



Estratègies terapèutiques per la Neurofibromatosi de tipus 1

Joan Castellsagué Garcia



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution 3.0. Spain License](#).

ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER LA NEUROFIBROMATOSI DE TIPUS 1

Joan Castellsagué Garcia

2014

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Programa de Doctorat de Biomedicina

ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER LA NEUROFIBROMATOSI DE TIPUS 1

Joan Castellsagué
2014

Memòria presentada per Joan Castellsagué Garcia per optar al grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona

Dra. Conxi Lázaro García
Directora

Dr. Alberto Villanueva
Co-Director

Joan Castellsagué Garcia
Doctorant

A la iaia Trini...

AGRAÏMENTS

Malauradament ja ha arribat el moment d'escriure les darreres paraules d'aquesta tesi i tancar la que ha estat sense cap mena de dubte, la millor etapa de la meva vida. 5 anys en els que he madurat i crescut com a científic...però a més a més, 5 anys durant els quals he conegut, conviscut i treballat amb un grup de persones extraordinàries, algunes d'elles que sé del cert que em seguiran accompanyant durant molt de temps encara que els nostres camins es separin.

I tot això no hagués estat possible si no fos per la **Conxi** perquè tu vas ser qui només coneixent-me durant 5 minuts vas decidir demanar-me una beca d'estiu, després vas acceptar-me per fer les pràctiques del màster i finalment em vas oferir fer el doctorat. Gràcies per escollir-me per tirar endavant aquest projecte i per descobrir-me el món de la Neurofibromatosi. Gràcies per la teva confiança, pel teu tracte, per fer-me de directora i a vegades fins i tot de mare, per intentar treure sempre el millor de mi sota l'estímul de la pressió i la insistència. Has estat una directora propera, però a la vegada exigent i resolutiva. Gràcies per deixar-me formar més enllà de la part científica i donar-me l'oportunitat d'anar a congressos, cursos i realitzar l'estada a Vancouver. També gràcies per tots els moments compartits fora del laboratori amb sopars *NFs*, sopars de Nadal, trobades de laboratori i pel gran viatge a Yellowstone ple de anècdotes i rialles...

Gràcies al coordinador d'aquesta tesi, l'**Alberto** perquè sense tu aquest projecte no hagués estat possible. Per donar-me sempre un cop de mà quan ha calgut i per implicar'thi fins al darrer moment. Per la teva paciència i per fer veure que em renyaves per alguna cagada.... Però sobretot, per ensenyar-me gran part del que he après a l'estabulari i per transmetre'm part de la teva devoció per aquesta feina (tot i que de tant en quant et queixessis...;).

Gràcies **Juani** perquè des del principi has tingut un tracte excepcional amb mi, sempre disposada a ajudar-me o a explicar-me el que calgués. Pacient, meticulosa i cuidadosa he tingut la sort d'aprendre de tu durant tots aquest anys. També per la part no laboral, en la que hem pogut compartir festes, sopars, barbacoes, tsunamis, *llamaradas, tapeos* i com no, el congrés de Yellowstone...

A l'**Edu** gràcies perquè part d'aquesta tesi també ha estat gràcies a tu. Per tota la feinada feta, per totes les idees i coneixements que has aportat. Però també pel teu bon tracte, per la teva proximitat i perquè hem pogut compartir grans moments.

A tot el grup de l'IMPPC, **Eli, Josep, Imma, Carles, Bernat i Ernest**. Especialment en **Bernat** per la teva implicació i dedicació en gran part d'aquesta tesi i per resoldre'm els dubtes que he anat tenint. I a l'**Ernest** per adoptar-me sempre que he anat al IMPPC (i deixar-me

guanyar de tant en quant al ping-pong), per la bona relació que hem mantingut fora del laboratori i sobretot pel sensacional *road trip* pels EEUU...

Gràcies a l'**Ignacio** i en **Gabi** per involucrar-vos en part en aquest projecte i per aportar crítiques i suggeriments a les reunions que hem compartit. Gràcies a en **Miquel Àngel**, per ajudar-me en diferents aspectes a tirar endavant aquesta tesi i per deixar-me formar part d'altres projectes.

A la **Iolandà B** per la teva implicació personal i professional i per la teva paciència davant de les nostres sol·licituds estadístiques.

A en **Roger** per tota la feinada realitzada amb les immunohistoquímiques i per sempre tenir un momentet per atendre'm i fer alguna foto més d'última hora.

A tota la gent de l'**estabulari** pel seu tracte sempre més que excel·lent i per intentar reconduir-me pel bon camí quan va ser necessari...

Gràcies a les **associacions contra la Neurofibromatosi** espanyola i catalana per creure en aquest projecte i recolzar-lo tant personalment com econòmicament.

Thanks to **Chris Maxwell** and their grup, for my stay in Vancouver, to give me de oportunity to join in a different project and to know a new laboratory, new city and new people.

Gràcies a totes les tècniques, **Eva M, Carol, Raquel, Anna, Su, Olga, Annabel i Mònica** perquè en algun moment o altre sempre heu estat allà per ajudar-me o ensenyar-me alguna cosa. Sense vosaltres el funcionament del laboratori no seria tan bo com és ara i tot i que amb els anys el distanciament s'ha fet més palpable, hem compartit grans moments dins i fora del laboratori.

Gràcies a tots els tècnics superiors i *jefecillos*, **Jesús, Mireia Menéndez, Mireia Morell, Marta, Nònia, Sara, Laura Valle, Xavi i Dani** pels vostres consells/aportacions/suggeriments als "lab meeting" o fora d'ells i pels moments compartits a taula i/o entre *poyates*.

Gràcies a la **Iolandà**, a la **Natàlia** i a la **Laura** perquè sense les vostres labors tot seria molt més complicat i enrevessat.

I gràcies a tota la colla de becaris del LRT1 (Ay perdó...de **LRT2**) que m'han patit tots aquest anys de molt a prop...

Gau el laboratori sense tu no seria el mateix. Vas estar un temps *out* però la teva tornada ha servit per fer-nos veure l'imprescindible que ets. Sempre a punt per *portar les maletes*, saps que ets la tercera pota d'una cadira que no s'aguanta per enlloc. Gràcies per la teva manera de ser, esbojarrada, autèntica, atenta i sobretot propera. Gràcies per ajudar-me tant en aquest final de tesi, moralment i logísticament.

Núria gràcies per compartir pis, laboratori, classes de guitarra i de teatre, sopars, festes i viatges durant tots aquests anys. Per la teva energia contagiosa i per les exaltacions tan teves... Realment ets única. Ja saps que sempre tindràs una olivera de la teva propietat, i jo espero poder *catar* aquella hamaca tan espectacular de tant en quant amb una *pomada a la mà...*

Torner gràcies perquè crec que ets l'única persona que només mirant-me als ulls (quan no porto la samarreta blava...) sap què em passa pel cap i com em sento. Gràcies per la gran complicitat que tenim, pels pocs tabús que hi ha entre nosaltres i per poder-te explicar absolutament tot. Gràcies per la teva alegria i generositat. Per les nostres actuacions, per oferir-me el sofà de casa teva en tantes ocasions, per *fotra'm tanta canya* i per no enfadar-te mai, encara que em deixi el projector o et toqui canviar de lloc a la taula. Sé que ets per sempre.

Vane, aixxxxx...Vanesita, Vanesita...!!! Gràcies per ser-hi sempre...per fer-me costat en la meva addicció a les ofertes i per accompanyar-me en el meu afany de viatjar... Istanbul, Menorca, Bèlgica, Formentera, Toulouse, Tàrrega, Berlin... Deixem enrere innombrables gran moments però espero seguir poder-ne gaudir de molts més, perquè ets de les grans persones que m'enduc d'aquests 5 anys, i encara que incomplim el decret de veure'ns un cop per setmana sempre hi haurà lloc per una "Vaina loca" amb sentiment.

Paco gràcies per iniciar-me al Jagermaister i al Tindler, per acollir-me al teu pis als nostres inicis a Barcelona quan érem màsters. Per totes les paelles enganxades, crues o exquisides. Per ensenyar-nos Honda tot i no ensopegar el dia que tocava. Per encobrir-nos mútuament i repartir-nos els disgustos a la Conxi. Perquè tot i anar a la teva "bola" ets un gran *tiu* i sobretot un gran *liante*, amb el que hem compartit grans moments dins i fora del laboratori.

Fernando gracias por tu paciencia y cordura, por estar siempre atento y dispuesto a echar una mano, y por amenizarnos tantos ratos de café con tus historias. Pero sobretodo, sobretodo... Por la oveja naranja, heee heeee. La Ovejaaaaa...Naranja!!!!!!

Garde gracias por tu carácter afable y cercano, a la vez que cañera y directa. Por tu paciencia por no reponer el almacén y por dormirme en tus "lab meeting" ;). Por tus

estornudos tan característicos y por esos *pearcings* taaaaaaaaan provocativos!!! Viva Mejicooooooo!!!!

Helena gràcies per la teva predisposició a ajudar i a resoldre dubtes, per fer-me de companya de PC durant aquests últims anys. Per deixar-nos la mansió per fer paelles i uns *banyitus* i per animar-te a accompanyar-nos a Bèlgica.

I a les iogurines del lab... **Maribel** i **Estela**, perquè heu aportat aire nou i alegria al laboratori. Gràcies per la vostra amabilitat i simpatia.

Durant tot aquest temps també he tingut la sort de conèixer gent d'altres laboratoris...

Gràcies a la **chupipandi** per formar part d'un grup que s'ha anat formant mica en mica amb la conglomeració de diferents personalitats amb els que hem congeniat des del primer moment... Gràcies per tots aquests anys tant actius; amb un viatge a la Rioja increïble, un cap de setmana a Montagut esplèndid, un cap de setmana *dominguero* a Alp, pels *vermutillos*, pels sopars de Nadal, pels *Paraparks*, calçotades, celebracions i perquè qualsevol excusa ha estat bona per reunir-nos i accompanyar-ho d'uns bons vins i uns gintònics... Ah, i gràcies per la samarreta *chupipandera* talla XS tant metrosexual... =)

Clara gràcies per donar-me taaaanta enveja en tots aquest viatges i per ser l'empenteta que em faltava per emprendre el vol...

Cris per ser tant única i exclusiva (com se't troba a faltar!), per els teus alts i baixos, per anar sempre a deshora i per la teva energia i vitalitat. Per les truites de patates i/o moniato combinades, per fer-me pujar al terrat de l'oliverar per la finestra i per totes les *birres* destinades a encarrilar les nostres vides.

Ferran gràcies per aquella nit al ras a la fira de Tàrrega, per guiar-nos en les expedicions muntanyenques, per descobrir-nos les carxofes i el pollastre del Prat i per delectar-nos amb els teus balls folklòrics i *nàtgics*.

Marta gràcies per preguntar-me sempre per les meves relacions, per deixar-nos la casa d'Alp (tot i que et perdessis en Llufes...), saber-te els acords de Laura Pausini, per posar-me sempre a la teva esquerre, per la motivació pel món del teatre (per actuació la nostra a Tàrrega...) i per la teva predisposició a fer sempre unes *birres* pel barri de Sants... Exquisit!!!!

Mercè gràcies per estar tan motivada com jo i organitzar uns sopars de germanor grandiosos. Gràcies per descobrir-nos els carnavals de Ribes, per intentar millorar les nostres capacitats etnològiques, deixar-nos la mansió playboy, per descobrir-nos en Bop-it i sobretot el *niiiiiiiiiinjaa* explosiu Haaaaaa!!!! Per cert, em deus una Patum...!!!!

Mireia gràcies pel teu caràcter tendre i entranyable i pel teu positivisme. Per estar sempre disposada a fer una cervesa o unes *ballaruques*. Admiro la teva resistència en no venir a viure al barri de moda de Barcelona.... SANTS!! Ah, gràcies per obrir-me camí a l'orfenat de Cambodja.

Natalia gracias por esa sinergía en la cocina, en la que han salido fideuás al filo de lo comestible. Gracias por interesarte siempre por cómo va todo o intentar sonsacarlo. Por organizar una noche de *Cluedo* soberbia, una *patatada* exquisita y por invitarnos a pasar unos fabulosos días en Málaga. Natalia, hablamos del independentismo??? NOOOOOOOOOOOOOOOOO...jejeje!!

I a la última incorporació, però no per això la menys important... **Lluís** sóc molt fan teu *tiu*... Ai roba-li el ventall!! Ai roba-li el ventall!!

Gràcies també a tota la colla **Broja-Astraco**... per fer de la Flama el nostre camp d'entrenament i el Salamandra el nostre camp de batalla. Per unes sortides a Borja (...quien es ecce homo...♪♪) i a Pamplona descomunals... i per portar-me orgullosament pel camí de la perdició durant tots aquest anys, on hem tingut multitud d'ocasions per *liar-la grossa*; barbacoes, sopars de tesi, sopars de *rabos*, sopars de germanor, colònies de germanor, festes de Gràcia, de Sants, del Prat...

Ahmed gracias por ayudar al resto a reconstruir las noches y por terminar-te siempre la coca cola 0. **Carlos** por ser un titular indiscutible desde que llegaste y por dejarte sobornar por un poquito de ron. **Curro** gracias por ser siempre el alma de la fiesta y por envalentonarme a bajarme los pantalones en público. **Eli** gràcies per provocar-me de tan en quant i per punxar-me els ratolins. **Jack** por no perderte ni una, por ser todo alegría y sobretodo un gran tío. **Lluís**, gràcies per motivar-me i intentar que fos un pro de volei platja i per organitzar les porres dels mundials. **Maria** gràcies per localitzar-me a l'Alberto, deixar-me mostres i per voler que t'agafés tota la *xiiiiixa*!!! Als *golden boys*, **Marcel** i **Mariona** perquè em quedo molt més tranquil sabent que les noves generacions pugen fort (tot i que no aguantéssiu el ritme a Canet Rock fins a les 9 del matí...). I per l'enciam, les olives i l'ou dur tan ben tallats....!! **Marta** gràcies per ser casi tan *groupie* com jo de Miquel del Roig... **Raúl** que Ramón te haga contrato vitalicio tío, sin ti el *lab* no tiene sentido. Y perdón por tirar petardos en tu *gintonic*. **Samuel** gracias por tu paciencia y perdón por colgarte cosas en la lámpara, cambiarte los cuadros de sitio y mancharte una camiseta blanca a besazos... **Sara** gracias por enseñarme a cortar parafinas y porque desde mis principios siempre has estado ahí al pie del cañón (como ese miércoles que se nos fue de las manos...).

I especialment a l'**Alba**. Gràcies per un viatge a Marroc increïble (Zomoz de Teruel eh...). I un viatge a Berlin molt *underground*. Per totes les vegades que hem demanat Foxy and

Sexy i ballat Mari Carmen o el Chipirón, per tots els *xupitos* de Jageirmaster mal aprofitats i per totes les *birres* posant-nos al dia dels nostres *culebrons*. Ves espavilant amb la tesi que t'espero al sud-est asiàtic...!!!

I a totes les vaques sagrades que ens han anat abandonat al llarg d'aquests anys: Gràcies **Laia** per ajudar-me als inicis del meravellós món de les immunohistoquímiques i amenitzar les estones entre incubacions. **Helena** per ser tan *canyera* i animar el *cotarro* entre *poyates*. **Miguel** por hacerte querer tanto, por tu pollo con mole y por tus temazos de cantautor y de DJ Mig Defoe. I a l'**Edu** i la **Gris** per fer-se els durs tot i ser uns *buenachons*.

També gràcies a la **Mar** pel contraban de ratolins i a l'**Agnès** i la **Nàdia** per donar-me un cop de mà amb les immunohistoquímiques.

I fora del món científico-laboral, també hi ha hagut molta gent que tot i no participar de forma directa en aquesta tesi, ha col·laborat d'una manera o altra a que hagi arribat fins aquí...

Gràcies a tota la gent de la UdG *family*... **Anna, Cris, Gemma, Irene, Laura Lluís, Laura Gràcia, Lídia, Sarai, Valdi i Vero**...perquè sense els vostres apunts potser encara seria a primer de carrera, però sobretot, sobretot, per tots aquests anys d'amistat incombustibles. Duo xerinola, us estimo!!!! I gràcies també a la **Silvia**, perquè tot i que ens veiem poc, sempre hi ets.

També gràcies a tots els amics de Granollers, en especial als "trainers of love"... **Enric, Omar, Pollo i Javi**. Perquè tot i que fa anys que la meva vida esta lluny de Granollers, cada cop que torno és com si no haguessin passat els anys...

I gràcies a la meva companya de pis **Ester**, perquè ja són uns quants anyets convivint plegats, compartint penes i alegries, i vivint de molt a prop l'evolució d'aquesta tesi.

Gràcies a tota la meva família **CASTELLSAGUÉ i GARCIA** perquè el factor genètic és vital, però l'ambiental també...i créixer envoltat d'una família com aquesta la vida és molt més fàcil.

Als **meus pares**, gràcies per donar-m'ho TOT. Perquè sense vosaltres no seria on sóc. Per donar-me dia a dia una lliçó de superació i de lluita personal. Per no condicionar-me mai i deixar-me fer, en els èxits i en els fracassos. Per tenir-vos sempre molt a prop, per sentir-me sempre estimat i emparat i perquè algun dia espero que estigueu tan orgullosos de mi com jo ho estic de vosaltres...

Gràcies **Gemma** per fer-me de germana gran, perquè sempre has estat un referent per a mi, tot i que mai l'he seguit i perquè amb els anys la nostre relació ha anat a més... Gràcies per la portada!!! Gràcies **Arnau** perquè tot i que et pensis que sóc un assassí de ratolins que fa mandonguilles de tumors i va ensenyant els calçotets amb 30 anys, ets el millor cunyat que em podia haver tocat... I gràcies a la última incorporació familiar... **Janitu!!!** Per alegrar-nos la vida a tots.

I gràcies **Mònica** per acompañar-me en part d'aquest llarg camí...

ACRÒNIMS

AI	desequilibri al·lèlic; de l'anglès, <i>allelic imbalance</i>
AURKA	aurora cinasa A; de l'anglès, <i>aurora kinase A</i>
AMO	oligonucleòtid morfolino antisentit; de l'anglès, <i>antisense morpholino oligonucleotid</i>
AON	oligonucleòtid antisentit; de l'anglès, <i>antisense oligonucleotid</i>
ATP	adenosina trifosfat; de l'anglès, <i>adenosine-5'-triphosphate</i>
ATPasa	adenosina trifosfatasa; de l'anglès, <i>adenosine-5'-triphosphatase</i>
cAMP	adenosina monofosfat cíclica; de l'anglès, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CFC	cardio-facio-cutània; de l'anglès, <i>cardio-facial-cutaneous</i>
CGH	hibridació genòmica comparativa; de l'anglès, <i>comparative genomic hybridization</i>
CLS	taques cafè amb llet; del francès, <i>café-au-lait spots</i>
Cnp	de l'anglès, <i>2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase</i>
CPC	complex passatger cromosòmic; de l'anglès, <i>Chromosomal Passenger Complex</i>
CS	cèl·lules de Schwann
Dhh	eriçó del desert; de l'anglès, <i>desert hedgehog</i>
DNA	àcid desoxiribonucleic; de l'anglès, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNF	neurofibroma dèrmic
GAP	proteïna activadora de GTPasa; de l'anglès, <i>gap activating protein</i>
GEF	factor bescanviador de nucleòtids de guanina; de l'anglès, <i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GEM	ratolí modificat genèticament; de l'anglès, <i>genetically engineered mouse</i>
GRD	domini relacionat amb GAP; de l'anglès, <i>GAP related domain</i>
GST	gen supressor de tumors
GTP	guanosina trifosfat; de l'anglès, <i>guanosine triphosphate</i>
GTPasa	guanosina trifosfatasa; de l'anglès, <i>guanosine triphosphatase</i>
EGFR	receptor del factor de creixement epidèrmic; de l'anglès, <i>epidermal growth factor receptor</i>

EMT	transició epiteli-mesenquima; de l'anglès, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EV12A	lloc d'integració viral ecotòpic 2A; de l'anglès, <i>ecotropic viral integration site 2A</i>
EV12B	lloc d'integració viral ecotòpic 2B; de l'anglès, <i>ecotropic viral integration site 2B</i>
hTERT	gen de la telomerasa retrotranscriptassa humana; de l'anglès, <i>human telomerase retrotranscriptase gene</i>
Kb	quilobase
kDa	quilodàltons
LC	línia cel·lular
LOH	pèrdua d'heterozigositat; de l'anglès, <i>loss of heterozygosity</i>
LoxP	locus d'encreuament a P1; de l'anglès, <i>Locus of Crossover in P1</i>
Mb	megabase
mRNA	RNA missatger; de l'anglès, <i>messenger ribonucleic acid</i>
MPNST	tumor maligne de la beina dels nervis perifèrics; de l'anglès, <i>malignant peripheral nerve sheath tumor</i>
NCFC	neuro-cardio-facio-cutànies; de l'anglès, <i>neuro-cardio-facial-cutaneous</i>
NF1	Neurofibromatosi de tipus 1
NF2	Neurofibromatosi de tipus 2
NIH	Institut Nacional de Salut; de l'anglès, <i>National Institut of Health</i>
NMD	de l'anglès, <i>nonsense mediated mRNA decay</i>
OMGP	glioproteïna de mielina dels oligodendròcits; de l'anglès, <i>oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>
OT	ortotòpic
PCA	anàlisi de components principals; de l'anglès, <i>principal component analysis</i>
PDGF	factor de creixement derivat de plaquetes; de l'anglès, <i>platelet-derived growth factor</i>
PDX	xenògraft derivat d'un tumor primari; de l'anglès, <i>patient derived xenograft</i>

pNF	neurofibroma plexiforme
POa	3.9 Periostina; de l'anglès, <i>3.9Periostin</i>
PRC2	complex repressiu Policom 2; de l'anglès, <i>Polycomb repressive complex 2</i>
PTC	codó prematur de terminació; de l'anglès, <i>premature termination codon</i>
RNA	àcid ribonucleic; de l'anglès, <i>ribonucleic acid</i>
SC	subcutani
SCID	immunodeficiència combinada greu; de l'anglès, <i>severe combined immunodeficiency</i>
SCNAs	alteracions somàtiques del número de còpies; de l'anglès, <i>somatic copy-number alterations</i>
SMA	actina del múscul llis; de l'anglès, <i>smooth muscle actin</i>
SP	esporàdic
SVA	SINE/número variable de repeticions en tandem/Alu; de l'anglès, <i>SINE/variable number of tandem repeats/Alu</i>
TP	tumor primari
UTR	regió no traduïda; de l'anglès, <i>untranslated region</i>
VEGFR	receptor del factor de creixement endotelial vascular; de l'anglès, <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
XCI	inactivació del cromosoma X; de l'anglès, <i>X chromosome inactivation</i>

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
NEUROFIBROMATOSIS.....	3
<i>Les RASopaties.....</i>	3
NEUROFIBROMATOSI DE TIPUS 1.....	4
MANIFESTACIONS CLÍNIQUES.....	4
NEUROFIBROMES.....	6
<i>Model de desenvolupament dels neurofibromes.....</i>	6
TUMOR MALIGNE DE LA BEINA DELS NERVIS PERIFÈRICS (MPNST).....	7
<i>Model de desenvolupament dels MPNST.....</i>	8
ASPECTES GENÈTICS	10
MOSAÏCISME GENÈTIC.....	10
GEN <i>NF1</i>	11
<i>NF1 com a gen supressor de tumors.....</i>	12
<i>Espectre mutacional germinal.....</i>	13
<i>Espectre mutacional somàtic.....</i>	14
CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP.....	15
NEUROFIBROMINA	16
OLIGONUCLEÒTIDS ANTISENTIT COM ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA EN MALALTIES HEREDITÀRIES.....	19
MODELS PRECLÍNICS	21
RATOLINS MODIFICATS GENÈTICAMENT (GEM).....	21
XENÒGRAFTS.....	24
DIANES FARMACOLÒGIQUES	27
AURORA CINASA A.....	31
RECEPTOR HER3.....	32

HIPÒTESI.....	35
OBJECTIUS.....	39
RESULTATS.....	43
Article 1: "A mild neurofibromatosis type 1 phenotype produced by the combination of the benign nature of a leaky NF1-splice mutation and the presence of a complex mosaicism."	47
Article 2: "Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicin."	69
Article 3: "Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition."	105
Resultats no publicats: "Estudi in vivo del receptor HER3 en models ortoxenògraft de MPNST."	129
DISCUSSIÓ.....	135
CONCLUSIONS.....	161
BILBIOGRAFIA	165
ANNEX.....	197

INTRODUCCIÓ

NEUROFIBROMATOSIS

Les Neurofibromatosis són un grup de malalties neurocutànies hereditàries que inclouen la Neurofibromatosi de tipus 1 (NF1), la Neurofibromatosi de tipus 2 (NF2) i la Schwannomatosis familiar. Aquestes malalties es caracteritzen pel desenvolupament de tumors al sistema nerviós a partir de les cèl·lules de Schwann (Riccardi, 1981; McClatchey, 2000) però les característiques clíniques i les bases genètiques són diferents.

La **Neurofibromatosi de tipus 1** (o de von Recklinghausen) és causada per mutacions en el gen *NF1* localitzat a la regió 17q11.2 (Cawthon et al, 1990; Wallace et al, 1990), el producte del qual és la proteïna Neurofibromina i es caracteritza per la presència de múltiples taques a la pell, denominades taques cafè amb llet (CLS, per *café-au-lait spots*) i neurofibomes. La **Neurofibromatosi de tipus 2** és causada per mutacions en el gen *NF2* localitzat a la regió 22q12.2 (Rouleau et al, 1993; Trofatter et al, 1993), el producte del qual és la proteïna Merlin i es caracteritza per la presència de schwannomes vestibulars als nervis auditius. Els schwannomes són tumors molt homogenis formats només per cèl·lules de Schwann que afecten a la beina dels nervis perifèrics. La **Schwannomatosis** familiar és causada per mutacions al gen *SMARCB1* localitzat a la regió 22q11 en aproximadament 30-60% dels casos familiars i en un 10% dels casos esporàdics (Hadfield et al, 2008; Rousseau et al, 2011; Smith et al, 2012), o al gen *LZTR1*, en un 80% de casos familiars i esporàdics sense presència de mutació a *SMARCB1* (Piotrowski et al, 2013). Aquesta malaltia es caracteritza per la presència de schwannomes a qualsevol part del cos, excepte als nervis vestibulars.

Les RASopaties

La NF1, forma part de les *RASopaties*, les quals són un grup de malalties genètiques que afecten principalment el sistema nerviós, el sistema circulatori i el desenvolupament facial (cranial) i cutani, entre altres afectacions. Altres síndromes que formen part d'aquest grup són: la **síndrome de Leopard**, la **síndrome de Noonan**, la **síndrome de Costello**, la **síndrome cardio-facio-cutània(CFC)** i la **síndrome de Legius** (Rauen, 2013). Totes aquestes síndromes són resultat de la desregulació de la via de les RAS/MAP cinases (Ras/Raf/Mek/Erk), provocada per mutacions germinals en els diferents gens d'aquesta via (Aoki et al, 2008). És per això que presenten característiques fenotípiques molt semblants.

Aquests trastorns estan causats per mutacions en els gens *PTPN11* i *KRAS* en la síndrome de Leopard, en els gens *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2* i *CBL* en la síndrome de Noonan, en el gen *HRAS* en la síndrome de Costello i en els gens *BRAF* i

MAPK2K1/2 (*MEK1/2*) en la CFC. Finalment, la síndrome de Legius, està causada per mutacions en el gen *SPRED1*, el qual, igual que la Neurofibromina, és un regulador negatiu de RAS-MAPK, generant una síndrome amb un solapament clínic molt elevat amb la NF1. Els pacients amb la síndrome de Legius presenten CLS i poden presentar pigues a les regions axil·lars i engonals, però no presenten els tumors típics associats a la NF1 com els neurofibromes o els gliomes òptics, en canvi si que poden presentar lipomes (Brems & Legius, 2013).

NEUROFIBROMATOSI DE TIPUS 1

MANIFESTACIONS CLÍNIQUES

La NF1 és una malaltia multisistèmica amb força variabilitat en les manifestacions clíniques que afecta principalment el sistema nerviós perifèric i la pell. El seu diagnòstic es basa en els criteris que es van definir l'any 1988 en una conferència de consens promoguda pel NIH (*National Institute of Health*) (Taula 1). El diagnòstic de la malaltia es dóna quan el pacient presenta 2 o més dels següents criteris:

Taula 1. Criteris diagnòstics per la Neurofibromatosi de tipus 1.

Sis o més taques cafè amb llet de més de 5mm abans de la pubertat i de més de 1,5 cm

Dos o més neurofibromes de qualsevol tipus o un neurofibroma plexiforme

Efèlides axil·lars o engonals

Glioma òptic

Dos o més nòduls de Lisch

Una lesió òssia característica com escoliosi, displàsia de l'esfenoide o aprimament del

Familiar de primer grau amb NF1

Les manifestacions clíniques més freqüents en pacients amb NF1 són la presència de taques cafè amb llet, els nòduls de Lisch (hamartomes pigmentats de l'iris), les efèlides o pigues a les regions axil-lars i engonals, gliomes òptics (astrocitoma del nervi òptic), lesions òssies (escoliosi, displàsia de l'esfenoide o displàsia dels ossos llargs) i neurofibromes dèrmics (dNF) i plexiformes (pNF)(Figura 1). A més a més, els pacients amb NF1 també poden desenvolupar altres manifestacions com ara tumors malignes de la beina dels nervis perifèrics (MPNST, de l'anglès *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*), feocromacitomes, rhabdomiosarcomes, tumors del glomus (Brems et al, 2009b), neuroblastomes i leucèmia mieloïde juvenil, anomalies en el creixement, problemes cognitius o altres problemes cardiovasculars i gastrointestinals (Laycock-van Spyk et al, 2011; Patil & Chamberlain, 2012). Més recentment també s'ha relacionat l'augment del risc de patir càncer de mama en dones amb NF1 (Sharif et al, 2007; Wang et al, 2012).

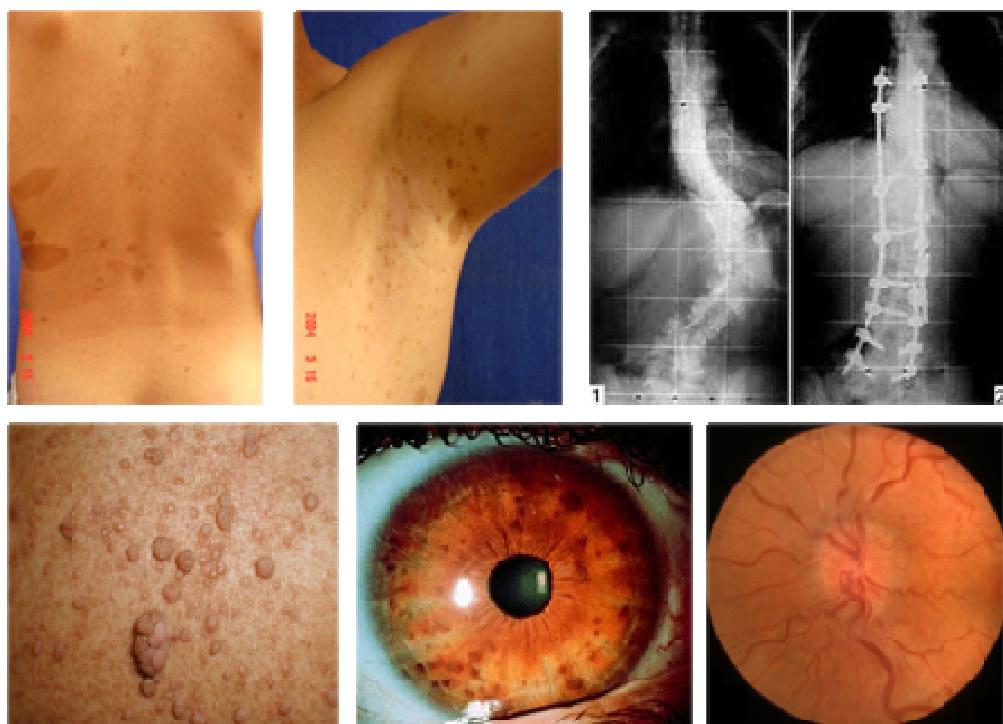


Figura 1. Principals manifestacions clíniques de la NF1. D'esquerre a dreta i de dalt a baix: Taques cafè amb llet, efèlides, escoliosi, neurofibromes dèrmics, nòduls de Lisch i glioma òptic.

NEUROFIBROMES

Els neurofibromes són tumors benignes originats a partir de la beina dels nervis perifèrics i es poden dividir en dNF, quan afecten només un nervi; i pNF, quan afecten múltiples fascicles nerviosos. Ambdós, estan formats principalment per cèl·lules de schwann (CS) i fibroblasts, entre d'altres tipus cel·lulars que es troben en menor proporció, com ara cèl·lules perineurals, mastòcits i neurones (Rosenbaum et al, 1997). Aquests tumors presenten una estructura dels fascicles nerviosos bastant desorganitzada, amb una gran quantitat de col·lagen i una disruptió del perineure.

Els **neurofibromes dèrmics** afecten pràcticament tots els pacients amb NF1, la seva mida pot variar entre 0,1 mm i uns pocs centímetres i el seu nombre també pot variar entre uns pocs i uns quants milers. Normalment apareixen a la pubertat i augmenten en nombre i mida en els pacients adults.

Els **neurofibromes plexiformes** afecten un 30% dels pacients amb NF1 (Huson et al, 1988; Ferner, 2007; Jett & Friedman, 2010) i són neurofibromes congènits que es desenvolupen internament a través de plexes nerviosos que afecten gran àrees de teixit i poden arribar a formar grans deformacions. Aproximadament un 10-13% dels pNF poden malignitzar i formar **tumors malignes de la beina dels nervis perifèrics** (Huson et al, 1988; Leroy et al, 2001; Evans et al, 2002; Ferner & Gutmann, 2002).

Actualment no existeix cap tractament específic pels pNF i la resecció completa d'aquests sovint és complicada degut a la seva naturalesa difosa. Per això l'extirpació de neurofibromes plexiformes en edats primerenques, quan encara són petits i superficials, podria evitar possibles futures complicacions (Prada et al, 2012; Rosenbaum & Wimmer, 2014).

Model de desenvolupament dels neurofibromes

Els neurofibromes es desenvolupen per la inactivació dels dos alels del gen *NF1* (model del doble *hit* (Knudson, 1971) a les CS ($CS^{NF1/-}$), on el primer *hit* es dóna per una mutació germinal heretada i el segon *hit* es dóna per una mutació somàtica (Serra et al, 1997). S'ha descrit que als neurofibromes només una subpoblació de CS presenta una inactivació bial·lèlica del gen *NF1*, mentre que els altres tipus cel·lulars només són portadors de la mutació germinal en aquest gen (Serra et al, 2000a; Serra et al, 2000b).

TUMORS MALIGNES DE LA BEINA DELS NERVIS PERIFÈRICS

Els MPNST són sarcomes rars molt agressius que es desenvolupen a partir d'un neurofibroma plexiforme preexistent (Spurlock et al, 2010). Aquests tumors poden sorgir en qualsevol part del cos però són més comuns en les parts pròximes a les extremitats superiors i inferiors i al tronc (Ducatman et al, 1986a; Sorensen et al, 1986; Hruban et al, 1990). Un 50% dels MPNST es donen en pacients NF1 i l'altre 50% apareixen en un entorn esporàdic. Els MPNST afecten un 8-13% dels pacients amb NF1, donant una incidència anual de 2:100, mentre que en la població general presenten una incidència de 1:100.000 (Ducatman et al, 1986a; Evans et al, 2002; McCaughan et al, 2007; Laycock-van Spyk et al, 2011; Patil & Chamberlain, 2012).

L'edat mitjana del diagnòstic dels MPNST en pacients amb NF1 és de 30 anys, mentre que en pacients esporàdics és de 42 anys (Patil & Chamberlain, 2012). Els MPNST són la major causa de mortalitat, amb una supervivència als 5 anys del seu diagnòstic del 21%, arribant al 42% en pacients esporàdics (Evans et al, 2002; Porter et al, 2009).

L'alta taxa de mortalitat d'aquests tumors està associada a l'edat de detecció dels tumors, a la resistència a la quimioteràpia i a l'aparició de metàstasis, generalment als pulmons, al fetge o al cervell (Ferner & Gutmann, 2002; Anghileri et al, 2006; Porter et al, 2009). El tractament d'aquests tumors consisteix en l'extirpació quirúrgica completa, associant-se amb una supervivència més alta (Anghileri et al, 2006; Zou et al, 2009a; Patil & Chamberlain, 2012; Rosenbaum & Wimmer, 2014). Tot i que la eliminació total del tumor no sempre és factible i un 40-65% dels MPNST acostumen a recidivar (Hruban et al, 1990; Wanebo et al, 1993; Wong et al, 1998; Anghileri et al, 2006; Porter et al, 2009; Zou et al, 2009a; Moretti et al, 2011). Normalment en pacients que presenten MPNST, s'aplica radioteràpia adjuvant en zones focalitzades després de la intervenció quirúrgica, allargant el temps de supervivència dels pacients (Gousias et al, 2010; L'Heureux-Lebeau & Saliba, 2014). Tot i així, als pacients amb NF1 familiar, es procura no fer tractaments amb radioteràpia per l'alt risc de desenvolupar malignitats secundàries a causa de les radiacions (Foley et al, 1980; Sharif et al, 2006; Wentworth et al, 2009; LaFemina et al, 2013). D'altra banda, també es pot acompañar amb una tractament adjuvant de quimioteràpia per inhibir la metàstasi (Carli et al, 2005). Els fàrmacs més utilitzats pels tractaments amb quimioteràpia dels MPNST són la doxorubicina i el ifosfamide, però la seva eficàcia envers aquests tumors és bastant limitant i no s'han conclòs beneficis clínics significatius (Grobmyer et al, 2008; Moretti et al, 2011; Zehou et al, 2013).

Model de desenvolupament dels MPNST

La transformació maligne a partir del neurofibroma plexiforme no és coneguda completament a nivell molecular, però es creu que a més a més de la doble inactivació del gen *NF1*, és necessària l'acumulació d'altres alteracions genètiques addicionals. Les alteracions genètiques més freqüents trobades en MPNST acostumen a trobar-se en diferents gens supressor de tumors com ara *TP53*, *CDKN2A*, *RB* o *PTEN*.

Així doncs, s'ha trobat que la alteració més freqüent en els MPNST és dóna per pèrdua de la funció del gen ***TP53*** el qual codifica per un factor de transcripció nuclear (Menon et al, 1990; Legius et al, 1994b; Birindelli et al, 2001; Carroll & Stonecypher, 2004; Holtkamp et al, 2007; Holtkamp et al, 2008; Upadhyaya et al, 2008a; Upadhyaya, 2011; Yang & Du, 2013). La proporció de MPNST que presenten mutacions en *TP53* varia entre els diferents estudis (Menon et al, 1990; Legius et al, 1994a; Birindelli et al, 2001; Mawrin et al, 2002;), degut a l'anàlisi de panells petits de tumors, o que la majoria d'estudis restringeixen l'anàlisi a exons seleccionats de *TP53*. D'altra banda, la inactivació bial·lèlica del gen *TP53* és poc freqüent en MPNST (Lothe et al, 2001), la qual cosa suggereix que la inactivació d'un sol alel pot ser suficient per la progressió dels neurofibromes benignes a tumors malignes MPNST (Menon et al, 1990; Legius et al, 1994a; Liapis et al, 1999; Rasmussen et al, 2000; Frahm et al, 2004; Upadhyaya et al, 2008a). També són comunes les deleccions en el gen ***CDKN2A*** (*P16* o *p16/INK4a*) (Kourea et al, 1999; Nielsen et al, 1999; Holtkamp et al, 2008; Mantripragada et al, 2008; Yang & Du, 2013) el qual codifica pels inhibidors del cicle cel·lular *p16^{INK4A}* i *p19^{ARF}*, reguladors de les vies de senyalització de p53 i de retinoblastoma; deleccions en el gen ***RB***, el qual codifica per la proteïna retinoblastoma, que impedeix la progressió del cicle cel·lular (Mawrin et al, 2002; Mantripragada et al, 2008); i deleccions en el gen ***PTEN***, el qual juga un paper molt important en el desenvolupament dels MPNST a través de la regulació de la via *PTEN/PI3K/AKT* (Holtkamp et al, 2008; Gregorian et al, 2009; Mawrin, 2010; Bradtmoller et al, 2012; Keng et al, 2012a).

A més a més de mutacions en gens supressors de tumors, hi ha evidències que indiquen que els factors de creixement i els seus receptors també contribueixen a la patogènia dels MPNST. Així doncs, s'han detectat en MPNST, amplificacions en gens que codifiquen pels receptors ***EGFR*** (Perry et al, 2002; Holtkamp et al, 2008; Keng et al, 2012b; Yang & Du, 2013; Rahrmann et al, 2014; Wu et al, 2014), ***HER2*** (Storlazzi et al, 2006; Holtkamp et al, 2008), ***c-Kit*** (Holtkamp et al, 2006), ***c-Met*** (Mantripragada et al, 2008; Torres et al, 2011; Upadhyaya et al, 2012; Yang & Du, 2013), així com amplificacions i mutacions en el receptor ***PDGF*** (Badache & De Vries, 1998; Holtkamp et al, 2006; Mantripragada et al, 2008; Upadhyaya et al, 2012). Tots aquest receptors formen part de la família de receptors tirosina cinasa, els quals es troben a la superfície de la cèl·lula i

comparteixen una estructura i una funció similar. Aquest receptors actuen com a mediadors primaris de la senyalització cel·lular, activant una cascada d'interaccions proteïques, alliberant senyals positives i negatives per a diversitat de processos cel·lulars com ara la regulació del cicle cel·lular, proliferació, adhesió, migració, invasió i supervivència.

Addicionalment, s'ha reportat recentment pèrdues del gens **HMMR** (Mantripragada et al, 2008; Yang & Du, 2013) i **SUZ12** (Lee et al, 2014; Zhang et al, 2014; DeReadt et al, 2014) en MPNST. HMMR és una proteïna reguladora del cicle cel·lular involucrada en la senyalització de RAS (Hall et al, 1995) i s'ha relacionat amb l'activació de la proteïna AURKA (Maxwell et al, 2011). SUZ12, codifica per una proteïna modificadora de la cromatina que forma part del complexe PRC2 (de l'anglès, *Polycomb repressive complex 2*), el qual podria actuar com un gen supressor de tumors (Lee et al, 2014; DeReadt et al, 2014). També s'han reportat amplificacions dels gens **TOP2A** i **BIRC5**, correlacionats amb nivells de sobreexpressió en tumors MPNST (Storlazzi et al, 2006; Kresse et al, 2008; Ghadimi et al, 2012; Upadhyaya et al, 2012; Alaggio et al, 2013; Peacock et al, 2013). El producte proteic del gen **BIRC5**, la survivina, té una funció inhibitòria de l'apoptosi i un paper molt important en la regulació de la mitosis. La proteïna TOP2A és una topoisomerasa que intervé en la replicació del DNA i ha estat associada amb el desenvolupament de resistència a determinats fàrmacs. A més a més, altres estudis han mostrat la sobreexpressió de determinats gens els qual podrien jugar un paper molt important en la desenvolupament dels MPNST; com ara **SOX9**, un factor de transcripció que intervé en la maduració de les cèl·lules mare de la cresta neural que generen les SC (Miller et al, 2009; Upadhyaya, 2011); i **AURKA**, el qual codifica una proteïna clau durant el cicle cel·lular (Patel et al, 2012). Finalment, estudis recents també han relacionat l'activació de la via de **Wnt/β-catenin** amb la progressió tumoral en pacient NF1 (Luscan et al, 2013; Watson et al, 2013a). Aquesta via de transducció de senyal està involucrada en la regulació de la transcripció gènica i juga un paper molt important en la carcinogènesis en diversos tipus de tumors.

En conclusió, els MPNST mostren un alt nombre d'anomalies genètiques, que comporten guanys, pèrdues i reordenaments cromosòmics molt variables, però alguns d'ells són recurrents. Aquests tumors acostumen a presentar cariotips haploides o triploides, amb guanys en els cromosomes 7, 8q i 15q i pèrdues que afecten a múltiples regions cromosòmiques (1p, 9p, 11, 12p, 14q, 17q, 18, 22q, X i Y)(Forus et al, 1995; Mertens et al, 1995; Lothe et al, 1996; Mechtersheimer et al, 1999; Plaat et al, 1999; Schmidt et al, 1999; Mertens et al, 2000; Schmidt et al, 2000; Kresse et al, 2008). Algunes d'aquestes regions afectades, comprenen gens anteriorment esmentats, implicats en la tumorogènesi dels MPNST, com per exemple *NF1* (17q11.2), *CDKN2A* (9p21), *TP53* (17p13) i *TOP2A* (17q21-q22).

ASPECTES GENÈTICS

La NF1 és una de les malalties genètiques més freqüents en humans amb una incidència estimada de 1/3.000 –1/4.000 individus (Crowe et al, 1956; Huson et al, 1989). Aquesta malaltia segueix un patró d'herència autosòmic dominant (Preiser & Davenport, 1918) en el qual els pacients són sempre heterozigots per mutacions en el gen *NF1*. La penetrància es considera completa a partir dels 8 anys (DeBella et al, 2000), això vol dir que una mutació en el gen *NF1* sempre causa la malaltia. Aquest gen es caracteritza per presentar una de les taxes de mutació més elevades en humans, que explicaria que pràcticament el 50% dels casos siguin esporàdics causats per una mutació *de novo* (Huson et al, 1989; Valero et al, 1997).

MOSAÏCISME GENÈTIC

La NF1 també presenta casos de mosaïcisme genètic, en els que l'individu afectat presenta dues o més línies cel·lulars genèticament diferents, a causa de mutacions somàtiques donades després de la formació del zigot.

Depenent del moment en el qual esdevingui la mutació, podem distingir entre **mosaïcisme somàtic**, quan només afecta la línia somàtica i per tant no pot ser transmesa a la descendència (Colman et al, 1996; Ainsworth et al, 1997; Wu et al, 1997; Streubel et al, 1999); **mosaïcisme germinal**, quan la mutació afecta als gàmetes (espermatozoides i òvuls) i per tant la mutació es pot transmetre a la descendència (Lazaro et al, 1994; Bottillo et al, 2010; Trevisson et al, 2014) i **mosaïcisme gonòsomic**, quan la mutació afecta tant la línia somàtica com la germinal (Callum et al, 2012).

D'altra banda, depenent del moment en què es dóna la mutació durant el desenvolupament embrionari, afecten més o menys capes embrionàries. D'aquesta manera podem distingir entre: **Mosaïcisme generalitzat**, quan afecta totes les línies embrionàries i les manifestacions clíniques estan disperses per tot el cos i per tant és molt difícil de diferenciar d'un pacient no mosaic (Messiaen et al, 2011; Zhou et al, 2012; Hardin et al, 2014). **Mosaïcisme segmental** o localitzat, quan només afecta alguna de les línies embrionàries i per tant, les manifestacions es troben focalitzades en una àrea concreta del cos. El mosaïcisme segmental té una prevalença estimada en la població general de 1:36.000-40.000 individus i es calcula que és entre 10 i 20 vegades menor que el generalitzat (Ingordo et al, 1995; Wolkenstein et al, 1995; Ruggieri & Polizzi, 2000; Messiaen et al, 2011).

GEN NF1

El gen *NF1* es troba localitzat en la regió pericèntrica q11.2 del cromosoma 17. Té una mida d'unes 300 Kb i està format per 60 exons, 57 constitutius i 3 alternatius (9a, 23a i 48a), numerats de l'1 al 49 ja que alguns es troben subdividits. El promotor d'aquest gen es troba situat en una illa CpG (Rodenhiser et al, 1993) i presenta conservats diversos motius d'unió a factors de transcripció (Hajra et al, 1994). El gen *NF1*, presenta una regió UTR no traduïble al final del gen de 3,5 Kb (Figura 2).

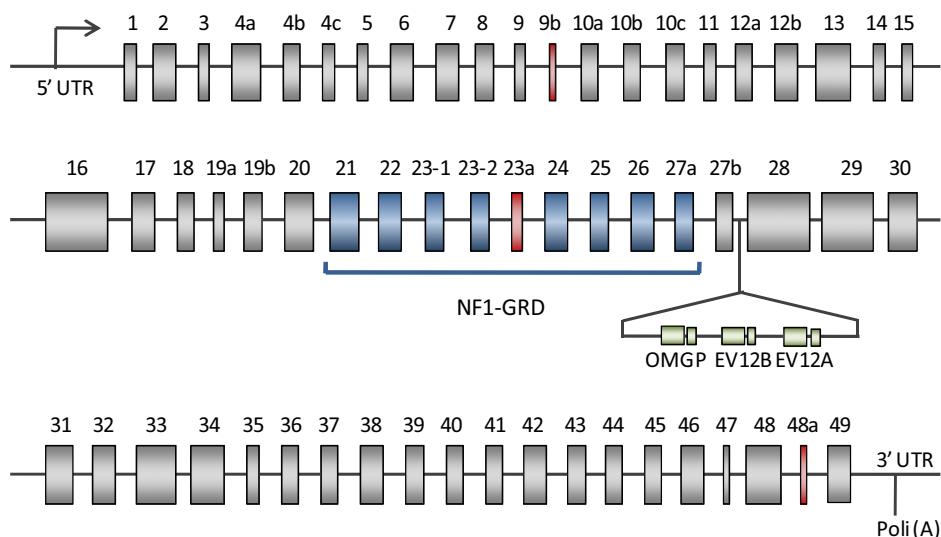


Figura 2. Esquema on es representa l'estrucció del gen *NF1*. Els exons constitutius es representen en gris els alternatius en vermell. S'indica el lloc d'inici de la transcripció 5' UTR amb una fletxa i el de terminació 3' UTR amb Poli (A). També s'indica la regió GRD de color blau i la regió de l'intró 27b que conté els tres gens OMGP, EV12A i EV12B.

Els exons 21-27a codifiquen per un domini funcional de 360 aminoàcids anomenat *NF1 GAP-related domain* (NF1-GRD). L'intró 27b conté tres gens que transcriuen en sentit oposat respecte el gen *NF1*; *OMGP* (Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein), una membrana nuclear involucrada en l'adhesió cel·lular; i *EV12A* i *EV12B* (Ecotropic Viral integration site), ambdós relacionats amb la leucèmia murina.

S'han descrit diversos pseudògens pel gen *NF1* localitzats als cromosomes 2, 12, 14, 15, 18, 21 i 22 (Legius et al, 1992; Suzuki et al, 1994; Purandare et al, 1995; Cummings et al, 1996; Kehrer-Sawatzki et al, 1997). Aquests pseudògens presenten una seqüència similar al gen normal, però a causa de l'acumulació de nombroses mutacions no dóna cap producte funcional. A més a més, la presència de pseudògens, dificulta l'anàlisi genètic del gen *NF1*.

NF1 com a gen supressor de tumors

El gen *NF1* és un gen supressor de tumors (GST), que inhibeix la proliferació cel·lular excessiva per evitar que una cèl·lula d'un organisme es transformi en una cèl·lula cancerígena. Els gens supressor de tumors codifiquen proteïnes que participen en la regulació del creixement, la diferenciació i la mort cel·lular programada (o apoptosis), per tal d'aturar la progressió del cicle cel·lular quan detecten algun dany en el DNA.

Quant els GST estan mutats o silenciats, les cèl·lules no poden respondre als punts de control del cicle cel·lular, o són incapaces de realitzar la mort cel·lular programada. Això pot provocar l'acumulació de mutacions durant els diferents cicles de divisió cel·lular i poden arribar a convertir-se en tumorogèniques (Weinberg, 1991).

Els GST actuen a nivell cel·lular de forma recessiva, de manera que segueixen el model de inactivació del doble *hit* proposat per Knudson (Knudson, 1971). Aquest model implica que és necessària la inactivació funcional dels dos al·lels per desregular el creixement. Individus amb mutacions germinals en GST necessiten una segona mutació somàtica a la cèl·lula diana que inactivi l'al·lel normal perquè es desenvolupi el tumor (Figura 3).

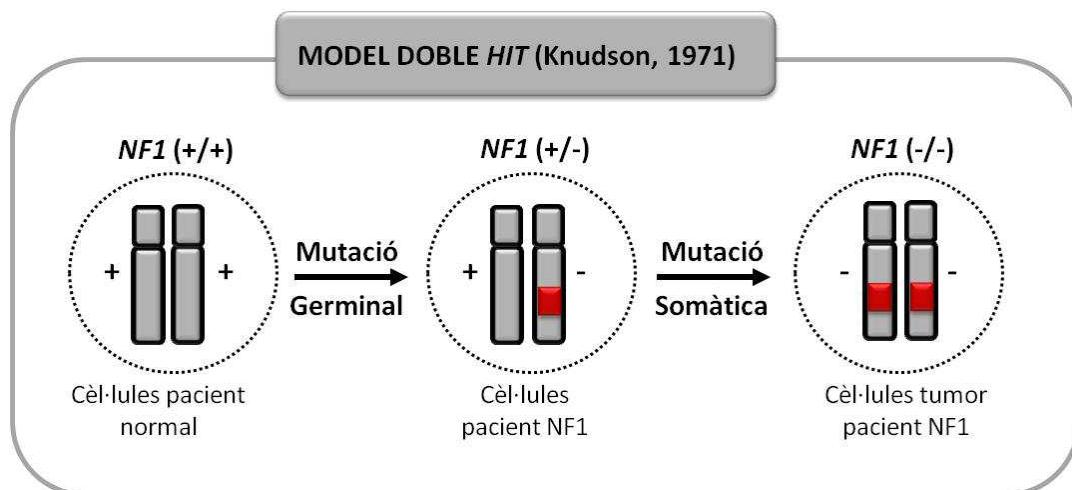


Figura 3. Representació del model del doble *hit* (Knudson, 1971).

Espectre mutacional germinal

La detecció de mutacions del gen *NF1* és força complexa per la gran mida d'aquest gen, per la presència dels pseudogens i l'amply espectre de mutacions identificades. El coneixement actual de l'espectre mutacional *NF1* inclou un gran nombre de mutacions distribuïdes per tot el gen. El gen *NF1* no presenta cap *hot spot* mutacional definit, però tot i així algunes mutacions són recurrents.

Fins ara s'han identificat més de 1.400 mutacions patogèniques diferents (Kluwe et al, 2004; Ko et al, 2013; Nemethova et al, 2013; Sabbagh et al, 2013; Ben-Salem et al, 2014; Xu et al, 2014), de les quals aproximadament un 5-10% són **grans delecions** (o microdelecions) que afecten el gen *NF1* i altres gens adjacents. La majoria de grans delecions tenen punts de trencaments recurrents i tenen lloc per recombinació homologa no al·lèlica. Les més comunes són les de tipus 1, la qual abasta 1,4 Mb, seguit de la de tipus 2 i la de tipus 3, que abasten 1,0 Mb i 1,2 Mb respectivament (Bengesser et al, 2010; Pasmant et al, 2010; Messiaen et al, 2011; Zickler et al, 2012). A més a més, s'ha descrit un nou tipus de microdelecions, causat per insercions associades a retrotransposons SVA (SINE/variable number of tandem repeats/*Alu*) en els punts de trencaments (Wimmer et al, 2011; Vogt et al, 2014). Aquestes delecions poden presentar una mida molt heterogènia i es creu que poden donar-se per diferents mecanismes. També s'han detectat anomalies en el **nombre de còpies d'un o varis exons** en un 2-5% del total de mutacions germinals (Shen et al, 1996; Fang et al, 2001; Wimmer et al, 2006; Griffiths et al, 2007; Wimmer et al, 2007; Orzan et al, 2008). El restant 90%, pràcticament són **mutacions puntuals** (Kluwe et al, 2004; Ko et al, 2013; Nemethova et al, 2013; Sabbagh et al, 2013; Xu et al, 2014). Segons la base de dades Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>) del 2014, les mutacions puntuals més comunes són les petites delecions o insercions/duplicacions (en pauta o en *frameshift*)(27%), seguit de les mutacions de *splicing* (23%) i per últim, les mutacions sense sentit (*nonsense*) i les mutacions de canvi de sentit (*missense*) conjuntament (24%). Dins de les mutacions de *splicing*, trobem les *deep intronic*, que són mutacions localitzades als introns que generen inclusió d'un exó críptic i que representen un 2.1% de les mutacions germinals identificades en pacients *NF1* (Pros et al, 2008).

Quan es té en compte l'efecte de la mutació a nivell de mRNA, entre un 30-50% de les mutacions afecten el correcte patró d'*splicing*, ja que les mutacions sense sentit, de canvi d'aminoàcid o de canvi de pauta de lectura, també poden causar alteracions en l'*splicing* del pre-mRNA (a més a més de les mutacions de *splicing*)(Ars et al, 2000; Fahsold et al, 2000; Messiaen et al, 2000; Ars et al, 2003; Colapietro et al, 2003; Zatkova et al, 2004; Wimmer et al, 2007; Pros et al, 2008; Messiaen & Wimmer, 2008; Jett & Friedman, 2010; Sabbagh et al, 2013; Xu et al, 2014).

D'altra banda, les mutacions puntuals poden provocar la introducció d'un codó d'aturada prematura (PTC, per *Premature Termination Codon*), ja sigui degut a una mutació sense sentit o una mutació que comporta un canvi de pauta de lectura. Els mRNAs portadors d'un PTC, són susceptibles de ser degradats pel mecanisme de *Nonsense Mediated mRNA Decay* (NMD). Aquest, és una mecanisme de control de l'mRNA que degrada selectivament transcrits que contenen PTC, per evitar la síntesi de proteïnes truncades o anòmals (Cartegni et al, 2002).

Aquest fet, pot comportar a l'expressió desigual per part dels dos al·lels (normal i mutat) del gen *NF1*, de manera que la proporció del transcrit normal pot ser superior a l'esperada (que seria del 50% per una malaltia autosòmica dominant). Aquesta expressió desigual pot ser deguda a la degradació dels transcrits mutants per part del NMD, amb conseqüent augment de la quantitat relativa de transcrits normals o a la producció de transcrits normals provinents de l'al·lel mutat (Hoffmeyer et al, 1995; Hoffmeyer et al, 1994; Skuse & Cappione, 1997; Cowley et al, 1998).

Espectre mutacional somàtic

Fins el moment han estat identificades menys mutacions somàtiques associades a tumors NF1 en comparació amb les mutacions germinals. Això és degut a que la heterogeneïtat cel·lular ens els teixits tumorals, així com el baix número de tumors benignes i malignes analitzats, dificulta la detecció de les mutacions somàtiques.

La doble inactivació del gen *NF1* s'ha demostrat com element clau en el desenvolupament de diversos tumors i trets clínics associats a la NF1. Tot i així, la causa efecte de les mutacions en el gen *NF1*, no ha estat establerta en tots els casos, ja que possiblement interactuen altres factors genètics i ambientals que augmenten el risc de desenvolupar aquests tumors.

Els neurofibromes dèrmics, els neurofibromes plexiformes i els MPNST, són generats quan la inactivació somàtica del gen *NF1* es dóna en les CS (Serra et al, 1997; De Raedt et al, 2006; Upadhyaya et al, 2008b), en canvi les CLS, són generades quan la mutació somàtica es dóna en els melanòcits (Maertens et al, 2007; De Schepper et al, 2008). D'altra banda, un 40% dels MPNST esporàdics no associats a la NF1 també presenten una doble inactivació d'aquest gen (Perry et al, 2002; Bottillo et al, 2009). Més recentment, també s'ha associat la doble inactivació del gen *NF1* en cèl·lules d'hamartoma fibrós, com a mecanisme per desenvolupar una pseudoartrosis congènita de la tibia (Stevenson et al, 2006; Lee et al, 2012). A més a més, s'ha descrit que altres afectacions associades a la NF1 també són portadores de la inactivació bial·lèlica del gen

NF1, com ara els gliomes òptics, els neuroblastomes, la leucèmia mieloide juvenil, els tumors gastrointestinals, els feocromacitomes (Brems et al, 2009a; Laycock-van Spyk et al, 2011; Patil & Chamberlain, 2012) i els tumors del glomus (Stewart et al, 2012) .

Els diferents tipus de tumors associats a la NF1 presenten un grau de variació en quan els mecanismes d'inactivació somàtica. Els dNF presenten aproximadament un 60% de **mutacions puntuals** causades principalment per recombinació mitòtica, mentre que els pNF, un 70% de les mutacions somàtiques són per **pèrdua d'heterozigositat** (LOH; de l'anglès, *loss of heterozygosity*), causades tant per recombinació mitòtica com per delecions genòmiques. Per últim, els MPNST, presenten un 90% de mutacions per LOH degut principalment a grans delecions (Serra et al, 2001; De Raedt et al, 2006; Serra et al, 2007; Upadhyaya et al, 2008a; Bottillo et al, 2009; Garcia-Linares et al, 2011; Laycock-van Spyk et al, 2011; Thomas et al, 2012).

La LOH és el fenomen pel qual un gen perd una de les dues còpies per una deleció o algun altre mecanisme com la monosomia, la conversió gènica o la recombinació mitòtica, provocant la pèrdua de l'heterozigositat per aquest gen.

CORRELACIÓ GENOTIP-FENOTIP

La NF1 presenta una gran variabilitat clínica, fins al punt que membres d'una mateixa família o pacients amb NF1 no relacionats, portadors de la mateixa mutació poden presentar fenotips molt diferents i manifesten la malaltia amb nivells d'afectació molt diversos (Szudek et al, 2000; Szudek et al, 2002; Szudek et al, 2003). Fins i tot hi ha estudis on avaluen les discordances fenotípiques entre parelles de bessons monozigòtics portadors de mutacions *NF1* (Rieley et al, 2010). Es postula que aquestes variacions poden ser causades per factors com l'edat, l'atzar, determinats factors ambientals o diferents gens modificadors (Easton et al, 1993; Riccardi, 1993; Wiest et al, 2003; Sabbagh et al, 2009; Sabbagh et al, 2013; Pasman et al, 2014) a més a més de factors no hereditaris com les diferències epigenètiques així com la presència de mutacions post-zigòtiques (Rieley et al, 2010).

D'altra banda, donat la gran heterogeneïtat de mutacions germinals del gen *NF1* s'han reportat diferents fenotips associats a **mutacions intragèniques** i a **grans delecions**. Pel que fa a les mutacions intragèniques, tot i que la majoria no s'ha associat a cap fenotip concret, s'han trobat per una banda, que la deleció de 3 parells de bases (c.2970-2972 del AAT) i la mutació *missense* (c.5425C>T i C>G) del gen *NF1*, s'associen a una clínica bastant lleu amb presència de CLS i absència de neurofibromes dèrmics i plexiformes (Upadhyaya et al, 2007)(Abstract de Martín et al, 2014 i de Messiaen. 16th

European Neurofibromatosis Meeting). D'altra banda, un estudi de 2012 analitza 23 mutacions que afecten el correcte *splicing* del gen *NF1* i assenyalen una associació amb el desenvolupament de gliomas cerebrals i MPNST (Alkindy et al, 2012). Val a dir que aquest estudi és molt limitat tant pel nombre de mutacions i pacients que s'estudien com per la classificació realitzada ja que situa totes les mutacions d'*splicing* en un únic grup independentment del seu perfil transcripcional i de l'efecte putatiu en la proteïna NF1 mutada. Un estudi recent analitzar 10 mutacions truncants i les associa a un fenotip clínic agressiu, amb la presència de manifestacions clíniques com elefantitis neuromatosa, càncer de mama, tumors gastrointestinals i MPNST (Ponti et al, 2014). Altra vegada ens trobem en un estudi molt limitat en el nombre de mutacions i pacients pel que els resultats deuen ser interpretats amb cautela. Pel que fa a la presència de grans deleccions en la regió del gen *NF1*, aquestes acostumen a presentar manifestacions clíniques més severes de la malaltia i s'han associat a la presència de problemes d'aprenentatge i a trets dismòrfics facials (Kayes et al, 1994; Venturin et al, 2004; Mensink et al, 2006; Maunter et al, 2010; Pasman et al, 2010). A més a més, els pacients portadors de microdeleccions del gen *NF1* del tipus-1 (1.4 Mb) presenten un risc més alt de desenvolupar neurofibromes dèrmics i plexiformes i MPNST (De Raedt et al, 2003; Mautner et al, 2010).

NEUROFIBROMINA

El gen *NF1* codifica per una proteïna citoplasmàtica de 2818 aminoàcids anomenada Neurofibromina que té una massa molecular de 250-280 KDa (DeClue et al, 1991; Gutmann et al, 1991). Aquesta proteïna té una expressió ubiqua, però és especialment alta en el sistema nerviós central, concretament en neurones, astròcits, oligodendrocits i CS (Nordlund et al, 1993).

La Neurofibromina conté diferents dominis però només 2 han estat ben caracteritzats a nivell funcional: un segment central anomenat GRD, relacionat amb les proteïnes activadores de GTPases o proteïnes GAP de RAS (Ballester et al, 1990; Martin et al, 1990; Xu et al, 1990); i un domini anomenat SEC14, adjacent al domini GRD, relacionat amb la unió a lípids i la regulació de l'activitat GAP, ja que contribueix a la localització de la Neurofibromina a la membrana (D'Angelo et al, 2006; Welti et al, 2007). A més a més, estudis recents, han suggerit que SPRED1 pot jugar un paper important en el reclutament de la Neurofibromina a la membrana plasmàtica per promoure l'activació de RAS-GTP (Stowe et al, 2012).

La Neurofibromina és una proteïna GAP, que gràcies al seu domini GRD, regula negativament l'activació de RAS. RAS és una proteïna que es troba ancorada a la membrana cel·lular i transdueix senyals dels receptors de la superfície cel·lular cap a vies

intracel·lulars (Malumbres & Barbacid, 2003; Pylayeva-Gupta et al, 2011). Les proteïnes RAS funcionen com a interruptors moleculars binaris, que poden alternar entre un estat actiu, quan la proteïna es troba unida a GTP i un estat inactiu, quan es troba unida a GDP. Aquesta transició està regulada per dos mediadors diferents: **Guanine nucleotide Exchange Factors** (GEFs), el qual promou l'activació de RAS, reemplaçant GDP permetent la inserció de GTP; i **GTPase Activating Protein** (GAP), el qual estimula la hidròlisi endògena de GTP unit a RAS, donant lloc a RAS-GDP, promovent la inactivació d'aquesta (Figura 3).

Les proteïnes RAS es troben involucrades en diferents vies de senyalització que controlen diversos processos claus en l'homeòstasi cel·lular. Les principals vies d'acció de RAS són: la via de **Ras/Raf/Mek/Erk**, involucrada en proliferació, diferenciació, supervivència i mort cel·lular; i la via de **Ras/PI3K/Akt/mTOR**, involucrada en proliferació i supervivència cel·lular. Així doncs, la pèrdua de funció de la Neurofibromina provoca un augment de l'activitat de RAS i una desregulació d'aquestes vies (Basu et al, 1992; DeClue et al, 1992; Guha et al, 1996)(Figura 4).

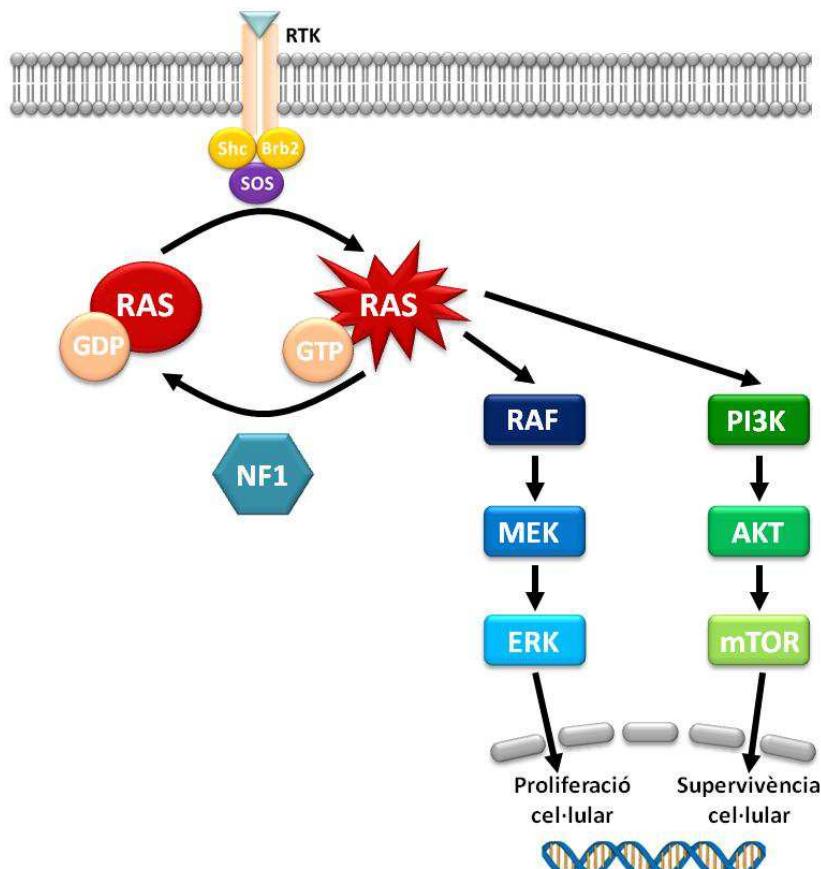


Figura 4. Esquema de la regulació de la via de RAS per la Neurofibromina (NF1) (modificat de Katz et al., 2009)

D'altra banda, es creu que la Neurofibromina pot estar relacionada amb la regulació de la via de cAMP (de l'anglès *cyclic adenosine monophosphate*) a través de l'activació de l'enzim adenil ciclasa, tot i que encara es desconeixen els mecanismes pels quals es dóna (Walker et al, 2013).

OLIGONUCLEÒTIDS ANTISENTIT COM ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA EN MALALTIES HEREDITÀRIES

Els oligonucleòtids antisentit (AON, per *antisense oligonucleotide*) són molècules de DNA de cadena senzilla de 15-20 nucleòtids de llargada i complementaris a un mRNA diana, encaminats a modular el mecanisme d'*splicing* per modificar els nivells del transcrit derivats de l'allel portador de la mutació, amb la finalitat d'incrementar els nivells de proteïna funcional, per aconseguir un fenotip més lleu de la malaltia.

Els AON poden ser utilitzats per diferents motius com ara; prevenir la inclusió d'un exò críptic aberrant a causa d'una mutació *deep intronic* (Du et al, 2007; Pros et al, 2009; Rodriguez-Pascual et al, 2009; Vega et al, 2009), induir la eliminació d'un exò *in-frame* que conte una mutació patogènica (Aartsma-Rus et al, 2003; Perez et al, 2010). Forçar la selecció d'un lloc d'*splicing* alternatiu per tal de evitar la síntesi del transcrit aberrant (Mercatante & Kole, 2002) o forçar l'*skipping* d'un o més exons portador d'una mutació *framshift*, per tal de restaurat la pauta de lectura del gen (Aartsma-Rus et al, 2003; Aartsma-Rus et al, 2004)(Figura 5).

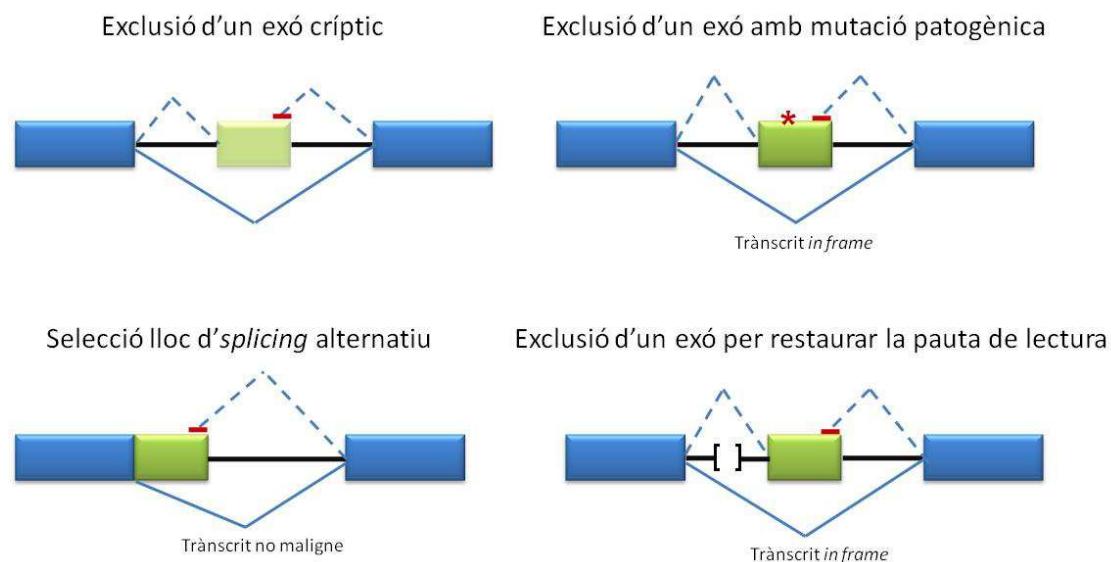


Figura 5. Esquema de les aplicacions dels AON (modificat de Pérez et al., 2010).

L'ús d'AON en estudis *in vitro* en cultius de línia cel·lulars s'ha realitzat en malalties com la β-thalassemia, l'acidèmia metilmalonònica i propiònica, la fibrosi quística, la progèria, l'albinisme ocular tipus 1, l'atàxia-telangiectàsia i la distròfia muscular de Duchenne, entre d'altres (Sierakowska et al, 1996; Friedman et al, 1999; Aartsma-Rus et

al, 2004; Scaffidi & Misteli, 2005; Vetrini et al, 2006; Rincon et al, 2007; Du et al, 2007; Perez et al, 2010).

En el cas de la NF1, entre un 30-50% de les mutacions puntuals detectades afecten el correcte patró d'*splicing* del gen *NF1*, de les quals aproximadament un 2% són mutacions *deep intronic* que generen inclusió d'un exó críptic (Messiaen & Wimmer, 2008; Pros et al, 2008). Aquestes mutacions són la diana perfecte per les teràpies antisentit, ja que els llocs d'*splicing* originals es mantenen intactes. L'ús d'AON per revertir l'efecte d'aquestes mutacions en el gen *NF1* ha sigut testat abans en un estudi *in vitro* en cultius primaris de fibroblasts i limfòcits amb AMOs (de l'anglès, *Antisense Morpholino Oligomers*), demostrant la restauració de l'*splicing* normal (Pros et al, 2009).

Els AMOs són un tipus de AON, però sintetitzats amb un àcid nucleic artificial, on la desoxiribosa del DNA és reemplaçada per un anell morfolino, conservant l'enllaç fosodièster i la unió a una base nitrogenada (adenosina, timina, citosina o guanina). D'aquesta manera el morfolino no és reconegut per cap enzim o proteïna cel·lular i és molt més estable perquè no és degradat per nucleases, ni genera cap resposta immune.

D'altra banda, fins a dia d'avui, no s'han reportat estudis *in vivo* (models animals preclínics ni assaigs clínics) on s'hagin utilitzat AON pel tractament de pacients NF1 portadors de mutacions *deep intronic*. En canvi, s'han obtingut resultats satisfactoris en models animals (Heemskerk et al, 2009; Yin et al, 2009; Goyenvalle et al, 2010) i assaigs clínics (Kinali et al, 2009; Aartsma-Rus & van Ommen, 2010; Koo & Wood, 2013) pel tractament amb AON de pacients amb distròfia muscular de Duchenne.

La distròfia muscular de Duchenne és una malaltia hereditària amb un patró d'herència recessiva lligada al cromosoma X, produïda per mutacions en el gen que codifica la proteïna Distrofina, encarregada de connectar els filaments d'actina amb la matriu extracel·lular. Els diferents assaigs clínics utilitzant AMOs pel tractament de pacients portadors de mutacions en el gen causant de la malaltia han demostrant la restauració de la Distrofina. Per aquests assaigs, s'ha utilitzat una injecció setmanal intramuscular o intravenosa en pacients amb distròfia muscular de Duchenne, sense mostrar efectes adversos aparents (Koo & Wood, 2013). Tot i així, es treballa per la millora la eficàcia dels AMOs i per desenvolupar teràpies combinades amb múltiples AMOs per millorar les teràpies d'aquest pacients.

MODELS PRECLÍNICS

El ratolí (*Mus musculus*) és l'espècie d'animal més utilitzada en l'experimentació científica actualment. Això és degut a les seves característiques reproductives, la seva mida i facilitat de manipulació i l'alt grau de coneixement del seu genoma. Els models animals poden reproduir característiques específiques de malalties humans, convertint-los en models biològics *in vivo*. Els models murins són un bon model per l'estudi del càncer humà per la investigació de factors involucrats en la malignitat, invasió i metàstasi, així com la predicción de la resposta i la toxicitat de diferents agents terapèutics *in vivo* abans de poder-los utilitzar a la clínica en humans.

Existeixen diversos models de ratolins, però dos dels més àmpliament utilitzats són: els **ratolins modificats genèticament** (GEM; de l'anglès, *genetically engineered mouse*), els quals recapitulen un genotip específic; i els **xenògrafts**, on ínies cel·lulars tumorals humanes o fragments de tumors primaris (PDX; de l'anglès, patient derived xenograft) són implantades en ratolins immunodeprimits.

RATOLINS MODIFICATS GENÈTICAMENT (GEM)

Els ratolins modificats genèticament tenen alterat el seu perfil genètic, a través de mutacions, delecions o sobreexpressió d'un o diversos gens, normalment involucrats en la transformació o en la malignitat dels tumors, per tal d'estudiar l'efecte de l'alteració d'aquest gens en els ratolins.

En el camp de la NF1 s'han generat diversitat de models de ratolins transgènics per tal de recapitular els diferents tumors associats a la malaltia *in vivo* (Taula 2). Els primers estudis amb ratolins modificats genèticament es centraven en la generació d'un ratolí en el qual s'eliminava el gen *Nf1* a partir de mutacions directes. Així doncs, ratolins homozigots amb una doble inactivació del gen *Nf1* (*Nf1-/-*), no són viables i moren durant el desenvolupament embrionari (Brannan et al, 1994). D'altra banda, els ratolins heterozigots per mutacions en el gen *Nf1* (*Nf1+/-*) són viables i fèrtils, i tot i que no presenten les principals afectacions de la NF1, són propensos a desenvolupar diferents tipus de tumors com feocromacitomes, leucèmies, entre d'altres (Jacks, 1994). En canvi, els ratolins heterozigots per mutacions en *cis* en els gens *Nf1* i *p53* (*Nf1+/-; p53+/-*) (Cichowski et al, 1999; Vogel et al, 1999) o en els gens *Nf1* i *CDKN2A* (*Nf1+/-; p16^{Ink4a}/p19^{Arf}-/-*) (Joseph et al, 2008) són propensos a desenvolupar MPNST i altres afectacions de la NF1. Finalment, un estudi recent, va generar un model de ratolí heterozigot per mutacions en *cis* en els gens *Nf1* i *Suz12* (*Nf1+/-; Suz12+/-*) i un triple heterozigot pels gens *Nf1*, *p53* i *Suz12* (*Nf1+/-; p53+/-; Suz12+/-*). Aquests ratolins van

desenvolupar lesions associades a la NF1 humana, com ara neurofibromes, MPNST i gliomes (De Raedt et al, 2014). El gen *SUZ12*, podria actuar com a gen supressor de tumors i codifica per una proteïna que forma part del complex PRC2, el qual disposa d'activitat histona metiltransferasa, intervenint en el silenciament de la cromatina (De Raedt et al, 2014).

D'altra banda, també s'han generat ratolins químèrics, els quals contenen dues poblacions cel·lulars genèticament diferents, per la combinació de dos zigots després de la fecundació. Aquests models permeten recrear unes condicions molts més acurades als humans, ja que els ratolins químèrics generats, es desenvolupen a partir de la combinació parcial de cèl·lules *Nf1* /- en un context *Nf1* +/- . Aquest models desenvolupen tumors semblants als pNF i presenten altres afectacions i problemes motors (Cichowski et al, 1999).

Finalment, s'han desenvolupat ratolins *knockout* condicionals, els quals es basen en la inactivació d'un gen mitjançant el sistema de recombinació Cre-LoxP. En l'estudi de la NF1, s'han generat diversos ratolins *knockout* condicionals desactivant el gen *Nf1* específicament en les cèl·lules de Schwann en diferents moments durant el seu desenvolupament embrionari per mitja de la utilització de diferents promotores.

Concretament, s'han generat models per ratolins heterozigots *Nf1* +/- (*Nf1* flox/-; *Krox20*-Cre) sota el control del promotor *Krox20*, el qual s'expressa transitòriament durant el desenvolupament de les CS. De manera que en un ambient heterozigot (format per CS -/- i resta de cèl·lules +/-) els ratolins desenvolupen pNF molt semblants als humans (Zhu et al, 2002). D'altra banda, s'han generat models per ratolins homozigots *Nf1* +/+ (*Nf1* flox/flox; *Dhh*-Cre) sota control del promotor *Desert Hedgehog* (*Dhh*), el qual s'expressa durant el desenvolupament de les CS, però en una fase més prematura (precursor de les CS). De manera que en un ambient homozigot (format per CS -/- i resta de cèl·lules +/+) els ratolins desenvolupen dNF i pNF (Wu et al, 2008). A més a més, s'han generat models per ratolins heterozigots *Nf1* +/- (*Nf1* flox/-; *P0a*-Cre) sota el control del promotor *3.9Periostin* (*P0a*), el qual també s'expressa en les cèl·lules precursores de les CS. De manera que en un ambient heterozigot (format per CS -/- i resta de cèl·lules +/-) els ratolins desenvolupen pNF (Joseph et al, 2008).

Més recentment s'han generat models de ratolins transgènics amb la pèrdua total del gen *Nf1* i de *Pten* en homozigosi (*Nf1* flox/flox, *Pten* flox/flox; *Dhh*-Cre) i heterozigosi (*Nf1* flox/flox, *Pten* flox/+; *Dhh*-Cre) sota el control del promotor *Dhh*, els quals desenvolupen MPNST d'alt i baix grau respectivament (Keng et al, 2012a). A més a més s'ha aconseguit generar MPNST de manera esporàdica a partir de models de ratolins amb la pèrdua total del gen *Pten* sota la expressió del promotor *Dhh* i la sobreexpressió d'*EGFR*.

sota control del promotor *2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (Cnp)* (*Pten* flor/flox; *Dhh-Cre*; *Cnp-EGFR*) (Keng et al, 2012b).

Per últim s'han generat models de ratolins transgènics a partir d'un sistema de mutagènesis amb transposons (*Sleeping Beauty*) per tal d'identificar gens *drivers* dels MPNST. Aquest sistema de mutagènesis és específic per CS, gràcies a la utilització dels promotores *Cnp* i *Cre*. Aquest sistema ha permès obtenir ratolins amb la pèrdua del gen *p53* i la sobreexpressió del gen *EGFR* (*Cnp-Cre*; *Cnp-EGFR*; *TP53^{R270H}*) els quals desenvolupen neurofibromes i MPNST (Rahrmann et al, 2013).

Taula 2. Diferents models de ratolins modificats genèticament generats. MPNST d'alt grau (a.g), MPNST de baix grau (b.g) i MPNST esporàdic (sp).

GEEM	GENOTIP	TUMORS	REFÈRENCEIA
Knockout	<i>Nf1</i> -/-	-	<i>Brannan et al., 1994</i>
	<i>Nf1</i> +/-	-	<i>Jacks et al., 1994</i>
	<i>Nf1</i> +/-; <i>p53</i> +/-	MPNST	<i>Cichowski et al., 1999; Vogel et al., 1999</i>
	<i>Nf1</i> +/-; <i>p16^{Ink4a}</i> / <i>p19^{Arf}</i> -/-	MPNST	<i>Joseph et al., 2008</i>
	<i>Nf1</i> +/-; <i>Suz12</i> +/-	pNF i MPNST	<i>De Raedt et al., 2014</i>
	<i>Nf1</i> +/-; <i>p53</i> +/-; <i>Suz12</i> +/-	pNF, MPNST i gliomes	<i>De Raedt et al., 2014</i>
Químèrics	<i>Nf1</i> -/-; <i>Nf1</i> +/-	pNF	<i>Cichowski et al., 1999</i>
Knockout	<i>Nf1</i> fl/-; <i>Krox20-Cre</i>	pNF	<i>Zhu et al., 2002</i>
	<i>Nf1</i> fl/fl; <i>Dhh-Cre</i>	dNF i pNF	<i>Wu et al., 2008</i>
	<i>Nf1</i> fl/-; <i>POa-Cre</i>	pNF	<i>Joseph et al., 2008</i>
Condicionals	<i>Nf1</i> fl/fl, <i>Pten</i> fl/fl; <i>Dhh-Cre</i>	MPNST (a.g)	<i>Keng et al., 2012</i>
	<i>Nf1</i> fl/fl, <i>Pten</i> fl/+; <i>Dhh-Cre</i>	MPNST (b.g)	<i>Keng et al., 2012</i>
	<i>Pten</i> fl/fl; <i>Dhh-Cre</i> ; <i>Cnp-EGFR</i>	MPNST (sp)	<i>Keng et al., 2012</i>
<i>Sleeping Beauty</i>	<i>Cnp-Cre</i> ; <i>Cnp-EGFR</i> ; <i>TP53^{R270H}</i>	NF/MPNST	<i>Rahrmann et al., 2013</i>

XENÒGRAFTS

Els xenògrafts són models *in vivo*, en els quals cèl·lules tumorals humans són implantades en ratolins immunodeficients. Els ratolins immunodeficients presenten un deteriorament de les funcions immunes com a conseqüència de diverses mutacions genètiques conegeudes. Aquests ratolins són els hostes ideals per a la implantació de tumors humans, ja que no reconeixen les cèl·lules humanes com a estranyes i per tant, no rebutgen el tumor implantat. Existeixen diferents models murins immunodeficients, però dos dels més utilitzats per a la generació de xenògrafts són: els ratolins **nude**, generats a partir d'una mutació en el gen *FOXN1*, el qual codifica per un factor de transcripció que controla la diferenciació de cèl·lules epiteliais del timus. La pèrdua o el deteriorament del timus provoca un sistema immune amb un número molt baix de cèl·lules T madures i la pèrdua del pèl corporal del ratolí. D'altra banda, trobem els ratolins **SCID**, generats a partir d'una mutació en el gen *PRKDC*, el qual codifica per una proteïna cinasa necessària per la unió d'extrems no homòlegs del DNA, afectant a la producció de cèl·lules T i B funcionals i per tant, produint animals deficients en cèl·lules T i B.

Segons la ubicació on són implantades les cèl·lules tumorals, podem distingir entre un model de xenògraft **subcutani**, en el qual les cèl·lules són implantades directament sota la pell, o bé, un model **ortotòpic**, en el qual les cèl·lules tumorals són implantades directament al mateix lloc d'origen del tumor del pacient. La procedència de les cèl·lules tumorals humanes poden ser o bé **línia cel·lulars** establertes, que reconstrueixen un tumor un cop injectades, o a partir de **tumors primaris** procedents directament de biòpsies humanes (PDX).

Els xenògrafts subcutanis presenten l'avantatge que els tumors són més fàcils d'implantar i un cop creixen, són palpables i es poden mesurar fàcilment. En contrapartida, els xenògrafts ortotòpics proporcionen als tumors un microambient molt més semblant al que té el tumor en el pacient, conservant propietats biològiques i metastàtiques molt més similars als casos clínics, la qual cosa condueix a una translació molt més fiable (Kim et al, 2009; Rubio-Viqueira & Hidalgo, 2009; Ruggeri et al, 2014; Stebbing et al, 2014). Diversos estudis han demostrat la influència del microambient en el comportament de les cèl·lules tumorals i com aquest pot afectar significativament a factors com la tumorogènesi, la disseminació, la metilació, la vascularització o fins i tot la different resposta a fàrmacs segons el lloc d'implantació (Dong et al, 1994; Fidler et al, 1994; Loukopoulos et al, 2004; Wang et al, 2005; Fleming et al, 2010; Garrido-Laguna et al, 2011; Du et al, 2014; Martinez-Garcia et al, 2014). Així doncs, s'ha vist que la implantació ortotòpica de línia cel·lulars derivades de tumors de mama, presenten nivells de creixement i de vascularització més alts i presenten perfils de metilació diferents a les implantades de forma subcutània (Wang et al, 2005; Fleming et al, 2010).

També s'ha descrit en càncer de vesícula, com els tumors implantats ortotòpicament presenten uns nivells de creixement, disseminació i vascularització més alts que els subcutanis (Du et al, 2014).

D'altra banda, el model PDX, permet recapitular l'heterogeneïtat i manté les alteracions genètiques dels tumors originals (DeRose et al, 2011; Zhao et al, 2012; Reyal et al, 2012; Hidalgo et al, 2014; Ruggeri et al, 2014). En canvi, els xenògraft generats a partir de cultius cel·lulars, deriven de cèl·lules cancerígenes que s'han adaptat a créixer fora del microambient natural d'un tumor, adquirint uns canvis genètics diferents als generats per l'estrès genètic en els tumors dels pacients (Siolas & Hannon, 2013; Martinez-Garcia et al, 2014). És per això, que existeixen més divergències genètiques entre els tumors primaris i la seva corresponent línia cel·lular, que no pas entre els tumors primaris i els respectius xenògrafts generats (Loukopoulos et al, 2004; Daniel et al, 2009; Martinez-Garcia et al, 2014).

Un altre punt important, és que els models PDX recapitulen les característiques morfològiques i estructurals del tumor original molt millor que els xenògrafts generats a partir de línies cel·lulars (Loukopoulos et al, 2004; DeRose et al, 2011; Ruggeri et al, 2014; Hidalgo et al, 2014; Martinez-Garcia et al, 2014). Una de les principals causes, és la composició estromal, ja que les línies cel·lulars únicament estan compostes per un tipus cel·lular i manquen per complet de cèl·lules que conformen l'estroma tumoral (fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules del sistema immunitari). En canvi, els tumors primaris mantenen inicialment l'estructura estromal original, tot i que la majoria d'estudis confirmen que posteriorment és reemplaçada per cèl·lules estromals de ratolí (Xu et al, 1999; Gray et al, 2004; Sanz et al, 2009; Lin et al, 2010; DeRose et al, 2011; Julien et al, 2012; Hylander et al, 2013).

Així doncs, els models de xenògrafts conformen un bon model preclínic, perquè reflecteixen la complexitat i l'heterogeneïtat dels tumors humans i permeten predir l'eficàcia d'agents anticancerigens (Hidalgo et al, 2014; Stebbing et al, 2014). Fins a dia d'avui, s'han generat diversos models de xenògraft per diferents tipus de tumors. Alguns dels més importants són: colorectal (Dangles-Marie et al, 2007), pàncrees (Fu et al, 1992), pulmó (Dong et al, 2010), melanoma (Taetle et al, 1987), cap i coll (Wennerberg et al, 1983), mama (Beckhove et al, 2003), pròstata (Gray et al, 2004), carcinoma renal (Beniers et al, 1992) o sarcomes (Stebbing et al, 2014).

En el context de la NF1 s'han desenvolupat diversos models de xenògrafts, la majoria d'ells a partir de línies cel·lulars derivades de MPNST i en algun cas, derivades de neurofibromes dèrmics i plexiformes (Taula 3). En el cas dels neurofibromes plexiformes, tot i les seves propietats tumorogèniques demostrades *in vitro*, l'èxit per establir models

de xenògrafts ha estat força limitat. Tot i així s'han aconseguit generar alguns models subcutanis i ortotòpics, aquests últims, o bé injectant les cèl·lules tumorals (Muir et al, 2001; Perrin et al, 2007a; Li et al, 2010), o bé implantant un fragment de tumor (Demestre et al, 2010) directament al nervi ciàtic del ratolí. En tots aquests models, els tumors preservaven les característiques típiques dels neurofibromes plexiformes humans, com ara la composició cel·lular, el baix grau de proliferació cel·lular i la angiogènesi (formació de vasos sanguinis en un tumor).

Pel que fa als MPNST, l'alta agressivitat de les cèl·lules tumorals facilita el seu creixement en el ratolí i per això s'han generat mols més models, tan subcutanis com ortotòpics. El xenògraft més utilitzat és el generat a partir de línies cel·lulars derivades de MPNST primaris, tant al context de la NF1 com als esporàdics. La majoria d'estudis generen els models injectant les cèl·lules de forma subcutànica (Mahller et al, 2007; Johansson et al, 2008; Banerjee et al, 2010; Lopez et al, 2011; Jessen et al, 2013) i en algun cas, també s'ha generat el model ortotòpic injectant línies cel·lulars a l'interior del nervi ciàtic (Perrin et al, 2007b; Li et al, 2010). D'altra banda, només existeix un model PDX d'un MPNST de pacient afectat d'NF1, però aquest està implantat de manera subcutànica (Bhola et al, 2009). Així hem de ressaltar que no existeix fins al moment, cap model PDX ortotòpic, implantat el tumor primari directament al nervi ciàtic.

Taula 3. Diferents models de xenògrafts generats a partir de la implantació subcutànica (SC) o ortotòpica (OT) de línies cel·lulars (LC) o tumors primaris (TP) de pNF i MPNST.

TUMOR	IMPLANTACIÓ	PROCEDÈNCIA	REFERÈNCIA
pNF	SC	LC	Muir et al., 2001
		TP	-
	OT	LC	Perrin et al., 2007; Li et al., 2010
		TP	Demestre et al., 2010
MPNST	SC	LC	Mahller et al., 2007; Johansson et al., 2008; Banerjee et al., 2010; Lopez et al., 2011; Jessen et al., 2013; Ohishi et al., 2013; Patwardhan et al., 2014
		TP	Bhola et al., 2009
	OT	LC	Perrin et al., 2007; Li et al., 2010
		TP	-

DIANES FARMACOLÒGIQUES

La recerca de dianes per trobar nous fàrmacs envers tumors associats a la NF1, s'han focalitzat en la via de RAS (Young et al, 2009), ja que aquests, presenten pèrdua de funció de la Neurofibromina per mutacions en el gen *NF1* i com a conseqüència presenten altos nivells de la proteïna RAS activa (Basu et al, 1992; Sherman et al, 2000a; Downward, 2003). Pel que fa als MPNST esporàdics, aproximadament en el 40% s'han observat mutacions en el gen *NF1* (Perry et al, 2002; Bottillo et al, 2009) i per tant podrien presentar nivells de RAS-GTP similars als NF1. Per contra, els MPNST esporàdics que no presenten mutacions en el gen *NF1*, poden conservar la funció de la Neurofibromina i per tant no tenen perquè presentar una activació constitutiva de RAS (Mahller et al, 2006).

Existeixen diversitat de fàrmacs per bloquejar els diferents punts de les vies de Raf/MEK/ERK i PI3K/AKT/mTOR (Figura 6). La via de RAS presenta complexos interaccions entre els diferents components i mecanismes de resistència als agents terapèutics, és per això, que s'utilitza la combinació de múltiples fàrmacs, per bloquejar sinèrgicament les diferents parts d'aquesta via.

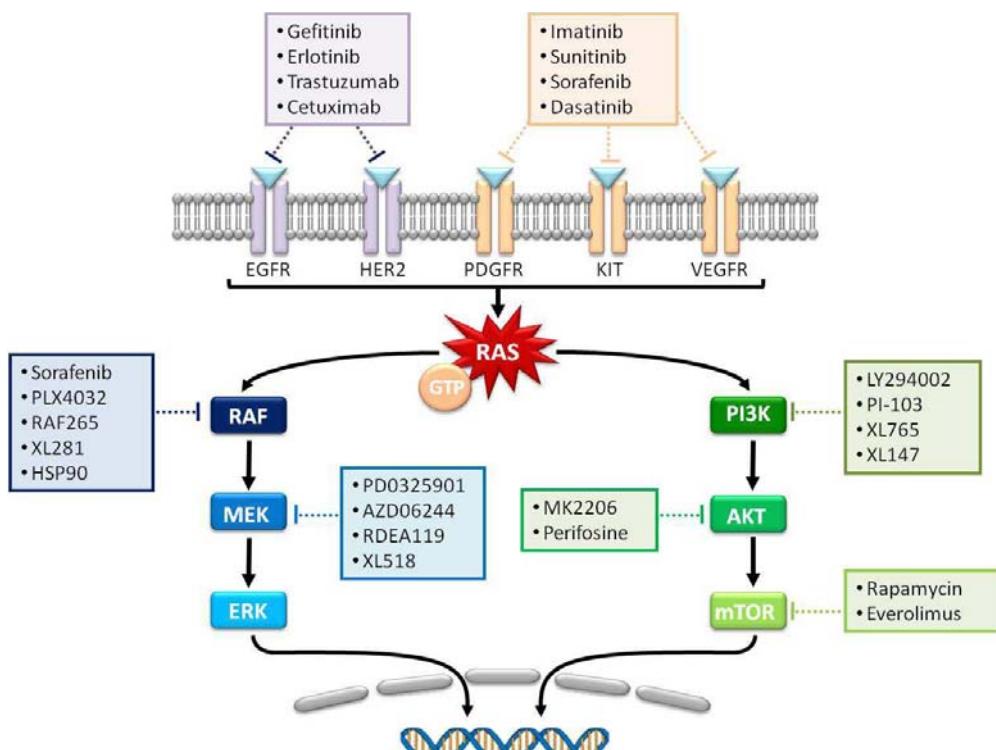


Figura 6. Fàrmacs que inhibeixen a diferents punts la via de RAS (modificat de Taylor et al., 2011).

El primer nivell a l'hora de testar nous fàrmacs *in vitro*, és mitjançant cultius de línies cel·lulars establertes a partir de tumors de pacients. La creació d'aquestes línies, les quals presenten un perfil citogenètic i genòmic que reflecteixen la diversitat que s'observa dels seus respectius tumors, representa un punt important en l'anàlisi de la influència de l'heterogeneïtat sobre la variabilitat de la resposta a teràpies diana. En aquest aspecte s'han creat diversitat de línies cel·lulars a partir de neurofibromes dèrmics, neurofibromes plexiformes i MPNST (esporàdics i NF1) i s'han testat diferents fàrmacs per mirar d'estudiar el comportament i la resposta d'aquestes cèl·lules tumorals. Alguns dels estudis *in vitro* més prometedors han estat amb inhibidors com erlotinib, imatinib, PD0325901, LY294002, PI103, rapamicina i sorafenib (Taula 4), en la majoria dels quals ha disminuït la proliferació cel·lular de les diferents línies de neurofibromes plexiformes i MPNST (Mahller et al, 2007; Ambrosini et al, 2008; Johansson et al, 2008; Zou et al, 2009b; Demestre et al, 2010; Endo et al, 2013; Jessen et al, 2013; Ohishi et al, 2013).

Un segon nivell pels assaigs de noves teràpies diana, ha estat mitjançant models *in vivo* en ratolins genèticament modificats i en diferents models de xenograft (Taula 4). Pel que fa al tractaments *in vivo* dels neurofibromes plexiformes, un dels tests preclínics més reveladors, va testar **rapamicina i sorafenib** en models GEM (*Nf1*^{flox/flox};DhhCre). Els resultats obtinguts van mostrar que la rapamicina pràcticament no tenia cap efecte vers els tumors, en canvi, el sorafenib provocava una disminució de la mida dels tumors en alguns dels animals (Wu et al, 2012). En quan a neurofibromes plexiformes, també s'han testat fàrmacs com PD0325901, també en model *Nf1*^{flox/flox};DhhCre (Jessen et al, 2013) i l'imatinib en models ortotòpics derivats de línies cel·lulars(Demestre et al, 2010), en ambos casos reduint la mida dels tumors.

Altres assaigs s'han realitzat en models de xenògraft de MPNST, la majoria d'ells establert a partir de línies cel·lulars, mostrant efectes satisfactoris en la reducció del volum tumoral, per tractaments amb rapamicina (everolimus i sirolimus)(Johannessen et al, 2008; Johansson et al, 2008; Bhola et al, 2009; De Raedt et al, 2011; Yamashita et al, 2014), imatinib (Ohishi et al, 2013; Patwardhan et al, 2014) i PD0325901 (Jessen et al, 2013) i efectes no tan prometedors en els assaigs amb erlotinib (Taula 4)(Mahller et al, 2007; Johansson et al, 2008).

Per últim, s'han realitzat diferents **assaigs clínics** en Fase I i II per diversos fàrmacs i per diferents afectacions del camp de la NF1, però cap d'ells ha obtingut resultats totalment concloents. Un del agents terapèutics més prometedors és l'imatinib, sobretot en un petit estudi de Fase II, en el que redueix el creixement dels neurofibromes plexiformes més d'un 20% en un 17% del pacients (Robertson et al, 2012). Els assaigs clínics més recents inclouen un estudi en Fase I del sorafenib en nens amb NF1 que

presentaven neurofibromes plexiformes inoperables. Els resultats d'aquest estudi van conoure que els nens no toleraven una dosis substancialment inferior a la dosis mínima tolerable i presentaven símptomes de toxicitat. A més a més, no es va observar una disminució de la mida dels tumors (Kim et al, 2013). També s'han realitzat altres assaigs clínics amb diversos agents terapèutics com el sirolimus (rapamicina)(Weiss et al, 2014), el tipifarnib (Widemann et al, 2014b) o el pirfenidone (Widemann et al, 2014a), els quals en cap cas, no van tenir cap efecte en la reducció dels pNF dels pacients (Taula 4).

Finalment, pel que fa a assaigs clínics en MPNST, es va realitzar un estudi en fase II amb sorafenib en monoteràpia en una sèrie de sarcomes, incloent-hi 12 MPNST. Els resultats obtinguts no van mostrar una resposta satisfactòria envers el tractament, ja que només 3 MPNST es van mantenir estable i la resta van progressar (Maki et al, 2009). Actualment, s'estan realitzat diferents assaigs clínics amb diversos agents terapèutics, com ara la rapamicina, el sorafenib o l'erlotinib envers els MPNST, però tots ells encara estan en fase de reclutament o bé els resultats no han estat publicats (www.clinicaltrials.gov). A més a més, cal tenir en compte, que la seva poca prevalença, dificulta molt el reclutament de pacients per la realització d'assaigs clínics rellevants (Taula 4).

D'altra banda, als darrers anys s'han generat multitud de dades genètiques al voltant dels gens involucrats en la malignitat del MPNST i diferents dianes per a la teràpia d'aquest tumors. Aquestes dades abasten múltiples branques a diferents nivells del control cel·lular, com ara les principals vies de transducció de senyal, l'angiogènesi, l'apoptosi, la mitosi o l'epigenètica. Per això, més enllà dels gens clàssics, com ara *TP53*, *PTEN*, *RB16* o les vies de *MAPK* i *mTOR*, altres gens podrien estar implicats en la tumorogènesi i en potencials dianes terapèutiques per als MPNST. Així doncs, a la present tesi s'ha volgut investigar el rol de molècules com l'aurora cinasa A i el receptor HER3, els quals, alguns estudis han evidenciat que podrien tenir un paper molt important en els MPNST.

Taula 4. Fàrmacs utilitzats per a tractaments *in vitro*, *in vivo* i assaigs clínics, tant per a neurofibromes plexiformes (pNF) com per a MPNST NF1 i esporàdics (SP), en models GEM i xenògrafts ortotòpics (OT) i subcutanis (sc).

ASSAIG	TUMOR	FÀRMAC	RESULTAT	REFERÈNCIA
IN VITRO	MPNST	pNF	Imatinib	Positiu
			Rapamicina	Positiu
			Erlotinib	Positiu
			Sorafenib	Positiu
			LY294002	Positiu
			PI-103	Positiu
			PD0325901	Positiu
		NF1	Imatinib	Positiu
			Rapamicina	Positiu
			Erlotinib	Positiu
			Sorafenib	Positiu
			LY294002	Positiu
			PI-103	Positiu
			PD0325901	Positiu
IN VIVO	MPNST	pNF	OT	Imatinib Positiu
			PD0325901	Positiu
			Rapamicin	Negatiu
			Sorafenib	Positiu
		NF1 (sc)	Rapamicin	Positiu
			PD0325901	Positiu
			Imatinib	Positiu
			Rapamicin	Positiu
		SP (sc)	Erlotinib	Negatiu
			Imatinib	Positiu
			GEM	Rapamicin Positiu
ASSAIGS CLÍNICS	pNF	Fase I	Sorafenib	Negatiu
			Imatinib	Positiu
		Fase II	Sirolimus	Negatiu
			Tipifarnib	Negatiu
			Pirfenidon	Negatiu
			Sorafenib	Negatiu
	MPNST	Fase II	Sorafenib	Maki et al., 2009

AURORA CINASA A

Les Aurores cinases formen una família de serina/treonina cinases crucials per al control del cicle cel·lular. Existeixen tres gens aurora cinasa, que codifiquen per tres aurores diferents (A, B i C), però les principals investigacions s'han centrat en aurora A i B, perquè sembla que juguen un paper molt important en l'oncogènesi i en la supressió tumoral (Katayama et al, 2003). Aquestes dues proteïnes, presenten un alt grau d'homologia però tenen localitzacions i funcions diferents. Aurora B forma part del *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) que regula diferents esdeveniments claus durant la mitosi. Aurora A (AURKA) és una proteïna que intervé en la formació de l'eix mitòtic i en la maduració i separació dels centrosomes (Barr & Gergely, 2007; Fu et al, 2007). A més a més, Aurora A i B s'han trobat sobreexpressades en diferents tipus de càncer com leucèmia, càlon, pròstata i mama (Gritsko et al, 2003; Jeng et al, 2004; Yang et al, 2004; Lee et al, 2006) així com als MPNST (Patel et al, 2012), sent bons candidats per a la teràpia d'aquests tumors.

A nivell molecular l'AURKA és activa quan interacciona amb la proteïna TPX2, formant un complex heterodímer actiu, el qual provoca l'activació la proteïna multifactorial RHAMM. D'altra banda, quan RHAMM és actiu, s'uneix a TPX2, evitant la activació de AURKA. De manera que quan l'expressió de RHAMM disminueix, allibera TPX2, activant AURKA i promovent la proliferació cel·lular (Maxwell et al, 2011)(Figura 7).

En concordança, a nivell genètic s'han identificat deleccions en el gen *HMMR* que codifica per RHAMM en aproximadament la meitat dels tumors MPNST d'alt grau (Mantripragada et al, 2008; Yang & Du, 2013) però no en tumors de baix grau i neurofibromes. D'altra banda, els gens que codifiquen pels gens d' AURKA (Cr. 20q13) i de TPX2 (Cr. 20q11.2) es troben a regions cromosòmiques que són amplificades freqüentment als MPSNT (Schmidt et al, 1999; Schmidt et al, 2000).

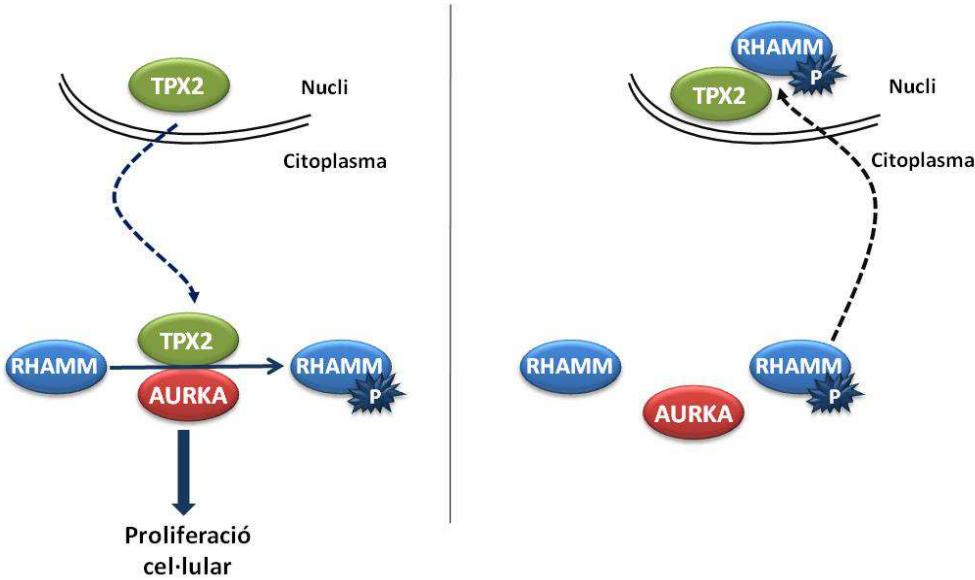


Figura 7. Esquema representatiu de la interacció entre AURKA, RHAMM i TPX2 (modificat de Maxwell et al., 2011).

Existeixen diferents inhibidors per Aurora A i B, com **VX-680** (Tozasertib), que és un potent inhibidor dual d'Aurora A i B, que s'ha demostrat que inhibeix la progressió del cicle cel·lular, induceix a l'apoptosi i bloqueja el creixement tumoral en diversos models *in vivo* de xenògrafts de leucèmia, càlon i pàncrees (Harrington et al, 2004). **MLN8237** (Alisertib), que és un inhibidor selectiu d'Aurora A, que induceix citotoxicitat i arrest cel·lular (Gorgun et al, 2010). La seva eficàcia s'ha avaluat en diferents estudis *in vivo* (Carol et al, 2011; Manfredi et al, 2011; Palani et al, 2013; Tanaka et al, 2013), així com alguns assaigs clínics en fase I/II en tumors sòlid avançats (Macarulla et al, 2010; Cervantes et al, 2012; Goldberg et al, 2014).

RECEPTOR HER3

El receptor HER3 pertany a la família de receptors tirosin cinasa HER, els quals es caracteritzen per tenir un domini extracel·lular encarregat de la unió a diferents lligands, una regió transmembrana i un domini intracel·lular amb activitat tirosina cinasa (Yarden, 2001). Aquesta família està formada per quatre receptors (EGFR, HER2, HER3 i HER4), que es troben inactius en forma de monòmers i després de la unió amb el lligand, pateixen un canvi conformacional que comporta la dimerització amb ell mateix o amb altres receptors de la mateixa família (formant homodímer o bé heterodímer), activant els residus de tirosina intracel·lulars. Aquest procés activa una sèrie de vies de transducció de senyal implicats en nombrosos processos biològics, com ara la supervivència, la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi, a partir principalment de

l'activació de les vies de Raf/MEK/ERK i Pi3K/AKT/mTOR (Prenzel et al, 2001; Holbro et al, 2003; Marmor et al, 2004)(Figura 8).

Aquests receptors es troben alterats en molts tumors epitelials. Concretament, **EGFR** (HER1) es troba sobreexpressat o mutat en determinats tumors de pulmó, colo-rectals i gliomes (Ji et al, 2006). **HER2** (ErbB2) es troba sobreexpressat principalment en tumors de mama, tot i que també s'ha trobat en tumors d'ovari, d'estómac i d'úter (Menard et al, 2001). **HER3** (ErbB3), ha estat descrit com a possible factor pronòstic del càncer de pròstata, càncer gàstric, càncer de bufeta, càncer colorectal entre d'altres i ha estat fortament associat amb la progressió tumoral de tots aquests tumors (Tanner et al, 2006; Hayashi et al, 2008; Ledel et al, 2014; Nielsen et al, 2014). **HER4** (ErbB4), és un dels menys estudiats fins el moment, tot i que s'han trobat mutacions d'aquest receptor en un baix percentatge de tumors de pulmó, mama, còlon i estómac (Soung et al, 2006).

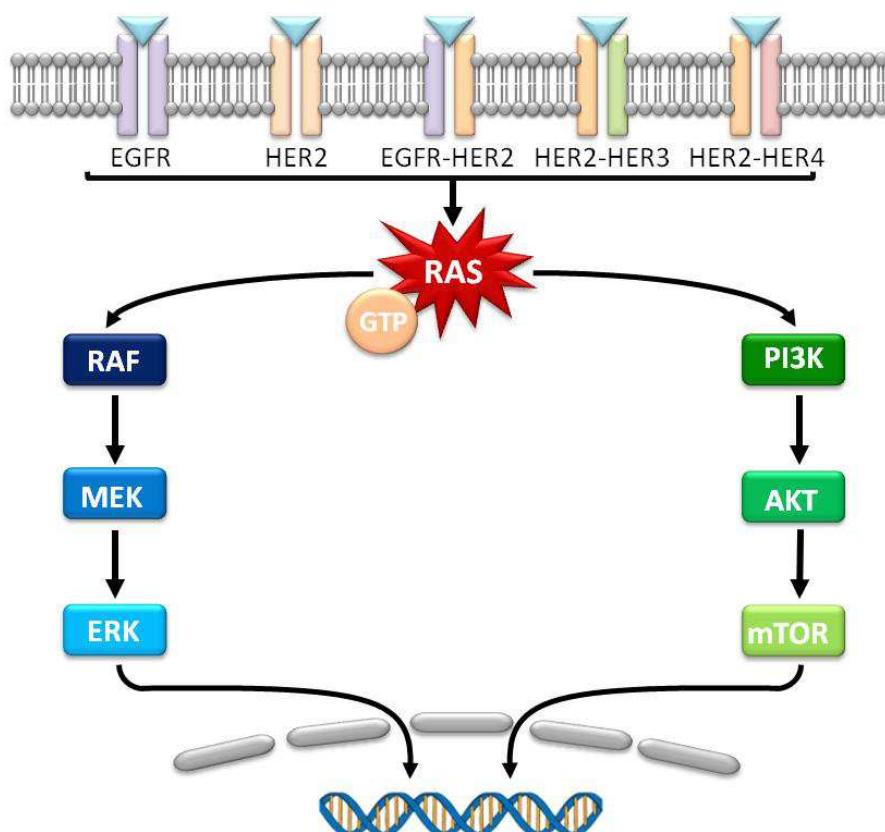


Figura 8. Esquema dels diferents receptors de la família HER i la seva relació amb la via de RAS (modificat de Katz et al., 2009).

A més a més, els receptors EGFR i HER2, semblen tenir un paper important en el control de la proliferació i els dos estan sobreexpressats en un alt percentatge de neurofibromes, schwannomes i MPNST (Holtkamp et al, 2008; Perrone et al, 2009; Ammoun et al, 2010). També s'ha descrit un pronòstic pitjor en MPNST amb sobreexpressió d'EGFR (Keizman et al, 2009) i una clara disminució de la proliferació en models *in vitro* i murins, després del tractament amb inhibidors específics d'EGFR, HER2 o ambdós (Dilworth et al, 2008; Ammoun et al, 2010; Ahmad et al, 2011). D'altra banda, el paper d'HER3 en MPNST només ha estat valorat en un únic estudi on es va descriure la sobreexpressió d'aquesta proteïna en 4/6 neurofibromes i 4/6 MPNST (Stonecypher et al, 2005), tot i que HER3 i HER4 són els principals receptors de la neuregulina, la qual s'ha descrit que és imprescindible pel desenvolupament i la proliferació de les SC (Eckert et al, 2009).

Actualment existeixen diferents compostos capaços de modular l'expressió selectiva dels diferents receptors HER. Els més rellevants són: **Lapatinib**, un inhibidor tirsoina cinasa dual dels receptors EGFR i HER2. Aquest fàrmac és utilitzat pel tractament de càncer de mama i altres tumors sòlids (Burris, 2004; Higa & Abraham, 2007). **Pertuzumab**, un anticòs monoclonal que bloqueja el domini extracel·lular d'HER2, evitant la dimerització amb altres receptors (HER2 i HER3). Aquest agent ha demostrat la seva activitat antiproliferativa en tumors gàstrics, de mama, neuroendocrins i de pròstata (DeGrendele, 2003; Yamashita-Kashima et al, 2011; Langdon & Cameron, 2013). **MEHD7945A**, un anticòs monoclonal que bloqueja dualment EGFR i HER3, el qual existeixen uns pocs assaigs preclínics, on s'ha demostrat una millor eficàcia que altres fàrmacs monoespecífics i el qual pot superar amb eficiència la resistència a inhibidors d'EGFR (Schaefer et al, 2011; Kamath et al, 2012; Huang et al, 2013).

HIPÒTESI

PREMISES PRINCIPALS QUE HAN CENTRAT LA PRESENT TESI DOCTORAL

La Neurofibromatosi de tipus 1 pertany al grup de malalties rares o minoritàries. Malgrat formar part d'aquest grup, és una de les malalties autosòmiques dominants més prevalent en humans afectant aproximadament a 1 de cada 3.500 individus de la població general.

La gran variabilitat en l'expressivitat clínica d'aquesta malaltia dificulta el pronòstic clínic i el seguiment individualitzat d'acord amb el risc real de cada pacient. Aprofundir en els mecanismes moleculars subjacents a aquesta variabilitat és rellevant per millorar el procés de seguiment clínic. Part d'aquesta variabilitat s'ha associat al mosaïcisme genètic.

Actualment no existeix cap tractament específic per cap dels signes i complicacions associats a aquesta greu malaltia. Tot i així, en la darrera dècada s'han descrit diferents aproximacions terapèutiques per diverses malalties genètiques dirigides a mutacions concretes, entre elles les mutacions que afecten el correcte *splicing*.

Els tumors malignes de la beina dels nervis perifèrics són uns tumors heterogenis molt poc freqüents i que en un 50% dels casos apareixen associats a una NF1. Aquests tumors són una de les principals causes de mortalitat prematura dels pacients NF1. A dia d'avui no existeix cap tractament estandarditzat amb eficàcia clínica contrastada per aquest tipus tumoral.

HIPÒTESI DE TREBALL

La determinació del paper del mosaïcisme genètic a la NF1 i l'estudi molecular dels pacients amb mosaïcisme permetrà una millora en la comprensió de l'expressivitat clínica de la NF1 en aquests casos.

Aproximacions terapèutiques emprant estratègies d'oligonucleòtids antisentit específics per mutació poden ser d'utilitat clínica en un percentatge de pacients amb NF1.

La generació de nous models animals amb MPNST derivats de tumors primaris humans constituirà una gran eina per assajar i validar noves estratègies terapèutiques. La creació d'un repositori de dades clíniques, moleculars - germinals i somàtiques - i de resposta a fàrmacs d'una col·lecció exhaustiva de tumors MPNST permetrà, en un futur, individualitzar el tractament per cada pacient amb MPNST dependent de les seves característiques germinals i somàtiques.

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu global d'aquesta tesi doctoral és aprofundir en alguns aspectes moleculars de la NF1. El treball s'ha realitzat en el marc de dos projectes independents, un centrat en la caracterització d'un cas particular de NF1 i un altre basat en el desenvolupament de nous models animals pels tumors MPNST.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

PART 1:

1. Explicar genèticament el cas particular d'un pacient NF1 que presenta una clínica molt lleu de la malaltia.
2. Utilitzar oligòmers antisentit del tipus morfolino per revertir l'efecte de la mutació *NF1* en cèl·lules d'aquest pacient com a possible estratègia terapèutica per aquest tipus de mutació.

PART 2:

1. Establir i caracteritzar una sèrie de models de xenògrafts ortotòpics derivats de MPNST procedents de pacients NF1 i esporàdics.
2. Utilitzar aquests models ortotòpics per l'estudi preclínic *in vivo*.

RESULTATS

PRESENTACIÓ DELS RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi es troben dividits en dos apartats: el primer consta d'un article publicat i el segons consta d'un article publicat, un sotmès a publicació i un apartat de resultats encara no publicats.

PART 1:

Article 1

“A mild neurofibromatosis type 1 phenotype produced by the combination of the benign nature of a leaky NF1-splice mutation and the presence of a complex mosaicism.”

Human Mutation, 2011.

PART 2:

Article 2

“Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine.”

Sotmès a publicació a Embo Molecular Medicine (preparant la 1^a revisió)

Article 3

“Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.”

Oncotarget, 2013

Resultats no publicats

“Estudi in vivo del receptor HER3 en models ortoxenògraft de MPNST.”

1. A MILD NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1 PHENOTYPE PRODUCED BY THE COMBINATION OF THE BENIGN NATURE OF A LEAKY *NF1*-SPLICE MUTATION AND THE PRESENCE OF A COMPLEX MOSAICISM.

ARTICLE 1

A mild neurofibromatosis type 1 phenotype produced by the combination of the benign nature of a leaky *NF1*-splice mutation and the presence of a complex mosaicism.

Juana Fernández-Rodríguez*, **Joan Castellsagué***, Llúcia Benito, Yolanda Benavente, Gabriel Capellá, Ignacio Blanco, Eduard Serra i Conxi Lázaro.

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Human Mutation; 32:705–709, 2011.

Resum: En aquest article es van analitzar les bases genètiques i moleculars responsables d'un fenotip lleu observat en una pacient NF1. La pacient és portadora d'una mutació puntual *de novo* en el gen *NF1* (c.3198-314G>A). Aquesta mutació es troba a l'intró 19a i provoca la creació d'un nou lloc acceptor d'*splicing*. Aquest nou lloc utilitz a dos llocs donadors críptics diferents preeixents a l'intró 19a (inactius quan no es troba la mutació) per generar dos transcrits aberrants diferents, cadascú dels quals implica la inclusió d'un exò críptic diferent. Ambdós transcrits aberrants codifiquen per a una proteïna truncada.

La quantificació de les cèl·lules portadores de la mutació en diferents mostres derivades de les tres capes embrionàries van evidenciar que es tractava d'un cas de mosaïcisme. A més a més, l'anàlisi de la inactivació del cromosoma X en els mateixos teixits suggereix un possible avantatge proliferatiu de les cèl·lules portadores de la mutació en el gen *NF1* en alguns teixits.

D'altra banda, l'anàlisi dels nivells de transcrits aberrant en teixits frescos i cultius curts de limfòcits i fibroblasts, així com la construcció d'un minigen amb la mutació del pacient (c.3198-314G>A), van confirmar una baixa proporció dels transcrits amb inclusió d'exò críptic, a causa de la generació de transcrits normals per part de l'al·lel portador de la mutació.

Els nostres resultats conclouen que la clínica lleu de la pacient podia ser explicada per una combinació de mosaïcisme genètic i per la producció de transcrits normals a partir de l'al·lel mutat.

Finalment, es va dissenyar una estratègia personalitzada per a corregir l'efecte d'aquesta mutació, i es va demostrar la correcció de l'*splicing* aberrant gràcies a la utilització de oligòmers mofolino antisentit específics contra els llocs críptics d'*splicing* (el generat per la mutació i els dos críptics).

A Mild Neurofibromatosis Type 1 Phenotype Produced by the Combination of the Benign Nature of a Leaky *NF1*-Splice Mutation and the Presence of a Complex Mosaicism

Juana Fernández-Rodríguez,^{1†} Joan Castellsagué,^{1†} Llúcia Benito,² Yolanda Benavente,^{3,4} Gabriel Capellá,¹ Ignacio Blanco,² Eduard Serra,⁵ and Conxi Lázaro^{1*}

¹Hereditary Cancer Program, Genetic Diagnosis Unit; ²Hereditary Cancer Program, Genetic Counseling Unit; ³Unit of Infections and Cancer (UNIC), Cancer Epidemiology Research Program, Institut Català d'Oncologia (ICO-IDIBELL); ⁴CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain; ⁵L'Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer (IMPPC), Badalona, Barcelona, Spain

Communicated by Garry R. Cutting

Received 19 November 2010; accepted revised manuscript 24 February 2011.

Published online 2 June 2011 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI 10.1002/humu.21500

ABSTRACT: Here we analyze the genetic and molecular basis responsible for a very benign phenotype observed in an NF1 patient. Quantification of cells carrying the *NF1* mutation in different samples derived from the three embryonic layers revealed mosaicism. Furthermore, the construction of a minigene with patient's mutation (c.3198–314G>A) confirmed its benign nature due to the leakiness of the splicing mechanism that generated a proportion of correctly spliced transcripts. Hence, we concluded that the mild phenotype observed in this patient is the result of the presence of mosaicism together with the benign nature of a leaky *NF1*-splice mutation. Finally, with the aim of developing a personalized therapeutic approach for this patient, we demonstrated correction of the splicing defect by using specific antisense morpholino oligomers. Our results provide an example of the molecular complexity behind disease phenotypes and highlight the importance of using comprehensive genetic approaches to better assess phenotype–genotype correlations.

Hum Mutat 32:705–709, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: NF1; mosaicism; genotype–phenotype; splicing

Neurofibromatosis type 1 (NF1; MIM# 162200) is an autosomal dominant disorder characterized by an increased predisposition to develop certain types of malignancies as well as by the presence of a wide range of clinical traits involving cells of neural crest origin (reviewed in [Riccardi, 1992]). NF1 is caused by germline mutations in the *NF1* gene, which is one of the human genes

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

*These two authors contributed equally to the study.

†Correspondence to: Conxi Lázaro, Hereditary Cancer Program, Genetic Diagnosis

Unit, Laboratori de Recerca Translacional, Institut Català d'Oncologia-ICO-IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, Gran Via 199-203, L'Hospitalet de Llobregat, 08907, Spain.
 E-mail: clazaro@oncologia.net

Contract grant sponsors: Spanish Health Research Fund; Carlos III Health Institute; Catalan Health Institute and Autonomous Government of Catalonia; Contract grant numbers: ISCIII-RETIC; RD06/0020/1051; RD06/0020/1050; 2009SGR290; PI10/01422; CA08/00248.

with a higher mutation rate. Comprehensive genetic studies identified more than 1,100 disease-causing mutations allowing a precise depiction of the *NF1* germline mutational spectrum (reviewed in [Messiaen and Wimmer, 2008]). So far, two constitutive *NF1* mutations have been correlated with a particular *NF1* phenotype. Individuals with type 1 *NF1*-deletions, which encompass 1.4 Mb of genomic DNA [Kayes et al., 1994; Lopez Correa et al., 1999] and involve several other genes in addition to the *NF1*, are characterized by a severe phenotype, consisting of learning problems, dysmorphic features and a high number of dermal neurofibromas [Mautner et al., 2010; Pasmant et al., 2010]. By contrast, patients with the recurrent c.2970–2972 delAAAT mutation seem to express a moderate phenotype characterized by the absence of dermal neurofibromas [Upadhyaya et al., 2007].

It has been suggested that a proportion of the new mutations are actually somatic implying that some sporadic patients are mosaics for a *NF1* mutation [Zlotogora, 1993; Kehrer-Sawatzki and Cooper, 2008]. Depending on the stage during development of the occurrence of the mutation we can distinguish patients showing generalized mosaicism, segmental mosaicism, and gonadal mosaicism [Ruggieri and Huson, 2001]. Generalized mosaicism cases exhibit typical symptoms of the disease in a mild generalized form, making them very difficult to distinguish from nonmosaic patients. Segmental manifestation show clinical manifestations limited to one or a few areas of the body [Crowe et al., 1956; Moss and Green, 1994; Riccardi, 1982]; this is a rare condition that occurs at around 1:36,000–40,000 individuals [Friedman et al., 1999; Ingordo et al., 1995; Ruggieri and Polizzi, 2000; Wolkenstein et al., 1995]. Gonadal mosaicism is confined to the germline and is extremely uncommon in NF1 [Bottillo et al., 2010; Lazaro et al., 1994]. Identification of somatic mosaicism and assessment of tissues affected by the *NF1* somatic mutation is difficult and represents a challenge because it is especially important for providing accurate genetic counselling to the patient.

For several genetic conditions, genotype–phenotype studies have suggested the importance of mechanisms regulating splicing as modifiers of phenotype in carriers of splicing defects [Nissim-Rafinia and Kerem, 2005]. For instance, a leaky effect of some splicing mutations associated with the production of wild-type transcripts from mutated alleles has been described. In some cases this phenomenon has been associated with a mild phenotype [Beck et al., 1999]. The high number and diversity of splicing

mutations in the *NF1* gene made it interesting to explore the occurrence of leakiness in the splicing mechanism and its putative relation to the severity of the disease.

In this work we describe the molecular basis underlying the mild *NF1* phenotype of a patient fulfilling the NIH-*NF1* established diagnostic criteria. Written informed consent was obtained from the patient following our institutional review board approved protocol. The patient is a 34-year-old woman who is a sporadic case of the disease (Fig. 1A, left panel) showing 20 café-au-lait spots on the trunk and upper extremities, mild scoliosis, axillary and submammary freckling, and presence of less than 50 minuscule neurofibromas (a few millimeters in diameter) located on the trunk, which started to appear when she was 18 years old (Fig. 1A, right panel). The patient does not have Lisch nodules, any dysmorphism or learning disability. The *NF1*-mutational analysis using DNA isolated from peripheral blood of the patient revealed a point mutation in exon 19a of the gene (c.3198–314G>A) (Supp. Table S1). This mutation is a deep intronic mutation that creates a new cryptic acceptor splice site that uses two different cryptic donor splice sites present in the wild-type sequence (Supp. Table S2), to generate two aberrantly spliced transcripts showing inclusion of two different cryptic exons (Fig. 1B); both cryptic exons would generate the same putative truncated protein (p.Asp1067TrpfsX7).

We investigated two possible biological mechanisms that could explain the mild phenotype of the patient: somatic mosaicism and presence of mild *NF1*-mutation. To explore mosaicism we used a quantitative approach, based on the analysis of a single nucleotide primer extension reaction (SNaPShot analysis), to determine the proportion of cells containing the mutated allele in a subset of samples representative of the three embryonic layers (Supp. Materials and Methods). As this *NF1* mutation had never been described before in other patients, it was impossible to obtain genetic material representative of a bona fide heterozygous sample that could be used as a control for quantification. Hence, we generated artificial controls consisting of two plasmids; one containing the patient's mutation and the other bearing the wild-type sequence (Supp. Materials and Methods). A mixture of serial proportions of both plasmids was used to obtain a standard curve that allowed estimation of the proportion of mutant alleles present in the different tissues obtained from the patient (Supp. Figs. S1 and S2). This analysis revealed that samples derived from the endoderm and mesoderm, such as uroepithelial cells and peripheral blood, respectively, showed a proportion of mutant allele of around 50% (Fig. 1C and Supp. Fig. S3), indicating that all the cells from these tissues are carrying the mutation in heterozygosity. However, samples derived from the ectoderm, such as skin, buccal swab or hair roots, showed a mutant allele proportion lower than 50%, ranging from 20 to 35%, suggesting that only a proportion of the cells of these tissues were carrying the *NF1* mutation. Cells from saliva showed an intermediate value that was in agreement with its nature, consisting of a mixture of white blood cells (mesoderm) plus buccal epithelial cells (ectoderm). To validate our results and confirm that the observed different proportions of mutated and WT alleles in the SNaPShot analysis were reflecting a somatic mosaicism and were not caused by amplification artefacts due to the different nature and origin of DNAs analyzed, we performed a control SNaPShot analysis using a SNP unrelated to the disease in the same set of DNA samples. We studied SNP rs2075786 located in an intronic region of the *TERT* gene, located on a different human chromosome and for which our patient was heterozygous. In this case, the proportion of both alleles was close to 50% in all tested DNA samples (Fig. 1C

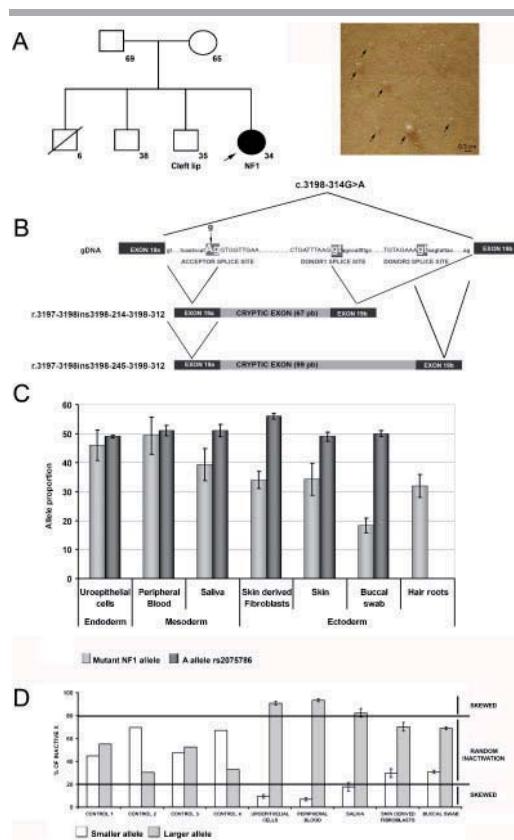


Figure 1. Patient and mutation description, SNaPshot results and XCI assay. **A:** Pedigree of the patient (left panel). Detail of neurofibromas from the back where the small size of them can be appreciated (right panel). **B:** Schematic representation of the *NF1* deep intronic mutation (c.3198–314G>A) and the observed aberrant splicing. Constitutive and cryptic exons are represented by dark and light gray boxes, respectively. Mutated nucleotide is shown in capital letter and indicated by an arrow. Intron sequences are in lower case; boxes in introns mark cryptic splice sites. **C:** Summary of the SNaPshot results for mutation c.3198–314G>A (light gray bars) and the SNP rs2075786 (control SNP) (dark gray bars) in a battery of different samples from our patient. Allele proportion is indicated on the Y-axis, experiments were performed in triplicate. Data are represented by a bar consisting of the mean \pm SD. **D:** Summary of the X-chromosome inactivation assay from different tissues of the studied patient and controls. Results were averaged from at least two replicates of the experiment. [Color figures can be viewed in the online issue, which is available at www.wiley.com/humanmutation.]

and Supp. Fig. S4), a result that reinforced the validity of our previous results observed in the SNaPShot analysis of the *NF1* mutation. Taking all our results together we can conclude that the patient studied here is a case of a *NF1* mosaicism as the *NF1* mutation is present in different proportions in different cell types. Hence, this *NF1* mutation may have occurred early during development; as cells derived from the three embryonic layers are carrying the mutation in contrast to cases of segmental mosaicism, where the proportion of mutated cells in nonneuronal crest derived tissues can often lie below the detection level of routine analysis [Maertens et al., 2007]. Although several cases of mosaicism have

been described for NF1, the role of mosaicism in NF1 is still scarcely analyzed and limited to few number of cases [Kehrer-Sawatzki and Cooper, 2008]. The use of different methodological approaches with high sensitivity such as SNaPShot analysis or real-time quantitative allele discrimination [Aretz et al., 2007; Maertens et al., 2006], together with the investigation of several different tissues in cases where a mild form of the disease is observed, will help to ascertain the role of somatic mosaicism in Neurofibromatosis type 1.

Taking into consideration the embryological origin of the different tissues analyzed and the fact that the majority of NF1 traits have a neural crest-derived cell origin (reviewed in [Raedt et al., 2008]), we were surprised by the proportions of mutated cells identified, greater in tissues mainly derived from the endoderm or mesoderm and smaller in tissues derived from the ectoderm. We decided to further explore the complex mosaicism exhibited in this patient by performing an X-chromosome inactivation (XCI) assay in the same set of tissues (Supp. Materials and Methods) [Allen et al., 1992]. X-chromosome inactivation is a stochastic event that occurs in the early stages of embryonic development in female embryos [Lyon, 1961, 1962]. If a genetic mutation occurs after this inactivation, one can perform an X-chromosome inactivation test in different tissues in order to ascertain whether any bias is observed in the proportion of inactivation in both X-chromosomes and compare these results to the proportion of cells carrying the given genetic mutation [Wang et al., 2009]. In our case, determination of clonal expansion was based on the analysis of DNA methylation and CAG tandem repeats at the human androgen receptor locus (*HUMARA*) [Allen et al., 1992], located on chromosome X, in the same tissues were mutation analysis was performed (with the exceptions of skin and hair roots). The number of CAG repeats differentiated the parental X chromosomes and methylation status distinguished the active and inactive X chromosome. In the absence of proliferative differences (advantages or disadvantages) between *NF1*-mutated and nonmutated cells, completely random XCI would be expected to result in around 50% inactivation of each X chromosome in all tissues. By convention, mildly skewed XCI was defined by an allele ratio 80–90% inactivation, and extremely skewed XCI was defined by an allele ratio >90% inactivation [Beever et al., 2003; Kimani et al., 2007]. Interestingly, we observed skewed XCI in the case of peripheral blood, saliva and uroepithelial cells with ratios of 12:88; 15:85, and 10:90, respectively. None of the rest of tissues from the patient, or a subset of control blood DNA samples, showed skewed XCI (Fig. 1D and Supp. Fig. S5). Tissues carrying the highest proportion of mutated cells coincided with those exhibiting skewed XCI. Moreover, in all these tissues, the same X chromosome was predominantly inactivated, making it unlikely that this observed skewed X-inactivation was the result of a purely random process. These results suggest a proliferative advantage of certain cells carrying the *NF1* mutation that results in higher proportions of both percentage of mutated cells and cells with skewed X chromosome inactivation. Consequently, these proliferative differences suggest that the observed proportions of mutated cells in the adult tissues analyzed in the present study do not reflect the initial percentage of mutated cells in the different embryonic cell layers. However, these results have to be taken carefully as it has been reported that X-inactivation ratios may vary between different tissues within one normal individual [Sharp et al., 2000].

To investigate a second possible cause of the observed mild NF1 phenotype, the benign nature of the *NF1* mutation, we analyzed and quantified the expression of mutant transcripts produced by the deep intronic *NF1* mutation identified, exploring different

tissues from the same patient. We analyzed any deviation from the expected 50:50 proportion of mutant versus normal transcripts, taking into consideration the proportion of mutated cells identified in the analysis of RNA from different tissues. The analysis of RNA from fresh tissues (Supp. Materials and Methods) indicated, with a certain degree of variation between samples, a low proportion of mutated transcripts, ranging from 1.4% to 14.41% and none in the hair root sample (Fig. 2A, upper panel). The study of cell cultures (lymphocytes and fibroblasts) (Supp. Materials and Methods) revealed a low proportion of mutated transcripts as well as the action of the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanism on mutated-mRNA, because puromycin treatment was able to increase the levels of mutant transcripts observed in both cell types (Fig. 2A, bottom panel). By comparing the proportion of mutated transcripts (Fig. 2A) with the percentage of mutated DNA (Fig. 1C) in the same tissues, it became clear that there was a reduction in the proportion of mutated RNA. An illustrative example was the analysis of lymphocyte cells that showed equal proportions of mutated and wild-type alleles at the DNA level. However, the analysis of their transcriptional profile provides evidence of a much lower proportion of aberrantly spliced transcripts than the expected 50% (20% after puromycin treatment and less than 10% without this treatment). Altogether, the differences between observed and expected proportions of aberrantly spliced transcripts, even after avoiding NMD, suggested the possibility that wild-type transcripts were also produced from the mutated allele, resulting in a low proportion of abnormal transcripts. In order to confirm this hypothesis we also constructed a minigene carrying the mutated allele (Supp. Materials and Methods). The analysis of the transcripts generated by the minigene containing mutation c.3198–314G>A indicated the production of both mutated and wild-type transcripts, while the minigene encoding the normal sequence only produced normal transcripts (Fig. 2B and Supp. Fig. S6), confirming that the low proportion of mutant transcripts is due to the production of normal transcripts from the mutated allele due to leakiness of the splicing mechanism. Therefore, the particular benign nature of this *NF1* mutation was possibly contributing to the mild phenotype observed in our patient, by acting as a hypomorphic allele rather than a null one.

Finally, and with the aim of starting to design personalized therapeutic strategies for NF1 patients, three different specific AMOs blocking cryptic splice sites used by the mutation were designed (as previously reported) [Pros et al., 2009]. AMOs were designed, synthesized, and purified by Gene Tools (Philomath, OR) and endo-porter (GeneTools) was used to deliver AMOs into skin-derived fibroblasts from the patient (Supp. Materials and Methods). We observed that the three designed AMOs were able to reduce the levels of mutant transcripts, although a complete correction was only observed when a combination of the three AMOs was used (Fig. 2C, upper panel) as has also been described in other genetic disorders [Gurvich et al., 2008]. To confirm that this reduction was specific to the AMO designed we performed the same treatment but using an unspecific AMO, designed to block a donor splice site generated by a different mutation located in exon 3 of the *NF1* gene (Supp. Materials and Methods). As expected, no effect on the proportion of mutant transcripts was observed when using an unspecific AMO. Furthermore, we observed that IVS19a-AMO donors 1 and 2 inhibit, in a specific manner, the two aberrant transcripts generated. IVS19a-AMO donor 1 preferentially inhibits aberrant transcript 1 (r.3197–3198ins3198-214-3198-312) whereas IVS19a-AMO donor 2 preferentially inhibits aberrant transcript 2 (r.3197–3198ins3198-245-3198-312) (Supp. Fig. S7). Finally, to confirm that correction of aberrant splicing by AMO treatment at

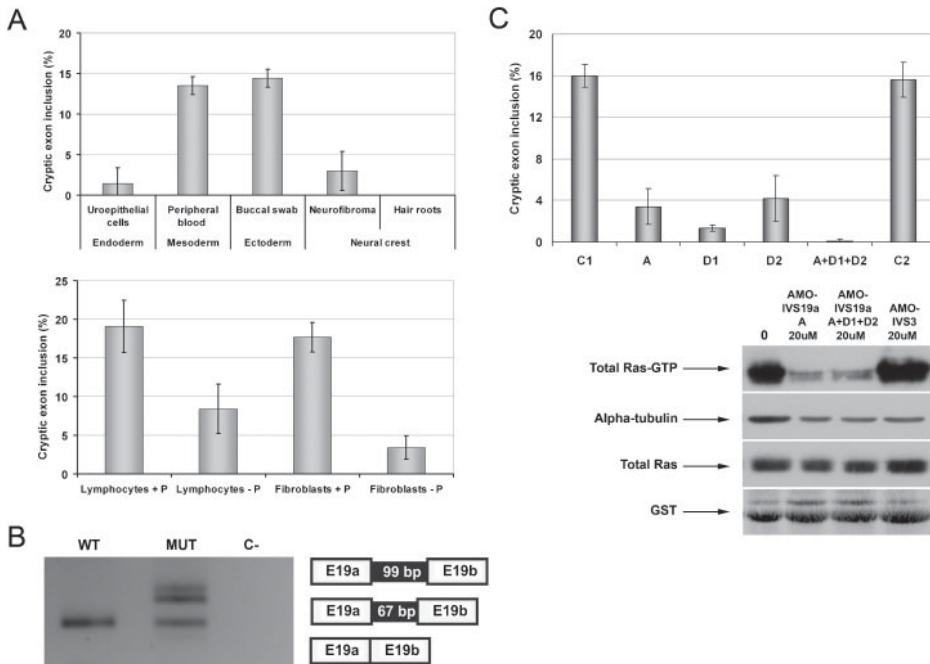


Figure 2. Quantification of transcripts, minigene assay, and AMO treatment. **A:** RT-PCR analysis of total RNA was performed using specific primers to analyze the three types of transcripts produced (wild-type and two aberrant transcripts). The Y-axis of each graph shows the proportion of aberrant transcripts versus the total. Results are represented by a bar consisting of the mean for at least three independent experiments. Upper panel: results from fresh tissues. Bottom panel: results from cultured lymphocytes and fibroblasts. P, Puromycin. **B:** Results of the RT-PCR analysis of the two constructed minigenes. MUT, corresponds to the minigene carrying mutation c.3198–314A; WT, correspond to the minigene with the normal sequence (c.3198–314G); C-, negative control. **C:** Correction of *NF1* aberrant splicing and restoration of the neurofibromin function by AMOs. Upper panel: RT-PCR analysis shows the proportion of aberrant transcripts versus the total in the Y-axis. Results are represented by a bar consisting of the mean \pm SD for at least three independent experiments. C1, control, untreated cells from the patient; A, AMO blocking acceptor splice site; D1, AMO blocking Donor 1 splice site; D2, AMO blocking Donor 2 splice site; A+D1+D2, combined AMOs blocking the three splice sites; C2, unspecific AMO blocking a donor splice site created by a different mutation located in intron 3 of the *NF1* gene. Bottom panel: morpholino treatment shows reduction of Ras-GTP levels in fibroblast cell cultures from the patient.

RNA level had some effect at a functional level, we indirectly assessed neurofibromin function, by measuring levels of active Ras (Ras-GTP) as an indicator of neurofibromin GTPase activity (Supp. Materials and Methods). We treated primary fibroblast cultures carrying the deep intronic mutation first with one AMO blocking the newly created acceptor splice site and second with a combination of three AMOs that were designed to block all cryptic splice sites located at intron 19a. We found that levels of Ras-GTP were lower in fibroblasts treated with specific AMOs than in untreated fibroblast or in fibroblasts treated with an unspecific AMO (Fig. 2C, bottom panel), in agreement with our previous results using cell lines derived from other NF1 patients carrying the same type of mutation [Pros et al., 2009]. This decrease in active Ras levels suggests that AMO treatment was indeed restoring neurofibromin GTPase function.

To conclude, in this report we are presenting a very illustrative case where a combination of different biological processes such as somatic mosaicism and the leaky nature of a splicing mutation, are the possible causes of the mild NF1 phenotype observed in our patient. Our results highlight the complexity of genotype–phenotype correlations and the importance of performing comprehensive genetic studies to interpret clinical findings and facilitate genetic counselling.

Acknowledgments

We thank the patient described in this study for her willingness to participate and collaborate in all the proposed experiments. We thank Dr. Laura Valle and Nuria Seguí for providing us conditions and reagents to analyse the telomerase SNP. We thank Susan Huson and Harvey Evans for critical advice and corrections of the manuscript. The authors would especially like to acknowledge the Asociación Española de Afectados de Neurofibromatosis, who awarded us one of their grants, as well as giving their constant support for our research. We also thank the Asociación Española contra el Cáncer that recognize our group as a one of the Grupos Estables de Investigación Oncológica 2010.

References

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 51:1229–1239.
- Aretz S, Stienen D, Friedrichs N, Stemmler S, Uhlhaas S, Rahner N, Propping P, Friedl W. 2007. Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). Hum Mutat 28:985–992.
- Beck S, Penque D, García S, Gomes A, Farinha C, Mata I, Gulbenkian S, Gil-Ferreira K, Duarte A, Pacheco P, Barreto C, Lopes B, Cavaco J, Lavinha J, Amaral MD. 1999. Cystic fibrosis patients with the 3272–26A → G mutation have mild disease, leaky

- alternative mRNA splicing, and CFTR protein at the cell membrane. *Hum Mutat* 14:133–144.
- Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, Field L, Brown CJ, Robinson WP. 2003. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet* 72:399–407.
- Bottillo I, Torrente I, Lanari V, Pinna V, Giustini S, Divona L, De Luca A, Dallapiccola B. 2010. Germline mosaicism in neurofibromatosis type 1 due to a paternally derived multi-exon deletion. *Am J Med Genet A* 152A:1467–1473.
- Crowe FW, Schull WJ, Neel JV. 1956. A clinical, pathological, and genetic study of multiple neurofibromatosis. Springfield, IL: Charles C. Thomas.
- Friedman JM, Gutman DH, MacCollin M, Riccardi VM, editors. 1999. Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis, 3rd ed. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT, Finkel RS, Medne L, Anderson CB, Weiss RB, Wilton SD, Flanigan KM. 2008. DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Ann Neurol* 63:81–89.
- Ingordo V, D'Andria G, Mendicini S, Grecucci M, Baglivo A. 1995. Segmental neurofibromatosis: is it uncommon or underdiagnosed? *Arch Dermatol* 131:959–960.
- Kaminsky ZA, Assadzadeh A, Flanagan J, Petronis A. 2005. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of met/C/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res* 33:e95.
- Kayes LM, Burke W, Riccardi VM, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens K. 1994. Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. *Am J Hum Genet* 54:424–436.
- Kehler-Sawatzki H, Cooper DN. 2008. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? *J Med Genet* 45:622–631.
- Kimani JW, Shi M, Daack-Hirsch S, Christensen K, Moretti-Ferreira D, Marazita ML, Field LL, Canady JW, Murray JC. 2007. X-chromosome inactivation patterns in monozygotic twins and sib pairs discordant for nonsyndromic cleft lip and/or palate. *Am J Med Genet A* 143A:3267–3272.
- Lazarus C, Ravella A, Gaona A, Volpini V, Estivill X. 1994. Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N Engl J Med* 331:1403–1407.
- Lopez Correa C, Brems H, Lazaro C, Estivill X, Clementi M, Mason S, Rutkowski JL, Marynen P, Legius E. 1999. Molecular studies in 20 submicroscopic neurofibromatosis type 1 gene deletions. *Hum Mutat* 14:387–393.
- Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372–373.
- Lyon MF. 1962. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 14:135–148.
- Maertens O, De Schepper S, Vandesompele J, Brems H, Heyns I, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L. 2007. Molecular dissection of isolated disease features in mosaic neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 81:243–251.
- Maertens O, Legius E, Speleman F, Messiaen L, Vandesompele J. 2006. Real-time quantitative allele discrimination assay using 3' locked nucleic acid primers for detection of low-percentage mosaic mutations. *Anal Biochem* 359:144–146.
- Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammert S, Hogel J, Spori H, Cooper DN, Kehler-Sawatzki H. 2010. Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J Med Genet* 47:623–630.
- Messiaen L, Wimmer K. 2008. NF1 mutational spectrum. In: Kaufmann D, editor. *Neurofibromatoses. Monographs in Human Genetics*. Basel: Karger. p 63–77.
- Moss C, Green SH. 1994. What is segmental neurofibromatosis? *Br J Dermatol* 130: 106–110.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. 2005. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet* 21:480–483.
- Pasmani E, Sabagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, Martin L, Barbarot S, Leheup B, Rodriguez D, Lacombe D, Dollfus H, Pasquier L, Isidor B, Ferkal S, Soulier J, Sanson M, Dieux-Coëslier A, Bieche I, Parfait B, Vidaud M, Wolkenstein P, Upadhyaya M, Vidaud D. 2010. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat* 31:E1506–E1518.
- Pros E, Fernandez-Rodriguez J, Canet B, Benito L, Sanchez A, Benavides A, Ramos FJ, Lopez-Ariztegui MA, Capella G, Blanco I, Serra E, Lazaro C. 2009. Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Hum Mutat* 30:454–462.
- Raeft T, Maertens O, Serra E, Legius E. 2008. Somatic NF1 mutations in tumors and other tissues. In: Kaufmann D, editor. *Neurofibromatoses. Monographs in Human Genetics*, Vol. 16. Basel: Karger. p 143–153.
- Riccardi VM. 1982. Neurofibromatosis: clinical heterogeneity. *Curr Probl Cancer* 7: 1–34.
- Riccardi VM. 1992. Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Ruggieri M, Huson SM. 2001. The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology* 56:1433–1443.
- Ruggieri M, Polizzi A. 2000. Segmental neurofibromatosis. *J Neurosurg* 93:530–532.
- Serra E, Ars E, Ravella A, Sanchez A, Puig S, Rosenbaum T, Estivill X, Lazaro C. 2001. Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Hum Genet* 108:416–429.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P. 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 107: 343–349.
- Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. 2002. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23:4072–4079.
- Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, Evans DG, Howard E, Kerr B, Griffiths S, Consoli C, Side L, Adams D, Pierpont M, Hachen R, Barriocat A, Li H, Wallace P, Van Biervliet JP, Stevenson D, Viskochil D, Baralle D, Haan E, Riccardi V, Turnpenny P, Lazaro C, Messiaen L. 2007. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp intraframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970–2972 delAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype–phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 80:140–151.
- Wang X, Wang M, MacLennan GT, Abdul-Karim FW, Eble JN, Jones TD, Olobatuyi F, Eisenberg R, Cummings OW, Zhang S, Lopez-Beltran A, Montironi R, Zheng S, Lin H, Davidson DD, Cheng L. 2009. Evidence for common clonal origin of multifocal lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 101:560–570.
- Wolkenstein P, Mahmoudi A, Zeller J, Revuz J. 1995. More on the frequency of segmental neurofibromatosis. *Arch Dermatol* 131:1465.
- Zlotogora J. 1993. Mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis: an hypothesis. *Am J Med Genet* 46:182–184.

Supp. Materials and Methods

Sample collection and DNA extraction

Different samples belonging to tissues derived from the three embryonic layers were acquired from the studied patient. Skin biopsy, buccal epithelium and hair roots were acquired for ectoderm representation, peripheral blood and saliva for mesoderm, and urine samples to obtain uroepithelial cells detached from the bladder were collected for endoderm representation. Genomic DNA was extracted by using the Gentra purogene kit (Qiagen) except for the saliva, which was extracted by using the Oragene DNA (Genotek), following the manufacturer's instructions.

Mutation has been named according to the Human Genome Variation Society guidelines (<http://www.hgvs.org>) and sequence variations checked by Mutalyzer – sequence variant nomenclature check V1.0.1. program (<http://www.LOVD.nl/mutalyzer/>). The first nucleotide of the first methionine codon is denoted position +1 according to the NF1 mRNA sequence RefSeq NM_000267.2. Exons are not named consecutively but according to the accepted nomenclature used by researchers in the NF1 field.

SNaPshot Analysis

SNaPshot is a primer extension method based on the addition of a single dye-labelled dideoxy nucleotide to primers localized adjacent to the nucleotide under examination [Kaminsky, et al., 2005; Uhlmann, et al., 2002]. Primer sequences flanking the *NF1* mutation present in intron 19a and flanking an intronic SNP on chromosome 5 (rs2075786) in the *hTERT* gene (human telomerase retrotranscriptase) were used, all primers are available upon request. Single nucleotide primer extension reaction was carried out with the SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Products were run in an ABI Prism 3130 DNA Sequencer and analyzed by GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). The degree of mosaicism was calculated using peak heights: Proportion of mutant allele A=A/(A+kG), where A was the peak height of the mutant allele, G the peak height of the wild type allele, and k was a constant given by the ratio of A/G in heterozygous control samples. Three independent replicates of all experiments were obtained and in every experiment controls were included.

Heterozygous control samples

Artificial heterozygous control samples were created in order to simulate a patient with the same mutation studied in a non-mosaic state to obtain the constant necessary to estimate the proportion of the mutant allele in all the studied DNA samples. PCR products were amplified from the heterozygous patient, with the primers amplifying the studied mutation, and cloned into PCR 2.1 TOPO by the TOPO TA CLONING kit (Invitrogen). Purified constructs were used as homozygous wild type and mutant plasmids. The genotype of the two constructed plasmids was confirmed by DNA sequencing.

X-chromosome inactivation assay

We performed the human androgen-receptor X-inactivation assay as previously described [Allen, et al., 1992]. Briefly, 100 ng of each female genomic DNA sample was digested either with the methylation-sensitive restriction enzyme *Hpa*II (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA) or incubated with 1× enzyme buffer only. Digestion was held for 16h at 37°C and was then terminated by incubating the reaction at 65°C for 20 min. From those reactions, one nanogram of each was then amplified by PCR with primers flanking the polymorphic androgen receptor CAG repeat. All reactions were performed at least in duplicate and primers are available upon request. PCR products were analyzed with ABI 3100 Genetics Analyzer (Applied Biosystems). The proportion of inactivation of the lower molecular weight allele (allele 1) was calculated using

the following formula, which normalizes occasional biases in allele amplification: Proportion $\frac{\text{allele}_1}{\text{allele}_1 + \text{allele}_2} = ((d1/u1)/(d1/u1+d2/u2)) \times 100$, where d1 and d2 represent the two peak heights from the digested samples and u1 and u2 are the corresponding peaks from the undigested samples. Results were averaged from two replicates of the experiment. By convention, mildly skewed XCI was defined by an allele ratio >80-20% and extremely skewed XCI was defined by an allele ratio >90-10% [Beever, et al., 2003; Kimani, et al., 2007].

Cell lines and cultures

For fibroblast isolation, skin was cut into small pieces and digested with 160 U/ml collagenase type 1 (Sigma, St. Louis, MO) and 0.8 U/ml dispase grade 1 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany [Serra, et al., 2001]. Fibroblasts were grown with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Invitrogen, Paisley, UK), 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Invitrogen), and penicillin/streptomycin (Gibco, Invitrogen) at 37°C and 5% CO₂.

RNA preparation, RT-PCR, and quantification of *NF1* expression

Total RNA was extracted by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's instructions after the addition of Puromycin (0.25mg/ml for 4h) to prevent the nonsense mRNA decay mechanism (NMD). Reverse-transcription reactions were performed with random hexamers and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were performed under the following conditions: 30 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 1 min after an initial denaturation of 3 min, and followed by a final extension of 8 min. Primer sequences used to amplify both wild-type transcripts and the different transcripts with cryptic exon inclusion are available upon request. PCR products were analyzed with the Agilent 2100 bioanalyzer with DNA 1000 LabChip kit series II (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Percentages of cryptic exon inclusion were obtained by taking the sum of concentration values (nmol/l) of the different fragments (wild-type and aberrantly spliced) as 100%.

Minigene constructs, transfection, and splicing analysis

The *NF1* minigene containing genomic sequence from exons 19a to 19b was created by cloning an amplified fragment of genomic *NF1* into pcDNA3.1-TOPO (Invitrogen), primers are available upon request. 293-HEK Cells were transfected with 1 µg of plasmid by the use of Lipofectamine (Invitrogen). After 24h, cells were harvested and RNA extracted using RNeasy kit (Qiagen). Semiquantitative amplification of spliced transcripts was carried out.

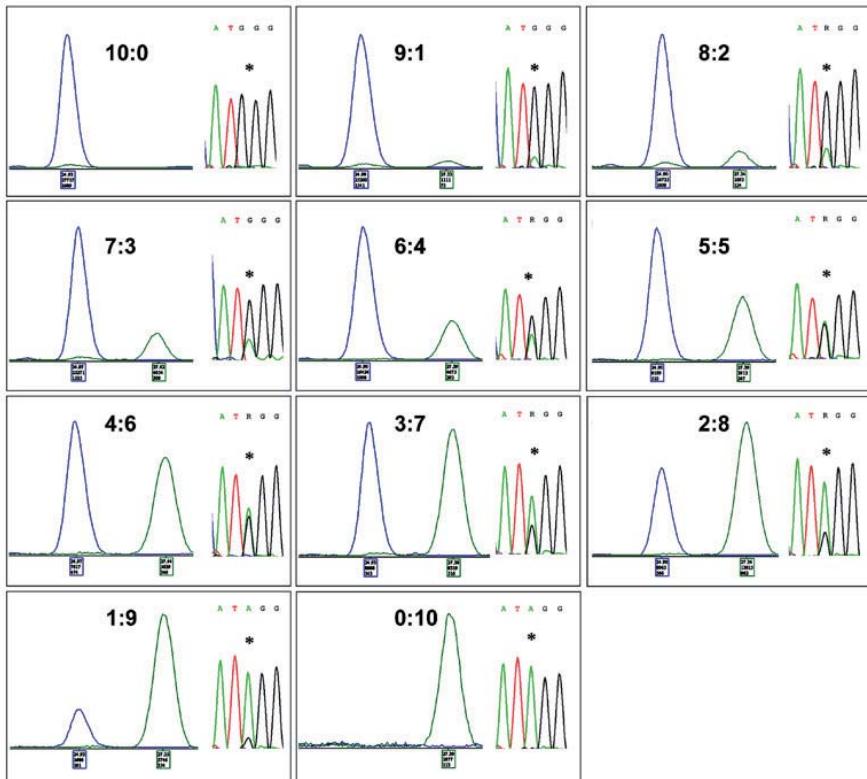
Morpholino oligomer design and treatment

The 25-mer AMOs were designed, synthesized, and purified by Gene Tools (Philomath, OR) and targeted the newly created aberrant acceptor splice site (AMO-IVS19a A) and the two different silent donor splice sites (AMO-IVS19a D1 and D2). Endo-Porter (GeneTools) was used to deliver AMOs into cells. AMO sequences are available upon request. In this work we also used an unspecific AMO to evaluate the specificity of our designed AMOs. This unspecific AMO is designed to block a donor splice site generated by a mutation in intron 3 of the *NF1* gene (c.288+2025T>G) [Pros, et al., 2009]. For fibroblast cell line treatment with AMOs, cells were seeded at 3x10⁵ cells/well, in a 6-well plate. The next day, culture medium was replaced by fresh 10% FBS/DMEM medium containing 20 µM of AMOs. Immediately afterwards, Endo-Porter was added and mixed well (6 mM).

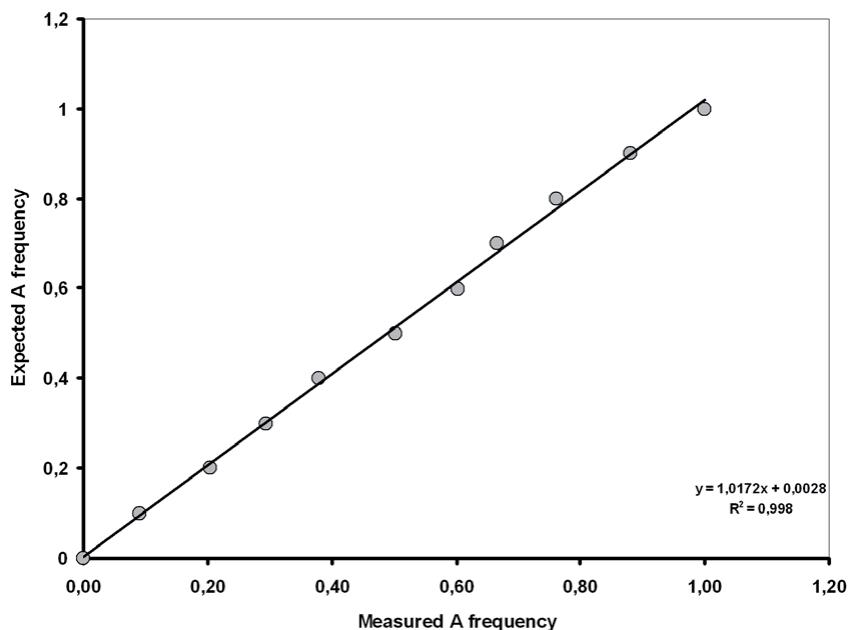
Ras-GTP assay and western blot of total Ras

The Ras activation assay kit (Upstate Biotech, Lake Placid, NY) was used according to the manufacturer's protocol. The assay uses affinity precipitation to isolate Ras-GTP from cell lysate. Fibroblast cell lysate (300 µg) was incubated with an agarose-bound Raf-1 RBD fusion

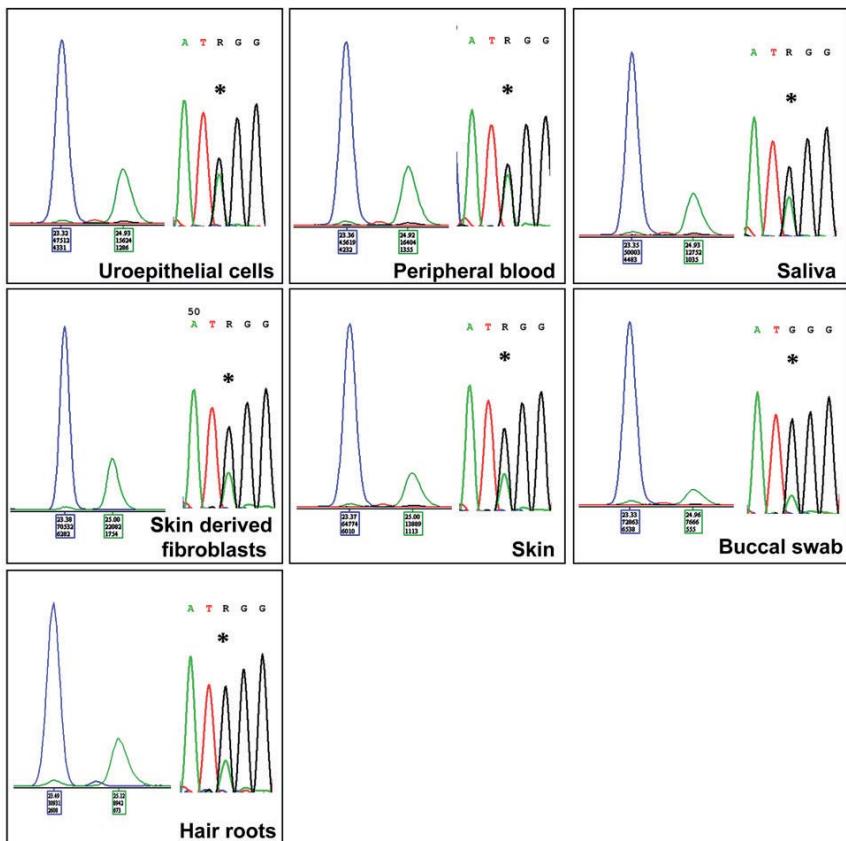
protein. Agarose beads were collected by pulsing in a microcentrifuge (5 sec at 14,000 rpm, 3g), washed with lysis buffer, and resuspended in Laemmli sample buffer. Cell lysates containing 5 µg of protein were prepared for Western blot analysis of total Ras. Samples from the Ras-GTP assay and total Ras analysis were then boiled for 5 min and loaded onto 12% SDS-PAGE polyacrylamide gels. Samples were electrophoresed and transferred (400 mA) to a nitrocellulose membrane (Hybond-C extra, GE-Healthcare). The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with primary antibody, anti-Ras clone RAS10 (1/300; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) (1 µg/ml). This was followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibody at room temperature for 1h. The blot was developed using the West Pico SuperSignal substrate (Pierce) for the total Ras analysis and Tubulin and West Femto SuperSignal for the Ras-GTP assay.



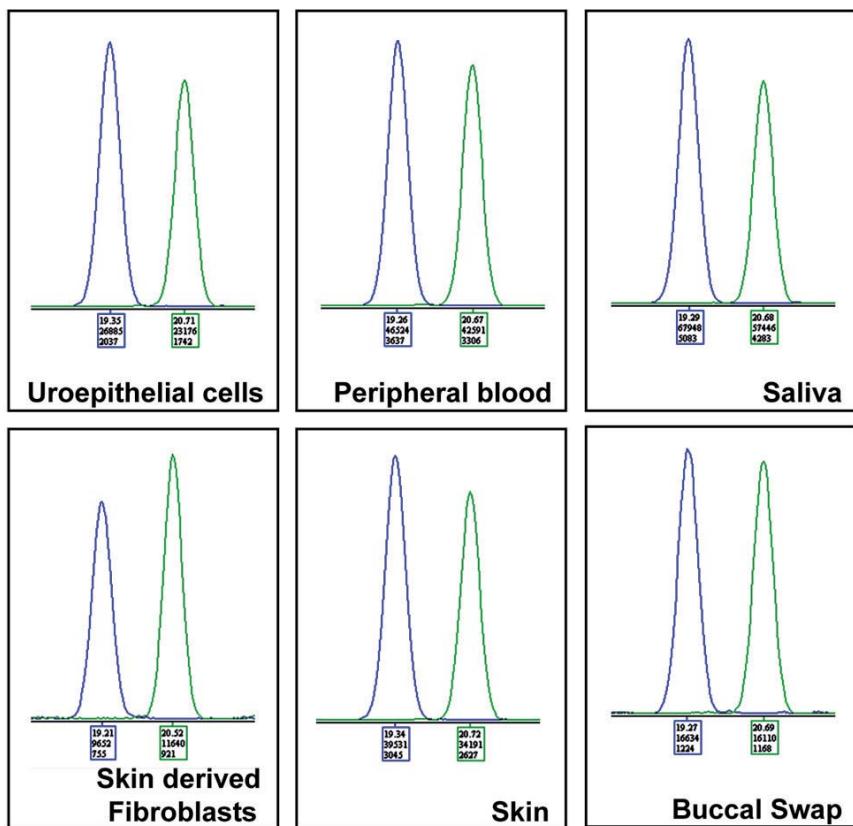
Supp. Figure S1. SNaPshot results from two different homozygous clones mixed to obtain different allele proportions. On the right of every SNaPshot graph the Sanger sequence is observed. The asterisk denotes the position of the mutation under examination. Numbers indicate the ratio between the wild type and mutant allele.



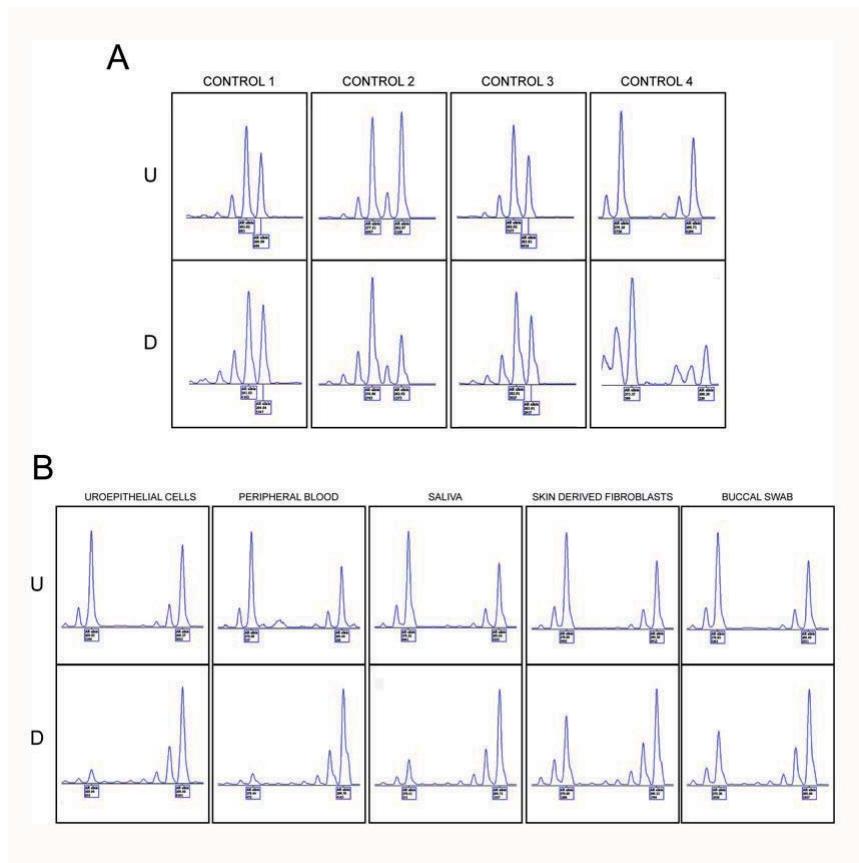
Supp. Figure S2. Regression analysis of SNaPshot analysis of c.3198-314G>A mutation after mixing two homozygous control cDNAs in different proportions. Allele proportions were calculated from the peak heights: Proportion of A allele= $A/(A+kG)$ where the correction factor k is determined from the mix simulating an allele proportion of 0.5 (5:5). The measured allele frequencies were plotted against the expected allele frequencies. A near linear relationship over the whole data is confirmed ($R^2=0.998$).



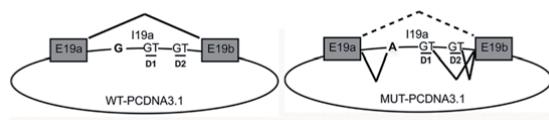
Supp. Figure S3. Results from SNaPShot analysis of c.3198-314G>A mutation in different samples. The asterisk denotes the position of the mutation under examination.



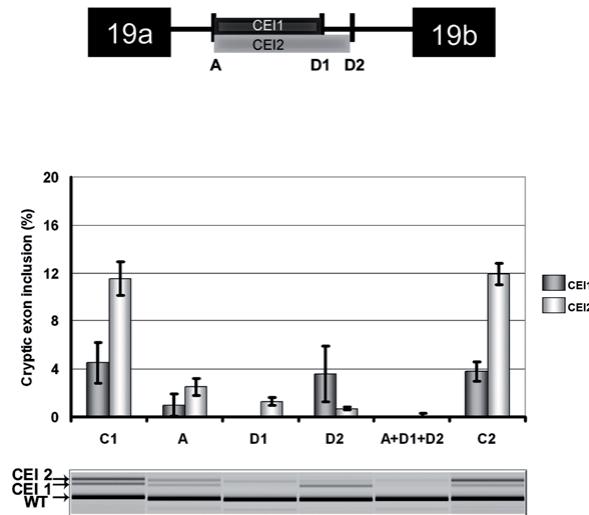
Supp. Figure S4. Results from SNaPShot analysis of rs 2075786 in different samples. The asterisk denotes the position under examination.



Supp. Figure S5. Results from X-Chromosome Inactivation (XCI) Assay. **A:** Analysis of the XCI pattern in blood from four different controls. **B:** Analysis of the XCI pattern in different samples of the studied patient. U: undigested, D: digested.



Supp. Figure S6. Schematic representation of the wild type and mutant minigenes and their corresponding splicing. Solid line corresponds to the expected splicing, and dashed line corresponds to the wild-type splicing from the mutant allele that we are assessing with this minigene analysis. E19a: Exon 19a, E19b: Exon 19b, I19a: Intron 19a, D1: Donor 1 cryptic splice site, D2: Donor 2 cryptic splice site.



Supp. Figure S7. Schematic representation of the three cryptic splice sites located deep inside intron 19a that allow the insertion of two aberrant transcripts: CEI1 and CEI2. And a graph showing the proportion of the two cryptic exon transcripts (CEI1 and CEI2); underneath the Agilent electrophoresis gel is shown.

Supp. Table S1. Description of the *NF1* deep intronic mutation at genomic, mRNA and protein levels

DNA Mutation	Intron	mRNA effect	Putative protein
c.3198-314G>A	19a	r.3197-3198ins3198-214-3198-312 r.3197-3198ins3198-245-3198-312	p.Asp1067TrpfsX7

Supp. Table S2. Summary of the predicted scores for the cryptic sites used by the identified mutation

DNA Mutation	3' splice-site (acceptor) sequences and scores					5' splice-site (donor) sequences and scores				
	Sequence	S&S	NN	ME	MM	Sequence	S&S	NN	ME	MM
c.3198-314G>A	(A) CAAATATTTCAAATCCAT AG GTG mut	84.57	0.95	9.05	8.41	(D1) AAG G TAGGCC	71.29	0.8	7.58	5.31
	CAAATATTTCAAATCCAT GG GTG wt	68.02	0	-22.81	-16.3	(D2) AAA G TAAAGT	87.84	0.99	9.72	8.51

Nucleotide introduced by mutation is in bold. Splice-site strength scores are obtained using the Shapiro and Senapathy (S&S) consensus splice-site weight matrix, neural network (NN) prediction, first-order Markov models (MM), and a maximum entropy (ME) model. A higher score indicates a greater probability of the resulting sequence being used as a splice site. **A**: Donor 1 splice site, **D1**: Donor 1 cryptic splice site, **D2**: Donor 2 cryptic splice site.

2. COMPREHENSIVE ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF ORTHOXENOGRAFT MOUSE MODELS OF MALIGNANT PERIPHERAL NERVE SHEATH TUMORS FOR PERSONALIZED MEDICINE

ARTICLE 2

Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine

Joan Castellsagué*, Bernat Gel*, Juana Fernández-Rodríguez*, Roger Llatjós, Yolanda Benavente, Ignacio Blanco, Diana Pérez-Sidelnikova, Javier García-del Muro, Joan Viñals, Rafael Valdés-Mas, Ernest Terribas, Adriana López-Doriga, Miguel Angel Pujana, Gabriel Capellá, XoseS. Puente, Eduard Serra, Alberto Villanueva i Conxi Lázaro.

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Article sotmès a publicació a *Embo Molecular Medicine*

Resum: En aquest article es van generar 5 models de ratolins xenògrafts ortotòpics derivats de 2 MPNST del mateix pacient NF1 (n=2), 2 casos esporàdics (n=2) i d'una línia cel·lular establerta a partir d'un tumor d'un pacient NF1 (línia S462). Els models ortotòpics generats van ser caracteritzats a diferents nivells, demostrant que recapitulaven les propietats histopatològiques i preservaven l'estat genòmic i transcriptòmic dels seus respectius tumors primaris. A més a més, es va veure, que els models de ratolí generats mimetitzaven les capacitats metastàsiques observades en humans. D'altra banda, també es va demostrar que l'estroma humà es reemplaçava ràpidament per estroma de ratolí després de la implantació dels tumors, la qual cosa va mostrar ésser molt útil per a la caracterització genòmica dels tumors.

Els resultats obtinguts en la caracterització genòmica mitjançant l'SNP array van mostrar com els MPNST contenen uns genomes molt alterats, que majoritàriament es mantenien estables un cop implantats al llarg dels diferents passatges en el model. L'anàlisi d'expressió va agrupar cada un dels tumors primaris amb els seus respectius ortoxenògrafts i també va diferenciar de forma molt clara els tumors esporàdics dels associats a la NF1. Els resultats obtinguts de la seqüenciació de l'exoma van mostrar que el nombre de mutacions adquirides en els tumors un cop implantats en el ratolí era molt baixa en tots els models. A més van evidenciar que la freqüència de mutacions en els MPNST esporàdics era un ordre de magnitud més elevada que en els derivats de pacients NF1, amb una representació més alta de substitucions C>T en els esporàdics.

Finalment, els 5 models ortoxenògrafts validats van ser utilitzats per provar l'eficàcia de diferents fàrmacs de manera independent i combinada. Aquests fàrmacs van ser el sorafenib (inhibidor de BRAF), la rapamicina (inhibidor de mTOR) i la doxorubicina (agent quimioteràpic convencional). El tractament amb sorafenib s'associa a una major reducció del creixement tumoral, tant quan s'administra sol com en combinació

amb els altres dos fàrmacs. Així mateix, l'administració intraperitoneal de la rapamicina va causar una reducció tumoral significativa en tots els models. D'altra banda els tractaments amb rapamicina administrada oralment i la seva combinació amb la doxorubicina, no van mostrar cap efecte en el creixement tumoral.

Com a conclusió global, el nostre treball demostra que el desenvolupament de models preclínics ben caracteritzats i estandarditzats per MPNST és una bona eina per a l'avaluació de noves estratègies terapèutiques en l'àmbit clínic. A més a més, els nostres resultats mostren que el sorafenib, especialment amb combinació amb altres fàrmacs, és un prometedor agent terapèutic pels MPNST.

COMPREHENSIVE ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF ORTHOXENOGRAFT MOUSE MODELS OF MALIGNANT PERIPHERAL NERVE SHEATH TUMORS FOR PERSONALIZED MEDICINE

Joan Castellsagué (1,2)*, Bernat Gel (3)*, Juana Fernández-Rodríguez (1,2)*, Roger Llatjós (4), Ignacio Blanco (1), Yolanda Benavente (5), Diana Pérez-Sidelníkova (7), Javier García-del Muro (6), Joan Maria Viñals (7), Rafael Valdés-Mas (8), Ernest Terribas (3), Adriana López-Doriga (1,2), Miguel Angel Pujana (2), Gabriel Capellá (1,2), Xose S. Puente (8), Eduard Serra (3), Alberto Villanueva (2,), Conxi Lázaro (1,2)

(1) Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology (ICO); (2) Translational Research Laboratory ICO-IDIBELL; (3) Institut de Medicina Predictiva i Personalitzada del Càncer (IMPPC); (4) Pathology Service, HUB-IDIBELL; (5) Unit of Infections and Cancer (UNIC), Cancer Epidemiology Research Program ICO-IDIBELL and CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP); (6) Plastic Surgery Service HUB-IDIBELL; (7) Medical Oncology Service ICO-IDIBELL; (8) Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Spain

* Joan Castellsagué, Bernat Gel and Juana Fernández-Rodríguez contributed equally to this work and share first authorship.

ABSTRACT

Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) are soft-tissue sarcomas that can arise either sporadically or in association with neurofibromatosis type 1 (NF1). These aggressive malignancies confer poor survival, with no effective therapy available. We present the generation of five patient-derived MPNST orthoxenograft models for pre-clinical testing. MPNST orthoxenografts recapitulate the histopathological properties and preserve the genomic and transcriptomic status of their parental primary tumors, mimicking distal dissemination properties. MPNSTs contained highly altered genomes that remained remarkably stable in orthoxenografts and along passages. Although preliminary, the results presented here point to clear differences between NF1-associated and sporadic MPNSTs. In accordance, mutation frequency in sporadic MPNSTs was an order of magnitude higher than in NF1-associated MPNSTs and unsupervised cluster analysis and principal component analysis using a MPNST signature perfectly divided the samples between NF1 and sporadic MPNST. Finally, sorafenib in combination with doxorubicin or rapamycin, was found to be the most effective treatment for reducing MPNST growth. The development of these models laid the foundations for evaluating novel therapeutic strategies in the clinical setting.

Keywords: MPNST, NF1, orthoxenograft, preclinical mouse models, sorafenib.

INTRODUCTION

Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) are common malignancies derived from the neural crest lineage arising from major peripheral nerves. MPNSTs account for 3-10% of all soft tissue sarcomas and are a highly aggressive histological subtype, with an incidence in the general population of 1 per 100,000 (Collin et al, 1987; Ducatman et al,

1986; Evans et al, 2002). Approximately half of MPNSTs develop in patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) while the other half develop sporadically (Carli et al, 2005; Evans et al, 2002; Ferner & Gutmann, 2002). In NF1 patients, these tumors commonly arise within a preexisting plexiform neurofibroma (Ducatman et al, 1986). NF1 is a common autosomal dominant tumor predisposition disorder occurring in 1 in 3,500 individual

world-wide (Carli et al, 2005). The lifetime risk of MPNST development in NF1 patients is around 8-13%, and these sarcomas are the leading cause of mortality and morbidity in adults with NF1 (Evans et al, 2002; Rasmussen et al, 2001). Due to the disease progression and metastatic potential, both sporadic and NF1-related MPNSTs are considered tumors of poor prognosis (Ferner & Gutmann, 2002; Porter et al, 2009).

The therapeutic approach for all MPNSTs comprises surgical excision followed by radiation and/or chemotherapy (Carli et al, 2005; Dilworth et al, 2006; Ducatman et al, 1986; Moretti et al, 2011; Porter et al, 2009). The five-year survival rate after MPNST diagnosis in a NF1 patient is 20-50%, with a higher survival rate in sporadic cases (Evans et al, 2002). Treatment failure is often associated with bone and lung metastases (Anghileri et al, 2006; Ducatman et al, 1986; Wong et al, 1998). Standard sarcoma chemotherapy regimens are indicated for the treatment of MPNST.

Different strategies have been developed to generate *in vivo* tumor models that may resemble human MPNSTs and could be used for the assessment of effective and standardized therapies. Subcutaneous and orthotopic xenograft MPNST models have been generated from both sporadic (Johansson et al, 2008; Lopez et al, 2011; Mahller et al, 2007) and NF1 tumors, from established cancer cell lines in all cases (Banerjee et al, 2010; Lopez et al, 2011; Perrin et al, 2007). To date, only one model has been derived from a primary MPNST, but this was subcutaneously engrafted (Bhola et al, 2010). A genetically engineered mouse model carrying linked germline mutations in *Nf1* and *Tp53* has also been developed and used in several drug trials (Cichowski et al, 1999; Vogel et al, 1999).

Several therapeutic approaches have been evaluated in pre-clinical models (Ambrosini et al, 2008; Demestre et al, 2010; Jessen et al, 2013; Johansson et al, 2008; Killion et al, 1998; Mahller et al, 2007; Ohishi et al, 2013), most of them aiming at targeting the RAS-MAPK signaling pathway (Basu et al, 1992; DeClue et al, 1992; Downward, 2003; Guha et al, 1996) that is expected to be over-activated upon *NF1* mutation (Guha et al, 1996; Sherman

et al, 2000). However, the results of these assays have been inconclusive or limited to certain models.

Here, we describe the establishment and comprehensive characterization of a library of orthotopic patient-derived xenograft MPNST models from sporadic and NF1 patients. Our results demonstrate that perpetuated orthotopic patient-derived tumor xenografts (PDTXs) closely resemble primary tumors and allow preclinical evaluation of personalized therapeutic approaches.

RESULTS

Development of orthoxenograft mouse models of MPNSTs

We generated five MPNST orthoxenograft mouse models: two from sporadic tumors, two from independent tumors of the same NF1 patient, and one corresponding to the engraftment of the MPNST cell line S462 (Figure 1 and Table I). None of the primary tumors received radiotherapy or chemotherapy prior to surgery. Human tumors (2-3 mm³) were grafted into the sciatic nerve of nude mice following the procedure outlined in Material and Methods.

Orthoxenograft mouse MPNST models closely resemble primary tumors

After the establishment and standardization of the orthoxenograft models, we performed an exhaustive histological and molecular characterization of MPNSTs and orthoxenografts, comparing each primary tumor to its corresponding orthoxenograft at passages 1 and 4.

Histological validation

Hematoxylin-eosin staining showed similar histopathological patterns between primary tumor and orthoxenograft at passages 1 and 4 (Figure 2A and Figure Table S1A). In addition, analysis of the soft-tissue tumor marker Vimentin showed positivity in all models, while three canonical non-nerve tumor markers (epithelial membrane antigen, desmin, and smooth muscle actin) were all negative (Table II and Figure 2B and Figure S1B). The endothelial marker CD34 was shown to be positive in two of the NF1 tumor models

(including the corresponding primary tumors) but negative for the rest of cases. S100, a neural differentiation marker that stains all benign Schwann cell tumors but only ~50% of MPNSTs (Khalifa et al, 2000), revealed positivity in all sporadic models but was negative for the NF1 tumors. As measured by Ki67 staining, the rate of tumor cell proliferation was similar for all cases (positivity 25-35%) with the exception of S462 cells, which showed a higher proliferation rate (~80%); similar results were observed using P53 (Table II, Figure 2B and Figure S1B).

To investigate distal dissemination properties, lung and liver from sacrificed mice were histologically analyzed for the presence of micrometastases. In one of the orthoxenograft models (MPNST-SP-001) few small lung synchronous metastases, but none liver metastases, were identified (Figure S2). A subgroup of orthotopically implanted mice (the two sporadic and MPNST-NF1-001) were kept alive for 4–6 months after tumor removal to investigate the dissemination capabilities in a longer time frame. Lung micrometastases were identified in 2 out of 3 orthoxenograft models (data not shown).

Human stroma is lost after engraftment and replaced by murine cells

Due to the importance of tumor microenvironment in tumor behavior and response to therapy, it was important to understand the nature of the stroma in the MPNST orthoxenografts generated. Thus, we next analyzed the fate of human non-tumor stroma cells after primary MPNST engraftment. The staining with anti-human CD34 clearly labeled vessels in primary tumors but not in orthoxenografts. By contrast, an antibody for the identification of mouse CD34 only labeled vessels in the orthoxenograft samples and not the patient's primary tumor (Figure 3C and Figure S3). In addition, when attempting to derive cell lines from first-passage MPNST orthoxenografts, a rapid overgrowth of murine fibroblasts was observed immediately after plating (data not shown), indicating the presence not only of murine vessels but also mouse stromal fibroblasts.

As both copies of the *NF1* gene are inactivated in NF1-associated MPNSTs, non-malignant

stroma cells can be identified as those carrying only the constitutional mutation but not bearing a second *NF1* hit. We analyzed the NF1 patient-derived MPNSTs (NF1-001 and NF1-002) for the presence of mutation c.350T>A (germline hit) and for the second *NF1* hit (LOH in both tumors). The sequence of the *NF1* region containing the constitutive mutation revealed WT *NF1* alleles in primary tumor samples, indicating the presence of normal human cells (Figure 3B). In contrast, WT *NF1* alleles were cleared out in the corresponding derived orthoxenografts, indicating probable loss of the human stroma cells (Figure 3B). We then analyzed SNP-array data from both tumors and corresponding xenografts, using ASCAT to estimate the percentage of normal cells present in both sample types. These results corroborated the loss of human stroma cells in orthoxenografts from the first engraftment (passage 1) (Figure 3A). Further analysis of SNP-array data from sporadic MPNSTs showed a similar pattern of stroma loss.

Molecular validation

In addition to a thorough histological validation of the developed MPNST orthoxenograft models, we performed extensive molecular characterization at the genomic and transcriptomic levels of primary tumors and orthoxenografts by SNP array, exome sequencing and expression array analyses.

Genomic copy number and allelic imbalance analysis

MPNSTs are characteristically composed by tumor cells containing highly altered genomes at a structural level (Beert et al, 2011; Forus et al, 1995; Mantripragada et al, 2009; Mantripragada et al, 2008; Mechtersheimer et al, 1999; Mertens et al, 2000; Mertens et al, 1995). Accordingly, we characterized the somatic copy-number alterations (SCNAs) and allelic imbalances (AIs) present in primary and paired orthoxenografts and performed an exhaustive comparison.

We first analyzed tumor MPNST-NF1-001 by comparing the primary tumor with the orthoxenografts at passages 1 and 4 from two lineages representing two independent engraftments (Figure 4). SNP-array data from

these five samples were analyzed using ASCAT. Comparison of the primary tumor with the four orthoxenografts allowed us to detect genomic alterations along xenograft passages, assessing the genomic stability of the engrafted tumor, and differences between two primary engrafted independent lineages, assessing the reproducibility of the orthoxenograft model. As expected, the genome of the primary MPNSTs and orthoxenografts was highly altered, mainly presenting gains of whole chromosomes or large chromosomal regions and a few losses of genetic material. In addition, B-allele frequency (BAF) plots showed several patterns consistent with complex rearrangements and large regions exhibiting LOH (Figure 4). A global view of the genomic alteration profiles showed a high degree of similarity between the primary tumor and the 4 derived orthoxenografts. In this case, due to the high proportion of non-altered stroma cells in the primary tumor sample, the raw data were strongly biased towards a diploid heterozygous genome, hence the analysis of SNP data from the primary tumor reported fewer alterations than in orthoxenografts. However, these differences were not present in the rest of the primary tumor vs. orthoxenograft comparisons, since the proportion of 2n cells in these tumors was lower (Figure S4). The comparison of BAF plots between primary tumor and orthoxenograft passages 1 and 4 was consistent with the progressive depletion of human 2n cells along passages. In addition, the analysis of multiple orthoxenograft passages revealed that this highly altered genome remained stable along successive xenograft passages (Figure S4). The differences in BAF between orthoxenografts at passage 1 and passage 4 that were not compatible with progressive stroma removal were interpreted as structural genomic changes caused by the successive engraftments (highlighted in Figure S4). Overall, comparative analysis of the primary tumor and the serial passages of the orthoxenograft models indicated that, on average, less than 7% of the orthoxenograft genome presented structural changes (copy number alterations and allelic imbalances) relative to the primary tumor.

Exome sequencing

Exome sequencing was used to characterize and compare genetic variation caused by point mutations in genomic coding regions present in the primary tumors and matched orthoxenograft MPNST models. The minimum coverage needed for reliable variant calling was set at 20x, and regions above this threshold (well covered regions, WCR) were identified in all samples related to the same primary tumor (primary related samples, PRS). The length of the different PRS-WCR ranged from 16.9Mb for MPNST-NF1-001-PRS to 44Mb for MPNST-SP-001-PRS. Only variants present in PRS-WCR were taken into account when comparing samples within each PRS.

The number of somatic mutations identified in PRS-WCR varied between PRSs and ranged from 22 in MPNST-NF1-002-PRS to 755 in MPNST-SP-001-PRS. When comparing tumors and xenograft pairs at passage 1, just after engraftment, a mean of ~9 (0-33) mutations were identified in orthoxenografts that were not present in primary tumors (Figure 5) (Table SI). New mutations were scattered over the genome and showed no apparent clustering except for three intronic mutations in the *TTN* gene. Of a total of 1409 somatic mutations identified in the four primary tumors, only 6 (3 in MPNST-NF1-002-OT1 and 3 in MPNST-NF1-001-OT4) were not detected in the orthotopic xenograft models and therefore classified as lost in the engraftment process (data not shown). Altogether, the low number of new and lost point mutations detected in the engrafted tumors with respect to their primary counterparts reinforces the fact that the orthotopic xenograft MPNSTs generated for this study recapitulate the characteristics of the primary tumors.

Expression analysis

Gene expression levels are influenced by different biological processes at the genomic and epigenomic levels. Thus, gene expression analysis can provide an integrative and more functional overview of the state of a tumor. Accordingly, expression array analysis was performed to validate the orthoxenograft models at the gene expression level. We observed a high global correlation between the normalized expression values for primary

tumors and orthoxenografts at passage 1 ($R^2 \sim 0.9$) and an even higher correlation between the values at passage 1 and passage 4 ($R^2 \sim 0.98$), which is consistent with the removal of stromal cells (Figure 6). We then analyzed a subset of ~1000 genes representing a molecular signature associated with NF1-peripheral nerve sheath tumors, differentiating benign tumors from malignant tumors and derived cell lines (Miller et al, 2009). Using this signature, the analysis reported an even closer correlation between orthoxenografts and the corresponding primary tumors ($R^2 \sim 0.95$); by contrast, using the same signature, lower correlation values were reported between distinct primary tumors ($R^2 \sim 0.78$) and between primary tumors and non-corresponding xenografts ($R^2 \sim 0.8$) (Figure 6A). Unsupervised clustering analysis organized all of the samples analyzed, with each primary tumor grouped together with the corresponding derived orthoxenografts at different passages (Figure 6B). Finally, PCA was performed using the gene expression levels of the molecular signature; primary tumors were perfectly grouped with their corresponding derived orthoxenografts (Figure 6C). At the same time, the first component separated NF1-associated MPNSTs and models from sporadic cases, while the second component separated primary tumors and orthoxenografts from the S462 cell line and its derived orthoxenograft.

Using pre-clinical orthoxenograft MPNST models to test drug treatment regimens

As the models were found to closely recapitulate the human disease at the histopathological, genomic and transcriptomic levels, they were used to test clinically relevant therapeutic approaches. The five models were treated with monotherapy or combined drug regimens, using: doxorubicin, a conventional chemotherapeutic agent; rapamycin, an allosteric mTOR inhibitor; and sorafenib, a BRAF inhibitor (Figure 7). Monotherapy with doxorubicin only showed a mild effect in one model, although in combination with rapamycin and with sorafenib it showed a slight synergistic effect, inhibiting tumor growth (Figure 7). Intraperitoneal administration of rapamycin caused significant tumor reduction in all models (Figure 7), whereas orally administrated rapamycin

showed no effect on tumor growth. Sorafenib treatment caused the greatest reduction of tumor growth relative to controls in all models, either alone or in combination with doxorubicin or rapamycin (Figure 7). Specifically, sorafenib plus doxorubicin was the most effective therapeutic regimen in all cases (Figure 7). Sorafenib plus rapamycin showed far more significant tumor reduction in NF1-related cases than in sporadic cases (Figure 7). Collectively, these therapeutic assays support the use of sorafenib to treat MPNSTs, although they also highlight the need for specific models to account for disease heterogeneity.

Overexpression of *ABCB5* and *ASNS* has been linked to resistance to doxorubicin in different tumor types (Cheung et al, 2011; Frank et al, 2005). Exome-sequencing analysis revealed three putative mutations in the *ABCB5* gene (a nonsense and two missense variants) and one in the *ASNS* gene (a splice site variant) (Table SI). The two variants with the clearest lost of function effect (the nonsense mutation in *ABCB5* and the splice site mutation in *ASNS*) were found in the same sporadic tumor (MPNST-SP-002). This tumor exhibited the best response to doxorubicin treatment, being potentially interesting for future pharmacogenetic studies.

Sporadic versus NF1-associated orthoxenograft mouse MPNST models

We developed four MPNST orthoxenograft models derived from primary tumors. Two of the primary tumors were independent MPNSTs from a single NF1 patient and the other two were sporadic MPNSTs from two unrelated patients. Although the number of models is still very limited, and results are potentially biased due to the two NF1-related primaries arising in the same patient, there were remarkable differences between the two groups at the molecular (point mutations, genome structure and gene expression) and histological levels.

The most striking differences were observed in the number and type of somatic point mutations. In order to remove any bias due to different coverage depths, we identified the regions with a read coverage of 20x or higher in all exome-sequenced samples and termed them All-Well Covered Regions (All-WCR).

The All-WCR contained a total of 16.76 Mb of exons and exon-intron boundaries. Only point mutations present in these regions were taken into account when comparing sporadic and NF1-related tumors. Thirty somatic point mutations were identified in MPNST-NF1-001 and 15 in MPNST-NF1-002. However, the number of somatic point mutations was an order of magnitude higher in sporadic MPNSTs: 308 in MPNST-SP-001 and 257 in MPNST-SP-002 (Figure 8A and Figure S5A). Consequently, the mutational frequency in common regions was 1.79 and 0.89 mutations per megabase for MPNST-NF1-001 and MPNST-NF1-002, respectively, and 18.38 and 15.33 mutations per megabase for MPNST-SP-001 and MPNST-SP-002, respectively.

Among the total number of somatic point mutations identified in the PRS-WCR, the frequency of different types of base changes also differed between sporadic and NF1-related tumors. While mutations in NF1-related tumors did not accumulate any particular base change, sporadic tumors were highly enriched in C>T mutations (Figure S5B), which represented 79.07% and 85.98% of the somatic mutations in MPNST-SP-001 and MPNST-SP-002, respectively. When we studied the mutation context of C>T mutations in the sporadic primary tumors MPNST-SP-001 and MPNST-SP-002 (Figure S5C), we observed an enrichment in TpC (56.78% and 57.48%) and a lower but significant enrichment in CpC (30.32% and 34.17%).

Differences between sporadic and NF1-related tumors were also observed at the level of structural genomic alterations. To overcome any bias produced by different proportions of 2n stromal cells in the primary tumors, we compared passage 1 orthotopic xenografts, in which the human stroma was strongly reduced (Figure S2). Both the sporadic and NF1-related tumors presented a highly altered genome with several copy-number alterations, ranging from 215 in MPNST-NF1-001 to 401 in MPNST-NF1-002, affecting the majority of the genome (from 71% in MPNST-NF1-001 to 84.9% in MPNST-SP-002). LOH was more frequent in the NF1 related tumors (38.3% and 61.2%) than in sporadic ones (3.8% and 24% respectively) (Figure S4).

Unsupervised hierarchical clustering of the expression profiles of primary tumors and derived orthoxenografts perfectly classified the samples in two groups: NF1-related (including the S462 cell line and derived xenograft) and sporadic cases (Figure 6B). This classification was obtained using both the molecular signature for NF1-related MPNSTs and the whole expression profile. In addition, the first component identified by PCA of the gene expression levels perfectly separated the sporadic tumors from NF1-related cases, grouping the S462 cell line with the NF1-related tumors (Figure 6C).

At the histological level, S100, a marker of neural differentiation, was positive in all sporadic models but negative for the NF1-related tumors (Table II).

Overall, while they remain preliminary, these results point to the existence of potential molecular differences between the two MPNST groups that could reflect either a different biological state or a different molecular origin.

Cell line *versus* primary tumor orthoxenograft models

In addition to the orthoxenograft models generated from primary MPNSTs, we also developed an orthoxenograft model from an established MPNST cell line (S462), following the same experimental procedures used for the other models. Histological characterization of the generated orthoxenograft showed that it retained the immunocytochemical marker characteristics of the original cell line, as well as reproducing the histological patterns of the NF1-associated orthoxenografts (Table II and Figure S1). At the molecular level, the number of point mutations and the expression pattern indicated a high degree of similarity between the cell line and the derived orthoxenografts (Figures 5 and 6). However, at structural genomic level, the number of differences between the S462 cell line and the orthoxenografts at passages 1 and 4 was greater than observed in the MPNST-derived models (Figure 8B and Figure S4). These differences were classified in two groups. The first group contained genomic changes identical to those identified in models generated from primary tumors; that is, differences between orthoxenograft passages 1 and 4, consistent

with structural genomic changes due to the successive engraftments (highlighted in yellow in Figure 8B). The percentage of genome affected by these changes was low and similar to that observed in the other models. The second group of differences corresponded to progressive changes along passages that were consistent with a selection process. We had previously observed a high diversity in the chromosomal content of S462 cells in culture by cytogenetic karyotyping (data not shown), and these progressive changes from primary tumor to passage 1 and passage 4 pointed to a clonal selection process, reducing the heterogeneity of the original cell culture (highlighted in magenta in Figure 8B).

DISCUSSION

MPNSTs are aggressive malignancies associated with poor survival and for which no effective therapy is available. We considered that establishing pre-clinical models was an step in the development of an experimental framework for more accurate, personalized testing of new therapeutic approaches. Our molecular understanding of cancer has been significantly expanded in recent years thanks to the development of large-scale cancer genome initiatives such as TCGA or ICGC (Hudson et al, 2010) aimed at identifying the genomic alterations that drive the oncogenic process. However, the development of novel therapeutic strategies is largely contingent on the availability of preclinical models capable of recapitulating the disease. Orthotopic PDTXs have proved to be excellent models for this purpose because they preserve the key influence of the tumor microenvironment, in contrast to *in vitro* cellular models or subcutaneous xenografts (Kopetz et al, 2012; Richmond & Su, 2008; Tentler et al, 2012). Histological analysis revealed an striking degree of concordance regarding histopathological and immunohistochemical patterns in the primary tumor-xenograft pairs. Human stroma was rapidly lost after MPNST engraftment and replaced by murine stroma, in agreement with other reports (DeRose et al, 2011; Hylander et al, 2013; Sanz et al, 2009; Xu et al, 1999), which greatly facilitated the genomic structural characterization of tumors, which is particularly crucial in the case of

primary tumors presenting large proportions of normal cells. The molecular analysis at the levels of genome and transcriptome also evidenced a high degree of similarity between primary MPNSTs and their corresponding orthoxenografts. Genomic characterization confirmed that MPNSTs bear highly altered genomes (Kresse et al, 2008; Mantripragada et al, 2009; Mechtersheimer et al, 1999): an average of 75.7% of the genome was found to exhibit copy-number alterations, with a high proportion of gains of whole chromosomes or large chromosomal regions and complex chromosomal rearrangements that would be compatible with an origin in a catastrophic event (Baca et al, 2013; Stephens et al, 2011; Zhang et al, 2013). This view was supported by the fact that the complex genome structures remained remarkably stable throughout the establishment of the orthoxenografts and along xenograft passages and did not reflect permanent genomic instability. In fact, on average, less than 7% of the genome structure showed copy-number alterations or allelic imbalance changes in primary tumor-xenograft pairs. Exome analysis also revealed little difference in coding region point mutations between primary tumors and paired orthoxenografts, with a mean of 10 mutations in xenografts that were not present in the primary tumor. We took an additional step in validating the orthoxenograft models by analyzing biological status at the level of gene expression. Transcriptomic analysis of ~1000 genes representing a molecular signature associated with MPNSTs and cell lines relative to normal Schwann cells and benign neurofibromas (Miller et al, 2009; Miller et al, 2006) showed a high correlation between primary tumors and paired orthoxenografts, even after several xenograft passages. All primary tumor-orthoxenograft pairs clustered together in an unsupervised cluster analysis and in a PCA, demonstrating the validity of the models.

The generation of an orthoxenograft using the NF1-related S462 MPNST cell line revealed differences in the engraftment process between the direct grafting of primary tumors at the sciatic nerve and the injection of cultured cell lines in the same site. Although the orthoxenograft generated from the S462 cell

line reproduced the histological patterns of the NF1-associated orthoxenografts, genomic analysis showed progressive changes along passages consistent with a cellular and genetic selection process of the high heterogeneity present in *in vitro* cell cultures, a process that was not observed in the engraftment of primary tumors.

It is generally assumed that sporadic and hereditary cancer sharing common inactivated pathways may be biologically similar although controversy is always present. Results presented here, although preliminary, point to clear differences in the development and biological state of NF1-associated and sporadic MPNSTs. Both MPNST types carried highly altered and rearranged genomes, but while NF1-associated MPNSTs seemed to have a higher degree of LOH than sporadic MPNSTs, the latter contained a number of point mutations an order of magnitude higher. Comparing mutation frequencies with those obtained across all cancer types (Lawrence et al, 2013; Watson et al, 2013), the NF1-associated MPNSTs (0.89-1.79 mutations per Mb) fall in the low range of somatic mutation frequency, whereas the sporadic MPNSTs (15.33-18.38) are in the highest frequency ranges. The high variation in mutation frequency within MPNSTs is also common in many other cancer types (Lawrence et al, 2013) and probably reflects current limitations on the classification of biological tumor properties. When analyzing the mutation spectra to identify signatures of carcinogenesis mechanisms, we identified a strong bias in sporadic MPNSTs towards a high frequency of C>T base substitutions, which is consistent with the action of APOBEC3 (Nik-Zainal et al, 2012; Stenglein et al, 2010; Taylor et al, 2013). The limited sequence data did not allow us to properly evaluate mutation clusters, so we do not know whether kataegis are present in sporadic MPNST samples. The differences between NF1 and sporadic MPNSTs went beyond genomic composition, mutation frequency or mutational signatures, since immunohistochemical characterization and gene expression analysis also revealed differences. Particularly significant results were obtained from the unsupervised cluster analysis and the PCA using a molecular signature of

~1000 genes associated with MPNSTs, which clearly separated the two MPNST types.

Finally, validated orthoxenograft MPNST models were used to test the effect of different drugs or drug combinations. The treatment experiments performed here demonstrated that the BRAF inhibitor sorafenib reduced MPNST growth. Sorafenib is clinically approved for the treatment of several cancer types such as kidney and liver cancer (Escudier et al, 2007; Llovet et al, 2008). At the preclinical level, good results have been reported in patients with advanced angiosarcomas or in mouse models of pancreatic islet cell tumors (Fendrich et al, 2012; Ray-Coquard et al, 2012). Sorafenib has been tested in MPNST cell lines *in vitro*, showing a significant inhibition of tumor growth, but little data is available for *in vivo* models (Ambrosini et al, 2008). Altogether these results strongly support the clinical evaluation of Sorafenib in this subset of patients. The antitumor activity of rapamycin and its analogues has been demonstrated in several *in vitro* studies with MPNST cell lines (Endo et al, 2012; Johansson et al, 2008; Zou et al, 2009) and in some clinical trials (Chan, 2004). Our results show that intraperitoneal rapamycin practically stopped tumor growth in almost all orthoxenografts. These results are consistent with other studies performed using patient-derived subcutaneous tumor xenografts (Bhola et al, 2010). However, oral rapamycin had no effect on tumor progression, in contrast to previous trials using subcutaneous xenografts derived from cell lines (Johansson et al, 2008). These results may illustrate the importance of the MPNST implantation site (subcutaneous or orthotopic) or reflect poor drug delivery to tumors by oral administration. Doxorubicin seemed to show a mild synergistic effect in combination with rapamycin and with sorafenib, although it has already been administered alone as a conventional chemotherapy regime in patients with MPNSTs with poor outcomes (Casali et al, 2008; Ferner & Gutmann, 2002). The most effective treatment in these pre-clinical models was sorafenib in combination with doxorubicin or rapamycin, which highlights the importance of combined drug therapy in achieving better therapeutic outcomes. Interestingly, the MPNST that showed the best response to

doxorubicin treatment contained loss-of-function mutations in both *ABCB5* and *ASNS* (MPNST-SP-002). The identification of mutations in these genes, involved in resistance to drug treatment, opens the possibility of combining inhibitors of these proteins with chemotherapeutic agents to improve drug response.

To summarize, we developed, validated at the histological and genomic levels and used five orthotopic patient-derived MPNST xenografts, which were found to be an excellent resource for pre-clinical investigation into this devastating tumor type. Our work points to differences in the engraftment processes of primary tumors compared to the engraftment of established cell lines. Although preliminary, the results also appear to reveal biological differences between sporadic and NF1-related MPNSTs in terms of genomic composition, mutation frequency and mutational signatures, immunohistochemical characterization and gene expression that could eventually be translated into different therapeutic strategies. Using the newly established and validated models, we obtained the best treatment response when using sorafenib in combination with rapamycin or doxorubicin. Genomic characterization will enable us to use these orthoxenograft MPNST models in pharmacogenomic analysis.

MATERIAL AND METHODS

Primary tumors and cell lines

4 fresh primary MPNSTs were identified and removed at the Sarcoma Clinical Unit (UFTOS) of Bellvitge Hospital (HUB) and the Catalan Institute of Oncology (ICO), both institutions located on the IDIBELL site. In the pathology laboratory, a piece of each tumor was stored immediately in culture medium before being sent to our molecular laboratory, where it was processed and preserved according to our conservation protocols for future genomic, functional and cellular analysis.

Animals

Six-week-old male nude Harlan mice weighing 18-22 g were used in this study. Animals were housed in a sterile environment, in cages with

autoclaved bedding, food and water. The mice were maintained on a daily 12-hr light, 12-hr dark cycle. All experiments with mice were approved by the IDIBELL Animal Care and Use Committee.

Human MPNST implantation and perpetuation

Fresh surgical specimens from 4 human MPNST were implanted in athymic mice (Figure 1). The donor tumors were minced into small fragments of 2-3 mm³ in size, and only macroscopically viable tumor tissue was implanted in the upper tight (orthotopic implantation, OT). Under isoflurane anesthesia, a subcutaneous pocket was made with surgical scissors. Then, a small incision was made in the muscle to display the sciatic nerve, where a piece of tumor was grafted. After implantation, tumor formation was checked weekly by palpation. Depending upon the intrinsic characteristics of the primary tumor or cell line, orthotopic tumors became apparent one-to-three months after engraftment. Once orthotopic tumors had reached a volume of 1000-1500 mm³, mice were sacrificed and tumors were passed to another animal. Each re-engraftment was considered a new passage. This process was repeated a minimum of 4 times to perpetuate the models. For each passage, part of the orthoxenograft tumor was cryo-preserved for future engraftments, and its viability after thawing was tested and demonstrated.

The S462 cell line was kindly provided by Dr. Nancy Ratner. To establish the orthoxenograft model from the S462 NF1-MPNST cell line, we injected 0.3 ml of the cell suspension (3×10^6 cells) with a needle directly in the upper thigh muscle.

A total of 17 samples were obtained and analyzed in different experiments: 4 primary MPNSTs, 1 cell line, 6 orthoxenografts in passage 1 and 6 orthoxenografts in passage 4. Details of all tumors and the cell line are provided in Table I.

Nucleic acid preparation

DNA

GentaPuragene Kit (Qiagen) was used for DNA isolation of frozen human and xenograft tumors, according to manufacturer's

recommendations, after homogenization using TissueLyser (QIAgen). DNA quality and quantity were assessed by visual inspection in an agarose gel and with NanoDrop and PicoGreen.

RNA

Total RNA was isolated from frozen samples using miRCURY RNA (Exiqon). RNA integrity number (RIN) was verified for each sample using a RNA Nano Chip Kit (Agilent Technologies, Germany) in Agilent Bioanalyzer 2100.

Immunohistochemistry analysis

Paraffin-embedded human primary and mouse orthoxenograft MPNST sections (3-5 μ m) were deparaffinized in xylene and gradually rehydrated. Endogenous peroxidases were blocked by incubation with hydrogen peroxide (H_2O_2 3%, for 20 minutes), and antigen retrieval was performed by heating tissue sections for 20 minutes in citrate buffer (pH=6 or pH=9 depending on the antibody manufacturer's protocol). Blocking was performed by incubation for 20 minutes with 10% horse serum. The primary antibodies vimentin (IR630, DAKO), Desmin (IR606, DAKO), Actin (M0851, DAKO), EMA (IR629, DAKO), CD34 (IR632, DAKO), S100 (IS504, DAKO), P53 (IR616, DAKO) and Ki-67 (M7240, DAKO) were incubated overnight at 4°C following the manufacturer's guidelines. Secondary HPRT conjugated antibody (Envision, DAKO, Denmark) was incubated at room temperature for 30 minutes. Finally, development was performed by incubation with diaminobenzidine (DAB) (DAKO, Denmark) for 10 minutes. Nuclei were counterstained with Hematoxylin. For stroma analysis, primary antibodies rat anti-mouse CD34 (Abcam 8158, 1:100 dilution) and mouse anti-human CD34 (Abcam 8536, 1:100 dilution) were incubated overnight at 4°C. Secondary HPRT anti-mouse conjugated antibody (Envision, DAKO, Denmark) or biotinylated anti-rat (Daki, Denmark; 1:200 dilution) were incubated at room temperature for 60 minutes.

SNP array analysis

SNP array analysis was performed on all 17 samples using Beadchip technology from Illumina, but with different chips depending on

availability at the time of the analysis. In particular, 2 samples were analyzed using Illumina Human660W-Quad chip (655246 SNPs), 6 samples using Illumina HumanOmniExpress v1 (730525 SNPs), and 9 samples using Illumina HumanOmni1S (1185076 SNPs). In all cases raw data were processed with Illumina Genome Studio v2009 with the Genotyping module v1.1.9 to extract B-allele frequency (BAF) and log R ratio (LRR) values for each SNP.

SNP array data were analyzed using the R package ASCAT (Van Loo et al, 2010) to obtain loss-of-heterozygosity (LOH) and allele specific copy number (CN) profiles from the BAF and LRR values. All samples were analyzed independently and treated as unpaired samples, using the germline genotype prediction functionality from ASCAT. In short, after loading BAF and LRR data, the germline genotype parameters were estimated and the data were segmented using the ASPCF algorithm. Next, ASCAT computed the most likely combination of CN states, total ploidy and percentage of aberrant cells. Circular genomic plots were created using Circos (Krywinski et al, 2009).

Exome sequencing

Exome sequence capture and amplification was performed using Agilent SureSelect Human All Exon kit (Agilent, Santa Clara, CA, US) according to the manufacturer's instructions. Paired-end sequencing was performed on a HiSeq2000 instrument (Illumina) using 76-base reads. Reads were aligned to the reference genome (GRCh37) and a BAM file was generated using SAMtools. PCR duplicates were removed using SAMtools and custom scripts, and single-nucleotide variant calling was performed using a combination of SAMtools and Sidrón as described previously (Puente et al, 2011). For orthoxenograft-derived samples, reads were first aligned to mouse genome (mm9), and those read-pairs which did not align to mouse were then aligned to the human genome following the same pipeline as above. This procedure removed murine-derived reads, which might interfere in the analysis by artificially increasing the number of variants. However, this could lead to the removal of certain human genes with a very

high DNA sequence identity to mouse DNA and caused some true changes to be overlooked. Only mismatch variants were taken into account and small insertions and deletions were not counted. Common variants, defined as those present in dbSNP135 with a minor allele frequency >1%, were filtered out. For all variants identified in primary tumors and in the orthoxenografts, BAM read count was used to check if they were supported by a read in the other related samples; variants were considered to be present if there was at least one read with a quality over 20. These data were used to identify somatic mutations as well as gained mutations (variants presents in the xenograft but not found in the primary tumor) and lost mutations (variants identified in the primary tumor but not detected in the xenograft). Analysis of the genomic context of the C>T variants was performed using R and Bioconductor.

Expression microarray analysis

Gene expression profiles were determined using Affymetrix Human Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) following standard protocols. Expression data were analyzed using R version 3.0.2 (Dean & Nielsen, 2007) and the Bioconductor (Gentleman et al, 2004) package Affy (Gautier et al, 2004). Raw CEL files were normalized with RMA and the normalized expression values extracted. Samples were compared at the level of normalized expression values using the Pearson correlation coefficient to quantify the changes between primary tumors and the derived orthoxenografts. Expression profiles were classified using a hierarchical clustering approach with Euclidean distance and average as agglomeration method. Heatmaps represent the Pearson correlation between pairs of samples and were drawn using the gplots library.

Drug treatment

Mice bearing MPNST orthoxenografts were randomly distributed into different treatment groups when tumors reached a homogeneous size of 2500-3000 mm³ (n=7-10/group). Seven treatment regimens were tested: doxorubicin, rapamycin (intraperitoneal and oral), sorafenib, and their combinations. Drugs were administered as follows: mice were given an

intraperitoneal injection of doxorubicin (8 mg/kg) only once, at the beginning of the treatment; a daily oral or intraperitoneal dose of rapamycin (6 mg/kg); a daily oral gavage dose of sorafenib (60 mg/kg). Rapamycin was obtained from Novartis Pharmaceuticals Corporation (East Hanover, NJ). Rapamycin was administered in a microemulsion solvent composed of 50% olive oil for the oral dosage and was diluted in 10% DMSO; for the intraperitoneal dosage it was diluted in 0.5% w/v carboxyl methylcellulose (Sigma) (Johansson et al, 2008). Sorafenib was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA) and was dissolved in 50% cremophor EL (Sigma, St. Louis, MO) – 50% ethanol. The mixture was vortexed for 30-60 minutes to dissolve sorafenib and then dissolved in 75% water immediately prior to oral gavage (Wu et al, 2011). At sacrifice, tumors were dissected out, measured and weighed. Representative fragments were both frozen in liquid nitrogen and fixed and paraffin embedded.

Overall treatment time varied slightly between experiments (12-25 days), according to the intrinsic differences in tumor growth, and was always marked by the tumor size in the matching control group.

After treatment initiation, tumors were measured every 2-3 days and tumor volume was calculated using the formula $v=(w^2l/2)$, where l is the longest diameter and w the width. Changes in tumor volume were quantified as the log₂ ratio between observed and baseline volume. The rate of change in volume across different treatment categories was modeled using linear mixed models (LMM). The interaction between follow-up time (in days) and treatment was used to assess the effect of each treatment in terms of volume change and compared to the control group. In order to address the problem of multiple comparisons, p values were adjusted by Bonferroni correction. All tests were two-sided and significance level was set at 0.05. Analyses were also repeated after exclusion of mice that died during follow-up, with no appreciable impact on results (data not shown). The analyses were performed using Stata v10 (StataCorp LP, College Station, Texas).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all patients who generously donated a tumor sample to generate the mouse models developed in the present study. The authors would like to particularly acknowledge the Asociación de Afectados de Neurofibromatosis (Spain) and the Asociación Española contra el Cáncer (AECC), which recognizes our group as a one of the Grupos Estables de Investigación Oncológica 2010. Contract grant sponsor: Spanish Health Research Fund; Carlos III Health Institute; RTICC, CIBERESP and the Catalan Health Institute and Autonomous Government of Catalonia. Contract grant numbers: RD06/0020/1051, RD06/0020/1050, RD12/0036/0008, RD12/0036/0031, PI10/01422, PI10-0222, PI11/01609, PI12/01528, PI13/00285, PIE13/00022, PI13-01339 and SAF2010-21165, SAF2013-45836-R, 2009SGR283, SGR290, SGR1465.

Author contributions

CL, ES, AV, GC and IB conceived the idea; CL, ES, JC, MAP and JF-R wrote the paper; JC and JF-R performed most of the experiments of the paper; JC and AV performed mouse experiments; XP, BG, JF-R, ET, RV-M, MAP and JC performed the EXOME experiments; XP, BG, AL-D and JF-R performed the bioinformatics analysis; YB performed statistical analysis; RLL performed the pathology; DP-S, JG-M and JV provided solid tumor samples.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

The Paper Explained

PROBLEM: Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) are aggressive soft-tissue sarcomas with poor survival and no effective therapy available. In 50% of cases, they occur in the context of neurofibromatosis type I, the remainder arise sporadically. *In vivo* tumor models of MPNST available so far are limited to models derived from established cancer cell lines. *In vivo* tumor models that may resemble human MPNSTs and could be used for the

assessment of effective and standardized therapies are needed.

RESULTS: We generated 5 MPNST orthoxenograft mouse models that were exhaustively characterized by histopathological analyses, SNP-array, exome sequencing and expression array analyses. We demonstrated that all orthoxenografts models recapitulate all features of their parental primary tumors and proved that they are excellent preclinical models for drug treatment trials. Moreover, the study of these models showed possible differences between sporadic and NF1 tumors. Finally, the therapeutic assays with sorafenib caused a great reduction of tumor growth in all models supporting their use to treat patients affected with MPNSTs.

IMPACT: Our work constitutes the creation of the first patient-derived MPNST orthoxenograft model resource available for pre-clinical testing. Moreover, results obtained strongly support the clinical use of sorafenib in these patients.

REFERENCES

- Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, Teed A, Sambol EB, Singer S, Schwartz GK (2008) Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells. *Mol Cancer Ther* 7: 890-896
- Anghileri M, Miceli R, Fiore M, Mariani L, Ferrari A, Mussi C, Lozza L, Collini P, Olmi P, Casali PG et al (2006) Malignant peripheral nerve sheath tumors: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Cancer* 107: 1065-1074
- Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M et al Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 153: 666-677
- Banerjee S, Byrd JN, Gianino SM, Harpstite SE, Rodriguez FJ, Tuskan RG, Reilly KM, Piwnica-Worms DR, Gutmann DH The neurofibromatosis type 1 tumor suppressor controls cell growth by regulating signal transducer and activator of transcription-3 activity in vitro and in vivo. *Cancer research* 70: 1356-1366
- Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J (1992) Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1

- neurofibromatosis patients [see comments]. *Nature* 356: 713-715
- Beert E, Brems H, Daniels B, De Wever I, Van Calenbergh F, Schoenaers J, Debiec-Rychter M, Gevaert O, De Raedt T, Van Den Brue A et al Atypical neurofibromas in neurofibromatosis type 1 are premalignant tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 50: 1021-1032
- Bhola P, Banerjee S, Mukherjee J, Balasubramanian A, Arun V, Karim Z, Burrell K, Croul S, Gutmann DH, Guha A Preclinical in vivo evaluation of rapamycin in human malignant peripheral nerve sheath explant xenograft. *International journal of cancer* 126: 563-571
- Carli M, Ferrari A, Mattke A, Zanetti I, Casanova M, Bisogno G, Cecchetto G, Alaggio R, De Sio L, Koscielniak E et al (2005) Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: the Italian and German soft tissue sarcoma cooperative group. *J Clin Oncol* 23: 8422-8430
- Casali PG, Jost L, Sleijfer S, Verweij J, Blay JY (2008) Soft tissue sarcomas: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19 Suppl 2: ii89-93
- Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* 286: 2172-2176
- Collin C, Godbold J, Hajdu S, Brennan M (1987) Localized extremity soft tissue sarcoma: an analysis of factors affecting survival. *J Clin Oncol* 5: 601-612
- Chan S (2004) Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *British journal of cancer* 91: 1420-1424
- Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, Fan ST Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC)B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 140: 344-355
- Dean CB, Nielsen JD (2007) Generalized linear mixed models: a review and some extensions. *Lifetime data analysis* 13: 497-512
- DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR (1992) Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* 69: 265-273
- DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT, Factor R, Matsen C, Milash BA, Nelson E et al Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature medicine* 17: 1514-1520
- Dilworth JT, Kraniak JM, Wojtkowiak JW, Gibbs RA, Borch RF, Tainsky MA, Reiners JJ, Jr., Mattingly RR (2006) Molecular targets for emerging anti-tumor therapies for neurofibromatosis type 1. *Biochem Pharmacol* 72: 1485-1492
- Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews* 3: 11-22
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piegras DG, Reiman HM, Ilstrup DM (1986) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer* 57: 2006-2021
- Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, Iida K, Matsumoto Y, Hakozaki M, Aoki M et al Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 19: 450-461
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylak C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA et al (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 356: 125-134
- Evans DG, Baser ME, McGaughan J, Sharif S, Howard E, Moran A (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 39: 311-314
- Fendrich V, Maschuw K, Rehm J, Buchholz M, Holler JP, Slater EP, Bartsch DK, Waldmann J Sorafenib inhibits tumor growth and improves survival in a transgenic mouse model of pancreatic islet cell tumors. *ScientificWorldJournal* 2012: 529151
- Ferner RE, Gutmann DH (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer research* 62: 1573-1577
- Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21-q22 in soft tissue sarcomas. *Genes, chromosomes & cancer* 14: 8-14
- Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH (2005) ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer research* 65: 4320-4333
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA (2004) affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)* 20: 307-315

- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J et al (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5: R80
- Guha A, Lau N, Huvar I, Gutmann D, Provias J, Pawson T, Boss G (1996) Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 12: 507-513
- Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabe RR, Bhan MK, Calvo F, Eerola I, Gerhard DS et al (2010) International network of cancer genome projects. *Nature* 464: 993-998
- Hylander BL, Punt N, Tang H, Hillman J, Vaughan M, Bshara W, Pitomiak R, Repasky EA Origin of the vasculature supporting growth of primary patient tumor xenografts. *Journal of translational medicine* 11: 110
- Jessen WJ, Miller SJ, Jousma E, Wu J, Rizvi TA, Brundage ME, Eaves D, Widemann B, Kim MO, Dombi E et al MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. *The Journal of clinical investigation* 123: 340-347
- Johansson G, Mahller YY, Collins MH, Kim MO, Nobukuni T, Perentesis J, Cripe TP, Lane HA, Kozma SC, Thomas G et al (2008) Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mol Cancer Ther* 7: 1237-1245
- Khalifa MA, Montgomery EA, Ismiil N, Azumi N (2000) What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *Am J Clin Pathol* 114: 123-126
- Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ (1998) Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17: 279-284
- Kopetz S, Lemos R, Powis G The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clin Cancer Res* 18: 5160-5162
- Kresse SH, Skarn M, Ohnstad HO, Namlos HM, Bjørkegågen B, Myklebost O, Meza-Zepeda LA (2008) DNA copy number changes in high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors by array CGH. *Molecular cancer* 7: 48
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research* 19: 1639-1645
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA et al Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214-218
- Lopez G, Torres K, Liu J, Hernandez B, Young E, Belousov R, Bolshakov S, Lazar AJ, Slopis JM, McCutcheon IE et al Autophagic survival in resistance to histone deacetylase inhibitors: novel strategies to treat malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer research* 71: 185-196
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 359: 378-390
- Mahller YY, Vaikunth SS, Currier MA, Miller SJ, Ripberger MC, Hsu YH, Mehrian-Shai R, Collins MH, Crombleholme TM, Ratner N et al (2007) Oncolytic HSV and erlotinib inhibit tumor growth and angiogenesis in a novel malignant peripheral nerve sheath tumor xenograft model. *Mol Ther* 15: 279-286
- Mantripragada KK, Diaz de Stahl T, Patridge C, Menzel U, Andersson R, Chuzhanova N, Kluwe L, Guha A, Mautner V, Dumanski JP et al (2009) Genome-wide high-resolution analysis of DNA copy number alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors using 32K BAC array. *Genes, chromosomes & cancer* 48: 897-907
- Mantripragada KK, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Ferner RE, Frayling IM, Dumanski JP, Guha A, Mautner V, Upadhyaya M (2008) High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 14: 1015-1024
- Mechtersheimer G, Otano-Joos M, Ohl S, Benner A, Lehnert T, Willeke F, Moller P, Otto HF, Lichter P, Joos S (1999) Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer* 25: 362-369
- Mertens F, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, Mandahl N, Mitelman F, Rosai J, Rydholm A, Sciot R, Tallini G et al (2000) Cytogenetic characterization of peripheral nerve sheath tumours: a report of the CHAMP study group. *J Pathol* 190: 31-38
- Mertens F, Rydholm A, Bauer HF, Limon J, Nedoszytko B, Szadowska A, Willen H, Heim S, Mitelman F, Mandahl N (1995) Cytogenetic findings

- in malignant peripheral nerve sheath tumors. International journal of cancer 61: 793-798
- Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, Jegga AG, Li H, Upadhyaya M, Giovannini M et al (2009) Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. EMBO molecular medicine 1: 236-248
- Miller SJ, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, Kaiser S, Aronow BJ, Frahm S, Kluwe L et al (2006) Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. Cancer research 66: 2584-2591
- Moretti VM, Crawford EA, Staddon AP, Lackman RD, Ogilvie CM Early outcomes for malignant peripheral nerve sheath tumor treated with chemotherapy. American journal of clinical oncology 34: 417-421
- Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, Jones D, Hinton J, Marshall J, Stebbings LA et al Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. Cell 149: 979-993
- Ohishi J, Aoki M, Nabeshima K, Suzumiya J, Takeuchi T, Ogose A, Hakozaki M, Yamashita Y, Iwasaki H Imatinib mesylate inhibits cell growth of malignant peripheral nerve sheath tumors in vitro and in vivo through suppression of PDGFR-beta. BMC cancer 13: 224
- Perrin GQ, Li H, Fishbein L, Thomson SA, Hwang MS, Scarborough MT, Yachnis AT, Wallace MR, Mareci TH, Muir D (2007) An orthotopic xenograft model of intraneural NF1 MPNST suggests a potential association between steroid hormones and tumor cell proliferation. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 87: 1092-1102
- Porter DE, Prasad V, Foster L, Dall GF, Birch R, Grimer RJ (2009) Survival in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours: A Comparison between Sporadic and Neurofibromatosis Type 1-Associated Tumours. Sarcoma 2009: 756395
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M et al Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature 475: 101-105
- Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. Am J Hum Genet 68: 1110-1118
- Ray-Coquard I, Italiano A, Bompas E, Le Cesne A, Robin YM, Chevreau C, Bay JO, Bousquet G, Piperno-Neumann S, Isambert N et al Sorafenib for patients with advanced angiosarcoma: a phase II Trial from the French Sarcoma Group (GSF/GETO). Oncologist 17: 260-266
- Richmond A, Su Y (2008) Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. Disease models & mechanisms 1: 78-82
- Sanz L, Cuesta AM, Salas C, Corbacho C, Bellas C, Alvarez-Vallina L (2009) Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 89: 91-97
- Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N (2000) Single cell ras-GTP analysis reveals altered ras activity in a subpopulation of neurofibroma schwann cells but not fibroblasts [In Process Citation]. J Biol Chem 275: 30740-30745
- Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. Nature structural & molecular biology 17: 222-229
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA et al Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell 144: 27-40
- Taylor BJ, Nik-Zainal S, Wu YL, Stebbings LA, Raine K, Campbell PJ, Rada C, Stratton MR, Neuberger MS DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. eLife 2: e00534
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nat Rev Clin Oncol 9: 338-350
- Van Loo P, Nordgard SH, Lingjaerde OC, Russnes HG, Rye IH, Sun W, Weigman VJ, Marynen P, Zetterberg A, Naume B et al (2010) Allele-specific copy number analysis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 16910-16915
- Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF (1999) Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. Science 286: 2176-2179
- Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L Emerging patterns of somatic mutations in cancer. Nat Rev Genet 14: 703-718

Wong WW, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE, Gunderson LL (1998) Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. International journal of radiation oncology, biology, physics 42: 351-360

Wu J, Dombi E, Jousma E, Scott Dunn R, Lindquist D, Schnell BM, Kim MO, Kim A, Widemann BC, Cripe TP et al Preclinical testing of sorafenib and RAD001 in the Nf(flox/flox) ;DhhCre mouse model of plexiform neurofibroma using magnetic resonance imaging. Pediatr Blood Cancer 58: 173-180

Xu Y, Silver DF, Yang NP, Oflazoglu E, Hempling RE, Piver MS, Repasky EA (1999) Characterization

of human ovarian carcinomas in a SCID mouse model. Gynecologic oncology 72: 161-170

Zhang CZ, Leibowitz ML, Pellman D Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. Genes & development 27: 2513-2530

Zou CY, Smith KD, Zhu QS, Liu J, McCutcheon IE, Slopis JM, Meric-Bernstam F, Peng Z, Bornmann WG, Mills GB et al (2009) Dual targeting of AKT and mammalian target of rapamycin: A potential therapeutic approach for malignant peripheral nerve sheath tumor. Mol Cancer Ther 8: 1157-1168

FIGURE LEGENDS

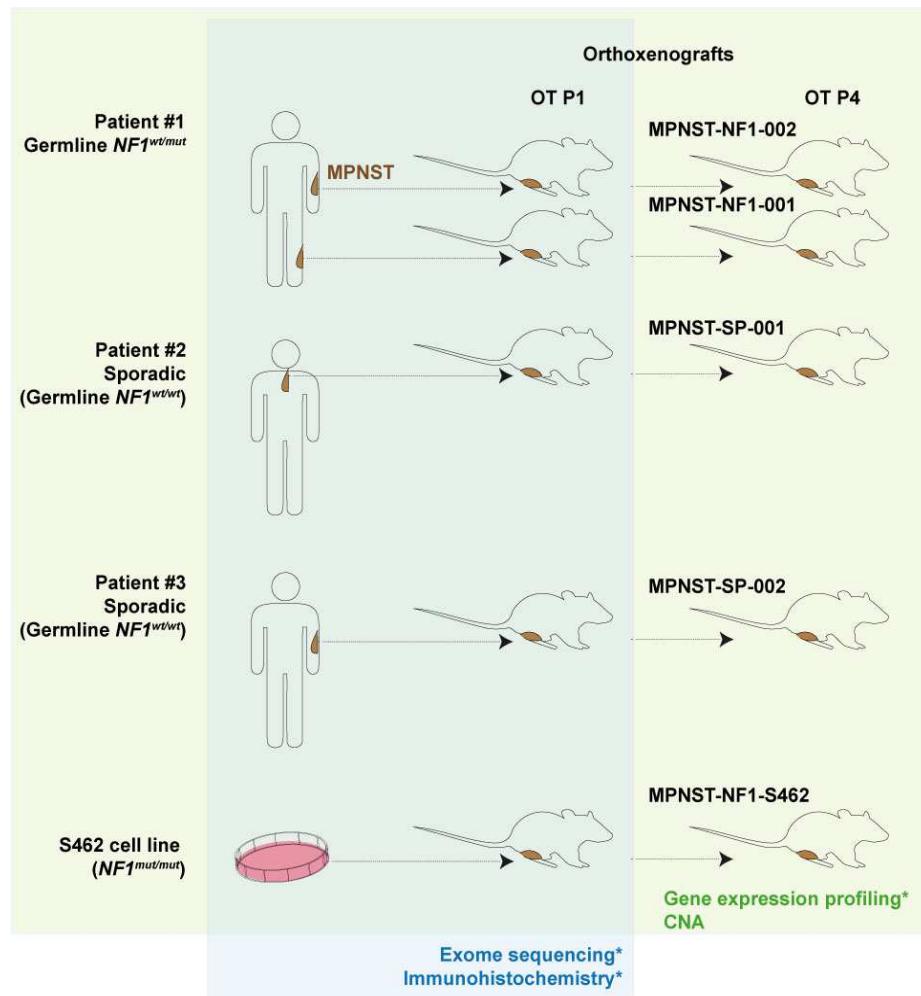
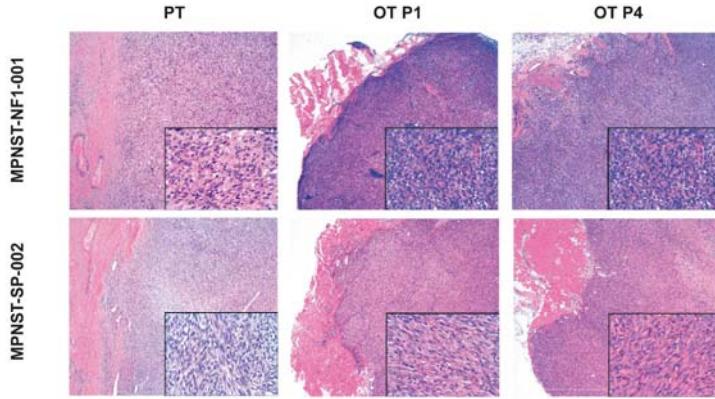


Figure 1. Development of orthoxenograft mouse models of MPNSTs

Five orthotopic xenograft mice models were established from different MPNSTs and one cell line. Two of the MPNSTs come from the same NF1 patient, two are sporadic cases. 2-3 mm³ of the primary tumor and the tumor cell line (3×10^6 cells) were grafted or injected in the leg of athymic nude mice, close to the sciatic nerve. Tumors were perpetuated along several passages and subsequently expanded. Several assays were performed on tumors in early passages (histopathological analysis, gene expression profiling, genomic profiling and drug efficacy studies).

*NF1-MPNST-001 at passage 4 and all primary tumors (PT) and orthotopic tumors (OT) at passage 1 were analysed by exome sequencing and immunohistochemistry. All primary tumors and orthotopic tumors at passages 1 and 4 were analysed by expression array (except NF1-MPNST-001 PT, SP-MPNST-001 OT P4 and NF1-S462 OT P4).

A



B

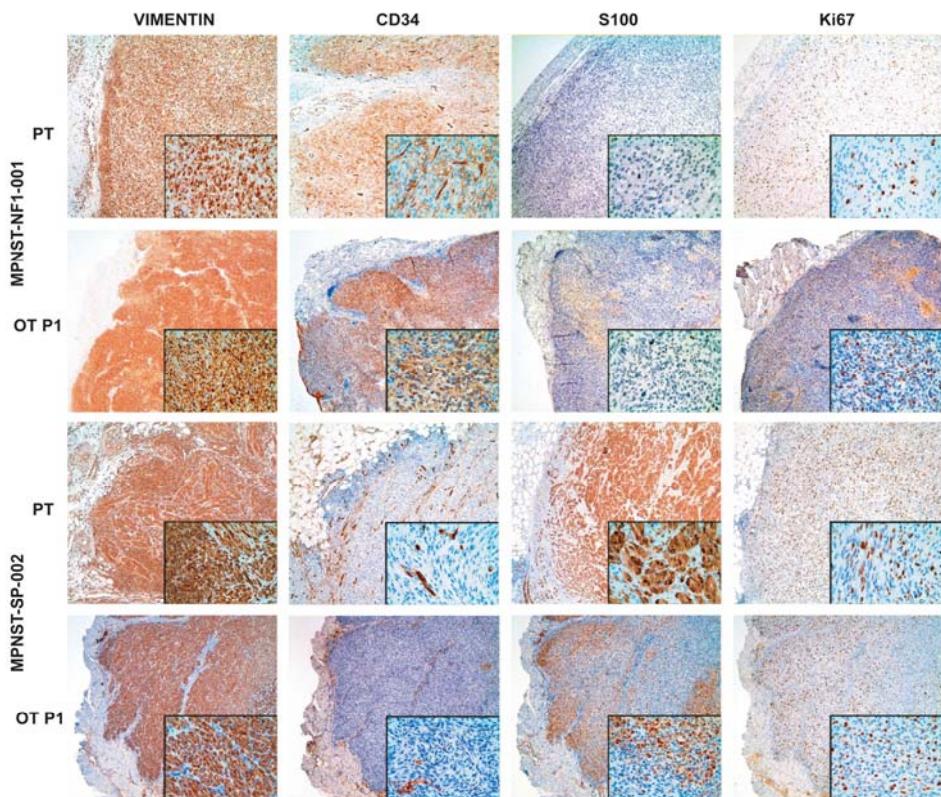


Figure 2. Orthoxenograft mouse MPNST models closely resemble primary tumors

A. Orthotopic MPNST xenografts at passages 1 (OT P1) and 4 (OT P4) are histopathologically similar to their corresponding primary MPNST (PT) in hematoxylin-eosin staining of paraffin sections from patients MPNST-NF1-001 and MPNST-SP-002. Main panels show a general vision of tumors at low magnification (40x), inset pictures were taken at higher magnification (400x).

B. Orthotopic xenograft and primary MPNSTs exhibit similar immunohistochemical features. A representative immunostained section of vimentin, CD34, S100 and Ki-67 is shown for primary tumors (PT) and orthotopic tumors (OT) from patients MPNST-NF1-001 and MPNST-SP-002. Positive antibody signals are shown in brown, and the hematoxylin counterstain in blue. Main panels show a general vision of tumors at low magnification (40x), inset pictures were taken at higher magnification (400x).

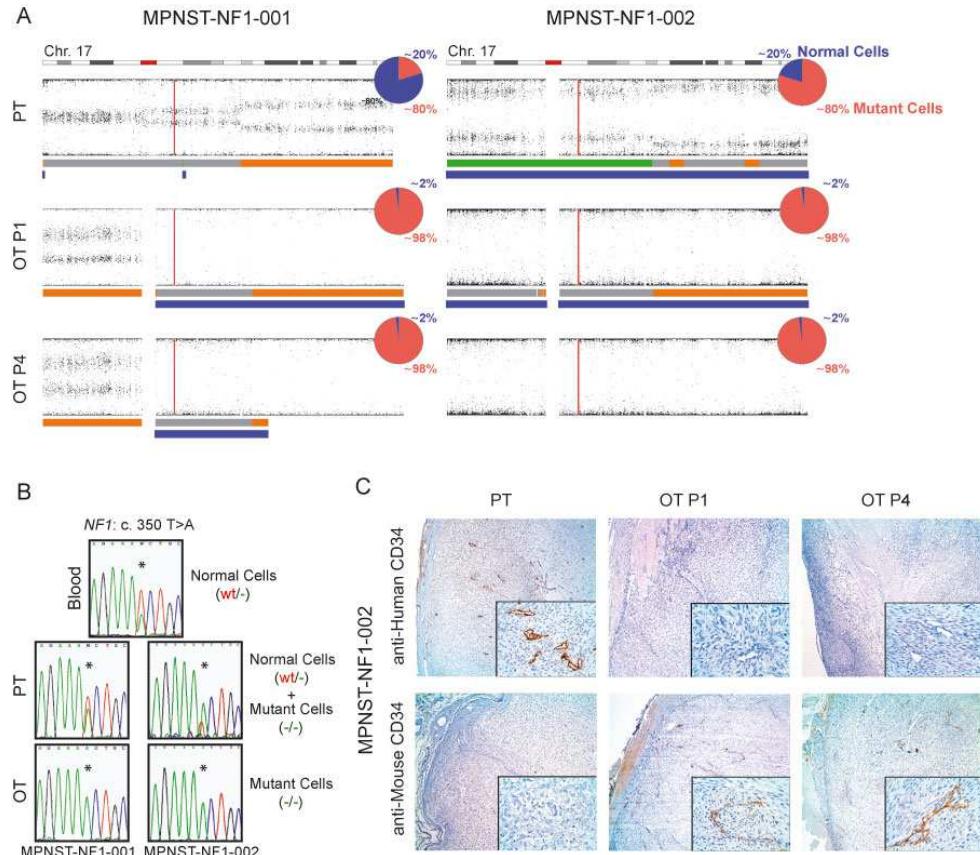


Figure 3. Human stroma is lost after engraftment and replaced by murine cells

A. SNP array of primary tumor (PT) and orthotopic xenograft at passage 4 (OT P4) from MNPSNT-NF1-001 tumor. Results correspond to chromosome 17. Images contain the allele frequency, bottom line represents the copy number. 2n are shown in grey, gains in orange, losses in green and LOH is represented by a blue line.

B. Sanger sequencing of the germline *NF1* mutation c.350T>A present in the patient carrying two different tumors (MPNST-NF1-001 and MPNST-NF1-002). Sequencing results from normal tissue, primary tumor (PT) and orthotopic xenograft tumors (OT) are shown.

C. Stromal elements of the primary tumors are labeled with anti-human CD34 but not anti-mouse CD34; patient-derived xenografts are labeled with anti-mouse CD34 only and no anti-human marker. Representative sections (at 40x and 400x magnification) of the primary tumors (PT) and the orthoxenograft tumors at passages 1 (OT P1) and 4 (OT P4) were labeled with anti-human CD34 (H) and anti-mouse CD34 (M).

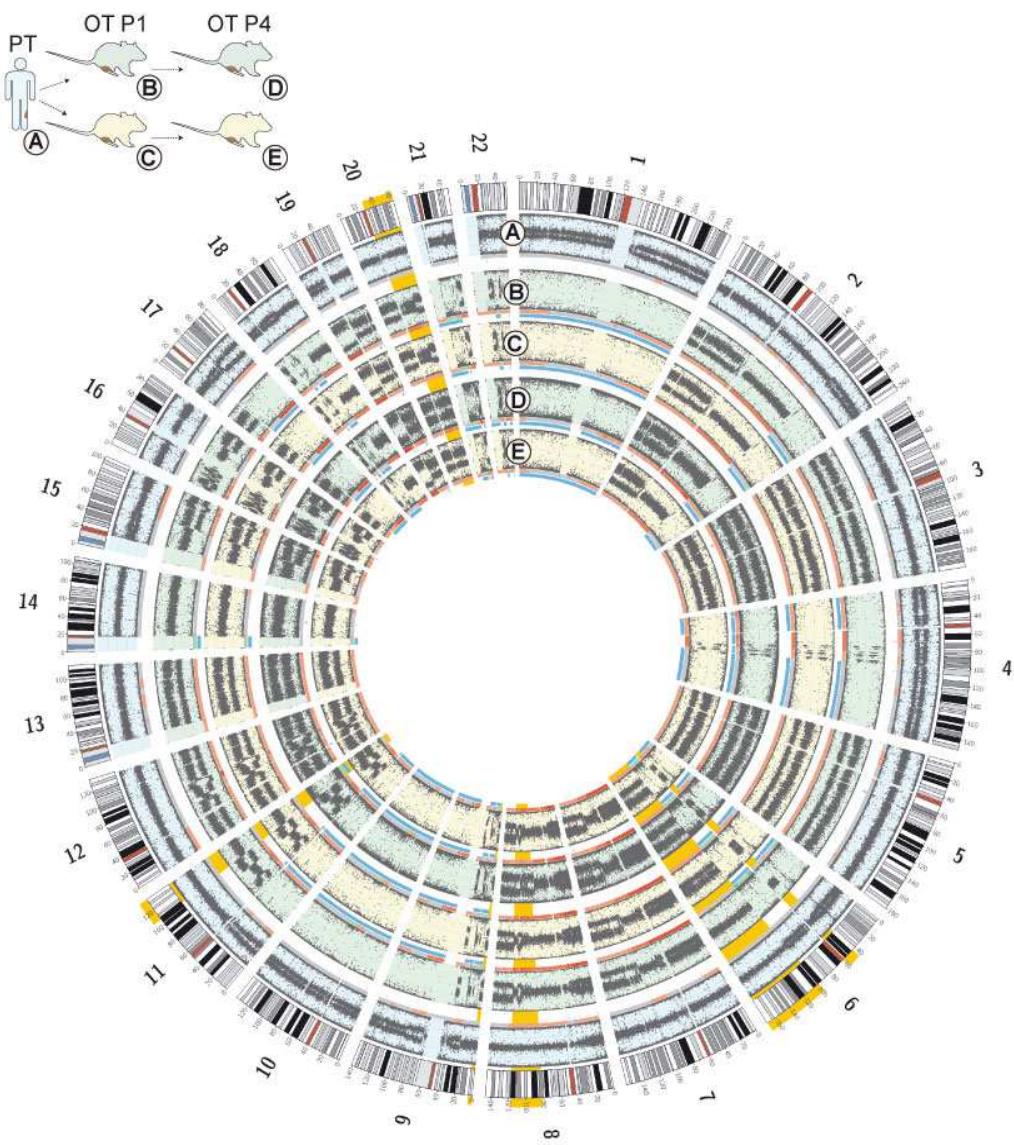


Figure 4. Orthotopic xenograft MPNST maintain the genomic structure found in primary tumors

Genome-wide SNP array profiling from two different orthoxenograft tumors derived from the same primary tumor (MPNST-NF1-001) are showed as Circos plots. The outermost layer contains the set of human autosomal chromosomes. The following layers, from outside to inside, illustrate: the BAF of the primary tumor (A), and the derived xenografts at passages 1 (B and C) and 4 (D and E). Copy number variations are represented by a colored line under each BAF (Grey = 2n, Red = $>2n$ (chromosomal gain); Green = $<2n$ (chromosomal loss). LOH events are shown in blue. Finally, differences between primary and xenograft tumors not compatible with the loss of signal from stroma cells are highlighted in orange.

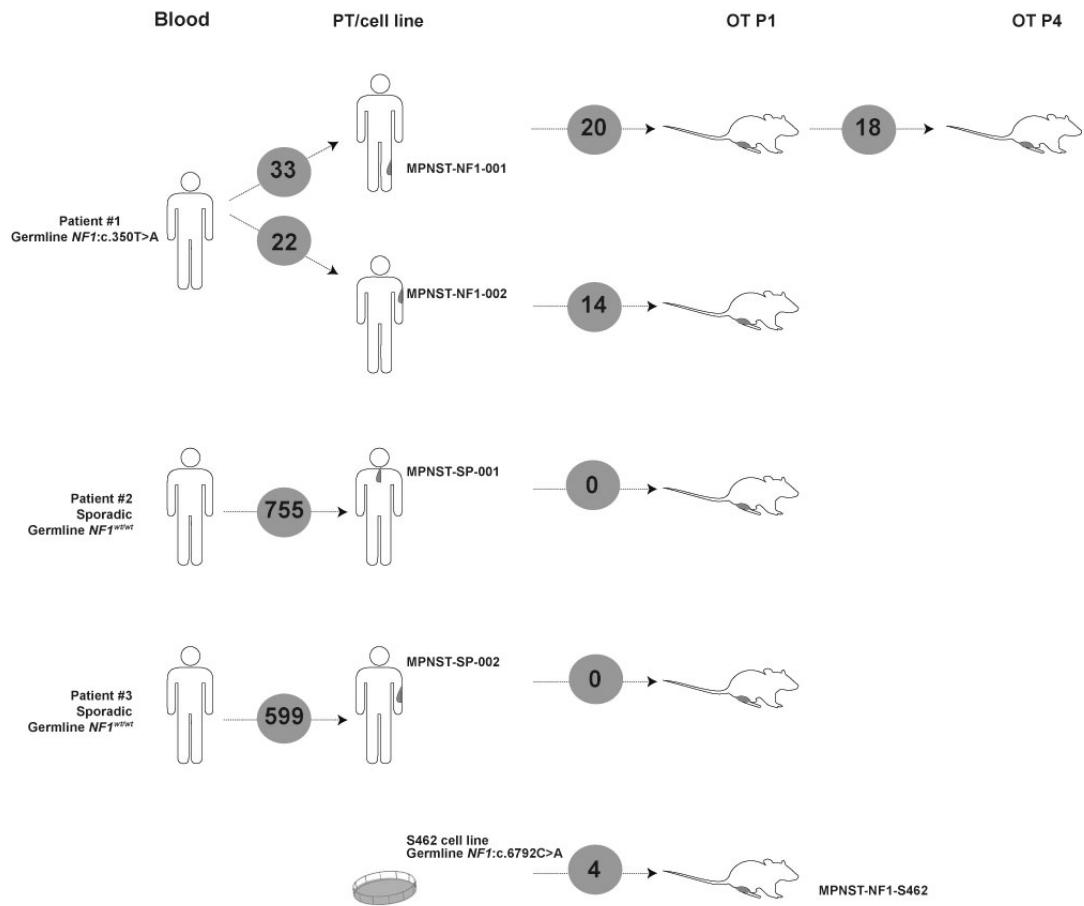


Figure 5. Exome sequencing analysis

Number of somatic point mutations identified in primary tumors and new mutations acquired in the orthoxenograft models in PRS-WCR. Somatic mutations found in primary tumors in sporadic cases were maintained in the orthoxenograft-derived tumors, whereas few acquired mutations were observed in all NF1-derived models.

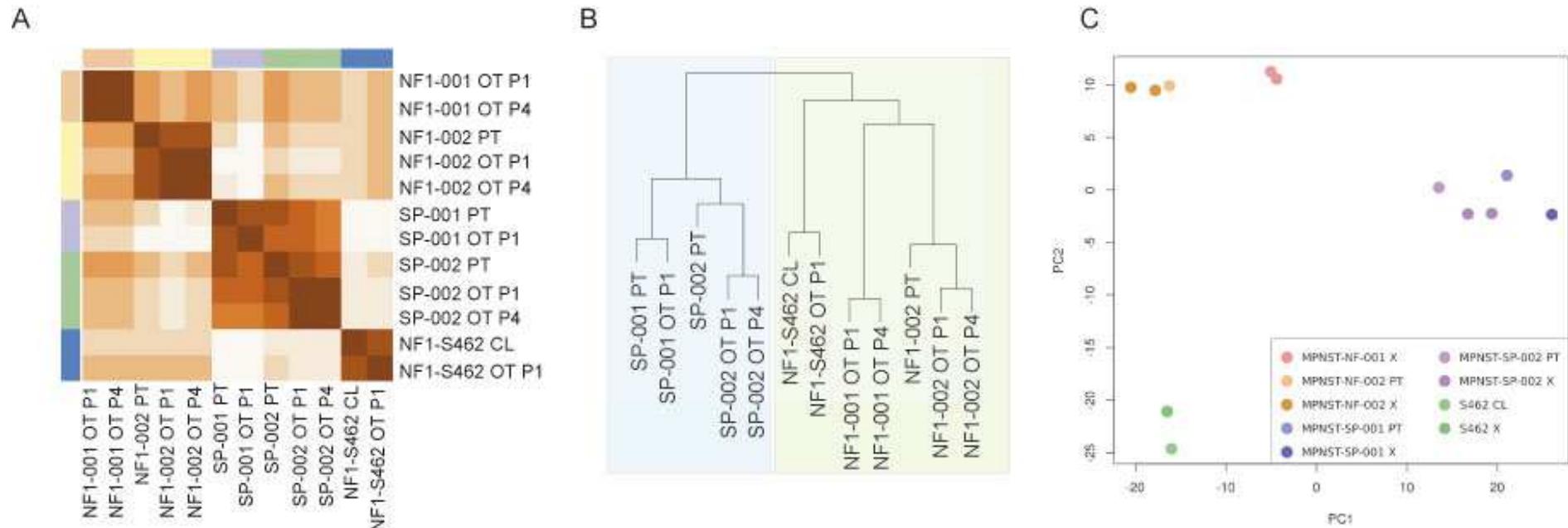


Figure 6. Gene expression profiles between primary and orthotopic xenograft MPNSTs are similar

A. Heat map showing the correlations between expression levels of genes in the molecular signature of MPNSTs.

B. Hierarchical clustering of tumors and xenografts groups together all primary tumors with their derived orthoxenografts. Moreover, sporadic tumors and NF1-related tumors form two different clusters.

C. PCA of genes in the molecular signature of MPNSTs. All primary-xenograft pairs cluster together. The first component differentiates between sporadic and NF1-related tumors and the second component differentiates primary tumors (and derived orthoxenografts) from the cell line (and the derived orthoxenograft).

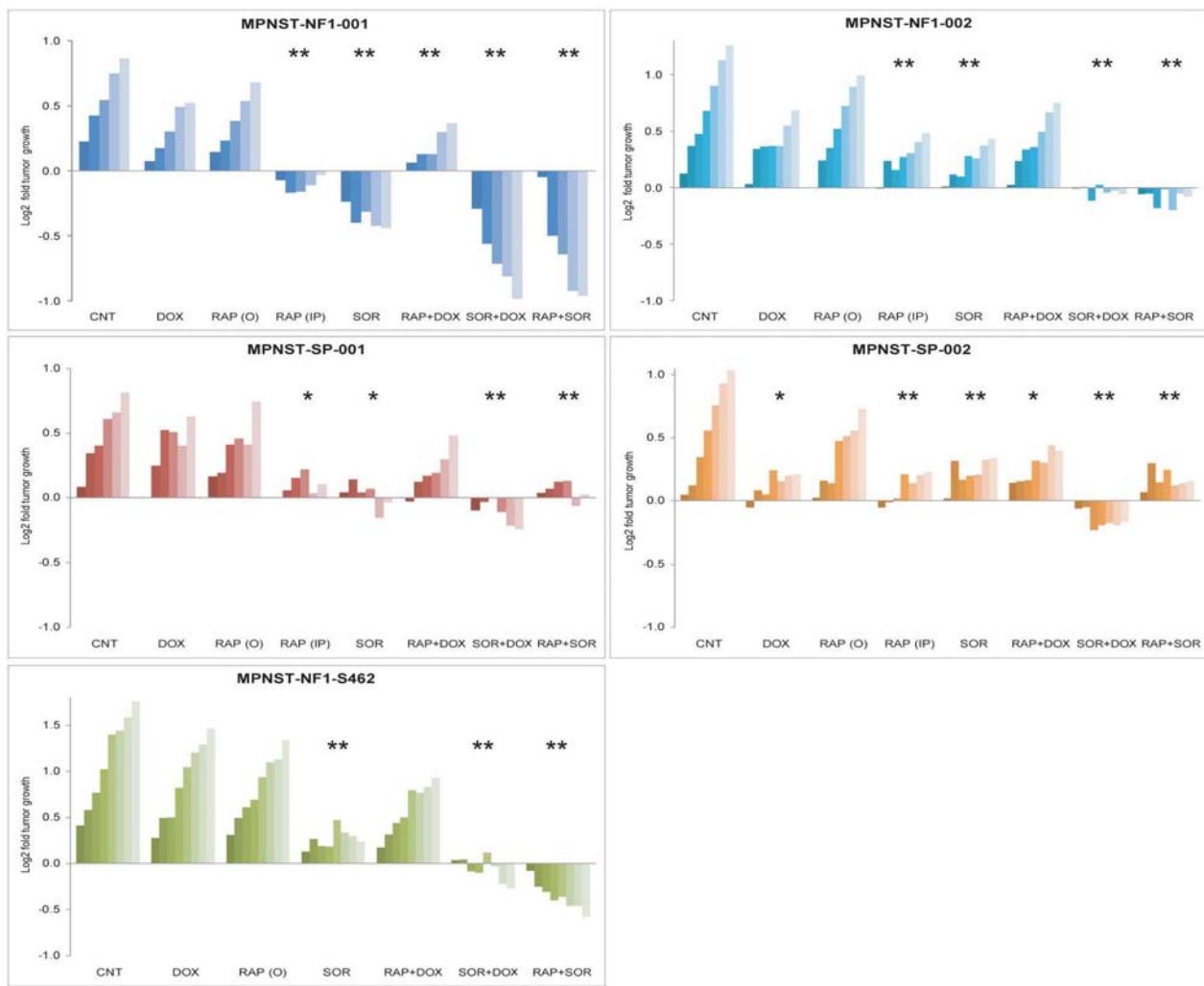


Figure 7. Pre-clinical orthoxenograft MPNST models to test drug treatment regimens

Tumor growth effects of treatment with doxorubicin, sorafenib, rapamycin and combinations thereof in the five MPNST xenograft models. Results are plotted as an average of the log₂ ratio of tumor volume at different days relative to the initial value. Statistically significant differences are shown as *, P < 0.05 and **, P < 0.001 versus control group by the Bonferroni test.

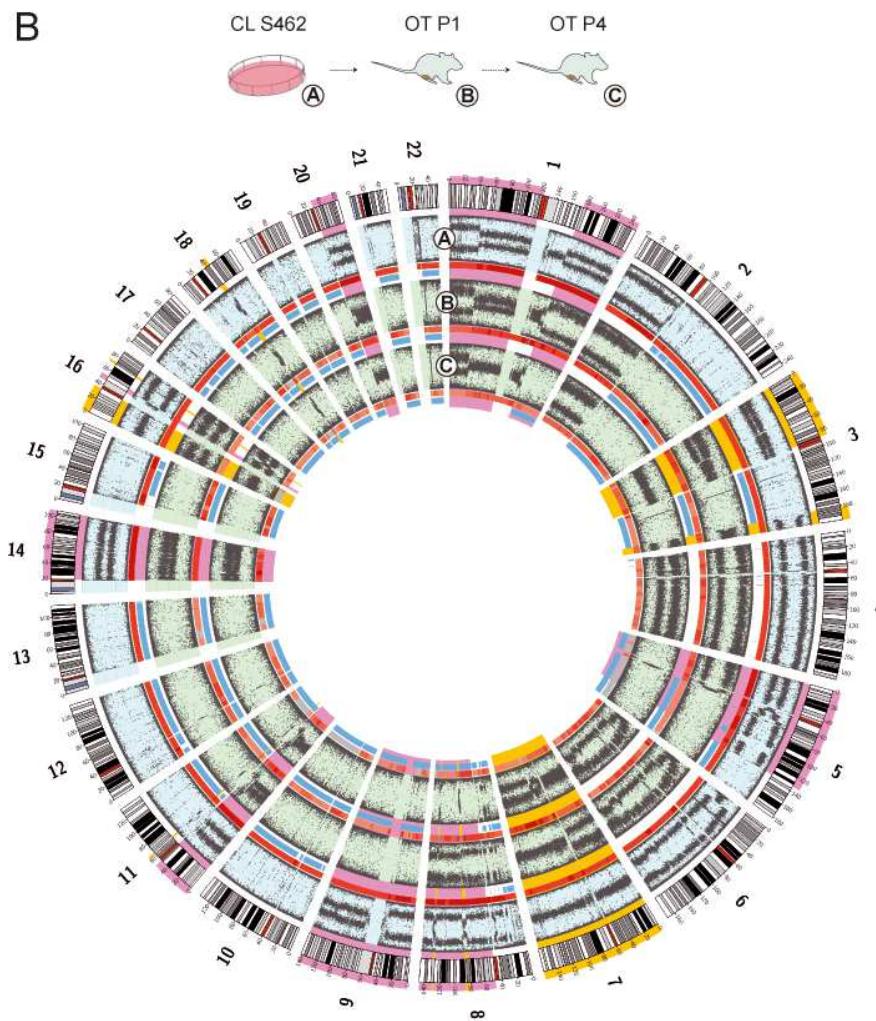
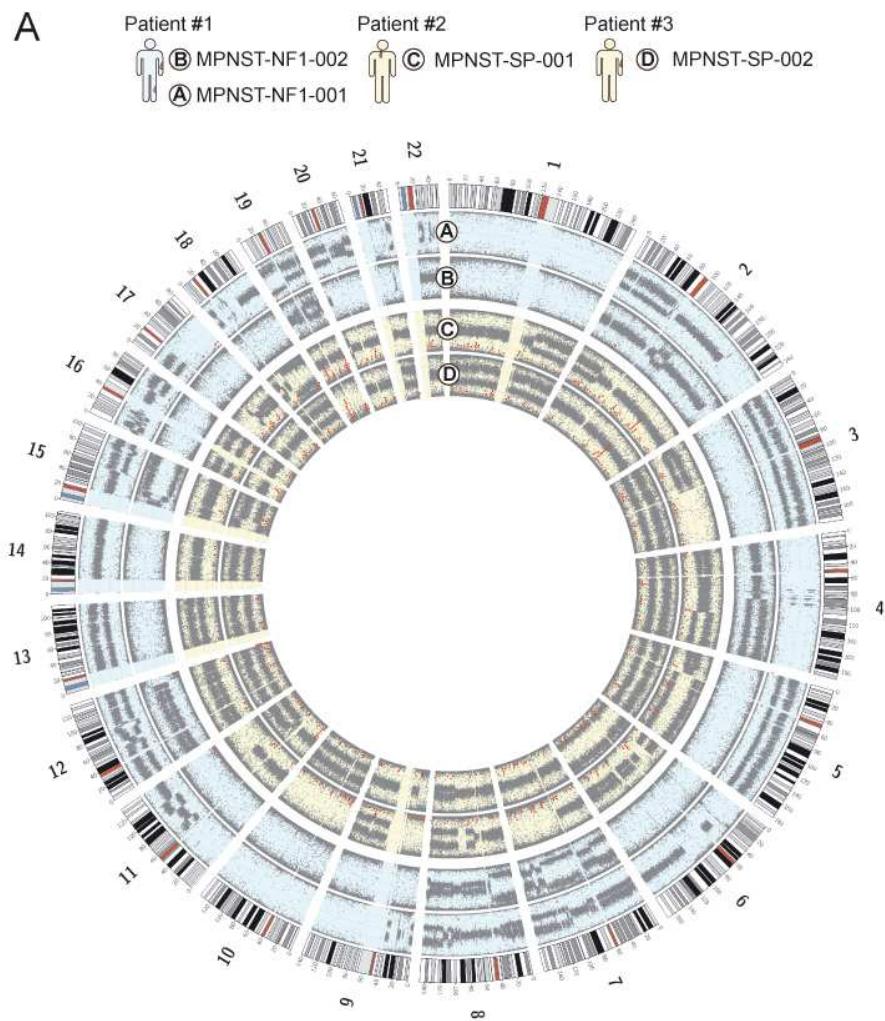


Figure 8. Sporadic versus NF1-associated orthoxenograft mouse MPNST models

A. Remarkable genetic differences were identified between sporadic MPNSTs and those arising in an NF1 context. The Circos plot shows the BAF data corresponding to orthoxenograft passage 1 derived from the four primary tumors and the somatic mutations in All-WCR as red dots. From outermost to innermost: MPNST-NF1-001 (A), MPNST-NF1-002 (B), MPNST-SP-001 (C) and MPNST-SP-002 (D).

B. Orthotopic xenograft MPNST derived from cell line S462 showed a number of differences in genomic alterations when compared to the S462 cell line itself. The outermost layer shows the full set of human autosomal chromosomes. The next layers, from outside to inside, show the BAF of the primary tumor (A), and its derived xenograft at passages 1 (B) and 4 (C). Copy number variations are represented by a colored line under each BAF (Grey = 2n, Red = >2n (chromosomal gain); Green = <2n (chromosomal loss). LOH events are shown in blue. Pink highlights mark the differences between cell line and xenografts compatible with a selection process, while orange highlights mark the regions not compatible with a selection process.

Table I. Clinical characteristics of patients and tumors used to generate the xenograft models

Tumor ID	Age	Sex	NF1 patient	Germline <i>NF1</i>	MPNST	Tumor grade	Location	Somatic <i>NF1</i>
MPNST-NF1-001	34	M	Yes	c.350T>A	Primary	IV	Thigh	LOH
MPNST-NF1-002	37	M	Yes	c.350T>A	Primary	III	Arm	LOH
MPNST-SP-001	88	M	No	-	Primary	IV	Laterocervical	c.3520 C>T
MPSNT-SP-002	74	F	No	-	Relapse	IV	Arm	-
MPNST-NF1-S462	19	F	Yes	c.6792C>A	Cell line	IV	Thigh	LOH

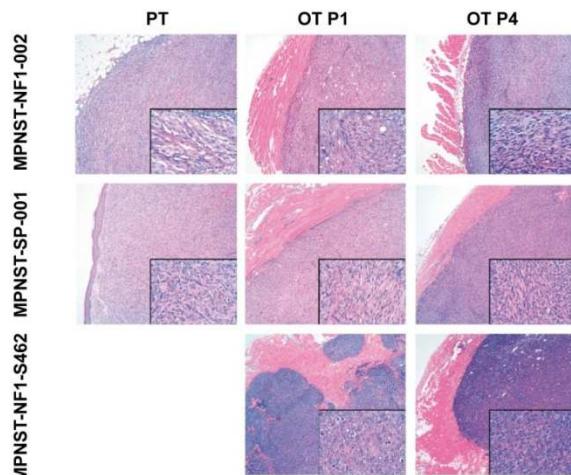
Table II. Immunohistochemical characterization of human tumors and their first derived xenograft mouse models.

	MPNST-NF1-001		MPNST-NF1-002		MPNST-SP-001		MPNST-SP-002		MPSNT-NF1-S462	
Antibody	PT	OT	PT	OT	PT	OT	PT	OT	CL	OT
Vimentin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Actin	-	-	-	-	-	-	-	- (+ focal)	-	- (+ focal)
EMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD34	+	+	-	- (+ focal)	-	-	-	-	+	+
S100	-	-	-	-	+	+	+	+/-	-	-
P53	15%	15%	<5%	20%	<5%	<5%	20%	<5%	80%	80%
Ki 67	25%	25%	25-30%	35%	35-40%	20%	25-30%	25-30%	90-95%	80%

PT = Primary tumor; OT = Orthotopic tumor; CL = Cell line

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

A



B

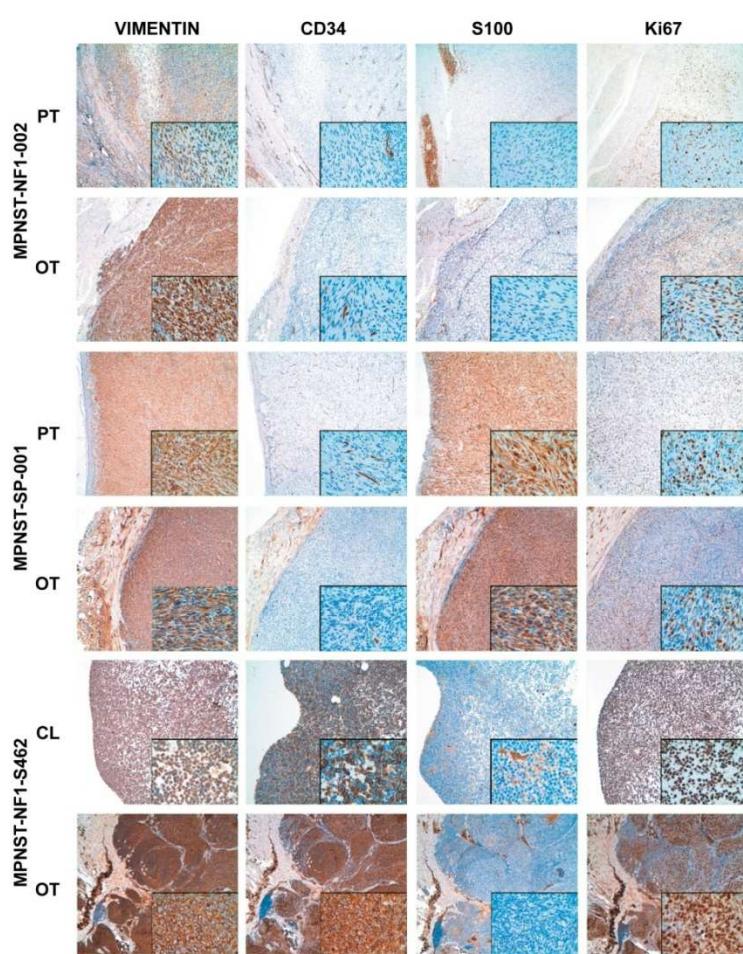


Figure S1. Orthoxenograft mouse MPNST models closely resemble primary tumors

A. Orthotopic MPNST xenografts at passages 1 (OT P1) and 4 (OT P4) are histopathologically similar to their corresponding primary MPNST (PT) in hematoxylin-eosin staining of paraffin sections. Main panels show a general vision of tumors at low magnification (40x), inset pictures were taken at higher magnification (400x).

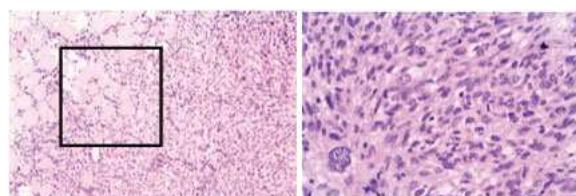
B. Orthotopic xenograft and primary MPNST exhibit similar immunohistochemical features. A representative immunostained section of vimentin, CD34, S100 and p53 is shown from primary tumors (PT), cell line S462 (CL) and orthotopic tumors (OT) corresponding to patients MPNST-NF1-001, MPNST-SP-001 and MPNST-NF1-S462. Positive antibody signals are shown in brown, and the hematoxylin counterstain in blue. Main panels show a general vision of tumors at low magnification (40x), inset pictures were taken at higher magnification (400x).

OT MPNST-SP-001 ENGRAFTMENT



Tumor removed by surgery

OT HISTOLOGY



OT LUNG METASTASIS

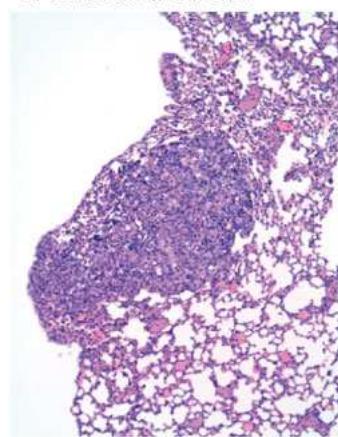


Figure S2. Distal dissemination of primary MPNST tumors

Orthoxenografts of MPNST also reproduce distal dissemination properties of primary MPNST tumors. Orthotopically implanted tumor mice (upper panel) were removed by surgery and extensively analyzed by hematoxylin and eosin (middle panel) for the presence micrometastases. Few small lung synchronous micrometastasis were identified in one of the orthoxenografts tumors (lower panel).

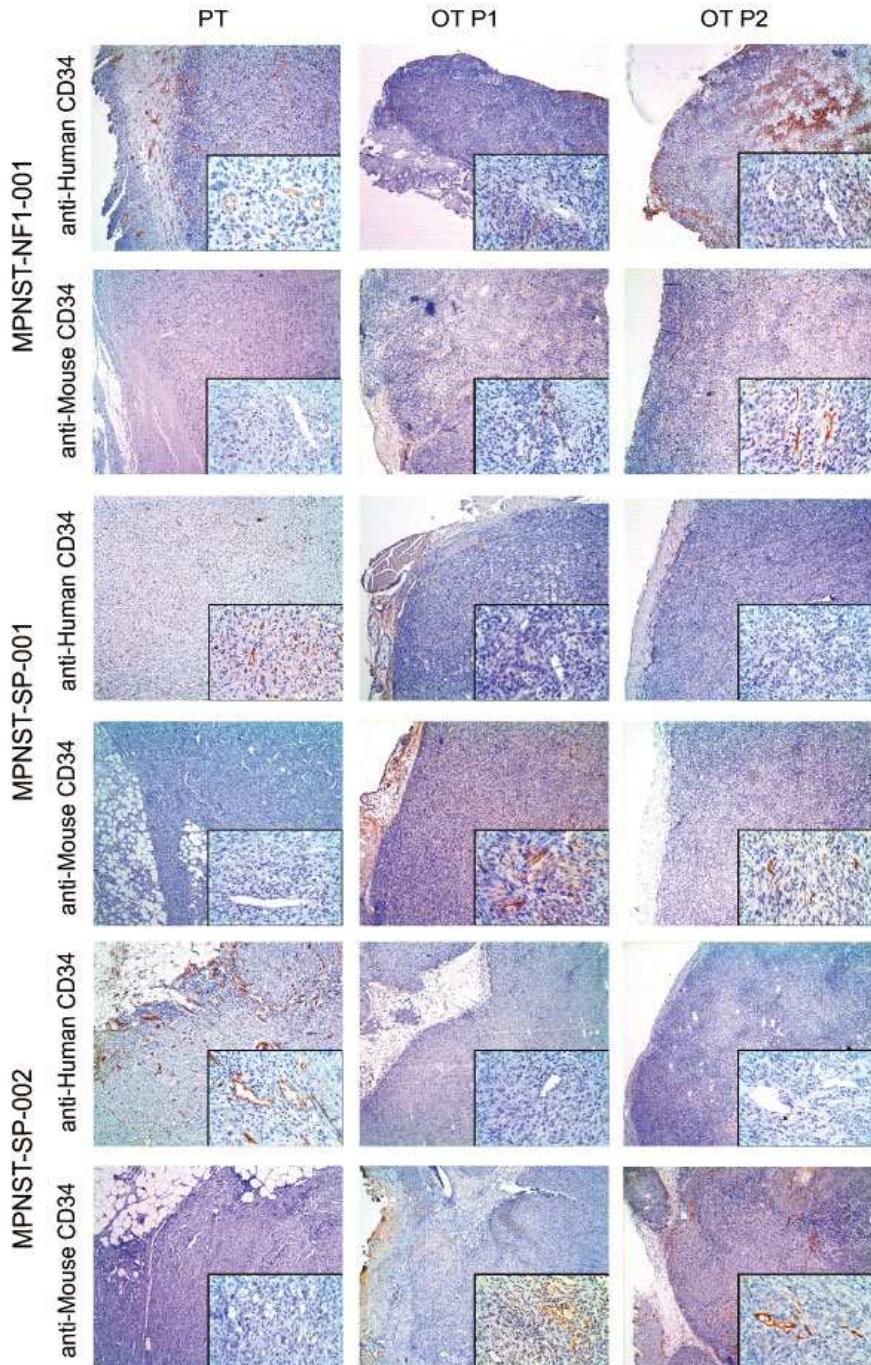


Figure S3. Human stroma is lost after engraftment and replaced by murine cells

Stromal elements of the primary tumors are labeled with anti-human CD34 but not with anti-mouse CD34; patient-derived xenograft is labeled with anti-mouse CD34 only and no anti-human marker. Two representative sections (at 40x and 400x magnification) of the primary tumors (PT) and the orthoxenograft tumors at passages 1 (OT P1) and 4 (OT P4) were labeled with both anti-human CD34 (H) and anti-mouse CD34 (M).

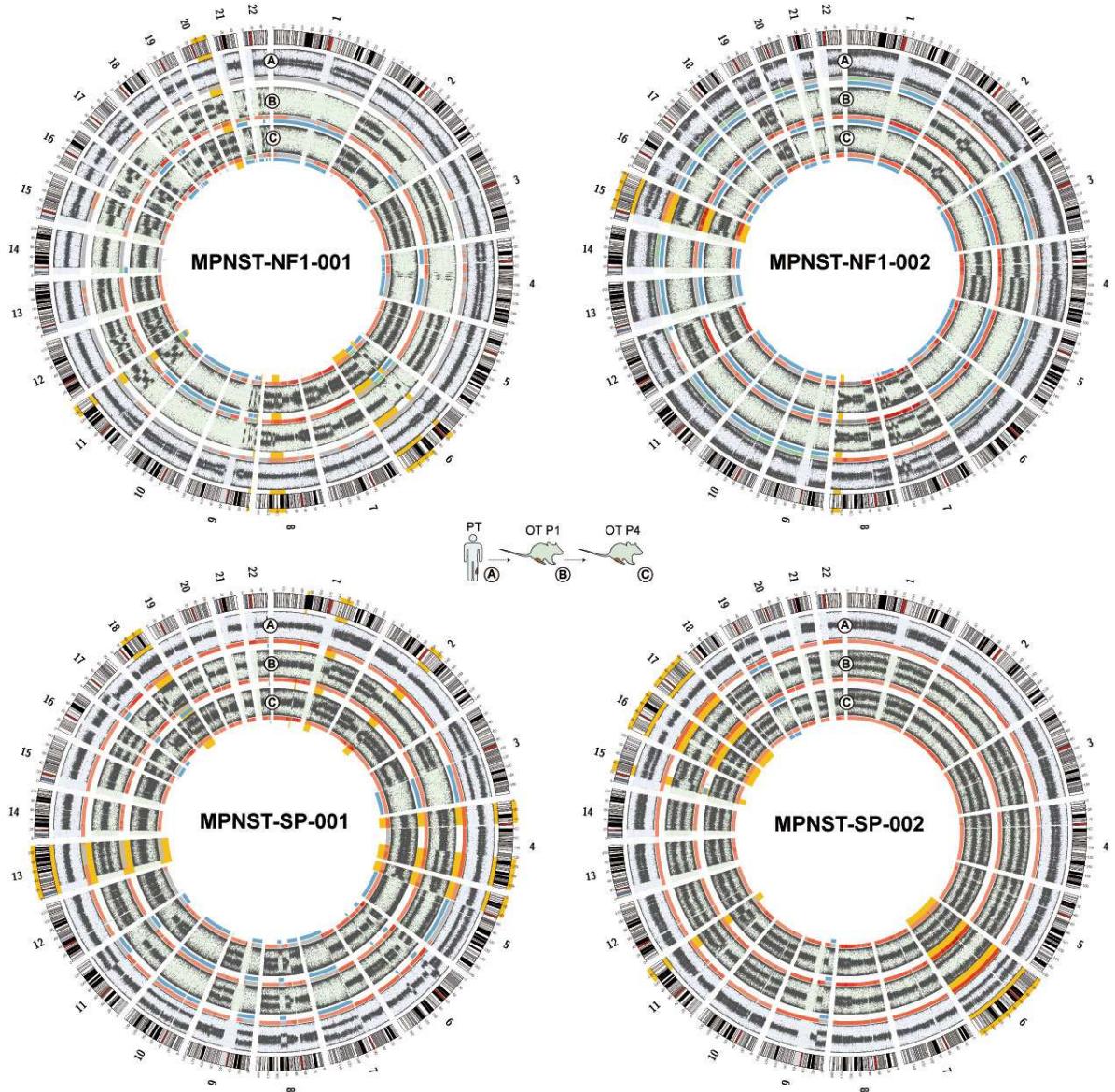


Figure S4. Orthotopic xenograft MPNST maintain genomic alterations found in primary tumors

Genome-wide SNP array profiling of MPNST-NF1-001, MPNST-NF1-002, MPNST-SP-001 and MPNST-SP-002 are shown as Circos plots. The outer layer illustrates the full set of autosomal human chromosomes; the following layers, from outside to inside, illustrate the allele frequency of the primary tumor (A), and the derived xenografts at passages 1 (B) and 4 (C). Copy number variations are represented by a colored line under each allele frequency (Grey = 2n, Red = >2n (chromosomal gain); Green = <2n (chromosomal loss)). LOH events are shown in blue. Finally, changes not conserved between primary and xenograft tumors are marked in orange.

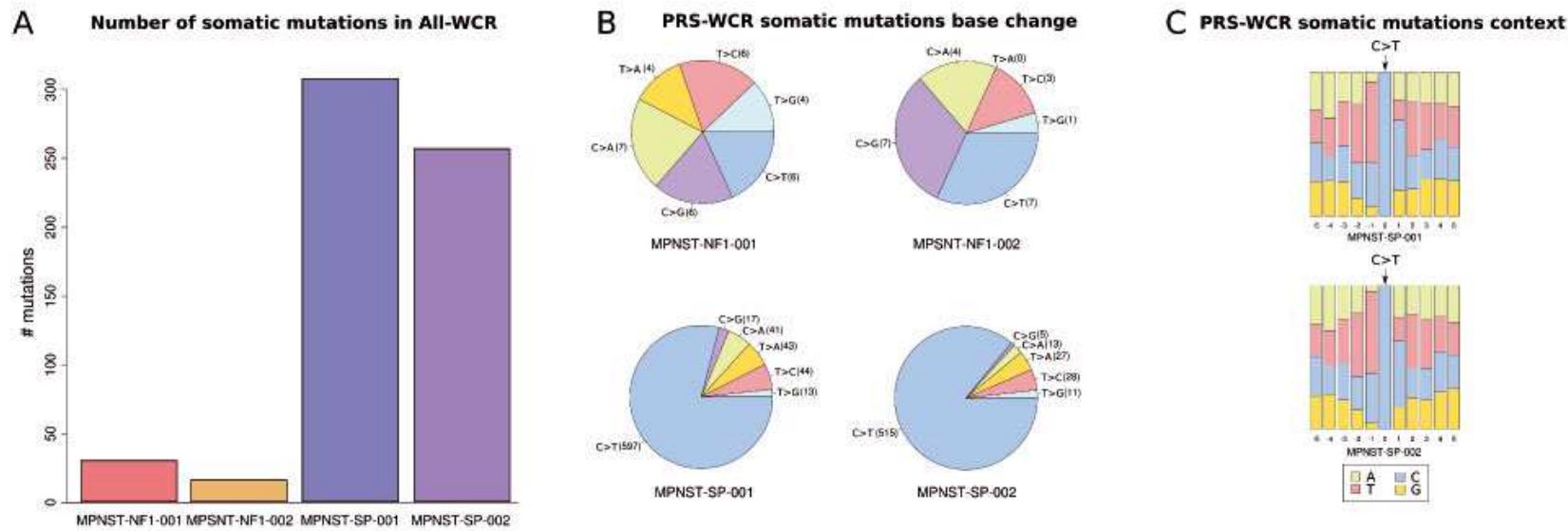


Figure S5. Mutational signatures of the primary tumors

- A. Number of somatic variants in All-WCR (regions over 20x in all samples) of the four primary MPNSTs.
- B. Base substitution for all somatic mismatch variants in PRS-WCR (regions over 20x in all samples related to a primary).
- C. Genomic sequence context of all C>T substitutions in the PRS-WCR of the sporadic MPNSTs.

Table SI. Mutations probably related to doxorubicin resistance

Gene	Mutation DNA level	Mutation Protein level	Tumor sample
<i>ABCB5</i>	c.43C>T	p.Gln15*	MPNST-SP-002
<i>ABCB5</i>	c.37A>T	p.Asn13Tyr	MPNST-SP-002
<i>ABCB5</i>	c.643C>T	p.Pro215Ser	MPNST-SP-001
<i>ASNS</i>	c.611-1G>A	-	MPNST-SP-002

3. GENOMIC IMBALANCE OF HMMR/RHAMM REGULATES THE SENSITIVITY AND RESPONSE OF MALIGNANT PERIPHERAL NERVE SHEATH TUMOUR CELLS TO AURORA KINASE INHIBITION.

ARTICLE 3

Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.

Pooja Mohan, **Joan Castellsagué**, Jihong Jiang, Kristi Allen, Helen Chen, Oksana Nemirovsky, Melanie Spyra, Kaiji Hu, Lan Kluwe, Miguel Angel Pujana, Alberto Villanueva, Victor F. Mautner, Jonathan J. Keats, Sandra E. Dunn, Conxi Lázaro i Christopher A. Maxwell.

Oncotarget: 4: 80-93, 2013

Resum: La contribució del doctorant en aquest article, va consistir en el tractament de dos models xenògrafts ortotòpics derivats de tumors MPNST primaris humans (un esporàdic i un de pacient afectat amb NF1) amb l'inhibidor MLN8237. El MLN8237 és un inhibidor de aurora cinasa A (AURKA), una diana emergent contra la progressió tumoral a través de la interrupció de la formació del fus mitòtic i de la segregació dels cromosomes, el qual ha mostrat efectes antiproliferatius en línies cel·lulars de MPNST *in vitro* i *in vivo*.

Els resultats per aquest fàrmac, van mostrar una estabilització del creixement tumoral, causant la parada del cicle cel·lular i una endoreduplicació de les cèl·lules tumorals dels models ortoxenògraft.

Genomic imbalance of *HMMR/RHAMM* regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.

Pooja Mohan¹, Joan Castellsague², Jihong Jiang¹, Kristi Allen³, Helen Chen¹, Oksana Nemirovsky¹, Melanie Spyra⁴, Kaiji Hu¹, Lan Kluwe⁴, Miguel Angel Pujana⁵, Alberto Villanueva⁵, Victor F. Mautner⁴, Jonathan J. Keats³, Sandra E. Dunn¹, Conxi Lazaro², Christopher A. Maxwell¹

¹ Department of Pediatrics, Child & Family Research Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada.

² Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Institute for Biomedical Research, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

³ Integrated Cancer Genomics Division, The Translational Genomics Research Institute, Phoenix, AZ, USA.

⁴ Department of Neurology, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany.

⁵ Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Institute for Biomedical Research, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Correspondence to: Chris Maxwell, *email:* cmaxwell@cfri.ubc.ca

Keywords: MPNST, AURKA, RHAMM, TPX2, cancer stem cell

Received: December 26, 2012, **Accepted:** January 07, 2013, **Published:** January 09, 2013

Copyright: © Mohan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNST) are rare, hereditary cancers associated with neurofibromatosis type I. MPNSTs lack effective treatment options as they often resist chemotherapies and have high rates of disease recurrence. Aurora kinase A (AURKA) is an emerging target in cancer and an aurora kinase inhibitor (AKI), termed MLN8237, shows promise against MPNST cell lines *in vitro* and *in vivo*. Here, we test MLN8237 against two primary human MPNST grown *in vivo* as xenotransplants and find that treatment results in tumour cells exiting the cell cycle and undergoing endoreduplication, which cumulates in stabilized disease. Targeted therapies can often fail in the clinic due to insufficient knowledge about factors that determine tumour susceptibilities, so we turned to three MPNST cell-lines to further study and modulate the cellular responses to AKI. We find that the sensitivity of cell-lines with amplification of AURKA depends upon the activity of the kinase, which correlates with the expression of the regulatory gene products TPX2 and HMMR/RHAMM. Silencing of HMMR/RHAMM, but not TPX2, augments AURKA activity and sensitizes MPNST cells to AKI. Furthermore, we find that AURKA activity is critical to the propagation and self-renewal of sphere-enriched MPNST cancer stem-like cells. AKI treatment significantly reduces the formation of spheroids, attenuates the self-renewal of spheroid forming cells, and promotes their differentiation. Moreover, silencing of HMMR/RHAMM is sufficient to endow MPNST cells with an ability to form and maintain sphere culture. Collectively, our data indicate that AURKA is a rationale therapeutic target for MPNST and tumour cell responses to AKI, which include differentiation, are modulated by the abundance of HMMR/RHAMM.

INTRODUCTION

Neurofibromatosis type I is an autosomal dominant,

tumour predisposition syndrome [1]. The disease affects about 1 in 3000 young adults and causes the occurrence of benign dermal and plexiform tumours. Approximately

8-13% of affected individuals will develop malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs) in their lifetime [2]. Sporadic MPNST are rare in the general population but account for approximately half of diagnosed MPNST cases [3]. Both sporadic and NF1-associated MPNST are difficult to treat owing to their resistance to chemotherapy and frequent deep seated location in the body, which results in 5-year survival rates in the range of 20-50% [2-4].

The molecular mechanisms underlying the progression of MPNSTs remain unclear, which limits the discovery and application of new targeted therapies. Patel and colleagues identified Aurora kinase A (AURKA) as a candidate target for MPNST therapy by first modeling the disease in an animal model, identifying frequent amplification of *AURKA* in human tumours, and then treating MPNST cell-lines grown *in vitro* and as xenotransplants *in vivo* with an AURKA specific inhibitor, termed MLN8237 [5]. AURKA is an oncogenic kinase that enables mitotic spindle assembly [6], and aurora kinase A inhibitors (AKI) often induce a G2/M cell cycle arrest followed by apoptosis in cancer cell lines grown *in vitro* and *in vivo* [7, 8]. Inhibitors of Aurora kinase B (AURKB) are also effective anti-mitotic drugs, which often induce mitotic failure and endoreduplication [8]. Treatment of an MPNST cell-line with MLN8237 stabilized the cell-line's growth *in vivo* and induced endoreduplication and senescence *in vitro* [5]. Optimal application of these emerging therapies will require a better understanding and prediction of MPNST susceptibilities and tumour cell responses.

The examination of copy number variants in human, primary dermal or plexiform neurofibromas and MPNSTs of differing grades provides an additional link between disease progression and the AURKA signalling pathway. In approximately half of the high-grade tumours and not in low-grade MPNSTs or neurofibromas, hemizygous deletion of the *hyaluronan mediated motility receptor* (*HMMR*) gene was reported [9]. The *HMMR* gene encodes a multifunctional protein (RHAMM) that enables mitotic spindle assembly [10] and may attenuate the activation of AURKA [11], which relies upon a heterodimeric complex with targeting protein for XKLP2 (TPX2) [12]. As RHAMM binds TPX2 [13, 14], the hemizygous loss of *HMMR/RHAMM* that is often associated with the progression of MPNSTs may release TPX2, activate AURKA, and provide a growth advantage. Indeed, both *AURKA* (20q13.2) and *TPX2* (20q11.2) lie within chromosomal regions that are frequently amplified in sporadic MPNSTs [15, 16]. Taken together, these genomic imbalances may oncogene-addict high-grade MPNSTs to AURKA activity and sensitize them to the treatment with AKIs.

AURKA also regulates non-mitotic events, such as apicobasal polarization of epithelia [11], cilia resorption [17], and embryonic stem cell fate [18, 19]. In mouse

embryonic stem cells (mESCs), AURKA is essential for maintenance of stem cell populations and silencing *AURKA* or treatment with AKI was sufficient to drive their differentiation through mesoderm and ectoderm lineages [18]. Thus, AKI may have effects on non-mitotic processes in tumour cells, such as the determination of cell fate and differentiation.

Here, we propose that AURKA represents a rational therapeutic target for MPNSTs and that the sensitivity of these tumours to AKI may be regulated by gene dosage and expression of *HMMR/RHAMM*. We find that treatment with an AKI efficiently stabilizes the growth of two primary human MPNSTs grown as xenografts *in vivo*. The sensitivity of immortalized MPNST cell-lines to this class of drugs relies in part on the activity of AURKA, which can be modified by targeted silencing of key kinase regulators, such as *TPX2* and *HMMR/RHAMM*. Treatment with MLN8237 also engages a differentiation program in sphere-enriched MPNST cells that impairs their self-renewal and favours differentiation with expression of neuron-specific microtubule architecture.

RESULTS

Aurora kinase inhibition is an encouraging preclinical treatment for human MPNST

A preclinical study of MLN8237 has shown efficacy against an immortalized MPNST cell-line that was grown *in vitro* and as a xenotransplant *in vivo* [5]. To build on these findings and test the efficacy of this new putative therapy against primary human MPNSTs, we treated two human tumours grown as explants *in vivo* (Castellsagué et al., manuscript under preparation). One sporadic (SP-MPNST) and one hereditary (NF1-MPNST) primary, human MPNST were separately transplanted orthotopically and expanded in the flank of NOD-SCID mice (n= 44 and 39, respectively) to a size of 2000 mm³, randomized, and treated by oral gavage with vehicle control or 30 mg/kg/day MLN8237 for a period of four weeks, which is a dosing regimen based upon the published *in vivo* pharmacodynamics for the drug [7]. Treatment of animals with MLN8237 resulted in stabilized disease for tumour explants from both patients, as opposed to the linear expansion of tumour volumes in the vehicle treated cohorts (SP-MPNST, p <0.0001; NF1-MPNST, p= 0.0011) (Fig 1A,B). Once the dosing schedule was completed, tumours were excised and weighed. Consistent with the caliper measurements, treatment with MLN8237 resulted in tumour masses that were significantly lower in both the NF1-MPNST and SP-MPNST explants (p<0.01) compared to those of vehicle treated tumours (Fig 1A,B).

For insight into the mechanisms through which MLN8237 stabilized tumour growth, we examined the

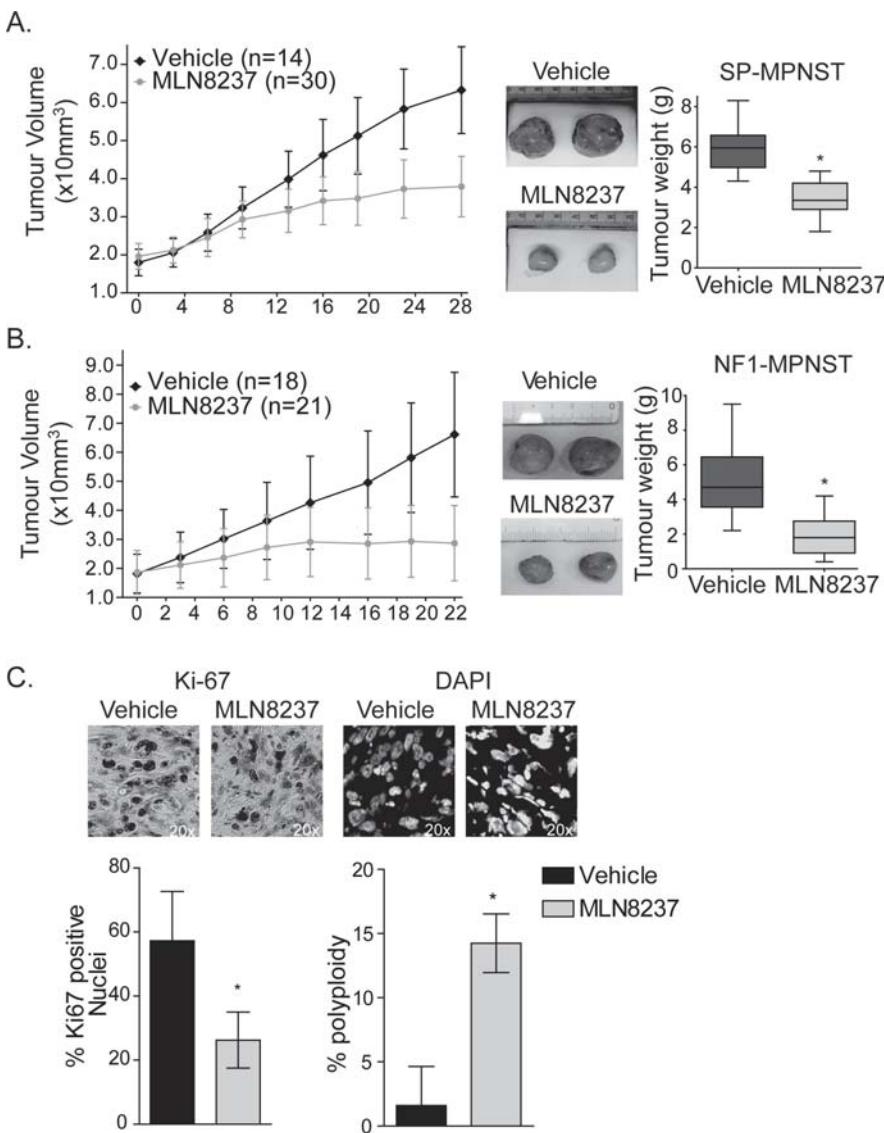


Figure 1: MLN8237 is effective against primary MPNSTs grown as xenotransplants in vivo. *A.* Sporadic MPNST tumours were orthotopically transplanted into *NOD/SCID* mice and allowed to grow to 2000 mm³ before treatment of 30mg/kg MLN8237 or vehicle was delivered daily. Treatment with MLN8237 resulted in stable disease after 2 weeks treatment, as determined by calliper measurements of tumour volumes, n=30 MLN8237 treated and n=14 for vehicle treated, *p<0.01, error bars = SD. Representative images of SP-MPNST tumours after 28 days of MLN8237 treatment or vehicle control are shown and treatment with the AKI resulted in significant reduction in tumour weight (quantitation on the right) (*p<0.01, Error bars = SD). *B.* NF1-MPNST tumours also show significantly stabilized tumour volumes and reduced tumour weight in the MLN8237 treated tumours compared to the vehicle controls. Vehicle treated mice, n=18, MLN8237 treated mice, n=21, error bars = SD. *C.* After 28 days of treatment, SP-MPNST tumour sections were stained for Ki-67 and DAPI. Ki-67 staining was significantly decreased in treated tumours suggesting that these cells have exited the cell cycle. Furthermore, there was a significant increase in multi-nucleate cells in treated tumours suggesting that cells are undergoing G2/M arrests and endoreduplication post treatment. *p<0.01, error bars = SD. Images are taken at 20x magnification.

excised SP-MPNSTs by immunohistochemistry and found evidence that MLN8237 causes tumour cells to exit the cell cycle and/or undergo endoreduplication. MLN8237-treated tumours contained significantly fewer Ki67positive

cells than the vehicle treated controls (Fig 1C) while the fraction of polyploid cells, as measured through the DAPI counterstain, was increased within the treated tumour cells (Fig 1C).

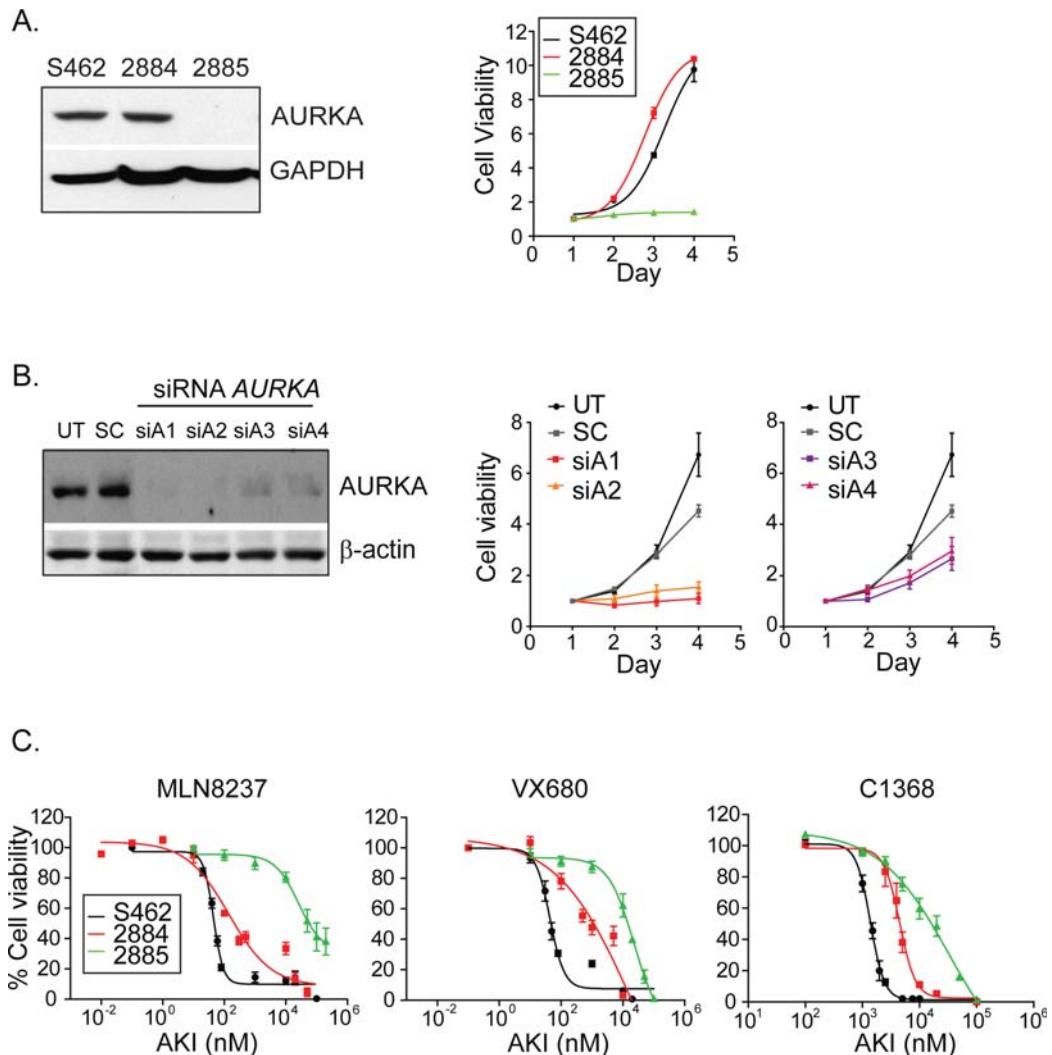


Figure 2: Inhibition of AURKA attenuates the growth of MPNST cell-lines in vitro. *A.* Cell lysates collected from S462, 2884 and 2885 cell lines show equivalent AURKA expression in S462 and 2884 cell lines. Furthermore, these cell lines undergo equivalent growth while 2885 cells experience slow proliferation. Seeding densities for S462 and 2884 were modified to enable equivalent proliferation. Cell viability was measured by MTT assays over a 4 day period. *B.* Immunoblot analysis of AURKA expression in lysates from untreated S462 cells and those treated with scrambled or AURKA targeted siRNA at 48 hours post transfection reveal specific reduction of AURKA. β-actin serves as a loading control. Cell viability is decreased in a dose dependent manner in cells treated with siRNA targeting AURKA relative to untreated cells and those cells treated with scrambled siRNA (right). Plotted siAurora values are obtained from four redundant siRNA targeting AURKA. Error bars = SEM, n=5 replicate experiments. *C.* Treatment of MPNST cells with three inhibitors to Aurora kinases, MLN8237, VX680 and C1368, reveals marked and dose-dependent reduction in cell viability as measured by MTT after 72 hours of treatment. Error bars = SEM, n=3 replicate experiments.

Immortalized MPNST cell-lines differ in their sensitivity to aurora kinase inhibitors (AKI)

To examine MPNST cellular responses to MLN8237 in greater detail, we studied three established and immortalized MPNST cell-lines. In two of the cell-lines (S462 and 2884), the expression of AURKA and the kinetics of growth *in vitro* were equivalent (Fig. 2A). The 2885 cell-line, however, was poorly proliferative and

lysates from these cells contained negligible levels of AURKA (Fig. 2A). When the expression of *AURKA* was silenced in S462 cells through transfection of four distinct siRNA constructs, cell survival was significantly impacted and proportional to the degree of *AURKA* silencing achieved by the various siRNA constructs, which implied a dose-response between AURKA abundance and cell growth rate or viability (Fig. 2B). We obtained three AKIs from commercial sources and tested the ability of each AKI to reduce kinase activity. Lysates from S462 cells

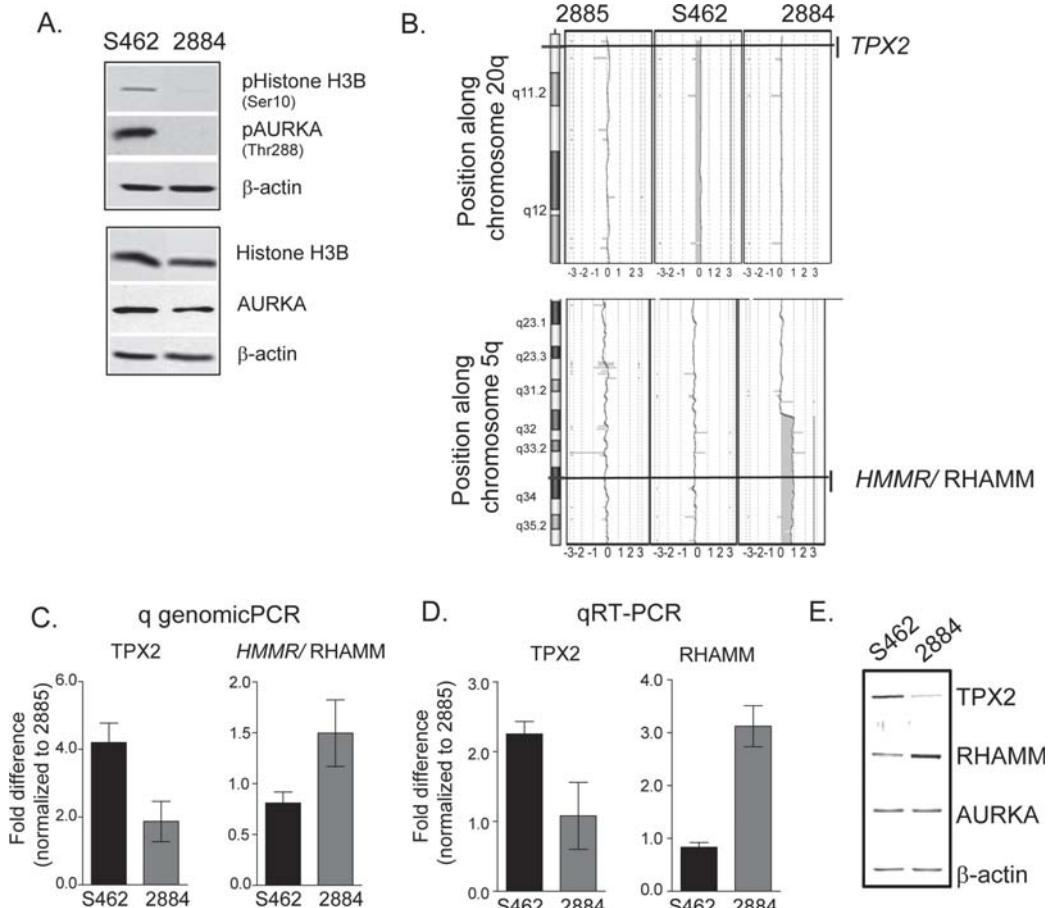


Figure 3: Gene dose alterations in TPX2 and RHAMM account for the differential AURKA activity in MPNST cell-lines. *A.* Augmented AURKA activity is detected in S462 cell lysates as measured by immunoblot detection of pS10-Histone H3B and pT288-AURKA. Apart from an increased level of RHAMM expression in 2884, levels of the unphosphorylated proteins are relatively constant. β-actin serves as a loading control. *B.* Comparative genomic hybridization of genomic DNA from S462, 2884 and 2885 MPNST cell lines identify copy number gains of 20q in S462 and 2884 cells, and a gain of 5q33.2-qter in 2884 cells. *C.* Quantitative PCR confirms increased gene dosage of *TPX2*, but decreased *HMMR*, in S462 relative to 2884 cells. Error bars =SD, n=3. *D.* Gene dosage translates to different levels of mRNA for *TPX2* and *RHAMM* as detected by qRT-PCR in S462 relative to 2884 cells. Error bars=SD, n=3. *E.* Representative blots for protein expression of AURKA, TPX2 and RHAMM as detected in cell lysates from S462 and 2884 cell-lines by IR labelled antibodies. Consistent with the genomic and message levels, S462 cells contain a marked increase in TPX2 expression and a reduced expression of RHAMM relative to 2884 cells.

treated with varying concentrations of AKI showed dose dependent reduction of pRHAMM (Fig S1A). This was confirmed with immunofluorescence analysis of the auto-activated kinase (p-AURKA) [12] and two downstream substrates (pRHAMM and p-histone H3) [11, 20] (Fig S1B). Each of the MPNST cell-lines was then separately treated with each AKI. Following 72 hours of treatment with MLN8237, the survival of each MPNST cell-line *in vitro* was reduced significantly (Fig. 2C). However, the sensitivity of the cell-lines did not completely align with the levels of AURKA expression, as would be predicted from the results of the siRNA experiments.

The 2885 cell-line resisted MLN8237 treatment and

required 400-725 fold higher concentrations to inhibit 50% of cellular growth (IC-50) (Fig. 2C), which is consistent with the negligible expression of AURKA in this cell-line. Despite equivalent growth rates and AURKA abundance in 2884 and S462 cells, however, the cellular responses to MLN8237 were significantly different ($p=0.02$) with S462 being the more sensitive (Fig. 2C). We found that S462 cells were also 2.2 – 9.2 fold more sensitive to the pan-Aurora inhibitors VX680 (IC-50- 2884, 387 ± 47 nM; S462, 42 ± 10 nM) and C1368 (IC-50- 2884, 2925 ± 135 nM; S462, 1302 ± 264 nM) (Fig. 2C), which implied that factors intrinsic to these cell-lines may influence their responses to AKI.

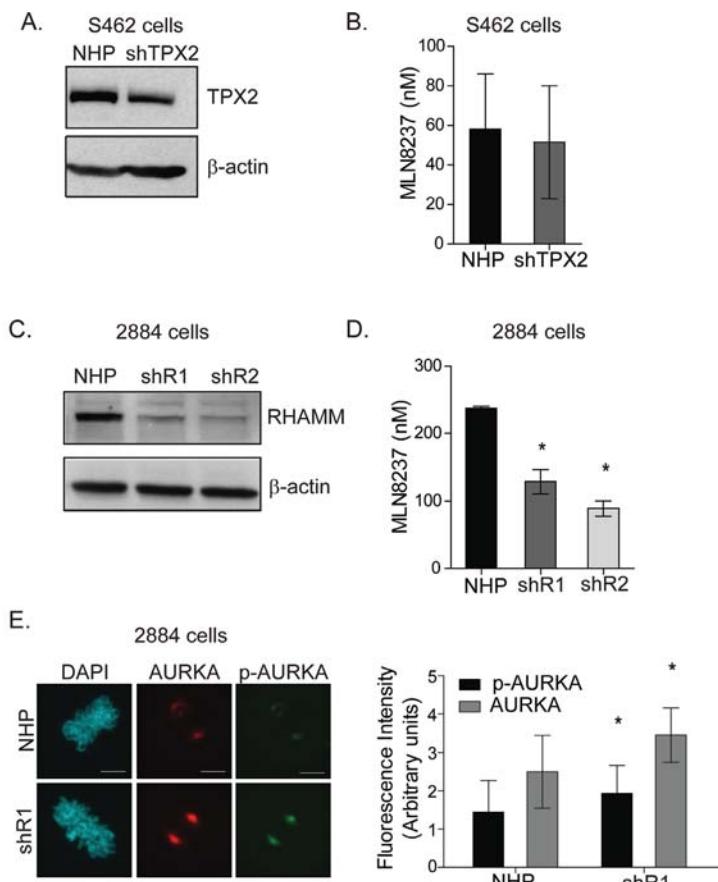


Figure 4: RHAMM depletion increases AURKA activity and sensitivity to AKI in 2884 cells. A. TPX2 was stably knocked down in S462 cells using shRNA mediated silencing of either TPX2 or a control non-hairpin (NHP) construct. β-actin served as a loading control. B. shTPX2 S462 cells experienced no significant differences in IC-50 to MLN8237 compared to NHP cells, error bars = SD, $n=3$. C. RHAMM was knocked down in 2884 cells with a similar shRNA expression system. Two redundant shRNAs were used, shR1 and shR2. β-actin served as a loading control. D. shR1 and shR2 cells experienced a 2 fold decrease in IC-50 in response to MLN8237 treatment compared to NHP cells, * p value<0.05, error bars = SD, $n=3$. E. Representative images of NHP and shR1 cells at metaphase stained for AURKA and pAURKA-T288. Scale bars = 5μm. Quantitation of fluorescent intensity of spindle poles was done using FV10-ASW software, * p value <0.05, error bars = SD.

Genomic imbalances in *HMMR/RHAMM* and *TPX2* regulate AURKA activity and the sensitivity of MPNST cells to AKIs

We postulated that the sensitivity of the S462

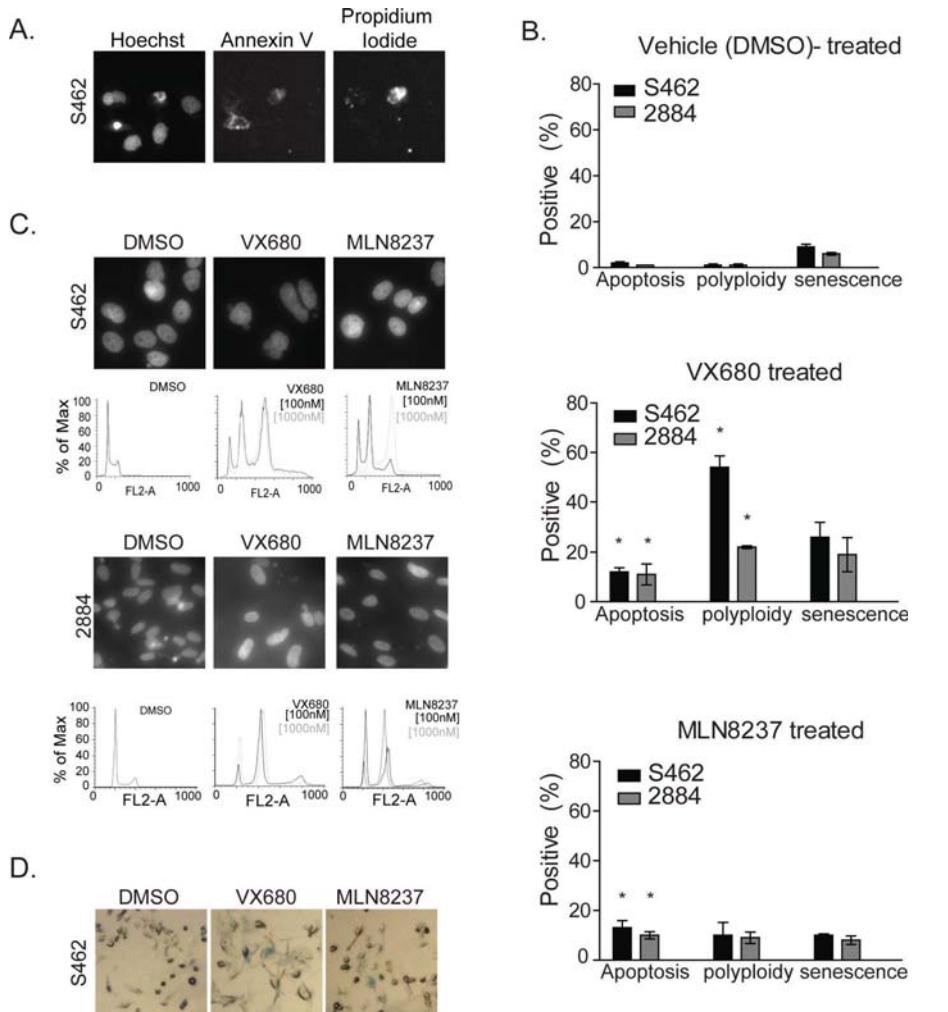


Figure 5: AKI treatment results in growth arrest, apoptosis, polypliody and cellular senescence in MPNST cell lines.
A. Treatment of S462 and 2884 cells with AKI for 48 hours resulted in low levels of apoptosis as detected by Annexin V staining by high content cell screening. Representative images are shown with non-viable, membrane permeable cells counter stained with propidium iodide (PI). B. Quantitation of cellular responses to AKI or vehicle treatments. * p value <0.05, error bars = SD, n=3 for apoptosis measurements, n=3 for polypliody and n=4 for senescence quantitation. C. S462 and 2884 cells were exposed to AKIs, or vehicle control, and changes in the nuclear content of treated cells was detected by PI staining and FACS analysis. S462 cells exposed to AKIs display larger G2/M and 8N fractions, indicative of an endoreduplication phenotype. Representative images of cells stained with DAPI are shown above the FACS profiles to illustrate the multi-nucleate phenotypes. D. Treatment of S462 cells with AKIs at IC-50 concentrations for 72 hours induces senescence activated β -gal expression in comparison to DMSO treated cells. Representative images were taken on an Axiovert 40 microscope (Zeiss).

and 2884 cell-lines to MLN8237 may reflect different levels of kinase activity, rather than AURKA abundance. Consistently, AURKA-mediated phosphorylation events were augmented in S462 cells, while the absolute levels of the substrate proteins remained relatively constant

(Fig 3A). So, we screened genomic DNA from each of the MPNST cell-lines on a high density oligonucleotide a-CGH platform for insight into a putative mechanism that accounts for the elevated kinase activity in S462 cells.

The 2885 cell-line displayed a relatively diploid genome, however, we identified copy number variation in the region surrounding *AURKA* in 2884 and S462 cells (Fig. S2A, B). In S462 cells, the region surrounding *TPX2* (20q11.2) was also amplified (Fig 3B). While in 2884 cells, the region surrounding *HMMR/RHAMM* (5q33.2-qter) was amplified (Fig 3B). These genomic imbalances implied that the S462 cell-line may express more TPX2, a protein that activates AURKA [12], and less RHAMM, a protein that sequesters TPX2 [11], and these imbalances may enhance AURKA activity. With quantitative genomic PCR, we confirmed the amplification of *TPX2* and *HMMR/RHAMM* in 2884 and S462 cells, respectively (Fig. 3C). Moreover, quantitative RT-PCR (Fig 3D) and quantitative immunoblot analysis (Fig. 3E) showed that the respective gene products were expressed in these cell-lines proportionate to the underlying genomic amplifications.

To investigate whether altering the expression of *TPX2* or *HMMR/RHAMM* is sufficient to modify MPNST cellular responses to AKI, we established stable S462 and 2884 sub-lines that express shRNA targeting *TPX2* or *HMMR/RHAMM*, respectively, as well as a non-hairpin (NHP) shRNA control. The growth kinetics for sub-lines did not differ significantly to NHP controls (Fig S3A, C). We silenced *TPX2* within S462 cells and, after drug selection, reduced TPX2 protein abundance by approximately 40% (Fig. 4A). However, the reduced expression of TPX2 did not alter the IC-50 for MLN8237 (Fig 4B) or VX680 (Fig S3B). Next, we silenced *HMMR/RHAMM* within 2884 cells with redundant constructs (shR1 and shR2) and achieved stable reduction of approximately 65% of RHAMM protein after drug selection (Fig. 4C). The IC-50 for MLN8237 (Fig 4D) and VX680 (Fig S3C) were significantly reduced in sub-lines in which *HMMR/RHAMM* was silenced. Moreover, the levels of AURKA and p-AURKA immunofluorescence intensity were both augmented at spindle poles in mitotic 2884 cells with stable shRNA-mediated silencing of RHAMM (Fig. 4E). These findings suggest that silencing of *HMMR/RHAMM* augments AURKA activity and sensitizes MPNST cells to AKI.

We sought to identify and modulate the responsible pathways behind the cytostatic effects of MLN8237 on MPNST cell-lines and focused our initial investigations on pathways that are frequently altered in cells treated with AKI, such as apoptotic cell death, arrest at the G2-M transition, endoreduplication, and replicative senescence [8]. Through high-content analysis of nuclei that stained positive for annexin V (marker for early apoptosis) but not for propidium iodide (PI, marker for necrotic death), we found that after 48 or 72 hours (not

shown) of MLN8237 treatment approximately 10% of cells were apoptotic regardless of the MPNST cell-line examined (Fig. 5A and 5B). Similar levels of apoptosis were also seen with exposure to VX680, which suggested that this cytostatic pathway may not account for the differential susceptibility of 2884 and S462 cells to these AKIs. Next, we examined the levels of polyploidy, as detected by immunofluorescence (DAPI counterstain) or fluorescent cytometry (PI) (Fig. 5C), and senescence, as measured through the activity of senescence activated beta-galactosidase [21] (Fig. 5D). After 72 hours exposure to VX680, but not to MLN8237, we found dramatic changes in gross nuclear morphology and the induction of senescence in both cell lines (Fig. 5B). Polyploidy was significantly more pronounced in S462 cells treated with VX680. However, it was only when the dose of MLN8237 was increased to 1 μ M that the levels of polyploidy observed by cytometry were significantly greater than vehicle-treated populations (Fig. 5C).

MLN8237 induces the differentiation of MPNST cancer stem-like cells

The levels of polyploidy, apoptosis or senescence did not explain the elevated sensitivity of S462 cells to MLN8237, so we investigated an alternative cytostatic pathway. As the S462 cell-line contains a subset of cancer stem-like cells [22] and small-molecule AKIs modify the cellular fates of mESCs and induced pluripotent stem cells [18, 19], we asked whether treatment with MLN8237 may promote the differentiation of these MPNST cancer stem-like cells. As a first step, we investigated the abilities of S462 and 2884 cell-lines to form spheroids when cultured under stem cell conditions. While no spheroids were identified in 2884 cultures, 5.6 ± 1.2% of S462 cells (168 ± 25 of 3,000 seeded) are capable of forming spheroids (Fig. 6A). Secondary passage formed significantly more spheres (Fig. 6A, labeled passage 1), which is consistent with a published report describing self-renewal of sphere-initiating cells in these cultures [22]. Next, we measured AURKA activity and found that p-AURKA, but not total AURKA, was elevated in dissociated sphere cells relative to parental adherent cells (Fig. 6B). To determine whether AURKA activity was necessary for the growth or self-renewal of MPNST spheres, S462 cells were seeded at low densities in the presence of either DMSO or IC-50 concentrations of MLN8237. By Day 6 (passage 0), sphere formation was significantly inhibited in cells treated with MLN8237 in comparison to the vehicle alone treated cells (166 to 29 spheres in the DMSO and MLN8237 treated cells, respectively. $p < 0.05$) (Fig 6C). When we dissociated spheres and re-seeded for a second passage, we found that the number of spheres formed was significantly reduced in the presence of MLN8237, which suggests that AURKA activity is necessary for the propagation and self-renewal

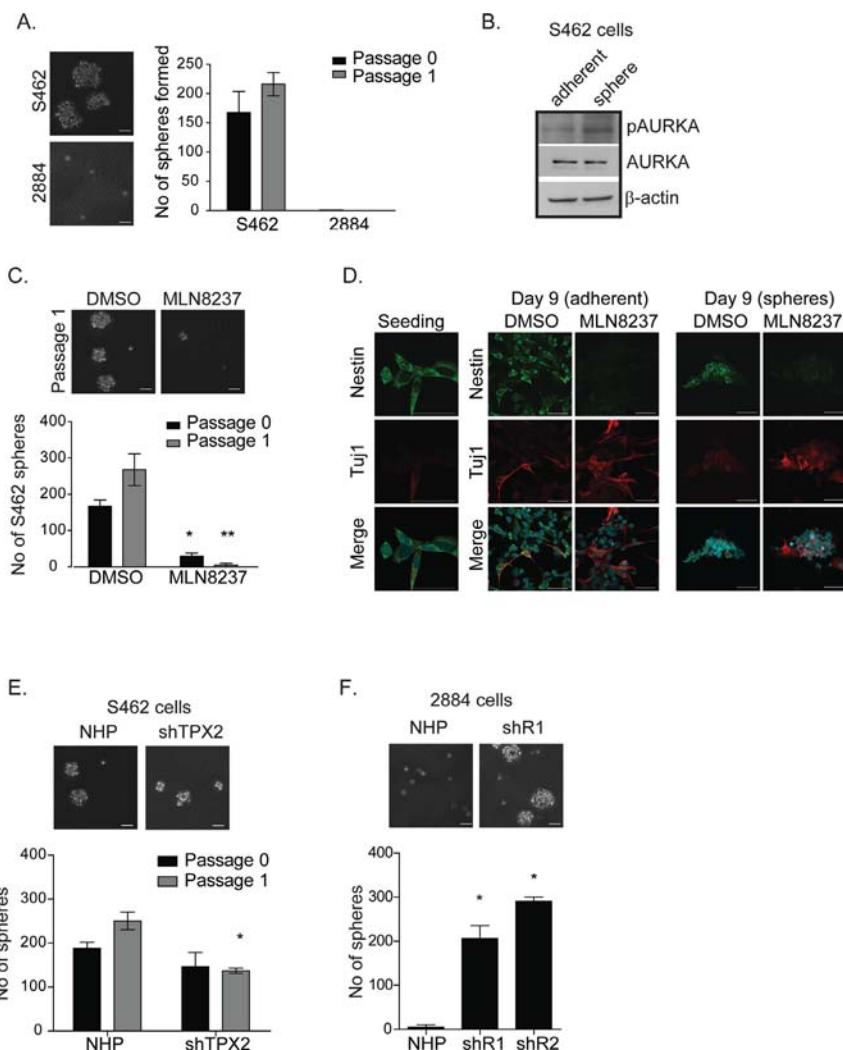


Figure 6: Inhibition of AURKA by MLN8237 limits self-renewal and induces neuronal differentiation of MPNST tumour initiating cells in vitro. *A.* S462 and 2884 cells were cultured in anchorage independent conditions in neurocult media and sphere formation was quantitated after 6 days (passage 0). Spheres were dissociated and cultured for a further 6 days and sphere formation was measured again (passage 1). S462 cells form spheres whereas, 2884 cells do not. Representative images on the left, scale bars = 50 μ m, quantitation on the right, error bars = SD, n=3. *B.* In comparison to adherent S462 cell lysates, sphere-enriched S462 lysates (sphere) contain higher levels of auto-activated pAURKA (Thr288) indicating increased AURKA activity in sphere versus adherent S462 cells. β -actin serves as a loading control. *C.* In comparison to DMSO (vehicle) treated controls, prolonged treatment of S462 with 100 nM MLN8237 inhibits the propagation (passage 0) and self-renewal (passage 1) of S462 cells cultured as spheres. Quantitation is shown below representative images. Scale bars equal 50 μ m. Error bars = SD, n=3, *p<0.05, **p<0.001. *D.* Dissociated sphere-enriched cells at passage 4 were fixed and stained for DAPI, nestin, and Tuj1 at day 0 and following 9 days of treatment with MLN8237 (50nM), or DMSO. Cells grew in both adherence and sphere phenotypes. While untreated cells maintain expression of nestin through the nine days of culture, MLN8237 treated spheres lost nestin expression and are positive for the neuronal marker, Tuj1 instead. Scale bars equal 50 μ m. *E.* shTPX2 and NHP S462 cells were grown in neurocult media. While there were no significant differences in sphere formation in passage 0, TPX2 knockdown is effecting the self-renewal of these spheres in passage 1, scale bars = 50 μ m, *p-value< 0.05, error bars = SD, n=3. *F.* shR1 and shR2 cells form significantly more spheres in neurocult media than NHP 2884 cells, indicating a role for RHAMM in sphere formation by modulating AURKA activity. Scale bars = 50 μ m, *p-value < 0.05, error bars = SD, n=3.

of sphere-enriched cancer stem-like cells.

Compared to vehicle treated cultures, spheres that formed in the presence of AKI were significantly smaller in size and less uniform in shape (Fig. 6C), which suggested to us the potential engagement of a differentiation pathway. To determine whether treatment with MLN8237 can influence the differentiation capacity of MPNST cells, we dissociated sphere-enriched cells and cultured them on matrigel for nine days in the presence of MLN8237 or vehicle control. Dissociated sphere cells then grew either as adherent colonies or as attached spheres on the matrigel-coated coverslips (Fig. 6D). At seeding and after nine days of culture, sphere cells were stained for nestin, a type IV intermediate filament protein and marker for neuroprogenitor cells, and Tuj1, a neuron-specific class III β -tubulin and neural differentiation marker [23]. We found that MLN8237 treatment, in relation to vehicle alone, modified the cellular fate of sphere cells and resulted in the loss of nestin staining, strong expression of the neuronal marker Tuj1, and morphological changes consistent with neurons, such as neurite-like extensions (Fig. 6D). In contrast, DMSO vehicle treated control cells maintained a round morphology and nestin expression, suggesting that adherent culture alone was not inducing their differentiation.

To investigate whether silencing of *TPX2* or *HMMR/RHAMM* expression, respectively, is sufficient to prevent or endow sphere-forming capacity on MPNST cell-lines, we cultured the S462 and 2884 sub-lines under stem cell conditions. Stable silencing of *TPX2* did not significantly alter the propagation of sphere-forming S462 cells in the first passage, but may have impacted their self-renewal capacity, as indicated by a significant reduction in the number of spheres formed during the second passage (Fig. 6E). However, the stable silencing of *HMMR/RHAMM* endowed 2884 cells with the capacity to both propagate and self-renew as sphere-forming cells (Fig 6F).

DISCUSSION

A recent study identified AKI as a viable treatment platform for MPNST by first modeling the disease in an animal model and then identifying differentially expressed genes, including *AURKA* [5]. In common with their report, we identified genomic amplification of *AURKA* in MPNST cell-lines (Fig S2B) and found that robust inhibition of growth *in vitro* followed the silencing of *AURKA* or the treatment of cells with AKI, which also stabilized the growth of two primary, human MPNST when grown as xenotransplants in animal models. By studying the responses of primary human MPNSTs grown *in vivo*, our animal models also contain non-neoplastic cells from the human tumour environment, which are critical for tumourigenicity [24]. However, we did not identify a significant level of endoreduplication downstream of AKI except at relatively high doses *in vitro* and within our

treated tumours *in vivo*, which may reflect concomitant inhibition of *AURKA* and *AURKB* at these dosages. Mitotic failure and polyploidy are common cellular response to inhibition of *AURKB* [8] and both MLN8237 *in vivo* treatment protocols (20 mg/kg/dose, twice daily or 30 mg/kg/dose, one daily) result in blood plasma levels in excess of 2.5 μ M [5, 7], which exceeds the described IC-50 against *AURKB* in cell-based assays [7]. We found, however, that a subset of sphere-enriched MPNST cells may engage a differentiation program in response to AKI.

To our knowledge, this is the first reported use of AKI to drive the differentiation of sphere-enriched cancer stem-like cells. We found that *AURKA* activity is critical to the propagation and self-renewal of MPNST sphere cells and that these phenotypes were responsive to the silencing of regulators for the kinase, such as *TPX2* and *HMMR/RHAMM*. A strong correlation has been drawn between *AURKA* expression and the maintenance of pluripotency in murine embryonic stem cells (mESCs) and, similar to our findings, silencing *AURKA* and treatment with AKI was sufficient to drive their differentiation [18]. In mESCs, this action of *AURKA* relies upon the phosphorylation and suppression of p53 activity, which may be a *TPX2*-independent action as silencing *TPX2* did not cause significant defects in self-renewal [18]. In our studies, however, we find that altering the abundance of either *TPX2* or *HMMR/RHAMM* was sufficient to modify the growth of MPNST cells as spheres in stem cell cultures. Thus, mitotic and non-mitotic roles for *AURKA* are likely to regulate the self-renewal and differentiation of sphere-enriched cancer stem-like cells, MESC self-renewal [18], and reprogramming of somatic cells to produce human induced pluripotent stem cells [19].

MPNSTs often resist chemotherapies and are prone to high rates of disease relapse [2-4]. Here, we find that AKI may potentiate the growth and self-renewal of MPNST spheroid forming cells, which suggests that these drugs may be effective against recurrent disease arising from a reservoir of cancer-stem like cells. Indeed, inhibitors for aurora kinases are effective against tumour cell lines that are refractory to EGFR inhibition [25, 26]. These cellular responses to AKI likely rely upon the activity of p53, which is often lost in MPNST [27] and is critical to the supervision of mitotic failure and tetraploidy [28, 29]. AKIs are sufficient to delay G2/M progression and the resolution of this delay, be it apoptosis or mitotic slippage followed by endoreduplication, relies upon the action of p53 [30]. Therefore, concurrent activation of the p53 pathway may be an important consideration when designing combination therapies for AKIs against MPNST. Such an approach has been shown to augment the pro-apoptotic actions of AKIs in cell-line models for carcinomas [31, 32].

Molecular-targeted single agent therapies often fail to demonstrate a significant survival benefit in patient populations in part due to our inability to predict tumour

responses. So, we aimed to understand and modulate the response of MPNST to AKI. Our study shows that the responses of MPNST cells *in vitro* to AKI treatment can be significantly altered by the silencing of key regulatory molecules. For example, silencing of *HMMR/RHAMM* in 2884 cells, which contain genomic amplification of 5q32-qter, significantly impacts the sensitivity to AKI and endows these cells with the ability to grow in stem cell culture, presumably through the release of TPX2 and activation of AURKA. Consistently, silencing of *HMMR/RHAMM* in breast epithelial cells modulates TPX2 location and augments kinase activity [11] while attenuation of *Xenopus* RHAMM (XRHAMM) may activate AURKA during anastral spindle assembly [33]. Genomic changes that accompany the transition of benign neurofibromas to MPNSTs occur at the *HMMR/RHAMM* locus [9], the *AURKA* locus [5](Fig. S2B) and chromosome 20q (containing *AURKA* and *TPX2*) [9, 15, 16]. Therefore, these genomic imbalances may endow a growth advantage to a subset of human primary MPNSTs but also make these tumours exquisitely sensitive to AKI.

Silencing of RHAMM may affect AURKA activity in a context or cell-type dependent manner. In multiple myeloma cells, RHAMM depletion protects against AKI treatment [34]. In *Xenopus*, XRHAMM depletion impaired TPX2 location and anastral assembly [13], which should reduce AURKA activity at sites of assembly. We believe these apparent contradictory findings are resolved by a bimodal model for RHAMM function. RHAMM is critical to the correct mitotic location of TPX2 [13, 14] and, therefore, its complete loss impairs TPX2-AURKA complex formation and attenuates kinase activity. However, RHAMM is also a substrate for the active kinase that negatively regulates AURKA activation through the sequestration of TPX2 [11]. Thus, the hemizygous loss of *HMMR/RHAMM*, or silencing its expression in 2884 cells with genomic amplification of 5q, may relax this negative feedback mechanism, augment kinase activity, and sensitize tumour cells to AKI.

Our studies indicate that hemizygous loss of *HMMR/RHAMM*, which occurs in approximately 50% of aggressive MPNST [9], may oncogene-addict tumours to AURKA activity and sensitize these cancers to AKI. This insight may be applied to other tumour subtypes. For example, variation in the genomic region surrounding *HMMR/RHAMM*, and the *HMMR/RHAMM* gene [11], modifies the risk to develop breast cancer in carriers of germline *BRCA1* mutations [35]. These carriers often develop breast tumours that do not express estrogen receptor, progesterone receptor or human epidermal growth factor receptor (HER-2), resemble basal epithelia by gene expression profiles (i.e. basal subtype), and are refractory to anti-estrogen therapy, hormone therapy, and targeted therapies directed against HER-2 [36]. The loss of 5qter, a genomic region surrounding *HMMR/RHAMM*, is a frequent event in basal subtype breast cancer [37],

and this genomic loss associates with an increase in the expression of AURKA in trans [38]. Thus, genomic loss of *HMMR/RHAMM* may indicate a subset of tumours that are reliant upon AURKA and highly susceptible to AKI.

In summary, our findings and those of Patel and colleagues [5] highlight AURKA as a new therapeutic target for MPNST. For the first time, we describe a pro-differentiation effect for AKI on a subset of sphere-enriched cancer stem-like cells and demonstrate that copy number alteration of regulatory gene-products, like *HMMR/RHAMM* and *TPX2*, can significantly impact the tumour cellular responses to these emerging therapies.

MATERIALS AND METHODS

In vivo animal models

Four-month-old male *NOD/SCID* mice were anesthetized with isoflurane and orthotopically implanted with 1 mm³ piece of explant tumour in both legs, near the sciatic nerve (Castellsagué et al. manuscript under preparation). Tumour volume was calculated at $V = (W^2 * L (\pi/6))$, where L is the longest diameter and W is the width. Mice were randomly assigned to treatment or control groups. Dosage of MLN8237 in mice was previously determined (31). Mice were treated by gavage once daily with 30mg/kg MLN8237 or vehicle (10% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin and 1% sodium bicarbonate) for 28 days. Tumours were measured every 3 days. At the end of the treatment period, mice were euthanized and harvested tumours were fixed in formalin.

Adherent culture and culture as spheres

Cell-lines were obtained from Drs. VF Mautner and L Kluwe (University Hospital Eppendorf, Germany) or the ATCC and were cultured as recommended. Unless noted otherwise, cells were seeded at 1.0×10^4 (S462 cell-line) or 3.0×10^4 (2884 and 2885 cell-lines) cells/well in 24-well culture plates and allowed to adhere for 24 hours prior to the denoted treatment. These seeding densities resulted in equivalent growth kinetics for S462 and 2884 cells. The culture of S462 spheres followed the protocol in [22].

siRNA and small molecule reagents

siRNA (Qiagen, Table S1) were transfected at 10 pmol/well using Lipofectamine2000™ according to manufacturer's protocols (Invitrogen). AURKA knockdown was confirmed at 48 hours post transfection. Small-molecule AKIs were dissolved and diluted in DMSO/DMEM and included the pan-aurora inhibitors

C1368 (Sigma) and VX680 (Selleck Chemicals), and the AURKA specific inhibitor MLN8237 (Selleck Chemicals).

Lentivirus mediated shRNA knockdown and generation of sub-lines

Lentivirus packaging, envelope and control non-hairpin (NHP) pLKO.1 plasmids (Addgene) were used with shRNA against RHAMM and TPX2 (Sigma) as described in [11] (Table S1). Transfected cells were selected with 0.5 μ g/ml puromycin (GIBCO) and maintained with 0.3 μ g/ml puromycin.

Immunofluorescence, immunohistochemistry, and immunoblot analyses

Antibodies were sourced as follows: RHAMM (Epitomics), TPX2 (Novus), nestin (Covance), Tuj1 (Covance), β -actin (Sigma), AURKA, phospho (p)-AURKA (Thr288), p-histone H3 (Ser10), and caspase 9 (Cell Signalling). The p-RHAMM (Thr703) polyclonal antibody is characterized in [11].

Cell-lines were fixed and permeabilized in methanol. Antibodies were diluted in PBS-0.1% Tween and 3% BSA (Sigma). Coverslips were mounted in 90% glycerol/PBS with DAPI (Invitrogen) and images were acquired and analyzed using an Olympus FV10i confocal microscope.

For immunofluorescence of spheres, coverslips were coated with 2% geltrex (Invitrogen) in Neurocult media (StemCell Technologies) before cells were plated. Cells were fixed with 4% PFA and then stained.

Immunohistochemistry on paraffin sections was done as in [11]. Secondary antibody staining was done with the relevant antibodies for 30 minutes at room temperature. Staining was visualized by 3,3-diaminobenzidine, with Hematoxylin as a counter-stain.

Western blot analyses were performed on lysates collected from sub-confluent MPNST cells lysed in modified RIPA buffer, as described [39]. Levels of protein were detected and quantified with the Odyssey infra-red imaging system (LI-COR) using IRDye 800- or IRDye 680-conjugated secondary antibodies (Rockland) or through chemiluminescence detection of HRP-conjugated antibodies (Sigma).

Genomic and reverse-transcriptase PCR and real-time PCR

Genomic DNA was extracted with the DNeasy extraction kit (Qiagen) and preparations were measured with a NanoDrop (Thermo-Fisher). For real-time, genomic PCR, reactions were run in triplicate with an Applied Biosystems 7000 series machine (Invitrogen). RNA was

extracted using the RNeasy kit (Qiagen), quantified with NanoDrop and converted to cDNA using AccessQuick (VWR) as per manufacturer's protocols. For primers and PCR conditions see Table S1. Results were analyzed using the $\Delta\Delta Ct$ method. Expression of transcript/gene was normalized to TATA box binding protein levels, which was then normalized to levels of transcript/gene in 2885 cells.

Array comparative genomic hybridization (a-CGH)

Genomic DNA was isolated using the Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen). Purified DNA was digested with Bovine DNase I (Ambion). Test and control samples were labelled with Alexa5 and Alexa3 dyes respectively using the BioPrime Total Genomic Labeling Kit (Invitrogen). Labeled samples were competitively hybridized to 2 x 400k Human CGH Arrays (Agilent Technologies) as recommended by the manufacturer. Copy number estimates were extracted from the microarray image files using Feature Extraction 10.5 (Agilent) and the data were analyzed in Agilent Genomic Workbench 6.5 (Agilent) after centralization and fuzzy zero normalization matrixes were applied. Copy number abnormalities were identified using the ADM-2 algorithm with a threshold setting of 5.5 and regions were only considered significant if they were defined by a minimum of 3 probes and the average \log_2 value exceeded a threshold of 0.2 (grey shaded regions).

Cell based assays

For cell viability assays, MPNST cell-lines were plated and after 24 hours were treated with carrier alone (0.1% DMSO) or AKIs at indicated concentrations. Viability was quantified after 72 hours by addition of 5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium (MTT, Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Each condition was done in triplicate and repeated three times. For growth curves, MTT assays were conducted at 24, 48, 72 and 96 hours after plating.

For nuclear content analysis by FACS, cells were harvested, fixed and stained as in [40] and analyzed with FACS Calibur and CellQuestPro software (BD Biosciences), respectively. For polyploidy analysis, AKI treated cells were stained with DAPI. Nuclei area was measured using Image J software. Annexin V (BD Biosciences) staining followed manufacturer's protocol. Images were collected with a High Content Analyzer (ArrayScan VTI, Cellomics).

Cellular senescence was measured by detection of senescence-activated β -Galactosidase activity. Cells were plated, treated with AKIs for 72 hours, fixed and stained as described in [21].

Statistics

Statistical significance was evaluated by unpaired two-tailed Student's t-tests with $p > 0.05$. Two way ANOVA was used to determine significance between treatments for *in vivo* tumour volumes using GraphPad Prism.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by the SickKids Foundation (CAM), the Children's Tumor Foundation (CAM and CL), the Michael Cuccione Foundation for Childhood Cancer Research (CAM), the Asociación Española de Afectados de Neurofibromatosis and Asociación Española contra el Cáncer (CL), the Spanish Health Research Fund; Carlos III Health Institute (CL); Catalan Health Institute and Autonomous Government of Catalonia (CL).

REFERENCE

1. Jett K and Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med.* 2010; 12(1):1-11.
2. Brems H, Beert E, de Ravel T and Legius E. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.* 2009; 10(5):508-515.
3. Woodruff JM. Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am J Med Genet.* 1999; 89(1):23-30.
4. Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A and Mautner VF. Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol.* 2007; 82(2):187-192.
5. Patel AV, Eaves D, Jessen WJ, Rizvi TA, Ecsedy JA, Qian MG, Aronow B, Perentesis J, Serra E, Cripe T, Miller SC and Ratner N. Ras-Driven Transcriptome Analysis Identifies Aurora Kinase A as a Potential Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Therapeutic Target. *Clin Cancer Res.* 2012.
6. Barr AR and Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 17):2987-2996.
7. Manfredi MG, Ecsedy JA, Chakravarty A, Silverman L, Zhang M, Hoar KM, Stroud SG, Chen W, Shinde V, Huck JJ, Wyson DR, Janowick DA, Hyer ML, Leroy PJ, Gershman RE, Silva MD, et al. Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel *in vivo* pharmacodynamic assays. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(24):7614-7624.
8. Lens SM, Voest EE and Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(12):825-841.
9. Mantripragada KK, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Ferner RE, Frayling IM, Dumanski JP, Guha A, Mautner V and Upadhyaya M. High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(4):1015-1024.
10. Jiang J, Casalegno-Garduno R, Chen H, Schmitt A, Schmitt M and Maxwell CA. Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis. *ScientificWorldJournal.* 2010; 10:1244-1257.
11. Maxwell CA, Benitez J, Gomez-Baldo L, Osorio A, Bonifaci N, Fernandez-Ramires R, Costes SV, Guino E, Chen H, Evans GJ, Mohan P, Catala I, Petit A, Aguilar H, Villanueva A, Aytes A, et al. Interplay between BRCA1 and RHAMM regulates epithelial apicobasal polarization and may influence risk of breast cancer. *PLoS Biol.* 2011; 9(11):e1001199.
12. Bayliss R, Sardon T, Vernos I and Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell.* 2003; 12(4):851-862.
13. Groen AC, Cameron LA, Coughlin M, Miyamoto DT, Mitchison TJ and Ohi R. XRHAMM functions in random-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. *Curr Biol.* 2004; 14(20):1801-1811.
14. Maxwell CA, Keats JJ, Belch AR, Pilarski LM and Reiman T. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. *Cancer Res.* 2005; 65(3):850-860.
15. Schmidt H, Wurl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen HJ and Hinze R. Genomic imbalances of 7p and 17q in malignant peripheral nerve sheath tumors are clinically relevant. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999; 25(3):205-211.
16. Schmidt H, Taubert H, Meye A, Wurl P, Bache M, Bartel F, Holzhausen HJ and Hinze R. Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease. *Cancer Lett.* 2000; 155(2):181-190.
17. Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP and Golemis EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell.* 2007; 129(7):1351-1363.
18. Lee DF, Su J, Ang YS, Carvajal-Vergara X, Mulero-Navarro S, Pereira CF, Gingold J, Wang HL, Zhao R, Sevilla A, Darr H, Williamson AJ, Chang B, Niu X, Aguiló F, Flores ER, et al. Regulation of embryonic and induced pluripotency by aurora kinase-p53 signaling. *Cell Stem Cell.* 2012; 11(2):179-194.
19. Li Z and Rana TM. A kinase inhibitor screen identifies small-molecule enhancers of reprogramming and iPS cell generation. *Nat Commun.* 2012; 3:1085.
20. Ding J, Swain JE and Smith GD. Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in

- mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2011; 78(2):80-90.
21. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J and Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betaGal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; 4(12):1798-1806.
 22. Spyra M, Kluwe L, Hagel C, Nguyen R, Panse J, Kurtz A, Mautner VF, Rabkin SD and Demestre M. Cancer stem cell-like cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors. *PLoS One.* 2011; 6(6):e21099.
 23. Memberg SP and Hall AK. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol.* 1995; 27(1):26-43.
 24. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK and Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science.* 2002; 296(5569):920-922.
 25. Astsaturov I, Ratushny V, Sukhanova A, Einmaron MB, Bagnyukova T, Zhou Y, Devarajan K, Silverman JS, Tikhmyanova N, Skobeleva N, Pecherskaya A, Nasto RE, Sharma C, Jablonski SA, Serebriiskii IG, Weiner LM, et al. Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. *Sci Signal.* 2010; 3(140):ra67.
 26. Hoellein A, Pickhard A, von Keitz F, Schoeffmann S, Piontek G, Rudelius M, Baumgart A, Wagenpfeil S, Peschel C, Dechow T, Bier H and Keller U. Aurora kinase inhibition overcomes cetuximab resistance in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncotarget.* 2011; 2(8):599-609.
 27. Rubin JB and Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1 - a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(7):557-564.
 28. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT and Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature.* 2005; 437(7061):1043-1047.
 29. Shi Q and King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature.* 2005; 437(7061):1038-1042.
 30. Nair JS, Ho AL and Schwartz GK. The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle.* 2012; 11(4):807-817.
 31. Rao B, van Leeuwen IM, Higgins M, Campbell J, Thompson AM, Lane DP and Lain S. Evaluation of an Actinomycin D/VX-680 aurora kinase inhibitor combination in p53-based cyclotherapy. *Oncotarget.* 2010; 1(7):639-650.
 32. Cheok CF, Kua N, Kaldis P and Lane DP. Combination of nutlin-3 and VX-680 selectively targets p53 mutant cells with reversible effects on cells expressing wild-type p53. *Cell Death Differ.* 2010; 17(9):1486-1500.
 33. Joukov V, Groen AC, Prokhorova T, Gerson R, White E, Rodriguez A, Walter JC and Livingston DM. The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell.* 2006; 127(3):539-552.
 34. Shi Y, Reiman T, Li W, Maxwell CA, Sen S, Pilarski L, Daniels TR, Penichet ML, Feldman R and Lichtenstein A. Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood.* 2007; 109(9):3915-3921.
 35. Nathanson KL, Shugart YY, Omaruddin R, Szabo C, Goldgar D, Rebbeck TR and Weber BL. CGH-targeted linkage analysis reveals a possible BRCA1 modifier locus on chromosome 5q. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(11):1327-1332.
 36. Foulkes WD, Smith IE and Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363(20):1938-1948.
 37. Waddell N, Arnold J, Cocciardi S, da Silva L, Marsh A, Riley J, Johnstone CN, Orloff M, Assie G, Eng C, Reid L, Keith P, Yan M, Fox S, Devilee P, Godwin AK, et al. Subtypes of familial breast tumours revealed by expression and copy number profiling. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123(3):661-677.
 38. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012; 486(7403):346-352.
 39. Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G and Pilarski LM. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell.* 2003; 14(6):2262-2276.
 40. Maxwell CA, Fleisch MC, Costes SV, Erickson AC, Boissiere A, Gupta R, Ravani SA, Parvin B and Barcellos-Hoff MH. Targeted and nontargeted effects of ionizing radiation that impact genomic instability. *Cancer Res.* 2008; 68(20):8304-8311.

Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.

Supplemental Material

Table S1: PCR conditions, primers, shRNA and siRNA in MPNST cell lines.

Genomic DNA targeted primers span intro-exon boundaries.

Gene	Target	Region	Primer pair
<i>HMMR</i>	Genomic	Intron 9-Exon 10	5' GCTGAAAGGCTGGTCAAGC 3' 5'CCAACCTAACACGCTCACAT 3' 5 cycles at 95°C for 5 minutes, 60°C for 60s and 72°C for 60s, and 35 cycles at 95°C for 60s, 60°C for 30s and 72°C for 30s (for all qPCRs)
	Message	Exon 9-Exon 10	5' TGTGCTTCAGATCAAGTGG 3' 5' CGTTGTGTTCTCTATTCCCTG 3' 95°C for 60s, 60°C for 30s and 72°C for 30s for 35 cycles (for all qRT-PCRs)
<i>TPX2</i>	Genomic	Exon 1-Intron 2	5' AAACCACAGGTAAGGCAGTGAC 3' 5' TCACCCACTATCCCACCTCT 3'
	Message	Exon 5	5' AGCCTTCAACCTGTCCAAGGA 3' 5' AGACAGGGTCTTGCTCCGTCA 3'
<i>RHAMM</i>	shRNA		5' CGTCTCCTCTATGAAGAACTA 3' 5' GCCAACTCAAATCGGAAGTAT 3'
<i>TPX2</i>	shRNA		5' CCGAGCCTATTGGCTTGATT 3'
<i>AURKA</i>	siRNA		5'TCCCAGCGCATTCTTTGCAA 3' 5' CAGGGCTGCCATATAACCTGA 3' 5' CACGTGCTCTACCTCCATT 3' 5' CACCTCGGCATCCTAATATT 3'

Supplementary Figure Legends

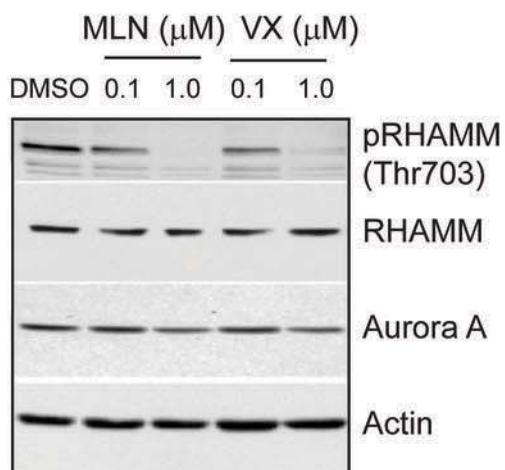
Supplementary Figure 1: Aurora kinase inhibitors are effective in decreasing kinase activity. *A.* S462 cells were treated with 1x (100 nM) and 10x IC-50 (1000nM) doses of MLN8237 and VX680 inhibitors. Immunoblot analysis shows that inhibition of the kinase reduced the levels of p-RHAMM in a dose-dependent manner after 3 hours, while overall levels of Aurora A and RHAMM remain stable with treatment. β -actin serves as a loading control. *B.* VX680- treated HeLa cells also have reduced levels of the active kinase (p-Aurora (Thr288)) and two substrates (p-RHAMM (Thr703) and p-Histone H3(Ser10)) as detected by immunofluorescence. Scale bars represent 5 μ m. *C.* MTT assays indicate different IC-50s for the three different inhibitors, with MLN8237and VX680 being the most potent while a commercially available inhibitor, termed C1368, is less potent. MPNST cells were treated with increasing doses of AKIs and cell viability was measured after 72 hours. Error bars = SEM, n=3.

Supplementary Figure 2: Comparative genomic hybridization (CGH) in MPNST cell lines show amplifications in *AURKA*. *A.* CGH of the entire genome of the MPNST cell lines 2885, 2884 and S462. *B.* CGH of the *AURKA* locus highlighting the amplification of this region in both the S462 and 2884 cell lines but not the 2885 line.

Supplementary Figure 3: Growth kinetics and the effect of VX680 on shTPX2, shR1 and shR2 lines. *A.* S462 cells with shRNA mediated silencing of TPX2 have similar proliferation rates to their non-hairpin (NHP) controls. Cell viability was measured by MTT assays at 24, 48, 72 and 96 hours and normalized to Day 1. Error bars = SD. *B.* IC-50s of VX680 treatment on

shTPX2 and NHP S462 cells. Cell viability was measured after 72 hours of VX680 treatment at various concentrations by MTT assays. Error bars = SD, n=3. *C.* Growth kinetics of shR1, shR2 and NHP transfected 2884 cells were not significantly different. Cell viability was measured by MTT assays at 24, 48, 72 and 96 hours and normalized to Day 1. Error bars = SD. *D.* IC-50s of VX680 treatment on shR1, shR2 and NHP 2884 cells. Cell viability was measured after 72 hours of VX680 treatment at various concentrations by MTT assays, p value <0.05, error bars = SD, n=3.

A.



B.

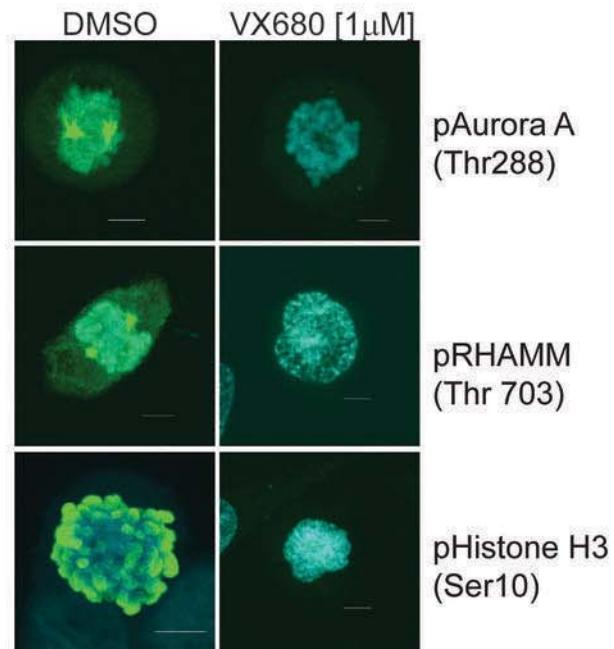


Figure S1

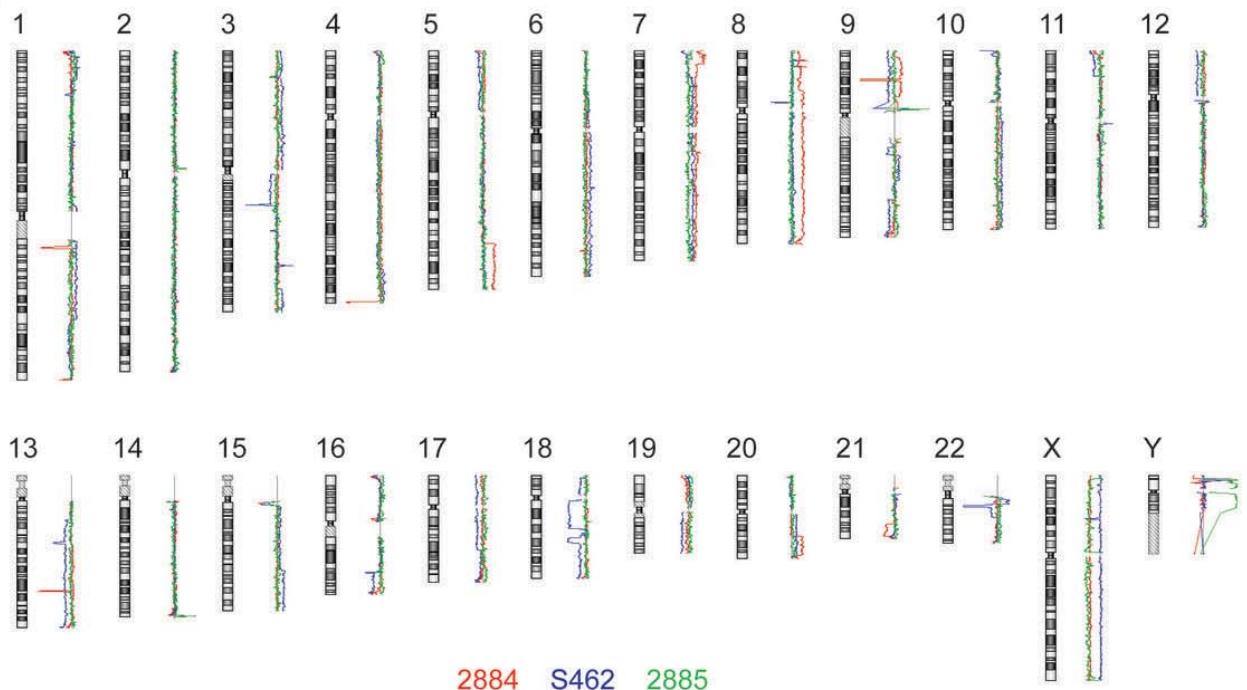
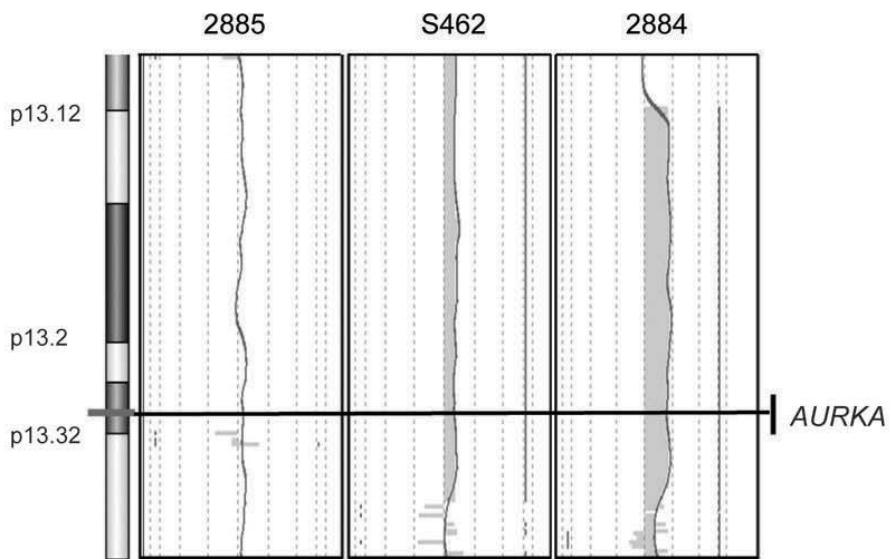
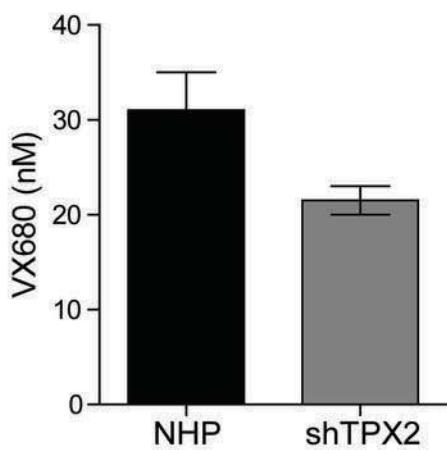
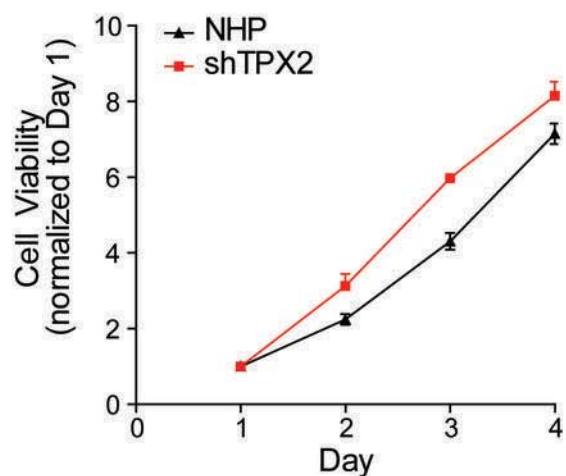
A.**B.**

Figure S2

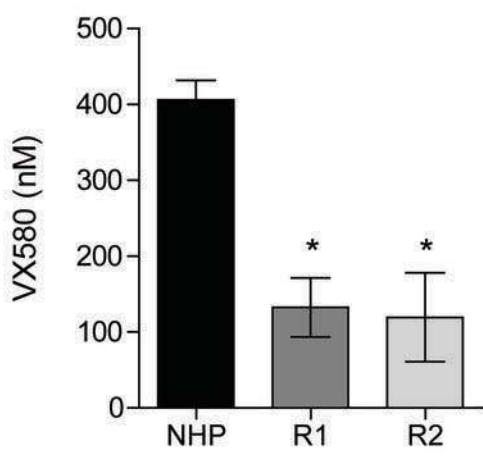
A.



B.



C.



D.

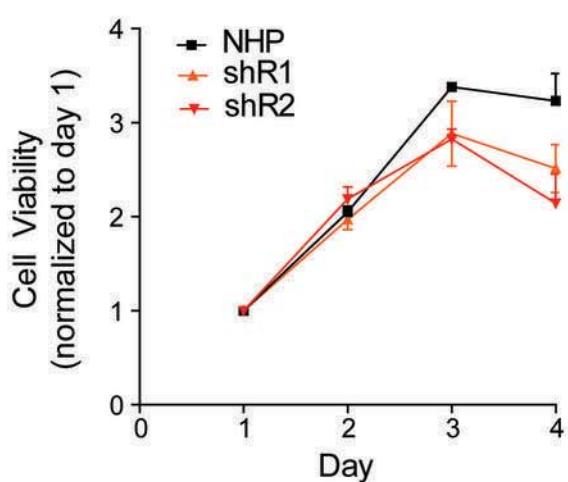


Figure S3

**4. ESTUDI *IN VIVO* DEL RECEPTOR HER3 EN MODELS
ORTOXENÒGRAFTS DE MPNST.**

RESULTATS NO PUBLICATS

Estudi *in vivo* de la inhibició del receptor HER3 en models ortoxenògrafts de MPNST

En un projecte col·laboratiu entre el nostre grup i el grup d'Anatomia Patològica de la Vall d'Hebron es va valorar per immunohistoquímica l'expressió del receptor HER3 en una sèrie de 14 MPNST primaris de pacients diagnosticats entre 2002 i 2009. Els resultats obtinguts van mostrar una sobreexpressió d'aquest receptor en el 50% dels tumors analitzats (Figura 9).

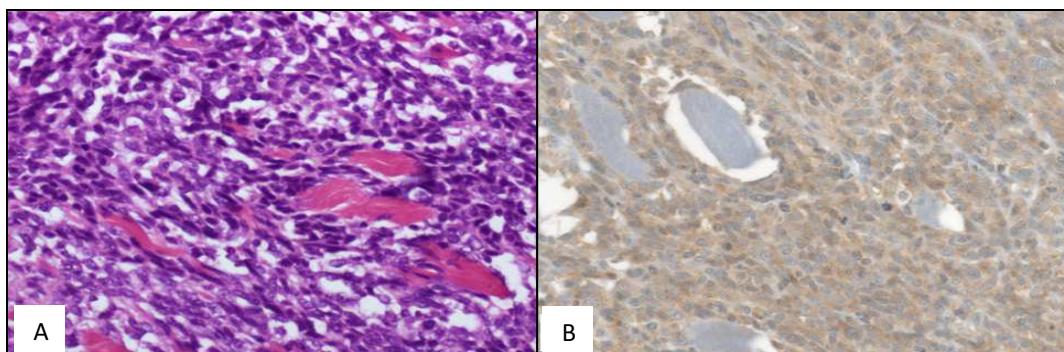


Figura 9. Exemple d'una de les tincions per Hematoxilina-Eosina (A) amb la seva respectiva immunohistoquímica de sobreexpressió d'HER3 (B) d'un dels MPNST primaris estudiats.

Tenint en compte els resultats del grup de Vall d'Hebron es va decidir analitzar l'expressió de tres receptors tirosin cinasa (EGFR, HER2 i HER3) en quatre dels nostres models de MPNST ortoxenògrafts. L'avaluació de les immunohistoquímiques es va realitzar tenint en compte la intensitat de les tincions i el percentatge de cèl·lules positives respecte el total de cèl·lules. Els resultats obtinguts van mostrar una sobreexpressió dels tres receptors en el model MPNST-NF1-001, d'EGFR i HER3 en el MPNST-NF1-002, una sobreexpressió només d'EGFR en el model MPNST-SP-001 i un nivells mitjans de sobreexpressió d'EGFR i HER3 en el MPNST-SP-002 (Taula 5).

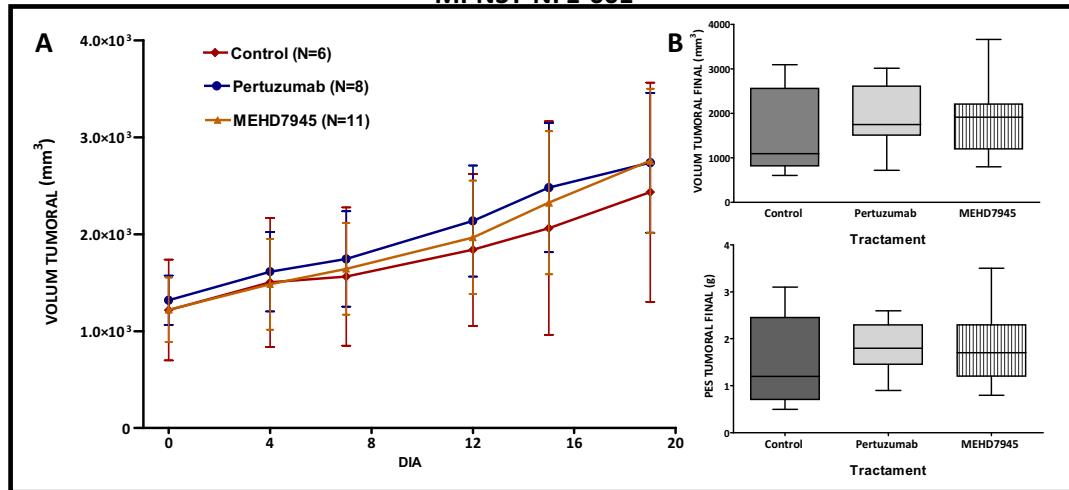
Taula 5. Taula dels resultats de les immunohistoquímiques dels diferents receptors HER

TUMOR ORTOXENÒGRAFT	EGFR		HER2		HER3	
	Intensitat	Percentatge	Intensitat	Percentatge	Intensitat	Percentatge
MPNST-NF1-001	3	100	2	80	2	100
MPNST-NF1-002	3	100	1	40	1	70
MPNST-SP-001	2	80	0	0	0	0
MPNST-SP-002	2	50	1	30	1	50

Amb tota aquesta informació es va decidir realitzar un estudi preclínic per testar la eficàcia de tres fàrmacs diferents: MEHD7945A (inhibidor d'HER2/3), pertuzumab (inhibidor d'EGFR/HER3) i lapatinib (inhibidor d'EGFR/HER2) en dos dels models de MPNST ortoxenògrafts generats pel nostre grup. Concretament es van utilitzar un MPNST esporàdic (MPNST-SP-001) i un MPNST en el context de la NF1 (MPNST-NF1-001). El tractament es va iniciar un cop els tumors van assolir 1.000-2.000 mm³ i els ratolins van ser dividits a l'atzar en diferents grups (N=6-12). Els diferents tractaments van consistir en: control, on no se'ls va administrar cap fàrmac; MEHD7945A, dues dosis (25mg/Kg) setmanals amb injecció intraperitoneal; pertuzumab, una dosi (40mg/Kg) setmanal amb injecció intraperitoneal i finalment, lapatinib, 5 dosis (100mg/Kg) setmanals amb administració oral (aquest tractament només es va poder realitzar en el model esporàdic). Aquestes dosis van ser escollides segons estudis preclínics previs en models de xenògrafts (Chu et al, 2012; Schaefer et al, 2011)(Yamashita-Kashima et al, 2011). Per a la preparació del MEHD7945A i el pertuzumab es va dissoldre el fàrmac directament en sèrum fisiològic a la concentració desitjada i per la preparació del lapatinib es va dissoldre el fàrmac en una solució 0,5% carboximetil cel·lulosica-0,1% Tween 80 (Sigma) (Juliachs et al, 2013). La durada dels tractaments va variar en funció del creixement dels tumors, segons els criteris de punt-final marcat pel nostre centre. Un cop iniciat el tractament els tumors es van mesurar cada 2-3 dies amb un peu de rei i el volum tumoral es va calcular seguint la formula $v=(w^2l/2)$, on l és el diàmetre llarg i w l'ample. Un cop acabat el tractament els ratolins es van sacrificar i els tumors van ser mesurats i pesats novament i ràpidament processats per diferents finalitats.

Els resultats obtinguts van mostrar que els tres fàrmacs utilitzats no provocaven una disminució de la progressió tumoral respecte el grup control en cap dels dos models de MPNST (Figura 10). A més a més, un cop extirpats els tumors, tampoc varem obtenir diferències significatives en quan al volum i al pes tumoral entre els ratolins tractats i el grup controls (Figura 10).

MPNST-NF1-001



MPNST-SP-001

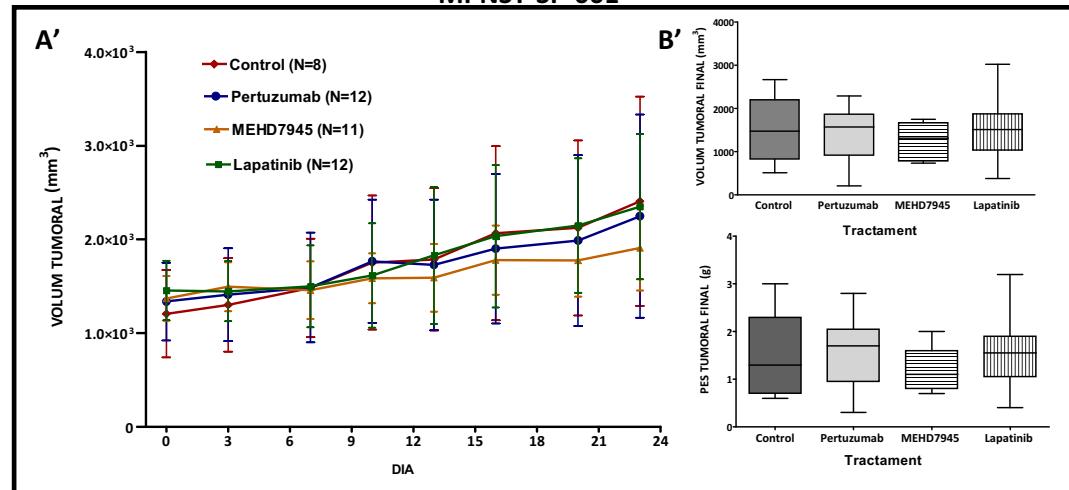


Figura 10. **A i A'**; Representació gràfica de la mitjana del volum tumoral i les seves desviacions estàndard del grup control i els diferents tractaments al llarg del temps. En dos models ortoxenògrafts de MPNST. **B i B'**; Distribució del volum tumoral final i els pes final després del sacrifici dels ratolins un cop finalitzats els tractaments.

DISCUSSIÓ

PART 1:

En aquest treball es descriuen dos possibles mecanismes biològics que podrien explicar el fenotip lleu que presenta una pacient NF1: el mosaïcisme somàtic i la presència d'una mutació d'splicing *NF1* lleu. A més a més, s'utilitzen oligòmers morfolino antisentit per tractar cèl·lules d'aquesta pacient, que presenta una mutació intrònica al gen *NF1*, per revertir l'efecte de la mutació

MOSAÏCISME I PROLIFERACIÓ CLONAL

Els resultats obtinguts indiquen que la clínica lleu de la pacient pot ser deguda en part a un cert grau de mosaïcisme somàtic, ja que el percentatge de cèl·lules portadores de la mutació varia entre els diferents teixits analitzats. D'altra banda la mutació identificada es troba en cèl·lules provinents de les tres capes embrionàries, la qual cosa suggereix que la mutació es va donar en etapes primerenques del desenvolupament embrionari. A més a més, les manifestacions clíiques de la pacient, es troben per tot el cos, a diferència dels casos de mosaïcisme segmental, en els quals només es veu afectada una regió concreta del cos, ja que només una part limitada del cos presenta la mutació somàtica (Maertens et al, 2007; Messiaen et al, 2011).

El gen *NF1* presenta una de les taxes de mutació més elevades del genoma humà, cosa que fa que aproximadament el 50% dels pacients siguin casos esporàdics de la malaltia degut a una mutació *de novo* en el gen *NF1*. Tot i així, es desconeix el paper real del mosaïcisme somàtic en els casos esporàdics de NF1 (Roehl et al, 2011; Kehrer-Sawatzki et al, 2012). S'han descrit casos de mosaïcisme germinal (Lazaro et al, 1994; Bottillo et al, 2010; Trevisson et al, 2014), mosaïcisme generalitzat (Messiaen et al, 2011; Zhou et al, 2012; Hardin et al, 2014), mosaïcisme segmental (Kehrer-Sawatzki & Cooper, 2008; Messiaen et al, 2011) i mosaïcisme gonosòmic per casos de NF1 (Callum et al, 2012).

Des del punt de vista clínic, els pacients NF1 amb mosaïcisme generalitzat són difícils de diferenciar dels pacients portadors de mutacions germinals en el gen *NF1*. En canvi el mosaïcisme segmental és molt més fàcil de detectar ja que les manifestacions clíiques es troben focalitzades en una àrea concreta del cos. A nivell molecular s'han descrit diversos casos de mosaïcisme segmental provocat per mutacions puntuals (Consoli et al, 2005; Maertens et al, 2007) i per grans deleccions (Tinschert et al, 2000; Maertens et al, 2007; Messiaen et al, 2011), i casos de mosaïcisme generalitzat provocat principalment per gran deleccions (Messiaen et al, 2011; Hardin et al, 2014). De manera que la nostra pacient va ser el primer cas descrit de mosaïcisme generalitzat provocat per

una mutació puntual intragènica, tot i que a data d'avui s'han publicat altres estudis similars (Zhou et al, 2012).

La presència de diferents proporcions de l'al·lel mutat en teixits derivats de les tres capes embrionàries implicaria que la mutació somàtica ha tingut lloc abans de la seva separació. Això explicaria que totes les cèl·lules derivades de l'endoderm i mesoderm portin la mutació, en canvi només entre un 40-60% de les cèl·lules derivades de l'ectoderm són portadores de la mutació, ja que observem freqüències de l'al·lel mutat entre un 20-30%.

El fet que el nombre de cèl·lules portadores de la mutació sigui major en els teixits derivats principalment de l'endoderm i el mesoderm i menor en els teixits derivats de l'ectoderm podria ser una de les causes de la clínica lleu de la pacient, ja que l'ectoderm és la capa embrionària a partir de la qual es deriven les cèl·lules de la cresta neural i per tant, que donen lloc a la majoria de trets clínics característics de la NF1 (Maertens et al, 2007).

D'altra banda varem analitzar més profundament el complex mosaïcisme presentat per la pacient emprant tècniques basades en l'estudi de la inactivació del cromosoma X (XCI; de l'anglès, *X chromosome inactivation*) en els mateixos teixits analitzats prèviament. La XCI és un procés mitjançant el qual a les primeres etapes del desenvolupament embrionari (blastòcit) s'inactiva aleatoriament una de les còpies del cromosoma X a les cèl·lules de les femelles. Quan una mutació genètica té lloc després d'aquesta inactivació (Figura 11), es pot realitzar el test de XCI en diferents teixits per tal de determinar si existeix algun biaix entre les proporcions de la inactivació d'ambdós cromosomes X i comparar aquest resultats amb la proporció de cèl·lules portadores de la mutació genètica en qüestió (Wang et al, 2009).

L'anàlisi del nombre de repeticions CAG en el gen *HUMARA*, localitzat en el cromosoma X, és un bon marcador per diferenciar els dos cromosomes X parentals i l'estudi de l'estat de metilació permet distingir el cromosoma X actiu de l'inactiu. Quan no existeix una diferència proliferativa (avantatge o desavantatge) entre les cèl·lules amb la mutació i les normals, s'espera un resultat d'un 50% d'inactivació per cada cromosoma X en tots els teixits, degut a una activació totalment aleatòria. Per conveni, una biaix lleuger en la XCI està definit en un quocient al·lèlic d'inactivació del 80-90% i un biaix extrem de XCI en un quocient al·lèlic de inactivació de més del 90% (Beever et al, 2003; Kimani et al, 2007).

Els nostres resultats mostren un biaix de XCI a la sang, la saliva i l'uroepiteli, amb uns quocients de 12:88, 15:85 i 10:90, respectivament. Cap de les altres mostres de la pacient, ni els grup de mostres control de DNA de sang, mostren biaix en la XCI. Concordant amb aquestes desviacions, els teixits amb la proporció de cèl·lules mutades

més altes coincideix amb aquells que mostren un biaix més alt en la XCI. A més a més, tots aquests teixits, presenten el mateix alel inactivat, descartant així la possibilitat d'una XCI purament aleatòria. Aquests resultats suggereixen un avantatge proliferatiu de les cèl·lules portadores de la mutació en el gen *NF1*, provocant una proporció més alta de cèl·lules mutades i de cèl·lules amb un alt biaix de XCI (Figura 11). Per tant, aquestes diferències proliferatives suggereixen que les proporcions observades de cèl·lules mutades en els teixits adults analitzats en el nostre estudi, no reflecteixen el percentatge inicial de cèl·lules mutades en les diferents capes embrionàries. Tot i així, aquest resultats s'han d'interpretar amb cura ja que ha estat reportat que els quocients de la XCI poden variar entre teixits dins d'un mateix individu (Sharp et al, 2000).

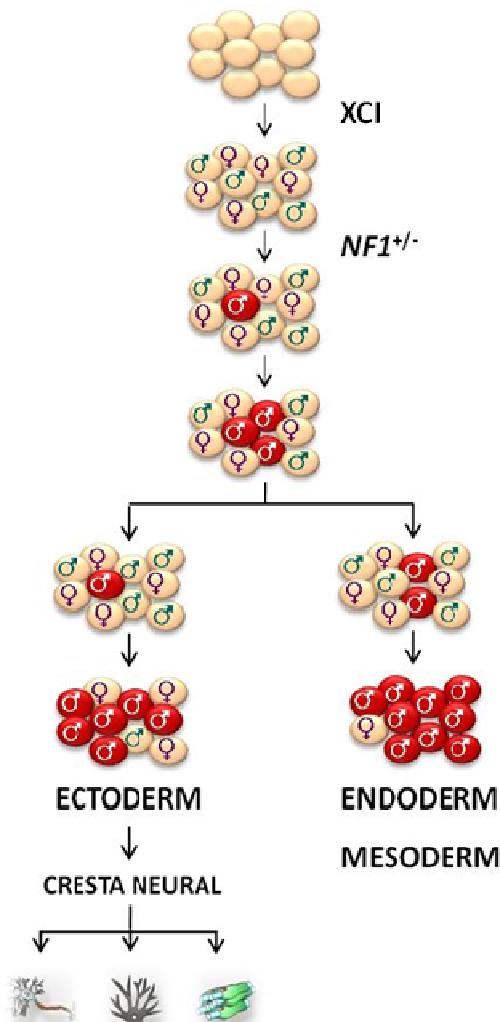


Figura 11. Representació esquemàtica del desenvolupament embrionari i el moment en que tenen lloc la XCI i la mutació del pacient ($NF1^{+/−}$) (Modificat de Roehl et al., 2011). Els símbols ♀ i ♂ representen el cromosoma X parental inactivat. En vermell es representa les cèl·lules portadores de la mutació.

PRESÈNCIA D'UNA MUTACIÓ NF1 LLEU

L'altra possible causa de la clínica lleu observada en aquesta pacient NF1, podria ser la producció de transcrits salvatges per part de l'al·lel portador de la mutació. Així, es va procedir a l'estudi de la proporció de transcrits salvatges i mutats en diferents teixits de la pacient. El resultat va mostrar, amb un cert grau de variació entre mostres, una proporció de transcrit mutat molt baixa. Tenint en compte la comparació de la proporció dels transcrits mutats amb el percentatge de DNA mutat en els mateixos teixits, caldria esperar un proporció de 50:50 per cada transcrit (aberrant i normal) en aquells teixits on la mutació ha estat detectada en el 50% de les cèl·lules, com són els casos de l'uroepiteli i la sang. En els casos dels fibroblast, de les cèl·lules epitelials bucats o el cabell, caldria esperar uns percentatges de transcrits aberrants més baixos, ja que el percentatge de cèl·lules amb la mutació, és inferior (20-35%).

Tanmateix, cal tenir en compte que la mutació estudiada genera transcrits amb un codó d'aturada prematur susceptible de ser degradats pel mecanisme de NMD, i que per tant, els nivells de transcrits aberrants podrien ser més baixos dels que caldria esperar. Per estudiar més a fons aquesta possibilitat es van quantificar el percentatge de transcrits salvatges i aberrants en cultius curts de limfòcits i fibroblasts tractats amb puromicina, agent que evita la degradació de transcrits amb codó d'aturada prematur. Els resultats mostren un increment dels nivells de transcrits aberrants, comparats amb les mostres no tractades, però en cap cas superen el 20%. Per tant, la diferència entre les proporcions de transcrits observades i les esperades, fins i tot després d'inhibir el procés de NMD, suggereix la possibilitat que l'al·lel mutat també produeix transcrits normals, implicant una proporció més baixa de transcrits aberrants.

Per confirmar aquesta hipòtesi, es van construir minigens portadors de la mateixa mutació de la pacient i amb la seqüència salvatge. Els resultats obtinguts van demostrar que el minigen amb la mutació, era capaç de produir transcrits normals, a més a més dels transcrits mutats. Aquest fet confirma que la baixa proporció de transcrits mutats observada a les mostres de la pacient era parcialment explicada per la producció de transcrits normals per part de l'al·lel mutat. Per tant, el fenotip lleu observat en la pacient, podria ser parcialment explicat perquè la mutació actua com un al·lel hipomòrfic en lloc de nul.

Aquests resultats confirmen que la clínica lleu de la pacient és parcialment explicada per la benignitat de la mutació *deep intronic*, establint una nova correlació genotip-fenotip i proporcionen un exemple de la complexitat molecular que hi ha darrera de cada mutació i com aquestes poden influir directament en el fenotip de la malaltia. A més a més aquests resultats ressalten la dificultat i complexitat molecular en l'avaluació de les correlacions genotip-fenotip.

TRACTAMENT AMB OLIGONUCLEÒTIDS ANTISENTIT MORFOLINOS

El tractament amb oligonucleòtids antisentit és una aproximació terapèutica interessant per mutacions localitzades a zones internes de l'intró (*deep intronic mutations*), ja que aquestes mutacions es troben localitzades en seqüències intròniques apartades dels llocs consens d'*splicing* mentre la seqüència codificant i els llocs donadors/acceptors d'*splicing* romanen intactes. En el nostre cas, la mutació de la pacient crea un nou lloc acceptor d'*splicing* que utilitza dos llocs donadors críptics diferents, per generar els dos transcrits aberrants. Es van dissenyar tres AMOs diferents, per tal de bloquejar el lloc acceptor i els dos llocs donadors críptics i restaurar l'*splicing* normal, amb la finalitat d'evitar la inclusió dels exons críptics dins el mRNA.

El tractament de fibroblasts de la pacient NF1 amb els tres AMOs diferents per separat i la combinació dels tres, va demostrar una correcció efectiva de l'*splicing* aberrant i una disminució dels nivells de transcrits mutats en tots els tractaments. L'efecte més notori, es va donar en la combinació de tots tres AMOs, on es va obtenir una correcció completa de l'*splicing* aberrant. Cal esmentar que el nivell de correcció per cada un dels AMOs per separat va ser lleugerament diferent, cosa que concorda amb el descrit prèviament, ja que s'ha vist que l'eficiència dels AMOs pot variar segons la seva seqüència, l'accessibilitat al mRNA diana o la capacitat de la cèl·lula d'incorporar-lo.

Per tal de comprovar l'especificitat dels AMOs, es va utilitzar un AMO (IVS3) que bloqueja un lloc donador d'*splicing* generat per una mutació NF1 a l'intró 3. En aquest cas, els nivells de transcrits aberrants no es van veure alterats, demostrant així que els AMOs actuen de manera específica.

Estudis previs *in vitro*, ja havien dissenyat AMOs per restaurar l'*splicing* normal evitant la incorporació d'exons críptics en diverses línies cel·lulars de pacients portadors de diferents tipus de mutacions tant en la NF1 (Pros et al, 2009) com en altres malalties genètiques com la β-thalassemia, l'acidèmia metilmalònica i propiònica, la fibrosi quística, la progèria, l'albinisme ocular tipus 1, l'atàxia-telangiectàsia i la distròfia muscular de Duchenne, entre d'altres (Sierakowska et al, 1996; Friedman et al, 1999; Aartsma-Rus et al, 2004; Scaffidi & Misteli, 2005; Vetrini et al, 2006; Rincon et al, 2007; Du et al, 2007; Perez et al, 2010).

Per últim, per comprovar si la restauració de l'*splicing* normal es reflectia funcionalment, es va quantificar els nivells de RAS-GTP total, ja que constitueix un indicador indirecte de la funció de la Neurofibromina.

Els fibroblast de la pacient no tractats, van mostrar un nivells alts de RAS-GTP, com a conseqüència de la manca de Neurofibromina. Tanmateix el tractament d'aquests

fibroblasts amb AMOs específics de la mutació van presentar un nivells de RAS-GTP més baixos que els no tractats, suggerint una restauració de la funció de la Neurofibromina. Aquest resultat va en consonància amb el que ha estat publicat per altres mutacions *deep intronic* en el gen *NF1* (Pros et al, 2009).

Els resultats obtinguts fan pensar que l'ús de AMOs podria ser un tractament eficaç per a pacients NF1 portadors de mutacions *deep intronic*. Però seria necessari estudis en models animals, per tal d'avaluar la seva eficàcia *in vivo*, així com poder determinar factors com la dosi mínima, toxicitat o la via d'administració. D'altra banda, el fet que s'hagin testat clínicament en pacients amb altres malalties genètiques, com la distròfia muscular de Duchenne (Kinali et al, 2009; Aartsma-Rus & van Ommen, 2010; Koo & Wood, 2013) també ajuden a pensar que el tractaments amb AMOs podria tenir resultats prometedors en pacients amb NF1.

PART 2:

Els MPNST són tumors molt agressius associats a una supervivència baixa i contra els que no existeixen teràpies efectives. És per això que la generació de models preclínics és essencial per tal d'identificar i testar nous compostos. El nostre objectiu és millorar les estratègies de tractament per a aquest tipus de tumors, en línia amb els estudis actuals que busquen una resposta al tractament d'acord amb el perfil molecular dels tumors i dels individus, com a predicción del resultat de resposta al tractament (Tentler et al, 2012).

DESENVOLUPAMENT DE MODELS ORTOXENÒGRAFTS A PARTIR DE MPNST PRIMARIS HUMANS

Fins el moment s'han generat diversos models *in vivo* que desenvolupen tumors MPNST, com ara ratolins GEM (Cichowski et al, 1999; Vogel et al, 1999) i diferents models de xenògrafts (Mahller et al, 2007; Perrin et al, 2007b; Johansson et al, 2008; Banerjee et al, 2010; Li et al, 2010; Lopez et al, 2011; Jessen et al, 2013), però no existeix cap xenògraft ortotòpic generat directament a partir de tumors primaris de pacients (PDX). El nostre grup ha aconseguit generar el primer PDX ortotòpic a partir de MPNST, implantant la peça de tumor en contacte amb el nervi ciàtic, aconseguint que el tumor creixi envoltant el nervi ciàtic. Els models PDX ortotòpics, a diferència dels models GEM i dels derivats a partir de línies cel·lulars, permeten recapitular característiques intrínseques del tumor original com ara la heterogeneïtat i les alteracions genètiques (DeRose et al, 2011; Reyal et al, 2012; Zhao et al, 2012; Hidalgo et al, 2014; Ruggeri et al, 2014). A més a més, a diferència dels models subcutanis, proporciona un microambient al tumor molt més similars al que està present en els pacients, el qual té una influència clau en el procés de progressió tumoral i metàstasi (Du et al, 2014; Martinez-Garcia et al, 2014). Així doncs, i donada la heterogeneïtat d'aquest tipus de tumors, el desenvolupament d'aquests models proporciona unes eines excel·lents pel desenvolupament d'una medicina personalitzada eficaç pels MPNST.

Altres models ortotòpics s'han generat a partir de la injecció de línies cel·lulars derivades de MPNST i pNF directament a l'interior del nervi ciàtic (Perrin et al, 2007b) formant tumors bastant semblants al humans. Però tot i així, cal tenir en compte que els xenògrafts generats a partir de cultius cel·lulars presenten més divergències amb el tumor original, ja que el procés de cultiu *in vitro* pot seleccionar subpoblacions de cèl·lules que no són totalment representatives del MPNST inicial (Martinez-Garcia et al, 2014; Wennerstrom et al, 2014).

A data d'avui, el nostre grup ha establert i perpetuat, un grup de models de ratolins xenògraft ortotòpics a partir de MPNST primaris i d'una línia cel·lular de MPNST, tant esporàdics com relacionats amb la NF1. En total, s'han obtingut i implantat 10 MPNST frescos procedents de diferents Hospitals (Bellvitge, Vall d'Hebron, Leuven) i 3 línies cel·lulars diferents (S462, 265T i 26T), més del 50% dels quals s'han aconseguit perpetuar més enllà del quart passatge (7/13). El percentatge d'èxit de creixement inicial dels tumors implantats pot ser deguda a factors com la mida de la peça tumoral inicial, la viabilitat i l'agressivitat de les cèl·lules tumorals o el percentatge d'estroma i de necrosi dels fragments implantats.

El temps de creixement del primer passatge va variar entre 1 mes, en el cas de la línia cel·lular esporàdica STS26T, la qual *in vitro* també presentava una taxa de proliferació molt ràpida, a fins a 5-6 mesos, en el cas del tumor primari MPNST-NF1-001 i de la línia cel·lular NF1 S462. Per la majoria de MPNST procedents de tumors primaris el temps de creixement del primer passatge ha estat entre 3-4 mesos. El temps de creixement entre passatges acostuma a disminuir substancialment a partir del primer passatge, possiblement perquè les cèl·lules tumorals es van habituant al nou microambient, o també pel fet que en el primer passatge l'estroma humà es reemplaçat per l'estroma del ratolí.

Cinc dels set tumors perpetuats durant múltiples passatges han estat caracteritzats i validats a nivell histològic i molecular, per tal de demostrar la seva similitud amb el tumor humà original, i demostrar que constitueixen un bon model per testar noves estratègies terapèutics de forma més precisa i personalitzada (Taula 6).

Taula 6. Característiques clíniques dels pacients i els tumors MPNST perpetuats en models ortoxenògraft (en gris, els tumors caracteritzats i en blanc, els que encara no han estat caracteritzats).

Identificació Tumor	Edat	Sexe	Pacient NF1	Mutació germinal <i>NF1</i>	MPNST	Grau tumoral	Localització	Mutació somàtica
MPNST-NF1-001	34	M	Si	c.350T>A	Primari	IV	Cuixa	LOH
MPNST-NF1-002	37	M	Si	c.350T>A	Primari	III	Braç	LOH
MPNST-SP-001	88	M	No	-	Primari	IV	Laterocervical	c.3520 C>T
MPNST-SP-002	74	F	No	-	Recurrència	IV	Braç	-
AAH	73	M	No	-	Primari	III	Cuixa	-
MPNST-NF1-S462	19	F	Si	c.6792C>A	Línia cel.	IV	Cuixa	LOH
MPNST-SP-STS26T	51	M	No	-	Línia cel.	II/III	Escàpula	-

VALIDACIÓ DELS MODELS ORTOXENÒGRAFTS DE MPNST

Els cinc models establerts han estat analitzats a diferents nivells, comparant els tumors primaris amb els corresponents ortoxenògrafts i també aquests a diferents passatges. La caracterització d'aquest model comprèn una validació histològica; amb una ànalisi immunohistoquímica específica i una validació molecular, tan a nivell genòmic, com transcriptòmic. A més a més, tots ells han estat expandits i han estat utilitzats per testar diferents fàrmacs.

VALIDACIÓ HISTOLÒGICA

Els MPNST representen aproximadament un 10% de tots els sarcomes de teixits tous (Ducatman et al, 1986b; Hruban et al, 1990), és per això que s'utilitzen diversos criteris histològics pel diagnòstic d'aquest tipus de tumors, com ara les característiques fusiformes de les cèl·lules o les tincions immunohistoquímiques per diferents anticossos.

La immunohistoquímica és una tècnica indispensable per tal de distingir tumors similars histològicament. D'aquesta forma, existeixen panells bàsics de nombrosos marcadors classificats en diferents grups com ara; proteïnes que formen el citoesquelet intern de les cèl·lules (vimentina, desmina i actina), marcadors endotelials (CD34), marcadors de cèl·lules derivades de la cresta neural (S100) o marcadors epitelials (EMA; *epitelial membrane antigen*). A més d'aquests marcadors també s'avalua la proliferació cel·lular emprant el marcador Ki-67. Tot i així, les interpretacions de les immunohistoquímiques en aquests tumors poden ser complicades ja que els tumors en general, i els sarcomes en particular, es caracteritzen per la seva heterogeneïtat, podent variar el seu aspecte histològic, i la seva expressió immunohistoquímica, d'un cas a un altre i en àrees diferents d'un mateix cas. D'altra banda, un tipus tumoral varia l'expressió dels seus marcadors en funció del grau de diferenciació, de manera que, el perfil dels tumors més indiferenciats és menys típic ja que acostumen a perdre marcadors.

S100 és un marcador utilitzat en la diferenciació de les cèl·lules derivades de la cresta neural (com són les cèl·lules de Schwann). Aquesta proteïna es troba en tots els tumors benignes derivats de la beina dels nervis, però es pot perdre quan aquest tumors malignitzen i adquireixen nivells de diferenciació més alts. Aquest és el cas dels MPNST, on s'ha descrit que només un 50% són positius per S100 (Weiss et al, 1983; Karamchandani et al, 2012). Els nostres resultats mostren com els tumors primaris i ortoxenògrafts NF1 han perdut l'expressió de S100, en canvi els esporàdics no, suggerint que potser els relacionats amb la NF1 podrien tenir un grau de diferenciació més alt.

D'altra banda, CD34 és un marcador de cèl·lules endotelials el qual s'expressa generalment en tumors benignes i només en alguns MPNST (Weiss et al, 1983), tot i que la seva valoració per a la classificació i la determinació del grau tumoral en aquest tipus de tumors és incerta a causa de la seva expressió ubiqua (Khalifa et al, 2000; Naber et al, 2011). Els nostres resultats mostren que el tumor primari MPNST-NF1-001 i la línia cel·lular S462 expressen CD34 i com els seus respectius ortoxenògrafts mantenen aquesta positivitat.

Ki-67 és un marcador proteic nuclear associat a la proliferació cel·lular dels tumors. Estudis previs han correlacionat un índex de marcatge de Ki-67 superior al 25% amb una taxa de reducció de la supervivència en els MPNST (Liapis et al, 1999; Watanabe et al, 2001). Els nostres resultats mostren uns índex de proliferació molt alts i homogenis, tenint en compte que el percentatge de cèl·lules positives respecte el nombre total de cèl·lules és superior al 25% en tots els casos. La línia S462, presenta un índex de proliferació molt més alt, possiblement degut a que es tracte d'una línia cel·lular establerta fa molt de temps i podria haver acumulat variacions genètiques que li proporcionessin avantatges clonals proliferatius (Holtkamp et al, 2007).

D'altra banda la tinció immunohistoquímica per p53 s'utilitza com un substitut per a l'anàlisi mutacional en l'estudi diagnòstic d'alguns tumors a més de que s'ha descrit que la immunorreactivitat de p53 es pot correlacionar amb el grau histològic del tumors i pot ajudar a predir la recurrència i el pronòstic dels MPNST (Brekke et al, 2009).

TP53 és un dels principals gens supressor de tumors amb un paper molt important en la patogènia de molts tipus tumorals(Eliyahu et al, 1984; Parada et al, 1984). Estudis previs en MPNST han establert una correlació entre la sobreexpressió de p53 per immunohistoquímica i mutacions en el gen *TP53*, ja que s'ha vist que algunes mutacions en aquest gen provoquen canvis moleculars a l'estructura de la proteïna, que augmenta la seva estabilitat, adquirint un major nivell proteic (Riddle et al, 2010). Les dades obtingudes en la seqüenciació de l'exoma i l'SNP array dels nostres tumors primaris i ortoxenògraft mostren que aquests no presenten mutacions puntuals o pèrdues de número de còpies en la regió 17q13.1 (on s'ubica el gen *TP53*). Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts en les immunohistoquímiques dels nostres tumors, que mostren un nivells d'expressió de p53 bastant baixos, tenint en compte que es considera un nivell baix d'expressió quan les cèl·lules positives són inferiors al 30% respecte el nombre total de cèl·lules (Riddle et al, 2010). La línia S462 va mostrar un nivells d'expressió de p53 molt alts, al igual que pel marcador Ki-67, cosa que ha estat descrita prèviament en altres estudis (Holtkamp et al, 2007).

A nivell global podem conoure que el panell de marcadors analitzats mostra que els tumors ortoxenògrafts generats en aquesta tesi doctoral recapitulen els patrons immunohistoquímics dels seus respectius tumors primaris. A més a més, també presenten una alta semblança histològica, pel que fa a la morfologia i distribució cel·lular. Pel primer model establert (tumor MPNST-NF1-001) també es va estudiar la histologia i els diferents marcadors immunohistoquímics als tumors ortoxenògrafts de passatges més avançats i els resultats mantenien els patrons de passatges primerencs i del tumor primari (dades no mostrades).

D'altra banda dos dels models ortoxenògraft generats van mostrar micrometàstasi pulmonar, recreant així la disseminació distal característica dels MPNST. Aquest és el primer cop que es descriu la detecció de metàstasi pulmonar en un model de xenògraft generat a partir de la implantació ortotòpica. Estudis previs havien aconseguit recrear la disseminació distal a pulmó, mitjançant la injecció intravenosa d'una línia cel·lular establerta d'un MPNST esporàdic (Ghadimi et al, 2012). Altres xenògrafts generats a partir de tumors primaris de càncer de mama implantats directament a les glàndules mamàries de femelles de ratolins immunodeprimits van desenvolupar metàstasi espontània als mateixos òrgans dels pacients dels quals derivaven els tumors (De Rose et al, 2011). A més a més, també s'ha reportat que models de xenògrafts ortotòpics de tumors de la vesícula biliar generaven metàstasis al fetge i als ganglis limfàtics, mentre que el model subcutani no generava cap tipus de metàstasi, corroborant d'aquesta manera una simulació del patró de disseminació dels pacients molt millor en els xenògrafts ortotòpics que en els subcutanis (Du et al, 2014).

Reemplaçament de l'estroma humà en els tumors ortoxenògrafts

Encara que hi ha una acceptació general del fet que els xenògrafts derivats de tumors primaris proporcionen un model en el qual es manté la histologia i la genètica del tumor original, encara no hi ha una comprensió clara del procés d'empelt i la destinació dels diferents components dels tumors de pacients. Comprendre millor aquests procés és fonamental per poder demostrar la importància del microambient tumoral en la fisiologia del tumor i la resposta terapèutica. Per això, l'estudi de la vasculatura (cèl·lules endotelials) o altres elements de l'estroma (fibroblasts i cèl·lules immunes) ha estat particularment important en xenògrafts de tumors primaris en experiments terapèutics (Hylander et al, 2013).

En el cas de xenògrafts derivats de línies cel·lulars humanes, s'ha reportat que tan els vasos com l'estroma tenen un clar origen murí (Lehr et al, 1997; Sausville & Burger, 2006). D'altra banda, hi ha controvèrsia en quan a la supervivència de la vasculatura i els components estromals en els xenògrafts generats a partir de tumors de pacients. Alguns

estudis van trobar que en tumors de pròstata implantats de forma subcutània en ratolins, un 80% de les cèl·lules endotelials eren humans als 30 dies de ser implantats (Gray et al, 2004). En contrapartida, els mateixos autors d'aquest article i altres estudis similars per diferents tipus de tumors (càncer colorectal, càncer de mama, càncer d'ovari, càncer de pulmó...)(Xu et al, 1999; Merk et al, 2009; Sanz et al, 2009; DeRose et al, 2011; Julien et al, 2012), van trobar que les cèl·lules vasculars humans i altres components estromals eren reemplaçats ràpidament per cèl·lules de ratolí i suggerien que podien haver diferències segons el tipus tumoral.

Els nostres resultats en MPNST van en concordança amb aquests últims estudis, ja que trobem que la vasculatura humana clarament desapareix en el primer passatge dels tumors ortoxenògraft i és reemplaçada per vasos murins. D'altra banda, cal tenir en compte que l'estroma també està constituït per altres tipus cel·lulars com fibroblast o cèl·lules immunes. Tot i que en aquesta tesi només es presenten els resultat per CD34, marcador de cèl·lules endotelials, també es van realitzar tincions per diferents marcadors de fibroblasts com vimentina o SMA (de l'anglès, *Smooth Muscle Actin*). Aquestes tincions però, van presentar problemes d'especificitat i de marcatge i per tant els resultats no van ser concluents.

A més a més, es van utilitzar les dades de l'anàlisi de seqüenciació de la mutació germinal i d'SNP array, per tal d'estudiar i corroborar el fenomen del reemplaçament de l'estroma. Aquestes dues tècniques permeten tenir en compte de forma global tots els tipus cel·lulars que conformen l'estroma, ja que consideren el percentatge de cèl·lules normals (estromals), respecte a les tumorals; a diferència de les tincions immunohistoquímiques per marcadors específics, que només tenen en compte un tipus cel·lular concret (cèl·lules endotelials, fibroblasts,...). En el cas de la seqüenciació, es veu com l'al·lel salvatge (cèl·lules estromals) desapareix en el tumor ortoxenògraft del primer passatge. L'anàlisi per SNP array va permetre quantificar el percentatge de cèl·lules estromals humans en els tumors primaris i els ortoxenògrafts derivats i en tots els casos es va observar com l'estroma desapareixia en el primer passatge.

Tots aquest resultats conclouen que l'estroma humà dels MPNST és completament reemplaçat per l'estroma de ratolí en els tumors implantats. Aquest fet té una especial importància en el nostre estudi, ja que els tumors primaris obtinguts són mostres heterogènies, on les cèl·lules tumorals representen només una part de la població total i on les cèl·lules normals poden interferir en els resultats de les analisis realitzades, com ara la detecció dels canvis genètics somàtics o els perfils d'expressió. De manera que, com veurem a continuació, l'establiment de models ortoxenògrafts a partir de tumors primaris, facilita la identificació de les alteracions genètiques somàtiques per la eliminació dels efectes de confusió de les cèl·lules normals del tumor original.

VALIDACIÓ MOLECULAR

El segon nivell de validació va consistir en una extensa caracterització molecular dels tumors primaris i els ortoxenògrafts. Per aquesta validació es van utilitzar dues eines de caracterització molecular: l'estudi genòmic a partir d'SNP arrays per cribar els reordenaments genòmics i la seqüenciació de l'exoma per identificar les variacions puntuals. A més a més, es va realitzar un estudi transcriptòmic, a partir d'un array d'expressió. Aquesta caracterització ens va permetre avaluar el grau de similitud entre tumors primaris i ortoxenògrafts, i a més a més, varem obtenir una perspectiva genòmica global dels nostres tumors.

SNP array

La tècnica de SNP array permet detectar la variació en el nombre de còpies genòmiques (SCNAs, de l'anglès *somatic copy-number alterations*) i analitzar el desequilibri al·lèlic (Als, de l'anglès *allelic imbalances*) al llarg de tots els cromosomes. Molts estudis previs han utilitzat la hibridació genòmica comparativa (CGH) per identificar les variacions en el número de còpies del genoma (Mechtersheimer et al, 1999; Kresse et al, 2008; Mantripragada et al, 2008; Mantripragada et al, 2009; Yang & Du, 2013), però l'SNP array permet detectar a més a més les regions amb pèrdua d'heterozigositat (LOH), ja que aquest mecanisme genètic pot no comportar canvi en el nombre de còpies del DNA. D'aquesta manera, es va poder avaluar l'estabilitat genòmica dels tumors implantats i comparar les alteracions del genoma al llarg dels passatges dels xenògrafts respecte els tumors primaris.

En primer lloc, la validació genòmica va mostrar un alt grau de similitud entre els tumors primaris i els seus respectius ortoxenògrafts. El perfil d'alteracions genòmiques va mostrar que menys del 7% del genoma dels ortoxenògraft presentava canvis estructurals en relació amb el tumor primari (tenint en compte les alteracions de nombre de còpies i els desequilibris al·lètics), demostrant que l'estructura alterada del genoma dels tumors primaris es mantenía estable al llarg de successius passatges dels xenògrafts. Les petites diferències en la freqüència al·lèlica entre diferents passatges, poden ser interpretades com canvis genòmics estructurals a causa dels successius empelts (Reyal et al, 2012). En el cas dels tumors de xenògrafts obtinguts a partir de la línia cel·lulars S462, el nombre de canvis genètics entre la línia cel·lular i els tumors ortoxenògrafts, són més alts, suggerint un procés de selecció clonal que comporta la reducció de l'heterogeneïtat present en el cultiu original de cèl·lules *in vitro*. Altres estudis també han detectat diferències genòmiques i d'expressió entre línies cel·lulars i els seus respectius models de xenògrafts (Dangles-Marie et al, 2007; Daniel et al, 2009).

En segon lloc, l'anàlisi per SNP array va mostrar que el genoma dels MPNST primaris i ortoxenògrafts estaven molt alterats. Concretament, es va fer una comparació dels ortoxenògrafts al passatge 1, en què l'estroma humà és reemplaçat, per tal d'eliminar qualsevol biaix produït per les diferents proporcions de cèl·lules estromals en els tumors primaris. Aquesta anàlisi, va mostrar que els MPNST dels ortoxenògrafts presentaven una mitjana de 75,7% del genoma amb alteracions en el nombre de còpies. Aquestes alteracions es tractaven principalment de guanys de cromosomes sencers o grans regions cromosòmiques i unes poques pèrdues de material genètic.

Aquests resultats concorden amb diversos estudis citogenètics que han assenyalat que els MPNST presenten un cariotip força complex i es caracteritzen per un ampli espectre d'aberracions cromosòmiques, incloent translocacions i duplicacions, així com nombrosos guanys i pèrdues de material genètic (Bridge et al, 2004; Fang et al, 2009). A més a més també concorden amb estudis on s'han analitzat els canvis del nombre de còpies del DNA emprant la hibridació genòmica comparativa (CGH) que mostraren que els guanys de nombre de còpies eren més freqüents que les delecions en mostres de MPNST (Mechtersheimer et al, 1999; Mantripragada et al, 2008; Kresse et al, 2008; Mantripragada et al, 2009; Yang & Du, 2013).

L'anàlisi del desequilibri al·lèlic per SNP array dels ortoxenògrafts també van mostrar diversos patrons corresponents a regions que presentaven pèrdues d'heterozigositat (LOH), sent més alta la presència de LOH en tumors ortoxenògrafts associats a la NF1 (38.3% i 61.2%) que en esporàdics (3.8% i 24%). Estudis previs on s'havien utilitzat SNP-array, també van observar alts nivells de LOH en MPNST (Upadhyaya et al, 2012), però aquesta és la primera vegada que es descriuen diferències en la proporció de LOH entre MPNST esporàdics i NF1.

El gran nombre d'alteracions genòmiques presents en els tumors primaris i en els xenògrafts fa pensar que es podrien donar a causa d'un esdeveniment catastròfic com la *chromothripsis* o la *chromoplexy* (Forment et al, 2012; Jones & Jallepalli, 2012; Baca et al, 2013; Zhang et al, 2013). La majoria de càncers es desenvolupen a causa d'una sèrie progressiva d'acumulacions d'aberracions genètiques, on l'alteració gradual de mecanismes de reparació del DNA o de processos de la supervivència cel·lular poden conduir a un increment de la malignitat dels tumors. Tot i així estudis recents han descrit diferents processos on desenes o centenars de reordenament genòmics poden donar-se en un sol pas, durant el qual alguns fragments es perdren i la resta es tornen a acoblar formant un nou haplotip (Baca et al, 2013; Zhang et al, 2013; Stephens et al, 2014). Així, les cèl·lules resultants que sobreviuen poden presentar la pèrdua simultània de diversos gens supressors de tumors o l'activació d'oncogens, capacitant aquestes cèl·lules d'un avantatge proliferatiu selectiu. D'altra banda, aquests processos normalment comporten

una disminució del nombre de còpies al·lèliques, ja que quan es donen, diversos fragments es perden i la resta es tornen a ajuntar formant un nou haplotip. Tanmateix, els nostres resultats per SNP array, mostren que els MPNST primaris i ortoxenògrafts presenten principalment guanys de cromosomes sencers o de regions cromosòmiques, la qual cosa podria indicar que aquests tumors presenten un cariotip poliploide. En concordança, els cariotips realitzats a les línies cel·lulars corresponents als MPNST primaris de MPNST-SP-001 i MPNST-NF-S462, van presentar un cariotip triploide en ambdós casos (dades no mostrades), a més a més, estudis previs han demostrat que els MPNST poden presentar cromosomes triploids i tetraploids (<http://atlasgeneticsoncology.org>) (Fang et al, 2009).

Seqüenciació de l'exoma

La seqüenciació de l'exoma es va utilitzar per caracteritzar i comparar la variació genètica causada per mutacions puntuals en les regions codificantes presents en els tumors primaris i els models MPNST ortoxenògraft derivats.

En primer lloc, es van comparar les mutacions identificades entre tumors primaris i ortoxenògrafts, tenint en compte les regions ben cobertes comunes entre el tumor primari i el seu respectiu ortoxenògraft de cada model (PRS-WCR de “*primary related samples of well covered regions*”). Aquesta anàlisi ens va permetre detectar que el número de mutacions guanyades o perdudes entre els tumors primaris i els ortoxenògrafts eren molt baixes en ambdós casos, oscil·lant entre 0 i 20 les mutacions guanyades i essent només 3 les mutacions perdudes en els quatre models. Aquestes dades recolzen novament la idea que els models de xenògrafts de MPNST recapitulen les característiques dels tumors primaris dels quals deriven, i que per tant, constitueixen un bon model experimental. A més a més, per un dels models (MPNST-NF1-001) es va analitzar també l'exoma en passatges més avançats, trobant només un total de 18 mutacions noves i 3 de perdudes al passatge 4, demostrant així, que el nombre de mutacions puntuals es mantenia molt estable al llarg de successius passatges.

En segon lloc, es van comparar les mutacions somàtiques identificades en els tumors primaris, tenint en compte les regions ben cobertes comunes pels tumors primaris dels 4 models ortoxenògrafts, per tal d'eliminar qualsevol biaix a causa de les diferents profunditats de cobertura (All-WCR de “*All-well covered regions*”). En aquest cas, les megabases analitzades són exactament les mateixes entre els diferents models, per tal de poder fer una bona comparació entre ells.

En aquesta anàlisi es van observar diferències notables en el nombre i tipus de mutacions puntuals somàtiques identificades entre els MPNST primaris NF1 i esporàdics,

essent de 15 (0,89 mutacions/Mb) i 30 (1,79 mutacions/Mb) el nombre de mutacions identificades en els MPNST-NF1 i de 257 (15,33 mutacions/Mb) i 308 (18,38 mutacions/Mb) en els MPNST esporàdics. Aquests resultats estan d'acord amb les taxes mutacionals descrites per altres tipus de càncer (Lawrence et al, 2013; Watson et al, 2013b), on la taxa de mutació més baixa (~1 mutació/Mb) s'ha descrit en casos de càncers pediàtrics i hematològics i la més alta (~15 mutacions/Mb) en càncers on els agents mutagènics ambientals augmenten la càrrega mutacional, com ara els melanomes (raigs ultraviolats) o els càncer de pulmó (tabac). L'alta variació en la freqüència de mutacions dins els MPNST també s'ha descrit en altres tipus de càncer (Lawrence et al, 2013), com el melanoma, on les taxes mutacionals varien notablement entre 1-15 mutacions/Mb. Aquestes diferències podrien associar-se a diferents factors com el grau d'exposició a agents mutagènics o el tipus de gens mutats (Lawrence et al, 2013; Watson et al, 2013b).

D'altra banda, està descrit que en general la majoria de mutacions somàtiques són mutacions passatgeres que no intervenen en la formació de tumors i que només una petita part d'aquestes són mutacions determinants “*driver*” afectant a gens implicats directament en la formació tumoral. El fet que els tumors primaris esporàdics presentin moltes més mutacions somàtiques que els tumors NF1 podria indicar que les mutacions en el gen *NF1* són un *driver* molt potent per a la formació dels MPNST ja que estan implicats directament en l'oncogènesi. De manera que en ser portadors d'una doble inactivació del gen *NF1*, necessiten acumular moltes menys mutacions somàtiques addicionals per malignitzar. En canvi, els tumors esporàdics, molts d'ells sense mutacions a *NF1*, necessitarien acumular moltes més mutacions somàtiques per tal d'esdevenir malignes. Aquest fet podria estar relacionat amb l'edat d'aparició dels tumors, ja que els dos MPNST NF1 van ser diagnosticats a edats molt més joves (34 i 37 anys) que els esporàdics (88 i 74 anys). A la literatura està descrit que l'edat d'aparició en els casos esporàdics és més alta que en els casos associats a la NF1, això donaria suport a la idea que en el context esporàdic cal acumular un nombre més elevat de mutacions i per tant caldria més temps d'evolució per produir-se el tumor (Patil & Chamberlain, 2012).

Finalment, també es van analitzar els espectres mutacionals entre MPNST primaris esporàdics i NF1, per identificar les signatures dels mecanismes de la carcinogènesi. Les mutacions somàtiques en el tumors són el resultat d'un o més processos d'acumulació de mutacions al llarg de la vida del pacient. Cada procés mutacional deixa una signatura de mutacions característica determinada que reflecteixen el dany i reparació a la qual les cèl·lules tumorals han estat exposades. Fins a dia d'avui, s'han descrit alguns dels mecanismes que constitueixen una signatura característica, com ara el consum de tabac en càncer de pulmó, la radiació ultraviolada en el càncer de pell, la reparació del DNA en alguns càncers colorectals o la sobreexpressió de *APOBEC3* en diversos càncers, tot i que la raó per a l'activació d'aquest procés mutacional es desconeix (Ding et al, 2010; Alexandrov et al, 2013; Lawrence et al, 2013; Watson et al, 2013b).

No obstant això, la comprensió dels processos biològics que generen aquestes mutacions és limitada i no sempre es correlacionen amb la signatura esperada. La seqüenciació dels nostres tumors va mostrar un fort biaix en els MPNST esporàdics cap a una alta freqüència de substitucions C>T, de les qual un 57% es trobaven en context de seqüència TpC i un 30-34% en CpC. Aquesta signatura és una de les més comunes trobades en altres tipus de càncer humans (Alexandrov et al, 2013) i coincideix amb la signatura induïda per l'acció de l'enzim APOBEC3 (Alexandrov et al, 2013; Burns et al, 2013; Taylor et al, 2013) i la induïda per la llum ultraviolada en melanomes (Alexandrov et al, 2013; Lawrence et al, 2013). Tot i això, aquests resultats s'han de interpretar amb certa cautela, ja que el baix nombre de mutacions identificades, no permet avaluar adequadament aquestes signatures. La signatura relacionada amb l'acció d'APOBEC3 està composta principalment per transicions C>T en un context de seqüència de TpC (on C és el lloc de la mutació)(Alexandrov et al, 2013). Això és degut, a que APOBEC3 és un enzim deaminassa citidina que actua com a agent mutagènic del DNA, ja que catalitza el canvi de citidina a uracil, canviant així els parells de bases C:G a U:G, el qual serà reconegut com a T:A. Addicionalment, s'ha plantejat la hipòtesi que l'enzim APOBEC3 és responsable del procés de *kataegis*, un mecanisme mutacional el qual descriu un patró de hipermutació localitzat en petites regions genòmiques estretament relacionades amb els reordenaments genètics (Alexandrov et al, 2013; Taylor et al, 2013).

Array d'expressió

Addicionalment es va realitzar una darrera validació dels models ortoxenògrafts fent un array d'expressió per tal de tenir una comparació global del nivell transcriptòmic dels tumors. L'anàlisi transcriptòmic complet, va mostrar unes correlacions molt altes entre els tumors primaris i els ortoxenògrafts ($R^2 \sim 0.90$), confirmant la semblança d'aquests tumors, i es va obtenir una correlació encara més alta entre els passatges 1 i 4 dels ortoxenògrafts ($R^2 \sim 0.98$), corroborant l'estabilitat del perfil transcriptòmic al llarg dels diferents passatges (Zhao et al, 2012). Aquesta diferència podria ser explicada degut a que els tumors primaris presenten cèl·lules humanes normals que podrien esbiaixar els resultats de l'expressió gènica. En canvi, en l'anàlisi dels tumors ortoxenògrafts, i degut a que la majoria de sondes utilitzades en l'array d'expressió són específiques d'humà, només s'analitzen les cèl·lules tumorals, ja que les estromals són de ratolí. Haguéss estat interessant poder fer la correlació entre el tumor primari del MPNST-NF1-001 i el seu corresponent ortoxenògraft, ja que com hem vist anteriorment, és el tumor primari que presenta un percentatge de cèl·lules normals més elevat i probablement mostraria una correlació més baixa que la resta però va ser impossible per limitacions de la mostra obtinguda.

També es va fer una anàlisi transcriptòmica tenint en compte 1708 gens que prèviament havien estat associats a una signatura molecular característica dels MPNST (Miller et al, 2006). Aquesta signatura va ser definida prèviament comparat el perfil transcriptòmic dels MPNST i diferents línies cel·lulars relacionades respecte a neurofibromes benignes i cèl·lules de Schwann (Miller et al, 2006). Els resultats obtinguts per aquesta anàlisi van mostrar novament una alta correlació entre els tumors primaris i els seus ortoxenògrafts derivats, inclús en passatges més avançats. També l'agrupació jeràrquica i l'anàlisi dels components principals (PCA) van mostrar com s'agrupaven entre sí, tan els tumors primaris amb els seus ortoxenògrafts, com els ortoxenògrafts a diferents passatges. Tots aquests resultats evidencien que els tumors ortoxenògrafts implantats recapitulen el perfil transcriptòmic dels tumors primaris dels quals deriven i que un cop implantats, aquests es mantenen estables al llarg dels diferents passatges.

D'altra banda, l'agrupació jeràrquica dels perfils d'expressió i l'anàlisi per PCA van separar perfectament les mostres dels MPNST NF1 (incloent la línia cel·lular S462) i els MPNST esporàdics. Aquests resultats són interessants, perquè és la primera vegada que s'ha descrit diferències en els perfils transcripcionals entre MPNST esporàdics i NF1. Treballs previs han identificat una signatura diferencial entre els tumors benignes (neurofibromes dèrmics i plexiformes) i MPNST (Miller et al, 2009), però no s'ha descrit mai una signatura transcripcional diferencial entre MPNST esporàdics i els NF1 (Holtkamp et al, 2004; Watson et al, 2004; Miller et al, 2006).

Tot i així, aquest resultats s'han d'interpretar amb precaució, ja que el número de tumors analitzats és molt baix i caldria augmentar la mida mostra per establir conclusions significatives i poder definir molt millor les diferències en el perfil transcripcional entre aquests dos tipus de MPNST.

Finalment, les diferències detectades tan a nivell genòmic com transcriptòmic entre els MPNST primaris NF1 i esporàdics suggereixen que el desenvolupament dels MPNST esporàdics i NF1 es podria donar per processos biològics diferents, tot i que ambdós tipus de tumors convergeixen i comparteixen un mateix fenotip histològic.

ÚS DELS ORTOXENÒGRAFTS GENERATS COM A MODEL PRECLÍNIC

Un cop demostrat que els models ortoxenògrafts establerts recapitulen les característiques histopatològiques, genòmiques i transcriptòmiques dels tumors primaris dels quals deriven, es van utilitzar com a models preclínics per testar diferents agents terapèutics.

Els cinc models desenvolupats van ser tractats amb tres fàrmacs diferents i administrats de manera individual i combinada. Els fàrmacs utilitzats van ser la doxorubicina, el sorafenib i la rapamicina. La doxorubicina va ser elegida perquè és un dels fàrmacs més utilitzats per la quimioteràpia convencional de diferents tumors, com ara ovarí, testicle, estomac, pulmó, mama, i diferents tipus de sarcomes de teixits tous. La rapamicina i el sorafenib van ser elegits com a inhibidors de diferents punts de les vies Raf/MEK/ERK i Pi3K/AKT/mTOR, ja que molts dels MPNST presenten pèrdua de funció de la Neurofibromina per mutacions en el gen *NF1* i com a conseqüència presenten alts nivells de la proteïna RAS activa.

La doxorubicina és un antibiòtic citotòxic que inhibeix la multiplicació de les cèl·lules tumorals, ja que s'intercala entre les parelles de bases de la doble cadena del DNA i bloqueja l'enzim topoisomerasa II, impedint la síntesi dels àcids nucleics. Tot i ser un dels fàrmacs més utilitzats per la quimioteràpia convencional dels MPNST, no s'han descrit resultats clínics beneficiosos concloents (Moretti et al 2011).

El sorafenib és un inhibidor tirosina cinasa que actua sobre BRAF i VEGFR (de l'anglès, *vascular endothelial growth factor receptor*) exercint un efecte inhibitori de la proliferació i l'angiogènesi (Wilhelm et al, 2004). El sorafenib ha estat testat a nivell preclínic amb resultats prometedors en diversos sarcomes pancreàtics (Fendrich et al, 2012) i en angiosarcomes avançats (Ray-Coquard et al, 2012). A més a més, ha estat aprovat clínicament per al tractament de diferents càncers com el de ronyó (Escudier et al, 2007) i el de fetge (Llovet et al, 2008). Per últim, només s'ha realitzat un assaig clínic en fase II pel tractament amb sorafenib en diferents tipus de sarcomes, incloent 12 pacients amb MPNST. Els resultats d'aquest assaig van mostrar que 3 dels 12 pacients presentaven una estabilització del creixement dels tumors, mentre que la resta van presentar progressió tumoral (Maki et al, 2009). Tot i així, aquest tractament només utilitzava el sorafenib en monoteràpia i no de manera combinada amb altres fàrmacs.

La rapamicina, també coneguda com a sirolimus, és un inhibidor de la via de mTOR. A més a més, és un medicament immunosupressor utilitzat per evitar el refús d'òrgans transplantats (especialment en el trasplantament de ronyó) i s'ha demostrat que posseeix una activitat anticancerígena en diversos tipus de tumors (Chan, 2004). D'altra banda, el temsirolimus, derivat de la rapamicina sense un efecte immunosupressor però

si una inhibició de l'angiogènesi tumoral, ha estat testat en un assaig clínic en fase II per diferents tipus de sarcomes, incloent-hi un MPNST, mostrant una progressió tumoral en el 95% dels tumors (Okuna et al, 2011).

El tractament dels 5 models ortoxenògraft amb doxorubicina només va mostrar un lleu efecte en el model MPNST-SP-002, el qual a través de la seqüenciació de l'exoma s'ha vist que presentava una mutació sense sentit (*nonsense*) en el gen *ABCB5* i una mutació que afecta a un dels llocs consens d'*splicing* del gen *ASNS*. La sobreexpressió d'aquests dos gens ha estat relacionada amb la resistència a la doxorubicina en diferents tipus de tumors (Frank et al, 2005; Lin et al, 2012). Per tant, la pèrdua de la funció dels gens *ABCB5* i *ASNS* provocat per les variants identificades, podria explicar que aquest model fos més sensible a la doxorubicina, per la pèrdua de la capacitat de resistència envers aquest fàrmac. D'altra banda, la combinació de la doxorubicina amb rapamicina o sorafenib mostra un cert efecte sinèrgic en alguns dels models, sent molt més clar en el cas de la teràpia combinada amb sorafenib.

El tractament amb rapamicina oral, no va mostrar cap efecte en cap dels models, mentre que la rapamicina administrada intraperitonealment va causar una reducció de la mida tumoral significativa en tots els models tractats. L'efecte inhibidor del creixement tumoral de la rapamicina administrada intraperitonealment trobat en els nostres models va en consonància amb altres estudis realitzats en xenògraft subcutanis establerts a partir de tumors primaris (Bhola et al, 2009). D'altra banda, els resultats del tractament amb rapamicina oral contrasta amb estudis previs realitzats en xenògraft subcutanis derivats de línies cel·lulars, on sí han observat una reducció del volum tumoral (Johansson et al, 2008). En aquest cas, però, van utilitzar un derivat de la rapamicina anomenat everolimus (RAD001), el qual actua de forma molt similar com a inhibidor de mTOR i com a immunosupressor. Tots aquests resultats suggereixen que tant el lloc d'implantació del tumors (subcutani o ortotòpic), com la via d'administració dels fàrmacs, podrien modificar l'efectivitat d'aquest envers els tumors. Tanmateix, s'han reportat altres casos en que l'efecte d'un fàrmac per un mateix tipus de cèl·lules tumorals varia entre assaigs *in vitro* i *in vivo*, remarcant la importància dels xenògraft derivats a partir de tumors primaris.

Finalment, el sorafenib sol i en combinació amb doxorubicina o rapamicina, van resultar ser els tractaments més efectius. Concretament, la combinació de sorafenib amb doxorubicina va causar la major reducció del creixement tumoral respecte els controls en tots els models i la combinació de sorafenib amb rapamicina, va mostrar una reducció tumoral més significativa en els MPNST NF1, que en els esporàdics. Així doncs, tot i els resultats negatius de l'assaig clínic pel tractament en monoteràpia de 12 MPNST (Maki et al, 2009), aquest resultats confirmen el sorafenib com un potencial agent terapèutic pel

tractaments dels MPNST i suggereixen la importància d'un esquema de tractament combinació de diferents fàrmacs per aconseguir millors resultats terapèutics. A més a més, cal tenir en compte que la heterogeneïtat molecular observada entre diferents MPNST pot influenciar en la prediccio de la resposta terapèutica i en els mecanismes de resistència als fàrmacs (Peacock et al, 2013).

Inhibició de la aurora cinasa A

Estudis de dades d'expressió gènica recents, comparant neurofibromes i MPNST, tant de pacients NF1 com de models de ratolí GEM, han identificat que AURKA es troba sobreexpressat en MPNST, suggerint el paper d'aquesta proteïna en la progressió tumoral dels MPNST (Patel et al, 2012). Per analitzar aquesta hipòtesi es va inhibir la proliferació *in vitro* de diverses línies cel·lulars de MPNST utilitzant un inhibidor d'aquesta proteïna com és el MLN8237. Estudis previs *in vivo* també havien utilitzat aquest fàrmac, per inhibir el creixement d'un model de xenògraft subcutani generat a partir de la línia cel·lular de MPNST humà, S462TY (Patel et al, 2012).

En consonància amb aquests estudis, els nostres resultats mostren que el tractament amb MLN8237, produceix una inhibició significativa del creixement de dos dels models de MPNST ortoxenògrafts generats a partir de tumors primaris humans (MPNST-SP-001 i MPNST-SP-001).

Per explicar el mecanisme d'acció del MLN8237, s'ha descrit que la inhibició d'AURKA provoca la retenció de la mitosi, produint defectes en la formació del fus mitòtic, podent arribar a induir l'apoptosi cel·lular, la senescència o la poliploïdia (Nair et al, 2012). Els altos nivells de proliferació i de cèl·lules binucleades obtinguts ens els tumors tractats dels dos xenògrafts ortotòpics, van evidenciar que el fàrmac MLN8237 provocava l'aturada del cicle cel·lular i l'augment de la endoreduplicació.

D'altra banda, estudis previs havien descrit que l'AURKA podria ser activada a través de la via de les MAPK (Raf/MEK/ERK). Encara que no es coneix el mecanisme exacte pel qual AURKA i la via MAPK interaccionen, podríem relacionar la sobreexpressió de RAS en els MPNST, a causa de la pèrdua de la funció de la Neurofibromina, amb la sobreexpressió d'AURKA (Furukawa et al, 2006).

Tots aquest resultats postulen que la sobreexpressió d'AURKA impulsa la progressió tumoral a través del control del cicle cel·lular, evidenciant que es podria tractar d'una molt bona diana en la teràpia contra els MPNST i que cal una major investigació dels inhibidors de AURKA, sols o en combinació, pel tractament d'aquest tipus de tumors.

Inhibició del receptor HER3

Estudis recents han proposat el receptor tirosina-cinasa HER3 com a potencial diana terapèutica pels MPNST, basant-se en el paper fisiològic que té en el desenvolupament de les cèl·lules de Schwann (Eckert et al, 2009) i el fet que existeixen diferents tractaments específics contra aquest receptor. A més a més, altres estudis previs han descrit la sobreexpressió dels receptors EGFR, HER2 i HER3 en un alt percentatge de MPNST primaris, relacionant-los directament amb el control de la proliferació cel·lular (Stonecypher et al, 2005; Holtkamp et al, 2008; Perrone et al, 2009; Ammoun et al, 2010).

Aquests resultats concorden amb la nostra valoració per immunohistoquímica de 14 MPNST primaris, on es va obtenir una sobreexpressió d'HER3 en el 50% dels tumors analitzats. D'altra banda, la valoració per immunohistoquímica realitzada en dos dels MPNST ortoxenògraft posteriorment tractats, van mostrar una sobreexpressió d'EGFR, HER2 i HER3 en el model relacionat amb la NF1 (MPNST-NF1-001), però en canvi només una sobreexpressió d'EGFR en el model esporàdic (MPNST-SP-001). Tanmateix, els resultats obtingut en el tractament amb pertuzumab, MEHD4579A i lapatinib en dos dels models ortoxenògrafts de MPNST, no van mostrar cap disminució de la progressió tumoral. Aquests resultats contrasten amb estudis previs on el tractament en models *in vitro* i *in vivo* amb inhibidors d'aquests tres receptors van provocar una disminució del creixement de diferents línies cel·lulars derivades de tumors de pàncrees, pulmó, schwannoma vestibular i MPNST (Dilworth et al, 2008; Ammoun et al, 2010; Ahmad et al, 2011; Schaefer et al, 2011).

Aquest resultats però, són els primers estudis preclínics en aquest tipus de tumors, per la qual cosa s'hauria de provar aquests fàrmacs amb altres models de xenògraft de MPNST. A més a més, la via per la qual actua HER3 encara no és del tot coneguda i potser seria interessant provar la combinació d'inhibidors de receptors HER amb inhibidors d'altres vies de senyalització involucrades en la tumorogènesi (com ara RAS), per afavorir un efecte sinèrgic envers la progressió tumoral.

MODELS ORTOXENÒGRAFTS COM A MEDICINA PERSONALITZADA

Els models ortoxenògrafts derivats de tumors primaris humans consisteixen una bona eina per la identificació de nous gens diana, per l'assaig de noves estratègies terapèutiques i per poder desenvolupar una medicina personalitzada.

Els MPNST conformen un grup de tumors heterogenis per la qual cosa és molt important disposar d'una col·lecció de models animals derivats de MPNST primaris, per tal d'obtenir un conjunt de dades clíniques, moleculars i de resposta a fàrmacs. D'aquesta manera es podrà individualitzar i optimitzar l'estrategia terapèutica específica per cada pacient amb MPNST dependent de les seves característiques germinals i somàtiques.

Per aprofundir en aquest camp i tenir diversitat de models ortoxenògrafts de MPNST seria interessant que un fragment de tumor primari extirpat del pacient s'implantés de forma rutinària a ratolins immunodeprimits en el moment de la cirurgia. Mentre el pacient es recupera de la cirurgia i rep tractament amb teràpies de primera línia el tumor empeltat s'expandiria a més ratolins. S'obtindrien i analitzarien mostres dels tumors primaris i del diferents passatges dels models ortoxenògrafts, per realitzar l'anàlisi genètica i transcriptòmica dels tumors. Un cop analitzades les dades obtingudes es podria realitzar un estudi *in vivo* en ratolí emprant els fàrmacs seleccionats en base al perfil molecular. Finalment, els resultats de l'assaig s'intentarien traslladar a la clínica per tal d'ajudar a guiar les etapes posteriors de la teràpia del pacient (Figura 12)(modificada de Stebbing et al, 2014). Amb tota la informació molecular generada es construiria un repositori de dades genètiques i farmacològiques que podrien ser utilitzades en el futur per classificar de forma ràpida els pacients, sense necessitat de passar pel model animal, i reduint així el temps de resposta clínica i de presa de decisions terapèutiques.

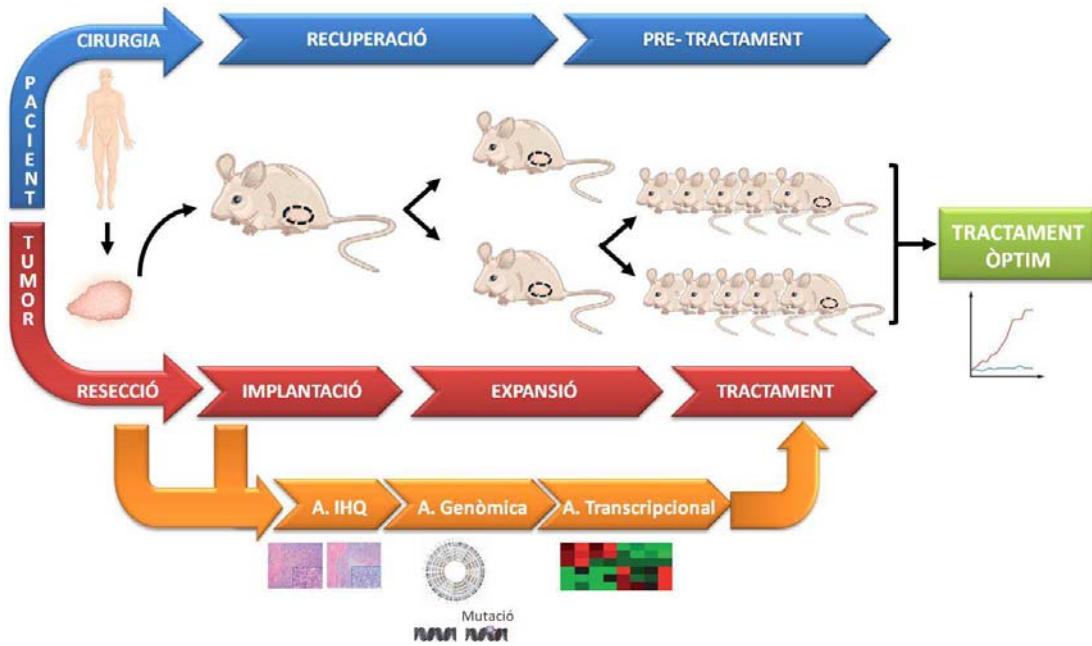


Figura 12. Esquema del procés d'empelt dels models MPNST ortoxenògrafts i el procés de tractament dels pacients (modificat de Stebbing et al., 2014).

CONCLUSIONS

PART 1:

- L'anàlisi quantitativa de la mutació *NF1* c.3198-314G>A en cèl·lules derivades de les tres capes embrionàries de una pacient NF1 amb una clínica molt lleu confirma que es tracta d'un cas de mosaïcisme genètic. El biaix observat en la inactivació del cromosoma X en diferents teixits suggereix diferències proliferatives en les cèl·lules portadores de la mutació *NF1*.
- Aquesta mutació intrònica comporta un *splicing* anormal i la generació de dos transcrits *NF1* aberrants portadors de codons prematurs de terminació. La proporció d'aquests transcrits mutats és molt baixa, inclusivament després de bloquejar el mecanisme de NMD. Aquest resultats i els de l'anàlisi d'un minigen amb aquesta mutació confirmen la generació de transcrits normals a partir de l'al·lel mutat.
- El tractament de fibroblasts de la pacient amb morfolinos antisentit específics per la mutació redueix els nivells de transcrits anòmals i produceix una disminució dels nivells de RAS-GTP, indicant de forma indirecta, la restauració de la funció de la Neurofibromina.

PART 2:

- Els cinc models ortoxenògrafts generats a partir de MPNST primaris i d'una línia cel·lular prèviament establerta conserven el patró histopatològic, genòmic i transcriptòmic dels tumors originals dels pacients, inclusivament en passatges avançats.
- L'estroma humà es perd després de l'empelt dels tumors primaris en el ratolí i és reemplaçat per cèl·lules murines en els ortoxenògrafts de MPNST en el primer passatge.
- Els MPNST primaris i els models ortotòpics derivats presenten un genoma altament alterat, suggerint un possible origen catastròfic. El MPNST generat a partir de la línia cel·lular S462 mostra un nombre de canvis genètics més alts que la línia cel·lular de la qual deriva, suggerint un procés de selecció clonal.
- Els models ortoxenògrafts generats a partir de tumors primaris NF1 i esporàdics presenten diferències a tots els nivells analitzats. Aquest és un resultat rellevant i

interessant que necessita ser confirmat en una sèrie més àmplia per tal de valorar la seva repercussió en el disseny d'assaigs clínics i tractaments per MPNST.

- El tractaments amb sorafenib, sol i en combinació amb doxorubicina o rapamicina, així com el tractament amb MLN8237, mostren una inhibició significativa del creixement tumoral dels models ortoxenògraft de MPNST. Els tractaments amb pertuzumab, MEHD7945A i lapatinib no mostren cap efecte envers el creixement tumoral, tot i que aquest darrer estudi s'ha realitzant només en dos models.

BIBLIOGRAFIA

A

- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Baas F, van Ommen GJ, van Deutekom JC (2003) Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Human molecular genetics* 12: 907-914
- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, den Dunnen JT, van Deutekom JC (2004) Antisense-induced multixon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *American journal of human genetics* 74: 83-92
- Aartsma-Rus A, van Ommen GJ (2010) Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur J Hum Genet* 18: 146-153
- Ahmad ZK, Brown CM, Cueva RA, Ryan AF, Doherty JK (2011) ErbB expression, activation, and inhibition with lapatinib and tyrphostin (AG825) in human vestibular schwannomas. *Otol Neurotol* 32: 841-847
- Ainsworth PJ, Chakraborty PK, Weksberg R (1997) Example of somatic mosaicism in a series of de novo neurofibromatosis type 1 cases due to a maternally derived deletion. *Human mutation* 9: 452-457
- Alaggio R, Turrini R, Boldrin D, Merlo A, Gambini C, Ferrari A, Dall'igna P, Coffin CM, Martines A, Bonaldi L et al (2013) Survivin expression and prognostic significance in pediatric malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *PloS one* 8: e80456
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL et al (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415-421
- Alkindy A, Chuzhanova N, Kini U, Cooper DN, Upadhyaya M (2012) Genotype-phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? *Human genomics* 6: 12
- Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, Teed A, Sambol EB, Singer S, Schwartz GK (2008) Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells. *Molecular cancer therapeutics* 7: 890-896
- Ammoun S, Cunliffe CH, Allen JC, Chiriboga L, Giancotti FG, Zagzag D, Hanemann CO, Karajannis MA (2010) ErbB/HER receptor activation and preclinical efficacy of lapatinib in vestibular schwannoma. *Neuro-oncology* 12: 834-843
- Anghileri M, Miceli R, Fiore M, Mariani L, Ferrari A, Mussi C, Lozza L, Collini P, Olmi P, Casali PG et al (2006) Malignant peripheral nerve sheath tumors: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Cancer* 107: 1065-1074
- Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y (2008) The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human mutation* 29: 992-1006
- Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, Estivill X, Lazaro C (2003) Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *Journal of medical genetics* 40: e82
- Ars E, Serra E, Garcia J, Kruyer H, Gaona A, Lazaro C, Estivill X (2000) Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1 [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 2000 Mar 1;9(4):659]. *Human molecular genetics* 9: 237-247

B

- Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M et al (2013) Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 153: 666-677
- Badache A, De Vries GH (1998) Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. *J Cell Physiol* 177: 334-342
- Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63: 851-859
- Banerjee S, Byrd JN, Gianino SM, Harpstite SE, Rodriguez FJ, Tuskan RG, Reilly KM, Piwnica-Worms DR, Gutmann DH (2010) The neurofibromatosis type 1 tumor suppressor controls cell growth by regulating signal transducer and activator of transcription-3 activity in vitro and in vivo. *Cancer research* 70: 1356-1366
- Barr AR, Gergely F (2007) Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *Journal of cell science* 120: 2987-2996
- Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J (1992) Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients [see comments]. *Nature* 356: 713-715
- Beckhove P, Schutz F, Diel IJ, Solomayer EF, Bastert G, Foerster J, Feuerer M, Bai L, Sinn HP, Umansky V et al (2003) Efficient engraftment of human primary breast cancer transplants in nonconditioned NOD/Scid mice. *International journal of cancer* 105: 444-453
- Beert E, Brems H, Daniels B, De Wever I, Van Calenbergh F, Schoenaers J, Debiec-Rychter M, Gevaert O, De Raedt T, Van Den Bruel A et al Atypical neurofibromas in neurofibromatosis type 1 are premalignant tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 50: 1021-1032
- Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, Field L, Brown CJ, Robinson WP (2003) Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *American journal of human genetics* 72: 399-407
- Ben-Salem S, Al-Shamsi AM, Ali BR, Al-Gazali L (2014) The mutational spectrum of the NF1 gene in neurofibromatosis type I patients from UAE. *Childs Nerv Syst* 30: 1183-1189
- Bengesser K, Cooper DN, Steinmann K, Kluwe L, Chuzhanova NA, Wimmer K, Tatagiba M, Tischert S, Mautner VF, Kehrer-Sawatzki H (2010) A novel third type of recurrent NF1 microdeletion mediated by nonallelic homologous recombination between LRRC37B-containing low-copy repeats in 17q11.2. *Human mutation* 31: 742-751
- Beniers AJ, Peelen WP, Schaafsma HE, Beck JL, Ramaekers FC, Debruyne FM, Schalken JA (1992) Establishment and characterization of five new human renal tumor xenografts. *The American journal of pathology* 140: 483-495
- Bhola P, Banerjee S, Mukherjee J, Balasubramanian A, Arun V, Karim Z, Burrell K, Croul S, Gutmann DH, Guha A (2009) Preclinical in vivo evaluation of rapamycin in human malignant peripheral nerve sheath explant xenograft. *International journal of cancer* 126: 563-571

- Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B, Ranzani GN, Pierotti MA, Pilotti S (2001) Rb and TP53 pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81: 833-844
- Bottillo I, Ahlquist T, Brekke H, Danielsen SA, van den Berg E, Mertens F, Lothe RA, Dallapiccola B (2009) Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *The Journal of pathology* 217: 693-701
- Bottillo I, Torrente I, Lanari V, Pinna V, Giustini S, Divona L, De Luca A, Dallapiccola B (2010) Germline mosaicism in neurofibromatosis type 1 due to a paternally derived multi-exon deletion. *American journal of medical genetics* 152A: 1467-1473
- Bradtmoller M, Hartmann C, Zietsch J, Jaschke S, Mautner VF, Kurtz A, Park SJ, Baier M, Harder A, Reuss D et al (2012) Impaired Pten expression in human malignant peripheral nerve sheath tumours. *PloS one* 7: e47595
- Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG (1994) Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues [published erratum appears in *Genes Dev* 1994 Nov 15;8(22):2792]. *Genes & development* 8: 1019-1029
- Brekke HR, Kolberg M, Skotheim RI, Hall KS, Bjerkehagen B, Risberg B, Domanski HA, Mandahl N, Liestol K, Smeland S et al (2009) Identification of p53 as a strong predictor of survival for patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro-oncology* 11: 514-528
- Brems H, Beert E, de Ravel T, Legius E (2009a) Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *The lancet oncology* 10: 508-515
- Brems H, Legius E (2013) Legius syndrome, an Update. *Molecular pathology of mutations in SPRED1*. *The Keio journal of medicine* 62: 107-112
- Brems H, Park C, Maertens O, Pemov A, Messiaen L, Upadhyaya M, Claes K, Beert E, Peeters K, Mautner V et al (2009b) Glomus tumors in neurofibromatosis type 1: genetic, functional, and clinical evidence of a novel association. *Cancer research* 69: 7393-7401
- Bridge RS, Jr., Bridge JA, Neff JR, Naumann S, Althof P, Bruch LA (2004) Recurrent chromosomal imbalances and structurally abnormal breakpoints within complex karyotypes of malignant peripheral nerve sheath tumour and malignant triton tumour: a cytogenetic and molecular cytogenetic study. *Journal of clinical pathology* 57: 1172-1178
- Burns MB, Temiz NA, Harris RS (2013) Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nature genetics* 45: 977-983
- Burris HA, 3rd (2004) Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *The oncologist* 9 Suppl 3: 10-15

C

- Callum P, Messiaen LM, Bower PV, Skovby F, Iger J, Timshel S, Sims CA, Falk RE (2012) Gonosomal mosaicism for an NF1 deletion in a sperm donor: evidence of the need for coordinated, long-term communication of health information among relevant parties. *Human reproduction* (Oxford, England) 27: 1223-1226
- Carli M, Ferrari A, Mattke A, Zanetti I, Casanova M, Bisogno G, Cecchetto G, Alaggio R, De Sio L, Koscielniak E et al (2005) Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: the Italian and German soft tissue sarcoma cooperative group. *J Clin Oncol* 23: 8422-8430

- Carol H, Boehm I, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Morton CL, Gorlick R, Kolb EA, Keir ST, Wu J et al (2011) Efficacy and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the Aurora kinase A inhibitor MLN8237 against preclinical models of pediatric cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 68: 1291-1304
- Carroll SL, Stonecypher MS (2004) Tumor suppressor mutations and growth factor signaling in the pathogenesis of NF1-associated peripheral nerve sheath tumors. I. The role of tumor suppressor mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63: 1115-1123
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-298
- Casali PG, Jost L, Sleijfer S, Verweij J, Blay JY (2008) Soft tissue sarcomas: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19 Suppl 2: ii89-93
- Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R (1990) Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics* 7: 555-565
- Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrishnan K, Rosello S, Andreu J, Jung J, Sanchis-Garcia JM et al (2012) Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora a kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 18: 4764-4774
- Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T (1999) Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science* (New York, NY 286: 2172-2176
- Colapietro P, Gervasini C, Natacci F, Rossi L, Riva P, Larizza L (2003) NF1 exon 7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis 1 patient. *Human genetics* 113: 551-554
- Colman SD, Rasmussen SA, Ho VT, Abernathy CR, Wallace MR (1996) Somatic mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *American journal of human genetics* 58: 484-490
- Consoli C, Moss C, Green S, Balderson D, Cooper DN, Upadhyaya M (2005) Gonosomal mosaicism for a nonsense mutation (R1947X) in the NF1 gene in segmental neurofibromatosis type 1. *J Invest Dermatol* 125: 463-466
- Cowley GS, Murthy AE, Parry DM, Schneider G, Korf B, Upadhyaya M, Harper P, MacCollin M, Bernards A, Gusella JF (1998) Genetic variation in the 3' untranslated region of the neurofibromatosis 1 gene: application to unequal allelic expression. *Somat Cell Mol Genet* 24: 107-119
- Crowe FW, Schull WJ, Neel JV (1956) A clinical, pathological, and genetic study of multiple neurofibromatosis., Springfield (IL): Charles C. Thomas
- Cummings LM, Trent JM, Marchuk DA (1996) Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homologous loci. *Cytogenet Cell Genet* 73: 334-340
- Chan S (2004) Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *British journal of cancer* 91: 1420-1424
- Chiba-Falek O, Kerem E, Shoshani T, Aviram M, Augarten A, Bentur L, Tal A, Tullis E, Rahat A, Kerem B (1998) The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C->T mutation. *Genomics* 53: 276-283

Chiba-Falek O, Parad RB, Kerem E, Kerem B (1999) Variable levels of normal RNA in different fetal organs carrying a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splicing mutation. Am J Respir Crit Care Med 159: 1998-2002

Chu C, Noel-Hudson MS, Boige V, Goere D, Marion S, Polrot M, Bigot L, Gonin P, Farinotti R, Bonhomme-Faivre L (2012) Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation. Fundamental & clinical pharmacology 27: 434-442

D

D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K (2006) A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. EMBO reports 7: 174-179

Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S, Weiswald LB, Assayag F, Saulnier P, Judd JG, Janneau JL, Auger N, Validire P et al (2007) Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. Cancer research 67: 398-407

Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, Yung R, Parmigiani G, Dorsch M, Peacock CD et al (2009) A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. Cancer research 69: 3364-3373

De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H, Ortonne N, Helin K, Hornick JL, Mautner V, Kehrer-Sawatzki H et al (2014) PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. Nature

De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, Frahm S, Sciot R, Legius E (2003) Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. American journal of human genetics 72: 1288-1292

De Raedt T, Maertens O, Chmara M, Brems H, Heyns I, Sciot R, Majounie E, Upadhyaya M, De Schepper S, Speleman F et al (2006) Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: Comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. Genes, chromosomes & cancer 45: 893-904

De Raedt T, Walton Z, Yecies JL, Li D, Chen Y, Malone CF, Maertens O, Jeong SM, Bronson RT, Lebleu V et al (2011) Exploiting cancer cell vulnerabilities to develop a combination therapy for ras-driven tumors. Cancer cell 20: 400-413

De Schepper S, Maertens O, Callens T, Naeyaert JM, Lambert J, Messiaen L (2008) Somatic mutation analysis in NF1 cafe au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. J Invest Dermatol 128: 1050-1053

DeBella K, Szudek J, Friedman JM (2000) Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. Pediatrics 105: 608-614

DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR (1991) Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 9914-9918

DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR (1992) Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. Cell 69: 265-273

DeGrendele H (2003) The anti-HER2 monoclonal antibody pertuzumab may be effective in androgen-independent prostate cancer. Clinical prostate cancer 2: 143-145

- Demestre M, Herzberg J, Holtkamp N, Hagel C, Reuss D, Friedrich RE, Kluwe L, Von Deimling A, Mautner VF, Kurtz A (2010) Imatinib mesylate (Glivec) inhibits Schwann cell viability and reduces the size of human plexiform neurofibroma in a xenograft model. *Journal of neuro-oncology* 98: 11-19
- DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MT, Factor R, Matsen C, Milash BA, Nelson E et al (2011) Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature medicine* 17: 1514-1520
- Dilworth JT, Wojtkowiak JW, Mathieu P, Tainsky MA, Reiners JJ, Jr., Mattingly RR, Hancock CN (2008) Suppression of proliferation of two independent NF1 malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines by the pan-ErbB inhibitor CI-1033. *Cancer biology & therapy* 7: 1938-1946
- Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL et al (2010) Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 464: 999-1005
- Dong X, Guan J, English JC, Flint J, Yee J, Evans K, Murray N, Macaulay C, Ng RT, Gout PW et al (2010) Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin Cancer Res* 16: 1442-1451
- Dong Z, Radinsky R, Fan D, Tsan R, Bucana CD, Wilmanns C, Fidler IJ (1994) Organ-specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* 86: 913-920
- Downward J (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews* 3: 11-22
- Du L, Pollard JM, Gatti RA (2007) Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6007-6012
- Du Q, Jiang L, Wang XQ, Pan W, She FF, Chen YL (2014) Establishment of and comparison between orthotopic xenograft and subcutaneous xenograft models of gallbladder carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 3747-3752
- Du X, Yang J, Ylipaa A, Zhu Z (2013) Genomic amplification and high expression of EGFR are key targetable oncogenic events in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Journal of hematology & oncology* 6: 93
- Duarte A, Amaral M, Barreto C, Pacheco P, Lavinha J (1996) Complex cystic fibrosis allele R334W-R1158X results in reduced levels of correctly processed mRNA in a pancreatic sufficient patient. *Human mutation* 8: 134-139
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgas DG, Reiman HM, Ilstrup DM (1986a) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer* 57: 2006-2021
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgas DG, Reiman HM, Ilstrup DM (1986b) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer* 57: 2006-2021

E

- Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *American journal of human genetics* 53: 305-313

Eckert JM, Byer SJ, Clodfelder-Miller BJ, Carroll SL (2009) Neuregulin-1 beta and neuregulin-1 alpha differentially affect the migration and invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor cells. *Glia* 57: 1501-1520

Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312: 646-649

Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, Iida K, Matsumoto Y, Hakozaki M, Aoki M et al (2013) Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 19: 450-461

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA et al (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 356: 125-134

Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A (2002) Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *Journal of medical genetics* 39: 311-314

F

Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D et al (2000) Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain [In Process Citation]. *American journal of human genetics* 66: 790-818

Fang LJ, Simard MJ, Vidaud D, Assouline B, Lemieux B, Vidaud M, Chabot B, Thirion JP (2001) A novel mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. *Journal of molecular biology* 307: 1261-1270

Fang Y, Elahi A, Denley RC, Rao PH, Brennan MF, Jhanwar SC (2009) Molecular characterization of permanent cell lines from primary, metastatic and recurrent malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) with underlying neurofibromatosis-1. *Anticancer research* 29: 1255-1262

Fendrich V, Maschuw K, Rehm J, Buchholz M, Holler JP, Slater EP, Bartsch DK, Waldmann J (2012) Sorafenib inhibits tumor growth and improves survival in a transgenic mouse model of pancreatic islet cell tumors. *TheScientificWorldJournal* 2012: 529151

Ferner RE (2007) Neurofibromatosis 1. *Eur J Hum Genet* 15: 131-138

Ferner RE, Gutmann DH (2002) International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer research* 62: 1573-1577

Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D (1994) Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer metastasis reviews* 13: 209-222

Fleming JM, Miller TC, Quinones M, Xiao Z, Xu X, Meyer MJ, Ginsburg E, Veenstra TD, Vonderhaar BK (2010) The normal breast microenvironment of premenopausal women differentially influences the behavior of breast cancer cells in vitro and in vivo. *BMC medicine* 8: 27

Foley KM, Woodruff JM, Ellis FT, Posner JB (1980) Radiation-induced malignant and atypical peripheral nerve sheath tumors. *Annals of neurology* 7: 311-318

Forment JV, Kaidi A, Jackson SP (2012) Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nature reviews* 12: 663-670

Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21-q22 in soft tissue sarcomas. *Genes, chromosomes & cancer* 14: 8-14

Frahm S, Mautner VF, Brems H, Legius E, Debiec-Rychter M, Friedrich RE, Knofel WT, Peiper M, Kluwe L (2004) Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis* 16: 85-91

Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH (2005) ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer research* 65: 4320-4333

Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R (1999) Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *The Journal of biological chemistry* 274: 36193-36199

Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C (2007) Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 5: 1-10

Fu X, Guadagni F, Hoffman RM (1992) A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5645-5649

Furukawa T, Kanai N, Shiwaku HO, Soga N, Uehara A, Horii A (2006) AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer. *Oncogene* 25: 4831-4839

G

Ghadimi MP, Young ED, Belousov R, Zhang Y, Lopez G, Lusby K, Kivlin CH, Demicco EG, Creighton CHJ, Lazar AJ et al (2012) Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 18: 2545-2557

Garcia-Linares C, Fernandez-Rodriguez J, Terribas E, Mercade J, Pros E, Benito L, Benavente Y, Capella G, Ravella A, Blanco I et al (2011) Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH. *Human mutation* 32: 78-90

Garralda E, Paz K, Lopez-Casas PP, Jones S, Katz A, Kann LM, Lopez-Rios F, Sarno F, Al-Shahrour F, Vasquez D et al (2014) Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res* 20: 2476-2484

Garrido-Laguna I, Uson M, Rajeshkumar NV, Tan AC, de Oliveira E, Karikari C, Villaroel MC, Salomon A, Taylor G, Sharma R et al (2011) Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 17: 5793-5800

Ghadimi MP, Young ED, Belousov R, Zhang Y, Lopez G, Lusby K, Kivlin C, Demicco EG, Creighton CJ, Lazar AJ et al (2012) Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 18: 2545-2557

Goldberg SL, Fenaux P, Craig MD, Gyan E, Lister J, Kassis J, Pigneux A, Schiller GJ, Jung J, Jane Leonard E et al (2014) An exploratory phase 2 study of investigational Aurora A kinase inhibitor alisertib (MLN8237) in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia research reports* 3: 58-61

- Gorgun G, Calabrese E, Hidemitsu T, Ecsedy J, Perrone G, Mani M, Ikeda H, Bianchi G, Hu Y, Cirstea D et al (2010) A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* 115: 5202-5213
- Gousias K, Bostrom J, Kovacs A, Niehusmann P, Wagner I, Kristof R (2010) Factors of influence upon overall survival in the treatment of intracranial MPNSTs. Review of the literature and report of a case. *Radiation oncology (London, England)* 5: 114
- Goyenvalle A, Babbs A, Powell D, Kole R, Fletcher S, Wilton SD, Davies KE (2010) Prevention of dystrophic pathology in severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice by morpholino-oligomer-mediated exon-skipping. *Mol Ther* 18: 198-205
- Gray DR, Huss WJ, Yau JM, Durham LE, Werdin ES, Funkhouser WK, Jr., Smith GJ (2004) Short-term human prostate primary xenografts: an in vivo model of human prostate cancer vasculature and angiogenesis. *Cancer research* 64: 1712-1721
- Gregorian C, Nakashima J, Dry SM, Nghiempou PL, Smith KB, Ao Y, Dang J, Lawson G, Mellinghoff IK, Mischel PS et al (2009) PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 19479-19484
- Griffiths S, Thompson P, Frayling I, Upadhyaya M (2007) Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years experience. *Fam Cancer* 6: 21-34
- Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ (2003) Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9: 1420-1426
- Grobmyer SR, Reith JD, Shahlaee A, Bush CH, Hochwald SN (2008) Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor: molecular pathogenesis and current management considerations. *Journal of surgical oncology* 97: 340-349
- Guha A, Lau N, Huvar I, Gutmann D, Provias J, Pawson T, Boss G (1996) Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors. *Oncogene* 12: 507-513
- Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT, Finkel RS, Medne L, Anderson CB, Weiss RB, Wilton SD, Flanigan KM (2008) DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Annals of neurology* 63: 81-89
- Gutmann DH, Wood DL, Collins FS (1991) Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9658-9662
- ## H
- Hadfield KD, Newman WG, Bowers NL, Wallace A, Bolger C, Colley A, McCann E, Trump D, Prescott T, Evans DG (2008) Molecular characterisation of SMARCB1 and NF2 in familial and sporadic schwannomatosis. *Journal of medical genetics* 45: 332-339
- Hajra A, Martin-Gallardo A, Tarle SA, Freedman M, Wilson-Gunn S, Bernards A, Collins FS (1994) DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics* 21: 649-652
- Hall CL, Yang B, Yang X, Zhang S, Turley M, Samuel S, Lange LA, Wang C, Curpen GD, Savani RC et al (1995) Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* 82: 19-26
- Hardin J, Behm A, Haber RM (2014) Mosaic generalized neurofibromatosis 1: report of two cases. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 18: 271-274

- Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A et al (2004) VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nature medicine* 10: 262-267
- Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, Yamada H, Kojima K, Kumagai J, Kawano T, Sugihara K (2008) High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 14: 7843-7849
- Heemskerk H, de Winter CL, van Ommen GJ, van Deutekom JC, Aartsma-Rus A (2009) Development of antisense-mediated exon skipping as a treatment for duchenne muscular dystrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1175: 71-79
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Maelandsmo GM et al (2014) Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer discovery* 4: 998-1013
- Higa GM, Abraham J (2007) Lapatinib in the treatment of breast cancer. *Expert review of anticancer therapy* 7: 1183-1192
- Hoffmeyer S, Assum G, Griesser J, Kaufmann D, Nurnberg P, Krone W (1995) On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1. *Human molecular genetics* 4: 1267-1272
- Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Krone W (1994) Unequal expression of NF1 alleles [letter]. *Nature genetics* 6: 331
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental cell research* 284: 99-110
- Holtkamp N, Atallah I, Okuducu AF, Mucha J, Hartmann C, Mautner VF, Friedrich RE, Mawrin C, von Deimling A (2007) MMP-13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia (New York, NY)* 9: 671-677
- Holtkamp N, Malzer E, Zietsch J, Okuducu AF, Mucha J, Mawrin C, Mautner VF, Schildhaus HU, von Deimling A (2008) EGFR and erbB2 in malignant peripheral nerve sheath tumors and implications for targeted therapy. *Neuro-oncology* 10: 946-957
- Holtkamp N, Okuducu AF, Mucha J, Afanasieva A, Hartmann C, Atallah I, Estevez-Schwarz L, Mawrin C, Friedrich RE, Mautner VF et al (2006) Mutation and expression of PDGFRA and KIT in malignant peripheral nerve sheath tumors, and its implications for imatinib sensitivity. *Carcinogenesis* 27: 664-671
- Holtkamp N, Reuss DE, Atallah I, Kuban RJ, Hartmann C, Mautner VF, Frahm S, Friedrich RE, Algermissen B, Pham VA et al (2004) Subclassification of nerve sheath tumors by gene expression profiling. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14: 258-264
- Hruban RH, Shiu MH, Senie RT, Woodruff JM (1990) Malignant peripheral nerve sheath tumors of the buttock and lower extremity. A study of 43 cases. *Cancer* 66: 1253-1265
- Huang S, Li C, Armstrong EA, Peet CR, Saker J, Amler LC, Sliwkowski MX, Harari PM (2013) Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer research* 73: 824-833
- Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabe RR, Bhan MK, Calvo F, Eerola I, Gerhard DS et al International network of cancer genome projects. *Nature* 464: 993-998
- Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS (1989) A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *Journal of medical genetics* 26: 704-711

Huson SM, Harper PS, Compston DA (1988) Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain* 111: 1355-1381

Hylander BL, Punt N, Tang H, Hillman J, Vaughan M, Bshara W, Pitoniak R, Repasky EA (2013) Origin of the vasculature supporting growth of primary patient tumor xenografts. *Journal of translational medicine* 11: 110

I

Ingordo V, D'Andria G, Mendicini S, Grecucci M, Baglivo A (1995) Segmental neurofibromatosis: is it uncommon or underdiagnosed? *Archives of dermatology* 131: 959-960

J

Jacks T, Shih, T. S., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Bernards, A., Weinberg, R.A. (1994) Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nature Genet* 7: 353-361

Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC (2004) Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 2065-2071

Jessen WJ, Miller SJ, Jousma E, Wu J, Rizvi TA, Brundage ME, Eaves D, Widemann B, Kim MO, Dombi E et al (2013) MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. *The Journal of clinical investigation* 123: 340-347

Jett K, Friedman JM (2010) Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med* 12: 1-11

Ji H, Sharpless NE, Wong KK (2006) EGFR targeted therapy: view from biological standpoint. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5: 2072-2076

Johannessen CM, Johnson BW, Williams SM, Chan AW, Reczek EE, Lynch RC, Rioth MJ, McClatchey A, Ryeom S, Cichowski K (2008) TORC1 is essential for NF1-associated malignancies. *Curr Biol* 18: 56-62

Johansson G, Mahller YY, Collins MH, Kim MO, Nobukuni T, Perentesis J, Cripe TP, Lane HA, Kozma SC, Thomas G et al (2008) Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Molecular cancer therapeutics* 7: 1237-1245

Jones MJ, Jallepalli PV (2012) Chromothripsis: chromosomes in crisis. *Developmental cell* 23: 908-917

Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, Conway SJ, Parada LF, Zhu Y, Morrison SJ (2008) The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. *Cancer cell* 13: 129-140

Juliachs M, Castillo-Avila W, Vidal A, Piulats JM, Garcia Del Muro X, Condom E, Hernandez-Losa J, Teixido C, Pandiella A, Graupera M et al (2013) ErbBs inhibition by lapatinib blocks tumor growth in an orthotopic model of human testicular germ cell tumor. *International journal of cancer* 133: 235-246

Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goere D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P et al (2012) Characterization of a large panel of patient-derived tumor

xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. Clin Cancer Res 18: 5314-5328

K

- Kamath AV, Lu D, Gupta P, Jin D, Xiang H, Wong A, Leddy C, Crocker L, Schaefer G, Sliwkowski MX et al (2012) Preclinical pharmacokinetics of MEHD7945A, a novel EGFR/HER3 dual-action antibody, and prediction of its human pharmacokinetics and efficacious clinical dose. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 69: 1063-1069
- Karamchandani JR, Nielsen TO, van de Rijn M, West RB (2012) Sox10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20: 445-450
- Katayama H, Brinkley WR, Sen S (2003) The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer metastasis reviews* 22: 451-464
- Kayes LM, Burke W, Riccardi VM, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens K (1994) Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients. *American journal of human genetics* 54: 424-436
- Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN (2008) Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? *Journal of medical genetics* 45: 622-631
- Kehrer-Sawatzki H, Schwickardt T, Assum G, Rocchi M, Krone W (1997) A third neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogene at chromosome 15q11.2. *Human genetics* 100: 595-600
- Kehrer-Sawatzki H, Vogt J, Mussotter T, Kluwe L, Cooper DN, Mautner VF (2012) Dissecting the clinical phenotype associated with mosaic type-2 NF1 microdeletions. *Neurogenetics* 13: 229-236
- Keizman D, Issakov J, Meller I, Maimon N, Ish-Shalom M, Sher O, Merimsky O (2009) Expression and significance of EGFR in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Journal of neuro-oncology* 94: 383-388
- Keng VW, Rahrmann EP, Watson AL, Tschida BR, Moertel CL, Jessen WJ, Rizvi TA, Collins MH, Ratner N, Largaespada DA (2012a) PTEN and NF1 inactivation in Schwann cells produces a severe phenotype in the peripheral nervous system that promotes the development and malignant progression of peripheral nerve sheath tumors. *Cancer research* 72: 3405-3413
- Keng VW, Watson AL, Rahrmann EP, Li H, Tschida BR, Moriarity BS, Choi K, Rizvi TA, Collins MH, Wallace MR et al (2012b) Conditional Inactivation of Pten with EGFR Overexpression in Schwann Cells Models Sporadic MPNST. *Sarcoma* 2012: 620834
- Khalifa MA, Montgomery EA, Ismiil N, Azumi N (2000) What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *Am J Clin Pathol* 114: 123-126
- Kim A, Dombi E, Tepas K, Fox E, Martin S, Wolters P, Balis FM, Jayaprakash N, Turkbey B, Muradyan N et al (2013) Phase I trial and pharmacokinetic study of sorafenib in children with neurofibromatosis type I and plexiform neurofibromas. *Pediatric blood & cancer* 60: 396-401
- Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE (2009) Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nature protocols* 4: 1670-1680

- Kimani JW, Shi M, Daack-Hirsch S, Christensen K, Moretti-Ferreira D, Marazita ML, Field LL, Canady JW, Murray JC (2007) X-chromosome inactivation patterns in monozygotic twins and sib pairs discordant for nonsyndromic cleft lip and/or palate. *American journal of medical genetics* 143A: 3267-3272
- Kinali M, Arechavala-Gomeza V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, Guglieri M, Ashton E, Abbs S, Nihoyannopoulos P et al (2009) Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 8: 918-928
- Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tischert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF (2004) Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. *Human mutation* 23: 111-116
- Knudson JAG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natn Acad Sci USA* 68: 820-823
- Ko JM, Sohn YB, Jeong SY, Kim HJ, Messiaen LM (2013) Mutation spectrum of NF1 and clinical characteristics in 78 Korean patients with neurofibromatosis type 1. *Pediatric neurology* 48: 447-453
- Koo T, Wood MJ (2013) Clinical trials using antisense oligonucleotides in duchenne muscular dystrophy. *Human gene therapy* 24: 479-488
- Kopetz S, Lemos R, Powis G (2012) The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clin Cancer Res* 18: 5160-5162
- Kourea HP, Orlow I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM (1999) Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *The American journal of pathology* 155: 1855-1860
- Kresse SH, Skarn M, Ohnstad HO, Namlos HM, Bjerkehagen B, Myklebost O, Meza-Zepeda LA (2008) DNA copy number changes in high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors by array CGH. *Molecular cancer* 7: 48

L

- L'Heureux-Lebeau B, Saliba I (2014) Updates on the diagnosis and treatment of intracranial nerve malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncotargets and therapy* 6: 459-470
- LaFemina J, Qin LX, Moraco NH, Antonescu CR, Fields RC, Crago AM, Brennan MF, Singer S (2013) Oncologic outcomes of sporadic, neurofibromatosis-associated, and radiation-induced malignant peripheral nerve sheath tumors. *Annals of surgical oncology* 20: 66-72
- Langdon SP, Cameron DA (2013) Pertuzumab for the treatment of metastatic breast cancer. *Expert review of anticancer therapy* 13: 907-918
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA et al (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214-218
- Laycock-van Spyk S, Thomas N, Cooper DN, Upadhyaya M (2011) Neurofibromatosis type 1-associated tumours: their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Human genomics* 5: 623-690

- Lazaro C, Ravella A, Gaona A, Volpini V, Estivill X (1994) Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *The New England journal of medicine* 331: 1403-1407
- Leled F, Hallstrom M, Ragnhammar P, Ohrling K, Edler D (2014) HER3 expression in patients with primary colorectal cancer and corresponding lymph node metastases related to clinical outcome. *Eur J Cancer* 50: 656-662
- Lee EC, Frolov A, Li R, Ayala G, Greenberg NM (2006) Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer research* 66: 4996-5002
- Lee SM, Choi IH, Lee DY, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Cho TJ (2012) Is double inactivation of the Nf1 gene responsible for the development of congenital pseudarthrosis of the tibia associated with NF1? *J Orthop Res* 30: 1535-1540
- Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada C, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, Tap WD et al (2014) PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nature genetics* 46(11):1227-32
- Legius E, Dierick H, Wu R (1994a) TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10: 250-255
- Legius E, Dierick H, Wu R, Hall BK, Marynen P, Cassiman JJ, Glover TW (1994b) TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 10: 250-255
- Legius E, Marchuk DA, Hall BK, Andersen LB, Wallace MR, Collins FS, Glover TW (1992) NF1-related locus on chromosome 15. *Genomics* 13: 1316-1318
- Lehr HA, Skelly M, Buhler K, Anderson B, Delisser HM, Gown AM (1997) Microvascular endothelium of human tumor xenografts expresses mouse (= host) CD31. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* 17: 138-142
- Leroy K, Dumas V, Martin-Garcia N, Falzone MC, Voisin MC, Wechsler J, Revuz J, Creange A, Levy E, Lantieri L et al (2001) Malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic and molecular study of 17 patients. *Archives of dermatology* 137: 908-913
- Li H, Zhang X, Fishbein L, Kweh F, Campbell-Thompson M, Perrin GQ, Muir D, Wallace M (2010) Analysis of steroid hormone effects on xenografted human NF1 tumor schwann cells. *Cancer biology & therapy* 10: 758-764
- Liapis H, Marley EF, Lin Y, Dehner LP (1999) p53 and Ki-67 proliferating cell nuclear antigen in benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in children. *Pediatr Dev Pathol* 2: 377-384
- Lin MT, Tseng LH, Kamiyama H, Kamiyama M, Lim P, Hidalgo M, Wheelan S, Eshleman J (2010) Quantifying the relative amount of mouse and human DNA in cancer xenografts using species-specific variation in gene length. *BioTechniques* 48: 211-218
- Lin ST, Chou HC, Chang SJ, Chen YW, Lyu PC, Wang WC, Chang MD, Chan HL (2012) Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. *Journal of proteomics* 75: 5822-5847
- Lopez G, Torres K, Liu J, Hernandez B, Young E, Belousov R, Bolshakov S, Lazar AJ, Slopis JM, McCutcheon IE et al (2011) Autophagic survival in resistance to histone deacetylase inhibitors: novel strategies to treat malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer research* 71: 185-196
- Lothe RA, Karhu R, Mandahl N, Mertens F, Saeter G, Heim S, Borresen-Dale AL, Kallioniemi OP (1996) Gain of 17q24-qter detected by comparative genomic hybridization in malignant

tumors from patients with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer research* 56: 4778-4781

Lothe RA, Smith-Sorensen B, Hektoen M, Stenwig AE, Mandahl N, Saeter G, Mertens F (2001) Biallelic inactivation of TP53 rarely contributes to the development of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 30: 202-206

Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S (2004) Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* 29: 193-203

Luscan A, Shackleford G, Masliah-Planchon J, Laurendeau I, Ortonne N, Varin J, Lallemand F, Leroy K, Dumaine V, Hivelin M et al (2013) The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 20: 358-371

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 359: 378-390

M

Macarulla T, Cervantes A, Elez E, Rodriguez-Braun E, Baselga J, Rosello S, Sala G, Blasco I, Danaee H, Lee Y et al (2010) Phase I study of the selective Aurora A kinase inhibitor MLN8054 in patients with advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Molecular cancer therapeutics* 9: 2844-2852

Maertens O, De Schepper S, Vandesompele J, Brems H, Heyns I, Janssens S, Speleman F, Legius E, Messiaen L (2007) Molecular dissection of isolated disease features in mosaic neurofibromatosis type 1. *American journal of human genetics* 81: 243-251

Mahller YY, Rangwala F, Ratner N, Cripe TP (2006) Malignant peripheral nerve sheath tumors with high and low Ras-GTP are permissive for oncolytic herpes simplex virus mutants. In *Pediatr Blood Cancer* pp 745-754.

Mahller YY, Vaikunth SS, Currier MA, Miller SJ, Ripberger MC, Hsu YH, Mehrian-Shai R, Collins MH, Crombleholme TM, Ratner N et al (2007) Oncolytic HSV and erlotinib inhibit tumor growth and angiogenesis in a novel malignant peripheral nerve sheath tumor xenograft model. *Mol Ther* 15: 279-286

Maki RG, D'Adamo DR, Keohan ML, Saulle M, Schuetze SM, Undevia SD, Livingston MB, Cooney MM, Hensley ML, Mita MM et al (2009) Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas. *J Clin Oncol* 27: 3133-3140

Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews* 3: 459-465

Manfredi MG, Ecsedy JA, Chakravarty A, Silverman L, Zhang M, Hoar KM, Stroud SG, Chen W, Shinde V, Huck JJ et al (2011) Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel *in vivo* pharmacodynamic assays. *Clin Cancer Res* 17: 7614-7624

Mantripragada KK, Diaz de Stahl T, Patridge C, Menzel U, Andersson R, Chuzhanova N, Kluwe L, Guha A, Mautner V, Dumanski JP et al (2009) Genome-wide high-resolution analysis of DNA copy number alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors using 32K BAC array. *Genes, chromosomes & cancer* 48: 897-907

Mantripragada KK, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Ferner RE, Frayling IM, Dumanski JP, Guha A, Mautner V, Upadhyaya M (2008) High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* 14: 1015-1024

- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58: 903-913
- Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM et al (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63: 843-849
- Martinez-Garcia R, Juan D, Rausell A, Munoz M, Banos N, Menendez C, Lopez-Casas PP, Rico D, Valencia A, Hidalgo M (2014) Transcriptional dissection of pancreatic tumors engrafted in mice. *Genome medicine* 6: 27
- Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammert S, Hogel J, Spori H, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H (2010) Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *Journal of medical genetics* 47: 623-630
- Mawrin C (2010) Critical role of PTEN for development and progression of nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1. *Future oncology (London, England)* 6: 499-501
- Mawrin C, Kirches E, Boltze C, Dietzmann K, Roessner A, Schneider-Stock R (2002) Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Arch* 440: 610-615
- Maxwell CA, Benitez J, Gomez-Baldo L, Osorio A, Bonifaci N, Fernandez-Ramires R, Costes SV, Guino E, Chen H, Evans GJ et al (2011) Interplay between BRCA1 and RHAMM regulates epithelial apicobasal polarization and may influence risk of breast cancer. *PLoS biology* 9: e1001199
- McCaughan JA, Holloway SM, Davidson R, Lam WW (2007) Further evidence of the increased risk for malignant peripheral nerve sheath tumour from a Scottish cohort of patients with neurofibromatosis type 1. *Journal of medical genetics* 44: 463-466
- McClatchey AI (2000) Neurofibromatosis type II: mouse models reveal broad roles in tumorigenesis and metastasis. *Mol Med Today* 6: 252-253
- Mechtersheimer G, Otano-Joos M, Ohl S, Benner A, Lehnert T, Willeke F, Moller P, Otto HF, Lichter P, Joos S (1999) Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer* 25: 362-369
- Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E (2001) HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 12 Suppl 1: S15-19
- Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DE, Freiman RN, Lee JK, Li, F. P., Barker DF, Ledbetter DH et al (1990) Chromosome 17p deletions and p53 mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5435-5439
- Mensink KA, Ketterling RP, Flynn HC, Knudson RA, Lindor NM, Heese BA, Spinner RJ, Babovic-Vukšanović D (2006) Connective tissue dysplasia in five new patients with NF1 microdeletions: further expansion of phenotype and review of the literature. *Journal of medical genetics* 43: e8
- Mercatante DR, Kole R (2002) Control of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy: effects on gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1587: 126-132

Merk J, Rolff J, Becker M, Leschber G, Fichtner I (2009) Patient-derived xenografts of non-small-cell lung cancer: a pre-clinical model to evaluate adjuvant chemotherapy? *Eur J Cardiothorac Surg* 36: 454-459

Mertens F, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, Mandahl N, Mitelman F, Rosai J, Rydholm A, Sciot R, Tallini G et al (2000) Cytogenetic characterization of peripheral nerve sheath tumours: a report of the CHAMP study group. *The Journal of pathology* 190: 31-38

Mertens F, Rydholm A, Bauer HF, Limon J, Nedoszytko B, Szadowska A, Willen H, Heim S, Mitelman F, Mandahl N (1995) Cytogenetic findings in malignant peripheral nerve sheath tumors. *International journal of cancer* 61: 793-798

Messiaen LM, Wimmer K. NF1 mutational spectrum. In: Kaufmann D, ed. *Neurofibromatoses. Monographs in Human Genetics.* Vol 16. Basel, Switzerland: Karger; 2008:63-77.

Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, Garcia-Linares C, Cooper DN, Lazaro C, Kehler-Sawatzki H (2011) Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Human mutation* 32: 213-219

Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD (2000) Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Human mutation* 15: 541-555

Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, Jegga AG, Li H, Upadhyaya M, Giovannini M et al (2009) Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. *EMBO molecular medicine* 1: 236-248

Miller SJ, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, Kaiser S, Aronow BJ, Frahm S, Kluwe L et al (2006) Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer research* 66: 2584-2591

Moretti VM, Crawford EA, Staddon AP, Lackman RD, Ogilvie CM (2011) Early outcomes for malignant peripheral nerve sheath tumor treated with chemotherapy. *American journal of clinical oncology* 34: 417-421

Muir D, Neubauer D, Lim IT, Yachnis AT, Wallace MR (2001) Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient neurofibroma Schwann cells. *The American journal of pathology* 158: 501-513

N

Naber U, Friedrich RE, Glatzel M, Mautner VF, Hagel C (2011) Podoplanin and CD34 in peripheral nerve sheath tumours: focus on neurofibromatosis 1-associated atypical neurofibroma. *Journal of neuro-oncology* 103: 239-245

Nair JS, Ho AL, Schwartz GK (2012) The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 11: 807-817

Nemethova M, Bolcekova A, Ilencikova D, Durovcikova D, Hlinkova K, Hlavata A, Kovacs L, Kadasi L, Zatkova A (2013) Thirty-nine novel neurofibromatosis 1 (NF1) gene mutations identified in Slovak patients. *Annals of human genetics* 77: 364-379

Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, MB MI, Rosenberg AE, Louis DN (1999) Malignant Transformation of Neurofibromas in Neurofibromatosis 1 Is Associated with CDKN2A/p16 Inactivation. *The American journal of pathology* 155: 1879-1884

Nielsen TO, Borre M, Nexo E, Sorensen BS (2014) Co-expression of HER3 and MUC1 is associated with a favourable prognosis in bladder cancer patients. *BJU international*

Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N (1993) Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci* 13: 1588-1600

O

Ohishi J, Aoki M, Nabeshima K, Suzumiya J, Takeuchi T, Ogose A, Hakozaki M, Yamashita Y, Iwasaki H (2013) Imatinib mesylate inhibits cell growth of malignant peripheral nerve sheath tumors in vitro and in vivo through suppression of PDGFR-beta. *BMC cancer* 13: 224

Orzan F, Stroppi M, Venturin M, Valero MC, Hernandez C, Riva P (2008) Breakpoint characterization of a novel NF1 multiexon deletion: a case showing expression of the mutated allele. *Neurogenetics* 9: 95-100

P

Palani S, Patel M, Huck J, Zhang M, Balani SK, Yang J, Chen S, Mettetal J, Manfredi M, Shyu WC et al (2013) Preclinical pharmacokinetic/pharmacodynamic/efficacy relationships for alisertib, an investigational small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 72: 1255-1264

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312: 649-651

Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, Martin L, Barbarot S, Leheup B, Rodriguez D et al (2010) NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Human mutation* 31: E1506-1518

Pasmant E, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P (2014) Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Journal of medical genetics* 49: 483-489

Patel AV, Eaves D, Jessen WJ, Rizvi TA, Ecsedy JA, Qian MG, Aronow BJ, Perentes JP, Serra E, Cripe TP et al (2012) Ras-driven transcriptome analysis identifies aurora kinase A as a potential malignant peripheral nerve sheath tumor therapeutic target. *Clin Cancer Res* 18: 5020-5030

Patil S, Chamberlain RS (2012) Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations. *The oncologist* 17: 101-116

Patwardhan PP, Surriga O, Beckman MJ, de Stanchina E, Dematteo RP, Tap WD, Schwartz GK (2014) Sustained inhibition of receptor tyrosine kinases and macrophage depletion by PLX3397 and rapamycin as a potential new approach for the treatment of MPNSTs. *Clin Cancer Res* 20: 3146-3158

Peacock JD, Cherba D, Kampfschulte K, Smith MK, Monks NR, Webb CP, Steensma M (2013) Molecular-guided therapy predictions reveal drug resistance phenotypes and treatment alternatives in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Journal of translational medicine* 11: 213

Perez B, Rodriguez-Pascual L, Vilageliu L, Grinberg D, Ugarte M, Desviat LR (2010) Present and future of antisense therapy for splicing modulation in inherited metabolic disease. *J Inherit Metab Dis* 33: 397-403

- Perrin GQ, Fishbein L, Thomson SA, Thomas SL, Stephens K, Garbern JY, DeVries GH, Yachnis AT, Wallace MR, Muir D (2007a) Plexiform-like neurofibromas develop in the mouse by intraneural xenograft of an NF1 tumor-derived Schwann cell line. *Journal of neuroscience research* 85: 1347-1357
- Perrin GQ, Li H, Fishbein L, Thomson SA, Hwang MS, Scarborough MT, Yachnis AT, Wallace MR, Mareci TH, Muir D (2007b) An orthotopic xenograft model of intraneuronal NF1 MPNST suggests a potential association between steroid hormones and tumor cell proliferation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87: 1092-1102
- Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocolle G, Millefanti C, Pastore E, Gronchi A, Pierotti MA, Pilotti S (2009) PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro-oncology* 11: 725-736
- Perry A, Kunz SN, Fuller CE, Banerjee R, Marley EF, Lapis H, Watson MA, Gutmann DH (2002) Differential NF1, p16, and EGFR patterns by interphase cytogenetics (FISH) in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) and morphologically similar spindle cell neoplasms. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61: 702-709
- Piotrowski A, Xie J, Liu YF, Poplawski AB, Gomes AR, Madanecki P, Fu C, Crowley MR, Crossman DK, Armstrong L et al (2013) Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. *Nature genetics* 46: 182-187
- Plaat BE, Molenaar WM, Mastik MF, Hoekstra HJ, te Meerman GJ, van den Berg E (1999) Computer-assisted cytogenetic analysis of 51 malignant peripheral-nerve-sheath tumors: sporadic vs. neurofibromatosis-type-1-associated malignant schwannomas. *International journal of cancer* 83: 171-178
- Plimack ER, Tan T, Wong YN, von Mehren MM, Malizzia L, Roethke SK, Litwin S, Li T, Hudes GR, Haas NB (2014) A phase I study of temsirolimus and bryostatin-1 in patients with metastatic renal cell carcinoma and soft tissue sarcoma. *The oncologist* 19: 354-355
- Polizzi A, Tesse R, Santostasi T, Diana A, Manca A, Logrillo VP, Cazzato MD, Pantaleo MG, Armenio L (2011) Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients bearing [H939R;H949L] allele. *Genetics and molecular biology* 34: 416-420
- Ponti G, Martorana D, Pellacani G, Ruini C, Loschi P, Baccarani A, De Santis G, Pollio A, Neri TM, Mandel VD et al (2014) NF1 truncating mutations associated to aggressive clinical phenotype with elephantiasis neuromatosa and solid malignancies. *Anticancer research* 34: 3021-3030
- Porter DE, Prasad V, Foster L, Dall GF, Birch R, Grimer RJ (2009) Survival in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours: A Comparison between Sporadic and Neurofibromatosis Type 1-Associated Tumours. *Sarcoma* 2009: 756395
- Prada CE, Jousma E, Rizvi TA, Wu J, Dunn RS, Mayes DA, Cancelas JA, Dombi E, Kim MO, West BL et al (2012) Neurofibroma-associated macrophages play roles in tumor growth and response to pharmacological inhibition. *Acta neuropathologica* 125: 159-168
- Preiser SA, Davenport CB (1918) Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen) and its inheritance. *Am J Med Sci* 156: 507-541
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer* 8: 11-31
- Pros E, Fernandez-Rodriguez J, Canet B, Benito L, Sanchez A, Benavides A, Ramos FJ, Lopez-Ariztegui MA, Capella G, Blanco I et al (2009) Antisense therapeutics for neurofibromatosis type 1 caused by deep intronic mutations. *Human mutation* 30: 454-462

Pros E, Gomez C, Martin T, Fabregas P, Serra E, Lazaro C (2008) Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutations: focus on splicing alterations. *Human mutation*

Purandare SM, Huntsman Breidenbach H, Li Y, Zhu XL, Sawada S, Neil SM, Brothman A, White R, Cawthon R, Viskochil D (1995) Identification of neurofibromatosis 1 (NF1) homologous loci by direct sequencing, fluorescence in situ hybridization, and PCR amplification of somatic cell hybrids. *Genomics* 30: 476-485

Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews* 11: 761-774

R

Rahrmann EP, Moriarity BS, Otto GM, Watson AL, Choi K, Collins MH, Wallace M, Webber BR, Forster CL, Rizzardi AE et al (2014) Trp53 Haploinsufficiency Modifies EGFR-Driven Peripheral Nerve Sheath Tumorigenesis. *The American journal of pathology* 184: 2082-2098

Rahrmann EP, Watson AL, Keng VW, Choi K, Moriarity BS, Beckmann DA, Wolf NK, Sarver A, Collins MH, Moertel CL et al (2013) Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis. *Nature genetics* 45: 756-766

Rasmussen SA, Overman J, Thomson SA, Colman SD, Abernathy CR, Trimpert RE, Moose R, Virdi G, Roux K, Bauer M et al (2000) Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes, chromosomes & cancer* 28: 425-431

Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM (2001) Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using U.S. death certificates. *American journal of human genetics* 68: 1110-1118

Rauen KA (2013) The RASopathies. *Annual review of genomics and human genetics* 14: 355-369

Ray-Coquard I, Italiano A, Bompas E, Le Cesne A, Robin YM, Chevreau C, Bay JO, Bousquet G, Piperno-Neumann S, Isambert N et al (2012) Sorafenib for patients with advanced angiosarcoma: a phase II Trial from the French Sarcoma Group (GSF/GETO). *The oncologist* 17: 260-266

Reyal F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, De Plater L, Gentien D, Poupon MF, Cottu P et al (2012) Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 14: R11

Riccardi VM (1981) Von Recklinghausen neurofibromatosis. *The New England journal of medicine* 305: 1617-1627

Riccardi VM (1993) Genotype, malleotype, phenotype, and randomness: lessons from neurofibromatosis-1 (NF-1) [editorial]. *American journal of human genetics* 53: 301-304

Riddle ND, Gorden L, Rojiani MV, Hakam A, Rojiani AM (2010) CD44 and p53 immunoexpression patterns in NF1 neoplasms - indicators of malignancy and infiltration. *International journal of clinical and experimental pathology* 3: 515-521

Rieley MB, Stevenson DA, Viskochil DH, Tinkle BT, Martin LJ, Schorry EK (2010) Variable expression of neurofibromatosis 1 in monozygotic twins. *American journal of medical genetics* 155A: 478-485

- Rincon A, Ugarte M, Aguado C, Desviat LR, Sanchez-Alcudia R, Perez B (2007) Propionic and Methylmalonic Acidemia: Antisense Therapeutics for Intronic Variations Causing Aberrantly Spliced Messenger RNA. American journal of human genetics 81
- Robertson KA, Nalepa G, Yang FC, Bowers DC, Ho CY, Hutchins GD, Croop JM, Vik TA, Denne SC, Parada LF et al (2012) Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase 2 trial. The lancet oncology 13: 1218-1224
- Rodenhiser DL, Coulter-Mackie MB, Singh SM (1993) Evidence of DNA methylation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene region of 17q11.2. Human molecular genetics 2: 439-444
- Rodriguez-Pascual L, Coll MJ, Vilageliu L, Grinberg D (2009) Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. Human mutation 30: E993-E1001
- Roehl AC, Vogt J, Mussotter T, Zickler AN, Spoti H, Hogel J, Chuzhanova NA, Wimmer K, Kluwe L, Mautner VF et al (2011) Intrachromosomal mitotic nonallelic homologous recombination is the major molecular mechanism underlying type-2 NF1 deletions. Human mutation 31: 1163-1173
- Rosenbaum T, Patrie KM, Ratner N (1997) Neurofibromatosis Type 1: Genetic and cellular mechanisms of peripheral nerve tumor formation. Neuroscientist 3: 412-420
- Rosenbaum T, Wimmer K (2014) Neurofibromatosis type 1 (NF1) and Associated Tumors. Klinische Padiatrie
- Rossello FJ, Tothill RW, Britt K, Marini KD, Falzon J, Thomas DM, Peacock CD, Marchionni L, Li J, Bennett S et al (2013) Next-generation sequence analysis of cancer xenograft models. PLoS one 8: e74432
- Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B et al (1993) Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2 [see comments]. Nature 363: 515-521
- Rousseau G, Noguchi T, Bourdon V, Sobol H, Olschwang S (2011) SMARCB1/INI1 germline mutations contribute to 10% of sporadic schwannomatosis. BMC neurology 11: 9
- Rubio-Viqueira B, Hidalgo M (2009) Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. Clinical pharmacology and therapeutics 85: 217-221
- Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S (2014) Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. Biochemical pharmacology 87: 150-161
- Ruggieri M, Polizzi A (2000) Segmental neurofibromatosis [letter]. J Neurosurg 93: 530-532

S

- Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanche H, Laurendeau I, Ferkal S, Vidaud M, Pinson S et al (2013) NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type 1 genotype-phenotype correlation: the French experience. Human mutation 34: 1510-1518

- Sabbagh A, Pasman E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, Combemale P, Ferkal S, Vidaud M, Aubourg P et al (2009) Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Human molecular genetics* 18: 2768-2778
- Sanz L, Cuesta AM, Salas C, Corbacho C, Bellas C, Alvarez-Vallina L (2009) Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89: 91-97
- Sausville EA, Burger AM (2006) Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer research* 66: 3351-3354, discussion 3354
- Scaffidi P, Misteli T (2005) Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature medicine* 11: 440-445
- Schaefer G, Haber L, Crocker LM, Shia S, Shao L, Dowbenko D, Totpal K, Wong A, Lee CV, Stawicki S et al (2011) A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer cell* 20: 472-486
- Schmidt H, Taubert H, Meye A, Wurl P, Bache M, Bartel F, Holzhausen HJ, Hinze R (2000) Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease. *Cancer Lett* 155: 181-190
- Schmidt H, Wurl P, Taubert H, Meye A, Bache M, Holzhausen HJ, Hinze R (1999) Genomic imbalances of 7p and 17q in malignant peripheral nerve sheath tumors are clinically relevant. *Genes, chromosomes & cancer* 25: 205-211
- Serra E, Ars E, Ravella A, Sanchez A, Puig S, Rosenbaum T, Estivill X, Lazaro C (2001) Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Human genetics* 108: 416-429.
- Serra E, Pros E, Garcia C, Lopez E, Gili ML, Gomez C, Ravella A, Capella G, Blanco I, Lazaro C (2007) Tumor LOH analysis provides reliable linkage information for prenatal genetic testing of sporadic NF1 patients. *Genes, chromosomes & cancer* 46: 820-827
- Serra E, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lazaro C (1997) Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *American journal of human genetics* 61: 512-519
- Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lazaro C (2000a) Schwann cells are the NF1(-/-) cells in neurofibromas. In NNFF International Consortium for the Molecular Biology of NF1 and NF2, Shannon K, McClatchey A (eds). Aspen, Colorado
- Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lazaro C (2000b) Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different schwann cell subpopulations. *Human molecular genetics* 9: 3055-3064
- Sharif S, Ferner R, Birch JM, Gillespie JE, Gattamaneni HR, Baser ME, Evans DG (2006) Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic glioma: substantial risks after radiotherapy. *J Clin Oncol* 24: 2570-2575
- Sharif S, Moran A, Huson SM, Iddenden R, Shenton A, Howard E, Evans DG (2007) Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *Journal of medical genetics* 44: 481-484
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P (2000) Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Human genetics* 107: 343-349
- Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *Journal of medical genetics* 33: 2-17

- Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N (2000a) Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 275: 30740-30745
- Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N (2000b) Single cell ras-GTP analysis reveals altered ras activity in a subpopulation of neurofibroma schwann cells but not fibroblasts [In Process Citation]. *The Journal of biological chemistry* 275: 30740-30745
- Sierakowska H, Sambade MJ, Agrawal S, Kole R (1996) Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12840-12844
- Siolas D, Hannon GJ (2013) Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer research* 73: 5315-5319
- Skuse GR, Cappione AJ (1997) RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). *Human molecular genetics* 6: 1707-1712
- Smith MJ, Wallace AJ, Bowers NL, Rustad CF, Woods CG, Leschziner GD, Ferner RE, Evans DG (2012) Frequency of SMARCB1 mutations in familial and sporadic schwannomatosis. *Neurogenetics* 13: 141-145
- Sorensen SA, Mulvihill JJ, Nielsen A (1986) Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis.Survival and malignant neoplasms. *The New England journal of medicine* 314: 1010-1015
- Soung YH, Lee JW, Kim SY, Wang YP, Jo KH, Moon SW, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ et al (2006) Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *International journal of cancer* 118: 1426-1429
- Spurlock G, Knight SJ, Thomas N, Kiehl TR, Guha A, Upadhyaya M (2010) Molecular evolution of a neurofibroma to malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) in an NF1 patient: correlation between histopathological, clinical and molecular findings. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136: 1869-1880
- Stebbing J, Paz K, Schwartz GK, Wexler LH, Maki R, Pollock RE, Morris R, Cohen R, Shankar A, Blackman G et al (2014) Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer* 120: 2006-2015
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA et al (2014) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40
- Stevenson DA, Zhou H, Ashrafi S, Messiaen LM, Carey JC, D'Astous JL, Santora SD, Viskochil DH (2006) Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. *American journal of human genetics* 79: 143-148
- Stewart DR, Pemov A, Van Loo P, Beert E, Brems H, Sciot R, Claes K, Pak E, Dutra A, Lee CC et al (2012) Mitotic recombination of chromosome arm 17q as a cause of loss of heterozygosity of NF1 in neurofibromatosis type 1-associated glomus tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 51: 429-437
- Stonecypher MS, Byer SJ, Grizzle WE, Carroll SL (2005) Activation of the neuregulin-1/ErbB signaling pathway promotes the proliferation of neoplastic Schwann cells in human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncogene* 24: 5589-5605
- Storlazzi CT, Brekke HR, Mandahl N, Brosjo O, Smeland S, Lothe RA, Mertens F (2006) Identification of a novel amplicon at distal 17q containing the BIRC5/SURVIVIN gene in malignant peripheral nerve sheath tumours. *The Journal of pathology* 209: 492-500

- Stowe IB, Mercado EL, Stowe TR, Bell EL, Oses-Prieto JA, Hernandez H, Burlingame AL, McCormick F (2012) A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes & development* 26: 1421-1426
- Streubel B, Latta E, Kehrer-Sawatzki H, Hoffmann GF, Fonatsch C, Rehder H (1999) Somatic mosaicism of a greater than 1.7-Mb deletion of genomic DNA involving the entire NF1 gene as verified by FISH: further evidence for a contiguous gene syndrome in 17q11.2. *Am J Med Genet* 87: 12-16
- Suzuki H, Ozawa N, Taga C, Kano T, Hattori M, Sakaki Y (1994) Genomic analysis of a NF1-related pseudogene on human chromosome 21. *Gene* 147: 277-280
- Szudek J, Birch P, Riccardi VM, Evans DG, Friedman JM (2000) Associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genet Epidemiol* 19: 429-439.
- Szudek J, Evans DG, Friedman JM (2003) Patterns of associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1). *Human genetics* 112: 289-297
- Szudek J, Joe H, Friedman JM (2002) Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genet Epidemiol* 23: 150-164.

T

- Taetle R, Jones OW, Honeysett JM, Abramson I, Bradshaw C, Reid S (1987) Use of nude mouse xenografts as preclinical screens. Characterization of xenograft-derived melanoma cell lines. *Cancer* 60: 1836-1841
- Tanaka H, Nakashiro K, Iwamoto K, Tokuzen N, Fujita Y, Shirakawa R, Oka R, Goda H, Hamakawa H (2013) Targeting Aurora kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oral oncology* 49: 551-559
- Tanner B, Hasenclever D, Stern K, Schormann W, Bezler M, Hermes M, Brulport M, Bauer A, Schiffer IB, Gebhard S et al (2006) ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 24: 4317-4323
- Taylor BJ, Nik-Zainal S, Wu YL, Stebbings LA, Raine K, Campbell PJ, Rada C, Stratton MR, Neuberger MS (2013) DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *eLife* 2: e00534
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG (2012) Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9: 338-350
- Thomas L, Spurlock G, Eudall C, Thomas NS, Mort M, Hamby SE, Chuzhanova N, Brems H, Legius E, Cooper DN et al (2012) Exploring the somatic NF1 mutational spectrum associated with NF1 cutaneous neurofibromas. *Eur J Hum Genet* 20: 411-419
- Tinschert S, Naumann I, Stegmann E, Buske A, Kaufmann D, Thiel G, Jenne DE (2000) Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene [In Process Citation]. *Eur J Hum Genet* 8: 455-459
- Torres KE, Zhu QS, Bill K, Lopez G, Ghadimi MP, Xie X, Young ED, Liu J, Nguyen T, Bolshakov S et al (2011) Activated MET is a molecular prognosticator and potential therapeutic target for malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res* 17: 3943-3955
- Trevisson E, Forzan M, Salviati L, Clementi M (2014) Neurofibromatosis type 1 in two siblings due to maternal germline mosaicism. *Clinical genetics* 85: 386-389

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K et al (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor [published erratum appears in Cell 1993 Nov 19;75(4):826]. *Cell* 72: 791-800

U

Upadhyaya M (2011) Genetic basis of tumorigenesis in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumors. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 16: 937-951

Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, Thomas N, Chuzhanova N, Giovannini S, Evans DG, Howard E, Kerr B, Griffiths S et al (2007) An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *American journal of human genetics* 80: 140-151

Upadhyaya M, Kluwe L, Spurlock G, Monem B, Majounie E, Mantripragada K, Ruggieri M, Chuzhanova N, Evans DG, Ferner R et al (2008a) Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Human mutation* 29: 74-82

Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, Thomas N, Friedrich RE, Kluwe L, Mautner V (2008b) Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Human mutation* 29: E103-111

Upadhyaya M, Spurlock G, Thomas L, Thomas NS, Richards M, Mautner VF, Cooper DN, Guha A, Yan J (2012) Microarray-based copy number analysis of neurofibromatosis type-1 (NF1)-associated malignant peripheral nerve sheath tumors reveals a role for Rho-GTPase pathway genes in NF1 tumorigenesis. *Human mutation* 33: 763-776

V

Valero MC, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, Moreno F, Hernandez-Chico C (1997) Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Human genetics* 99: 720-726

Vega AI, Perez-Cerda C, Desviat LR, Matthijs G, Ugarte M, Perez B (2009) Functional analysis of three splicing mutations identified in the PMM2 gene: toward a new therapy for congenital disorder of glycosylation type Ia. *Human mutation* 30: 795-803

Venturin M, Guarneri P, Natacci F, Stabile M, Tenconi R, Clementi M, Hernandez C, Thompson P, Upadhyaya M, Larizza L et al (2004) Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *Journal of medical genetics* 41: 35-41

Vetrini F, Tammaro R, Bondanza S, Surace EM, Auricchio A, De Luca M, Ballabio A, Marigo V (2006) Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Human mutation* 27: 420-426

Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF (1999) Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science (New York, NY)* 286: 2176-2179

Vogt J, Bengesser K, Claes KB, Wimmer K, Mautner VF, van Minkelen R, Legius E, Brems H, Upadhyaya M, Hogel J et al (2014) SVA retrotransposon insertion-associated deletion

represents a novel mutational mechanism underlying large genomic copy number changes with non-recurrent breakpoints. *Genome biology* 15: R80

W

- Walker JA, Gouzi JY, Long JB, Huang S, Maher RC, Xia H, Khalil K, Ray A, Van Vactor D, Bernards R et al (2013) Genetic and functional studies implicate synaptic overgrowth and ring gland cAMP/PKA signaling defects in the *Drosophila melanogaster* neurofibromatosis-1 growth deficiency. *PLoS genetics* 9: e1003958
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL et al (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: Identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science (New York, NY)* 249: 181-186
- Wanebo JE, Malik JM, Vandenberg SR, Wanebo HJ, Driesen N, Persing JA (1993) Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 28 cases. *Cancer* 71: 1247-1253
- Wang X, Levin AM, Smolinski SE, Vigneau FD, Levin NK, Tainsky MA (2012) Breast cancer and other neoplasms in women with neurofibromatosis type 1: a retrospective review of cases in the Detroit metropolitan area. *American journal of medical genetics* 158A: 3061-3064
- Wang X, Wang M, MacLennan GT, Abdul-Karim FW, Eble JN, Jones TD, Olobatuyi F, Eisenberg R, Cummings OW, Zhang S et al (2009) Evidence for common clonal origin of multifocal lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 101: 560-570
- Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, Cao M, Chen WG, Goetz L, Xue H, Sadar M, Shappell SB, Cunha GR et al (2005) Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *The Prostate* 64: 149-159
- Watanabe T, Oda Y, Tamiya S, Kinukawa N, Masuda K, Tsuneyoshi M (2001) Malignant peripheral nerve sheath tumours: high Ki67 labelling index is the significant prognostic indicator. *Histopathology* 39: 187-197
- Watson AL, Rahrmann EP, Moriarity BS, Choi K, Conboy CB, Greeley AD, Halfond AL, Anderson LK, Wahl BR, Keng VW et al (2013a) Canonical Wnt/beta-catenin signaling drives human schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance. *Cancer discovery* 3: 674-689
- Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L (2013b) Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet* 14: 703-718
- Watson MA, Perry A, Tihan T, Prayson RA, Guha A, Bridge J, Ferner R, Gutmann DH (2004) Gene expression profiling reveals unique molecular subtypes of Neurofibromatosis Type I-associated and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14: 297-303
- Weinberg RA (1991) Tumor suppressor genes. *Science (New York, NY)* 254: 1138-1146
- Weiss B, Widemann BC, Wolters P, Dombi E, Vinks AA, Cantor A, Korf B, Perentes J, Gutmann DH, Schorry E et al (2014) Sirolimus for non-progressive NF1-associated plexiform neurofibromas: an NF clinical trials consortium phase II study. *Pediatric blood & cancer* 61: 982-986
- Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM (1983) Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 49: 299-308

- Welti S, Fraterman S, D'Angelo I, Wilm M, Scheffzek K (2007) The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *Journal of molecular biology* 366: 551-562
- Wennerberg J, Trope C, Biorklund A (1983) Heterotransplantation of human head and neck tumours into nude mice. *Acta oto-laryngologica* 95: 183-190
- Wennerstrom AB, Lothe IM, Sandhu V, Kure EH, Myklebost O, Munthe E (2014) Generation and characterisation of novel pancreatic adenocarcinoma xenograft models and corresponding primary cell lines. *PloS one* 9: e103873
- Wentworth S, Pinn M, Bourland JD, Deguzman AF, Ekstrand K, Ellis TL, Glazier SS, McMullen KP, Munley M, Stieber VW et al (2009) Clinical experience with radiation therapy in the management of neurofibromatosis-associated central nervous system tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 73: 208-213
- Widemann BC, Babovic-Vuksanovic D, Dombi E, Wolters PL, Goldman S, Martin S, Goodwin A, Goodspeed W, Kieran MW, Cohen B et al (2014a) Phase II trial of pirfenidone in children and young adults with neurofibromatosis type 1 and progressive plexiform neurofibromas. *Pediatric blood & cancer* 61: 1598-1602
- Widemann BC, Dombi E, Gillespie A, Wolters PL, Belasco J, Goldman S, Korf BR, Solomon J, Martin S, Salzer W et al (2014b) Phase 2 randomized, flexible crossover, double-blinded, placebo-controlled trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in children and young adults with neurofibromatosis type 1 and progressive plexiform neurofibromas. *Neuro-oncology* 16: 707-718
- Wiest V, Eisenbarth I, Schmegner C, Krone W, Assum G (2003) Somatic NF1 mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers. *Human mutation* 22: 423-427
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M et al (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* 64: 7099-7109
- Wimmer K, Callens T, Wernstedt A, Messiaen L (2011) The NF1 gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent de novo insertion. *PLoS genetics* 7: e1002371
- Wimmer K, Roca X, Beiglböck H, Callens T, Etzler J, Rao AR, Krainer AR, Fonatsch C, Messiaen L (2007) Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Human mutation* 28: 599-612
- Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O et al (2006) Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes, chromosomes & cancer* 45: 265-276
- Wolkenstein P, Mahmoudi A, Zeller J, Revuz J (1995) More on the frequency of segmental neurofibromatosis. *Archives of dermatology* 131: 1465
- Wong WW, Hirose T, Scheithauer BW, Schild SE, Gunderson LL (1998) Malignant peripheral nerve sheath tumor: analysis of treatment outcome. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 42: 351-360
- Wu BL, Boles RG, Yaari H, Weremowicz S, Schneider GH, Korf BR (1997) Somatic mosaicism for deletion of the entire NF1 gene identified by FISH. *Human genetics* 99: 209-213
- Wu J, Dombi E, Jousma E, Scott Dunn R, Lindquist D, Schnell BM, Kim MO, Kim A, Widemann BC, Cripe TP et al (2012) Preclinical testing of sorafenib and RAD001 in the Nf(flox/flox)

;DhhCre mouse model of plexiform neurofibroma using magnetic resonance imaging. Pediatric blood & cancer 58: 173-180

Wu J, Patmore DM, Jousma E, Eaves DW, Breving K, Patel AV, Schwartz EB, Fuchs JR, Cripe TP, Stemmer-Rachamimov AO et al (2014) EGFR-STAT3 signaling promotes formation of malignant peripheral nerve sheath tumors. Oncogene 33: 173-180

Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Witte D, Meijer D, Stemmer-Rachamimov AO, Cancelas JA, Ratner N (2008) Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. Cancer cell 13: 105-116

X

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R et al (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. Cell 62: 599-608

Xu W, Yang X, Hu X, Li S (2014) Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. International journal of molecular medicine 34: 53-60

Xu Y, Silver DF, Yang NP, Oflazoglu E, Hempling RE, Piver MS, Repasky EA (1999) Characterization of human ovarian carcinomas in a SCID mouse model. Gynecologic oncology 72: 161-170

Y

Yamashita-Kashima Y, Iijima S, Yorozu K, Furugaki K, Kurasawa M, Ohta M, Fujimoto-Ouchi K (2011) Pertuzumab in combination with trastuzumab shows significantly enhanced antitumor activity in HER2-positive human gastric cancer xenograft models. Clin Cancer Res 17: 5060-5070

Yamashita AS, Baia GS, Ho JS, Velarde E, Wong J, Gallia GL, Belzberg AJ, Kimura ET, Riggins GJ (2014) Preclinical evaluation of the combination of mTOR and proteasome inhibitors with radiotherapy in malignant peripheral nerve sheath tumors. Journal of neuro-oncology 118: 83-92

Yang H, Ou CC, Feldman RI, Nicosia SV, Kruk PA, Cheng JQ (2004) Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. Cancer research 64: 463-467

Yang J, Du X (2013) Genomic and molecular aberrations in malignant peripheral nerve sheath tumor and their roles in personalized target therapy. Surgical oncology 22: e53-57

Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology 61 Suppl 2: 1-13

Yin H, Moulton HM, Betts C, Seow Y, Boutilier J, Iverson PL, Wood MJ (2009) A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice. Human molecular genetics 18: 4405-4414

Young A, Lyons J, Miller AL, Phan VT, Alarcon IR, McCormick F (2009) Ras signaling and therapies. Advances in cancer research 102: 1-17

Z

- Zatkova A, Messiaen L, Vandenbroucke I, Wieser R, Fonatsch C, Krainer AR, Wimmer K (2004) Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Human mutation* 24: 491-501
- Zehou O, Fabre E, Zelek L, Sbidian E, Ortonne N, Banu E, Wolkenstein P, Valeyrie-Allanore L (2013) Chemotherapy for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1: a 10-year institutional review. *Orphanet journal of rare diseases* 8: 127
- Zhang CZ, Leibowitz ML, Pellman D (2013) Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes & development* 27: 2513-2530
- Zhang M, Wang Y, Jones S, Sausen M, McMahon K, Sharma R, Wang Q, Belzberg AJ, Chaichana K, Gallia GL et al (2014) Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nature genetics* 46:1170-2
- Zhao X, Liu Z, Yu L, Zhang Y, Baxter P, Voicu H, Gurusiddappa S, Luan J, Su JM, Leung HC et al (2012) Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma. *Neuro-oncology* 14: 574-583
- Zhou CY, Li J, Guo XY, Liao J, Wang ZH, Lan FH (2012) [Identification of a mosaic mutation of NF1 gene in a sporadic case of neurofibromatosis type 1]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics* 29: 529-532
- Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF (2002) Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* (New York, NY 296: 920-922
- Zickler AM, Hampp S, Messiaen L, Bengesser K, Mussotter T, Roehl AC, Wimmer K, Mautner VF, Kluwe L, Upadhyaya M et al (2012) Characterization of the nonallelic homologous recombination hotspot PRS3 associated with type-3 NF1 deletions. *Human mutation* 33: 372-383
- Zou C, Smith KD, Liu J, Lahat G, Myers S, Wang WL, Zhang W, McCutcheon IE, Slopis JM, Lazar AJ et al (2009a) Clinical, pathological, and molecular variables predictive of malignant peripheral nerve sheath tumor outcome. *Annals of surgery* 249: 1014-1022
- Zou CY, Smith KD, Zhu QS, Liu J, McCutcheon IE, Slopis JM, Meric-Bernstam F, Peng Z, Bornmann WG, Mills GB et al (2009b) Dual targeting of AKT and mammalian target of rapamycin: A potential therapeutic approach for malignant peripheral nerve sheath tumor. *Molecular cancer therapeutics* 8: 1157-1168

ANNEX

INFORME DEL DIRECTOR

Jo, Conxi Lázaro García, en qualitat de directora de la tesi doctoral presentada per en Joan Castellsagué Garcia, titulada “**Estratègies terapèutiques per la Neurofibromatosi de tipus 1**”, faig constar que el doctorant ha participat activament en el disseny i realització experimental dels treballs que s'inclouen en aquesta tesi així com en l'anàlisi de resultats, la seva discussió i la preparació dels manuscrits. Les contribucions concretes de cada treball s'especifiquen a continuació, així com el factor d'impacte dels articles a la data de la seva publicació.

ARTICLE 1:

Com a directora de la present tesi doctoral faig constar que la Dra. Juana Fernández-Rodríguez, coautora de l'article “*A mild neurofibromatosis type 1 phenotype produced by the combination of the benign nature of a leaky NF1-splice mutation and the presence of a complex mosaicism.*” no ha utilitzat aquests resultats per a la realització d'una tesi doctoral.

A mild neurofibromatosis type 1 phenotype produced by the combination of the benign nature of a leaky NF1-splice mutation and the presence of a complex mosaicism.

Juana Fernández-Rodríguez*, **Joan Castellsagué***, Llúcia Benito, Yolanda Benavente, Gabriel Capellá, Ignacio Blanco, Eduard Serra i Conxi Lázaro.

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Human Mutation; 32:705–709, 2011.

Factor d'impacte (2011 JCR Science Edition): 5.686

Contribució del doctorant: La participació del doctorant en aquest treball ha consistit en l'extracció del DNA de diferents mostres derivades de les tres capes embrionàries. Detecció de la mutació del pacient i del SNP control, mitjançant les tècniques de seqüenciació i SNaPshot per les diferents mostres de DNA obtingudes. Generació dels plàsmids controls i de la recta patró per calcular les proporcions al·lèliques de les mostres analitzades. Realització de l'assaig d'inactivació del cromosoma X. Cultius cel·lulars de fibroblasts i limfòcits per la posterior extracció de RNA, RT-PCR i la quantificació dels transcrits. Construcció de dos minigenes (salvatge i mutat) i transfecció de les cèl·lules 293HEK i el posterior anàlisi dels patrons d'splicing. Disseny dels tres AMOs utilitzats i el tractament de cultius de fibroblasts, seguits de l'extracció de RNA, RT-PCR i la

quantificació dels transcrits. Finalment també va realitzar l'assaig per RAS-GTP i el *western blot* per detectar els nivells de la proteïna RAS total.

ARTICLE 2:

Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine.

Joan Castellsagué*, Bernat Gel*, Juana Fernández-Rodríguez*, Roger Llatjós, Yolanda Benavente, Ignacio Blanco, Diana Pérez-Sidelnikova, Javier García-del Muro, Joan Viñals, Rafael Valdés-Mas, Ernest Terribas, Adriana López-Doriga, Miguel Angel Pujana, Gabriel Capellá, XoseS. Puente, Eduard Serra, Alberto Villanueva i Conxi Lázaro.

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball.

Article sotmès a publicació a *EMBO Molecular Medicine*

Contribució del doctorant: La participació del doctorant en aquest treball ha consistit en la generació de cinc models de xenògrafts ortotòpics mitjançant la implantació de tumors primaris de pacients NF1 i esporàdics així com en la seva perpetuació fins a aconseguir l'estandardització del seu creixement. També s'ha encarregat de l'extracció, la quantificació i la verificació de la qualitat de DNA, RNA i proteïna de mostres de tumors primaris i ortoxenògrafts així com de la seva congelació i preservació. També ha obtingut els blocs de parafina a partir dels tumors ortoxenògrafts i la realització de talls histològics per l'anàlisi immunohistoquímica. El doctorand va portar a terme el tractament farmacològic dels 5 models ortoxenògraft, va monitoritzar el seguiment del creixement tumoral durant el tractament i el posterior sacrifici i conservació de les mostres tumorals. El doctorant va participar en la discussió dels resultats de les analisis de les dades genòmiques i transcriptòmiques així com en la redacció del manuscrit.

ARTICLE 3:

Genomic imbalance of HMMR/RHAMM regulates the sensitivity and response of malignant peripheral nerve sheath tumour cells to aurora kinase inhibition.

Pooja Mohan, **Joan Castellsagué**, Jihong Jiang, Kristi Allen, Helen Chen, Oksana Nemirovsky, Melanie Spyra, Kaiji Hu, Lan Kluwe, Miguel Angel Pujana, Alberto Villanueva, Victor F. Mautner, Jonathan J. Keats, Sandra E. Dunn, Conxi Lázaro i Christopher A. Maxwell.

Oncotarget: 4: 80-93, 2013

Factor d'impacte (2013 JCR Science Edition): 6,627

Contribució del doctorant: La participació del doctorant en aquest treball ha consistit en la utilització de dos dels models ortoxenògraft generats emprant el fàrmac MLN8237 així com el seguiment del creixement tumoral durant el tractament i posterior sacrifici i conservació de les mostres tumorals. També ha obtingut els blocs de parafina a partir dels tumors ortoxenògrafts i els talls histològics per l'anàlisi per immunohistoquímica de Ki-67 i la immunofluorescència per DAPI.

RESULTATS NO PUBLICATS

Estudi *in vivo* del receptor HER3 en models ortoxenògrafts de MPNST.

Contribució del doctorant: La participació del doctorant en aquest treball ha consistit en la utilització de dos dels models ortoxenògraft generats emprant els fàrmacs: MEHD7945, pertuzumab i lapatinib; el seguiment del creixement tumoral durant el tractament i posterior sacrifici i conservació de les mostres tumorals. També ha obtingut els blocs de parafina a partir dels tumors ortoxenògrafts i l'extracció de proteïna dels tumors tractats per futurs estudis proteomics.