG00000084676					Pax-4, Pax-6, Pax-8
OSBPL8	ENSG00000091039	-600	(+)	8.5	tcaggaaTCACGgtcaacat	
LYPLA3	ENSG00000103066	-644	(+)	8.6	tggcgggTGACGctgcactc	
		-1228	(+)	8.4	gacggaggTTACGgtgagcca	
B. Genes con expresión disminuida						
DUSP4	ENSG00000120875	-216	(-)	8.9	ctttagacCGTCAcaacttc	
IGFBP3	ENSG00000146674					Pax-2, Pax-6
HEY1	ENSG00000164683					Pax-5
NPTX2	ENSG00000106236	-119	(-)	8.7	gccactgCGTGAcgcgacc	
MAP2K1	ENSG00000169032	-527	(-)	8.8	cgcgctccCGTGAcgtatttc	
ZFP36L2	ENSG00000152518					Pax-5, Pax-8
ENPP2	ENSG00000136960					Pax-6
EPHA4	ENSG00000116106					Pax-5, Pax-6

PLAG1	ENSG00000181690					Pax-6, Pax-8
-------	-----------------	--	--	--	--	--------------

6.5. MYCN es un blanco biológicamente relevante de PAX3-FKHR

El análisis de la expresión génica identificó a MYCN como un blanco de PAX3-FKHR. MYCN, es un factor de transcripción bHLH que funciona normalmente en el desarrollo neuronal y también está implicado en tumorigénesis (138), por estas razones nos pareció interesante estudiar a profundidad el papel de PAX3-FKHR en su regulación y, a su vez, la participación de MYCN en la oncogénesis de RMSA.

MYCN pertenece a la familia de factores transcripcionales, Myc, la cual está integrada por 5 miembros (MYCN, c-Myc, L-Myc, B-Myc y S-Myc). El gen de *MYCN* mide 6kb, se localiza en locus 2p24.1, y está compuesto de 3 exones. Este factor de transcripción tiene un dominio C-terminal de unión a ADN hélice-lazo-hélice/cremallera de leucina y un dominio de transactivación que está compuesto por dos cajas myc (MBI y MBII). La familia MYC funciona como parte de una red de factores transcripcionales junto con las proteínas MAX y MAD. Las proteínas MYC se reclutan en los complejos transcripcionales activadores o inhibidores al unirse a MAX y MAD respectivamente. Estas proteínas regulan a genes específicos a través de unirse a cajas E en los promotores de estos genes. Entre los genes regulados por MYCN se encuentran, MRP1, telomerasa, α -protimosina, Id2, MCM7, y LIF.

MYCN se expresa normalmente en el embrión en desarrollo, en el estadio pre-implantación, principalmente, en el cerebro fetal, riñón y los neuroblastos que migran de la cresta neural antes de la maduración. Los ratones knockout para MYCN detienen su crecimiento a la mitad de la gestación y desarrollan defectos en el sistema nervioso, corazón, extremidades, mesonefros, hígado, cresta genital, pulmón e intestino. MYCN disminuye su expresión a medida que los tejidos se diferencian y el crecimiento se detiene.

MYCN se expresa en tumores de origen neural o con características neurales, como neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms, y carcinoma de pulmón de células pequeñas. Esta proteína oncogénica está involucrada en diferentes aspectos de la fisiología celular normal y oncogénica, incluyendo proliferación, regulación del ciclo celular, apoptosis e inestabilidad genómica. Estudios previos reportaron diferencias en la expresión de MYCN entre RMSE y RMSA (Tabla 7). Particularmente es interesante el estudio de Williamson D y cols, en el que se evaluaron 113 muestras de RMS. Los autores observaron una correlación entre la sobre-expresión y amplificación de MYCN y la duración de la sobrevida libre de enfermedad ($p = 0.0158$), y la sobrevida global ($p = 0.036$) se asoció significativamente con los niveles de expresión de MYCN. A pesar de que ambos subtipos histológicos expresan MYCN, la asociación con mal pronóstico sólo se mantuvo para el grupo de RMSA y no para los RMSE.

Tabla 7. Expresión de MYCN en rabdomiosarcomas

Autor	Año	Resultados	N (ARMS vs. ERMS)	Ensayo	Referencia
Driman D	1994	42.9 vs 0 %	7 - 6	SB	(139)
Hachitanda	1998	60 vs 0 %	15 - 14	FISH	(140)
Pandita A	1999	50%	12 - 0	CGH	(116)
Gil-Benso R	2003	67%	3 - 0	FISH	(141)
Toffolatti L	2002	18/19	19 - 0	RT- PCR	(142)
Williamson D	2005	ARMS (mediana, 1,209) y ERMS (mediana, 246) Mann- Whitney $p = .013$	48 - 58	qPCR	(143)

6.5.1. Material y Métodos

6.5.1.1. Análisis de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

La metodología empleada fue similar a la que se describió con anterioridad en el capítulo 6.4. Las secuencias para los primers y sondas para MYCN fueron publicadas previamente (143)

6.5.1.2. Anticuerpos y análisis de western blot.

Los lisados de proteínas fueron preparados y evaluados como se describió en el capítulo 6.2. Las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos dirigidos contra PAX3 (Abcam) y MYCN (Santa Cruz Biotechnology).

6.5.1.3. Ensayo de estabilidad del mensajero

La vida media del ARNm de MYCN fue determinada a través de tratar células RDP3FK/ER con actinomicina D. Las células fueron tratadas previamente con 4-OHTR por 24 hrs., posteriormente se adicionó al medio actinomicina D (10 µg/ml) para bloquear la transcripción. Durante las siguientes 3 hrs. las células fueron cosechadas cada 30 min., y el ARN total fue aislado, MYCN fue cuantificado a través de qPCR como se describió previamente.

6.5.1.4. Ensayo de cicloheximida

Para distinguir entre un efecto directo y uno indirecto de PAX3-FKHR sobre la transcripción de MCYN, realizamos experimentos de inhibición con cicloheximida (CHX). Las células RD P3FK/ER fueron pretratadas con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHX y fueron posteriormente tratadas con y sin el agente inductor 4-OHT.

6.5.1.5. Ensayo de reportero

La actividad transcripcional del promotor de MYCN fue medida con el sistema “Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) Assay (Promega), y fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El constructo del promotor de MYCN (pE/B N-

myc) fue proporcionado por el Dr. William Carroll (Escuela de Medicina de Mount Sinai, Nueva York), y el inserto fue subclonado en un plásmido que expresa la luciferasa.

6.5.2. Resultados

6.5.2.1. PAX3-FKHR induce la expresión de MYCN

La figura 7 muestra que las células RD-P3FK/ER tratadas con diferentes dosis de 4-OHT, incrementaron los niveles de expresión de los transcritos de MYCN de acuerdo a las dosis crecientes de 4-OHT. Para confirmar la inducción de la expresión de MYCN en un ambiente miogénico, transducimos otras líneas celulares de RMSE (SMS-CTR, RH6 y RH36) con el constructo P3FK/ER. Estas líneas celulares también mostraron un incremento en la expresión de MYCN. Por lo tanto MYCN fue inducido por PAX3-FKHR en ambientes miogénicos independientes de líneas celulares de RMSE.

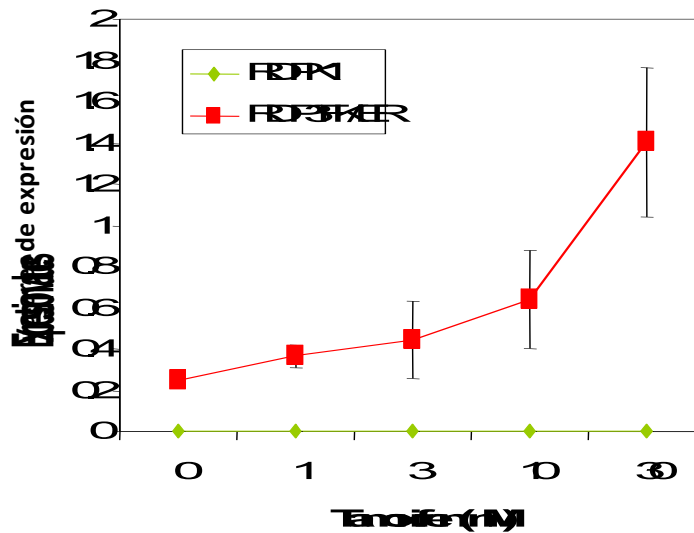


Figura 9. Inducción de la expresión de MYCN por PAX3-FKHR. La línea celular de RMSE (RD) fue transducida con un constructo inducible PAX3-FKHR o el vector control (pK1), cuya actividad es inducida por 4-OHT. La expresión de MYCN fue cuantificada por medio de qRT-PCR.

Finalmente, la expresión de MYCN fue determinada por qRT-PCR en un grupo independiente de 38 muestras de tumores primarios de RMS, 19 RMSA positivos para PAX3-FKHR y 19 RMSE. Como se muestra en la Figura 10, los niveles de expresión de MYCN fueron más altos en RMSA comparados con RMSE. Esta diferencia en la expresión de MYCN entre ambos subtipos histológicos fue estadísticamente significativa ($p = 0.0004$). Aun más, cuando comparamos los niveles de expresión de ARNm entre los RMSA fusión-positivos y negativos, la expresión de MYCN fue significativamente mayor en los RMSA fusión positivos (Figura 10).

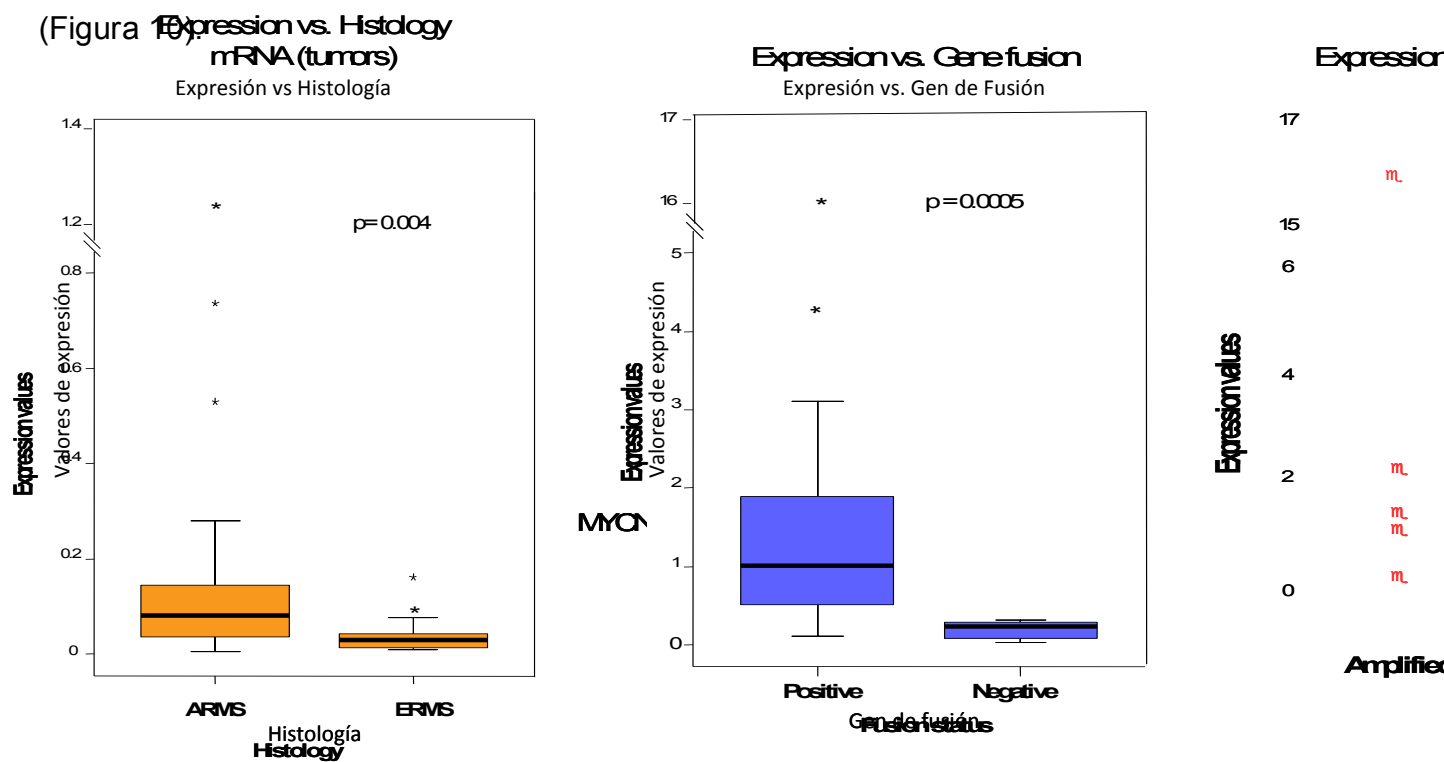


Figura 10. Correlación de la expresión de MYCN con el subtipo de RMS (A), y con la presencia del gen de fusión (B). El ARNm de MYCN fue cuantificado a través de qRT-PCR en una muestra independiente de RMS.

Para confirmar que los niveles de proteínas de MYCN también se incrementaron después de la inducción por PAX3-FKHR, realizamos una serie de análisis de western blot, primero cuantificamos MYCN en un experimento de dosis respuesta utilizando células RDP3FK/ER tratadas con y sin 4-OHT (Figura 11). RD Pk1 con y sin 4-OHT no expresaron MYCN, sin embargo, como se vio previamente RD

P3FK/ER sin tratamiento mostró un pequeño incremento de la proteína de MYCN como consecuencia de la filtración del sistema, pero se observó un incremento significativo en la expresión de MYCN después del tratamiento con 4-OHT. También se comparó la expresión proteica entre líneas celulares de RMSA y RMSE, lo cual mostró que las líneas celulares de RMSA (RH18, RH28, RH30, y MP4) expresaron niveles más altos de MYCN comparados con las líneas RD y SMS-CTR, las cuales mostraron una expresión muy baja. Finalmente, comparamos la expresión de MYCN en muestras de RMS, MYCN estuvo presente en 4/4 RMS y expresión proteica en una de las muestras de RMSE.

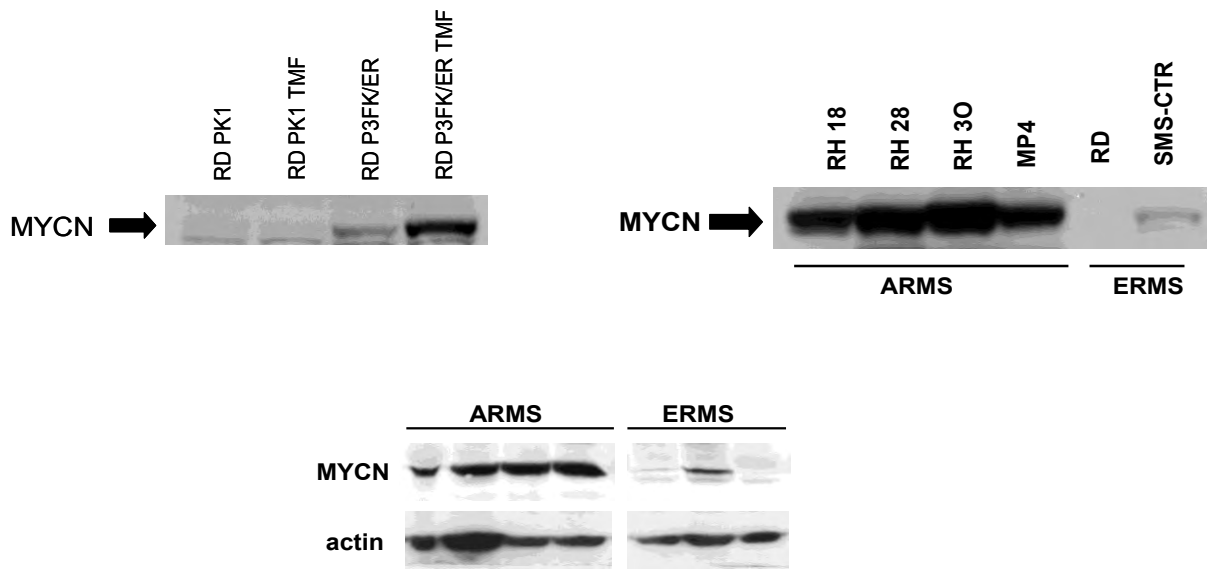


Figura 11. Comparación de la expresión de proteínas de MYCN en diferentes sistemas. La expresión proteica fue cuantificada por western blot en RD P3FKER, líneas celulares de RMS y en muestras de tumores. En la figura A se observa la inducción de la proteína de MYCN en células RD PAX3-FKHR/ER tratadas con 4-OHT (30nM) por 24 hrs. En la figura B se observa la expresión de MYCN en líneas celulares de RMSA (RH 18,28, 30 y MP4) y RMSE y finalmente en la figura C se observa la comparación de la expresión proteica de MYCN en muestras de tumores de RMS.

6.5.2.2. Mecanismo de inducción de MYCN por PAX3-FKHR

6.5.2.2.1. Estabilidad del mensajero

Reportar transfection assay

A continuación estudiamos el mecanismo por el cual PAX3-FKHR contribuye para modular la expresión de MYCN en RMSA. Primero, nos enfocamos en la degradación del ARNm de MYCN y comparamos células RD transducidas con P3FK/ER o el vector vacío, las cuales fueron tratadas con el inhibidor transcripcional, actinomicina D, después de incubación con 4-OHT (Figura 12). La cantidad del ARNm de MYCN en las poblaciones celulares y a diferentes tiempos fue cuantificada por qRT-PCR. En dos experimentos independientes, el patrón de expresión de MYCN después del tratamiento con actinomicina D fue casi igual entre las células que expresan PAX3-FKHR y las células control. La degradación de ARNm de MYCN fue relativamente rápido, con un promedio de vida media de 30 minutos para ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren que el efecto de PAX3-FKHR en la expresión de MYCN no es post-transcripcional y por lo tanto dirige la atención hacia la posibilidad que este efecto involucra un mecanismo transcripcional.

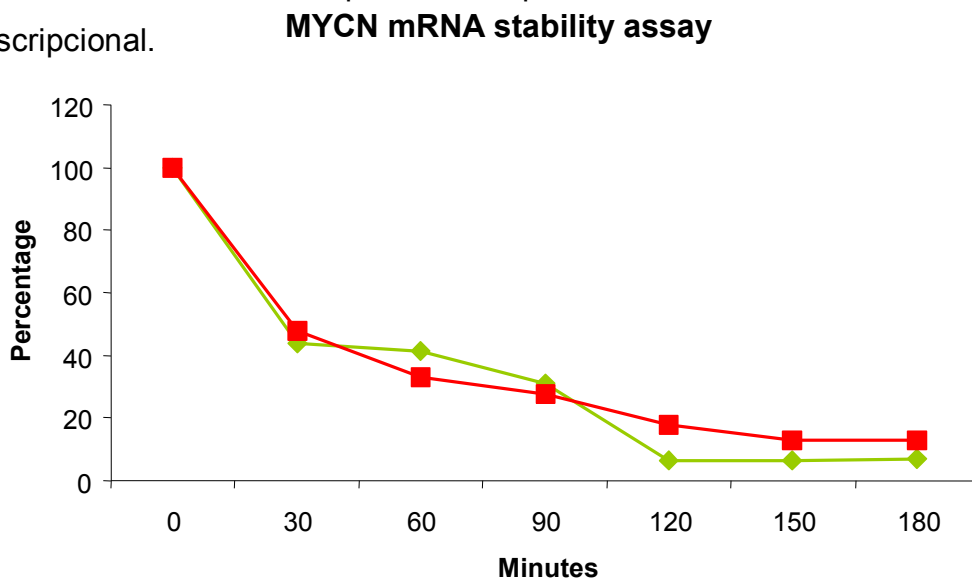


Figura 12. Ensayo de estabilidad del ARNm de MYCN. La degradación de MYCN fue analizada en células RD transducidas con el constructo inducible P3FK/ER o con el vector vacío como controles. Estas células fueron tratadas continuamente con 4-OHT y posteriormente fueron tratadas con un pulso de Actinomicina D en el tiempo 0. El ARN fue aislado en los tiempos indicados y cuantificado por medio de qRT PCR.

6.5.2.2. Regulación Transcripcional

6.5.2.2.1. Inducción temprana de MYCN por PAX3-FKHR

Para determinar si MYCN es un blanco transcripcional directo de PAX3-FKHR, realizamos un experimento de pulsado y seguimiento a través del tiempo (pulse-chase time-course). Las líneas celulares RD, RH6 y RH36 que expresan P3FK/ER fueron expuestas a 4-OHT (100 nM) por 1 hr., lavadas con PBS para remover el agente inductor, e incubadas con medio. La expresión del ARNm de MYCN fue determinada por qRT-PCR en diferentes tiempos después de la inducción con 4-OHT. Este experimento reveló que la expresión se incrementó en los tres sistemas tan tempranamente como 3 hrs. Este patrón de incremento temprano es similar en otros blancos transcripcionales de PAX3-FKHR como CXCR4 (Figura 12). Es importante hacer notar que el patrón de expresión de MYCN a través del tiempo se comporta de manera distinta entre las tres líneas celulares. En las líneas celulares RD y RH6, la expresión de MYCN continua incrementándose hasta las 24 hrs., mientras que en las células RH36, la expresión presenta un pico a las tres horas y después inicia su descenso y se estabiliza a un nivel mas bajo a las 12 hrs. (Figura 13).

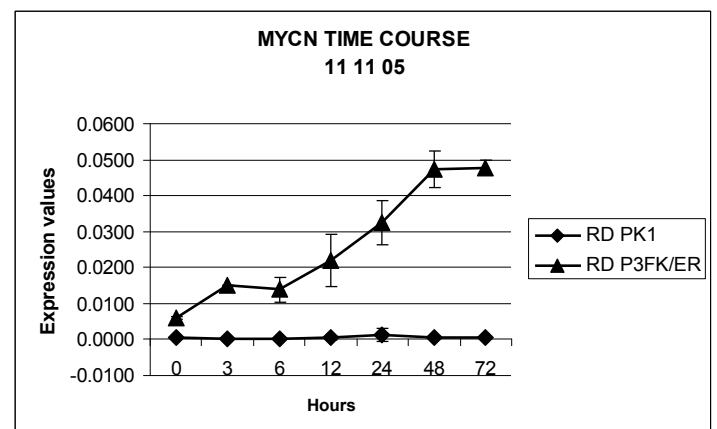
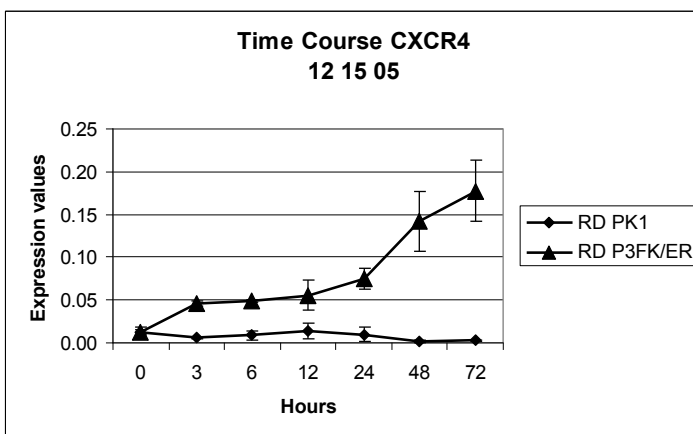


Figura 13. Ensayo de curso temporal de la expresión de CXCR4 y MYCN inducidas por PAX3-FKHR

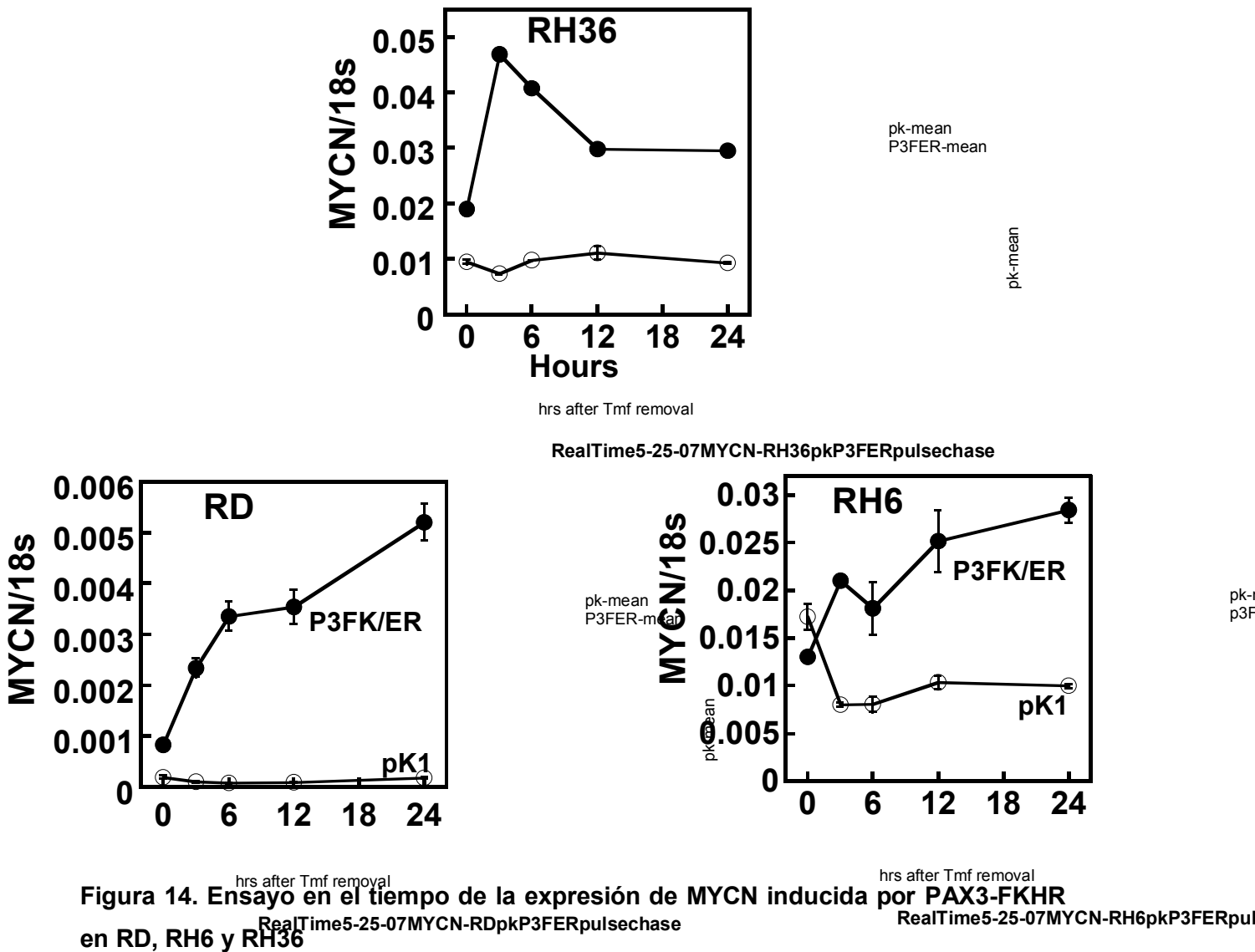


Figura 14. Ensayo en el tiempo de la expresión de MYCN inducida por PAX3-FKHR en RD, RH6 y RH36

6.5.2.2.2. Inhibición con cicloheximida

Con el propósito de distinguir entre un efecto directo o un efecto indirecto de PAX3-FKHR en la transcripción de MYCN, realizamos experimentos de inhibición con cicloheximida (CHX). La cicloheximida permite la inhibición de la síntesis de proteína *de novo*, por lo tanto, podemos evitar la activación por otros factores transcripcionales. Las células RD P3FK/ER fueron pretratadas con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHX antes del tratamiento con (o sin) el agente inductor 4-OHT. Como se muestra en la figura 15, la CHX no afectó la inducción de MYCN

por PAX3-FKHR. El pretratamiento con CHX dio como resultado una disminución en la expresión basal de MYCN en las células no tratadas con 4-OHT, sugiriendo la presencia de un activador lábil de la expresión de MYCN. Aunque el nivel basal fue menor, el tratamiento de las células con 4-OHT en la presencia de CHX dio como resultado un incremento de ARNm de MYCN de 6 veces, este incremento absoluto es igual a la inducción de MYCN por el tratamiento con 4-OHT en la ausencia de CHX. Estos descubrimientos son consistentes con la premisa de que la proteína PAX3-FKHR actúa directamente en el gen de MYCN para su activación.

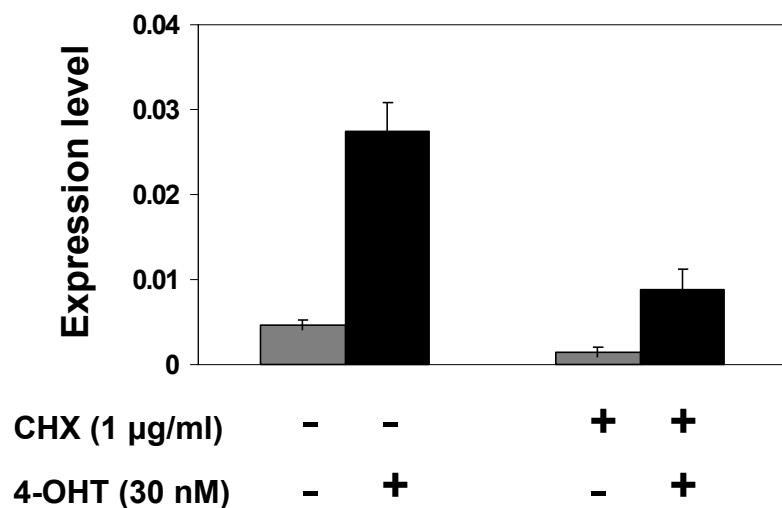


Figura 15. Ensayo de cicloheximida

6.5.2.2.2.3. Activación del promotor de MYCN por PAX3-FKHR

Los resultados previos nos indican una probable regulación transcripcional de MYCN por PAX3-FKHR, por lo tanto, Para comprobar si PAX3-FKHR puede unirse y activar los elementos regulatorios del gen de MYCN, utilizamos un reportero de luciferasa acoplado con un fragmento de 2 kb en la región 5' del gen humano de MYCN (144). Este fragmento se extiende desde - 1871 a + 105, relativo al sitio de inicio de la transcripción. Esta región del gen de MYCN tiene actividad

transcripcional significativa y se han descrito elementos regulatorios positivos en las posiciones -680 y -1871 (145). En células que expresan el constructo P3FK/ER y tratadas con dosis escaladas de 4-OHT, observamos un pequeño incremento en el nivel de activación del reportero (16-27% de incremento sobre las no tratadas) después de la transfección con el constructo del reportero que contiene la región completa de 2 kb 5' de MYCN (Figura 16). Este pequeño incremento no puede explicar completamente la inducción tan importante en la expresión de ARN que se observa cuando las células son tratadas con 4-OHT. Por el contrario, la transfección de un constructo del reportero que contiene los sitios de unión de PAX3 (6XPRS9) mostró un incremento de más de 50 veces en la actividad del reportero después del tratamiento con 4-OHT.

Para descartar la posibilidad de que elementos inhibitorios mediaran la expresión de MYCN, generamos una serie de constructos de reportero con deleciones secuenciales 5' del fragmento original de 2 kb de la región 5' de MYCN y tampoco pudimos detectar ninguna diferencia en la actividad del reportero.

Existen otras regiones regulatorias potenciales; en particular, algunos elementos regulatorios se localizan río arriba del sitio de inicio de la transcripción y en el primer exón e intrón del gen (145-148). Para evaluar la participación probable de estas regiones regulatorias en la modulación de la transcripción de MYCN por PAX3-FKHR, probamos un constructo que incluye un fragmento adicional de 907 bp de la región 3' de la secuencia de MYCN, la cual incluye todo el exon 1 y una porción del intrón 1 (-872 a +1058). Otra vez, no obtuvimos un incremento significativo en la actividad del reportero. Estos resultados indican que estos fragmentos de la región 5', primer exón y primer intrón no pueden recapitular el incremento en la expresión de MYCN mediado por PAX3-FKHR (Estos datos no se muestran).

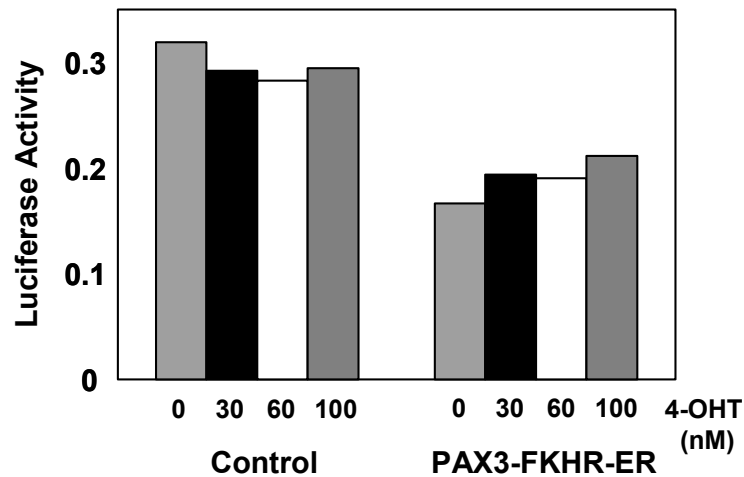


Figura 16. Ensayos de reportero. El análisis de los ensayos de reportero fue realizado utilizando un constructo que contiene 1.8 kb del promotor de MYCN y un constructo control que expresa constitutivamente la luciferasa de renilla, los constructores fueron transfectados a células RD que expresan PAX3-FKHR-ER o el constructo control.

6.5.2.2.3. Cooperación de MYCN con PAX3-FKHR para incrementar su actividad transformante

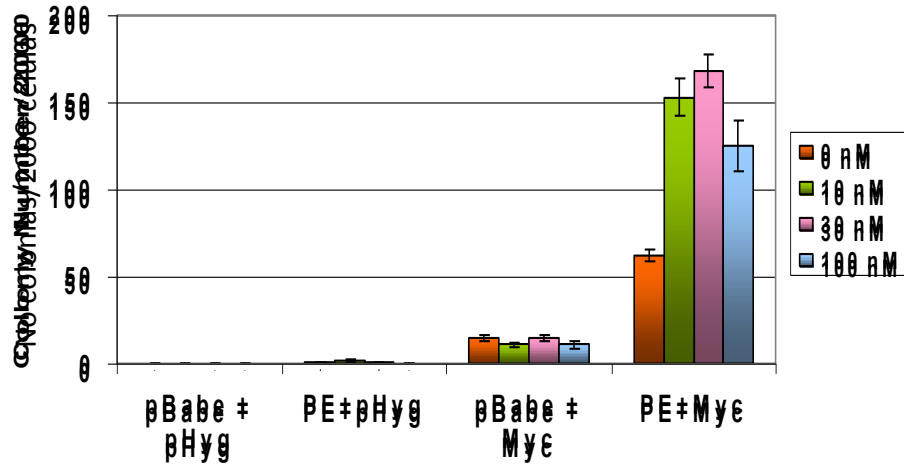
MYCN es un oncogén que participa en diversas actividades celulares como proliferación y diferenciación, nosotros hipotetizamos que el incremento de MYCN por PAX3-FKHR en el ambiente de RMSA contribuye a la actividad oncogénica de PAX3-FKHR. Para probar esta hipótesis nosotros utilizamos un sistema celular utilizando células NIH3T3. La eficiencia de transformación en células NIH3T3 transducidas con PAX3-FKHR es pobre pero detectable (131). Por otro lado, es importante MYCN no incrementa su expresión significativamente en células NIH 3T3 que expresan PAX3-FKHR. Nosotros especulamos que parte de la razón para una baja eficiencia de transformación de PAX3-FKHR en células NIH3T3 es que MYCN no es inducido por PAX3-FKHR en este ambiente celular. Aun más, la falta de respuesta de MYCN a PAX3-FKHR en este sistema es de gran ayuda para

poder determinar cual es la contribución individual de PAX3-FKHR y MYCN en la transformación.

Para examinar la hipótesis anterior concerniente al efecto de la expresión forzada de MYCN en la actividad de PAX3-FKHR, establecimos una serie de poblaciones celulares de NIH3T3, las cuales expresan P3FK/ER, MYCN o ambas. En este experimento, el vector retroviral utilizado fue pBabe, el cual expresa niveles relativamente mas bajos de P3FK/ER y a diferencia del vector retroviral pK1 no suprime el crecimiento (149). La actividad transformante fue evaluada utilizando dos ensayos independientes, formación de colonias en agar suave y formación de focos (Figura 17). Para que el ensayo de agar suave fuera más astringente y para concentrarnos en la detección de la cooperatividad entre PAX3-FKHR y MYCN, sembramos un número menor de células (2×10^3 células comparadas con las usuales 2×10^4 células por ensayo). En estas condiciones, PAX3-FKHR solo y los controles de vector no dieron ninguna transformación detectable, mientras que MYCN solo demostró un nivel bajo de transformación. Sin embargo, la combinación de MYCN y PAX3-FKHR resulta en un incremento substancial de la actividad transformante relativa a los controles.

En el ensayo de formación de focos, células que expresan solo PAX3-FKHR o solo MYCN demostraron un nivel de formación de focos que es cercano el nivel basal. Sin embargo, en células NIH3T3 que expresan ambos PAX3-FKHR y MYCN, hubo nuevamente un incremento en la actividad transformante comparada con MYCN o PAX3-FKHR solos, además se observó un incremento dosis respuesta con el tratamiento con 4-OHT. Estas observaciones indican claramente el papel de MYCN en estimular la actividad oncogénica de PAX3-FKHR en este sistema.

Soft Agar Assay Ensayo de agar suave



Focus Assay Ensayo de formación de focos

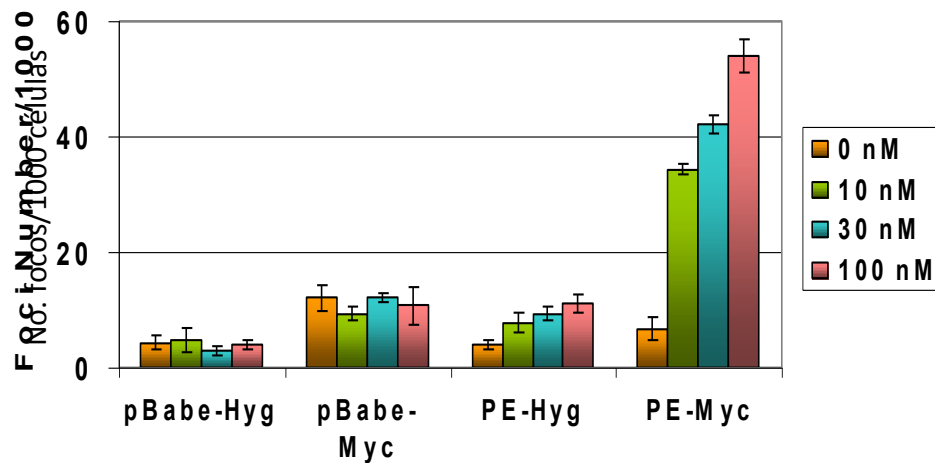


Figura 17. Análisis fenotípico de la actividad oncogénica de MYCN y PAX3-FKHR. PAX3-FKHR fue co-transducido con MYCN en células NIH3T3, y la actividad transformante fue evaluada por medio de anclaje independiente en el ensayo de agar suave e inhibición por contacto en el ensayo de formación de focos.

7. Discusión

PAX3-FKHR está asociado a la oncogénesis y progresión de los RMSA, sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales esta proteína quimérica participa en estos procesos, no es totalmente comprendida. La fusión de PAX3 y FKHR origina un factor de transcripción quimérico y el mecanismo más probable por el cual PAX3-FKHR contribuye a la patogénesis de este tumor es una ganancia de función con desregulación de sus blancos transcripcionales, sin embargo, los genes modulados por este factor de transcripción, son poco conocidos.

Para entender los mecanismos moleculares de PAX3-FKHR involucrados en la tumorigénesis de RMSA y poder comprender el comportamiento clínico agresivo de estos tumores, nosotros buscamos identificar las genes regulados por PAX3-FKHR utilizando análisis de microarreglos de expresión. Los probables genes blanco inducidos por PAX3-FKHR fueron identificados a través de comparar los perfiles de expresión de dos sistemas diferentes, un sistema inducible en cultivo celular y muestras de tumores de los dos subtipos principales de RMS (RMSE y RMSA PAX3-FKHR positivos). La comparación de ambos perfiles de expresión mostró un limitado número de genes que probablemente sean regulados directamente por PAX3-FKHR, en total 39, de los cuales, en 29 su expresión fue inducida y en 10 reprimida.

7.1. Funciones

Utilizando la herramienta de agrupamiento de anotaciones funcionales de DAVID pudimos clasificar nuestra lista de genes en tres grupos principales, los cuales son:

a) Proteínas que participan en desarrollo,

- b) Proteínas asociadas a modificaciones postraduccionales (quinasas) y
- c) Proteínas involucradas en la regulación de la transcripción.

7.1.1. Desarrollo

El primer grupo incluye genes que codifican proteínas que participan en el proceso de desarrollo, de acuerdo a DAVID, 14 genes de nuestra lista están involucrados en este proceso (HEY1, KCCN3, MYCN, TRIB3, DAPK, MYOD1, DCX, GREM1, FOXF1, MAP2K1, MET, IGFBP3, CRMP). Notablemente, este análisis mostró pocos marcadores de miogénesis (MYOD1, IGFBP3), este análisis no es consistente con la noción de que PAX3-FKHR induce un programa de diferenciación miogénica lo cual ha sido sugerido en estudios previos (81). En su lugar encontramos que siete genes están involucrados con el desarrollo del sistema nervioso central (HEY1, KCNN3, MAP2K1, DCX, MET, CRMP1, GREM1). Sin embargo, este fenómeno puede ser explicado por varias razones:

1. Nosotros utilizamos líneas celulares de RMSE como el ambiente celular para la expresión de PAX3-FKHR, estas células se derivan de músculo esquelético, y por lo tanto algunos de los genes miogénicos se expresarán independientemente de la activación de PAX3-FKHR.
2. Pax3 se expresa durante el desarrollo embrionario temprano en dominios espacialmente restringidos incluyendo las extremidades, cresta neural y tubo neural. La expresión de genes neurogénicos sugiere que la regulación de PAX3 se pierde cuando es fusionado a FKHR, y esto permite regular blancos neurogénicos en un ambiente muscular.
3. Finalmente, una de las deficiencias de las herramientas de anotación es que la mayoría de las bases de datos que utilizan están incompletas; por que no existe la información experimental, o por que no están actualizadas,

por lo tanto, algunos de los genes que consideramos que solo participan en neurogénesis pudieran participar también en el proceso de miogénesis.

7.1.2. Modificaciones post-traduccionales (quinasas)

El segundo grupo del análisis funcional mostró que 10 de los genes modulados por PAX3-FKHR codifican proteínas que participan en modificaciones post-traduccionales (PRKAR2B, MAP2K1, TRIB3, DAPK1, EPHA4, MET, DZIP3, DUSP4, MYOD1, IGFBP3). De estos, 6 son proteína cinasas (PRKAR2B, MAP2K1, TRIB3, DAPK1, EPHA4, MET) y tres específicamente tirosin cinasas (MAP2K1, EPHA4 y MET). Las tirosin-cinasas son enzimas que regulan múltiples procesos celulares que contribuyen al desarrollo de tumores o a su progresión, incluyendo crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis.

Las proteína cinasas han cobrado gran interés en los últimos años en el área de investigación oncológica ya que diversos estudios clínicos han establecido que los inhibidores de cinasas son seguros y activos terapéuticamente en poblaciones seleccionadas de pacientes con cáncer, y muchas de estas drogas forman parte de los esquemas de primera línea para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Las proteínas cinasas representan el 30% de todos los blancos proteicos en investigación por compañías farmacéuticas.

MET, forma parte del grupo de tirosin cinasas de nuestra lista, este gen codifica el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, el cual se ha asociado con diversos tipos de cáncer, y especialmente con fenotipos agresivos. MET es un blanco conocido de PAX3 y PAX3-FKHR y se expresa en ambos subtipos de RMS. MET ha ganado interés como un potencial blanco terapéutico, diversos antagonistas se han desarrollado y están siendo evaluados en ensayos clínicos

(150). Por lo tanto, los antagonistas de MET pueden representar nuevas alternativas terapéuticas para los pacientes de RMSA.

EPHA4 pertenece a la subfamilia de receptores de efrina, participa en el desarrollo del sistema nervioso, su sobre expresión se ha asociado a diversas neoplasias. EPHA4 fue identificado como un blanco de PAX3-FKHR en un estudio previo, sin embargo a diferencia de nuestro estudio, la expresión de este gen se incrementó en presencia de PAX3-FKHR. Esta diferencia pone de relieve la importancia del ambiente celular en la modulación de blancos por factores transcripcionales (82).

Begum et al expresó PAX3-FKHR en la línea celular de osteosarcoma SaOS-2 y se estudiaron los perfiles de expresión utilizando microarreglos. EPHA4 fue identificado como uno de los genes inducidos por PAX3-FKHR y el ensayo de CHIP confirmó la unión de la proteína quimérica. Sin embargo, como comentamos previamente, en nuestro sistema este gen mostró una disminución en su expresión. Es interesante, que en el mismo artículo mencionan que la expresión de otro de los blancos, BMP, fue diferente dependiendo del ambiente celular (RD vs. SaOs-2). También la diferencia de expresión EPHA4 pone de relieve la importancia de comparar los sistemas *in vitro* con muestras de tumores, ya que en el caso de EPHA4 la disminución de la expresión es consistente con los patrones que encontramos en las muestras de RMSA estudiadas por nosotros.

La cascada de MAPK (mitogen-activated protein kinase) traduce los estímulos extracelulares a vías intracelulares para regular diversas funciones, como es proliferación, diferenciación, y respuesta al estrés. En nuestra lista, 3 genes se asociaron con esta vía (MAP2K1, GADD45A, DUSP4). MAP2K1 y DUSP4 fueron reprimidos por PAX3-FKHR y GADD45A se sobre expresó. MAP2K1 es miembro

de la familia de cinasas de especificidad dual. DUSP4 es una fosfatasa que regula negativamente a los miembros de la superfamilia de MAP cinasas, específicamente ERK1, ERK2, y JNK. GADD45 es un gen que responde a estrés ambiental mediando la activación de la vía p38/JNK a través de la cinasa MTK1/MEKK4.

La vía de MAP cinasas se ha asociado en la tumorigénesis de RMS en diversos estudios. Uno de estos estudios mostró que la activación de la MAP cinasa p38 es deficiente en células de RMS, este estudio sugiere que la función de MyoD requiere la activación de MAPK, por lo tanto la deficiencia en esta activación resultaría en el bloqueo del programa de diferenciación miogénica y estimulación de la proliferación (151). Sin embargo, otros estudios han demostrado activación de las vías MAPK, de hecho PDGFR-A, un receptor de tirosin cinasa, que media diferentes respuestas celulares a través de la activación de MAPK, es un blanco conocido de PAX3-FKHR su inhibición se asocia con una disminución en el crecimiento del tumores en ratones (152).

7.1.3. Regulación de la transcripción

El tercer grupo se compone de genes que codifican factores transcripcionales (FOXF1, HEY1, NCOA1, GTF3C1, PLAG1, MYCN, TRB3, MYOD1, TCF7L2, ZFP36L2). Cuatro de diez genes (NCOA1, HEY1, MYOD1, y MYCN) incluidos en esta categoría codifican proteínas que pertenecen a la familia de factores de transcripción básicos hélice-lazo-hélice (bHLH). Estos factores de transcripción participan, principalmente, en el proceso del desarrollo.

NCOA1 es un coactivador transcripcional para receptores nucleares y se ha asociado a cáncer. Los miembros de la familia interactúan con sus ligandos y

reclutan acetiltransferasas de histona y metiltransferasas facilitando la remodelación cromatínica, ensamblaje de factores de transcripción generales, y transcripción de genes blanco. NCOA1 fue reportado previamente como un compañero alternativo de PAX3, esta variante del gen de fusión fue identificada analizando los perfiles de expresión de casos de RMSA y RMSE, y probó ser un activador transcripcional similar a PAX3-FKHR (31).

HEY1 pertenece a la familia de represores HESR (hairy and enhancer of split-related), la expresión de este gen es inducida por las vías de señalización Notch y c-Jun. La señalización de Notch es crítica para el desarrollo de músculo esquelético y su regeneración, permitiendo la expansión de células progenitoras a través de prevenir la diferenciación prematura. HEY1 se expresa durante el desarrollo del sistema nervioso central, las somitas, el corazón y la región craneofacial, también la inducción de HEY1 bloquea la miogénesis. En nuestro sistema, la expresión de HEY1 está reprimida, lo que indica que permite la miogénesis, sin embargo, como hemos comentado previamente, aunque PAX3-FKHR induce un programa miogénico no logra la diferenciación terminal, probablemente como consecuencia de la atenuación de la actividad transcripcional de MyoD.

7.1.4. Progresión y Metástasis

Las metástasis son el paso determinante en la progresión del cáncer, causa más del 90% de las muertes por cáncer. Los pacientes de RMSA muestran una alta frecuencia de enfermedad avanzada al diagnóstico y el pronóstico de estos pacientes es muy pobre con menos de 15% de sobrevida libre de enfermedad, ya que no existe una alternativa terapéutica efectiva para la enfermedad metastásica. El estado de la fusión se ha asociado con un comportamiento más agresivo en los

RMSA. En el modelo condicional de RMSA, la expresión de Pax3:Fkhr se incrementa durante el estado de preneoplasia tardía, sin embargo, las células tumorales metastásicas están en una aparente selección de la expresión de Pax3:Fkhr (153). De acuerdo a lo anterior, la expresión de PAX3-FKHR además de participar en la oncogénesis tiene un papel importante en la progresión y por lo tanto, algunos de sus blancos deben estar implicados en el proceso metastático.

Uno de los sitios mas frecuentes de metástasis en pacientes con RMSA es la médula ósea, MET se expresa tanto en tejidos primarios de RMSA como en células asiladas de médula ósea y se correlaciona con variables clinicopatológicas y con la sobrevida de los pacientes (154). Otros genes en nuestra lista también se han implicado en el proceso metastático como GREM1, el cual se asocia con invasión del carcinoma ductal de mama (155), GADD45 fue identificado como probable marcador del fenotipo metastático en líneas celulares de osteosarcoma (156). Por su parte, CRMP1 fue identificado como un candidato en el proceso de invasión utilizando microarreglos de expresión en tumores de la pituitaria productores de prolactina (157). FOXF1 es un blanco de WNT5 que ha sido implicado en invasión y metástasis (158). Finalmente, la disminución de la expresión de IGFBP3 se ha correlacionado clínicamente con tumores de alto grado, estadio avanzado y pobre sobrevida en pacientes con carcinoma endometriode de ovario (159).

Es importante resaltar que la calidad de las listas de genes que se derivan del análisis de microarreglos es uno de los factores más importantes que influyen en el éxito del análisis funcional de la herramienta DAVID o de cualquier otra herramienta. Una de las principales factores es que la lista debe contener un número razonable de genes que va de cientos a miles (ej. 100 – 2000 genes), sin

que este número sea demasiado pequeño o demasiado grande (160). El número de genes incluido en nuestra lista es extremadamente pequeño (39), por lo tanto el análisis funcional de este grupo de genes no tiene el poder suficiente para detectar con un nivel confianza adecuado todas las categorías funcionales o vías en que participan los genes identificados.

7.2. Sitios de unión de PAX3-FKHR

Utilizando la secuencia consenso de unión de PAX3 pudimos identificar que cerca del 50% de los genes en la lista tienen sitios de unión para PAX3, entre estos se encuentran GREM1, MYCN, MET, GADD45A, CRMP1, FOXF1, MYOD1, QDPR, DAPK1, RPS27L, OSBPL8, LYPLA3, NPTX. El análisis de predicción de los sitios de unión depende en gran medida de la calidad de la matriz utilizada, y la calidad de esta matriz depende directamente de la información experimental con que se cuenta, en este momento la información experimental acerca del sitio consenso de PAX3 es muy pobre y es todavía más escaso para PAX3-FKHR. Además, la secuencia de unión PAX3 esta compuesta por dos dominios diferentes (PD y HD) y, en el caso de PAX3-FKHR, cada uno de estos dominios puede interactuar con el DNA independientemente o en conjunto, de hecho, algunos estudios han encontrado que los dominios HD y PD tienen diferentes propiedades de transformación (161). Esta alternancia de dominios complica aun más la predicción computacional de los sitios de unión de PAX3-FKHR.

El conocimiento de los sitios de unión de PAX3-FKHR es importante para ampliar nuestro conocimiento de los mecanismos oncogénicos de esta proteína quimérica, ya que permitirá identificar con mayor precisión sus blancos transcripcionales. Existen diferentes metodologías que pueden ser utilizadas con este fin, sin embargo, el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), tiene la

capacidad de mapear factores de transcripción unidos a la secuencia del genoma *in vivo* (162, 163). La unión de un factor de transcripción dentro de una supuesta región de control da evidencia que el gen es regulado directamente y permite el análisis de las secuencias a donde se ha unido para poder establecer regiones consenso mas confiables (164, 165). La combinación de CHIP con otras tecnologías como tecnología de microarreglos (CHIP-chip) o secuenciación paralela masiva (CHIP-Seq) permite analizar las interacciones de DNA-proteínas y de esta manera identificar el cistroma, el cual se define como el conjunto de blancos cis (sitios de unión a DNA) de un factor trans (factor de transcripción) a un nivel de genoma completo.

7.3. Mecanismos alternativos para la tumorigénesis de PAX3-FKHR

Hasta el momento la principal hipótesis acerca de la participación de PAX3-FKHR en la oncogénesis es a través de su función como reguladora de la transcripción, sin embargo, su participación también podría estar dada por mecanismos independientes a la regulación transcripcional directa, y será importante considerarlos para poder entender la biología y comportamiento de este tumor. Rioeb y cols., estudiaron mioblastos aislados de ratones transgénicos que expresan PAX3-FOXO1 bajo el control del promotor de PAX3 y mostraron que estos mioblastos no pudieron completar su diferenciación miogénica, lo cual se debió a su falta de habilidad para inducir la expresión de p57Kip2, esta proteína es un regulador miogénico clave, el cual promueve la diferenciación principalmente a través de estabilizar MyoD y manteniendo Rb1 en un estado activo. Sin embargo, se demostró que p57Kip2 no esta directamente regulado por PAX3-FKHR. La proteína quimérica causa la desestabilización del factor de transcripción EGFR1 que regula directamente la transcripción p57Kip2. La desestabilización de EGFR1 por PAX3-FKHR es mediada a través del proteosoma (166, 167).

7.4. MYCN como ejemplo de un blanco de PAX3-FKHR biológicamente relevante

MYCN fue identificado en el grupo de genes cuya expresión fue modificada por la inducción de la actividad de PAX3-FKHR en el sistema inducible y estaba diferencialmente expresado cuando se compararon RMSA y RMSE. MYCN es un factor de transcripción bHLH que participa en el desarrollo neural y también se ha implicado en tumorigénesis (138). Por estas razones pensamos que es un blanco interesante y decidimos estudiar el papel de PAX3-FKHR en la regulación de MYCN y a su vez el papel de MYCN en la oncogénesis de los RMSA.

MYCN fue inducido por PAX3-FKHR en medios miogénicos independientes de líneas celulares de RMSE, y sus niveles de expresión se incrementaron de acuerdo con las dosis de 4-OHT. Descartamos un mecanismo postraduccional para la regulación de MYCN, y los ensayos a través del tiempo y de cicloheximida sugieren que MYCN puede ser un blanco directo de PAX3-FKHR. Sin embargo, los resultados de los ensayos de reportero mostraron que las regiones 5', el primer exón e intrón no pueden recapitular el incremento en la expresión de MYCN mediada por PAX3-FKHR.

Una de las posibilidades es que los sitios de unión se localizan lejos del sitio conocido de inicio de la transcripción de MYCN. Charron y cols, mostraron en embriones transgénicos utilizando diversos transgenes reporteros N-myc/laz, que se requieren >16 kb de secuencias genómicas del ratón para recapitular el patrón de expresión completo del gen N-myc durante el desarrollo (168). Además, un estudio reciente mostró que PAX3-FKHR puede regular a sus blancos a través de unirse a potenciadores, como es el caso de MyoD, el cual es modulado por la

unión de la proteína quimérica a una secuencia en un potenciador (258 core enhancer), el cual se localiza a más de 20 kb río arriba del SIT (sitio de inicio de la transcripción). Estudios recientes utilizando ChIP-chip y ChIP-Seq han mostrado que solo una pequeña parte de los sitios de unión de factores de transcripción están dentro de la 1000 pb río arriba de los SIT. Muchos de estos sitios de unión pueden localizarse en las regiones de 10 k alrededor del SIT, además nuevos promotores se han localizado dentro de genes y muchos genes pueden tener más de un promotor (169, 170).

Sabemos que la presencia de PAX3-FKHR, o cualquier otro gen de fusión, no es suficiente por si mismo para inducir la oncogénesis, se requieren otros eventos colaborativos secundarios en el proceso. En nuestro estudio demostramos que MYCN puede representar uno de estos eventos colaborativos en el proceso de transformación de PAX3-FKHR. Las células NIH3T3 que expresan a MYCN y PAX3-FKHR presentan un incremento en la actividad transformante comparado con MYCN o PAX3-FKHR solos, además observamos que la actividad transformante sigue un patrón de dosis respuesta con el tratamiento de 4-OHT. Estos resultados muestran claramente el papel de MYCN en la estimulación de la actividad oncogénica de PAX3-FKHR en este sistema.

MYCN es un factor transcripcional, el cual está involucrado en muchos aspectos de la fisiología celular normal y oncogénica, incluyendo proliferación, regulación del ciclo celular, apoptosis e inestabilidad genómica. Los blancos de MYCN no se conocen completamente, en neuroblastoma, se sugiere a MDM2 y OCD1 como algunos de estos blancos que podrían también colaborar para la tumorigénesis. Por otra parte, MYCN tiene un patrón de expresión muy restringido, se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario, posteriormente a este periodo,

su expresión se reprime, en adultos se detecta exclusivamente en células B. La identificación de inhibidores selectivos de MYCN puede ser una importante herramienta para el desarrollo de agentes terapéuticos más específicos, efectivos, y menos tóxicos para los pacientes con RMSA.

7.5. Genes de fusión, importancia y su identificación

“La importancia atribuida a diferentes tipos de aberraciones genómicas en cáncer está frecuentemente asociada a la tecnología disponible para medirlas” (171). Por mucho tiempo se creyó que los rearrreglos cromosómicos que dan lugar a genes de fusión tenían solo un impacto biológico y clínico en leucemias, linfomas y sarcomas, pero esta visión cambio cuando un grupo de investigadores utilizando un enfoque bioinformático identificaron una translocación recurrente en cerca del 50% de tumores de próstata (3), y dado que el cáncer de próstata tiene una gran prevalencia, los genes de fusión se convirtieron en la alteración genética mas frecuente en cáncer, asimismo, en años recientes otros tumores epiteliales, como pulmón y cáncer de mama se han unido al grupo de tumores positivos para genes de fusión (172), incrementando de esta manera el interés general para la identificación de nuevos genes de fusión en otros tipos de neoplasias, ya que por su especificidad los convierte en excelentes herramientas para el diagnóstico y también como blancos terapéuticos.

La mayoría de los gene de fusión identificados hasta el momento se ha logrado a través de utilizar diferentes metodologías como citogenética, cariotipo espectral, FISH, e hibridación genómica comparativa (aCGH), sin embargo, sus limitaciones técnicas no permitió identificar estas alteraciones en la mayoría de los tumores epiteliales. La implementación de nuevas tecnologías facilitará la identificación de genes de fusión en otros tumores. LDI-PCR (long distance inverse PCR) es una

técnica que se basa en la hidrólisis del ADN del paciente utilizando distintas combinaciones de enzimas de restricción, ligación de los fragmentos resultantes de ADN y subsecuente reacción de PCR utilizando un set específico de oligonucleótidos. Esta estrategia permite en principio identificar genes de fusión conocidos o desconocidos (173, 174). Por ejemplo, Walz y cols utilizando LDI-PCR identificaron un nuevo gen de fusión, MYO18A-PDGFRB en una neoplasia mieloproliferativa atípica eosinofílica asociada con la translocación t(5;17)(q33-34;q11.2) (174).

La identificación de los eventos genéticos que están involucrados en el desarrollo de cáncer se ha facilitado a través del desarrollo y aplicación de diversas plataformas de microarreglos con alta resolución y cobertura. SNP-chip (high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray), se ha utilizado para definir variaciones en número de copias, lo que permite identificar con mayor precisión regiones de delección o amplificación, sin embargo, también puede utilizarse para identificar sitios de ruptura en cromosomas que estén involucrados en translocaciones no balanceadas, permitiendo la identificación de genes de fusión. Kawamata y cols utilizando esta plataforma identificaron varios compañeros de fusión de PAX5 en células de LAL (leucemia aguda linfoblástica) como ETV6, FOXP1, AUTS2, y C20orf112.

Dentro de las estrategias más recientes y con mayor resolución para una detección de rearrreglos cromosómicos a nivel de genoma completo, se encuentran, secuenciación BAC, “fosmid paired-end sequences”, secuenciación parecida a “serial analysis of gene expression (SAGE)”, y secuenciación de ADN de siguiente generación. Dentro de otras estrategias se encuentra la secuenciación “paired end” del transcriptoma, una de las mayores ventajas de

utilizar el transcriptoma es que permite identificar rearrreglos que no son detectados a nivel de DNA así como quimeras de >RNA que no tienen aberraciones del DNA (175-179).

Los sarcomas de tejidos blandos se han clasificado de acuerdo a sus características moleculares en dos grupos, sarcomas asociados a translocaciones cromosómicas, y sarcomas sin translocaciones específicas (4). De la misma manera como los tumores epiteliales, es muy posible que la secuenciación de nueva generación de DNA o RNA, pruebe que los sarcomas fusión negativos también presentan rearrreglos cromosómicos recurrentes., lo cual brindaría nuevas herramientas para el diagnóstico específico y la creación de nuevas opciones terapéuticas.

7.6. ¿Genes de fusión como oncogén?

Desde la identificación de BCR-ABL siempre se ha creído que las proteínas quiméricas resultantes de rearrreglos cromosómicos son enteramente anormales y tienen efectos neoplásicos que dan lugar al crecimiento y/o ventajas de supervivencia a las células que los contienen (180). Sin embargo, un estudio reciente mostró que células estromales normales de endometrio expresan un ARN quimérico específico que fusiona los exones 5' del gen JAZF1 en el cromosoma 7p15 a lo exones 3' del gen JJAZ1/SUZ12 en el cromosoma 17q11, el transcrito se traduce a JAZF1-JJAZ1, una proteína con actividad antiapoptótica. El mecanismo propuesto es que el ARN JAZF1-JJAZ1 surge de un "trans-splicing" fisiológicamente regulado entre RNAs mensajeros precursores para JAZF1 y JJAZ1. Los autores proponen que el producto de estos genes de fusión podría participar en la protección del endometrio a la hipoxia. El ARN quimérico y la

proteína son idénticos a aquellos producidos por los genes de fusión que se encuentran en tumores estromales de endometrio (180).

Este fenómeno se ha descrito previamente, en sujetos sanos pueden detectarse, por RT PCR, los transcritos de genes de fusión de leucemias y linfomas a niveles bajos (181). El artículo por Li y cols, proponen que la expresión de genes de fusión por “trans-splicing” puede ser un evento fisiológico y que las translocaciones cromosómicas pueden ser consideradas una mutación que da lugar a la producción constitutiva de los genes de fusión.

Estas observaciones son consistentes con la conclusión de que los rearrreglos cromosómicos y los genes de fusión en células neoplásicas pueden presentar mecanismos para la expresión deregulada de productos de genes quiméricos que son generados en etapas específicas del desarrollo y con funciones fisiológicas en células normales.

Este descubrimiento implica dos cuestiones de suma importancia que deben ser consideradas, en primer lugar es el riesgo de utilizar la presencia de los rearrreglos cromosómicos en los especímenes para el diagnóstico y detección de cáncer, especialmente en el contexto de enfermedad mínima residual, y en segundo lugar, las drogas diseñadas para interferir con las proteínas quiméricas podrían ocasionar toxicidad debido a la inhibición de proteínas similares en células normales (180).

8. Conclusiones

Identificamos 39 genes que son modulados por PAX3-FKHR y están diferencialmente expresados entre rhabdomyosarcomas embrionarios y alveolares.

En nuestra lista se confirmaron la inducción de genes blanco de PAX3-FKHR reportados previamente como MET y MYOD1.

Funcionalmente, casi una tercera parte de los genes regulados por PAX3-FKHR/ER son factores de transcripción. También destaca la participación de algunos de los genes en el proceso de desarrollo, sin embargo, contrario a lo esperado, una gran mayoría están involucrados principalmente con el desarrollo de sistema nervioso.

El número limitado de genes identificado sugiere que, la sola expresión de PAX3-FKHR no es suficiente para inducir el patrón de expresión completo identificado con los tumores RMSA positivos para PAX3-FKHR.

El contexto celular como el tipo y efectos del ambiente pueden ser parámetros importantes que influyen en la activación de genes blanco por parte de PAX3-FKHR.

Basado en nuestros resultados nosotros proponemos que PAX3-FKHR contribuye en la expresión de MYCN en RMSA y a su vez MYCN colabora con la proteína de fusión PAX3-FKHR el proceso de transformación en RMSA.

Estudios recientes sugieren que los genes de fusión representan alteraciones genéticas frecuentes en cáncer. Cincuenta por ciento de los genes que participan en estos genes de fusión son factores de transcripción, por lo tanto, para el mejor entendimiento del cáncer será esencial identificar los blancos transcripcionales de estas proteínas quiméricas a un nivel genómico, sin duda este conocimiento nos ayudará a entender el complejo proceso de la transformación oncogénica, y finalmente se podrá traducir en un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con cáncer.

9. Referencias Bibliográficas

1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):233-45.
2. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2008). 2008 [updated 2008; cited]; Available from: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
3. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):644-8.
4. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):685-94.
5. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. 1995 Apr 15;75(8):2186-95.
6. Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Oct 5;97(19):1407-27.
7. Fajardo AG, Mendoza H, Valdez E, Mejia M, Yamamoto L, Mejia A, et al. Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio multicentrico. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1996;53(2):57-66.
8. Wexler LH, Herman LJ. Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In: Poplack Pa, editor. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3er ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 799-829.
9. Parham DM. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol*. 2001 May;14(5):506-14.
10. Newton WA, Jr., Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ, Hamoudi AB, et al. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification--an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer*. 1995 Sep 15;76(6):1073-85.
11. Pappo AS, Parham DM, Rao BN, Lobe TE. Soft tissue sarcomas in children. *Semin Surg Oncol*. 1999 Mar;16(2):121-43.
12. Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*. 2009 Jun 17;117:17.
13. Womer RB, Pressey JG. Rhabdomyosarcoma and soft tissue sarcoma in childhood. *Curr Opin Oncol*. 2000 Jul;12(4):337-44.

14. Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, et al. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Mar;33(3):310-21.
15. Weber-Hall S, Anderson J, McManus A, Abe S, Nojima T, Pinkerton R, et al. Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1996 Jul 15;56(14):3220-4.
16. Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC, Cavenee WK. Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature*. 1985 Jul 25-31;316(6026):330-4.
17. Scrabble HJ, Witte DP, Lampkin BC, Cavenee WK. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature*. 1987 Oct 15-21;329(6140):645-7.
18. Tycko B. Genomic imprinting: mechanism and role in human pathology. *Am J Pathol*. 1994 Mar;144(3):431-43.
19. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 1995 Mar 15;9(6):650-62.
20. Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, et al. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):3026-30.
21. Schwienbacher C, Sabbioni S, Campi M, Veronese A, Bernardi G, Menegatti A, et al. Transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: identification and mutational analysis of the BWR1A gene reveals the presence of mutations in tumor samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3873-8.
22. Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swansbury J, Pritchard-Jones K, et al. Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Feb;36(2):259-67.
23. Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene*. 1999 Sep 20;18(38):5340-8.
24. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther*. 2002 Mar-Apr;1(2):97-104.
25. Barr FG, Smith LM, Lynch JC, Strzelecki D, Parham DM, Qualman SJ, et al. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III trial: a report from the Children's Oncology Group. *J Mol Diagn*. 2006 May;8(2):202-8.
26. Sorensen PH, 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*. 2002 Jun 1;20(11):2672-9.

27. Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, et al. Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *Jama*. 1995 Feb 15;273(7):553-7.
28. Kilpatrick SE, Garvin AJ. Recent advances in the diagnosis of pediatric soft-tissue tumors. *Med Pediatr Oncol*. 1999 May;32(5):373-6.
29. Pfeifer JD, Hill DA, O'Sullivan MJ, Dehner LP. Diagnostic gold standard for soft tissue tumours: morphology or molecular genetics? *Histopathology*. 2000 Dec;37(6):485-500.
30. Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Hum Pathol*. 2000 May;31(5):532-8.
31. Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, Stegmaier S, Treuner J, Simon-Klingenstein K, et al. Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5539-45.
32. Raney RB, Anderson JR, Barr FG, Donaldson SS, Pappo AS, Qualman SJ, et al. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001 May;23(4):215-20.
33. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol*. 2001 Jun 15;19(12):3091-102.
34. Breneman JC, Lyden E, Pappo AS, Link MP, Anderson JR, Parham DM, et al. Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma--a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 1;21(1):78-84.
35. Barr FG, Galili N, Holick J, Biegel JA, Rovera G, Emanuel BS. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 1993 Feb;3(2):113-7.
36. Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Valentine MB, Morris SW, Noll M. The gene for PAX7, a member of the paired-box-containing genes, is localized on human chromosome arm 1p36. *Genomics*. 1993 Sep;17(3):767-9.
37. Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development*. 1994 Apr;120(4):957-71.
38. Chalepakis G, Jones FS, Edelman GM, Gruss P. Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12745-9.
39. Chalepakis G, Gruss P. Identification of DNA recognition sequences for the Pax3 paired domain. *Gene*. 1995 Sep 11;162(2):267-70.

40. Apuzzo S, Abdelhakim A, Fortin AS, Gros P. Cross-talk between the paired domain and the homeodomain of Pax3: DNA binding by each domain causes a structural change in the other domain, supporting interdependence for DNA Binding. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):33601-12.
41. Cao Y, Wang C. The COOH-terminal transactivation domain plays a key role in regulating the in vitro and in vivo function of Pax3 homeodomain. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9854-62.
42. Chalepakis G, Goulding M, Read A, Strachan T, Gruss P. Molecular basis of *spotch* and *Waardenburg Pax-3* mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):3685-9.
43. Robson EJ, He SJ, Eccles MR. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):52-62.
44. Bober E, Franz T, Arnold HH, Gruss P, Tremblay P. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*. 1994 Mar;120(3):603-12.
45. Daston G, Lamar E, Olivier M, Goulding M. Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development*. 1996 Mar;122(3):1017-27.
46. Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP, Epstein JA. Pax3 functions in cell survival and in *pax7* regulation. *Development*. 1999 Apr;126(8):1665-74.
47. Epstein JA, Lam P, Jepeal L, Maas RL, Shapiro DN. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem*. 1995 May 19;270(20):11719-22.
48. Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C. The role of *Lbx1* in migration of muscle precursor cells. *Development*. 2000 Jan;127(2):437-45.
49. Baldwin CT, Hoth CF, Macina RA, Milunsky A. Mutations in PAX3 that cause *Waardenburg syndrome type I*: ten new mutations and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1995 Aug 28;58(2):115-22.
50. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R, Gruss P, et al. *Waardenburg's syndrome* patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*. 1992 Feb 13;355(6361):635-6.
51. Read AP, Newton VE. *Waardenburg syndrome*. *J Med Genet*. 1997 Aug;34(8):656-65.
52. Yang XM, Trasler DG. Abnormalities of neural tube formation in pre-spina bifida *spotch*-delayed mouse embryos. *Teratology*. 1991 Jun;43(6):643-57.
53. Conway SJ, Henderson DJ, Copp AJ. Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the *spotch (Sp2H)* mutant. *Development*. 1997 Jan;124(2):505-14.

54. Franz T, Kothary R. Characterization of the neural crest defect in *Spotch* (Sp1H) mutant mice using a lacZ transgene. *Brain Res Dev Brain Res*. 1993 Mar 19;72(1):99-105.
55. Henderson DJ, Conway SJ, Copp AJ. Rib truncations and fusions in the Sp2H mouse reveal a role for Pax3 in specification of the ventro-lateral and posterior parts of the somite. *Dev Biol*. 1999 May 1;209(1):143-58.
56. Franz T, Kothary R, Surani MA, Halata Z, Grim M. The *Spotch* mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat Embryol (Berl)*. 1993 Feb;187(2):153-60.
57. 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*. 1999 Nov 1;59(21):5443-8.
58. Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):7989-97.
59. Parker CJ, Shawcross SG, Li H, Wang QY, Herrington CS, Kumar S, et al. Expression of PAX 3 alternatively spliced transcripts and identification of two new isoforms in human tumors of neural crest origin. *Int J Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):314-20.
60. Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3369-75.
61. Gerber JK, Richter T, Kremmer E, Adamski J, Hofler H, Balling R, et al. Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. *J Pathol*. 2002 Jul;197(3):293-7.
62. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS, et al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 1993 Nov;5(3):230-5.
63. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):2869-72.
64. Parry P, Wei Y, Evans G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Oct;11(2):79-84.
65. Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, et al. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*. 1997 Jan 16;14(2):195-202.
66. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3714-9.

67. Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, Shutter JR, Accili D. Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol.* 2003 Aug 18;162(4):535-41.
68. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2003 Jan;4(1):119-29.
69. Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K, Wikstrom M. Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry.* 2001 May 22;40(20):5861-9.
70. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005 Nov 14;24(50):7410-25.
71. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 1;102(5):1649-54.
72. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene.* 2001 Sep 10;20(40):5736-46.
73. Benniselli JL, Edwards RH, Barr FG. Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 28;93(11):5455-9.
74. Fredericks W, Galili N, Mukhopadhyay S, Rovera G, Benniselli J, Barr F, et al. The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol Cell Biol.* 1995;15(3):1522-35.
75. Davis RJ, Barr FG. Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 22;94(15):8047-51.
76. del Peso L, Gonzalez VM, Hernandez R, Barr FG, Nunez G. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. *Oncogene.* 1999 Dec 2;18(51):7328-33.
77. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999 Mar 19;96(6):857-68.
78. Rena G, Prescott AR, Guo S, Cohen P, Unterman TG. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J.* 2001 Mar 15;354(Pt 3):605-12.
79. Relaix F, Polimeni M, Rocancourt D, Ponzetto C, Schafer BW, Buckingham M. The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes Dev.* 2003 Dec 1;17(23):2950-65.

80. Epstein JA, Song B, Lakkis M, Wang C. Tumor-specific PAX3-FKHR transcription factor, but not PAX3, activates the platelet-derived growth factor alpha receptor. *Mol Cell Biol.* 1998 Jul;18(7):4118-30.
81. Khan J, Bittner ML, Saal LH, Teichmann U, Azorsa DO, Gooden GC, et al. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 9;96(23):13264-9.
82. Begum S, Emani N, Cheung A, Wilkins O, Der S, Hamel PA. Cell-type-specific regulation of distinct sets of gene targets by Pax3 and Pax3/FKHR. *Oncogene.* 2005 Mar 10;24(11):1860-72.
83. Zhang L, Wang C. Identification of a new class of PAX3-FKHR target promoters: a role of the Pax3 paired box DNA binding domain. *Oncogene.* 2007 Mar 8;26(11):1595-605.
84. Scheidler S, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd, Barr FG, Vogt PK. The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9805-9.
85. Lam PY, Sublett JE, Hollenbach AD, Roussel MF. The oncogenic potential of the Pax3-FKHR fusion protein requires the Pax3 homeodomain recognition helix but not the Pax3 paired-box DNA binding domain. *Mol Cell Biol.* 1999 Jan;19(1):594-601.
86. Bernasconi M, Remppis A, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd, Schafer BW. Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):13164-9.
87. Ebauer M, Wachtel M, Niggli FK, Schafer BW. Comparative expression profiling identifies an in vivo target gene signature with TFAP2B as a mediator of the survival function of PAX3/FKHR. *Oncogene.* 2007 May 21.
88. Kikuchi K, Tsuchiya K, Otabe O, Gotoh T, Tamura S, Katsumi Y, et al. Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jan 18;365(3):568-74.
89. Keller C, Arenkiel BR, Coffin CM, El-Bardeesy N, DePinho RA, Capecchi MR. Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. *Genes Dev.* 2004 Nov 1;18(21):2614-26.
90. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
91. Graf Finckenstein F, Shahbazian V, Davicioni E, Ren YX, Anderson MJ. PAX-FKHR function as pangenes by simultaneously inducing and inhibiting myogenesis. *Oncogene.* 2008 Mar 27;27(14):2004-14.
92. Tomescu O, Xia SJ, Strezlecki D, Bennicelli JL, Ginsberg J, Pawel B, et al. Inducible short-term and stable long-term cell culture systems reveal that the PAX3-FKHR fusion oncoprotein regulates CXCR4, PAX3, and PAX7 expression. *Lab Invest.* 2004 Aug;84(8):1060-70.

93. Barber TD, Barber MC, Tomescu O, Barr FG, Ruben S, Friedman TB. Identification of target genes regulated by PAX3 and PAX3-FKHR in embryogenesis and alveolar rhabdomyosarcoma. *Genomics*. 2002 Mar;79(3):278-84.
94. Armoni M, Quon MJ, Maor G, Avigad S, Shapiro DN, Harel C, et al. PAX3/forkhead homolog in rhabdomyosarcoma oncoprotein activates glucose transporter 4 gene expression in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Nov;87(11):5312-24.
95. Ayalon D, Glaser T, Werner H. Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression by the PAX3-FKHR oncoprotein. *Growth Horm IGF Res*. 2001;11(5):289-97.
96. Ginsberg JP, Davis RJ, Bennicelli JL, Nauta LE, Barr FG. Up-regulation of MET but not neural cell adhesion molecule expression by the PAX3-FKHR fusion protein in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3542-6.
97. Rudnicki MA, Jaenisch R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays*. 1995 Mar;17(3):203-9.
98. Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(1):1-8.
99. Buckingham M. Molecular biology of muscle development. *Cell*. 1994 Jul 15;78(1):15-21.
100. Margue CM, Bernasconi M, Barr FG, Schafer BW. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene*. 2000 Jun 8;19(25):2921-9.
101. Wachtel M, Runge T, Leuschner I, Stegmaier S, Koscielniak E, Treuner J, et al. Subtype and prognostic classification of rhabdomyosarcoma by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 10;24(5):816-22.
102. Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9):4213-8.
103. Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, Tanaka K, Ida K, Koh K, et al. Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Apr;46(4):348-58.
104. Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, Reza R, Zhao D, Trzyna E, et al. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7926-35.
105. Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot JM, Kucia M, et al. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2597-606.
106. Burel SA, Harakawa N, Zhou L, Pabst T, Tenen DG, Zhang DE. Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol Cell Biol*. 2001 Aug;21(16):5577-90.

107. Deneen B, Denny CT. Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene*. 2001 Oct 11;20(46):6731-41.
108. Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, Forus A, Hovig E, Fodstad O, et al. Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br J Cancer*. 1995 Aug;72(2):393-8.
109. Iolascon A, Faienza MF, Coppola B, Rosolen A, Basso G, Della Ragione F, et al. Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Apr;15(4):217-22.
110. Obana K, Yang HW, Piao HY, Taki T, Hashizume K, Hanada R, et al. Aberrations of p16INK4A, p14ARF and p15INK4B genes in pediatric solid tumors. *Int J Oncol*. 2003 Oct;23(4):1151-7.
111. Linardic CM, Naini S, Herndon JE, 2nd, Kesserwan C, Qualman SJ, Counter CM. The PAX3-FKHR fusion gene of rhabdomyosarcoma cooperates with loss of p16INK4A to promote bypass of cellular senescence. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6691-9.
112. Sharp R, Recio JA, Jhappan C, Otsuka T, Liu S, Yu Y, et al. Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1276-80.
113. Wang W, Kumar P, Epstein J, Helman L, Moore JV, Kumar S. Insulin-like growth factor II and PAX3-FKHR cooperate in the oncogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1998 Oct 1;58(19):4426-33.
114. Wang W, Slevin M, Kumar S, Kumar P. The cooperative transforming effects of PAX3-FKHR and IGF-II on mouse myoblasts. *Int J Oncol*. 2005 Oct;27(4):1087-96.
115. Ren YX, 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*. 2008 Aug 15;68(16):6587-97.
116. Pandita A, Zielenska M, Thorner P, Bayani J, Godbout R, Greenberg M, et al. Application of comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and microarray analysis in the identification of subtype-specific patterns of genomic changes in rhabdomyosarcoma. *Neoplasia*. 1999 Aug;1(3):262-75.
117. Goldstein M, Meller I, Issakov J, Orr-Urtreger A. Novel genes implicated in embryonal, alveolar, and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumors. *Neoplasia*. 2006 May;8(5):332-43.
118. Barr FG, Duan F, Smith LM, Gustafson D, Pitts M, Hammond S, et al. Genomic and clinical analyses of 2p24 and 12q13-q14 amplification in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Aug;48(8):661-72.

119. Nabarro S, Himoudi N, Papanastasiou A, Gilmour K, Gibson S, Sebire N, et al. Coordinated oncogenic transformation and inhibition of host immune responses by the PAX3-FKHR fusion oncoprotein. *J Exp Med*. 2005 Nov 21;202(10):1399-410.
120. Jostes B, Walther C, Gruss P. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev*. 1990 Dec;33(1):27-37.
121. Mootoosamy RC, Dietrich S. Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis. *Development*. 2002 Feb;129(3):573-83.
122. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):777-86.
123. Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development*. 1996 Mar;122(3):831-8.
124. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol*. 2000 Feb 15;218(2):115-24.
125. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res*. 1995 May 25;23(10):1686-90.
126. Pratt WB. Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol Cell Endocrinol*. 1990 Nov 12;74(1):C69-76.
127. Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, Zaitsev K, Madden B, McCormick DJ, et al. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol*. 1993 Feb;13(2):869-76.
128. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989 Nov 3;59(3):477-87.
129. Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*. 1988 Jul 15;54(2):199-207.
130. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Apr;83(8):2496-500.
131. Xia SJ, Barr FG. Analysis of the transforming and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR oncoprotein. *Oncogene*. 2004 Sep 9;23(41):6864-71.
132. Naef F, Magnasco MO. Solving the riddle of the bright mismatches: labeling and effective binding in oligonucleotide arrays. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2003 Jul;68(1 Pt 1):011906.

133. Wu CH, Horng SJ. Run-length chain coding and scalable computation of a shape's moments using reconfigurable optical buses. *IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern.* 2004 Apr;34(2):845-55.
134. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5116-21.
135. Sandberg R, Ernberg I. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. *Genome Biol.* 2005;6(8):R65.
136. Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc.* 2008;3(10):1578-88.
137. Taulli R, Scuoppo C, Bersani F, Accornero P, Forni PE, Miretti S, et al. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 2006 May 1;66(9):4742-9.
138. Thomas WD, Raif A, Hansford L, Marshall G. N-myc transcription molecule and oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 May;36(5):771-5.
139. Driman D, Thorner PS, Greenberg ML, Chilton-MacNeill S, Squire J. MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Cancer.* 1994 Apr 15;73(8):2231-7.
140. Hachitanda Y, Toyoshima S, Akazawa K, Tsuneyoshi M. N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization: its correlation with histologic features. *Mod Pathol.* 1998 Dec;11(12):1222-7.
141. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Carda C, Lopez-Guerrero JA, Ferrer J, Pellin-Perez A, et al. Cytogenetic and molecular findings related to rhabdomyosarcoma. An analysis of seven cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Jul 15;144(2):125-33.
142. Toffolatti L, Frascella E, Ninfo V, Gambini C, Forni M, Carli M, et al. MYCN expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and tumour samples. *J Pathol.* 2002 Apr;196(4):450-8.
143. Williamson D, Lu YJ, Gordon T, Sciot R, Kelsey A, Fisher C, et al. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 1;23(4):880-8.
144. Sivak LE, Pont-Kingdon G, Le K, Mayr G, Tai KF, Stevens BT, et al. A novel intron element operates posttranscriptionally To regulate human N-myc expression. *Mol Cell Biol.* 1999 Jan;19(1):155-63.
145. Sivak LE, Tai KF, Smith RS, Dillon PA, Brodeur GM, Carroll WL. Autoregulation of the human N-myc oncogene is disrupted in amplified but not single-copy neuroblastoma cell lines. *Oncogene.* 1997 Oct 16;15(16):1937-46.
146. Strieder V, Lutz W. Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer Lett.* 2002 Jun 28;180(2):107-19.

147. Hiller S, Breit S, Wang ZQ, Wagner EF, Schwab M. Localization of regulatory elements controlling human MYCN expression. *Oncogene*. 1991 Jun;6(6):969-77.
148. Wada RK, Seeger RC, Reynolds CP, Alloggiamento T, Yamashiro JM, Ruland C, et al. Cell type-specific expression and negative regulation by retinoic acid of the human N-myc promoter in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 1992 Apr;7(4):711-7.
149. Xia SJ, Rajput P, Strzelecki DM, Barr FG. Analysis of genetic events that modulate the oncogenic and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR fusion oncoprotein. *Lab Invest*. 2007 Apr;87(4):318-25.
150. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2207-14.
151. Puri PL, Wu Z, Zhang P, Wood LD, Bhakta KS, Han J, et al. Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev*. 2000 Mar 1;14(5):574-84.
152. Taniguchi E, Nishijo K, McCleish AT, Michalek JE, Grayson MH, Infante AJ, et al. PDGFR-A is a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2008 Nov 20;27(51):6550-60.
153. Nishijo K, Chen QR, Zhang L, McCleish AT, Rodriguez A, Cho MJ, et al. Credentialing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2902-11.
154. Diomedes-Camassei F, McDowell HP, De Ioris MA, Uccini S, Altavista P, Raschella G, et al. Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4119-27.
155. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, et al. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5278-86.
156. Zucchini C, Rocchi A, Manara MC, De Sanctis P, Capanni C, Bianchini M, et al. Apoptotic genes as potential markers of metastatic phenotype in human osteosarcoma cell lines. *Int J Oncol*. 2008 Jan;32(1):17-31.
157. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Sep;14(3):887-900.
158. Katoh M. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades. *Int J Mol Med*. 2009 Jun;23(6):763-9.
159. Torng PL, Lee YC, Huang CY, Ye JH, Lin YS, Chu YW, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) acts as an invasion-metastasis suppressor in ovarian endometrioid carcinoma. *Oncogene*. 2008 Apr 3;27(15):2137-47.
160. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.

161. Zhang Y, Schwartz J, Wang C. Comparative Analysis of Paired- and Homeodomain-specific Roles in PAX3-FKHR Oncogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(4):370-83.
162. Lieb JD, Liu X, Botstein D, Brown PO. Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*. 2001 Aug;28(4):327-34.
163. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*. 2000 Dec 22;290(5500):2306-9.
164. Galgoczy DJ, Cassidy-Stone A, Llinas M, O'Rourke SM, Herskowitz I, DeRisi JL, et al. Genomic dissection of the cell-type-specification circuit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 28;101(52):18069-74.
165. Nagaraj VH, O'Flanagan RA, Bruning AR, Mathias JR, Vershon AK, Sengupta AM. Combined analysis of expression data and transcription factor binding sites in the yeast genome. *BMC Genomics*. 2004 Aug 26;5(1):59.
166. Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC. PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 13;104(46):18085-90.
167. Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC. Guilt by association: PAX3-FOXO1 regulates gene expression through selective destabilization of the EGR1 transcription factor. *Cell Cycle*. 2008 Apr 1;7(7):837-41.
168. Charron J, Gagnon JF, Cadrin-Girard JF. Identification of N-myc regulatory regions involved in embryonic expression. *Pediatr Res*. 2002 Jan;51(1):48-56.
169. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. 2007 Jun;8(6):424-36.
170. Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, et al. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):626-35.
171. Raphael BJ, Volik S, Yu P, Wu C, Huang G, Linardopoulou EV, et al. A sequence-based survey of the complex structural organization of tumor genomes. *Genome Biol*. 2008;9(3):R59.
172. Simpson AJ. Sequence-based advances in the definition of cancer-associated gene mutations. *Curr Opin Oncol*. 2009 Jan;21(1):47-52.
173. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1443-8.
174. Walz C, Haferlach C, Hanel A, Metzgeroth G, Erben P, Gosenca D, et al. Identification of a MYO18A-PDGFRB fusion gene in an eosinophilia-associated atypical myeloproliferative neoplasm with a t(5;17)(q33-34;q11.2). *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Feb;48(2):179-83.

175. Volik S, Zhao S, Chin K, Brebner JH, Herndon DR, Tao Q, et al. End-sequence profiling: sequence-based analysis of aberrant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7696-701.
176. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):727-32.
177. Ruan Y, Ooi HS, Choo SW, Chiu KP, Zhao XD, Srinivasan KG, et al. Fusion transcripts and transcribed retrotransposed loci discovered through comprehensive transcriptome analysis using Paired-End diTags (PETs). *Genome Res*. 2007 Jun;17(6):828-38.
178. Campbell PJ, Stephens PJ, Pleasance ED, O'Meara S, Li H, Santarius T, et al. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat Genet*. 2008 Jun;40(6):722-9.
179. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. 2009 Mar 5;458(7234):97-101.
180. Li H, Wang J, Mor G, Sklar J. A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells. *Science*. 2008 Sep 5;321(5894):1357-61.
181. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Mar;36(3):211-23.

10. Listado de Abreviaturas

SE: Sarcoma de Ewing

SS: Sarcoma sinovial

RMS: Rabdomiosarcoma

RMSA: Rabdomiosarcoma alveolar

RMSE: Rabdomiosarcoma embrionario

RCB: Rearreglos cromosómicos balanceados

DT: dominio de transactivación

CML: Leucemia mielógena crónica

CGH: Hibridación genómica comparativa

HD: homodominio

PD: paired domain

6xPRS9 (paireddomain recognition site): se refiere a una secuencia que contiene seis copias del sitio de unión a ADN de PAX, es un derivativo sintético de e5, la cual es la secuencia del promotor de drosophila even-skipped, y contiene ambos elementos regulatorios, paired y homeobox.

pK1: Es un vector MSCV (Murine stem cell virus), idéntico a MigR1 excepto que tiene un inserto del gen de resistencia a puromicina en lugar de un cassette de proteína fluorescente verde (GFP).

SAM: Significance analysis of microarrays

pBabe: Es un vector el cual se deriva del virus murino Molones (MMLV).

SLN: señal de localización nuclear

4-OHT: 4-hidroxitamoxifen

FDR: False discovery rate

TFBS: sitios de unión de factores de transcripción

ARNr: ARN ribosomal

ARNm: ARN mensajera

qRT-PCR: RT-PCR en tiempo real

RT: retrotranscripción

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

bHLH: familia de factores transcripcionales hélice-lazo-hélice básicos

5' UTR: 5 Untranslated Region

11. Publicación

Identification of PAX3-FKHR-Regulated Genes Differentially Expressed Between Alveolar and Embryonal Rhabdomyosarcoma: Focus on MYCN as a Biologically Relevant Target

Gabriela E. Mercado,^{1†} Shujuan J. Xia,¹ Chune Zhang,¹ Eun Hyun Ahn,¹ Donna M. Gustafson,¹ Marick Laé,^{2‡} Marc Ladanyi,^{2,3} and Frederic G. Barr^{1*}

¹Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA 19104

²Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021

³Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021

Rhabdomyosarcoma is a family of myogenic soft tissue tumors subdivided into two main subtypes: alveolar (ARMS) and embryonal (ERMS). ARMS is characterized by a frequent 2;13 chromosomal translocation that creates a PAX3-FKHR fusion transcription factor. To identify downstream targets of PAX3-FKHR, we introduced an inducible form of PAX3-FKHR into human RD ERMS cells. Microarray analysis identified 39 genes (29 upregulated and 10 downregulated) that are modulated by PAX3-FKHR in RD cells and differentially expressed between ERMS and PAX3-FKHR-positive ARMS tumors. Functional annotation demonstrated that genes involved in regulation of transcription and development, particularly neurogenesis, are represented in this group. *MYCN* was one notable neural-related transcription factor-encoding gene identified in this set, and its regulation by PAX3-FKHR was further confirmed at the RNA and protein levels. The findings of cycloheximide inhibition and time-course studies are consistent with the hypothesis that the PAX3-FKHR protein acts directly on the *MYCN* gene at the transcriptional level. Functional studies established that *MYCN* cooperates with PAX3-FKHR to enhance oncogenic activity. In conclusion, we identified a selected set of biologically relevant genes modulated by PAX3-FKHR, and demonstrated that PAX3-FKHR contributes to the expression of *MYCN* and in turn *MYCN* collaborates with PAX3-FKHR in tumorigenesis. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common pediatric soft-tissue tumor (Gurney et al., 1995). Alveolar (ARMS) and embryonal (ERMS) are the main histopathologic subtypes of RMS, and show different clinical behaviors and genetic features (Parham, 2001). All subtypes show evidence of skeletal muscle differentiation, and are proposed to originate due to deregulated myogenic differentiation and growth pathways.

Most ARMS tumors are characterized by recurrent chromosomal translocations. The frequent translocation t(2;13)(q35;q14) is present in 55% of cases while the variant translocation t(1;13)(p36;q14) is present in 22%, and 23% are fusion-negative (Sorensen et al., 2002). The 2;13 and 1;13 translocations generate gene fusions that encode chimeric transcription factors consisting of the DNA binding domain of PAX3 or PAX7 fused to the transactivation domain of FKHR (FOXO1) (Barr, 2001).

The formation of the chimeric transcription factor is a key step in ARMS tumorigenesis. Previous

studies suggest a gain of function with deregulated expression of downstream targets, which participate in pathways related to proliferation, survival, differentiation, and migration (Barr, 2001). A few genes have been defined as possible PAX3-FKHR targets, including *MET*, *PDGFRA*, *BCL2L1*, *CXCR4*, and *TFAP2B* (Epstein et al., 1998;

Supported by: NIH; Grant numbers: CA64202 (FGB), CA87812 (GEM), CA104896 (FGB), CA106450 (ML); Alveolar Rhabdomyosarcoma Research Fund; University Research Foundation; Children's Oncology Group Chair's Development Fund; Joanna McAfee Childhood Cancer Foundation; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); National Institute of Genomic Medicine, Mexico (INMEGEN).

[†]Present address: National Institute of Genomics, Mexico City, 01900 Mexico.

[‡]Present address: Service de Pathologie, Département de Biologie des tumeurs, Institut Curie, Paris, France.

*Correspondence to: Frederic G. Barr, M.D., Ph.D., Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, 505C Stellar Chance Laboratories, 422 Curie Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA.
E-mail: barrfg@mail.med.upenn.edu

Received 4 October 2007; Accepted 4 February 2008

DOI 10.1002/gcc.20554

Published online 11 March 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Ginsberg et al., 1998; Margue et al., 2000; Tomescu et al., 2004; Ebauer et al., 2007). In the present study, we used gene-expression profiling of two complementary systems, an inducible cell culture system and a panel of ARMS and ERMS tumors, to identify a new set of PAX3-FKHR target genes pertinent to ARMS pathogenesis. Although downstream PAX3-FKHR target genes were investigated in other recent cell culture studies (Davicioni et al., 2006), this inducible system has the advantage of identifying early genes induced by PAX3-FKHR, and these early genes are likely to be direct targets of this chimeric transcription factor.

MATERIALS AND METHODS

Tumor Samples and Cell Lines

Thirty-one frozen primary tumor specimens (15 ERMS and 16 ARMS) were used for microarray profiling and were described previously (Lae et al., 2007). An independent set of 38 RMS samples (19 ARMS and 19 ERMS) were used for PCR validation. The samples were derived from residual pathology specimens removed for diagnostic and/or therapeutic purposes from the Children's Hospital of Philadelphia, Memorial Sloan Kettering Cancer Center or the Hospital of the University of Pennsylvania. Additional tumor material was provided by the Cooperative Human Tissue Network. Each tumor sample used for microarray analysis was confirmed histopathologically to have >70% tumor cells. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR were detected by either reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and differential hybridization after slot blotting (Barr et al., 1995) or real-time RT-PCR with specific probes (Barr et al., 2006).

The RD and SMS-CTR ERMS cell lines were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA) with 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT), and the RH6 and RH36 ERMS cell lines were maintained in DMEM with 15% FBS. The media were supplemented with penicillin, streptomycin, and fungizone (Gibco).

Inducible System, Plasmid Transfection, and Retroviral Transduction

The construct for the inducible form of the PAX3-FKHR fusion protein (P3FK/ER) was described previously (Tomescu et al., 2004). This construct was prepared by fusing PAX3-FKHR with the modified estrogen receptor ligand binding domain (Littlewood et al., 1995). Retroviral trans-

duction of P3FK/ER in pK1 or vector controls was performed as described previously (Xia and Barr, 2004) to infect the ERMS cell lines. Cells selected in puromycin (1 μ g/ml) were expanded for a limited number of population doublings before use in individual experiments. This procedure was repeated to generate multiple, independent transduced populations for P3FK/ER and for the controls with the empty vector pK1. To activate P3FK/ER, the cells were treated with the ligand 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), which results in the transfer of P3FK/ER to the nucleus and induction of transcriptional activity.

RNA Extraction, Labeling, and Hybridization

For microarray analysis, RNA was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA). For validation studies, the RNA was isolated using RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX). For microarray studies, labeling and hybridization were performed according to Affymetrix standard protocols. As was previously performed for the tumor samples (Lae et al., 2007), labeled cRNA from the inducible system was hybridized onto the Affymetrix GeneChip Human Genome U133A array (Santa Clara, CA), which contains 22,215 probes. Microarray slides were scanned using the Affymetrix GCS 2500 scanner to collect fluorescence signal.

Microarray Data Analysis

Affymetrix Microarray Suite 5.0 was used to measure expression levels, and default values were applied to all analysis parameters. Data files were uploaded into GeneSpring (Agilent Technology, Santa Clara, CA), and normalization of expression levels of all spot replicates was performed. Probe sets were initially filtered to select only those with a present or marginal call in at least one sample. This yielded 17,605 probe sets, which contain most of the variation in gene expression information across all samples. Identification of differentially expressed genes between ARMS and ERMS samples was performed using significance analysis of microarray (SAM) software with default settings (Tusher et al., 2001). The statistical test Mixed ANOVA (Partek Pro, St. Louis, MO) was used to analyze the data from the inducible cell culture system. Functional annotation was assigned through GENATLAS (www.genatlas.org) and previously published literature. Gene classification was obtained through the web-accessible functional annotation tool DAVID 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>; Dennis et al., 2003).

Quantitative RT-PCR Analysis

cDNA synthesis from total RNA samples was performed using MultiScribe reverse transcriptase with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA was quantified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using the 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems). The sequences for the primer and probes for KCNN3 and MYCN were published previously (Tomita et al., 2003; Williamson et al., 2005). Gene expression levels were normalized using the level of 18S RNA. Each sample was tested in triplicate, and data are expressed as mean \pm SD. Statistical differences between groups were analyzed by the Mann–Whitney test. Statistical significance was accepted at the $P < 0.05$ level (two-tailed).

Reporter Assay

Transcriptional activity was measured with the Dual-Luciferase[®] Reporter (DLR[™]) Assay System (Promega, Madison, WI), performed according to the manufacturer's instructions. MYCN promoter constructs were provided by Dr. W. Carroll.

Western Blot Analysis

Protein lysates were prepared and assayed by Western blot analysis as described previously (Xia and Barr, 2004). The proteins were detected using antibodies directed against PAX3 (Abcam, Cambridge, MA) and MYCN (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

RESULTS

Microarray Analysis

To identify PAX3-FKHR downstream targets that are relevant in ARMS tumors, we compared the gene expression profiles of two independent sets of samples. To study the degree to which PAX3-FKHR accounts for differences between ARMS and ERMS, we expressed an inducible form of PAX3-FKHR (P3FK/ER) in an ERMS cell culture system. In particular, three populations expressing P3FK/ER were treated with or without 30 nM 4-OHT and three populations transduced with vector only (pK1) were similarly treated. Use of this ERMS cell line permits examination of the effect of PAX3-FKHR expression in this closely related myogenic tumor background. Furthermore, the relevance of this ERMS cell line to tumor phenotype is shown in a nude rat injection model in which there is increased dissemination to bone

sites, similar to ARMS metastasis, when these cells express PAX3-FKHR (LeGallo et al., 2005).

The other set of samples consisted of RNA isolates from 15 fusion-negative ERMS tumors and 16 PAX3-FKHR-positive ARMS tumors. Expression profiling and initial analysis of this set of tumors has been previously performed (Lae et al., 2007). Our overall strategy was to use an oligonucleotide-based microarray to determine the downstream PAX3-FKHR targets in the first system and the differences in gene expression between the two RMS subtypes in the second system. Then these two sets of data could be compared in a final step to find genes induced by PAX3-FKHR that are differentially expressed between ERMS and fusion-positive ARMS.

To identify PAX3-FKHR regulated genes in the inducible cell culture system, we analyzed the gene expression data using the mixed ANOVA statistical test, which is a factorial design that includes both between and within subjects variables. This design consisted of one within subject variable ("treatment"), with two levels (0 and 30 nM), and one between subjects variable ("construct"), with two levels (vector control and P3FK/ER). Genes were selected for further analysis if the P value was less than 0.01, and there was at least a 1.5-fold expression difference between the two conditions, P3FK/ER-treated (30 nM) and P3FK/ER-untreated (0 nM). Based on these parameters, this analysis revealed a total of 361 genes (178 upregulated and 183 downregulated). To validate the specificity of the PAX3-FKHR targets, we also compared gene expression between 4-OHT treated and untreated control RD pK1 cells as well as between RD pK1 controls and RD P3FK/ER cells, and did not find any statistically significant genes from the previous analyses.

SAM was used to identify genes that are differentially expressed between the 16 PAX3-FKHR-positive ARMS and 15 fusion-negative ERMS tumors, using our previously published expression profiling dataset (Lae et al., 2007). SAM uses a permutation-based multiple testing algorithm and identifies significant genes with a variable false discovery rate (FDR; Tusher et al., 2001). Filtering was performed using a FDR less than 5%, and a fold change of at least of 1.5. Using these conditions, there were 1,085 probe sets differentially expressed between the two morphological subtypes, 779 genes overexpressed in ARMS and 306 overexpressed in ERMS.

On the basis of these findings, we identified the genes that were both differentially expressed in the inducible cell culture system and between

TABLE 1. PAX3-FKHR Target Genes Identified by Microarray Analysis

Affy ID	Common	Fold change	
		Inducible	Tumors
A. Upregulated genes			
218468_s_at	GREM1	6.61	2.58
203680_at	PRKAR2B	5.75	2.99
209757_s_at	MYCN	3.31	4.05
49111_at	DKFZp762M127	3.69	4.69
204851_s_at	DCX	3.26	8.23
205903_s_at	KCNN3	2.57	8.80
203510_at	MET	2.38	2.47
203962_s_at	NEBL	2.35	2.69
210794_s_at	MEG3	2.28	7.91
209656_s_at	TM4SF10	2.23	2.39
218145_at	TRIB3	2.10	2.14
206306_at	RYR3	2.09	4.64
222186_at	DKFZp686F02110	2.03	1.51
203725_at	GADD45A	2.02	2.33
202517_at	CRMP1	1.95	3.61
205935_at	FOXF1	1.85	4.86
207231_at	DZIP3	1.76	2.39
206657_s_at	MYOD1	1.75	3.78
212761_at	TCF7L2	1.74	2.04
209123_at	QDPR	1.72	3.68
203139_at	DAPK1	1.72	2.02
211042_x_at	MCAM	1.69	3.49
218007_s_at	RPS27L	1.66	1.99
218829_s_at	CHD7	1.63	2.20
35671_at	GTF3C1	1.65	1.52
209105_at	NCOA1	1.61	2.38
212585_at	OSBPL8	1.60	1.61
213256_at	MARCH3	1.54	3.00
204458_at	LYPLA3	1.50	1.53
B. Downregulated genes			
204014_at	DUSP4	4.30	2.41
210095_s_at	IGFBP3	2.46	2.63
218839_at	HEY1	2.10	2.70
213479_at	NPTX2	2.05	7.41
202670_at	MAP2K1	2.01	1.62
201368_at	ZFP36L2	1.81	1.90
210839_s_at	ENPP2	1.72	2.49
206114_at	EPHA4	1.61	4.03
205372_at	PLAG1	1.50	5.96
204301_at	KIAA0711	1.55	4.51

ARMS and ERMS. To assure that the expression values were consistent in most tumor samples, we filtered the genes based on the raw expression values. Upregulated genes were selected if the raw expression value was greater than 150 in at least 14 of 16 ARMS tumor samples, and for downregulated genes, the genes were selected if the raw expression value was greater than 150 in 13 of 15 ERMS. After removing probe sets that belonged to the same gene and showed similar gene expression profiles, a nonredundant set of 39 genes was obtained, of which 29 were upregulated and 10 were downregulated (Table 1).

TABLE 2. DAVID Functional Annotation

Biological process	Count	P value
Transcription regulator activity	10	8.9 E - 4
Protein kinase activity	6	6.3 E - 3
Nervous system development	5	1.6 E - 2
Cell communication	14	1.8 E - 2
Development	9	3.3 E - 2
Signal transduction	12	5.6 E - 2

To validate the results of the microarray analysis, seven genes (*KCNN3*, *MET*, *RYR3*, *DCX*, *TRIB3*, *FOXF1*, and *DKFZp762M127*) were examined by qRT-PCR. First we verified that all genes were induced in an independent dose-response experiment with the inducible cell culture system (data not shown). We also evaluated the expression of these genes by qRT-PCR in an independent set of 38 RMS tumor samples (19 PAX3-FKHR-positive ARMS and 19 ERMS); three of these genes were examined in a previous study (Lae et al., 2007) and the remainder were examined in the current study (data not shown). Of the seven genes examined, all were confirmed to be differentially expressed between the two RMS subtypes except *MET*, which did not show a significant statistical difference between ARMS and ERMS. Of note, previous studies also showed *MET* overexpression in both ERMS and ARMS tumors (Taulli et al., 2006).

Functional Annotation

The set of genes that exhibited either increased or decreased expression levels was analyzed for significant enrichment with respect to various categories of gene function using the DAVID 2007 annotation software. Categories corresponding to biological processes or molecular function that achieved the highest degree of significance are shown in Table 2. The analysis pointed to three major groups of genes whose expression was altered by PAX3-FKHR: (a) genes participating in development, (b) genes encoding protein kinases, and (c) genes involved in transcriptional regulation. Analysis of the genes in the category of development specifically pointed to proteins that participate in nervous system development. These genes included *GREM1*, *KCNN3*, *HEY1*, *CRMP1*, and *DCX*. Examination of the PAX3-FKHR-induced genes that participate in regulation of transcription indicated that 4 of these 10 genes encode products classified as helix-loop-helix transcriptional factors (bHLH); the genes included in this group are *NCOA1*, *HEY1*, *MYOD1*, and *MYCN*.

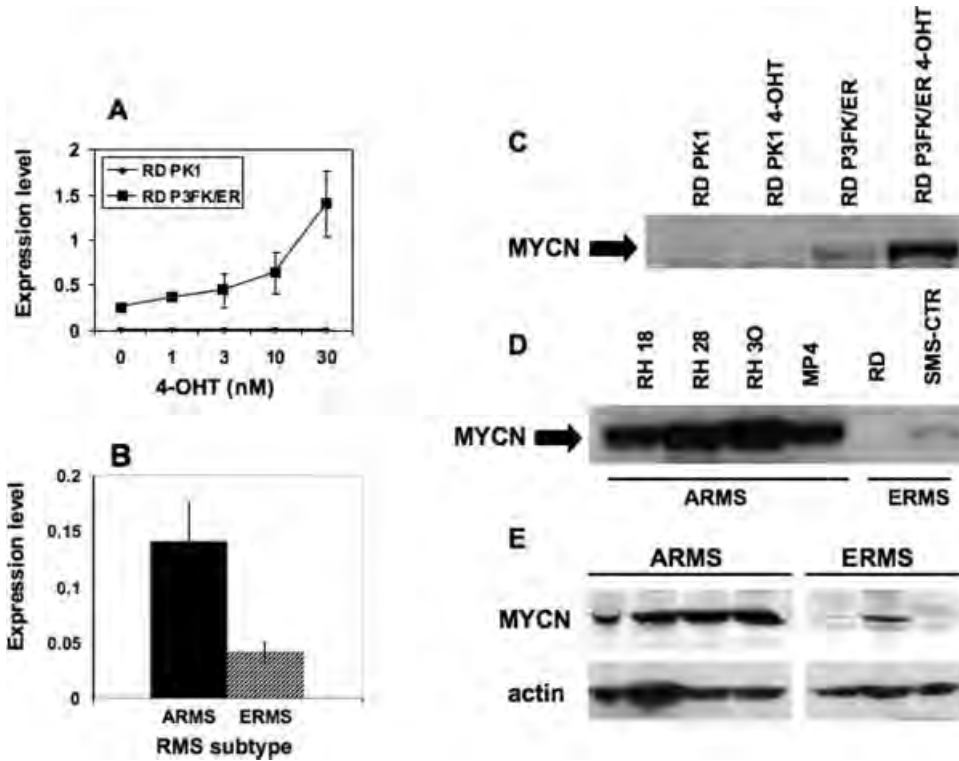


Figure 1. PAX3-FKHR induction of MYCN expression and relationship of MYCN expression to RMS subtype. A. RD ERMS cells were transduced with the inducible PAX3-FKHR construct (P3FK/ER) or vector control (PK1), and treated with the indicated concentration of 4-OHT. RNA was isolated 24 hr after induction, and MYCN transcript expression was measured by qRT-PCR. Values were normalized to corresponding 18S RNA expression levels and represent the ratio of the means (\pm SD) of triplicate measurements. B. MYCN mRNA was measured by qRT-PCR in an independent set of PAX3-FKHR-positive ARMS

($n = 19$) and fusion-negative ERMS ($n = 19$) tumor samples. The mean (\pm SD) of the mRNA levels in the two RMS subsets is shown. C. RD cells were transduced as in (A) and treated with 0 or 30 nM 4-OHT. Lysates were isolated 24 hr after induction, and MYCN protein expression was measured by Western blot analysis. D. MYCN protein expression was measured in lysates of the indicated ARMS and ERMS cell lines by Western blot analysis. E. MYCN protein expression was measured in lysates of four PAX3-FKHR-positive ARMS and three ERMS tumor samples by Western blot analysis.

MYCN Is Upregulated by PAX3-FKHR and Has a Higher Expression in ARMS

For further analysis of one target gene, we selected *MYCN*, which encodes a bHLH transcription factor normally functioning in neural development and also implicated in tumorigenesis (Thomas et al., 2004). As shown in Figure 1A, MYCN transcripts are regulated by PAX3-FKHR in a dose-response manner in the inducible RD cell culture system. To further confirm the induction of MYCN expression in a myogenic tumor environment, we transduced additional ERMS cell lines (SMS-CTR, RH6, and RH36) with the P3FK/ER construct. Treatment of these additional P3FK/ER-transduced ERMS cell lines with 4-OHT also showed an increase in MYCN expression (data not shown). Therefore, MYCN is upregulated by PAX3-FKHR in multiple, independent ERMS cell environments.

MYCN expression was determined by qRT-PCR in an independent set of 38 diagnostic primary RMS

samples, 19 PAX3-FKHR-positive ARMS, and 19 ERMS. As shown in Figure 1B, the PAX3-FKHR-positive ARMS tumors expressed higher levels of MYCN mRNA than the fusion-negative ERMS cases. This difference in MYCN expression between the two subtypes was statistically significant ($P = 0.0004$).

We next used Western blot analysis to examine MYCN expression at the protein level in the inducible RD cell culture system, and in RMS cell lines and tumor samples. Protein lysates were harvested from RD cells incubated in the absence and presence of 30 nM 4-OHT for 24 hr. RD controls showed no MYCN protein expression, while untreated cells transduced with the P3FK/ER construct demonstrated a low basal level of MYCN protein expression, which was increased substantially by 4-OHT treatment (Fig. 1C). Analysis of MYCN protein expression in four ARMS and two ERMS cell lines revealed that MYCN protein expression is higher in the ARMS cell lines compared to the ERMS cell lines (Fig. 1D). Finally, examination of MYCN protein expression in seven

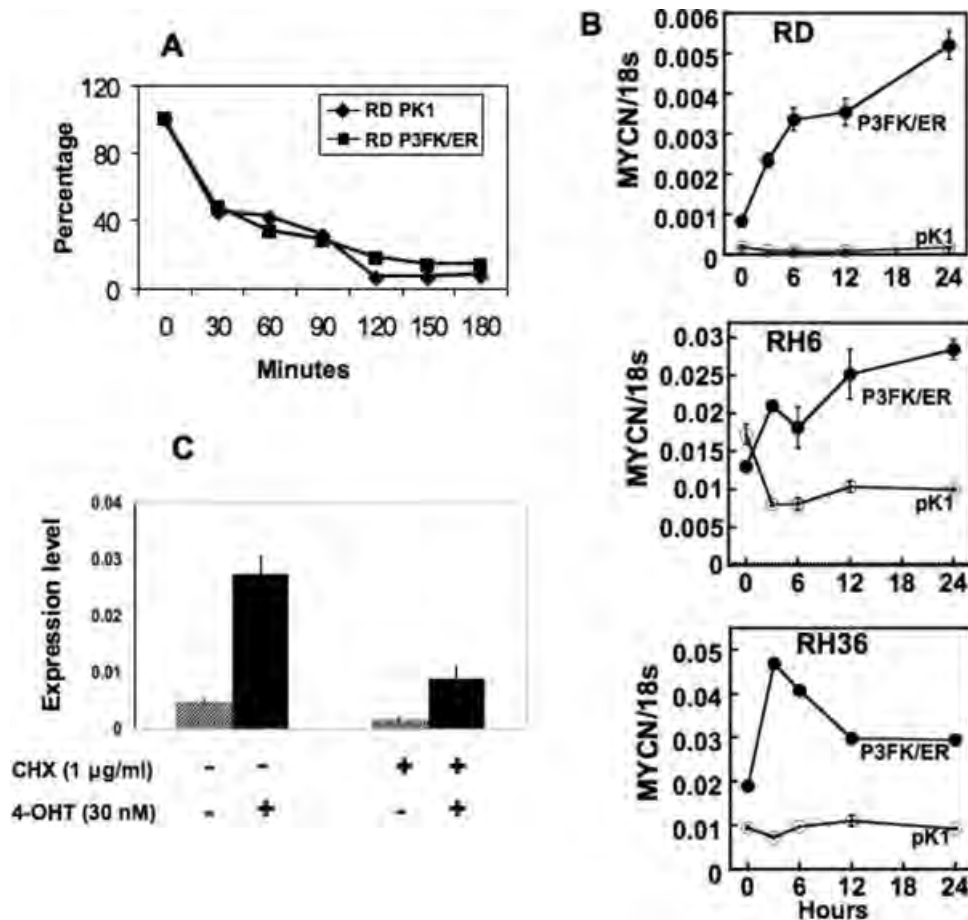


Figure 2. Studies of mechanism of PAX3-FKHR-induced MYCN expression. A. To measure the degradation rates of MYCN mRNA, 10^6 P3FK/ER- or pK1-transduced RD cells were seeded in 10-cm dishes. After 24 hr, 30 nM 4-OHT was added to the medium. After 24 hr of treatment, RNA synthesis was blocked by adding actinomycin D (5 µg/ml). Cells were harvested at the indicated time points following actinomycin D treatment and RNA was isolated. MYCN mRNA expression was measured by qRT-PCR as in Figure 1, and was shown as the percentage of MYCN expression at the beginning of actinomycin D treatment. B. To monitor the appearance of MYCN mRNA, ERMS cells (RD, RH6,

and RH36) transduced with P3FK/ER or vector alone (pK1) were treated with 100 nM 4-OHT for 1 hr, washed with PBS, and then incubated with fresh medium. After isolating RNA at the indicated time points, MYCN mRNA expression was measured by qRT-PCR as in Figure 1. C. To evaluate the relationship of the action of PAX3-FKHR to the MYCN gene, P3FK/ER-transduced RD cells were incubated with or without CHX (1 µg/ml). After 1-hr incubation, cells were treated with or without 4-OHT for 24 hr. Total mRNA was isolated, and MYCN expression was measured by qRT-PCR as in Figure 1.

RMS tumor samples, consisting of four ARMS and three ERMS tumors, again demonstrated higher MYCN protein expression in the ARMS tumors than in the ERMS tumors (Fig. 1E).

MYCN mRNA Stability Is Not Modified by PAX3-FKHR

We next studied the mechanism by which PAX3-FKHR contributes to MYCN expression in ARMS, and investigated whether PAX3-FKHR augments MYCN mRNA at the level of mRNA degradation or production. First, we focused on degradation of MYCN mRNA and compared RD cells transduced with P3FK/ER or vector only, and treated with the transcriptional inhibitor actinomycin D, after incubation with 4-OHT (Fig. 2A). The amount of

MYCN mRNA was measured by qRT-PCR in each cell population at time points after actinomycin D treatment. In two independent experiments, the MYCN expression pattern following actinomycin D treatment was nearly the same between P3FK/ER and vector-transduced cells. MYCN mRNA turnover was relatively rapid, with an average half-life of 30 min for both cell lines. These results suggest that the effect of PAX3-FKHR on MYCN expression is not posttranscriptional and thus direct attention to the possibility that this effect instead involves a transcriptional mechanism.

Analysis of MYCN as a Direct Target of PAX3-FKHR

To determine whether MYCN is a direct transcriptional target for PAX3-FKHR, we first

performed a pulse-chase time course experiment. RD, RH6, and RH36 cells expressing P3FK/ER were exposed to 4-OHT (100 nM) for 1 hr, washed with PBS to remove the inducing agent, and then incubated with medium. MYCN mRNA expression was determined by qRT-PCR at time points after this induction, and revealed that expression was increased as early as 3 hr in the three different systems. Of note, there are differences among the three cell lines in the ensuing expression pattern. In RD and RH6 cells, MYCN expression continued to increase up to at least 24 hr, while in RH36 cells, expression peaked at 3 hr and then decreased and plateaued to a lower level at 12 hr (Fig. 2B). This overall pattern of early increased expression is similar to other PAX3-FKHR targets, like MET and CXCR4 (data not shown). These findings are therefore consistent with the premise that PAX3-FKHR increases MYCN expression at the transcriptional level.

To distinguish between a direct and indirect effect of PAX3-FKHR on MYCN transcription, we performed cycloheximide (CHX) inhibition experiments. RD P3FK/ER cells were pretreated with the protein synthesis inhibitor CHX prior to treatment with (or without) the inducing agent 4-OHT. Measurement of the level of MYCN mRNA by qRT-PCR in the cells treated with and without CHX and/or 4-OHT thereby shows whether PAX3-FKHR induction of MYCN expression can occur without any additional protein synthesis. As shown in Figure 2C, CHX did not affect the overall PAX3-FKHR induction of MYCN. CHX pretreatment resulted in a decrease in basal MYCN expression in cells without 4-OHT treatment, suggesting the presence of a labile activator of MYCN expression. Although the basal level was lower, treatment of the cells with 4-OHT in the presence of CHX resulted in a sixfold induction of MYCN mRNA, equal to induction of MYCN mRNA by 4-OHT in the absence of CHX. These findings are consistent with the premise that the PAX3-FKHR protein acts directly on the MYCN gene.

To test whether PAX3-FKHR can bind to and transactivate regulatory elements in the MYCN gene, we used luciferase reporters coupled to different fragments of the 5' region of the human MYCN gene (Hiller et al., 1991; Wada et al., 1992; Sivak et al., 1997, 1999). These reporters extended from -1871 to +1058 relative to the transcription start site, and included exon 1 and a portion of intron 1. In cells expressing the P3FK/ER construct and treated with increasing doses of 4-OHT, there was at most a small level of activation of 5'-

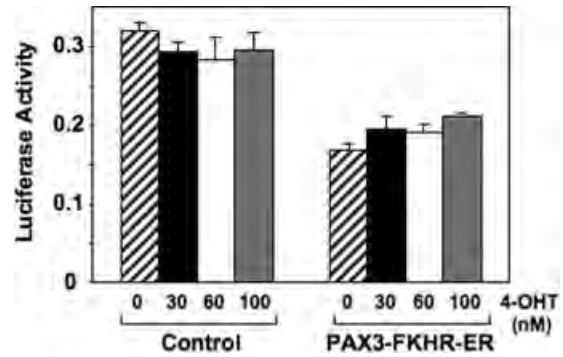


Figure 3. Reporter transcription analysis of the MYCN promoter. Reporter transcription analysis was performed with a firefly luciferase construct containing 2.0 kb 5' MYCN region and the pRL-TK control construct constitutively expressing renilla luciferase (Promega). After seeding 5×10^4 P3FK/ER-expressing RD cells in 24-well dishes and incubating the cells for 24 hr, the cells were cotransfected with $0.4 \mu\text{g}$ 5' MYCN reporter construct and $0.015 \mu\text{g}$ of pRL-TK construct. After 24 hr, the cells were then treated with the indicated 4-OHT concentrations. For all transfections, cell lysates were harvested after 24 hr, and the activities of firefly and renilla luciferases were measured by luminometry. The results are expressed as the ratio (\pm SD) of the means of triplicate measurements of firefly to renilla luciferase activity.

MYCN reporter activity (16–27% increase over untreated; Fig. 3A), which did not account for the observed increase in RNA expression. Testing of reporter constructs with sequential 5' deletions of the 5' MYCN region still did not detect any difference in reporter activity (data not shown). These results indicate that this MYCN region could not recapitulate the PAX3-FKHR-mediated increase in MYCN expression.

MYCN Cooperates with PAX3-FKHR to Enhance Transforming Activity

As MYCN has been identified as an oncogene with effects on cellular activities such as proliferation and differentiation, we hypothesize that MYCN upregulation by PAX3-FKHR in ARMS cells contributes to the oncogenic activity of PAX3-FKHR in this environment. We and others have shown that NIH3T3 cells transduced with PAX3-FKHR have low but detectable transformation efficiency (Xia and Barr, 2004). Of note, MYCN is not significantly upregulated in PAX3-FKHR-expressing NIH3T3 cells (data not shown). We speculate that part of the reason for the low transformation efficiency of PAX3-FKHR in NIH3T3 cells is that MYCN is not upregulated by PAX3-FKHR in this cellular background. However, the unresponsiveness of MYCN expression to PAX3-FKHR in these cells provides a useful tool, because it permits us to determine the individual contributions of PAX3-FKHR and MYCN to transformation in this model cell culture system. We postulate that enforced

upregulation of MYCN in the NIH3T3 environment will enhance PAX3-FKHR oncogenic function, and will simulate what would happen if MYCN was upregulated by PAX3-FKHR (along with other cellular influences).

To examine the latter hypothesis concerning the effect of enforced MYCN expression on PAX3-FKHR activity, we established a series of NIH3T3 populations, which express P3FK/ER, MYCN, or both. In this experiment, the retroviral vector was pBabe, which expresses lower levels of P3FK/ER and, unlike the retroviral vector pK1, does not result in growth suppression (Xia et al., 2007). Transforming activity was assessed in two independent assays: soft agar colony formation and focus formation (Fig. 4). To make the soft agar assay more stringent and to concentrate on detection of cooperativity between PAX3-FKHR and MYCN, we plated a small number of cells (2×10^3 cells compared to the usual 2×10^4 cells per assay). Under these conditions, PAX3-FKHR alone and vector controls do not result in detectable transformation, whereas MYCN alone demonstrates a low level of transformation. However, the combination of MYCN and PAX3-FKHR results in a substantial increase in transforming activity relative to controls. In the focus formation assay, cells expressing PAX3-FKHR alone or MYCN alone demonstrate a low level of focus formation that is near the background level. However, in NIH3T3 cells expressing both PAX3-FKHR and MYCN, there was again a large increase in transforming activity compared to MYCN or PAX3-FKHR alone, with a 4-OHT-dose response increase in focus formation. These observations indicate a clear role for MYCN in stimulating PAX3-FKHR-mediated oncogenic activity in this system.

DISCUSSION

In the present study, we identified target genes regulated by the PAX3-FKHR oncoprotein that are biologically relevant in ARMS tumors. The gene expression profiles of an inducible cell culture system were compared with the genes that showed differential expression patterns between ERMS and ARMS tumors. A set of 39 genes was identified, and the expression pattern of representative genes was verified. Functional annotation showed an enrichment of transcriptional regulators, many of which are involved in development. *MYCN*, which encodes a transcription factor and oncoprotein, was identified as a prime example of this category in this gene set. Our subsequent studies verified that *MYCN* expression is modulated

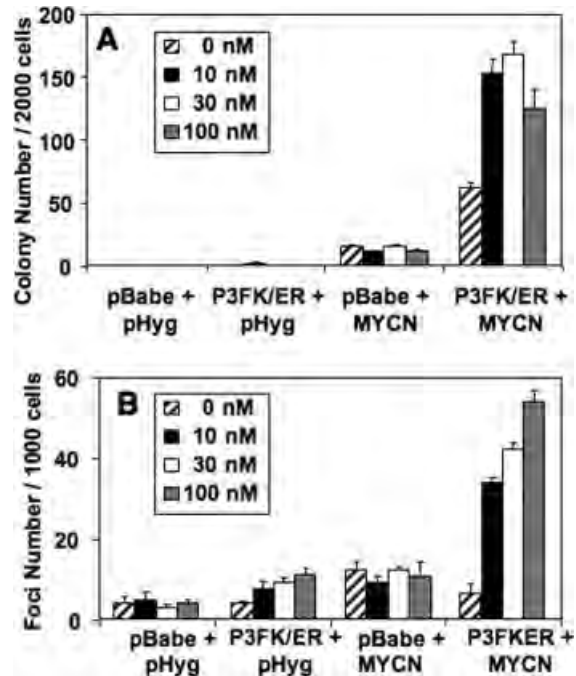


Figure 4. Phenotypic assays of MYCN and PAX3-FKHR oncogenic activity. A. For the soft agar colony formation assay, 2×10^3 cells were transduced with the indicated retroviral constructs (Xia et al., 2007), incubated in Iscove's medium (Gibco) containing 10% FBS with 0.35% agar (Agar Noble, Difco Laboratories, Detroit, MI), and seeded on top of 0.7% agar in the same medium. Cells were then incubated with the indicated 4-OHT concentration, and colonies were scored after 3 weeks. Three plates were counted for each condition, and results were expressed as the mean (\pm SD). B. For the focus formation assay, 10^3 cells were transduced with the indicated retroviral constructs (Xia et al., 2007), mixed with 10^6 nontransduced NIH3T3 cells in 100-mm dishes, and treated with the indicated concentrations of 4-OHT. After 2 weeks, three plates were stained and counted for each condition, and results were expressed as the mean (\pm SD).

by PAX3-FKHR and, importantly, demonstrated that MYCN collaborates with PAX3-FKHR in transformation.

Functional annotation of the PAX3-FKHR target genes in this study showed that a significant subset of genes is involved in development, and remarkably many of them are associated with nervous system development. This finding can be explained by the fact that wild-type PAX3 is expressed during specific stages of development and participates in myogenesis and neurogenesis (Robson et al., 2006). A previous study introduced PAX3-FKHR into NIH3T3 cells, and showed activation of a myogenic transcription program, including upregulation of MyoD1 and myogenin (Khan et al., 1999). In our system, although MYOD1 is still activated, prominent activation of a myogenic program is not detected because the starting cell already has a myogenic background. Instead, we detected dramatic changes in neural development genes. This pattern may indicate that expression of

PAX3-FKHR in myogenic cells imposes mixed expression of myogenic and neurogenic genes. We postulate that PAX3-FKHR may require fewer cofactors than wild-type PAX3 to activate target genes, and thus can activate genes in the myogenic environment whose expression is normally restricted to the neural environment by the need for cofactors that collaborate with PAX3.

MYCN has an essential role during neurogenesis, and amplification of MYCN occurs in several neurogenic tumors as well as RMS (Schwab, 1999). During neural development, MYCN promotes pathways controlling survival and cell cycle progression in early progenitors. This premise is supported by studies in which overexpression of MYCN in postmitotic sympathetic neurons stimulates reentry into S-phase and survival (Wartiovaara et al., 2002). Furthermore, the loss of its function specifically disrupts the ability of neuronal progenitor cells to expand, differentiate, and populate the brain (Knoepfler et al., 2002). In human neuroblastoma, MYCN amplification is associated with tumor progression and poor clinical outcome. Higher copy number and expression levels have also been identified in ARMS subsets, and some studies have proposed that high MYCN copy number and/or expression defines a high-risk group in ARMS (Hachitanda et al., 1998; Williamson et al., 2005).

Previous studies have shown that MYCN expression is generally higher in ARMS than ERMS tumors (Williamson et al., 2005). One mechanism that explains a subset of ARMS cases with high MYCN expression is MYCN gene amplification. However, our results indicate a more common mechanism for MYCN expression in ARMS tumors. We propose that PAX3-FKHR or PAX7-FKHR is involved in the activation of intermediate MYCN expression levels in most fusion-positive ARMS tumors. Our cell culture studies suggest that the mechanism for this effect of PAX3-FKHR on MYCN is at the direct transcriptional level. However, our reporter transfection studies in the RD cell line with the inducible P3FK/ER construct could not recapitulate the transcriptional regulation of MYCN by PAX3-FKHR with an exogenous reporter construct. Although other cell culture-based reporter assays have localized positive regulatory elements to the near 5' region of the *Mycn* gene (Sivak et al., 1997), transgenic mouse studies have indicated that additional sequences are needed to recapitulate developmental expression patterns (Charron et al., 2002). Thus, there may be other regulatory regions in the MYCN locus, and one or more of these regions may be

responsible for transcriptional activation of MYCN by PAX3-FKHR.

Normal cells have a mechanism of growth inhibition by cell–cell contact and a growth requirement for anchorage. When introduced alone into NIH3T3 cells, PAX3-FKHR can provide a low level of anchorage independence but cannot attenuate contact inhibition as measured in soft agar and focus formation assays, respectively (Xia and Barr, 2004). The introduction of MYCN into this NIH3T3 system substantially enhances the transformation efficiency of PAX3-FKHR in both focus formation and soft agar colony assays. These results suggest that MYCN may be important for PAX3-FKHR function in ARMS cells, and thus MYCN has a postulated role in the maintenance of the malignant phenotype. These phenotypic studies have been performed in murine fibroblasts to take advantage of the special expression features of these cells. However, since ARMS is a human tumor of the myogenic lineage, these studies do not fully address the phenotypic role of PAX3-FKHR and MYCN in the actual tumor lineage. Comparable studies have been performed in human myoblasts and resulted in similar oncogenic effects, and thus in this case, NIH3T3 cells seem to provide a reasonable model of the corresponding human tumor lineage (Xia and Barr, manuscript in preparation).

Davicioni and colleagues published a study in which the microarray component was somewhat similar to the present one. These investigators cross-referenced the results of an expression profiling study comparing fusion-positive and -negative RMS tumors to data from RD ERMS cell lines expressing PAX3-FKHR or PAX7-FKHR to identify a PAX-FKHR “expression signature” consisting of 81 genes (Davicioni et al., 2006). Comparison of that study with the current study showed that 17 of the 39 genes identified in our study are also present in the 81-gene list. A major difference between our study and that conducted by Davicioni and colleagues was that we assayed genes regulated by an inducible form of PAX3-FKHR after 24 hr, whereas in the system used by Davicioni and colleagues, the fusion gene was constitutively expressed in RD cells and was assayed 48 or 72 hr after retroviral transduction. As a consequence of this difference, our system at 24 hr was better suited to detect earlier regulated genes, whereas after 48–72 hr, the identified genes included later events.

Recently, a study was published in which a series of mRNA expression changes was identified

after treating an ARMS cell line with a pair of small interfering RNAs directed against the PAX3 region 5' of the PAX3-FKHR fusion point (Ebauer et al., 2007). In particular, this study identified 51 activated genes that were also differentially expressed between fusion-positive ARMS and ERMS tumors. Comparison of these 51 genes identified four genes in common with our group of 39 differentially expressed PAX3-FKHR target genes. One of the genes in common between our study and the Ebauer study is *MYCN*. Therefore, this alternative strategy also indicates that *MYCN* is a biologically relevant target of PAX3-FKHR in ARMS cells.

As demonstrated by our studies with *MYCN*, the gene list identified in our study will help to understand the biology and clinical behavior of ARMS tumors. As the function and interactions of these genes are further elucidated, these genes will provide insights into the regulatory networks and signaling pathways that point to key differences between the ARMS and ERMS subsets. Therefore, this list provides the starting point for multiple studies of critical pathways in ARMS biology. Furthermore, as demonstrated in other recent profiling studies (Davicioni et al., 2006), specific genes within this signature may have clinical utility as markers for prognosis and for development of new specific therapeutic targets.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dara D. Holder for technical contributions to this paper and John Tobias for bioinformatic consultation.

REFERENCES

- Barr FG. 2001. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 20:5736–5746.
- Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, Biegel JA, Womer RB. 1995. Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *J Am Med Assoc* 273:553–557.
- Barr FG, Smith LM, Lynch JC, Strzelecki D, Parham DM, Qualman SJ, Breitfeld PP. 2006. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-III trial: A report from the Children's Oncology Group. *J Mol Diagn* 8:202–208.
- Charron J, Gagnon JF, Cadrin-Girard JF. 2002. Identification of N-myc regulatory regions involved in embryonic expression. *Pediatr Res* 51:48–56.
- Davicioni E, Finckenstein FG, Shahbazian V, Buckley JD, Triche TJ, Anderson MJ. 2006. Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 66:6936–6946.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. 2003. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol*, Epub 4:R60; doi 10.1186/gb-2003-4-9-r60.
- Ebauer M, Wachtel M, Niggli FK, Schafer BW. 2007. Comparative expression profiling identifies an *in vivo* target gene signature with TFAP2B as a mediator of the survival function of PAX3/FKHR. *Oncogene* 26:7267–7281.
- Epstein JA, Song B, Lakkis M, Wang C. 1998. Tumor-specific PAX3-FKHR transcription factor, but not PAX3, activates the platelet-derived growth factor α receptor. *Mol Cell Biol* 18:4118–4130.
- Ginsberg JP, Davis RJ, Benniselli JL, Nauta LE, Barr FG. 1998. Up-regulation of MET but not neural cell adhesion molecule expression by the PAX3-FKHR fusion protein in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 58:3542–3546.
- Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. 1995. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 75:2186–2195.
- Hachitanda Y, Toyoshima S, Akazawa K, Tsuneyoshi M. 1998. N-myc gene amplification in rhabdomyosarcoma detected by fluorescence *in situ* hybridization: Its correlation with histologic features. *Mod Pathol* 11:1222–1227.
- Hiller S, Breit S, Wang ZQ, Wagner EF, Schwab M. 1991. Localization of regulatory elements controlling human MYCN expression. *Oncogene* 6:969–977.
- Khan J, Bittner ML, Saal LH, Teichmann U, Azorsa DO, Gooden GC, Pavan WJ, Trent JM, Meltzer PS. 1999. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13264–13269.
- Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN. 2002. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16:2699–2712.
- Lae M, Ahn EH, Mercado GE, Chuai S, Edgar M, Pawel BR, Olshen A, Barr FG, Ladanyi M. 2007. Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol* 212:143–151.
- LeGallo R, Burger A, Barr FG, Gastier-Foster JM, Fraser B, Shiels WE, Qualman S. 2005. Fusion gene dependent dissemination patterns of alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS) in the nude rat model. *Mod Pathol* 18:301.
- Littlewood TD, Hancock DC, Daniellian PS, Parker MG, Evan GI. 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acid Res* 23:1686–1690.
- Margue CM, Bernasconi M, Barr FG, Schafer BW. 2000. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene* 19:2921–2929.
- Parham DM. 2001. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol* 14:506–514.
- Robson EJ, He SJ, Eccles MR. 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 6:52–62.
- Schwab M. 1999. Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9:319–325.
- Sivak LE, Tai KF, Smith RS, Dillon PA, Brodeur GM, Carroll WL. 1997. Autoregulation of the human N-myc oncogene is disrupted in amplified but not single-copy neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 15:1937–1946.
- Sivak LE, Pont-Kingdon G, Le K, Mayr G, Tai KF, Stevens BT, Carroll WL. 1999. A novel intron element operates posttranscriptionally to regulate human N-myc expression. *Mol Cell Biol* 19:155–163.
- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. 2002. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 20:2672–2679.
- Taulli R, Scuoppo C, Bersani F, Accornero P, Forni PE, Miretti S, Grinza A, Allegra P, Schmitt-Ney M, Crepaldi T, Ponzetta C. 2006. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 66:4742–4749.
- Thomas WD, Raif A, Hansford L, Marshall G. 2004. N-myc transcription molecule and oncoprotein. *Int J Biochem Cell Biol* 36:771–775.
- Tomescu O, Xia SJ, Strzelecki D, Benniselli JL, Ginsberg J, Pawel B, Barr FG. 2004. Inducible short-term and stable long-term cell culture systems reveal that the PAX3-FKHR fusion oncoprotein regulates CXCR4, PAX3, and PAX7 expression. *Lab Invest* 84:1060–1070.
- Tomita H, Shakkottai VG, Gutman GA, Sun G, Bunnay WE, Cahalan MD, Chandry KG, Gargus JJ. 2003. Novel truncated isoform of SK3 potassium channel is a potent dominant-negative regulator of

- SK currents: Implications in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:524–535.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116–5121.
- Wada RK, Seeger RC, Reynolds CP, Alloggiamento T, Yamashiro JM, Ruland C, Black AC, Rosenblatt JD. 1992. Cell type-specific expression and negative regulation by retinoic acid of the human N-myc promoter in neuroblastoma cells. *Oncogene* 7:711–717.
- Wartiovaara K, Barnabe-Heider F, Miller FD, Kaplan DR. 2002. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J Neurosci* 22:815–824.
- Williamson D, Lu YJ, Gordon T, Sciot R, Kelsey A, Fisher C, Poremba C, Anderson J, Pritchard-Jones K, Shipley J. 2005. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *J Clin Oncol* 23:880–888.
- Xia SJ, Barr FG. 2004. Analysis of the transforming and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR oncoprotein. *Oncogene* 23:6864–6871.
- Xia SJ, Rajput P, Strzelecki DM, Barr FG. 2007. Analysis of genetic events that modulate the oncogenic and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR fusion oncoprotein. *Lab Invest* 87:318–325.