

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**DAX1 (*NR0B1*): UN NUEVO ACTOR EN LA
PATOGENÉNESIS DE LOS TUMORES DE
EWING.**

Memoria presentada por **Eva García Aragoncillo**, licenciada en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: Dr. Francisco Javier Alonso García de la Rosa.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM
Madrid, 2008

D. Francisco Javier Alonso García de la Rosa, Doctor en Biología e Investigador del CSIC

CERTIFICA:

que **Eva García Aragoncillo**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

“DAX1 (*NR0B1*): un nuevo actor en la patogénesis de los tumores de Ewing”

el cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el siguiente certificado en Madrid a 1 de Septiembre de 2008.

Fdo. Fco. Javier Alonso García de la Rosa
Investigador del CSIC

A mis padres
A Victor

AGRADECIMIENTOS.

La realización de este trabajo me ha servido para mejorar tanto a nivel científico y laboral como personalmente. Siempre he intentado abordar este reto con toda mi ilusión. Hay mucha gente que ha estado conmigo durante este camino y a todos ellos es a los que les quiero agradecer su apoyo.

Primero quiero agradeceréselo al Dr. Ángel Pestaña, por dejarme realizar la tesis en su laboratorio y por darme su apoyo en los nuevos proyectos. Al Dr. Javier Alonso por ayudarme científicamente con todos sus conocimientos y guiarme durante este tiempo. Por dedicar tanto tiempo a que el trabajo siempre saliera bien y a la vez ayudarme a aumentar mis conocimientos en materias para mí desconocidas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM), gracias a sus infraestructuras y a sus servicios esta tesis ha llegado a buen fin. Al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación aportada a través de la beca concedida y por los proyectos concedidos a nuestro laboratorio (SAF2003-01068, SAF2006-07586 y SAF2007-62101). Mencionar también a la Fundación Inocente Inocente, Fundación Enriqueta Villavecchia y a la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (AECC) que también han intervenido en la financiación de esta tesis.

Al Dr. E. Lalli por proporcionarme algunos de los anticuerpos y plásmidos utilizados en este trabajo. Su colaboración ha sido muy importante en el desarrollo de esta tesis, sus conocimientos nos han ayudado a solucionar diversos problemas científicos. Al Dr. C. T. Denny por aportar varios de los plásmidos utilizados en esta tesis. Al Dr. G. Gómez-López por contribuir con sus conocimientos en el análisis estadístico de matrices de oligonucleótidos.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio. Primero quiero agradecerle a Marta su apoyo al principio de este nuevo proyecto y darme fuerzas para abordar con ilusión todo el camino a seguir. Quiero agradecer en especial a Jaime por estar siempre apoyándome y conseguir animarme en momentos difíciles. Gracias por todo lo que has ayudado en la elaboración de esta tesis. A Noe porque siempre ha tenido una palabra de ánimo y porque en los últimos meses siempre ha sabido como hacerme sonreír. A Helena, Christian, Itziar, Raquel, Noemí, Amelia, Isa y Angelo compañeros que han compartido momentos buenos y malos dentro y fuera del trabajo, porque se que los puedo considerar buenos amigos y que estarán siempre ahí.

Quiero agradecerse a los integrantes de otros laboratorios que siempre han estado apoyandome y con los que he pasado buenos momentos. Así quiero destacar los integrantes del laboratorio 0.2, JÓse, Lorena, Ana, Teresa, Alba, Iciar y Esther que siempre me han ayudado. Al laboratorio 1.4.1, Lara, María, Camino, Esther, Alberto y Dani que siempre nos han acompañado en las largas horas en cultivos animando el día. A los distintos miembros de otros laboratorios con los que he compartido muchas horas, destacando gente del laboratorio 1.8 como Juan, Amparo, gente del laboratorio 1.4.2 como Leticia y Bárbara, y otros miembros que ya no están en el IIB como Marta Coton, Marta Mora y Ana, con las que pasé buenos ratos desayunando y comiendo juntas.

A la gente de Imagen y bioinformática, así como a los miembros del resto de servicios del Instituto, porque siempre me han ayudado cuando lo he necesitado.

Agradecérselo a todo mi grupo de amigas y amigos, siempre han sabido como darme ánimos cuando perdía la ilusión, porque han sabido escucharme y darme buenos consejos. Se que siempre os tendré en los buenos y malos momentos. Quiero destacar el apoyo brindado por mis compañeras de piso los años de la tesis, Isa, Vane y María, por tantas horas intentando arreglar el mundo.

Quiero agradecerse a mi familia y a la familia de Victor. A Irene, que aunque no haya llegado a ver el final siempre me ha apoyado a su manera. A mi hermana que ha sido un gran apoyo en la distancia, siempre con palabras de ánimo. Y en especial a mis padres que siempre me han animado en los proyectos que he llevado a cabo. Sin ellos nunca lo habría conseguido. Muchísimas gracias por las buenas palabras y por la fuerza que me habeis aportado para seguir adelante.

A Victor que estos últimos años ha sabido escucharme como nadie. Ha estado conmigo en malos y buenos momentos, siempre ayudándome a sonreír. Porque lo ha dejado todo por mi y eso nunca sabré como agradecerse. Miles de gracias por tu apoyo incondicional. Se que a mi lado tengo a la persona más especial que podía tener.

Muchísimas gracias de todo corazón.

RESUMEN: La principal característica de los tumores de la familia Ewing es la presencia de translocaciones cromosómicas que dan lugar a proteínas de fusión, como la formada por los genes EWS y FLI1 (EWS/FLI1). Estas proteínas de fusión son factores de transcripción aberrantes que regulan la expresión de genes importantes para el desarrollo del tumor. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que EWS/FLI1 es capaz de inducir la expresión del receptor nuclear huérfano DAX1 (*NR0B1*) y que su expresión es elevada en células y tumores de Ewing. En esta Tesis hemos profundizado en el mecanismo de regulación de DAX1 y hemos estudiado su papel en el desarrollo de estos tumores. Nuestros estudios indican que EWS/FLI1 reconoce una secuencia polimórfica presente en el promotor de DAX1 formada por repeticiones de la secuencia GGAA, demostrando que DAX1 es una diana directa de EWS/FLI1. Para analizar el papel de DAX1 en el desarrollo de los tumores de Ewing, desarrollamos sistemas inducible de ARNs de interferencia. De esta manera demostramos que el silenciamiento de DAX1 en células de Ewing bloquea el ciclo celular en la transición G1/S, disminuye la proliferación celular, y reduce la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Estudios llevados a cabo con matrices de oligonucleótidos, mostraron que un número elevado de genes implicados en la regulación del ciclo celular, tales como *CDK2*, *MCM10*, *CDC6* o *SKP2*, son regulados por EWS/FLI1 y DAX1. En resumen, nuestros resultados indican que DAX1 desempeña un papel importante en los tumores de Ewing, especialmente en el control de la transición G1/S del ciclo celular y abren nuevas expectativas terapéuticas basadas en la interferencia de la función de DAX1 en los tumores de Ewing.

SUMMARY: Ewing's family tumors are characterized by the presence of balanced translocations leading to the formation of chimerical transcription factors, for example EWS/FLI1. The chimerical protein has the characteristics of an aberrant transcription factor that deregulated gene expression. We have recently demonstrated that DAX1 (*NR0B1*), an orphan nuclear receptor, is induced by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. This suggests that DAX1 is a biologically relevant target of EWS/FLI1-mediated oncogenesis. In this work we first demonstrate that DAX1 is a direct transcription target of the EWS/FLI1. EWS/FLI1 binds to GGAA-rich region in the DAX1 promoter. We use an inducible model of RNA interference against DAX1 to analyze their role in the pathogenesis of Ewing tumors. DAX1 silencing induce growth arrest, severely impairs its transforming capability and growth tumor in immunodeficient mice. Gene expression profile analysis shown that genes regulated by EWS/FLI1 and DAX1, were mainly involved in cell cycle progression, such as *CDK2*, *MCM10*, *CDC6* o *SKP2*. These findings identify a new function of DAX1 as a cell cycle progression regulator an open the possibility of new therapeutic approaches based on DAX1 function interference.

ÍNDICE

1. Introducción.....	17
1.1. Características de los tumores de Ewing.....	19
1.1.1. Características anatomopatológicas, diagnóstico e histiogénesis de los tumores de la familia Ewing.....	19
1.1.2. Características clínicas.....	20
1.1.3. Características moleculares.....	22
1.2. Propiedades oncogénicas de las proteínas de fusión EWS/ETS.....	25
1.3. Genes regulados por las proteínas quiméricas EWS/ETS.....	27
1.4. Características del receptor nuclear huérfano DAX1 (<i>NR0B1</i>).....	30
1.4.1. Estructura genética y molecular.....	30
1.4.2. DAX-1 es un represor transcripcional.....	31
1.4.3. DAX-1 en fisiología y patología humana.....	32
2. Objetivos.....	35
3. Materiales y Métodos.....	39
3.1. Material biológico.....	41
3.1.1. Líneas celulares.....	41
3.1.2. Animales de experimentación.....	41
3.2. Plásmidos.....	42
3.3. Establecimiento de líneas de Ewing con expresión inducible de shRNA.....	43
3.4. Estudios para ver si DAX1 es una diana transcripcional de DAX1.....	46
3.4.1. Transfección transitoria de 293 con EWS/FLI1, distintos mutantes de dicha translocación y FLI1.....	46
3.4.2.1. Estudios de transactivación del promotor de DAX1 con mutantes de delección.....	46
3.4.2.2. Estudios de la actividad promotora de DAX1.....	47
3.4.3. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP).....	48
3.5. Estudios de la región rica en GGAA del promotor de DAX1.....	49
3.6. Estudios celulares.....	49
3.6.1. Ensayos de proliferación celular.....	49
3.6.1.1. Cristal violeta.....	49
3.6.1.2. BrdU.....	50
3.6.2. Estudios de citometría de flujo.....	50
3.6.3. Formación de focos de crecimiento en agar blando.....	51
3.7. Estudios <i>in vivo</i> . Formación de tumores en ratones.....	51
3.8. Estudios de la expresión génica.....	52
3.8.1. Estudios de la expresión mediante matrices de oligonucleótidos.....	52
3.8.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	54
3.8.3. Western blot.....	55
3.9. Expresión de DAX1 en un contexto celular distinto.....	57
3.10. Papel represor de DAX1.....	58
4. Resultados.....	59
4.1. Regulación de la expresión de DAX1 por EWS/FLI1.....	61
4.1.1. Establecimiento de sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible contra EWS/FLI1 en células de Ewing.....	61
4.1.2. DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1.....	65
4.1.3. DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1 en células de Ewing.....	69

4.1.4. La región del promotor de DAX1 responsable de su activación por EWS/FLI1, es una región polimórfica que contiene múltiples motivos GGAA concatenados y su número correlaciona con los niveles de expresión de DAX1.....	71
4.2. Papel oncogénico de DAX1 en los tumores de la familia Ewing.....	74
4.2.1. Establecimiento de modelos de ARN de interferencia inducible contra DAX1.....	74
4.2.2. El silenciamiento de DAX1 inhibe la proliferación de las células de Ewing.....	77
4.2.3. El silenciamiento de DAX1 provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G1.....	80
4.2.4. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y de DAX1 en la formación de focos de crecimiento en agar blando.....	81
4.2.5. El silenciamiento de DAX1 inhibe la formación de tumores <i>in vivo</i>	82
4.2.6. DAX1 no tiene los mismos efectos sobre la proliferación celular en la línea de neuroblastoma IMR32.....	84
4.3. Mecanismo de acción de DAX1.....	86
4.3.1. EWS/FLI1 y DAX1 regulan la expresión de un mismo grupo de genes.....	86
4.3.2. El grupo de genes regulados por EWS/FLI1 y por DAX1 está principalmente implicado en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S.....	87
4.3.3. El efecto de DAX1 sobre el perfil de expresión génica es diferente en función del contexto celular.....	93
4.3.4. DAX1 podría actuar como un represor transcripcional en células de Ewing.....	94
5. Discusión.....	97
6. Conclusiones.....	113
7. Bibliografía.....	117
8. Anexo 1.....	135
9. Anexo 2.....	151

Abreviaturas

PNET	Tumores neuroectodérmicos primitivos
SE	Sarcoma de Ewing
NB	Neuroblastoma
NMA-/+	Amplificación negativa/positiva del gen N-myc
DBD	Dominio de unión a ADN
RGG	Región rica en arginina-glicina-glicina
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN
SYQG	Región rica en glutamina, treonina y prolina
Zn	Dedos de Zinc
Pro	Dominio de activación rico en prolina
AF-1	Elemento de transactivación independiente de hormona
AF-2	Dominio de transactivación dependiente de hormona
PTD	Dominio puntual
AD	Dominio ácido
NTD	Dominio amino-terminal
CTD	Dominio carboxi-terminal
LBD	Dominio de unión a ligando
hMSC	Células madre mesenquimales humanas
ER	Receptor de estrógenos
LRH-1	Receptor homólogo de hígado-1
AR	Receptor de andrógenos
PR	Receptor de progesterona
AHC	Hipoplasia adrenal congénita ligada al cromosoma X
DSS	Síndrome del sexo reverso sensible a dosis
CAT	Catecol acetil transferasa
RT	Temperatura ambiente
Min	Minutos
Seg	Segundos
Dox	Doxiciclina
shRNA	ARNs pequeños en forma de horquilla
BrdU	Bromo-deoxi-uridina
aa	aminoácido
vs	versus

1 .Introducción

1.1. Características de los tumores de Ewing.

1.1.1. Características anatomopatológicas, diagnóstico e histiogénesis de los tumores de la familia Ewing.

El sarcoma de Ewing fue descrito por primera vez por James Ewing en 1921 como un endotelioma difuso o mieloma endotelial (Ewing 1921). Desde un punto de vista anatomopatológico, son tumores formados por una población homogénea de células pequeñas, redondeadas e indiferenciadas. Estas características morfológicas son compartidas por otros tumores pediátricos, tales como los rhabdomyosarcomas, el neuroblastoma, el tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas y algunos tipos de linfomas, por lo que el diagnóstico diferencial de estos tumores puede en ocasiones presentar cierto grado de complejidad (Triche 1988). Tradicionalmente, el diagnóstico del sarcoma de Ewing se hacía por exclusión de otras patologías, definiéndose como tumores primitivos de células redondas y pequeñas, desarrollados en niños o adolescentes, raramente en adultos y que carecieran de los rasgos bioquímicos y estructurales de neuroblastos (neuroblastoma), músculo esquelético primitivo (rhabdomyosarcoma), células epiteliales (carcinoma) o células linfoides (linfoma). Por estas razones se intentaron buscar marcadores proteicos y moleculares que facilitaran el diagnóstico diferencial de estos tumores.

El marcador proteico más utilizado en la actualidad es la proteína de superficie CD99 (Ambros et al. 1991; Kovar et al. 1990). La gran mayoría de estos tumores expresan altos niveles de esta glicoproteína transmembrana codificada por el gen MIC2 (Gelin et al. 1989; Kovar et al. 1990; Perlman et al. 1994). Sin embargo, este marcador no es exclusivo de los sarcomas de Ewing, y se expresa también en otros tumores de células pequeñas y redondas, como los osteosarcomas de células pequeñas, los sarcomas sinoviales y algunos rhabdomyosarcomas, y por lo tanto representa un marcador relativamente específico para los sarcomas de Ewing (Folpe et al. 2000; Hibshoosh and Lattes 1997).

No fue hasta 1984 cuando se descubrió la presencia de translocaciones cromosómicas características de los sarcomas de Ewing. Como veremos más adelante con cierto detalle, estas translocaciones dan lugar a proteínas de fusión con características oncogénicas (EWS/FLI1, EWS/ERG y otras), de tal modo que hoy está extensamente aceptado que esta alteración es el primer evento mutacional que desencadena el desarrollo del tumor. La identificación de estas alteraciones en otras entidades relacionadas, como el tumor de Askin o los tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET, *Primitive Neuroectodermal Tumor*) permitió englobarlos definitivamente en un mismo grupo de tumores denominados tumores de la familia Ewing. Hoy en día, la identificación de estas alteraciones genéticas mediante hibridación in situ (FISH) o

RT-PCR es utilizada de forma rutinaria para su diagnóstico definitivo (Aurias et al. 1984; Delattre et al. 1994; Turc-Carel et al. 1984).

El origen celular de estos sarcomas es controvertido. Inicialmente se pensó que estos tumores derivaban de células progenitoras de la cresta neural, basándose en ciertas características particulares observadas en las células de los tumores de Ewing, tales como la expresión de la enzima catecol acetil transferasa (implicada en la biosíntesis de neurotransmisores en nervios colinérgicos), la expresión de la enolasa específica de neurona y la tendencia de ciertas células derivadas de tumores de Ewing a formar dendritas primitivas y expresar proteínas asociadas a neuronas en respuesta a diferentes agentes diferenciadores (Arvand and Denny 2001; Cavazzana et al. 1987; Noguera et al. 1992; O'Regan et al. 1995; Staeger et al. 2004b). Sin embargo, varios estudios aparecidos recientemente parecen indicar que estos tumores derivarían de células madre mesenquimales adultas. Uno de tales estudios muestra que el silenciamiento de las proteínas de fusión características de estos tumores (en concreto EWS/FLI1) en células de Ewing, provoca la reexpresión de determinadas proteínas compatibles con células madre mesenquimales (CD44, CD54, CD59 y CD73). Además, estas líneas celulares de Ewing en las que se ha eliminado la expresión de EWS/FLI1, pueden diferenciar, tras la exposición a los agentes adecuados, a adipocitos, osteoblastos y condrocitos, una característica esencial de las células madre mesenquimales (Tirode et al. 2007). Por otro lado, las células madre mesenquimales humanas (hMSC) son permisivas a la expresión de EWS/FLI1 y la sobreexpresión de EWS/FLI1 en estas células induce la expresión de genes específicos de células de Ewing (Riggi et al. 2008). Por último, Miyagawa y cols. han descrito recientemente que la expresión ectópica de EWS/FLI1 o EWS/ERG en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea produce en estas un fenotipo similar al observado en las células de Ewing, induciendo la expresión de marcadores característicos de las células de Ewing (CD54, CD99, CD117 y CD271) y reprimiendo la de otros genes como CD10 y CD13 (Miyagawa et al. 2008). Todos estos estudios apoyarían la hipótesis de que los tumores de Ewing procederían de células madre mesenquimales en las que su capacidad de diferenciación ha sido bloqueada por EWS/FLI1.

1.1.2. Características clínicas.

Los tumores de la familia Ewing aparecen principalmente asociados a hueso (especialmente a pelvis (31%), fémur (20%) y fibula y tibia (11%)) (Grier 1997). En un 15% de los casos se encuentran en tejidos blandos, sin una asociación aparente a tejido óseo (Arvand and Denny 2001). Aproximadamente un 15-30% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, las cuales se localizan principalmente en el pulmón (50%), en los

huesos (25%) y en médula ósea (25%). Estos tumores afectan principalmente a adolescentes y jóvenes adultos en la primera y segunda década de vida (Triche 1988), con una incidencia de 3 casos por millón de individuos menores de 15 años y representan la segunda patología tumoral ósea más frecuente en la población infantil y adolescente (Paulussen et al. 2001). Es ligeramente más frecuentemente en varones que en mujeres (ratio hombre:mujer 3:2) (Paulussen et al. 2001) y en la población caucásica frente a la población asiática o africana (72,5% frente al 27,5%) (Stiller and Parkin 1996; Zucman-Rossi et al. 1997).

En la actualidad, el tratamiento de estos tumores se basa en una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia. La supervivencia global a los 5 años es actualmente del 60-65% (Scotlandi 2006). Estos valores de supervivencia varían sin embargo mucho según el grupo de riesgo, siendo superiores al 85% en pacientes con enfermedad localizada en los huesos de las extremidades y menores del 30% en pacientes con metástasis al diagnóstico en médula ósea (Desandes 2007; Hendershot 2005; Leavey and Collier 2008; West et al. 1997; Zoubek et al. 1998). Las tasas de supervivencia han permanecido prácticamente estancadas durante las dos últimas décadas, lo que indica claramente que los tratamientos actuales han tocado techo y son necesarios nuevos abordajes terapéuticos que permitan mejorar la supervivencia, especialmente, de los grupos de riesgo más desfavorecidos.

Entre los diferentes abordajes que están siendo evaluados como posibilidades terapéuticas cabe destacar:

- La inhibición de la expresión de las proteínas de fusión EWS/FLI1: Estrategias dirigidas a inhibir la expresión de EWS/FLI1 mediante técnicas de ARN de interferencia o similares son efectivas *in vitro* y en modelos animales, aunque su aplicación clínica requiere el desarrollo de formulaciones macromoléculas más efectivas y seguras (Hu-Lieskovan et al. 2005; Kovar et al. 1996; Lambert et al. 2000; Ouchida et al. 1995; Prieur et al. 2004; Siligan et al. 2005; Tanaka et al. 1997; Toretsky et al. 1997; Yi et al. 1997). Por otro lado, ciertos compuestos, como la rapamicina (usada para prevenir los rechazos en transplantes), disminuyen la expresión de las proteínas de fusión, aunque su mecanismo de actuación es desconocido (Mateo-Lozano et al. 2003).

- La inhibición de la ruta del IGF1: Los tumores de Ewing son dependientes de IGF1 y esta ruta de señalización desempeña un papel central en la supervivencia celular de los mismos (Kim et al. 2005; Luo et al. 2003; Mitsiades et al. 2004; Prieur et al. 2004; Yee et al. 1990). Existen en la actualidad varios anticuerpos dirigidos contra el receptor del IGF1 (IGF1R) e inhibidores de su actividad tirosina quinasa, algunos de los cuáles se encuentran en desarrollo

clínico (Benini et al. 2001; Kolb et al. 2008; Manara et al. 2007; Martins et al. 2006; Mitsiades et al. 2004; Scotlandi et al. 2005).

- El bloqueo de la proteína de membrana CD99: Aunque la función de CD99 en tumores de Ewing no es plenamente conocida, anticuerpos dirigidos contra esta proteína de superficie son capaces de reducir el crecimiento de los tumores de Ewing (Scotlandi et al. 2006; Sohn et al. 1998).

- La inhibición de la angiogénesis: Este es uno de los procesos más importantes para el crecimiento tumoral. Así, la inhibición de la actividad VEGF (utilizando la región temprana del gen E1A de adenovirus) reduce el potencial oncogénico en líneas celulares de Ewing (Guan et al. 2005). Un anticuerpo anti-VEGF humanizado, el bevacizumab, ha dado buenos resultados en el tratamiento del cáncer colorrectal, al igual que ciertos compuestos dirigidos contra la acción de la actividad tirosín kinasa del receptor del VEGF y podrían por tanto usarse en el tratamiento de los tumores de Ewing (Ahmed et al. 2004; Collins and Hurwitz 2005).

1.1.3. Características moleculares.

La principal característica molecular de los tumores de Ewing es la presencia de translocaciones cromosómicas específicas. Estas translocaciones dan lugar a proteínas de fusión entre la región N-terminal de un miembro de la familia TET (generalmente EWS, y en raras ocasiones TLS/FUS) (Figura 1), y la región C-terminal de un miembro de la familia de factores de transcripción ETS (Figura 2). El gen EWS (*E*Wing *S*arcoma) puede fusionarse con cinco factores distintos de la familia ETS (FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1), mientras que TLS/FUS (*T*ranslocated in *L*iposarcoma/*F*USion) sólo se fusiona con el factor de transcripción ERG.

La translocación más frecuente es la t(11;22)(q24;q12) (85% de los casos), que da lugar a una proteína de fusión entre los genes EWS y FLI1 (*F*riend *L*eukaemia *I*ntegration *1*) (Delattre et al. 1994). En un 10% de los tumores de la familia Ewing se observa la fusión t(21;22)(q22;q12) que da lugar a una fusión entre los genes EWS y ERG (*E*ts *R*elated *G*ene) (Sorensen et al. 1994; Zucman et al. 1993). El resto de las translocaciones identificadas son muy infrecuentes y se dan en el 5% restante: t(2;22)(q33;q12) en la que EWS se fusiona a FEV (*F*ifth *E*wing *V*ariant) (Peter et al. 1997); t(17;22)(q12;q12) en la que EWS se fusiona a E1AF (*E*1A *F*actor o *E*TV4, *E*ts *V*ariant gene *4*) (Kaneko et al. 1996; Urano et al. 1996); t(7;22)(p22;q12) en la que EWS se fusiona a ETV1 (*E*ts *T*ranslocation *V*ariant *1*) (Jeon et al. 1995) y t(16;21)(p11;q22) en la que TLS/FUS se fusiona a ERG (Shing et al. 2003).

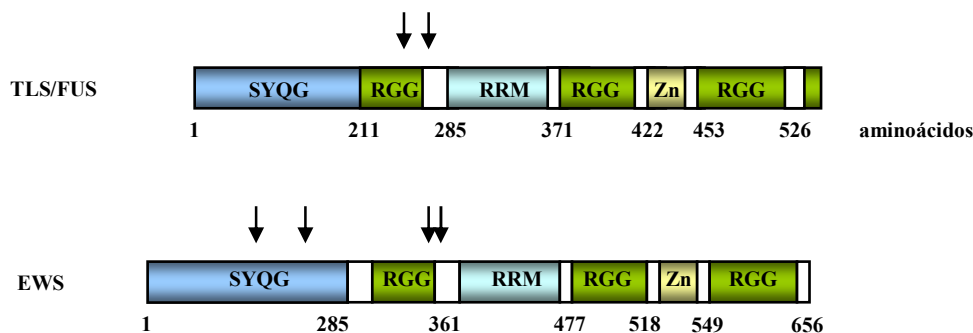


Figura 1. Miembros de la familia de proteínas TET que forman parte de las translocaciones cromosómicas características de los tumores de la familia Ewing. Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer un dominio de 87 aminoácidos denominado RRM (*RNA Recognition Motif*) que interviene en uniones ARN-proteína. También poseen un número variable de repeticiones RGG (*Arginine-Glycine-Glycine*) que parecen también facilitar las interacciones con el ARN. Debido a esta estructura, estas proteínas parecen participar en el procesamiento y/o la transcripción de los ARNm. El extremo N-terminal contiene una serie de repeticiones degenerativas del dipéptido Ser-Tyr y es también una región rica en glutamina, treonina y prolina (SYQG). La región N-terminal se asocia con el complejo TFII, ciertas subunidades de la ARN polimerasa II y el coactivador CBP/p300. Por lo tanto, esta región tiene actividad transactivadora. Esta región N-terminal es la que se fusiona con la región C-terminal de los factores de transcripción ETS y está presente en todas las proteínas de fusión (Las flechas indican los puntos de fusión con los factores de transcripción de la familia ETS). Zn: dedos de Zinc.

La zona de fusión de cada uno de los genes se produce a nivel de diferentes exones del gen EWS o TLS/FUS y de los factores de transcripción FLI1 y ERG. De esta forma se han descrito hasta 12 fusiones diferentes de EWS/FLI1 (Zoubek et al. 1996; Zoubek et al. 1994; Zucman et al. 1993). Las dos fusiones más comunes son la denominada de tipo I (en la que el exón 7 de EWS se yuxtapone al exón 6 de FLI1) y la de tipo II (donde el exón 7 de EWS se fusiona al exón 5 de FLI1). Ambas fusiones representan el 80 % de los casos. En el caso de las proteínas de fusión EWS/ERG se han descrito hasta cinco variantes, siendo la más abundante la fusión del exón 7 de EWS con el exón 6 de ERG (Ginsberg et al. 1999; Zoubek et al. 1994; Zucman et al. 1993). Algunos estudios sugieren que el tipo de fusión es un factor pronóstico (de Alava et al. 1998; Zoubek et al. 1996).

Además de estas translocaciones que representan la marca molecular de los tumores de Ewing se han identificado también otras alteraciones genéticas recurrentes. Por ejemplo, la delección homocigótica del locus p16 aparece en un 25-30% de los tumores de Ewing (Kovar et al. 1997). También son recurrentes la t(1;16) (20%), la ganancia de un cromosoma (trisomía) 8 (35-55 % de los casos), 12 (25%) o la presencia de delecciones en 1p36 (18%) (Armengol et al. 1997; Hattinger et al. 1999; Hattinger et al. 2000).

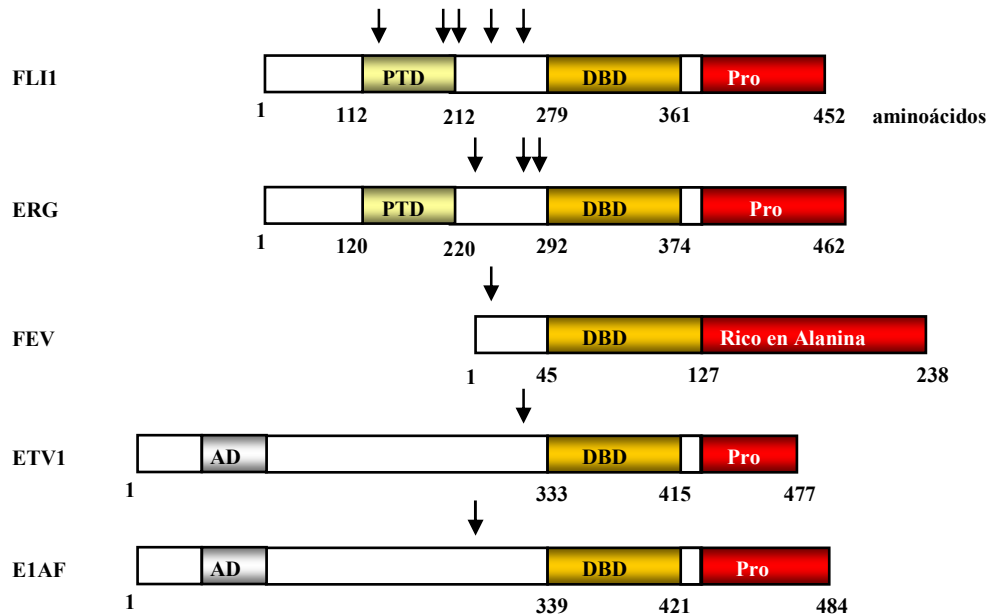


Figura 2. Factores de transcripción de la familia ETS implicados en las translocaciones características de los tumores de Ewing. Dentro de esta familia hay distintas subfamilias, dos de las cuales forman parte de las translocaciones de los tumores de Ewing. La subfamilia ERG, a la que pertenecen FLI1 (*Friend Leucemia virus Integration site 1*), ERG (*ETS Related Gene*) y FEV (*Fifth Ewing Variant*), y la subfamilia PEA3, en la que se incluyen ETV1 (*ETS Translocation Variant 1*) y E1AF (*E1A Factor*) (ETV4). Los distintos miembros de la familia se clasifican según su homología en el dominio DBD (*DNA Binding Domain*), la posición relativa de dicho dominio y la presencia de otros dominios transactivadores o implicados en interacciones proteína-proteína. El DBD es un dominio altamente conservado compuesto por 87 aminoácidos que reconoce la secuencia (GGAA/T) en el ADN. Este dominio, localizado en la mitad C-terminal de la molécula, es el que forma parte en todas las proteínas de fusión característica de los tumores de Ewing. Las flechas indican los diferentes puntos de fusión con EWS identificados en los tumores de Ewing. AD: *Acidic Domain*, que forma parte del dominio de activación N-terminal. Pro: dominio de activación rico en prolina. PTD: *Pointed Domain*.

1.2. Propiedades oncogénicas de las proteínas de fusión EWS/ETS.

Desde su descubrimiento a principios de los 90, se ha acumulado suficiente evidencia científica que demuestra que las proteínas de fusión EWS/ETS son factores de transcripción aberrantes que desempeñan un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing (Figura 3).

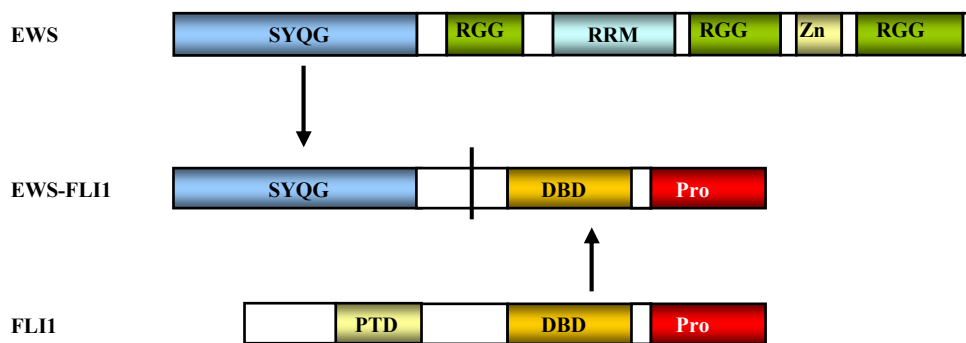


Figura 3. Dominios funcionales de EWS y de FLI1 que intervienen en el factor de transcripción quimérico EWS/FLI1. EWS/FLI1 es la proteína de fusión más frecuentemente observada en los tumores de Ewing (85% de los casos). En la figura aparecen los distintos dominios que forman parte de cada una de las proteínas nativa (EWS y FLI1), así como las distintas partes involucradas en la proteína de fusión EWS/FLI1. SYQG: región rica en serina-tirosina-glutamina-glicina que tiene un alto potencial de transactivación, RGG: región rica en arginina-glicina-glicina, RRM: *RNA Recognition Motif*, Zn: Dedos de Zinc. PTD: *Pointed Domain*, DBD: *DNA Binding Domain*, Pro: dominio de activación rico en prolina.

Los primeros estudios que demostraron un papel oncogénico para estas proteínas de fusión provienen de estudios realizados en células NIH-3T3 de ratón. Así, la proteína de fusión EWS/FLI1 es capaz de transformar esta línea celular de ratón, así como inducir la formación de colonias en agar blando y la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos, que llamativamente, presentan un aspecto histológico similar al de los tumores humanos (May et al. 1993a; May et al. 1993b; Thompson et al. 1999; Yi et al. 1997). El mantenimiento de estas propiedades tumorogénicas depende de la existencia de niveles elevados de expresión de EWS/FLI1 (Kovar et al. 1996; Ouchida et al. 1995; Tanaka et al. 1997). En cambio, la expresión de FLI1 nativo en células NIH-3T3, no produce los mismos efectos, indicando que EWS/FLI1 y FLI1 son funcionalmente diferentes. Aunque estos estudios claramente demostraron el potencial oncogénico de EWS/FLI1, otros estudios indicaron que el efecto de EWS/FLI1 sobre la fisiología celular era muy diferente. Así, la expresión de EWS/FLI1 en fibroblastos primarios humanos y fibroblastos embrionarios de ratón resulta ser letal para estas células (Deneen and Denny 2001; Lessnick et al. 2002), aunque estas se vuelven permisivas a la expresión de EWS/FLI1, si se eliminan, mediante manipulaciones genéticas, los genes p53, p16^{INK4} o p19^{ARF}. Estos resultados indican que en determinados sistemas celulares parecen ser

necesarias ciertas alteraciones secundarias para soportar la expresión de EWS/FLI1 (Deneen and Denny 2001). Todos estos estudios se llevaron a cabo en sistemas celulares heterólogos, y aunque algunos de ellos claramente demostraron que las proteínas de fusión EWS/FLI1 eran capaces de inducir las características propias de las células tumorales, estos no permitían sacar conclusiones generales sobre el papel de las proteínas de fusión EWS/ETS en su contexto fisiopatológico.

Más adelante, la utilización de diferentes técnicas para silenciar EWS/FLI1 en células de Ewing ha permitido demostrar, sin ninguna duda, que estas proteínas de fusión desempeñan un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing. De este modo, ha quedado claramente demostrado que la inhibición de la expresión de EWS/FLI1 en líneas celulares de Ewing, produce una disminución de la tasa de crecimiento, induce una acumulación de las células tumorales en la fase G1 del ciclo celular, incrementa su susceptibilidad a la apoptosis, inhibe su capacidad para crecer independiente de anclaje y previene la formación de tumores en ratones desnudos (Hu-Lieskovan et al. 2005; Kovar et al. 1996; Lambert et al. 2000; Ouchida et al. 1995; Prieur et al. 2004; Siligan et al. 2005; Tanaka et al. 1997; Toretsky et al. 1997; Yi et al. 1997).

Estas propiedades oncogénicas de EWS/FLI1 son dependientes de su capacidad de unión al ADN, como lo demuestra el hecho de que todas las proteínas de fusión identificadas hasta fecha contienen un dominio ETS de unión al ADN intacto. La importancia del dominio de unión al ADN ha quedado directamente demostrada mediante experimentos de mutagénesis dirigida, ya que la mutación de este dominio provoca una reducción o anulación de la capacidad transformante de la proteína quimérica (Jaishankar et al. 1999; May et al. 1993a). Igualmente importante para el mantenimiento de sus propiedades oncogénicas es la capacidad de EWS/FLI1 para activar la transcripción a través del dominio N-terminal de EWS. Así, se ha demostrado, que el dominio N-terminal de EWS presente en las fusiones EWS/ETS actúa como un potente activador de la transcripción (Bailly et al. 1994; Mao et al. 1994; May et al. 1993b; Ohno et al. 1993) y que la delección de este dominio transactivador reduce el potencial oncogénico de EWS/ETS (Lessnick et al. 1995). Algunos estudios parecen demostrar que, al menos en células NIH-3T3, este dominio N-terminal podría inducir ciertas características transformantes, incluso en ausencia de un dominio de unión al ADN funcional (Welford et al. 2001). En definitiva, todos estos estudios vienen a demostrar que ambas mitades de estas proteínas de fusión son necesarias para desarrollar todo su potencial oncogénico: el dominio N-terminal de EWS, media las interacciones proteína-proteína, y actúa como un potente activador transcripcional, mientras que el dominio C-terminal del factor de transcripción ETS, que contiene el dominio de unión al ADN, lleva a cabo la selección de los genes regulados.

1.3. Genes regulados por las proteínas quiméricas EWS/ETS.

La característica más importante de estas proteínas de fusión es su capacidad para activar o reprimir la expresión de determinados genes. Por esta razón, durante los últimos años se ha hecho un esfuerzo importante para identificar genes diana de EWS/FLI1, con el objeto de comprender mejor cuales son los mecanismos moleculares que subyacen en el desarrollo de estos tumores. Así, se ha demostrado que EWS/FLI1 es capaz de regular la expresión génica, directa o indirectamente, de multitud de genes implicados en los “*hallmark*” del cáncer (Hanahan and Weinberg 2000). A continuación exponemos algunos de los ejemplos más relevantes.

EWS/FLI1 activa genes implicados en la estimulación de la proliferación celular: Si las comparamos con las células no transformadas, las células tumorales son, parcial o completamente independientes de factores de crecimiento exógenos para poder proliferar. Algunos de los genes que regulan las proteínas EWS/ETS son factores de crecimiento o proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, EWS/FLI1 induce la expresión – directa o indirectamente – de *PDGF-C* (factor de crecimiento derivado de plaquetas C) (Zwerner and May 2001), *CCND1* (ciclina D1) (Baer et al. 2004; Fuchs et al. 2004b; Khan et al. 2001; Matsumoto et al. 2001; Wai et al. 2002), *c-Myc* (Bailly et al. 1994; Dauphinot et al. 2001; Nishimori et al. 2002), *GLI1* (un efector de la señal Hedgehog que regula la proliferación celular en colaboración con c-Myc) (Zwerner et al. 2008) o *CCK* (colecistoquinina) (Carrillo et al. 2007).

EWS/FLI1 ayuda a evadir las señales de inhibición del crecimiento: La proliferación celular está también regulada por señales intrínsecas o extrínsecas que inhiben el crecimiento y algunos de los genes regulados por EWS/FLI1 están implicados en estas señales inhibitorias. El control intrínseco del ciclo celular es realizado por los inhibidores de kinasas dependientes de ciclina. Tres de estos inhibidores, *p21^{WAF1/CIP1}*, *p27^{KIP1}* y *p57^{KIP2}*, son genes cuya expresión está inhibida en tumores de Ewing (Matsumoto et al. 2001; Nakatani et al. 2003). En el caso de *p21^{WAF1/CIP1}*, EWS/FLI1 puede unirse al promotor de este gen y reprimir su expresión o actuar indirectamente a través de interacciones proteína-proteína con el factor de transcripción Brn-3a, impidiendo así la unión de Brn-3a al promotor de *p21^{WAF1/CIP1}* (Gascoyne et al. 2004). *p21^{WAF1/CIP1}* puede también ser reprimido por c-Myc, que a su vez es inducido por EWS/FLI1 (Wanzel et al. 2003). En cuanto a las señales inhibitorias externas, EWS/FLI1 inhibe, por ejemplo, la expresión del receptor de TGF- β de tipo II (*TGFBR2*), hasta el punto que su expresión es indetectable en tumores de Ewing (Fukuma et al. 2003; Hahm 1999; Im et al. 2000; Kovar et al. 2003). La inhibición de la expresión de *TGFBR2* contribuye a que las células

de Ewing no respondan a las señales inhibitorias mediadas por el TGF- β (Factor de crecimiento transformante β). Otro gen inducido por EWS/FLI1 e implicado en la evasión de la inhibición del crecimiento es *ID2*, (Fukuma et al. 2003; Nishimori et al. 2002) una proteína que interacciona con factores de transcripción de tipo hélice-lazo-hélice como MyoD o miogenina. Id2 impide la unión de estos factores de transcripción al ADN, y por tanto la transcripción de sus genes diana. De esta manera, Id2 es capaz de suprimir la diferenciación de una gran variedad de células, lo que podría explicar el característico fenotipo indiferenciado de las células de Ewing. Además, Id2 también inhibe al factor de transcripción E2A, suprimiendo la activación de *p21^{WAF1/CIP1}* dependiente de E2A, y por tanto promoviendo el ciclo celular. (Lasorella et al. 2001; Ruzinova and Benezra 2003; Zebedee and Hara 2001).

EWS/FLI1 contribuye a escapar de la senescencia: La telomerasa es la enzima responsable de mantener la longitud de los telómeros con cada división celular. En la mayoría de las células tumorales, la subunidad catalítica de la telomerasa (*hTERT*) está sobreexpresada, lo que favorece que las células cancerosas escapen a la senescencia, y se vuelvan inmortales (Hiyama and Hiyama 2003; Janknecht 2004). EWS/FLI1 induce la expresión de *hTERT*, y su expresión está aumentada en los tumores de Ewing (Fuchs et al. 2004a; Takahashi et al. 2003). EWS/FLI1 no se une directamente al promotor de *hTERT*, sino que activa su expresión indirectamente a través de c-Myc.

EWS/FLI1, supervivencia celular y apoptosis: Una de las vías de señalización más importantes en cuanto a supervivencia celular es la ruta IGF-1/Akt. Esta ruta de señalización está frecuentemente activada en células tumorales, incluyendo los tumores de la familia Ewing (Kim et al. 2005; Luo et al. 2003; Mitsiades et al. 2004). EWS/FLI1 inhibe la expresión del gen *IGFBP-3* (Proteína de unión al IGF, 3) (Prieur et al. 2004). IGFBP-3 interacciona con IGF-1, impidiendo la interacción de IGF-1 con sus receptores y la activación de la ruta Akt (Firth and Baxter 2002; Grimberg 2003; Pollak 2004). Por lo tanto, niveles bajos de IGFBP-3 contribuyen a mantener elevados los niveles de IGF-1 y por tanto, la ruta Akt activa en células de Ewing.

EWS/FLI1 y angiogénesis: El crecimiento del tumor está limitado por la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Con el objeto de garantizar el aporte energético, los tumores inducen la formación de vasos sanguíneos, fenómeno conocido como angiogénesis. EWS/FLI1 también regula varios de los genes implicados en este proceso. Por ejemplo, EWS/FLI1 induce la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) (Dalal et al. 2005; Fuchs et al. 2004b; Guan et al. 2005). Esta regulación no parece ser directa, sino que parece ser llevada a cabo indirectamente vía factores de transcripción Sp1 (Black et al. 2001; Finkenzeller et al. 1997; Mukhopadhyay et al. 1997; Suske 1999). Por otro lado, la expresión de *VEGF* también

puede ser aumentada por EWS/FLI1 vía IGF-1 y sus receptores (Strammiello et al. 2003). Estudios recientes muestran que EWS/FLI1 reprime la expresión de las trombospondinas 1 y 2 (una familia de glicoproteínas inhibitoras de la angiogénesis), sugiriendo que estas glicoproteínas pueden desempeñar un papel relevante en la vascularización de los tumores de Ewing (Potikyan et al. 2007).

EWS/FLI1, invasión y metástasis: Los procesos de invasión y la metástasis requieren la remodelación y/o destrucción de la matriz extracelular. Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) juegan un papel importante en este proceso y frecuentemente se encuentran sobreexpresadas en las células tumorales o en las células del estroma vecinas (Brinckerhoff and Matrisian 2002; Coussens et al. 2002; Egeblad and Werb 2002; Overall and Lopez-Otin 2002). Las proteínas de fusión EWS/ETS son capaces de activar el promotor de los genes *MMP-1* y *MMP-3* in vitro, pero su expresión en tumores de Ewing es muy baja (Braun et al. 1995; Fuchs et al. 2003; Yabe et al. 2002), lo que probablemente indique que estas dos metaloproteinasas no juegan un papel importante en la progresión de los tumores de Ewing. Por otro lado, las metaloproteinasas *MMP-2*, *-9* y *-14* se expresan a niveles elevados en la mayoría de los tumores de Ewing (Yabe et al. 2002), pero su contribución al proceso tumorigénico es desconocida. Por último, mencionar otros dos genes inducidos por las proteínas de fusión EWS/ETS que se encuentran también sobreexpresados en tumores y/o células de Ewing. La proteína de matriz extracelular Tenascina C (Watanabe et al. 2003), que se expresa en células tumorales y del estroma (Jones and Jones 2000) y la caveolina-1 (*CAVI*), una proteína que forma parte de las caveolas, implicada en la regulación de determinadas señales intracelulares, y que parece ser importante para el desarrollo de las metástasis (Tirado et al. 2006).

Todos estos estudios nos permiten afirmar que las proteínas de fusión EWS/ETS desempeñan un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing a través de la regulación – directa o indirecta – de genes implicados en los procesos y rutas de señalización que son claves para el desarrollo tumoral. Aunque el avance obtenido en estos últimos años ha sido considerable, es de esperar que en los próximos años surjan nuevos genes diana de las proteínas de fusión EWS/ETS que desempeñen un papel relevante en el desarrollo de estos tumores. Uno de estos genes puede ser el receptor nuclear huérfano DAX1 (*NR0B1*). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que DAX1 es inducido por EWS/FLI1, pero no por FLI1 nativo, y que su expresión es elevada en células y tumores de Ewing (Mendiola et al. 2006). Este trabajo describe por primera vez la regulación de este receptor nuclear por un oncogen. Estas observaciones nos animaron a profundizar en los mecanismos de regulación de DAX1 y a estudiar su papel funcional en los tumores de la familia Ewing.

1.4. Características del receptor nuclear huérfano DAX1 (*NR0B1*).

1.4.1. Estructura genética y molecular.

El gen *DAX1* (nombre oficial *NR0B1*) se localiza en la región cromosómica Xp21 y tiene una estructura genómica muy simple formada por dos exones separados por un único intrón (Guo et al. 1995; Zanaria et al. 1994). Codifica para un ARNm de 1413 nucleótidos y una proteína de 470 aminoácidos. Recientemente se ha identificado una isoforma, DAX1 α , que da lugar a una proteína de 401 aminoácidos codificada por el exón 1 y un nuevo exón generado por splicing alternativo (Hossain et al. 2004).

DAX1 es un receptor nuclear huérfano perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares (Burriss et al. 1996; Giguere 1999). Los miembros de esta superfamilia de reguladores transcripcionales presentan una estructura bien definida en la que se pueden diferenciar los siguientes dominios (Figura 4A): i) un dominio modulador, denominado región A/B, que contiene un elemento de transactivación independiente de hormonas (AF-1); ii) un dominio de unión al ADN (DBD o región C), muy conservado entre los diferentes miembros de la familia; iii) una subregión D, que actúa de bisagra entre el DBD y el dominio de unión a ligando (LBD); y por último, iv) el dominio de unión a ligando (LBD o región E), muy conservado y que media la unión del ligando, la dimerización y la localización nuclear. Consiste en 12 hélices α con un dominio de transactivación dependiente de hormona (AF-2).

La estructura de DAX1, sin embargo, es bastante inusual (Figura 4B). El dominio carboxi-terminal de DAX1 es homólogo al dominio LBD característico de los receptores nucleares y también contiene el dominio de transactivación AF-2. Pero DAX1 carece de la región C (el típico DBD), el dominio modulador (región A/B) y la región bisagra (zona D). En lugar de estos dominios, la mitad amino-terminal de DAX1 está formada por una estructura única, que contiene 3½ repeticiones de una secuencia de 65-70 aminoácidos rica en alanina y glicina. En esta región se encuentran también tres motivos LXXLL, unas secuencias características de co-represores y a través de los cuáles DAX1 puede interactuar con otros receptores nucleares (Kawajiri et al. 2003; Suzuki et al. 2003; Zhang et al. 2000). Esta secuencia no tiene homología con ninguna otra proteína conocida, con la excepción de otro receptor nuclear huérfano denominado SHP (*NR0B2*).

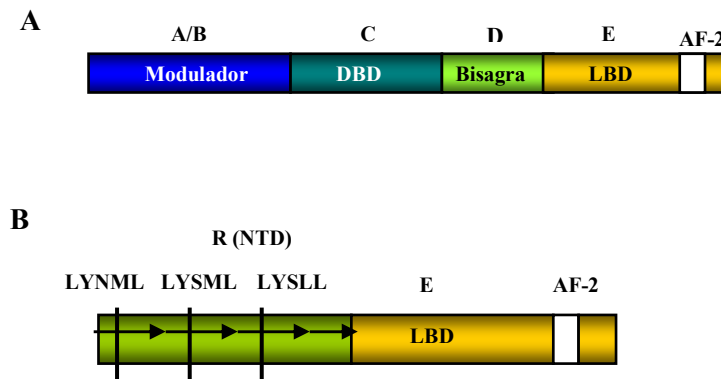


Figura 4. A) Estructura de los receptores nucleares. Hay varios dominios que pueden ser diferenciados: el dominio modulador o dominio A/B, el dominio de unión a ADN (DBD) o dominio C, la región D, que actúa como bisagra entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando (LBD) y por último el dominio globular de unión a ligando o región E. En esta última región reside el dominio de transactivación dependiente de hormona AF-2. **B) Estructura de DAX1.** DAX1 no conserva todos los dominios característicos de los receptores nucleares. Se pueden distinguir dos dominios: el dominio amino-terminal (NTD) o región R, formada por 3½ repeticiones de una secuencia rica en alanina y glicina, y en la que se localizan tres motivos LXXLL y la región E que contiene el dominio LBD y AF-2 como en todos los receptores nucleares.

1.4.2. DAX1 es un represor transcripcional.

DAX1 es un potente represor transcripcional. Esta actividad represora reside en el dominio C-terminal de la molécula, la cual es capaz de interactuar con varios co-represores como Alien (Altincicek et al. 2000) o N-CoR (Crawford et al. 1998). DAX1 utiliza diferentes mecanismos para ejercer esta actividad represora:

- Unión directa al ADN: DAX1 puede interactuar directamente con el promotor de *StAR* (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), uno de los principales reguladores en la síntesis de esteroides, a través de estructuras con forma de horquilla en el ADN y reprimir su transcripción (Zazopoulos et al. 1997).

- Interacción con otros receptores nucleares: DAX1 interactúa con el receptor nuclear SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*) inhibiendo su actividad transcripcional y por tanto reprimiendo la expresión de los genes que están bajo el control de SF-1 (Ito et al. 1997; Suzuki et al. 2003). En la interacción participan los tres motivos LXXLL presentes en el dominio N-terminal de DAX1 y el dominio AF-2 de SF-1 (Ito et al. 1997; Lalli et al. 1997; Suzuki et al. 2003; Zhang et al. 2000). DAX1 también reprime la actividad de los receptores de estrógenos (ER, *NR3A1-2*) y del receptor homólogo de hígado 1 (LRH-1, *NR5A2*), mediante un mecanismo similar al descrito para SF-1 (Kawajiri et al. 2003).

- Otros mecanismos de represión transcripcional: DAX1 actúa también como un co-regulador negativo de los receptores de andrógenos (AR, *NR3C4*) (Agoulnik et al. 2003; Holter et al. 2002; Yuan et al. 2001) y de los receptores de progesterona (PR, *NR3C3*) (Agoulnik et al. 2003). El mecanismo por el cual DAX1 media la represión de estos receptores nucleares parece ser diferente al encontrado para SF-1, ER o LRH-1. En este caso, DAX1 inhibe la transactivación de AR interfiriendo con la dimerización y con la comunicación interdominio entre las moléculas de AR. Tanto el dominio amino- como el carboxi-terminal de DAX1 parecen estar implicados. En el caso de PR, DAX1 interfiere en su homodimerización.

1.4.3. DAX1 en fisiología y patología humana.

Mutaciones inactivantes en DAX1 provocan una enfermedad denominada Hipoplasia Adrenal Congénita ligada al cromosoma X (AHC, *Adrenal Hypoplasia Congenita*) (Zanaria et al. 1994). Esta enfermedad se caracteriza por un desarrollo embrionario anormal de las cápsulas suprarrenales, cuya consecuencia es un déficit en la síntesis de mineralocorticoides (Habiby et al. 1996; Tabarin et al. 2000). Por otro lado, duplicaciones de la región cromosómica donde se localiza DAX1, dan lugar a una patología conocida como el Síndrome del sexo reverso sensible a dosis (DSS, *Dosage Sensitive Sex reversal*). En este síndrome, los individuos XY presentan un fenotipo XX (Bardoni et al. 1994). El nombre de DAX1 proviene de su implicación en estas dos patologías: DSS, AHC, región crítica del cromosoma X, gen 1.

DAX1 desempeña un papel importante en la determinación sexual y el desarrollo de las gónadas. En este sentido, DAX1 es considerado un gen anti-testículos, ya que reprime la transcripción de *MIS* (*Müllerian Inhibiting Substance*), cuya expresión es imprescindible para la regresión del conducto de Müllerian y el desarrollo de los testículos (Meeks et al. 2003a; Meeks et al. 2003b; Yu et al. 1998). Aunque menos conocido, DAX1 también desempeña un papel en la fisiología de los órganos sexuales femeninos. Así, DAX1 inhibe la transactivación de β HSD2 mediada por LRH-1 en células granulosas, regulando la síntesis de esteroides durante el ciclo menstrual (Peng et al. 2003).

Una de las funciones mejor estudiadas de DAX1 es su papel como regulador negativo de la síntesis de esteroides. Así, muchas de las enzimas implicadas en la síntesis de estas hormonas son reprimidas (directa o indirectamente) por DAX1 (Clipsham and McCabe 2003; Lalli and Sassone-Corsi 2003). Por ejemplo, DAX1 reprime la transactivación mediada por SF-1 de genes implicados en la biosíntesis de andrógenos por las glándulas adrenales (*StAR*, *P450scc* y *Cyp17*) en células en cultivo (Jimenez et al. 2003) y juega un papel importante en la

síntesis de gonadotropina en la glándula pituitaria, actuando como regulador negativo de la secreción de gonadotropina (Iyer and McCabe 2004; Yu et al. 1998).

En un sentido completamente distinto, DAX1 parece desempeñar también un papel importante en la fisiología de las células madre embrionarias. Así, DAX1 se expresa a elevados niveles en las células madre embrionarias de ratón y su expresión se pierde durante el proceso de diferenciación, lo que sugiere que DAX1 podría desempeñar algún papel en el mantenimiento del estado indiferenciado de estas células madre (Clipsham and McCabe 2003; Clipsham et al. 2004; Yu et al. 1998).

En resumen, DAX1 es un receptor nuclear huérfano implicado en numerosas funciones fisiológicas, entre las que destacan la determinación del sexo en mamíferos, el desarrollo de las gónadas y el control de la síntesis de esteroides (Lalli and Sassone-Corsi 2003). Hasta la fecha, su implicación en cáncer ha sido escasa y se ha circunscrito exclusivamente a estudios llevados a cabo en tumores derivados de los tejidos donde este gen es fisiológicamente activo, como los adenomas pituitarios (Ikuyama et al. 1998) y los tumores adenocorticales (Reinke et al. 1998). También se ha descrito su expresión en cáncer de mama (Conde et al. 2004), así como en carcinoma de ovario, donde se ha propuesto como un factor pronóstico adverso (Abd-Elaziz et al. 2003).

La elevada expresión de DAX1 en los tumores de Ewing, un tumor no relacionado con tejidos esteroideogénicos, y el hecho que DAX1 sea inducido por EWS/FLI1, la oncoproteína característica de estos tumores, nos han animado a profundizar en los mecanismos de regulación de DAX1 y estudiar su papel funcional en los tumores de la familia Ewing. Esta Tesis es el resultado de estos estudios.

2. Objetivos

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas específicas, que en el 85% de los casos dan lugar a una proteína de fusión entre la región N-terminal del gen EWS y la región C-terminal del factor de transcripción FLI1. La proteína de fusión resultante, EWS/FLI1, actúa como un factor de transcripción aberrante que desregula la expresión de genes implicados en el desarrollo del cáncer.

Recientemente hemos demostrado que DAX1, un receptor nuclear huérfano que posee una potente actividad represora transcripcional, es uno de los genes regulados por EWS/FLI1 en células de Ewing y que su expresión es elevada en tumores y líneas celulares de Ewing (Mendiola et al. 2006). Sin embargo, desconocemos como EWS/FLI1 regula la expresión de DAX1 y su papel funcional en el desarrollo de los tumores de Ewing. Esta Tesis pretende dar respuesta a estos dos aspectos.

Los objetivos concretos planteados son:

1- Analizar si DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1.

Para ello se establecerán sistemas de ARN de interferencia inducible contra EWS/FLI1 en células de Ewing, se analizará el efecto de mutantes funcionales de EWS/FLI1 sobre la expresión de DAX1 y se llevarán a cabo ensayos con genes reporteros y experimentos de inmunoprecipitación de cromatina para identificar que regiones del promotor de DAX1 están implicadas en su regulación.

2- Estudiar el papel funcional de DAX1 en el desarrollo de los tumores de Ewing.

Para ello se establecerán modelos de ARN de interferencia contra DAX1 y se estudiará el efecto del silenciamiento de DAX1 sobre las características transformantes y tumorigénicas de las células de Ewing.

3- Estudiar el mecanismo de acción de DAX1 en células de Ewing.

Ya que DAX1 es, en su contexto fisiológico, un potente represor transcripcional, analizaremos, mediante matrices de oligonucleótidos, el perfil de expresión génica regulado por DAX1 en células de Ewing y lo compararemos al regulado por EWS/FLI1. Por último, analizaremos si DAX1 mantiene su característica actividad represora transcripcional en células de Ewing.

3. Materiales y Métodos

31. Material Biológico.

3.1.1. Líneas Celulares.

Las líneas celulares utilizadas se cultivaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo de GIBCO BRL, se suplementó con suero fetal bovino (10-20% según la línea celular), o con suero fetal bovino sin tetraciclina especial para los sistemas inducibles creados, así como con penicilina (100u.i./ml) y estreptomycinina (100 µg/ml).

Las características más importantes de las líneas celulares utilizadas están en la siguiente tabla.

Tabla 1. Líneas celulares.

Nombre	Tipo (1)	Medio de cultivo	Características moleculares(2)	Referencias
A673	SE	DMEM	t(11;22); EWS/FLI-1 Tipo I.	(Dauphinot et al. 2001; Frolík et al. 1984)
SK-N-MC	PNET	IMDM	t(11;22); EWS/FLI-1 Tipo I.	(Bastida et al. 1985)
SK-PN-DW	SE	IMDM	t(11;22); EWS/FLI-1 Tipo I.	(Helson et al. 1984)
RD-ES	SE	RPMI	t(11;22); EWS/FLI-1 Tipo II.	(Dauphinot et al. 2001; Giovannini et al. 1994)
TTC-466	PNET	RPMI	t(21;22); EWS/FLI-1 Tipo I.	(Fults et al. 1992)
A4573	SE	RPMI	t(11;22); EWS/FLI-1 (10/6)	(McKeon et al. 1988)
TC-71	SE	IMDM	t(21;22); EWS/FLI-1 Tipo I.	(Whang-Peng et al. 1984)
SK-ES-1	SE	McCoy's	t(21;22); EWS/FLI-1 Tipo II.	(Dauphinot et al. 2001; Giovannini et al. 1994)
IMR-32	NB	RPMI	NMA+	(Tumilowicz et al. 1970)
293	Riñón embrionario	DMEM	p53-, Ad5	(Graham et al. 1977)

(1) SE: Sarcoma de Ewing; PNET: Tumor primitivo neuroectodérmico; NB: neuroblastoma.

(2) Aquí vemos las características moleculares de los distintos tipos de líneas celulares utilizados. En el caso de las líneas de Ewing vemos la presencia de translocaciones. En el caso de la línea de neuroblastoma se muestra la amplificación o no del gen *N-MYC*. En otras líneas vemos la pérdida o no de la función de distintos genes (p53). Ad5: indica que dicha línea celular está transformada con el ADN del adenovirus tipo 5.

3.1.2. Animales de experimentación.

Para los experimentos “*in vivo*” de formación de tumores, se utilizaron ratones desnudos inmunodeprimidos *nu/nu* hembras de 6 semanas (Harlan Ibérica, Barcelona).

Como son ratones inmunodeprimidos el mantenimiento y manipulación se realizó en condiciones de completa esterilidad bajo supervisión del personal especializado y siguiendo lo recomendado por la normativa vigente.

3.2. Plásmidos

Los distintos plásmidos utilizados en los diferentes experimentos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2. Plásmidos.

Nombre	Características	Procedencia
pENTRTM/H1/TO/shRNA	Plásmido intermedio en la obtención del plásmido lentiviral de expresión del shRNA.	Plásmido inicial invitrogen. Plásmido de expresión del shRNA obtenido en el laboratorio.
pLenti6/TR	Plásmido lentiviral de expresión del represor de tetraciclina (TR).	Invitrogen.
pLenti4/BLOCK-itTM-DEST/shRNA	Plásmido lentiviral de expresión del shRNA correspondiente.	Plásmido inicial de invitrogen. Plásmido de expresión del shRNA obtenido en el laboratorio por recombinación con el pENTR TM /H1/TO/shRNA.
pSRα MSV tk-neo	Plásmido de expresión. Vector vacío.	Dr. C.T. Denny (UCLA, LA).
pSRα dF EF	Plásmido de expresión de EWS/FLI1 nativo.	Dr. C.T. Denny (UCLA, LA).
pSRα EF Δ65	Plásmido de expresión de EWS/FLI1 mutado. EWS/FLI1 tiene deletionados los sitios ETS de unión a ADN.	Dr. C.T. Denny (UCLA, LA).
pSRα EF triple mutante	Plásmido de expresión de EWS/FLI1 mutado. EWS/FLI1 tiene 3 mutaciones en el dominio de unión a ADN.	Dr. C.T. Denny (UCLA, LA).
pCI neo	Plásmido de expresión. Vector vacío.	Promega.
pCI EWS/FLI1	Plásmido de expresión de EWS/FLI1 nativo.	Plásmido clonado en el laboratorio.
pCI FLI1	Plásmido de expresión de FLI1 nativo.	Plásmido clonado en el laboratorio.
pSG5	Plásmido de expresión. Vector vacío.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pSVDAX1	Plásmido de expresión de DAX1 nativo.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pSVDAX1 R267P	Plásmido de expresión de DAX1 mutado. Mutación de cambio de un aminoácido en el dominio C-terminal.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4M polly II	Vector de expresión del dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-470	Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-451	Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (le faltan los 19 últimos aminoácidos) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-466	Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (le faltan los 4 últimos aminoácidos) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-470 A257F	Plásmido de expresión. Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (cambio de un aminoácido en la posición 257) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-470 A258F	Plásmido de expresión. Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (cambio de un aminoácido en la posición 258) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.

Nombre	Características	Procedencia
pG4D 207-470 V309F	Plásmido de expresión. Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (cambio de un aminoácido en la posición 309) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-470 A360F	Plásmido de expresión. Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (cambio de un aminoácido en la posición 360) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pG4D 207-470 V443F	Plásmido de expresión. Vector que expresa el dominio C-terminal de DAX1 mutado (cambio de un aminoácido en la posición 443) fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pGL2 basic	Vector reportero con el gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pGL2 DAX1	Vector reportero que contiene 1,3 Kb del promotor de DAX1 upstream del gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pGL2 DAX1 Nde I	Vector reportero que contiene 500 b del promotor de DAX1 upstream del gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pGL2 DAX1 Sac I	Vector reportero que contiene 225 b del promotor de DAX1 upstream del gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pGL2 DAX1 BssH II	Vector reportero que contiene 60 b del promotor de DAX1 upstream del gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pBLCAT3	Vector reportero con el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pDAX1 prom CAT	Vector reportero que contiene 1,6 Kb del promotor de DAX1 upstream del gen CAT.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
p5x17 mer-tk-luc	Vector reportero que contiene sitio pentamérico de unión de GAL4 clonado <i>upstream</i> del promotor de la timidita kinasa y del gen de la luciferasa.	Cedido por el Dr. E. Lalli.
pSV β Gal	Vector reportero de expresión de β -galactosidasa.	Promega.

3.3. Establecimiento de líneas de Ewing con expresión inducible de shRNA.

Para la creación de un sistema que regule de forma controlada la expresión de shARNs en líneas de Ewing se utilizó el protocolo *BLOCK-iTTM* de Invitrogen. De esta forma se utiliza el represor de tetraciclina (TR) para controlar la expresión de los ARNs de interferencia correspondientes. Estos shRNAs están clonados en un vector cuya expresión está controlada por el promotor H1 humano que tiene insertadas dos copias de TeTO₂ (*tetracycline operator 2*).

Lo primero que se hizo fue establecer dos líneas celulares de Ewing (A673 y SKPNDW) que expresasen de forma estable y a niveles adecuados el TR. Para lo cual dichas líneas se infectaron con lentivirus portadores del vector de expresión pLenti6/TR, que codifica para la expresión del TR. Se seleccionó con Blasticidina (5 μ g/ml), se aislaron clones y el que mayor expresión de TR presentaba, es el que se utilizó para establecer las líneas celulares con expresión inducible de los distintos shRNAs.

Para la clonación de los ARNs de interferencia en los vectores adecuados y su posterior infección en las líneas de Ewing que expresasen establemente el TR, lo primero que se hizo fue diseñar oligonucleótidos complementarios para construir los shRNAs específicos de DAX1 (gen que hemos visto que está regulado por EWS/FLI-1), de la región de fusión EWS/FLI1 y

otro de la región de FLI1 con el *software BLOCK-iTTM RNAi designer* (Invitrogen, <https://rnaidesigner.invitrogen.com>). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue: shDAX60 F 5'- CAC CAC ATG CTT ATG AGC GCG AAG CGA GAG CTT CGC GCT CAT AAG CAT G -3'; shDAX60 R 5'- AAA ACA TGC TTA TGA GCG CGA AGC TCT CGC TTC GCG CTC ATA AGC ATG T -3'; shDAX807 F 5'- CAC CGC TGC GCT TCG TCA AGT ACT TCG AAA AGT ACT TGA CGA AGC GCA GC -3'; shDAX807 R 5'- AAA AGC TGC GCT TCG TCA AGT ACT TTT CGA AGT ACT TGA CGA AGC GCA GC -3' shDAX1320 F 5'- CAC CGA GAT TCA TCA ATG CCA ATG TCG AAA CAT TGG CAT TGA TGA ATC TC -3'; shDAX1320 R 5'- AAA AGA GAT TCA ATG CCA ATG TTT CGA CAT TGG CAT TGA TGA ATC TC -3'; shEF F 5'- CAC CGC AGC AGA ACC CTT CTT ATG ACG AAT CAT AAG AAG GGT TCT GCT GC -3'; shEF R 5'- AAA AGC AGC AGA ACC CTT CTT ATG ATT CGT CAT AAG AAG GGT TCT GCT GC -3'; shFLI1 F 5'- CAC CGG GCA CAA ACG ATC AGT AAG ACG AAT CTT ACT GAT CGT TTG TGC CC -3'; shFLI1 R 5'- AAA AGG GCA CAA ACG ATC AGT AAG ATT CGT CTT ACT GAT CGT TTG TGC CC -3'; shGFP F 5'- CAC CGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TCG AAA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC -3'; shGFP R 5'- AAA AGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TTT CGA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC -3'.

Para el alineamiento de los oligonucleótidos, se diluyeron a 50 μ M en tampón de alineamiento, se calentaron en un baño de agua durante 4 minutos a 95 °C y se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Estos oligonucleótidos se volvieron a diluir y se ligaron al vector pENTRTM/H1/TO (Invitrogen). Los vectores correspondientes se transformaron en bacterias competentes de *E. coli* One Shot TOP10 con 3 μ l de la reacción. Las colonias positivas se seleccionaron por ser resistentes a kanamicina (50 μ g/ml), posteriormente se purificaron los correspondientes plásmidos pENTRTM/H1/TO/shRNAs, y se secuenciaron con los cebadores suministrados en el kit de clonaje (H1 *forward* y M13 *reverse*) para confirmar la identidad de la secuencia (*BLOCK-iTTM Inducible H1 RNAi Entry Vector kit*, Invitrogen).

Para poder infectar nuestras líneas celulares con los correspondientes vectores lentivirales, se transfirió el fragmento H1/shRNA clonado en pENTRTM/H1/TO al vector pLenti4/BLOCK-iTTM-DEST mediante una reacción de recombinación. Esta reacción se preparó con 30 ng de pENTRTM/H1/TO/shRNA, 150 ng de pLenti4/BLOCK-iTTM-DEST y 2 μ l de la mezcla de enzimas LR clonase en un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó una hora y media a 25°C, tras los cuales se añadió 1 μ l de solución de proteinasa K y se incubó 10 minutos adicionales a 37°C. 2 μ l de esta reacción se utilizaron para transformar bacterias competentes de *E. coli* One Shot Stbl3, se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina

(100 µg/ml), se purificó el plásmido pLenti4/BLOCK-iTTM-DEST-shARN, confirmando su identidad mediante secuenciación.

Estos vectores lentivirales se utilizaron para la creación de virus portadores de los shRNAs correspondientes. Para lo cual se utilizaron células 293 FT (Invitrogen) que se transformaron con lipofectamina 2000. Para la transformación se preparó una mezcla compuesta por 9 µg de plásmidos empaquetadores (*ViraPower Packaging Mix*, Invitrogen) y 3 µg del vector de interés (pLenti6/TR, pLenti4/BLOCK-iTTM-DEST-shDAX60, -shDAX807, -shDAX1320 -shEF, -shFLI1 y -shGFP), diluidos en 1,5 ml de medio de cultivo OptiMEM I sin suero. En otro tubo se añadió 36 µl de lipofectamina 2000 a 1,5 ml de medio OptiMEM I sin suero. Ambos tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron y se mantuvieron otros 20 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon 10 millones de células 293FT (Invitrogen) en 5 ml de medio OptiMEM I con suero al 10 % y se adicionaron a una placa de cultivo P100. A esta placa se le añadió 5 ml de medio OptiMEM I con suero y la mezcla de plásmidos y lipofectamina. La placa se incubó toda la noche a 37°C y al día siguiente se cambió el medio por DMEM suplementado con 10% de suero y 0.1% de aminoácidos no esenciales para mejorar la formación de virus. A las 48 horas se recogió el sobrenadante con virus, se pasó por un filtro de 0,45 µm, se alicuotó y se congeló rápidamente en nieve carbónica, conservándose a -80°C hasta el momento de su empleo. Para las infecciones, las células se sembraron a 150000 células en placas de 6 pocillos, y tras 48 horas se incubaron con 1 ml de sobrenadante viral en presencia de 1 µg/ml de polibrina durante 24 horas. Tras esta incubación se eliminó el medio y se añadió medio fresco suplementado con 10 % de suero fetal bovino libre de análogos de tetraciclina. A las 48 horas se volvió a añadir medio fresco con el antibiótico adecuado (blastidina a 5 µg/ml para las células infectadas con pLenti6/TR, o zeocina a 100 µg/ml para las infectadas con pLenti4/BLOCK-iTTM-DEST-shDAX60, -shDAX807, -shDAX1320, -shEF, -shFLI1 y -shGFP). El título de infección de cada preparación lentiviral se calculó a partir del recuento de las colonias tras 21 días de incubación con el correspondiente antibiótico de selección. Todas las manipulaciones con lentivirus se llevaron a cabo en las instalaciones de nivel de bioseguridad 2 (BL2), exclusivamente por personal autorizado.

Tras la selección de las líneas infectadas con los correspondientes shRNAs se aislaron cultivos policlonales y clones independientes. Para inducir la expresión de los shRNAs (y en consecuencia el silenciamiento del ARNm correspondiente), las células A673/TR/shRNAs y SK-PN-DW/TR/shRNAs se incubaron con doxiciclina (1 µg/ml) durante periodos variables de tiempo en función de los experimentos. Los niveles del ARNm de los genes de interés silenciados, se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa y western blot.

3.4. Estudios para ver si DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1.

3.4.1. Transfección transitoria de 293 con EWS/FLI1, distintos mutantes de dicha translocación y FLI1.

Se sembraron 500000 células en placas p60, se dejaron crecer y se transfectaron a las 48 horas. El método utilizado fue la lipofectamina de invitrogen. Se siguieron las instrucciones del protocolo. Se puso 4,4 µg de ADN (vectores de expresión pSRα MSV tk-neo, vector vacío, pSRα dF EF, expresión de EWS/FLI1 nativo, pSRα EF Δ65, mutante de delección de los sitios ETS del dominio de unión a ADN de EWS/FLI1, pSRα EF triple mutante, contiene tres mutaciones puntuales en el dominio de unión a ADN de EWS/FLI1 y pCI FLI1, con expresión de FLI1 nativo) y 16 µl de lipofectamina por placa. Se diluyó el ADN en 300 µl de medio Opti-MEM sin suero, se mezcló y se dejó 5 min. Lo mismo hicimos con la lipofectamina. Tras los 5 minutos se combinó el ADN y la lipofectamina y se dejó unos 20 minutos a RT. Se cambió el medio de cultivo a las células y se repuso por un volumen de 2,4 ml, y se añadió la mezcla anterior. Se dejó 6 horas tras las cuales se cambió el medio y se mantuvo 48 horas creciendo. Tras la incubación se extrajo proteína para su posterior estudio.

3.4.2.1. Estudios de transactivación del promotor de DAX1 con mutantes de delección.

Como en el caso anterior se utilizaron células 293. En este caso se utilizó el lípido catiónico JET PEI (Poly plus transfection). Se siguieron las recomendaciones de la casa comercial. Se transfectaron 2 µg de ADN por pocillo. En una proporción 2:1 vector expresión: vector reportero. Los vectores utilizados en este caso fueron:

Vectores de expresión; pCI neo, pCI EWS/FLI1 y pCI FLI1. Los vectores reporteros: pGL2basic, pGL2-DAX1, pGL2-DAX1 NdeI, pGL2-DAX1 SacI y pGL2-DAX1 BssHIII. El pGL2-DAX1 contiene un fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1, el resto de los vectores contiene un fragmento de dicho promotor cada vez más pequeños.

También se transfectaron 20 ng de vector pSV-βGal por pocillo, que nos sirve para ver la eficacia de la transfección.

A las 48 horas de sembrar las células se transfectaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras cambiar el medio se incubaron 48 horas y se lisaron las células con un tampón comercial (promega), se midió actividad luciferasa y β-galactosidasa en el luminómetro (Berthold-Biolumat; LUMAT LB 9507). Se siguieron las instrucciones de uso del fabricante en ambos casos.

3.4.2.2. Estudios de la actividad promotora de DAX1.

La línea celular utilizada fue la 293. Estos experimentos se realizaron en placas de 6 pocillos. 48 horas antes de la transfección se sembraron 200000 células por pocillo. Cada situación se hizo por triplicado. La transfección se realizó con el lípido catiónico lipofectamina 2000 de invitrogen y 1,6 µg de ADN por pocillo. Se utilizaron las instrucciones del protocolo para transfectar como en el punto 3.4.1.

En las distintas situaciones se co-transfetaron distintos vectores. Las distintas proporciones fueron: 1 µg de vector de expresión: 0,3 µg de vector reportero para medir actividad luciferasa: 0,3 µg de vector reportero para medir actividad CAT (cloranfenicol acetiltransferasa). También se transfectó 20 ng del vector pSV-βGal por pocillo.

Los vectores de expresión utilizados fueron: pSRα MSV tk-neo, pSRα dF EF, pSRα EF Δ65, pSRα EF triple mutante y pCI FLI1. Los vectores reporteros utilizados para medir la actividad luciferasa fueron: pGL2basic y pGL2-DAX que contiene un fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX-1 en posición *upstream* del gen de la luciferasa. Los vectores utilizados para medir actividad CAT fueron: pBLCAT3 y pDAX1 prom CAT que contiene 1,6 Kb del promotor de DAX1, clonado *upstream* del gen de la cloranfenicol acetiltransferasa.

El pSV-βGal contiene el gen de la β-galactosidasa y se utilizó como control interno de la eficacia de transfección.

A las 48 horas de la transfección, las células se lisaron en un tampón comercial (promega) y se midieron las distintas actividades.

En el caso de la luciferasa y la β-galactosidasa se utilizó el luminómetro (Berthold-Biolumat; LUMAT LB 9507). Se siguieron las instrucciones de uso del fabricante en ambos casos.

En el caso de la actividad cloranfenicol acetiltransferasa se utilizó el *kit CAT ELISA* (Roche-applied-science). Se siguieron las instrucciones del protocolo y se midió en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices).

3.4.3. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP).

Se sembraron en placas p150 células A673/TR/shEF y A673/TR/shGFP, se crecieron durante 3 días con o sin doxiciclina a 1 µg/ml para inhibir la expresión de EWS/FLI1. Un total de unos 40 millones de células se fijaron en formaldehído al 1% durante 10 min, se incubó 5 minutos adicionales con glicina 2,5 M en una dilución 1/20 en volumen. Posteriormente se lavó dos veces con PBS y tres veces más con buffer L (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, IGEPAL 0.5 %, PMSF 1 mM). Tras lo cual el pellet celular se resuspendió en buffer pre-IP (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 1 mM, IGEPAL 4 %, SDS 0.01 %, NaCl 0.27 M), suplementado con inhibidores de proteasas (tabletas completas; Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). Se sonicaron en hielo para obtener fragmentos de cromatina de unos 100-200 pb (Bioruptor 200, Diagenode, Bélgica). Tras centrifugar, los sobrenadantes se limpiaron con camas de proteína A-sefarosa (Amershan Biosciences, Piscataway, NJ) durante 30 min a 4°C. Se centrifugó otra vez para eliminar las camas de sefarosa y se incubó con el buffer IP (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1 %, NaCl 150 mM, inhibidores de proteasas) que contiene 15 µg de anticuerpo anti-FLI1 C-19 o un anticuerpo no específico IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology), toda la noche a 4°C. Posteriormente las camas de A-sefarosa se añaden a las muestras para inmunoprecipitar los complejos. El inmunoprecipitado se lava dos veces con buffer 1 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1 %, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM), una vez con buffer 2 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1 %, SDS 0.1 %, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM), una vez con buffer 3 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, Lic. 0.25 M, IGEPAL 0.5 %, deoxicolate de sodio 0.5 %) y dos veces con el buffer Tris-EDTA. Los complejos de cromatina se separan de las camas de sefarosa incubando con buffer de elución (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 0.5 %) durante 30 min a 65°C. Finalmente los complejos ADN-Proteína se incubaron con proteinasa K (1 mg/ml) toda la noche a 65°C.

Se purificó el ADN con el kit de *invisorb* (invitek). La concentración de ADN se midió en el nanodrop quedando a unos 10 ng/µl. El ADN se amplificó usando unos cebadores específicos del promotor de DAX1 (cebadores de la región rica en GGAA); DAX1-PF1 (5'-CCTCTCACAGGCAGAATGAAAT-3') y DAX1-PR3 (5'-TATACCAGCTGATACAGAA TCATT-3'). Las condiciones de la PCR fueron: 2 min de desnaturalización a 95°C seguidos de 40 ciclos con 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C para el alineamiento y 30 seg a 72°C para la extensión. Finalmente se dejó 5 min a 72°C.

3.5. Estudios de la región rica en GGAA del promotor de DAX1.

Para el estudio de la región rica en GGAA del promotor de DAX1 se utilizó ADN de tumores de Ewing y ADN de las líneas celulares de dicho sarcoma. El ADN de las líneas se obtuvo de 1 millón de células y utilizando un kit comercial (*QIAquick purification kit*, Qiagen) y el ADN de los tumores se obtuvo de tumores de Ewing que llegaron a nuestro laboratorio para su diagnóstico, el ADN de los tumores se estajo también con el kit comercial ya mencionado. Este ADN se amplificó con un primer marcado en 6-FAM necesario para un análisis posterior. Los cebadores utilizados eran los específicos de la región rica en GGAA del promotor de DAX1. DAX1-PF1 (5'-CCTCTCACAGGCAGAATGAAAT-3') y DAX1-PR3 (5'-TATACCAGCTGATACAGAA TCATT-3'). El cebador DAX1-PF1 es el que está marcado en 5'-6-FAM. De esta forma la PCR utilizada para amplificar el ADN de esta región fue: primero una desnaturalización previa a 95°C 2 min seguida de 40 ciclos con 30 seg a 95°C, 30 seg a 59°C para el alineamiento, 30 seg a 72°C para la expansión y un paso final a 72°C durante 5 min. Se comprobó la PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 3%. En una dilución 1/20 se llevó a analizar los fragmentos de ADN para saber el número exacto de pares de bases en cada caso. El análisis posterior se hizo con el programa informático *Peak Scanner Software v1.0* (Applied Biosystems). De esta forma obtuvimos el número exacto de pares de bases de cada caso.

3.6. Estudios celulares.

3.6.1. Ensayos de proliferación celular.

3.6.1.1. Cristal violeta.

Para los estudios de crecimiento celular en las células A673 TR shDAX1, shEF y shFLI1, se sembraron 15000 células/pocillo en placas de 6 pocillos respectivamente. Las células utilizadas fueron los clones con mayor inhibición de los genes correspondientes. En el caso de las A673/TR/shDAX1 se utilizaron los clones 11 y 13, en las A673 shEF el clon 18. En el caso del shARN de FLI1 no se obtuvieron buenos clones y no se utilizaron para los estudios de proliferación. En el caso de las SKPNDW/TR los clones utilizados fueron: shDAX1 clon 5 y para el shFLI1 (shRNA para la translocación que dio mejor resultado en estas células) el clon 14.

Las células se sembraron y se dejaron 2 días para su completa adhesión, se añadió el estímulo correspondiente, doxiciclina a 1µg/ml. El medio con el estímulo se cambió cada 2 o 3 días. La tasa de crecimiento se midió a los 0, 2, 4 y 6 días.

Se cuantificó el crecimiento celular siguiendo un protocolo de tinción con cristal violeta (Flick and Gifford 1984) con algunas modificaciones. Se quitó el medio y se añadió glutaraldehído al 1% durante 10 minutos, se lavó con agua 2 veces y se dejó secar. Posteriormente se tiñó con una solución de cristal violeta al 0.1% en agua destilada (v/v) durante 10 minutos en agitación. Se lavó dos veces con agua y se secó. El colorante absorbido se liberó con ácido acético al 10 % (v/v). Finalmente, se tomó una alícuota de 100 μ l y se midió la absorbancia a 450 y 600 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices).

3.6.1.2. BrdU.

También se midió la proliferación mediante la incorporación de BrdU con un kit comercial (Roche). Esta forma de medir proliferación se utilizó tanto en las A673/TR/shRNA como en las SKPNDW/TR/shRNA. En este caso se sembraron unas 10000 células en placas de 24 pocillos, cada situación se hizo por cuadruplicado. Se dejaron 48 horas tras sembrarlas y luego se incubaron 3 días con o sin doxiciclina en el caso de las A673/TR/shRNA y 6 días en el caso de las SKPNDW/TR/shRNA. En este ensayo también se utilizaron los clones con mayor inhibición del gen correspondiente. Tras el tratamiento con doxiciclina las células se incubaron 2 horas con BrdU a una concentración de 10 μ M. Finalizada la incubación, se aspiró el medio y se fijaron las células durante 30 min con el buffer del kit correspondiente. Posteriormente se incubaron durante 1 hora y media con el anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. A continuación, se eliminó el anticuerpo y se lavaron los pocillos 3 veces con solución de lavado. Por último, se incubó con la solución sustrato (tetrametil bencidina) durante 5-10 minutos y se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices).

3.6.2. Estudios de citometría de flujo.

Para ver las distintas fases del ciclo celular se utilizó la citometría de flujo, para lo cual se tiñeron las células con IPr (yoduro de propidio). Se sembraron los clones de mayor inhibición en el caso de las A673, en placas p100. Se incubaron con doxiciclina entre 48 y 72 horas y se trataron para medirlas en el citómetro.

Las células adheridas se recogieron por tripsinización y se juntaron con las células en suspensión. Después de lavar con PBS, se fijaron en etanol al 70% y se dejaron un mínimo de 1 hora a un máximo de 15 días a 4 °C. Finalmente se resuspendieron en una solución de RNasa (100 μ g/ml) e IPr (40 μ g/ml) en PBS y se incubaron 30 minutos en oscuridad a 37°C. Se analizaron aproximadamente 10000 células en G1 de cada línea celular en un citómetro

FACSCAN (BD Biosciences). Los datos se procesaron con el programa informático *WinMDI* v2.8.

3.6.3. Formación de focos de crecimiento en agar blando.

Se utilizaron placas p60 para los estudios de crecimiento independiente de anclaje. Estas placas se prepararon con una base de agar libre de endotoxinas (Sigma) al 0,5 % (p/v) en medio DMEM/Hepes 1x (Hepes a 15 mM) suplementado con suero fetal bovino 10 %, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), glutamina (4 mM), fungizona (3 µg/ml) y baycip (25 µg/ml). Esta preparación impide el anclaje de las células al fondo de la placa. Tras la solidificación del agar, se sembraron 50000 células por placa resuspendidas en 1,5 ml de agar al 0.3 % (p/v) en medio de cultivo DMEM suplementado con lo ya citado. Las células se incubaron a 37° C durante 4-5 semanas, añadiendo medio fresco cada 2 o 3 días (el medio correspondiente suplementado con 10% suero fetal bovino, antibióticos y los estímulos correspondientes). Se tomaron varias fotografías de las placas para luego poder cuantificarlas y calcular el área usando el programa *Analysis* (Olympus, Hamburg, Alemania). Finalmente se tiñeron con cristal violeta al 0,005% (p/v) y se fotografiaron.

3.7. Estudios *in vivo*. Formación de tumores en ratones.

En estos experimentos utilizamos ratones desnudos inmunodeprimidos *nu/nu* hembras de 6 semanas (Harlan Ibérica, Barcelona).

Se hicieron varios grupos para ver la importancia de EWS/FLI1 y de DAX1 en la formación de tumores. Se utilizaron las células A673/TR/shEF c18 y A673/TR/shDAX1 c11 y c13. Dichas células se contaron y se resuspendieron en PBS. Se inyectaron 5 millones de células en el flanco derecho de cada ratón. Desde la inyección de las células se controló la formación de tumores y se fue cambiando el agua de bebida cada 2-3 días. En los grupos adecuados se añadía doxiciclina a 1mg/ml. El tamaño de los tumores se midió utilizando la fórmula; $L \cdot A \cdot \pi / 6$ (donde L es el largo y A el ancho). La progresión tumoral se siguió durante un mes.

3.8. Estudios de la expresión génica.

3.8.1. Estudios de expresión mediante matrices de oligonucleótidos.

Se sembraron entre 250000 y 500000 células/placa p100 para el modelo de las células A673/TR/shDAX1, shEF y shGFP (utilizadas como control) y se dejaron 2 días para su adhesión antes de añadirle doxiciclina a 1 µg/ml. A los 3 días de estimular las células se extrajo ARN total con *TRI-REAGENT* (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial. La cantidad y pureza del ARN se determinaron mediante nanodrop y electroforesis en un Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Para obtener ADNc y ARNc biotinilado se utilizó un kit comercial (*Codelink Expression Assay Reagent Kit*, Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 µg de ARN a los que se añadieron una mezcla de ARNs bacterianos utilizados como controles de marcaje (araB/entF a 0,083 pg/µl, fixB/gnd a 0,28 pg/µl e hisB/leuB a 0,83 pg/µl) y 1 µl de cebadores oligo dT-T7 en un volumen final de 12 µl. Esta mezcla se incubó a 70°C 10 minutos, se enfrió en hielos, y se añadió 2 µl de 10x first strand buffer, 4 µl de dNTPs 5 mM, 1 µl de inhibidor de RNasas y 1 µl de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 µl, y se incubó 2 horas a 42 °C. Para la síntesis de la segunda hebra del ADNc, se añadió a la reacción anterior 10 µl de 10x second strand buffer, 4 µl de dNTPs 5 mM, 2 µl de mezcla de ADN polimerasas y 1 µl de RNasa H, y se incubó 2 horas a 16 °C. El ADNc de doble hebra se purificó con un kit comercial (*QIAquick purification kit*, Qiagen) y se concentró mediante un Speed-Vac a 50°C durante 1 hora y media.

Para obtener el ARNc se resuspendió el ADNc en una mezcla de 9,5 µl de agua y 4 µl de tampón de reacción 10x, a la que se añadió 4 µl de solución de ATP, GTP y CTP, 3 µl de solución de UTP, 7,5 µl de biotina-11-UTP 10 mM y 4 µl de mezcla de enzimas T7 10x. Se incubó 15 horas a 37°C y el ARNc marcado con biotina se purificó con un kit comercial (RNeasy, Qiagen). La cantidad y calidad del ARNc biotinilado se determinó mediante nanodrop y electroforesis en un Bioanalyzer 2100 (Agilent). Solamente se hibridaron a las matrices las muestras en las que el tamaño medio del ARNc sintetizado fue mayor de 500 pb.

Posteriormente, se diluyeron 10 µg de cada ARNc en tampón de fragmentación 5x hasta un volumen final de 25 µl y se incubaron 20 minutos a 94°C para fragmentar el ARNc. La mezcla se enfrió 5 minutos en hielo y se le añadió 78 µl de tampón de hibridación A y 130 µl de tampón de hibridación B, completando con agua destilada hasta un volumen final de 260 µl. La mezcla se agitó 5 segundos a máxima velocidad, se incubó 5 minutos a 90°C para desnaturalizar el ARNc y se volvió a enfriar durante 5 minutos en hielo. Por último, se cargó en

la cámara de la matriz y se incubó 20 horas a 37°C en un agitador orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific) a 300 rpm. Trascendido este tiempo se eliminó la muestra de la cámara de hibridación, y se colocaron las matrices en un contenedor con TNT 0.75x (TNT 1x = Tris HCl pH 7,6 100 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,05 %). A continuación, las matrices se incubaron sucesivamente 1 hora a 46°C en TNT 0,75x, 30 minutos a temperatura ambiente en Cy5-estreptavidina diluida 1/500 en solución TNB (Tris HCl pH 7,6 100 mM, NaCl 150 mM y NEN blocking reagent al 0,5 %), cuatro incubaciones de 5 minutos a temperatura ambiente en TNT 1x, y finalmente, dos incubaciones en 0,1xSSC/0,05 % Tween 20. Las matrices se secaron por centrifugación a 650g durante 3 minutos y se escanearon bajo las condiciones de longitud de onda a 635nm, PMT 600V, potencia del láser 100 %, posición de enfoque 0 µm y tamaño de píxel 5-10 µm (Axon GenePix 4000B).

Las imágenes obtenidas se analizaron con la aplicación informática *Codelink Expression Analysis Software v4.1*. Esta aplicación permite obtener en formato Excel los valores de intensidad crudos, los valores de fondo, la intensidad normalizada, una etiqueta con información sobre la calidad de cada *spot* (G=bueno, L=no significativamente diferente del fondo, C=contaminado, I=irregular, S=saturado), y las anotaciones asociadas a cada *spot*.

Para identificar genes regulados por EWS/FLI1 o por DAX1 analizamos el ARN aislado de tres clones obtenidos de la población policlonal que se estimularon 3 días con doxiciplina. Los genes encontrados estadísticamente significativos ($P < 0.001$, en *test T de student*) respecto al control (células con el shGFP) fueron considerados regulados por EWS/FLI1 o por DAX1.

Los datos *gene ontology* (GO) (componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos) se obtuvieron de los genes diferencialmente expresados usando el *Expression Analysis Systematic Explorer* (EASE, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/ease/ease.jsp>). Las diferencias significativas entre los porcentajes de GO se calcularon por el *test de Fischer*.

Gene Set Enrichment Analyses (GSEA; <http://www.broad.mit.edu/gsea/>; (Subramanian *et al.* 2005) se realizó usando un método público de *Biocarta* (www.biocarta.com). GSEA es un método que sirve para ver los genes que están muy representados ya sea por lo alto o por lo bajo de una lista previa (en este caso la lista de genes diferencialmente regulados por EWS/FLI1 o por DAX1 obtenidos por el *test T de student*). Las diferencias significativas se obtuvieron usando un test permutacional (1000 permutaciones). Las clases de genes se consideraron significativamente enriquecidos (EWS/FLI1 o DAX1 frente a GFP) cuando $FDR < 0.25$, seguido de un test de corrección múltiple no paramétrico Kolmogorov-Smirnoff.

3.8.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Lo primero que se hizo fue obtener el ADNc para la posterior PCR, para lo cual se hizo una RT. En esta RT se puso 1 µg de ARN, dNTPs 1 mM cada uno, DTT 10 mM, *random primers* 2,5 µM (Promega) y tampón de transcripción reversa 1x, todo en un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó a 70°C 10 minutos. Se enfrió en hielo y se le añadió el inhibidor de RNasas (RNasin, Promega) y transcriptasa reversa MMLV (invitrogen) para que quedaran a 2 U/µl y 10 U/µl respectivamente. Esta reacción se puso en el termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. Como RT negativa se utilizaron muestras donde no se añadieron las enzimas finales.

Para la PCR cuantitativa utilizamos sondas Taqman y sondas UTL.

La PCR cuantitativa convencional (usando sondas Taqman) se realizó con 80 ng de ADNc, dNTPs 800 µM, MgCl₂ 4 mM, 1µl solución cebadores/sonda Taqman (Applied Biosystems), 0,5 U Taq polimerasa (Biotools) y tampón de reacción 1x, en un volumen final de 20 µl. El programa utilizado fue: 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 50 segundos a 60°C. En todos los ensayos se amplificó en paralelo el ARNm del gen TBP (*TATA binding protein*), que se utilizó como referencia interna para la normalización de los niveles de expresión del resto de los genes. La PCR a tiempo real se llevaron a cabo en un aparato de PCR cuantitativa modelo RotorGene 2000 (Corbett Research). La secuencia de los cebadores y sondas Taqman son:

TBP-	Sonda Taqman	5' FAM-CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG-TAMRA 3'
	TBP-F2	5' GAACATCATGGATCAGAACAACAG 3'
	TBP-R2	5' ATT GGT GTTCTGAATAGGCTGTG 3'
EWS/FLI1-	Sonda Taqman	5' TET-AAC AGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA-TAMRA 3'
	EWS-F2	5' AGCCAAGCTCCAAGTCAATATAG 3'
	FLI1-R3	5' TCCTCTTCTGACTGAGTCATAAG 3'
DAX1 -	Sonda Taqman	5' TET-CATCAGTACCAAGGAGTACGCCTACCT-TAMRA 3'
	DAX-F3	5' TTTCTTTCCAAATGCTGGAGTCTGA 3'
	DAX-R2	5' GAATGTA CTTCACGCACTGCAGG 3'

Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron frente al control interno (TBP). Para cada muestra se obtuvo los datos Ct (*Cycle Threshold*, ciclo en el que los productos de PCR inician la fase exponencial de la amplificación), usando un programa específico (*RotorGene versión 6.0*). Para ver los niveles de expresión de un gen en dos muestras diferentes se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen 2001). Lo primero que hicimos fue calcular el ΔCt de la muestra que queremos analizar y del control usando la siguiente fórmula $\Delta Ct = Ct_{gen}$ muestra problema $- Ct_{TBP}$. Posteriormente se calculó el valor $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra problema} - \Delta Ct_{muestra control}$.

El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En el caso de las sondas UTL lo que se hizo fue extraer ARN de las muestras a analizar y de aquí obtener el cDNA a través de una RT, utilizada posteriormente para la PCR cuantitativa a tiempo real en placa.

Las sondas y los cebadores necesarios los obtuvimos de un programa específico de Roche (www.roche-applied.science.com *Genomic systems. Universal Probe Library for Human*). Los distintos *primers* y sondas UTL utilizados fueron los siguientes:

Tabla 3. Cebadores y sondas UTL utilizados en la PCR cuantitativa en placas.

Gen	Cebadores	Sonda UTL
TBP	F-5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTT- 3'	3
	R-5'-CTTCACACGCCAAGAAACAGT-3'	
CDK2	F-5'-CCTCCTGGGCTGCAAATA-3'	50
	R-5'-CAGAATCTCCAGGGAATAGGG-3'	
SKP2	F-5'- CTGTCTCAAGGGGTGATTGC-3'	44
	R-5'-TTCGATAGGTCCATGTGCTG-3'	
MCM10	F-5'-CATGAAGCCCAAGGATGG-3'	82
	R-5'-GACCTTCTGAGGATGATCGATAG-3'	
CDC6	F-5'-CCTGTTCTCCTCGTGTA AAAAGC-3'	45
	R-5'-GTGTTGCATAGGTTGTCATCG-3'	

Como en el caso anterior para cada muestra se obtuvo el dato CT, que se normalizo frente a su control interno TBP. De esta forma los datos obtenidos en esta PCR, los pudimos comparar con los datos obtenidos en la PCR convencional.

3.8.3. Western blot.

La extracción de proteína necesaria para esta técnica se hizo de varias formas:

- De los ensayos de transfección transitoria donde se midió actividad luciferasa o CAT, la proteína se obtuvo al lisar las células con un buffer comercial (promega o roche) y un posterior centrifugado para eliminar los restos celulares.

- Para obtener proteína total, las células se lavaron 2 veces con PBS, y se lisaron con solución RIPA suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 100 µg/µl, aprotinina 62 µg/ml, EDTA 1 mM). Se dejó 30 minutos en hielo y se centrifugó para eliminar restos celulares como en el caso anterior.

- Para la obtención de proteína citoplasmática y nuclear se utilizó un kit (*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, PIERCE Biotechnology), se siguieron las instrucciones del protocolo.

La concentración de proteína se midió en los tres casos igual por el método del ácido bicinónico (BCA, Pierce), en un lector de ELISA Versamax (Molecular Devices). Posteriormente se cargaron entre 5 y 20 µg de proteína en un gel de poliacrilamida vertical al 10% (acrilamida: bisacrilamida 37,5:1) y se realizó una electroforesis a 100 V. Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Pall) usando el método semiseco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell Instruction Manual*, Bio-Rad Laboratories (1988)) a un amperaje constante de 3 mA por cm². El bloqueo y los lavados de la membrana se hicieron en el tampón TTBS (TBS 1x (tampón salino con Tris 20mM, NaCl 136mM, pH 7,5) y Tween 20 0,5 %). Según el anticuerpo utilizado se bloqueó en leche desnatada al 5% o en BSA (Albumina de suero bovino) también al 5%. Los distintos anticuerpos utilizados y las diluciones utilizadas fueron: anti-FLI1 policlonal de conejo (1:250, Santa Cruz), anti-tubulina monoclonal de ratón (1:10000, Sigma), anti-SKP2 monoclonal de conejo (1:250, Cell Signalling), anti-Dax1 monoclonal de ratón clon 2F4 (1:1.000) y anti-Dax1 monoclonal de ratón 3E5 proporcionados por el Dr. Enzo Lalli del *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire*, y anti-TeT-R policlonal de conejo (1:1000, MoBiTec). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de ratón (1:5000, Santa Cruz) y anti-IgG de conejo (1:7500, Santa Cruz), acoplados todos estos a HRP (Peroxidasa de rábano picante). Tras la incubación con los anticuerpos, se hicieron 4 lavados de 15 minutos con TTBS 1x. Para la visualización de proteínas se utilizó el sistema de detección ECL (Amersham). Las películas fueron expuestas y se revelaron para posteriormente ser escaneadas. Para poder cuantificar proteína en los casos que fuera necesario, se utilizó el programa *ImageQuant5.0* (Amersham). Se aplicó la corrección de la media del fondo.

Las membranas se reutilizaron tras tratarlas con una solución compuesta por SDS 10% (p/v), β -mercaptoetanol 5 mM y Tris HCl 50 mM pH 6,8, durante 30 minutos a 65°C. Posteriormente se lavaron con agua y se incubaron de nuevo con TTBS 1x para poder utilizarlas con otros anticuerpos.

3.9. Expresión de DAX1 en un contexto celular distinto.

Transfectamos establemente las células de neuroblastoma IMR32 con distintos vectores de expresión. Sembramos 750000 células por placa p60. Los vectores de expresión utilizados fueron: pSG5 como vector vacío, pSVDAX1 vector de expresión del gen *DAX1* y un mutante de dicho gen, pSVDAX1 R267P que tiene altamente deteriorada su actividad represora transcripcional y tienen una alta localización citoplasmática. Una vez sembradas las células transfectamos 48 horas después con el lípido catiónico JET PEI (Polyplus transfection). La ratio N/P utilizado fue 8, utilizamos 4,4 μ g de ADN y 14,08 μ l de JET PEI por placa. Cada placa se transfectó con el vector de expresión correspondiente más pCI, vector utilizado para dar resistencia a G418 a las células transfectadas. Tras ocho horas se cambió el medio y se dejó que las células creciesen otras 48 horas cuando se añadió el medio con el agente seleccionante, G418 a 300 μ g/ml. Tras el tiempo necesario se comprobó la expresión de DAX1 en esta línea celular por western.

Estas líneas estables con expresión de DAX1 y su mutante se utilizaron para ensayos de proliferación con cristal violeta, siguiendo el protocolo de la sección 3.6.1.1, sembrando 100000 células por pocillo en este caso.

Para los estudios de expresión génica se extrajo ARN total con *TRI-REAGENT* (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Este ARN se utilizó para hacer PCR cuantitativa, siguiendo el protocolo para sondas UTL ya mencionado en la sección 3.8.2.

En el caso de la línea 293 realizamos transfección transitoria, sembramos 500000 células por placa p60. Los vectores de expresión utilizados fueron: pSG5 y pSVDAX1. Como en el caso anterior, una vez sembradas las células transfectamos 48 horas después con lipofectamina de invitrogen. Se siguieron las instrucciones del protocolo. Se transfectaron 4,4 μ g de ADN y 16 μ l de lipofectamina por placa. Se diluyó el ADN en 300 μ l de medio Opti-MEM sin suero, se mezcló y se dejó 5 min. Lo mismo hicimos con la lipofectamina. Tras los 5 min se combinó el ADN y la lipofectamina y se dejó unos 20 min a RT. Se cambió el medio de cultivo a las células y se repuso por un volumen de 2,4 ml, y se añadió la mezcla anterior. Se dejó 6 horas tras las cuales se cambió el medio y se mantuvo 48 horas creciendo. Tras la

incubación se extrajo ARN total con *TRI-REAGENT* (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Este ARN se utilizó para hacer PCR cuantitativa para sondas UTL, siguiendo el protocolo ya mencionado en la sección 3.8.2.

3.10. Papel represor de DAX1.

La línea celular utilizada en este caso fue SKNMC. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 350000 células/pocillo. Cada situación se realizó por triplicado. Tras 48 horas dichas células se transfectaron con el lípido catiónico JET PEI (Poly plus transfection). Se utilizó 1,8 µg de ADN y 5,76 µl de JET PEI por pocillo. La proporción utilizada fue 4:1, vector de expresión: vector reportero. En cada pocillo se añadió 20 ng de pSV-βGal, para ver la eficacia de la transfección a través de la actividad β-galactosidasa. Los vectores utilizados fueron: vectores de expresión; pG4M polyII (vector que expresa el dominio de unión a ADN de la proteína GAL4), pG4D 207-470 (contiene el dominio C-terminal de DAX1 fusionado al dominio de unión a ADN del GAL4) y distintos mutantes de este vector, pG4D 207-451 (le falta la hélice H12 de dicho dominio), pG4D 207-466 (le faltan los últimos 4 aminoácidos (aa)) y diversas mutaciones de cambio de aa como: pG4D 207-470 A257F, pG4D 207-470 A258F, pG4D 207-470 V309F, pG4D 207-470 A360F y pG4D 207-470 V443F. Como vector reportero usamos p5x17 mer-tk-luc (que contiene el sitio pentamérico de unión de GAL4 clonado *upstream* del promotor de la timidita kinasa y del gen de la luciferasa). Ocho horas después de la transfección se les cambió el medio a las células y se dejó crecer otras 48 horas más. Tras lo cual, se lisaron con un buffer comercial (promega) y se midió la actividad luciferasa y β-galactosidasa en el luminómetro (Berthold-Biolumat; LUMAT LB 9507), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante en ambos casos.

4. Resultados

4.1. Regulación de la expresión de DAX1 por EWS/FLI1.

4.1.1. Establecimiento de sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible contra EWS/FLI1 en células de Ewing.

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el silenciamiento de EWS/FLI1 mediante la transfección transitoria de un ARN de interferencia específico, inhibía la expresión de DAX1 en las células de Ewing A673, indicando que DAX1 era una diana de EWS/FLI1 en estas células (Mendiola et al. 2006). Sin embargo, este sistema de transfección transitoria de ARNs de interferencia resultó ser en la práctica poco útil, por lo que uno de nuestros primeros objetivos fue establecer una serie de sistemas celulares modelos de ARN de interferencia inducible en células de Ewing, que nos facilitarán el estudio del papel de DAX1 en estos tumores. Para ello se eligió el sistema lentiviral de ARN interferencia *HI inducible BLOCK-iTTM* de Invitrogen. En este sistema, la expresión de los shRNAs (*small hairpin RNAs*) puede ser controlada mediante la adición de doxiciclina (un análogo de la tetraciclina) al medio de cultivo. En ausencia de doxiciclina, el shRNA no es expresado y por tanto no se ven alterados los niveles de expresión del gen de interés. Por el contrario, al añadir doxiciclina al medio de cultivo, se induce la expresión del shRNA, lo que a su vez provoca una reducción en los niveles de ARNm de nuestro gen de interés.

En primer lugar infectamos dos líneas celulares de Ewing, A673 y SKPNDW, con lentivirus que contenían un vector de expresión del represor de la tetraciclina (pLenti6/TR). Después de la selección con el antibiótico correspondiente, se aisló, por cada tipo celular, un clon que expresaba los niveles más elevados del represor de la tetraciclina (TR). Estos clones, denominados A673/TR y SKPNDW/TR, fueron infectados a continuación con vectores de expresión que portaban los siguientes shRNAs: un shRNA específico para EWS/FLI1, localizado en la zona de fusión entre los genes *EWS* y *FLI1* (pLenti4/BLOCK-iT-DEST/shEF); un shRNA localizado en la región C-terminal de FLI1 ((pLenti4/BLOCK-iT-DEST/shFLI); y un shRNA dirigido contra el ARNm de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) utilizado como control (pLenti4/BLOCK-iT-DEST/shGFP) (Figura 5).

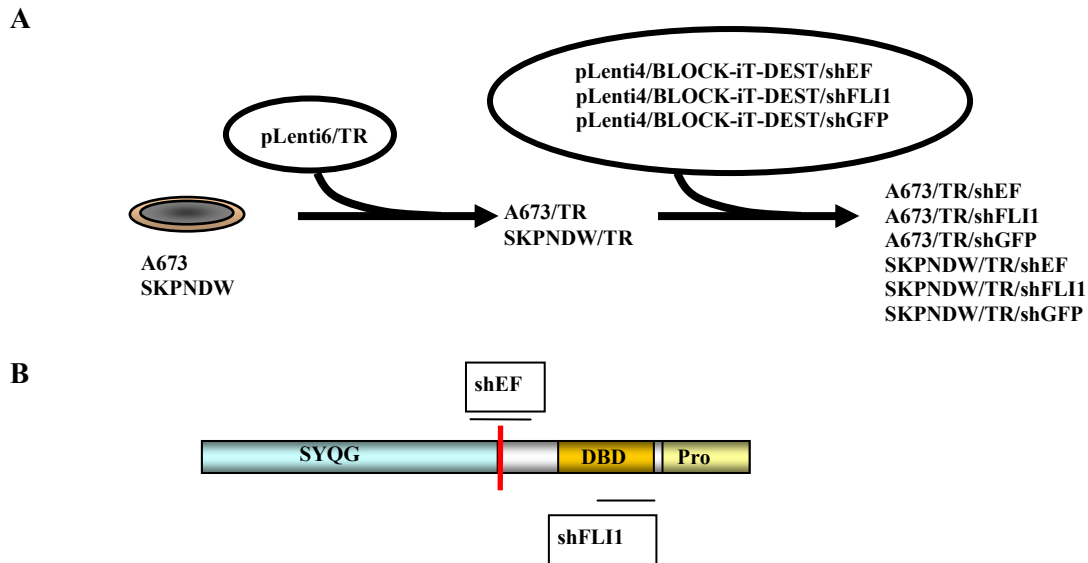


Figura 5. Sistema inducible de expresión de shRNAs dirigidos contra EWS/FLI1 en células de Ewing. **A)** Las líneas celulares de Ewing A673 y SKPNDW se infectaron en primer lugar con lentivirus que portaban el represor de la tetraciclina (TR). A continuación se seleccionaron los clones que expresaban los niveles más elevados de TR y se infectaron con lentivirus que portaban los vectores con los shRNAs de interés. El represor de tetraciclina impide la expresión del ARN de interferencia. Al añadir doxiciclina, un análogo de la tetraciclina, el represor deja de reprimir y se expresa el shRNA correspondiente. **B)** Localización de los ARNs de interferencias utilizados contra EWS/FLI1. Se utilizaron dos shRNAs diferentes. Uno dirigido contra la zona de fusión de los genes *EWS* y *FLI1* (shEF) y otro frente a la zona C-terminal de FLI1 (shFLI1).

Después de la selección con el antibiótico correspondiente, se seleccionó una población policlonal por cada una de las células y shRNAs utilizados. En la figura 6 se muestra el efecto de la adición de doxiciclina al medio de cultivo en estas poblaciones celulares. Como se puede observar, la adición de doxiciclina al medio de cultivo –lo que induce la expresión del correspondiente shRNA– provocó una disminución de los niveles del ARNm de EWS/FLI1 en ambas células de Ewing, aunque el grado de silenciamiento varió en función de la línea celular y la secuencia del ARN de interferencia utilizada (rango 62-95% de inhibición respecto a las células incubadas con vehículo).

Estas diferencias son probablemente una consecuencia de las diferentes preparaciones lentivirales utilizadas durante el establecimiento de estos modelos celulares. En la misma figura se puede observar el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre la expresión de DAX1 en ambas células de Ewing. En todos los casos, el silenciamiento de EWS/FLI1 provocó, en paralelo, una disminución significativa de los niveles de ARNm de DAX1. El efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre DAX1 fue, independientemente de la secuencia de shRNA utilizada, menos pronunciado en la línea celular SKPNDW. Esto puede ser debido a que los niveles de DAX1 observados en estas células son superiores a los observados en las células A673 (Mendiola et al. 2006). Todos los cambios observados en los niveles de expresión de los

ARNm de EWS/FLI1 y DAX1 tuvieron su correspondiente reflejo en los niveles de proteína (Figura 6B). Estos experimentos indican que la expresión de DAX1 es dependiente de EWS/FLI1 en células de Ewing.

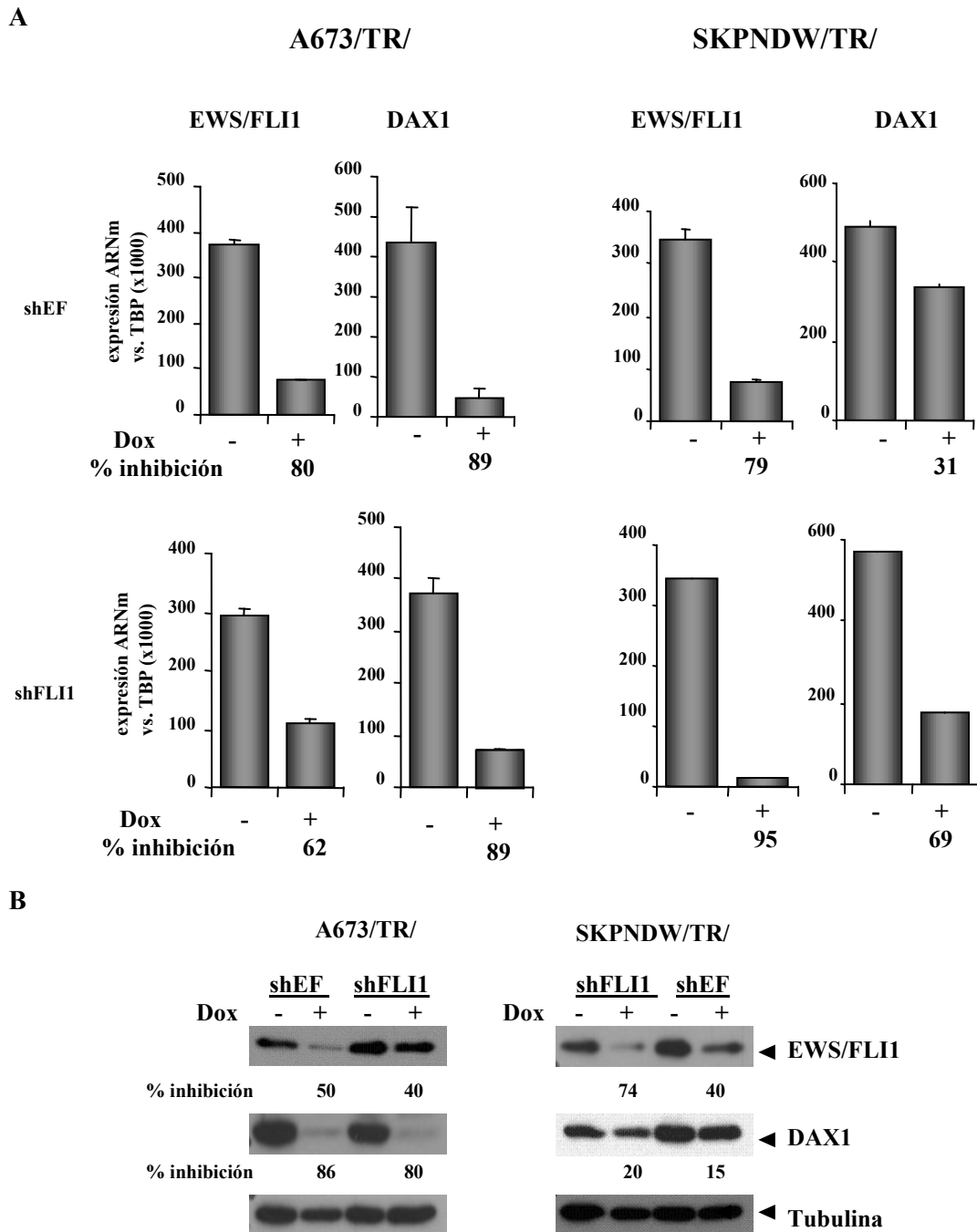
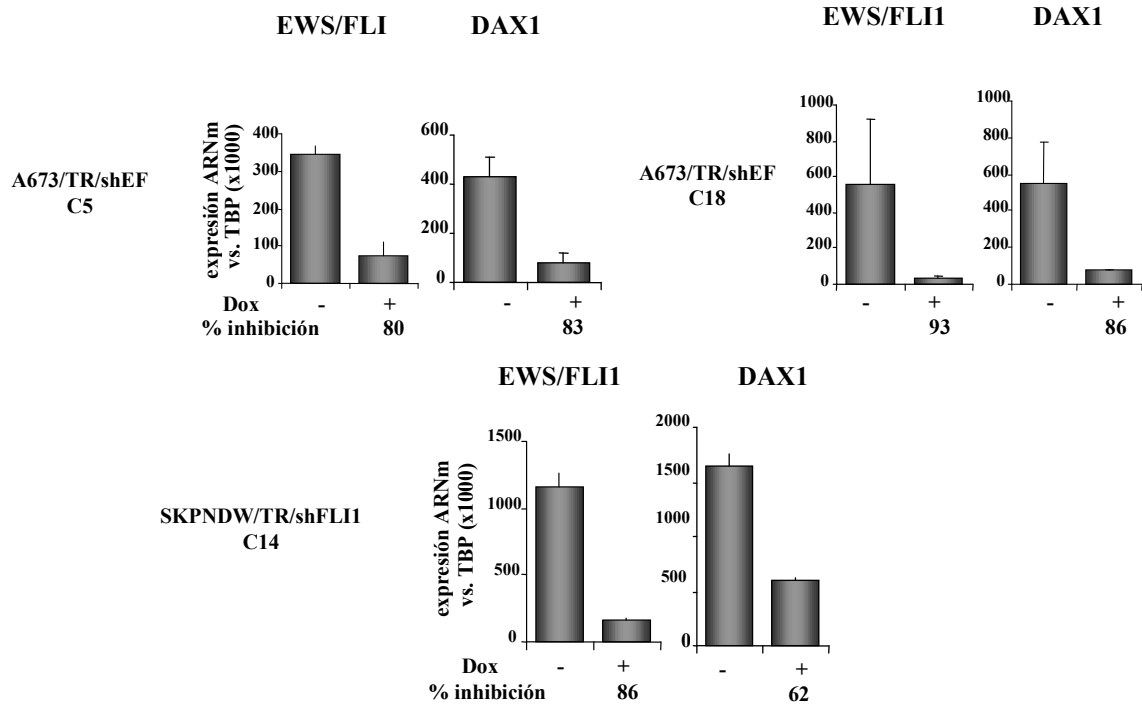


Figura 6. El silenciamiento de EWS/FLI1 en las líneas celulares de Ewing A673 y SKPNDW provoca una disminución de los niveles de DAX1 a nivel de ARNm y proteína. **A)** Los niveles del ARNm de EWS/FLI1 y DAX1 se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa en las poblaciones policlonales de las células A673 y SKPNDW con los diferentes shRNAs dirigidos contra EWS/FLI1. La inducción de los shRNAs específicos de EWS/FLI1 con doxicielina (Dox) redujo considerablemente los niveles del ARNm de EWS/FLI1 en ambas células. Como consecuencia del silenciamiento de EWS/FLI1, los niveles del ARNm de DAX1 se vieron también reducidos significativamente. Media \pm desviación estándar de dos experimentos por duplicado. **B)** Análisis de los niveles de las proteínas EWS/FLI1 y DAX1 mediante western-blot. La reducción en los niveles de los ARNm de EWS/FLI1 y DAX1 va acompañada de una disminución en los niveles de EWS/FLI1 y DAX1 a nivel de proteína.

Los porcentajes de inhibición, tanto para EWS/FLI1, como para DAX1, fueron mayores en las células A673/TR/shEF y SKPNDW/TR/shFLI1. A la vista de estos resultados se generaron clones de estas líneas celulares (Figura 7). Aquellos que presentaron los mayores niveles de silenciamiento, fueron los utilizados en los estudios posteriores.

A



B

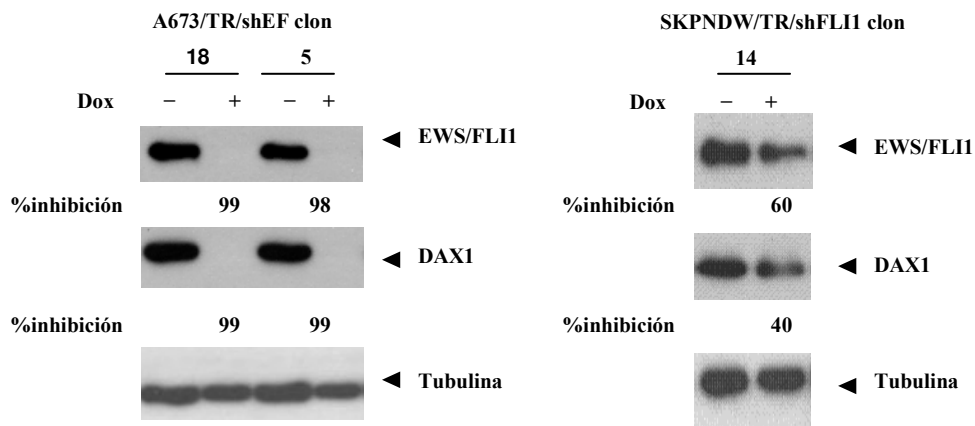


Figura 7. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre la expresión de DAX1 en los clones de células A673/TR/shEF y SKPNDW/TR/shFLI1. A) Cuantificación de los niveles de ARNm de EWS/FLI1 y DAX1 mediante RT-PCR cuantitativa. Media \pm desviación estándar de dos experimentos por duplicado. **B)** Determinación de los niveles de EWS/FLI1 y DAX1 a nivel de proteína mediante western-blot. El silenciamiento de EWS/FLI1 en las células A673/TR/shEF produce una disminución prácticamente total de EWS/FLI1 y DAX1. En el caso de las células SKPNDW/TR/shFLI1 la inhibición de EWS/FLI1 y DAX1 es cercana al 50%. Dox, doxiciolina.

4.1.2. DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1.

Aunque los resultados anteriores demuestran que la expresión de DAX1 es dependiente de EWS/FLI1 en las células de sarcoma de Ewing, A673 y SKPNDW, no nos permiten afirmar si DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1. Con el objetivo de determinar esta posibilidad realizamos los experimentos que se describen a continuación.

En primer lugar, analizamos si la inducción de DAX1 por EWS/FLI1 dependía de la capacidad de EWS/FLI1 para unirse al ADN. Para ello expresamos, mediante transfecciones transitorias en células 293, las proteínas EWS/FLI1 (pSR α dF EF) y FLI1 (pCI-FLI) nativas y dos mutantes de EWS/FLI1 que afectan a su capacidad de unión al ADN. Uno de los mutantes consiste en una delección de 65 aminoácidos que elimina el dominio ETS de unión al ADN (pSR α EF Δ 65) y el otro en tres mutaciones puntuales (R337N, R340N, Y341V) localizadas en dicho dominio (pSR α EF triple mutante). Ambas mutaciones eliminan la capacidad de EWS/FLI1 para unirse al ADN (Muller et al. 1991; Takebe et al. 1988; Welford et al. 2001). En la figura 8A se muestra un esquema de los diferentes vectores de expresión utilizados en estos experimentos.

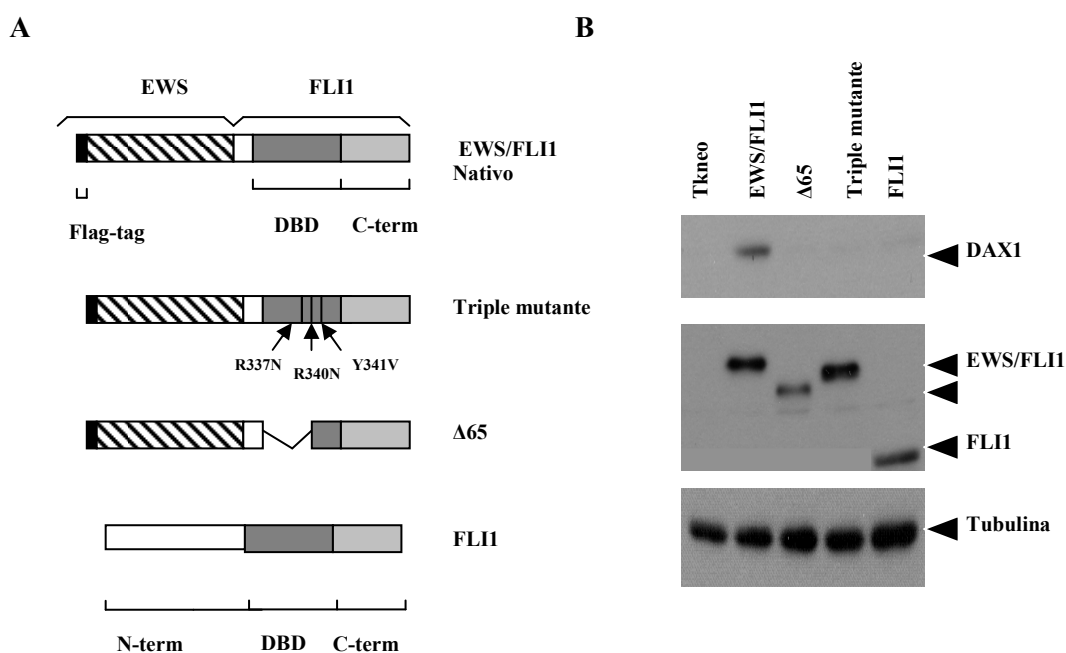


Figura 8. Efecto de diferentes mutantes funcionales de EWS/FLI1 sobre la expresión de DAX1 en células 293. **A)** Se muestra un esquema de los diferentes mutantes utilizados: un mutante con tres mutaciones puntuales en la región de unión al ADN de FLI1 (R337N, R340N, Y341V), denominado triple mutante, y otro mutante con una delección del dominio ETS de unión al ADN, denominado Δ 65. Estos mutantes tienen severamente alterada su capacidad de unión al ADN. Además de estos mutantes se utilizaron también las proteínas nativas EWS/FLI1 y FLI1. **B)** Western-blot mostrando el efecto de la sobreexpresión de las diferentes proteínas nativas y mutantes sobre la expresión de DAX1 en células 293. La expresión de DAX1 es únicamente inducida por EWS/FLI1 nativo.

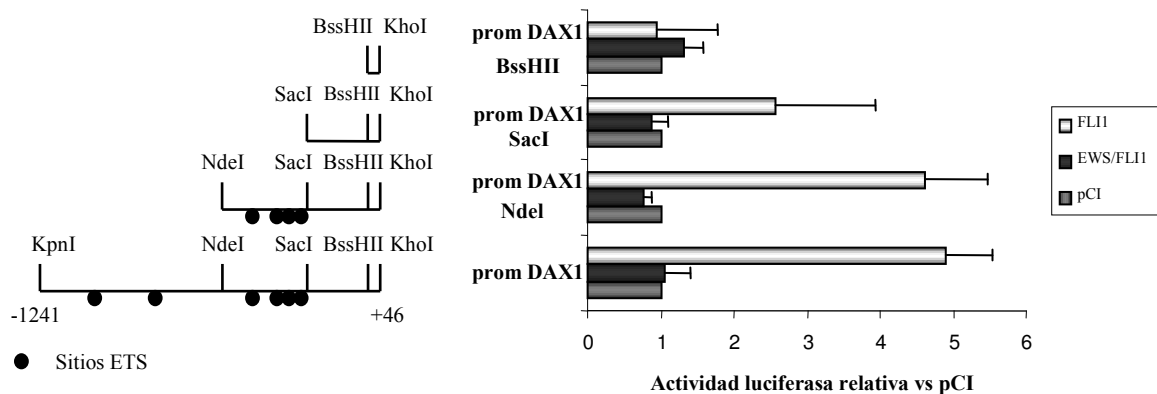
Como se muestra en la figura 8B, la expresión de EWS/FLI1 nativo en células 293 estimula la expresión de DAX1. Por el contrario, los dos mutantes de EWS/FLI1 que afectan a su capacidad de unión al ADN ($\Delta 65$ y triple mutante) son incapaces de estimular la expresión de DAX1. Este resultado indica que el dominio de unión a ADN de EWS/FLI1 es necesario para inducir la expresión de DAX1. Sorprendentemente, FLI1 nativo, el cual mantiene su dominio ETS de unión al ADN intacto, es también incapaz de estimular la expresión de DAX1 en células 293. Este resultado confirma experimentos previos de nuestro laboratorio, en los que se mostraba que FLI1 no estimulaba la expresión de DAX1 en células 293 y HeLa (Carrillo et al. 2007; Mendiola et al. 2006). Estos estudios indican que la actividad transcripcional de EWS/FLI1 es determinante para inducir la expresión de DAX1, pero no demuestran si DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1.

A continuación realizamos ensayos de transactivación del promotor de DAX1, como un primer paso para determinar si DAX1 era una diana transcripcional de EWS/FLI1. En primer lugar, utilizamos un vector reportero que contenía un fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1 (-1241/+46) clonado *upstream* del gen de la luciferasa de luciérnaga (pGL2*basic* vector). El análisis *in silico* (MatInspector, Genomatix) de este fragmento del promotor de DAX1 identificó varios sitios ETS putativos (GGAA/T), potencialmente reconocibles por el dominio ETS de unión al ADN de EWS/FLI1. En estos experimentos también empleamos fragmentos del promotor más pequeños, con el objeto de determinar las regiones y/o sitios de unión al ADN potencialmente implicados en la regulación del promotor de DAX1. En la figura 9 se muestran de forma esquemática los diferentes fragmentos utilizados y la localización de los sitios ETS putativos en el ADN.

Cada uno de los diferentes vectores reporteros se cotransfectó con los vectores de expresión para EWS/FLI1 y FLI1 nativo en células 293, con el objeto de analizar la capacidad de estas proteínas para transactivar los diferentes fragmentos del promotor de DAX1. Como se muestra en la figura 9A, FLI1 es capaz de transactivar el fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1, induciendo un incremento de 5 veces en la actividad luciferasa respecto a las células cotransfectadas con el vector de expresión vacío. El efecto de FLI1 sobre el promotor de DAX1 se mantiene con el fragmento limitado por la enzima de restricción NdeI, correspondiente a los nucleótidos -413/+46. Por el contrario, la capacidad transactivadora de FLI1 se reduce un 50% cuando se elimina el fragmento comprendido entre las dianas de restricción NdeI y SacI (nucleótidos -413/-132). Esta región contiene 4 sitios ETS putativos, y parece ser la más importante para la activación del promotor *in vitro* mediada por FLI1. Estos resultados indican que FLI1 es capaz de transactivar un fragmento del promotor de DAX1, probablemente a través de su unión a varios sitios ETS localizados en una región comprendida entre los nucleótidos -

413 y -132. Estos datos son aparentemente contradictorios con los descritos en el apartado anterior, ya que FLI1 es incapaz de estimular la expresión de DAX1 endógeno en células 293. Esto sugiere que la capacidad de FLI1 para activar un promotor sintético no parece ser suficiente para activar el promotor endógeno, probablemente debido a diferencias en la conformación del ADN o modificaciones epigenéticas.

A



B

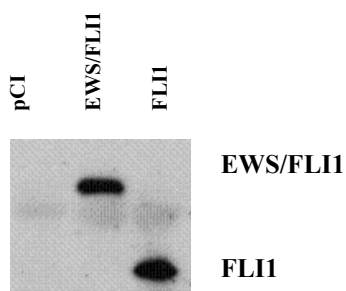


Figura 9. Capacidad de las proteínas nativas EWS/FLI1 y FLI1 para activar diferentes fragmentos del promotor de DAX1. A) Las células 293 se cotransfectaron con los vectores de expresión pCI, pCI EWS/FLI1 y pCI FLI1 y con diferentes vectores reporteros conteniendo diferentes fragmentos del promotor de DAX1, clonados *upstream* del gen de la luciferasa. EWS/FLI1 es incapaz de activar ninguno de los fragmentos del promotor de DAX1. Por el contrario, FLI1 es capaz de activar el fragmento de 1,3 Kb hasta 5 veces. Esta activación disminuye un 50% al eliminar un fragmento del promotor comprendido entre las dianas de restricción NdeI y SacI, donde se localizan 4 sitios ETS putativos. A la izquierda se muestra un esquema de los distintos fragmentos de promotor utilizados y la situación de los sitios ETS identificados *in silico*. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado B) Western-blot representativo mostrando que los niveles de expresión de EWS/FLI1 y FLI1 fueron similares en las células 293 transfectadas con estos vectores.

Sorprendentemente, EWS/FLI1 no fue capaz de activar el fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1 ni ninguno de los fragmentos más pequeños (Figura 9A). Las diferencias observadas entre EWS/FLI1 y FLI1 no pueden ser atribuidas a diferencias en sus niveles de expresión, ya que ambas proteínas se expresaron a niveles equivalentes, como se muestra en la figura 9B.

Estos resultados nos llevaron a valorar la posibilidad que en el fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1 no residiera la región responsable para su transactivación por EWS/FLI1. Por esta razón, diseñamos un nuevo experimento en el que utilizamos un vector reportero que contenía un fragmento de 1,6 Kb del promotor de DAX1 (-1595/+46) clonado *upstream* del gen de la cloranfenicol acetil transferasa (pDAX1 prom CAT). En estos experimentos cotransfectamos dos vectores reporteros, el vector que contenía el fragmento de 1,3 Kb (pGL2-DAX) y el que contenía el fragmento de 1,6 Kb (pDAX1 prom CAT). De esta forma se podían analizar ambas actividades en el mismo experimento y comparar directamente el efecto de EWS/FLI1 sobre ambos fragmentos del promotor de DAX1. En este caso, cotransfectamos dichos vectores reporteros con los vectores de expresión para EWS/FLI1, los dos mutantes de EWS/FLI1 que afectan al dominio de unión al ADN y FLI1 nativo.

Como se muestra en la figura 10, EWS/FLI1 nativo es capaz de transactivar el fragmento de 1,6 Kb del promotor de DAX1, incrementando los niveles del gen reportero *CAT* hasta 10 veces. Por el contrario, y en concordancia con los resultados anteriores (figura 9), EWS/FLI1 no activó el fragmento de 1,3 Kb del promotor de DAX1, manteniéndose inalterados los niveles de expresión del gen reportero luciferasa. Ninguno de los dos mutantes del dominio de unión al ADN de EWS/FLI1 activó el fragmento de 1,6 Kb del promotor de DAX1, indicando que la activación de dicho promotor es dependiente de la unión de EWS/FLI1 al ADN. FLI1 activó ambos fragmentos del promotor entre 3 y 4 veces confirmando los resultados anteriores y sugiriendo que diferentes regiones del promotor están implicadas en la activación del promotor de DAX1 por EWS/FLI1 y FLI1 *in vitro*. Todos estos resultados indican que DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1.

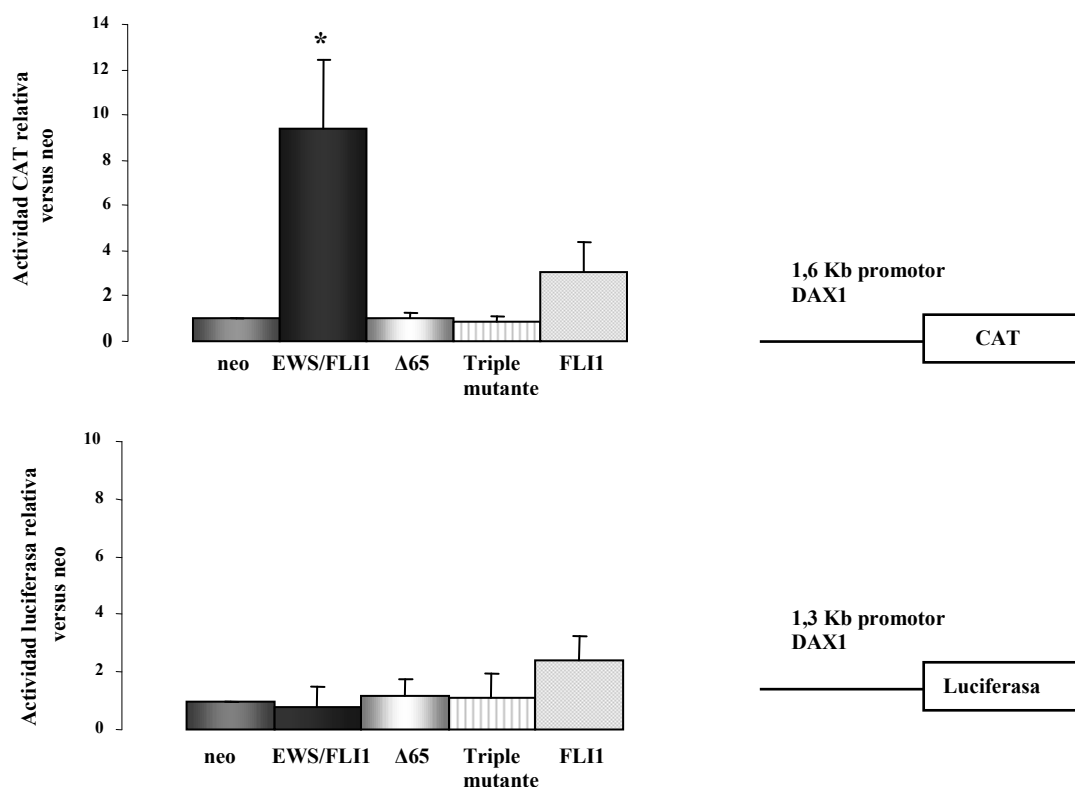


Figura 10. EWS/FLI1 es capaz de transactivar un fragmento de 1.6 Kb del promotor de DAX1. En estos experimentos se cotransfectaron los vectores reporteros pDAX1 prom CAT (que contiene un fragmento de 1,6 Kb del promotor de DAX1 clonado *upstream* del gen de la cloranfenicol acetil transferasa) y pGL2-DAX (que contiene un fragmento de 1,3 Kb clonado *upstream* del gen de la luciferasa), con uno de los vectores de expresión que contienen EWS/FLI1 nativo, los mutantes de EWS/FLI1 “triple mutante” y Δ65 o FLI1 nativo. En la gráfica superior se muestran los resultados obtenidos con el vector reportero pDAX1 prom CAT y en la inferior los obtenidos con el vector reportero pGL2-DAX. EWS/FLI1 nativo es capaz de activar aproximadamente 10 veces el vector que contiene el fragmento del promotor de 1,6 Kb, mientras que los dos mutantes funcionales de EWS/FLI1 (Δ65 y triple mutante) no tuvieron ningún efecto. De acuerdo con los resultados mostrados en la figura anterior, FLI1 fue capaz de activar moderadamente ambos fragmentos del promotor de DAX1, indicando que los elementos de respuesta a EWS/FLI1 y FLI1 se localizan en posiciones diferentes. Las gráficas muestran la media ± desviación estándar de tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0,02$ versus células transfectadas con el vector de expresión vacío (neo).

4.1.3. DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1 en células de Ewing.

De los experimentos anteriores se deduce que DAX1 es una diana transcripcional de EWS/FLI1: por un lado, se necesita un dominio ETS de unión al ADN funcional para inducir la expresión de DAX1, y por otro, existe una región en el promotor de DAX1, localizada entre los nucleótidos -1595 y -1241, susceptible de ser transactivada por EWS/FLI1. Sin embargo, estos resultados no nos permiten afirmar si EWS/FLI1 es capaz de interactuar directamente con el promotor de DAX1.

Con este fin, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), utilizando el sistema inducible de RNA de interferencia contra EWS/FLI1 que habíamos ya desarrollado en células de sarcoma de Ewing (apartado 4.1.1.). En estos experimentos, se cultivaron las células A673/TR/shEF en ausencia y presencia de doxiciclina durante 72 horas para inducir la expresión del shRNA específico dirigido contra EWS/FLI1, se obtuvieron los complejos ADN/proteína y se inmunoprecipitaron estos complejos con un anticuerpo anti-FLI1 o con una IgG irrelevante utilizada como control. Por último, se llevó a cabo una PCR sobre el ADN inmunoprecipitado utilizando un par de cebadores que delimitaban una región de aproximadamente 350 pb, correspondiente a la región necesaria para la activación del promotor de DAX1 *in vitro* (figura 11A).

A

```

-1680 GATTTAACCACTGTGCTATTTAGGGCCTCTCACAGGCAGAATGAAATTTAACGCTGCAAG
                                     DAX-PF >
-1620 CAAAATGGGGTCTCCTAGGTTTTCCTCTTATGCTGAGAATCCAGGTCCTGGAGAAGAA
-1560 GAAAAAGAGAAAAGAAAGAGAGAGAGAAGGAGTGAGAGAGGGAGGGAGGGAGGGGA
-1500 GGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGA
-1440 AAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGA
-1380 AAAGAAAGAGGGAGGATGGGAGGGAGGGAAAAAGTAAAAAATGATTCTGTATCAGCTGGTA
                                               < DAX-PR
-1320 TATACCAACACCCTTCCCTGCCCATGTCTTCACAGCTGTGTGGCAAGTGAA.....

```

B

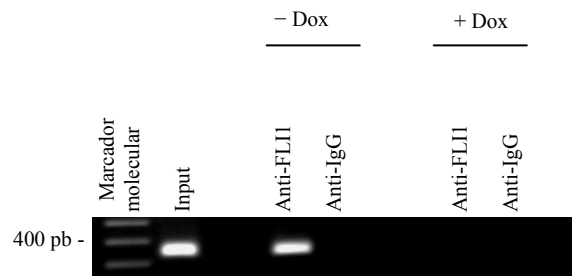


Figura 11. EWS/FLI1 interacciona directamente con el promotor de DAX1. A) Secuencia del promotor de DAX1 delimitada por los cebadores utilizados en los experimentos de ChIP. B) Las células A673/TR/shEF se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) y los complejos ADN/proteína se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico anti-FLI1 o con un anticuerpo irrelevante anti-IgG. A continuación, el ADN inmunoprecipitado fue amplificado mediante PCR utilizando los cebadores descritos anteriormente. La presencia de una banda de amplificación en células incubadas en ausencia de doxiciclina – y por tanto expresando elevados niveles de EWS/FLI1 – e inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico anti-FLI1, demuestra que EWS/FLI1 se une directamente al promotor de DAX1. No se observó producto de amplificación ni en las células tratadas con doxiciclina, en las que la expresión de EWS/FLI1 ha sido silenciada, ni en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo irrelevante.

Como se muestra en la figura 11B, la presencia de una banda de amplificación en las células cultivadas en ausencia de doxyciclina (y por tanto expresando elevados niveles de EWS/FLI1) e inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-FLI1, demuestra que EWS/FLI1 interacciona con esta región del promotor de DAX1. Por el contrario, no se detectó dicho producto de amplificación en las células cultivadas en presencia de doxyciclina y en las que por tanto EWS/FLI1 había sido silenciado. Tampoco se observaron productos de amplificación cuando ambas muestras fueron inmunoprecipitadas con una preparación de IgG inespecíficas, indicando que la proteína inmunoprecipitada fue específicamente EWS/FLI1. Estos resultados, junto con los estudios de transactivación del promotor, demuestran que EWS/FLI1 es capaz de unirse al promotor de DAX1 y activar su transcripción.

4.1.4. La región del promotor de DAX1 responsable de su activación por EWS/FLI1, es una región polimórfica que contiene múltiples motivos GGAA concatenados y su número correlaciona con los niveles de expresión de DAX1.

Un análisis de la secuencia del promotor de DAX1 comprendida entre los nucleótidos -1595 y -1241 (esto es, la región del promotor que responde a EWS/FLI1), reveló la existencia de múltiples repeticiones GGAA concatenadas, que coinciden con la secuencia consenso de unión al ADN de los factores de transcripción de la familia ETS (GGAA/T) (Guo et al. 1996).

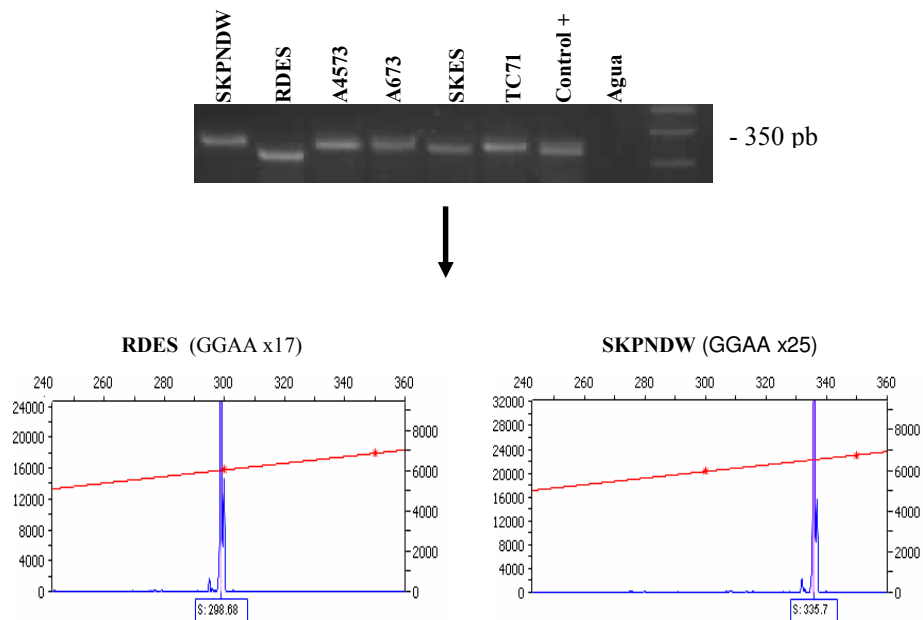


Figura 12. Análisis de la región polimórfica (microsatélite) del promotor de DAX1 rica en GGAA en líneas celulares de Ewing. El ADN genómico de distintas líneas de Ewing (n=6) se amplificó mediante PCR con los cebadores que delimitan la región polimórfica. En la parte superior de la figura se muestran los diferentes productos de amplificación obtenidos a partir de las líneas células de Ewing separados en un gel de agarosa. Estos fragmentos fueron sometidos a electroforesis capilar para la determinación de su tamaño exacto (parte inferior de la figura). Las células RDES tuvieron el microsatélite más pequeño (299 pb que correspondieron a 17 repeticiones GGAA) y las células SKPNDW el de mayor longitud (336 pb que correspondieron a 25 repeticiones GGAA).

Esta región rica en el motivo GGAA es una región polimórfica (microsatélite) (Guo et al. 1996). La configuración de esta región, formada por una concatamerización del motivo GGAA sugiere que varias moléculas de EWS/FLI1 pueden unirse a dicha secuencia, actuando de forma cooperativa. En este caso, uno debería esperar una correlación positiva entre el número de repeticiones del motivo GGAA y los niveles de expresión de DAX1. Para confirmar esta hipótesis analizamos el tamaño de esta secuencia polimórfica en varias líneas celulares de Ewing (n=6). Para ello amplificamos el ADN genómico de estas líneas celulares con los mismos cebadores utilizados en los experimentos de CHIP y determinamos el tamaño de los fragmentos amplificados mediante análisis de fragmentos fluorescentes (para lo cual, uno de los cebadores fue previamente marcado con un fluoróforo). Como se muestra en la figura 12, el tamaño de los productos de PCR varió entre las 299 pb de la línea celular RD-ES y las 336 pb de la línea celular SKPNDW. La secuenciación de los fragmentos de PCR nos permitió determinar que estos tamaños correspondían a 17 y 25 repeticiones GGAA, respectivamente.

En la figura 13 se muestra la relación existente entre el tamaño de la región polimórfica, es decir, el número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de DAX1 y los niveles del ARNm de DAX1 en las líneas celulares de Ewing. Ambos parámetros presentaron una correlación positiva ($r^2=0,87$) estadísticamente significativa ($p=0,0066$). Estos resultados sugieren que el número de repeticiones GGAA influye de manera significativa en los niveles del ARNm de DAX1 en células de Ewing. Así, a mayor número de repeticiones GGAA, los niveles de DAX1 son altos mientras que a menor número de repeticiones los niveles de expresión de DAX1 son bajos.

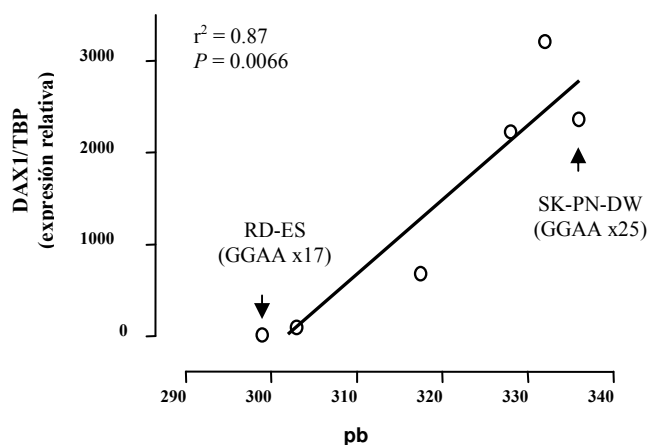


Figura 13. Los niveles de expresión de DAX1 en las líneas celulares de Ewing correlacionan con el número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de DAX1. En la figura se representa el tamaño de la región polimórfica del promotor de DAX1 (en pb) frente a los niveles de expresión del ARNm de DAX1 medidos por RT-PCR cuantitativa. Los datos indican que ambas variables correlacionan positivamente ($r^2=0,87$) de manera estadísticamente significativa ($p=0,0066$).

Los resultados mostrados hasta el momento nos permiten concluir que: i) EWS/FLI1 estimula la expresión de DAX1 en células de Ewing, ii) el dominio de unión al ADN de EWS/FLI1 es esencial para esta activación, iii) EWS/FLI1 es capaz de transactivar el promotor de DAX1 uniéndose a una región polimórfica del promotor de DAX1 caracterizada por la concatamerización de múltiples motivos GGAA y iv) el número de repeticiones GGAA presentes en esta región correlaciona significativamente con los niveles de DAX1 en células de Ewing. Todo ello, unido al hecho que los niveles de DAX1 son elevados en tumores de Ewing (Mendiola et al. 2006) sugieren que DAX1 pueda desempeñar un papel importante en la patogénesis de los tumores de la familia Ewing.

4.2. Papel oncogénico de DAX1 en los tumores de la familia Ewing.

4.2.1. Establecimiento de modelos de ARN de interferencia inducible contra DAX1.

Con el objeto de estudiar el papel de DAX1 en los tumores de Ewing, generamos un sistema inducible de expresión de ARNs de interferencia frente a DAX1 en células de Ewing, siguiendo el mismo esquema empleado para el establecimiento de los modelos de ARN de interferencia contra EWS/FLI1 (Figura 14A). En esta ocasión, las células A673/TR y SKPNDW/TR, que expresan elevados niveles del represor de tetraciclina (TR), se infectaron con lentivirus que contenían las secuencias de shRNAs diseñados contra DAX1. Se analizaron tres shRNAs diferentes localizados en diferentes regiones del ARNm de DAX1. shDAX60, localizado en la región N-terminal de DAX1, shDAX807 localizado en la parte inicial del dominio C-terminal de DAX1 y shDAX1320 situado en la zona final del dominio C-terminal de DAX1 (Figura 14B). De todos ellos, el que dio mejores resultados fue el localizado en la región final del dominio C-terminal de DAX1 (shDAX1320, en adelante shDAX1) y fue por tanto el utilizado en todos los estudios posteriores.

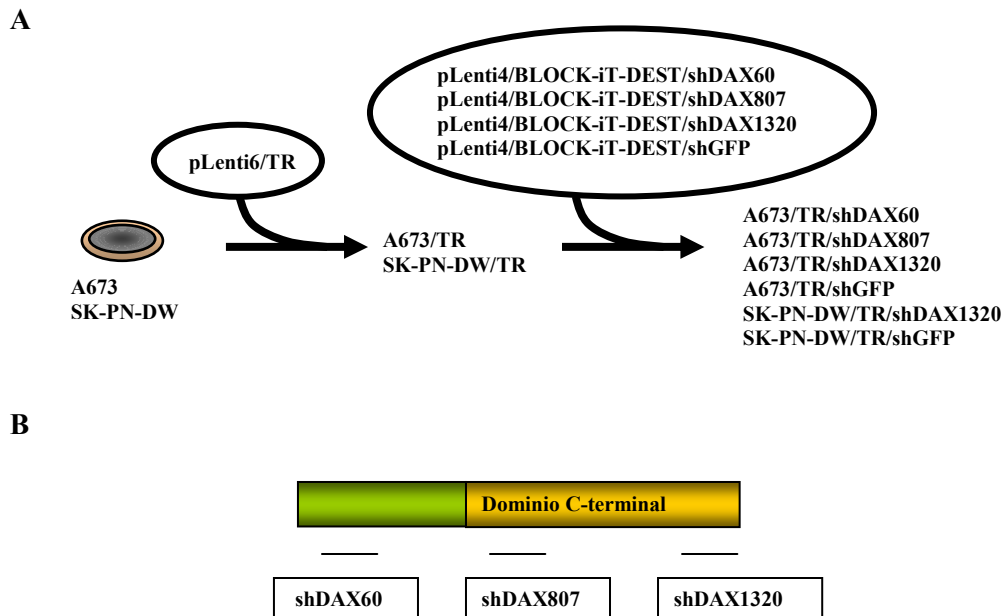


Figura 14. Sistema inducible de expresión de shRNAs dirigidos contra DAX1 en células de Ewing. A) Las líneas celulares de Ewing A673/TR y SKPNDW/TR, que expresan constitutivamente elevados niveles del represor de la tetraciclina (TR), se infectaron con lentivirus que portaban los vectores de expresión con los shRNAs de interés dirigidos contra DAX1. B) Localización de los ARNs de interferencias utilizados contra DAX1. Se utilizaron tres shRNAs diferentes. Los mayores niveles de silenciamiento se obtuvieron con shDAX1320.

De cada línea celular se obtuvieron, en primer lugar, poblaciones policlonales que fueron posteriormente utilizadas para la obtención de clones celulares. Los clones que presentaron mayores niveles de inhibición de DAX1 tras la estimulación de las células con doxiciclina fueron empleados en los estudios posteriores. En la figura 15 se muestran los resultados del silenciamiento de DAX1 a nivel de ARNm y proteína en varios clones de las células A673/TR/shDAX1 y SKPNDW/TR/shDAX1.

Los resultados obtenidos con las células A673/TR/shDAX1 fueron más llamativos, ya que el silenciamiento a nivel de ARNm y proteína fueron superiores al 90% y al 85%, respectivamente. Por el contrario, aunque también se obtuvieron niveles de silenciamiento aceptables en las células SKPNDW/TR/shDAX1, los resultados fueron menos llamativos que en el caso anterior, con porcentajes de inhibición del 70 y 50% a nivel de ARNm y proteína respectivamente. El menor grado de inhibición observado en las células SKPNDW especialmente en lo referente a los niveles de proteína, puede ser explicado por el hecho que estas células expresan mayores niveles de DAX1 (Mendiola et al. 2006).

Como era de esperar, la expresión del ARN de interferencia frente a DAX1 no tuvo efecto sobre los niveles de EWS/FLI1 en ambas líneas celulares. Por tanto, este modelo celular nos permitirá analizar el efecto específico de la inhibición de DAX1 sobre el fenotipo tumoral de las células de Ewing, sin alterar la expresión de EWS/FLI1. Como control se utilizaron las células A673/TR/shGFP y SKPNDW/TR/shGFP en las que no se observó ningún efecto sobre los niveles de EWS/FLI1 o DAX1.

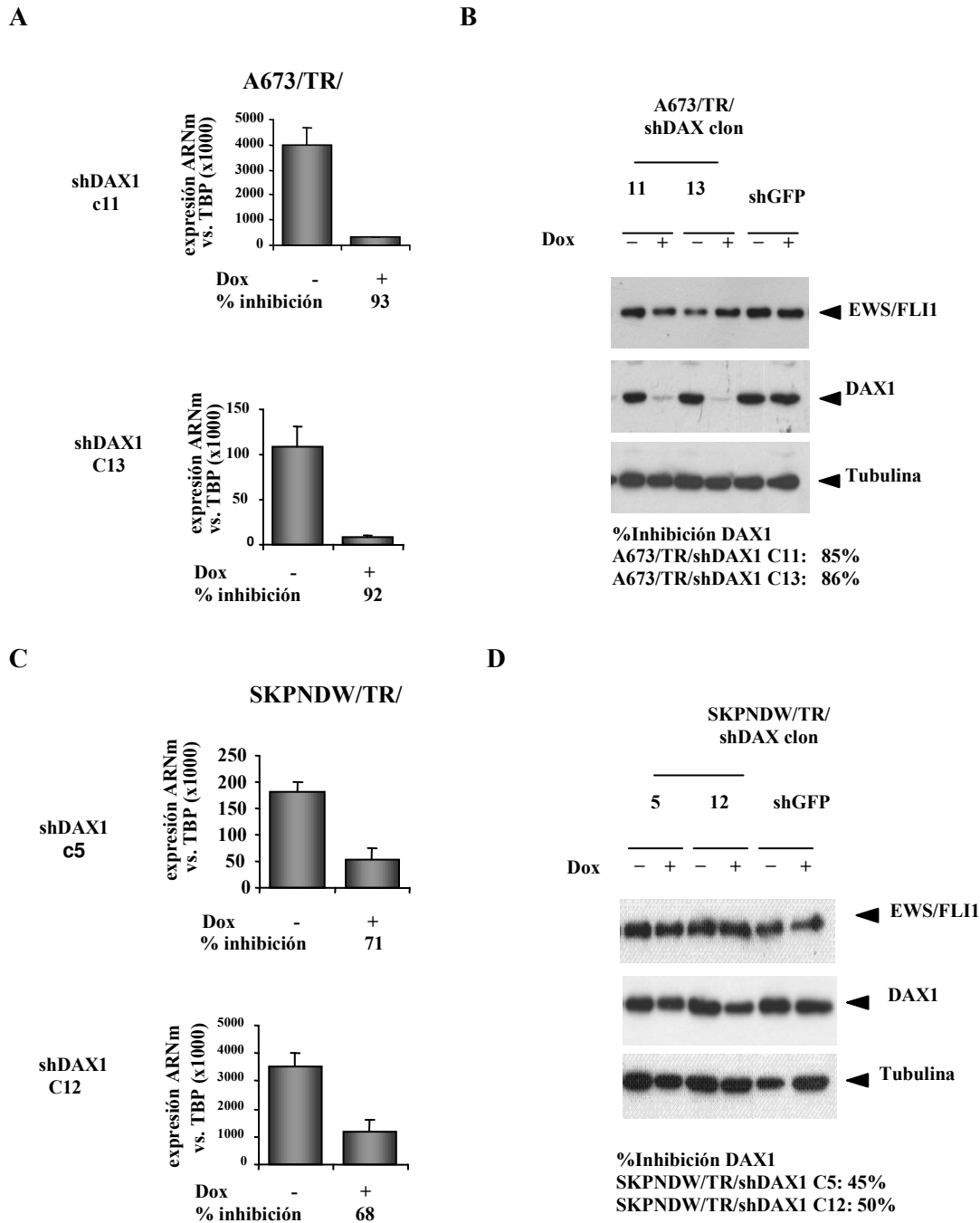
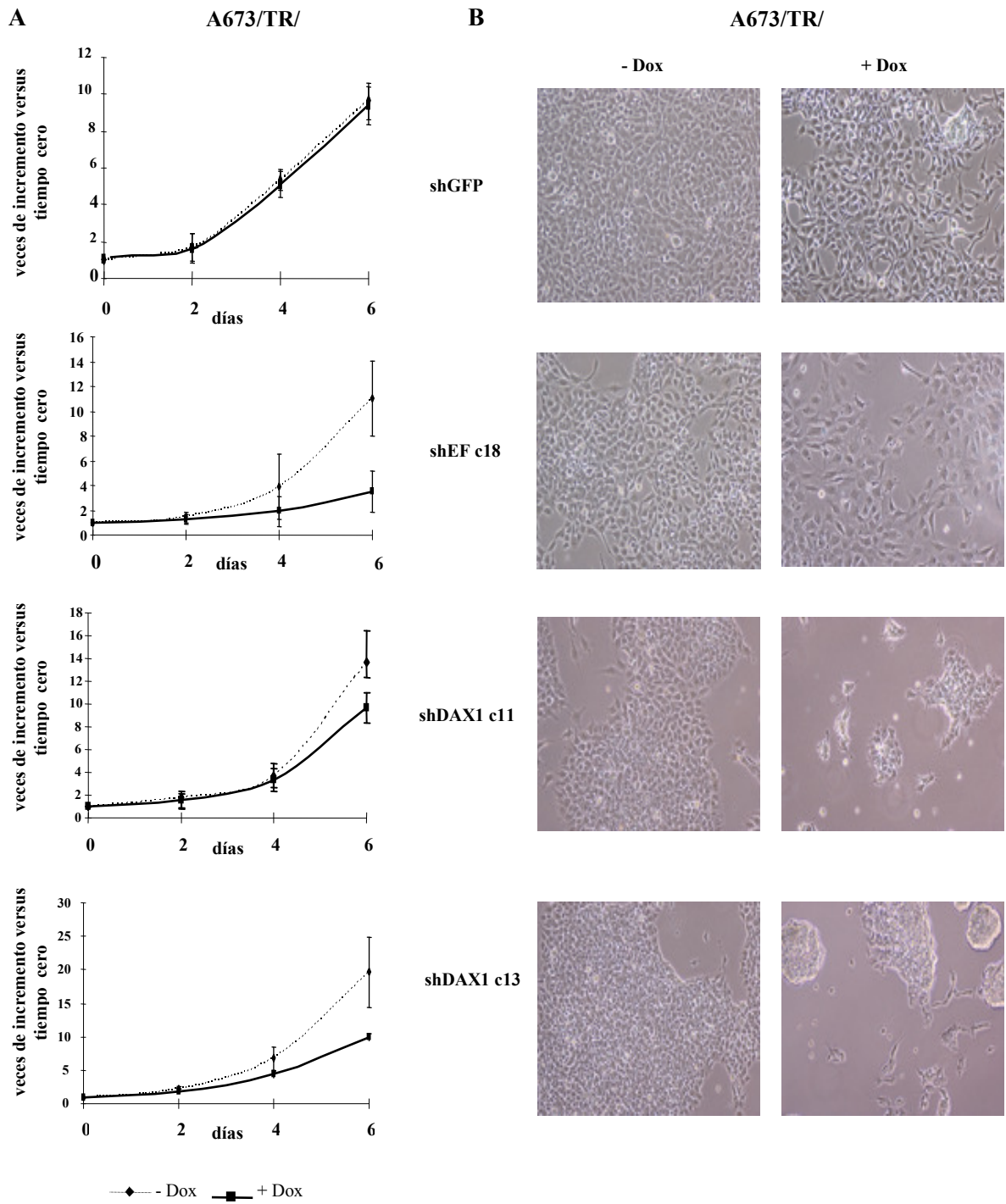


Figura 15. Efecto de la inducción del shRNA dirigido contra DAX1. A y C) Los niveles del ARNm de DAX1 se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa en clones derivados de las células A673/TR/shDAX (A) y SKPNDW/TR/shDAX (C). La inducción de los shRNAs específicos de DAX1 con doxiciclina (Dox) redujo considerablemente los niveles del ARNm de DAX1 en ambas células, y especialmente en las células A673. Media \pm desviación estándar de dos experimentos por duplicado. B y D) Análisis de los niveles de las proteínas EWS/FLI1 y DAX1 mediante western-blot. La reducción en los niveles del ARNm de DAX1 correlacionó con una disminución en los niveles de DAX1 a nivel de proteína en las células A673 (B) y SKPNDW (D). La eficiencia del silenciamiento resultó ser mayor en las células A673. En todos los casos, el silenciamiento de DAX1 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de EWS/FLI1. Las líneas celulares A673/TR/shGFP y SKPNDW/TR/shGFP fueron utilizadas como controles negativos.

4.2.2. El silenciamiento de DAX1 inhibe la proliferación de las células de Ewing.

Varios estudios han demostrado que la inhibición de EWS/FLI1 mediante diferentes estrategias (ADNc antisentido, oligonucleótidos antisentido y ARNs de interferencia) (Carrillo et al. 2007; Chansky et al. 2004; Kinsey et al. 2006; Prieur et al. 2004; Tanaka et al. 1997) afecta la proliferación de las células de Ewing. Por lo tanto, analizamos si el silenciamiento de DAX1 mediante nuestro sistema de ARN de interferencia inducible también afectaba al crecimiento celular de nuestras líneas celulares de Ewing, y lo comparamos al efecto producido por el silenciamiento de EWS/FLI1 en las mismas condiciones experimentales. Utilizamos dos técnicas para medir proliferación: análisis del crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta y la técnica de incorporación de BrdU al ADN. Los resultados obtenidos en ambos casos fueron similares.

En la figura 16 se muestran los resultados de los ensayos de proliferación en las células A673/TR/shEF c18, A673/TR/shDAX1 c11 y c13 y A673/TR/shGFP. Utilizando la técnica de cristal violeta, observamos que el silenciamiento de EWS/FLI1 durante 6 días, produjo una disminución en el crecimiento celular de un 70% respecto a las células incubadas en ausencia de doxyciclina. El silenciamiento de DAX1 produjo una inhibición del crecimiento que varió entre un 30% en el clon 11 a un 50% en el clon 13, respecto a las células cultivadas en ausencia de doxyciclina. Como era de esperar, la inducción del shRNA de la GFP en las células control A673/TR/shGFP no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento celular (Figura 16A). En la misma gráfica se muestran varias microfotografías tras 6 días de tratamiento con doxyciclina y en las que se puede observar como el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 va acompañado de una disminución en la densidad celular (Figura 16B). Estos resultados fueron independientemente validados en la línea celular de Ewing SKPNDW. Como se muestra en la figura 16C, el silenciamiento de EWS/FLI1 provocó una disminución del crecimiento el 80%, mientras que el silenciamiento de DAX1 redujo la proliferación en un 20%. Las microfotografías realizadas tras 6 días de tratamiento con doxyciclina confirman los resultados anteriores, observándose una disminución de la densidad celular tras el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 (Figura 16D).



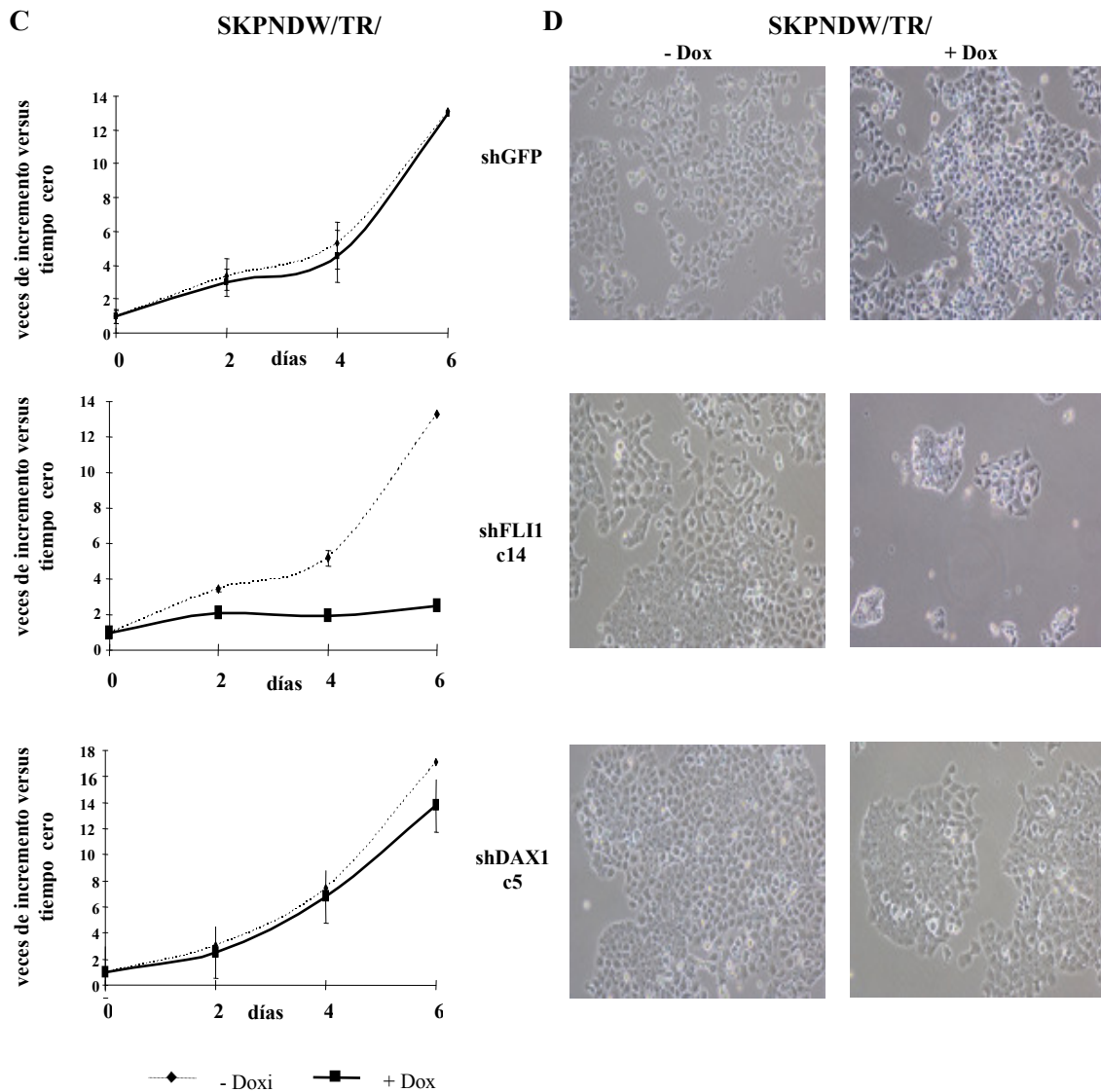


Figura 16. El silenciamiento de DAX1 inhibe el crecimiento celular. **A y C)** Las células A673 (**A**) y SKPNDW (**C**) con sus correspondientes shRNAs, se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) durante 6 días. El crecimiento celular se cuantificó mediante tinción con cristal violeta a 2, 4 y 6 días. El silenciamiento de EWS/FLI1 produjo una reducción del crecimiento entre el 70 y el 80%, mientras que el producido por el silenciamiento de DAX1 varió entre el 20 y el 50% en función del tipo celular y clon estudiado. Las células A673/TR/shGFP se utilizaron como control. Media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. **B y D)** Microfotografías de las células A673 (**B**) y SKPNDW (**D**) tras los 6 días de tratamiento.

El efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre el crecimiento celular fue confirmado adicionalmente mediante la técnica de incorporación de BrdU al ADN, la cual es una medida de la síntesis de ADN y por tanto de proliferación propiamente dicha. Como se puede observar en la figura 17A, el silenciamiento de EWS/FLI1 en las células A673 disminuyó la incorporación de BrdU un 50% respecto a las células incubadas en ausencia de doxiciclina, mientras que el silenciamiento de DAX1 produjo una inhibición que varió entre el 30 y el 40% en función del clon celular analizado. Como en los experimentos anteriores, la

inducción del ARN de interferencia frente a la GFP en las células control no tuvo efectos significativos sobre la tasa de proliferación. Resultados similares se obtuvieron en la línea celular SKPNDW (Figura 17B). Así, el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 disminuyeron la proliferación celular un 70% y un 30% respectivamente. En general, los resultados obtenidos con la línea celular SKPNDW tras el silenciamiento de DAX1 no fueron tan llamativos como los obtenidos con la línea celular A673, probablemente porque la eficiencia del silenciamiento fue menor en las células SKPNDW.

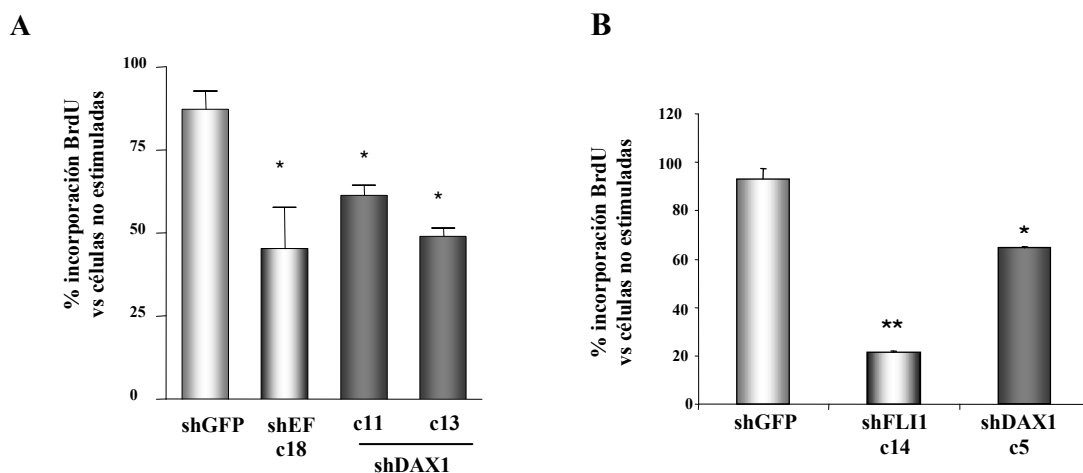


Figura 17. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre la proliferación celular. Las células A673 (A) y SKPNDW (B) con sus correspondientes shRNAs, se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) durante 72 horas y se cuantificó la incorporación de BrdU al ADN. Se muestran los porcentajes de inhibición en relación a las células incubadas en ausencia de doxiciclina. Media \pm desviación estándar de tres experimentos por cuadruplicado. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,001$ vs células control (shGFP).

Estos resultados confirman que la expresión de EWS/FLI1 es clave para la proliferación de las células de Ewing, tal y como se ha demostrado en otros estudios (Dohjima et al. 2003; Hu-Lieskovan et al. 2005; Prieur et al. 2004; Tanaka et al. 1997) y demuestran que al menos parte de los efectos que EWS/FLI1 tiene sobre la proliferación de estas células tumorales están mediados por DAX1.

4.2.3. El silenciamiento de DAX1 provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G1.

A continuación, realizamos estudios de citometría de flujo en la línea celular de Ewing A673 para determinar el efecto del silenciamiento de DAX1 sobre el ciclo celular. Como se muestra en la figura 18, el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 provocó un incremento significativo en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular (15% más de células en esta fase respecto a las células control). Estos resultados sugieren que el silenciamiento de

EWS/FLI1 y DAX1 en células de Ewing provoca una parada del ciclo celular y confirman los resultados de los experimentos anteriores, en los que se había observado una inhibición de la proliferación celular tras el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1. Estos resultados indican que DAX1 media una parte importante del efecto de EWS/FLI1 sobre el ciclo celular y que la expresión de DAX1 parece ser necesaria para la progresión del ciclo celular en células de Ewing.

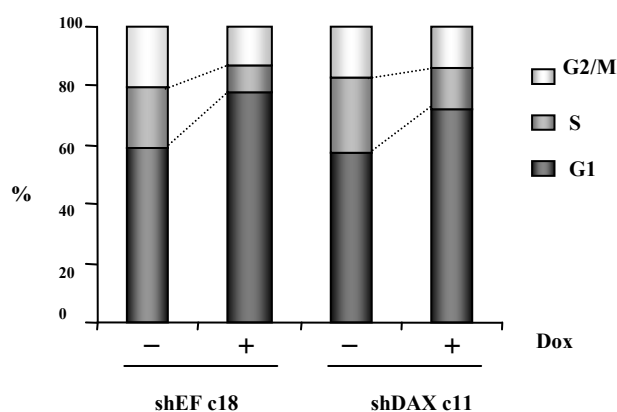


Figura 18. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre el ciclo celular. Las células A673/TR/shEF y A673/TR/shDAX1 se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (Dox) y se analizaron las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de cada una de las fases del ciclo celular. El silenciamiento de EWS/FLI1 y de DAX1 provoca una acumulación de células en la fase G1, aproximadamente un 15% más, respecto a las células incubadas en ausencia de doxiciclina. Media de dos experimentos independientes.

4.2.4. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y de DAX1 en la formación de focos de crecimiento en agar blando.

Varios estudios han demostrado que EWS/FLI1 tiene propiedades transformantes *in vitro* (May et al. 1993a; May et al. 1993b; Thompson et al. 1999; Welford et al. 2001; Yi et al. 1997). Por lo tanto, a continuación analizamos el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre la capacidad de las células de Ewing para formar colonias en medio semisólido, una propiedad característica de las células transformadas.

En la figura 19 se muestran los resultados de estos experimentos. El silenciamiento de EWS/FLI1 en la línea celular A673 provocó una reducción del 87% en el número de colonias creciendo en medio semisólido. Por el contrario, el silenciamiento de DAX1 no tuvo ningún efecto significativo sobre el número de colonias (Figura 19A). A la vista de este resultado, analizamos también el tamaño medio de las colonias. Como se puede observar en la figura 19B, tanto el silenciamiento de EWS/FLI1 como el de DAX1 produjeron una disminución del tamaño medio de las colonias. Este efecto fue mayor tras el silenciamiento de EWS/FLI1 (75%) que tras el silenciamiento de DAX1 (47%). Estos resultados sugieren que el

silenciamiento de EWS/FLI1 influye tanto sobre las propiedades transformantes de las células (capacidad para formar colonias en medio semisólido), como sobre su capacidad proliferativa (tamaño de las colonias), mientras que el silenciamiento de DAX1 solo influye sobre el potencial proliferativo de estas células.

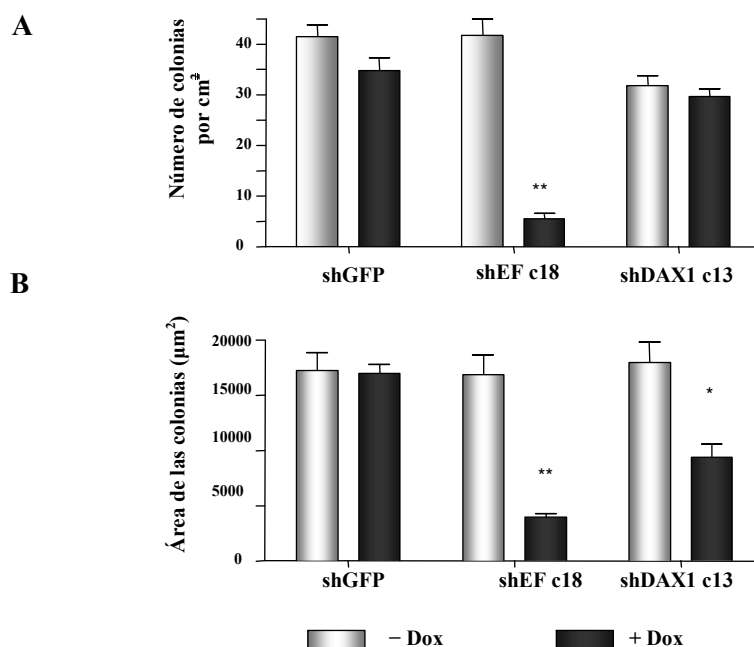


Figura 19. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre la formación de focos de crecimiento en agar blando. Las células A673/TR/shEF, shDAX1, y shGFP (control) se sembraron en placas de agar blando y se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina durante 20 días. Al final del periodo de incubación se cuantificó el número de colonias (A) y el área de las mismas (B). Media \pm desviación estándar de dos experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ respecto a las células incubadas en ausencia de doxiciclina.

4.2.5. El silenciamiento de DAX1 inhibe la formación de tumores *in vivo*.

Por último, analizamos el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre la capacidad de las células de Ewing A673 para formar tumores en ratones inmunodeprimidos (*nu/nu*). En estos experimentos, la inducción de los correspondientes ARNs de interferencia se realizó mediante la administración de doxiciclina a los animales en el agua de bebida.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 20. El silenciamiento de EWS/FLI1 provocó una inhibición del 100% en la formación de tumores. Ninguno de los animales inyectados con las células A673/TR/shEF c18, a los que se administró doxiciclina en el agua de bebida ($n=8$), desarrolló tumores visibles tras 25 días de tratamiento, mientras que todos los animales ($n=8$) mantenidos solo con agua desarrollaron tumores en el mismo periodo de tiempo. El silenciamiento de DAX1 produjo un efecto similar. Así, en uno de los clones

utilizados (A673/TR/shDAX1 c13), no se observaron tumores tras 25 días de tratamiento con doxiciclina (n=7), mientras que en otro de los clones celulares utilizados (A673/TR/shDAX1 c11), los tumores que aparecieron crecieron significativamente más lento que los tumores desarrollados en los animales mantenidos solo con agua. Estos resultados indican que tanto la expresión de EWS/FLI1 como la de DAX1 resultan ser esenciales para la formación de tumores de células de Ewing en ratones inmunodeprimidos.

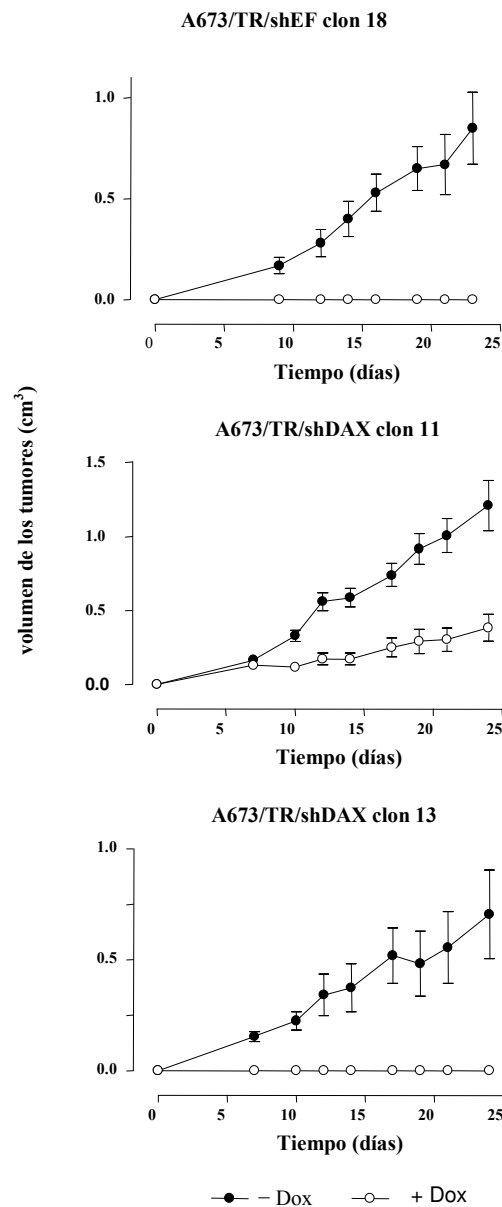


Figura 20. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 en la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con las células A673/TR/shEF (clon 18) y A673/TR/shDAX1 (clones 11 y 13). Tras la inoculación de las células, cada grupo de animales fue dividido en dos subgrupos, uno de los cuales recibió doxiciclina en el agua de bebida para inducir la expresión del correspondiente ARN de interferencia. El silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 redujo de manera considerable el crecimiento tumoral.

4.2.6. DAX1 no tiene los mismos efectos sobre la proliferación celular en la línea de neuroblastoma IMR32.

De los resultados mostrados en los apartados anteriores se puede concluir que DAX1 desempeña un papel importante en el control de la proliferación de las células de Ewing. Sin embargo, desconocemos si el efecto de DAX1 sobre la proliferación es un efecto general o exclusivo de las células de Ewing. Para responder a esta cuestión, analizamos el efecto de la expresión de DAX1 en un contexto celular distinto, en concreto en la línea celular de neuroblastoma IMR32 que no expresa niveles detectables de DAX1 (Mendiola et al. 2006).

Transfectamos las células IMR32 con un vector de expresión de DAX1 y un mutante funcional de dicho gen, R267P, y seleccionamos varios clones celulares con expresión estable de las correspondientes proteínas (Figura 21A). El mutante R267P de DAX1 provoca un cambio conformacional que impide la translocación de DAX1 al núcleo y en consecuencia tiene severamente deteriorada su actividad represora transcripcional (Lalli et al. 1997).

En la figura 21 se muestra como la sobreexpresión de DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32 disminuye el crecimiento celular, tanto si se mide con la técnica de tinción celular con cristal violeta (Figura 21B), como con la técnica de incorporación de BrdU al ADN (Figura 21C) Este efecto inhibitorio sobre la proliferación celular desaparece si las células de neuroblastoma sobreexpresan el mutante de DAX1, R267P, que ha perdido su capacidad para translocar al núcleo y por tanto de actuar como un regulador transcripcional.

Estos resultados indican que DAX1 también afecta a la proliferación de las células de neuroblastoma IMR32, pero en sentido contrario a como lo hace en las células de Ewing. Así, en lugar de estimular la proliferación, como en las células de Ewing, DAX1 inhibe la proliferación en la línea celular de neuroblastoma IMR32. Por tanto, DAX1 resulta esencial para la proliferación de las células de Ewing, pero es un inhibidor del crecimiento en células, que como las de neuroblastoma, no expresan DAX1 y en las que por tanto no es esperable que DAX1 desempeñe un papel pro-oncogénico.

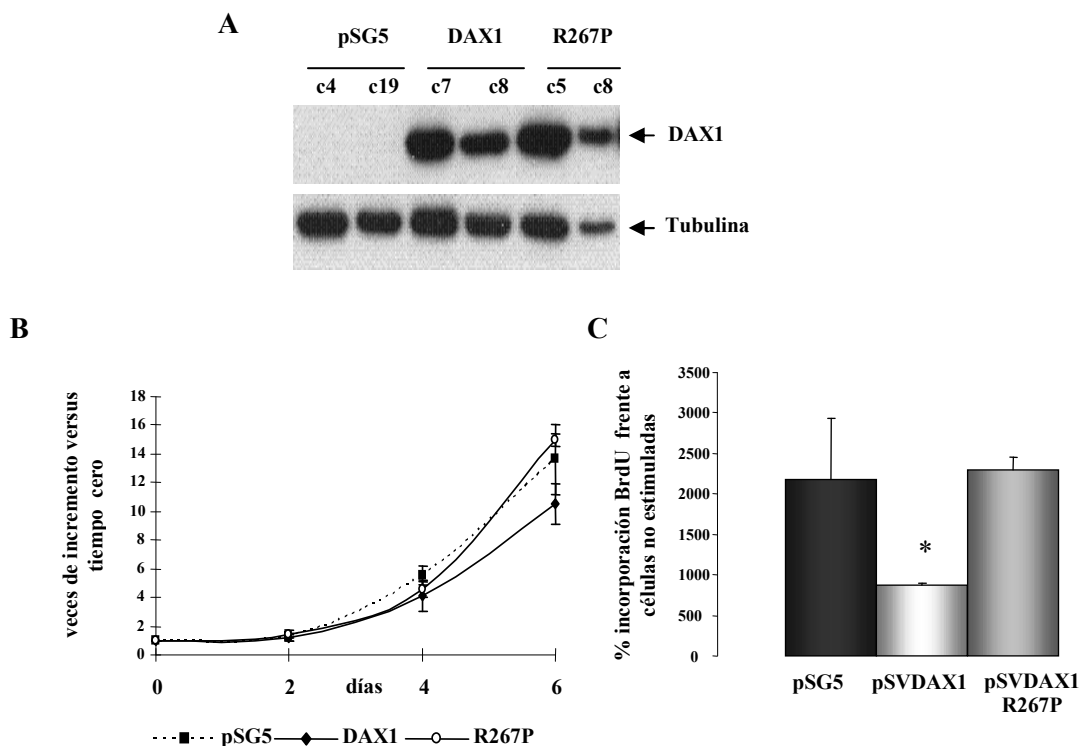


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32 sobre la proliferación celular. **A)** Expresión de DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32 transfectadas establemente con vector vacío (pSG5), DAX1 y un mutante de DAX1 (R267P), que tiene severamente afectada la capacidad represora transcripcional. **B)** Análisis del crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta. La expresión de DAX1 nativo en las células de neuroblastoma IMR32 inhibe el crecimiento celular aproximadamente un 25% a los 6 días de cultivo. Media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. Por el contrario, la expresión de DAX1 mutante no tiene ningún efecto sobre el crecimiento celular. **C)** Cuantificación de la tasa de proliferación celular mediante incorporación de BrdU al ADN. La expresión de DAX1 disminuye la proliferación celular un 60%, mientras que el mutante R267P no tiene ningún efecto. Media \pm desviación estándar de tres experimentos por cuadruplicado. * $P < 0,05$ vs las células control (pSG5).

En resumen, de los resultados mostrados en este apartado podemos concluir que el silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 en líneas de Ewing disminuye la proliferación celular, bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G1, e inhibe la capacidad de crecimiento en medio semisólido y la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos. Todo ello indica que DAX1 desempeña un papel central en la progresión del ciclo celular en células de Ewing. Por último, el efecto de DAX1 sobre la proliferación de las células de Ewing parece ser específico del tipo celular, ya que al contrario que en las células de Ewing, donde DAX1 estimula la proliferación, la sobreexpresión de DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32 inhibe significativamente la proliferación. Con todos estos datos podemos concluir que DAX1 juega un papel fundamental en la oncogénesis de los tumores de Ewing.

4.3. Mecanismo de acción de DAX1.

4.3.1. EWS/FLI1 y DAX1 regulan la expresión de un mismo grupo de genes.

En su contexto fisiológico, DAX1 funciona como un potente represor transcripcional regulando la expresión de genes que resultan esenciales para la diferenciación celular y la síntesis de esteroides (Ito et al. 1997; Lalli et al. 1997; Lalli and Sassone-Corsi 2003). Aunque es poco probable que el mecanismo de acción de DAX1 en células de Ewing sea similar al desempeñado en los tejidos esteroideogénicos – las células de Ewing no sintetizan hormonas esteroideas – parece lógico pensar que DAX1 pueda seguir actuando como un regulador transcripcional en células de Ewing. Por ello, analizamos el perfil de expresión génica regulado por DAX1 en células de Ewing y lo comparamos al regulado por la oncoproteína EWS/FLI1. Esta información debería ser de utilidad para investigar el mecanismo de acción de DAX1 y la forma en la que regula la progresión del ciclo celular en las células de Ewing.

Analizamos el perfil de expresión génica en tres clones independientes y una población policlonal de las células A673/TR/shEF, A673/TR/shDAX1 y A673/TR/shGFP estimuladas durante 72 horas con doxiciclina para inducir los correspondientes ARNs de interferencia. Una vez extraído el ARN, este se procesó y se hibridó a matrices de oligonucleótidos comerciales (Human 20K, GE Healthcare, Amersham Biosciences), que contienen sondas para aproximadamente 20000 genes bien caracterizados. Después de analizar los resultados como se describe en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, encontramos que 2783 y 1081 genes (representados por 3494 y 1366 sondas en la matriz de oligonucleótidos) fueron, respectivamente, diferencialmente regulados por EWS/FLI1 y DAX1 en las células de Ewing A673. Cabe destacar que el número de genes regulados por DAX1 fue significativamente más pequeño que el observado para EWS/FLI1, lo cual concuerda con el hecho que DAX1 sea un gen diana de EWS/FLI1. Ya que DAX1 es una diana directa de EWS/FLI1, que media algunos de los efectos que EWS/FLI1 ejerce sobre las células de Ewing, uno debe esperar que una proporción significativa de los genes regulados por EWS/FLI1 lo sean también por DAX1. En efecto, encontramos que un total de 229 genes (representados por 266 sondas) fueron de manera consistente inducidos o inhibidos por EWS/FLI1 y por DAX1 (Figura 22 y Anexo 1 Tabla A1). Estos resultados indican que aproximadamente un 10% de los genes regulados por EWS/FLI1 son genes diana de DAX1. El análisis estadístico mediante chi-cuadrado indicó que este número de genes compartido por EWS/FLI1 y por DAX1 es mucho más elevado que el cabría esperar meramente por azar ($P < 0,0001$).

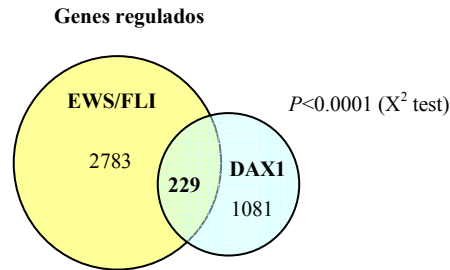


Figura 22. Genes regulados por EWS/FLI1 y por DAX1. Se muestra el número de genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1 de acuerdo con los estudios llevados a cabo con las matrices de oligonucleótidos. Un total de 229 genes fueron regulados (estimulados o inhibidos) tanto por EWS/FLI1 como por DAX1. El análisis estadístico mediante χ^2 indicó que este número de genes cuya regulación es compartida por EWS/FLI1 y DAX1 es mucho mayor que el esperado por azar ($P < 0,0001$).

4.3.2. El grupo de genes regulados por EWS/FLI1 y por DAX1 está principalmente implicado en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S.

Con el objeto de identificar funciones que pudieran explicar la relación entre EWS/FLI1 y DAX1, utilizamos el algoritmo EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*) (Hosack et al. 2003), para identificar que funciones (definidas como términos de *Gene Ontology* (GO) Gene Ontology Consortium database (www.geneontology.org) (Ashburner et al. 2000) están sobrerrepresentadas entre los grupos de genes regulados por EWS/FLI1, por DAX1 o por ambas proteínas (Tablas 4, 5 y 6).

Entre los genes regulados por EWS/FLI1 abundan los genes implicados en la regulación del metabolismo de nucleótidos, ciclo celular y procesamiento de ADN y ARN. El número de grupos GO sobrerrepresentados en el grupo de genes regulados por DAX1 fue muy inferior, destacando los términos de biogénesis y ciclo celular. De manera interesante, el único término GO que se encontró sobrerrepresentado en ambos grupos de genes fue “ciclo celular”. De acuerdo con esta observación, el grupo GO más importante en el grupo de genes regulados a la vez por EWS/FLI1 y DAX1, tanto si tenemos en cuenta el número de genes representados, como su significación estadística, es precisamente “ciclo celular”. La aparición, por tanto del término “ciclo celular” en todos los grupos de genes analizados no puede ser casual, y explica porque tanto EWS/FLI1 como DAX1 están funcionalmente relacionados con la proliferación celular en células de Ewing.

Tabla 4. Grupos GO sobrerrepresentados en el grupo de genes regulados por EWS/FLI1.

ID	Grupo	Nº de genes en cada grupo	Test de Fisher
Proceso biológico			
GO:0016072	Metabolismo de ARNr	20	1,24E-09
GO:0016070	Metabolismo ARN	83	3,76E-09
GO:0006364	Procesamiento ARNr	18	1,20E-08
GO:0008152	Metabolismo	748	6,87E-08
GO:0007049	Ciclo celular	172	1,20E-07
GO:0006396	Procesamiento ARN	67	2,98E-07
GO:0006626	Señal proteína-mitocondria	13	6,25E-07
GO:0006139	Metabolismo de bases, nucleósido, nucleótido y ácido nucleico	371	1,17E-06
GO:0000067	Replicación del ADN y ciclo del cromosoma	58	2,76E-06
GO:0042254	Biogénesis y unión del ribosoma	29	3,76E-06
GO:0006259	Metabolismo del ADN	102	4,76E-06
GO:0006260	Replicación del ADN	36	1,49E-05
GO:0007046	Biogénesis del ribosoma	24	1,83E-05
GO:0008283	Proliferación celular	232	6,94E-05
Componente celular			
GO:0043231	Unión intracelular membrana-orgánulo	684	9,78E-19
GO:0043227	Unión membrana-orgánulo	684	9,78E-19
GO:0005622	intracelular	850	5,02E-15
GO:0043229	Orgánulo intracelular	737	8,73E-15
GO:0043226	Orgánulo	737	8,73E-15
GO:0005739	Mitocondria	161	1,16E-12
GO:0005634	núcleo	459	7,08E-12
GO:0043234	Complejos proteicos	272	5,59E-09
GO:0000313	Orgánulos ribosomales	19	5,80E-09
GO:0005761	Ribosoma mitocondrial	19	5,80E-09
GO:0005737	Citoplasma	552	3,70E-08
GO:0030529	Complejo ribonucleoproteico	82	7,38E-08
GO:0005730	Nucleolo	38	1,62E-07
GO:0005759	Matriz mitocondrial	31	4,86E-07
GO:0019866	Membrana interna	32	2,54E-05
GO:0005744	Complejos de translocación de la membrana interna mitocondrial	8	3,07E-05
GO:0005743	Membrana interna mitocondrial	30	4,62E-05
GO:0005740	Membrana mitocondrial	40	6,92E-05
GO:0005732	Complejo ribonucleoproteico nucleolar pequeño	11	6,96E-05
Función molecular			
GO:0003676	Unión de Ácidos nucleicos	334	1,33E-06
GO:0003723	Unión de ARN	99	2,10E-06

Tabla 5. Grupos GO sobrerrepresentados en el grupo de genes regulados por DAX1

ID	Grupo	Nº de genes en cada grupo	Test de Fisher
Proceso biológico			
GO:0016043	Biogénesis y organización celular	90	1,65E-06
GO:0007143	Meiosis femenina	8	4,00E-05
GO:0007049	Ciclo celular	69	6,80E-05
GO:0030029	Procesamiento de filamentos de actina	22	7,44E-05
Componente celular			
GO:0030479	Parcheado cortical de la actina	4	8,60E-05

Tabla 6. Grupos GO sobrerrepresentados en el grupo de genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1.

ID	Grupo	Nº de genes en cada grupo	Test de Fisher
Proceso biológico			
GO:0007049	Ciclo celular	27	3,48E-07
GO:0000280	División nuclear	12	1,37E-05
GO:0006259	Metabolismo de ADN	17	1,83E-05
GO:0000279	Fase M	12	2,94E-05
GO:0000067	Replicación del ADN y ciclo del cromosoma	11	4,41E-05
GO:0016321	Segregación de los cromosomas en la meiosis femenina	4	5,17E-05
GO:0006997	Organización nuclear y biogénesis	11	5,73E-05
GO:0007126	Meiosis	7	6,92E-05
GO:0008283	Proliferación celular	30	7,12E-05
GO:0000278	Ciclo celular mitótico	12	9,23E-05
Componente celular			
GO:0005634	núcleo	54	6,82E-07
GO:0043227	Unión membrana-orgánulo	70	1,15E-06
GO:0043231	Unión intracelular membrana-orgánulo	70	1,15E-06

El análisis EASE permite identificar que funciones están sobrerrepresentadas en un determinado grupo de genes, pero no nos proporciona información acerca de las rutas afectadas propiamente dichas. Por esta razón, y con el objeto de identificar las rutas afectadas de forma similar por EWS/FLI1 y DAX1 en células de Ewing, llevamos a cabo un análisis GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) (Subramanian et al. 2005). El análisis GSEA determina si una lista de genes (en nuestro caso genes que pertenecen a una determinada ruta) está enriquecida en la parte superior de una segunda lista de genes ordenada según un criterio predeterminado (en nuestro caso la lista de genes regulados por EWS/FLI1 o DAX1). Comparamos 215 rutas

definidas (www.biocarta.com) contra la lista de genes regulados por EWS/FLI1 o DAX1 ordenados en función de los valores de significación (P) según el Test de la T de Student. Si la mayoría de los genes de una determinada ruta se localizan en la parte superior de la lista de genes ordenada, entonces esa ruta estará específicamente regulada por EWS/FLI1 o DAX1. Este análisis identificó varias rutas reguladas por EWS/FLI1 y DAX1 con un valor de significación estadística $FDR < 0.25$ (Figura 23 y Anexo 1 Tablas A2 y A3).

Dos rutas, RBPATHWAY y CELLCYCLEPATHWAY (de acuerdo con la denominación de Biocarta), implicadas en la transición G1/S del ciclo celular, fueron las únicas rutas reguladas tanto por EWS/FLI1 como por DAX1. Por lo tanto, los análisis de genómica funcional realizados sobre los resultados de expresión génica obtenidos con las micromatrices de oligonucleótidos, mostraron que las únicas funciones y rutas sobrerrepresentadas en las listas de genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1, corresponden a genes implicados en la progresión del ciclo celular y particularmente en la transición de la fase G1 a la fase S. Estos resultados, por tanto, proporcionan una explicación funcional del efecto del silenciamiento de DAX1 sobre la proliferación de las células de Ewing.

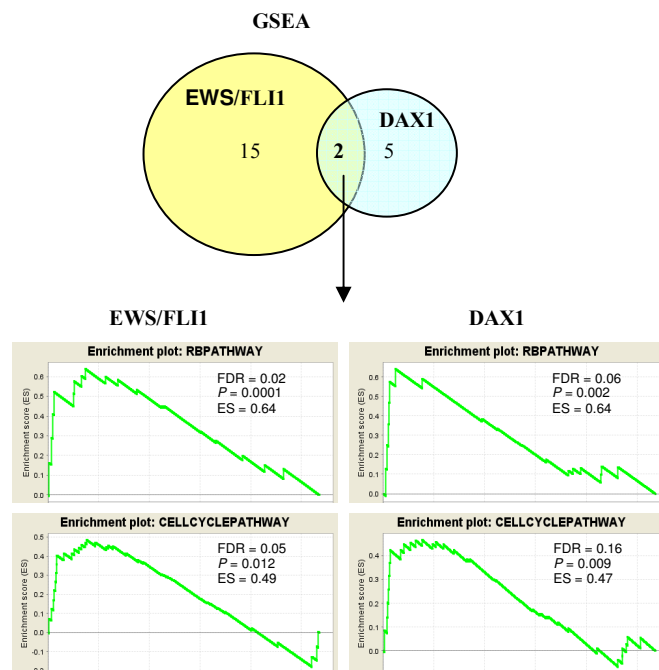


Figura 23. Resultado del análisis GSEA. Este análisis permite identificar rutas que están significativamente representadas en un determinado grupo de genes, en nuestro caso, los grupos de genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1. De acuerdo con este análisis, quince rutas fueron significativamente representadas en el grupo de genes regulados por EWS/FLI1, y cinco, en el grupo de genes regulados por DAX1. Dos rutas, RBPATHWAY y CELLCYCLEPATHWAY (según la denominación de Biocarta), implicadas en la transición G1/S del ciclo celular, fueron las únicas rutas reguladas tanto por EWS/FLI1 como por DAX1. En la figura se muestran los parámetros FDR (*False Discovery Rate*) y P , que indican la probabilidad de que una ruta determinada se encuentre significativamente representada en un determinado grupo de genes y el parámetro ES (*Enrichment Score*), un estadístico que mide el enriquecimiento de la ruta en cuestión en el grupo de genes.

A continuación seleccionamos cuatro de los genes regulados por EWS/FLI1 y por DAX1 para su validación mediante RT-PCR cuantitativa: la ciclina dependiente de kinasa CDK2, esencial en la transición G1/S del ciclo celular (Murray 2004; Stein et al. 2006); SKP2, una proteína F-box implicada en la degradación dependiente de ubiquitina de miembros de las familias KIP y CIP de inhibidores de CDKs (Assoian and Yung 2008; Bryant et al. 2006); la proteína MCM10 (*Mini-Chromosome Maintenance protein 10*), implicada en la iniciación de la replicación de los genomas eucarióticos (Maiorano et al. 2006) y CDC6, una proteína encargada de controlar que la replicación del ADN haya sido completada antes de iniciar la fase de mitosis (Boronat and Campbell 2008).

En estos experimentos utilizamos las líneas celulares A673/TR y SKPNDW/TR con los shRNAs dirigidos contra EWS/FLI1, DAX1 y GFP. Como se muestra en la figura 24, el silenciamiento de EWS/FLI1 o DAX1 en ambas células de Ewing provocó una disminución en los niveles de ARNm de *CDK2*, *SKP2*, *MCM10* y *CDC6*. Además, el perfil de expresión de estos genes a lo largo del tiempo fue muy similar en ambas células de Ewing, tanto tras el silenciamiento de EWS/FLI1 como tras el silenciamiento de DAX1. Estos resultados, por tanto, validan de manera independiente los obtenidos mediante las micromatrices de oligonucleótidos y confirman que estos genes son inducidos por EWS/FLI1 y DAX1 en células de Ewing. Ya que los niveles de EWS/FLI1 no fueron alterados tras el silenciamiento de DAX1, podemos concluir que el efecto de EWS/FLI1 sobre la expresión de estos reguladores de ciclo celular es mediado principalmente a través de DAX1 en células de Ewing.

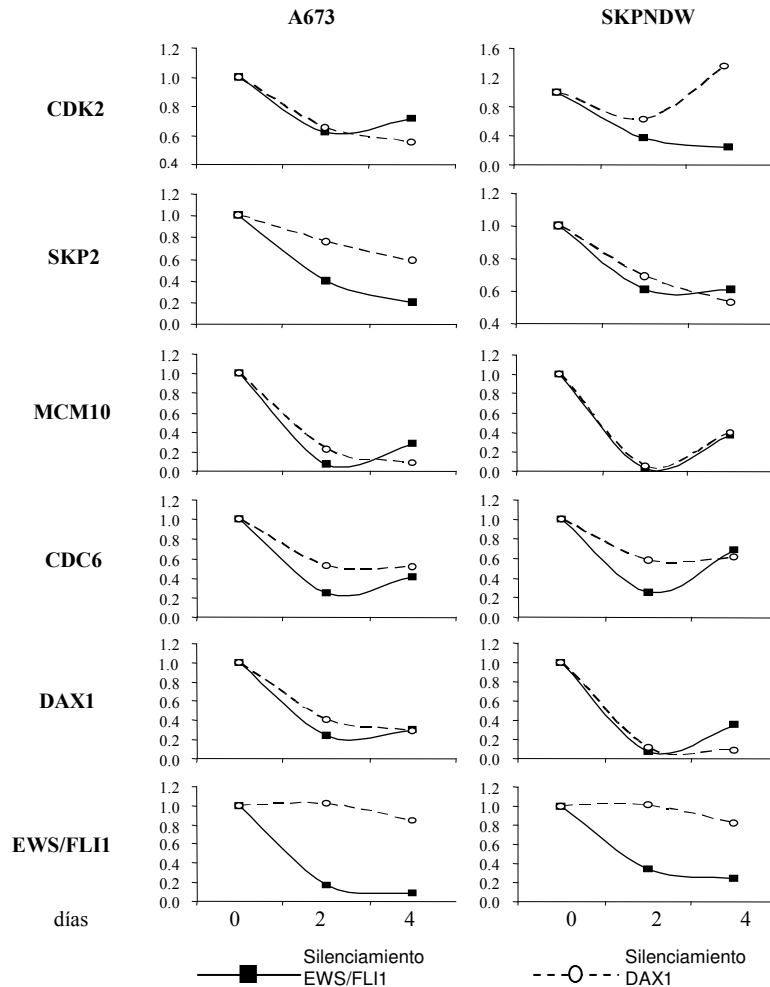


Figura 24. Validación de algunos de los genes regulados por EWS/FLI1 y por DAX1 mediante RT-PCR cuantitativa. Las células A673/TR/shEF, A673/TR/shDAX1, SKPNDW/TR/shEF y SKPNDW/TR/shDAX1 se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina durante los tiempos indicados. La expresión relativa de los diferentes ARNm se cuantificó mediante RT-PCR cuantitativa. Estos experimentos confirman que EWS/FLI1 y DAX1 inducen la expresión de los genes *CDK2*, *SKP2*, *MCM10* y *CDC6* en células de Ewing.

A continuación, analizamos también el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre los niveles de la proteína SKP2. Elegimos a esta proteína por desempeñar un papel central en la transición G1/S del ciclo celular al regular los niveles de los inhibidores de CDKs (CDKIs) p21, p27 y p57, a través de su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Hershko 2008; Nakayama and Nakayama 2005). Como se muestra en la figura 25A, el silenciamiento de EWS/FLI1 en diferentes clones de células A673/TR/shEF produjo una disminución, cercana al 100%, en los niveles de proteína SKP2. De manera notable, el silenciamiento de DAX1 en las células A673/TR/shDAX1 produjo un efecto similar (Figura 25B). Es decir, la inhibición de la expresión de DAX1 en células A673 provocó una inhibición en paralelo de los niveles de SKP2 a nivel proteína. Conviene recordar que en estas células los

niveles de EWS/FLI1 no son alterados por el silenciamiento de DAX1, y por tanto, podemos concluir, que el efecto de EWS/FLI1 sobre los niveles de SKP2 está principalmente mediado por DAX1.

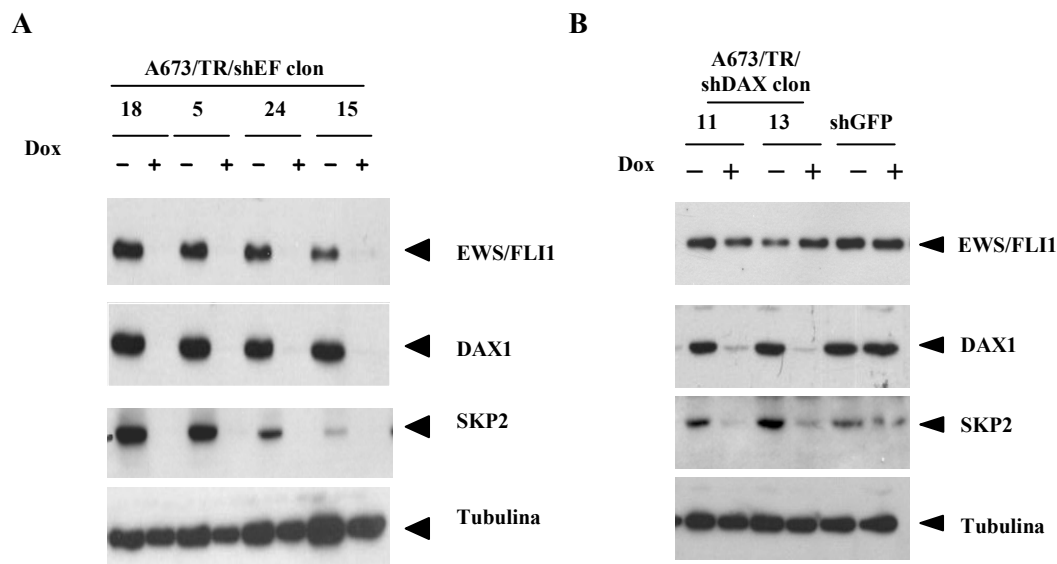


Figura 25. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 y DAX1 sobre los niveles de SKP2. A) Western-blot mostrando el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre los niveles de SKP2 en diferentes clones de las células A673/TR/shEF. B) Western-blot mostrando el efecto del silenciamiento de DAX1 sobre los niveles de SKP2 en diferentes clones de las células A673/TR/shDAX1. Estos resultados indican que el efecto de EWS/FLI1 sobre los niveles de expresión de SKP2 está mediado principalmente por DAX1.

4.3.3. El efecto de DAX1 sobre el perfil de expresión génica es diferente en función del contexto celular.

A continuación, examinamos si el efecto de DAX1 sobre la expresión de los genes analizados en el apartado anterior podría ser reproducido en otros tipos celulares. Para ello, expresamos DAX1 en dos tipos celulares diferentes que no expresan DAX1, como son las células 293 (células epiteliales renales embrionarias) y las células de neuroblastoma IMR32. En el primer caso, los estudios se llevaron a cabo mediante transfecciones transitorias, mientras que en el segundo se utilizaron las células ya empleadas en el apartado 4.2.6.

Como se muestra en la figura 26, la expresión ectópica de DAX1 en las células 293 no provocó ningún cambio significativo en los niveles de *CDK2*, *SKP2*, *MCM10* o *CDC6*, mientras que en las células de neuroblastoma IMR32, la expresión de DAX1 indujo un incremento significativo en los niveles de *MCM10*. Por tanto, DAX1 parece afectar a la expresión de los genes estudiados de manera diferente en función del contexto celular.

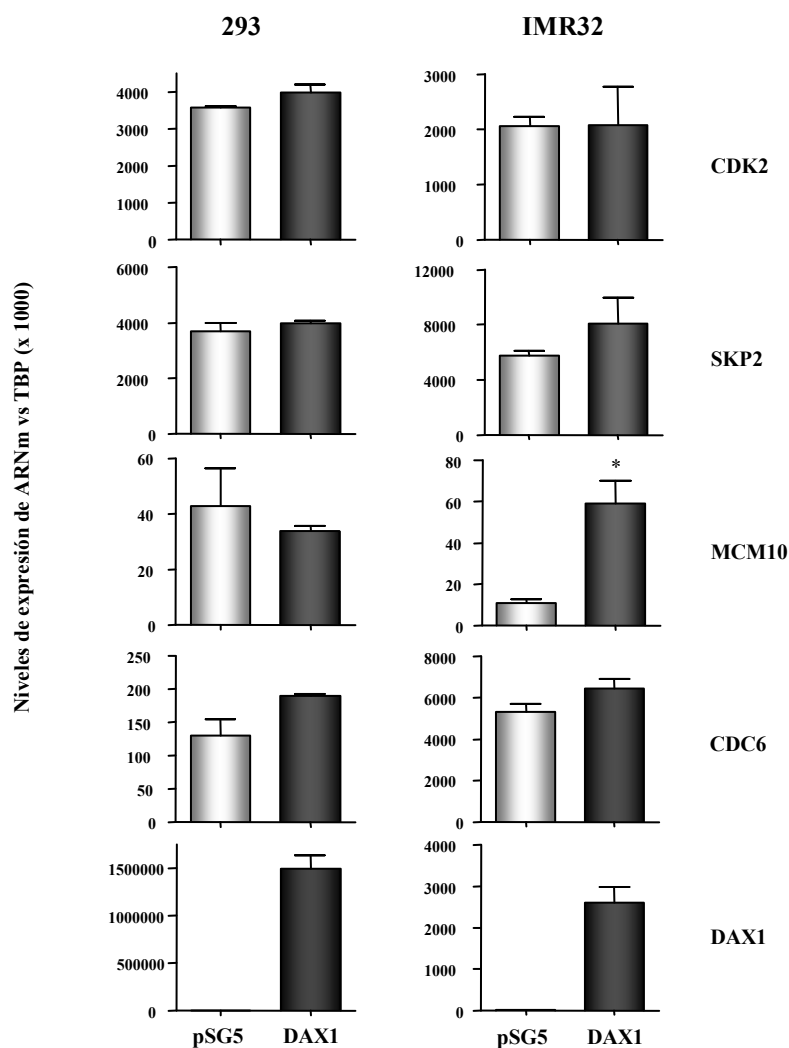


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de DAX1 en los niveles de ARNm de *CDK2*, *SKP2*, *MCM10* y *CDC6* en otros contextos celulares. Las células 293 se transfectaron transitoriamente con un vector de expresión que contenía el cDNA completo de DAX1 nativo (DAX1) y con el vector vacío (pSG5) como control. Cuarenta y ocho horas después, se aisló el ARN y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (media \pm error estándar de un experimento por duplicado). Las células IMR32 se transfectaron de forma estable con los mismos vectores. Después de la selección, se extrajo el ARN y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (media \pm error estándar de dos clones independientes por cada condición experimental realizado por duplicado). * $P < 0,05$ vs células transfectadas con vector vacío (pSG5).

4.3.4. DAX1 podría actuar como un represor transcripcional en células de Ewing.

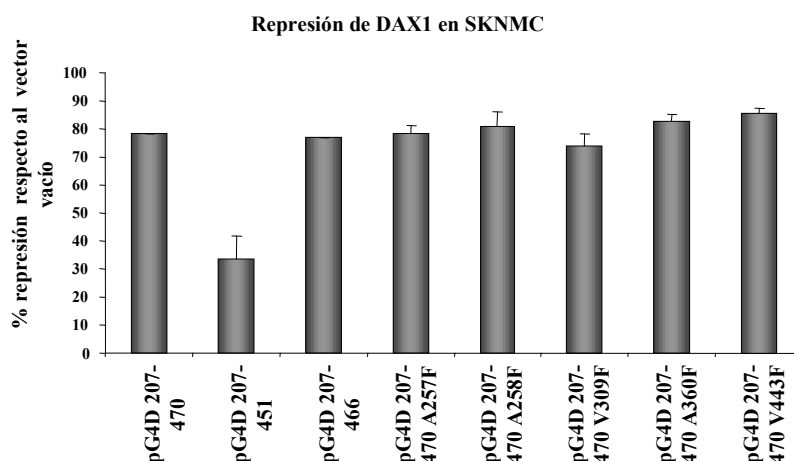
Tal y como hemos comentado en la introducción, DAX1 actúa como un potente represor transcripcional de otros receptores nucleares como SF1 (*NR5A1*) (Ito et al. 1997), Nur77 (*NR4A1*) (Song et al. 2004), LRH1 (*NR5A2*) (Suzuki et al. 2002), el receptor de estrógenos (*ESR1*) (Zhang et al. 2000) o el receptor de andrógenos (*AR*) (Holter et al. 2002). Sin embargo, solo el 23% de los genes regulados por DAX1 resultaron ser reprimidos (es decir, inducidos tras el silenciamiento de DAX1) en las células de Ewing A673, lo que en principio

podría sugerir que DAX1 podría no estar actuando como un represor transcripcional en células de Ewing

Por lo tanto, analizamos si el dominio C-terminal de DAX1, donde reside la actividad represora transcripcional, mantiene su funcionalidad en las células de Ewing. Para ello, utilizamos un vector de expresión de la proteína de fusión GAL4/DAX1, en la que el dominio C-terminal de DAX1 (aa 207-470) fue fusionado con el dominio de unión a ADN de GAL4 (aa 1-147) (Lalli et al. 1997). Utilizamos también diversos mutantes del dominio C-terminal de DAX1, algunos de los cuales tienen su actividad represora transcripcional severamente afectada. Estos vectores de expresión se cotransfectaron con un vector reportero que contenía 5 copias del elemento de unión al ADN de GAL4 *upstream* del promotor basal de la timidina kinasa (tk) y se analizó el efecto de las diferentes proteínas de fusión GAL4/DAX1 y sus mutantes sobre la actividad basal del referido promotor.

Como se puede observar en la figura 27, la expresión de la proteína de fusión GAL4/DAX1 nativa (pG4D 207-470) inhibió la expresión basal del promotor de la tk en un 80%, en concordancia con los resultados obtenidos en otros sistemas celulares (Lehmann et al. 2002). Esta actividad represora fue severamente alterada cuando se expresó la proteína pG4D 207-451, en la que los últimos 19 aminoácidos de DAX1 han sido eliminados. Estos aminoácidos constituyen la hélice H12 del dominio globular C-terminal, donde reside el dominio AF-2 (*activation function-2*) necesario para la interacción con co-represores. La eliminación de los últimos 4 aminoácidos de DAX1 (pG4D 207-466), o la sustitución de algunos aminoácidos en el hipotético bolsillo de unión a ligando (pG4D 207-470 A257F, A258F, V309F, A360F y V443F) no afectaron la actividad represora de la proteína. Para descartar que los efectos observados pudieran ser debidos a diferencias en la eficiencia de la transfección o en la estabilidad de las diferentes proteínas, realizamos western-blot para comprobar que todas las proteínas se expresaron a niveles equivalentes en el núcleo y el citosol. Como puede observarse en la figura 27B, todas las proteínas de fusión fueron expresadas a niveles similares y se distribuyeron más o menos en la misma proporción entre el núcleo y el citoplasma, por lo que las diferencias observadas en cuanto a su capacidad represora deben ser atribuidas a alteraciones funcionales de la proteína. En esta figura también se puede observar como DAX1 endógeno se localiza casi exclusivamente en el núcleo, como corresponde a un regulador transcripcional.

A



B

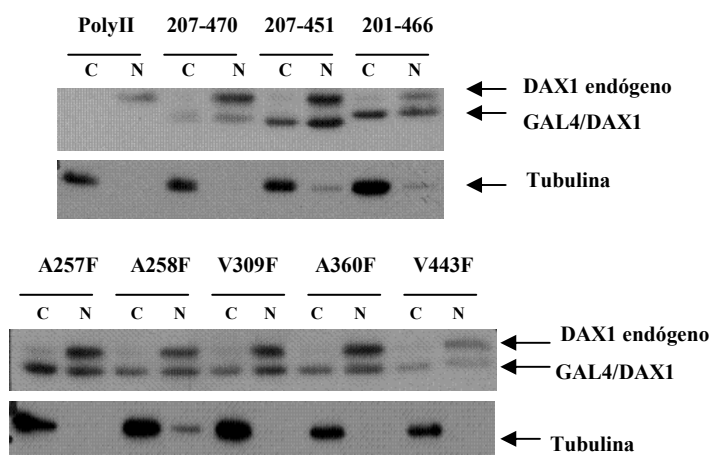


Figura 27. El dominio C-terminal de DAX1 mantiene su actividad represora en las células de Ewing SKNMC. A) Las células de Ewing SKNMC se transfectaron con diferentes proteínas de fusión GAL4/DAX1 y un vector reportero que contenía elementos de respuesta GAL4 clonados *upstream* del promotor basal de la timidina quinasa. En la gráfica se representa el porcentaje de represión producido por cada una de las proteínas de fusión respecto a las células transfectadas con el vector vacío (PolyII). Media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. El dominio C-terminal nativo de DAX1 (207-470) mantiene su actividad represora, incluso cuando le faltan los últimos 4 aminoácidos (207-466), o cuando se han mutado diferentes aminoácidos que afectan al hipotético bolsillo de unión a ligando (A257F, A258F, V309F, A360F y V443F). Por el contrario, el mutante 207-451, en el que han sido eliminados los últimos 19 aminoácidos, pierde su capacidad represora. Este mutante carece de la hélice H12, donde se localiza el dominio AF-2, y por tanto ha perdido su capacidad para interactuar con co-represores. **B)** Western-blot mostrando los niveles de las diferentes proteínas de fusión y su distribución subcelular. DAX1 endógeno se encuentra exclusivamente en el núcleo, mientras que las proteínas de fusión GAL4/DAX1 se distribuyen entre el citoplasma (C) y el núcleo (N). La distribución subcelular de estas proteínas de fusión no es alterada por las diferentes mutaciones. Para la realización de este western-blot se empleó el anticuerpo anti-DAX1 3E5 que reconoce el dominio C-terminal.

Efectos similares se obtuvieron con la línea celular SKPNDW y el dominio C-terminal de DAX1 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el dominio C-terminal de DAX1 es funcional en células de Ewing, manteniendo su actividad represora transcripcional.

5. Discusión

Actualmente, está plenamente aceptado que las proteínas de fusión EWS/ETS juegan un papel primordial en los tumores de la familia Ewing. Estas proteínas de fusión son factores de transcripción quiméricos, que regulan la expresión de múltiples genes de forma aberrante (Arvand and Denny 2001; Janknecht 2005; Kovar 1998; May et al. 1993a; West 2000). Por esta razón, la identificación y caracterización funcional de los genes afectados por estas proteínas de fusión es fundamental para entender la oncogénesis de los sarcomas de Ewing.

En los últimos años han aparecido numerosos estudios describiendo genes regulados por estas proteínas de fusión, utilizando diversos modelos celulares y técnicas moleculares (Baer et al. 2004; Braun et al. 1995; Carrillo et al. 2007; Deneen et al. 2003b; Gangwal et al. 2008; Khan et al. 2001; Lessnick et al. 2002; Mendiola et al. 2006; Ohali et al. 2004; Prieur et al. 2004; Rorie et al. 2004; Siligan et al. 2005; Staeger et al. 2004a; Tirado et al. 2006; Wai et al. 2002; Welford et al. 2001). En particular, nuestro grupo describió recientemente que uno de los genes regulados por EWS/FLI1, la proteína de fusión presente en el 85% de los casos de tumor de Ewing, inducía la expresión del receptor nuclear huérfano DAX1 (*NR0B1*) (Mendiola et al. 2006) en células de Ewing. Además, en este trabajo mostramos que DAX1 se expresaba a elevados niveles en células y tumores de Ewing en comparación con otros tumores pediátricos como los osteosarcomas, los neuroblastomas y los rhabdomyosarcomas.

DAX1 es un receptor nuclear huérfano implicado en numerosas funciones fisiológicas, entre las que destacan la determinación del sexo en mamíferos, el desarrollo de las gónadas y el control de la síntesis de esteroides (Lalli and Sassone-Corsi 2003). Hasta la fecha, su implicación en cáncer ha sido escasa y se ha circunscrito exclusivamente a estudios llevados a cabo en tumores derivados de los tejidos donde este gen es fisiológicamente activo, como los adenomas pituitarios (Ikuyama et al. 1998) y los tumores adenocorticales (Reincke et al. 1998).

La elevada expresión de DAX1 en los tumores de la familia Ewing, un tumor no relacionado con tejidos esteroideogénicos, y el hecho que DAX1 sea inducido por EWS/FLI1, la oncoproteína característica de estos tumores, resultaron ser, por tanto, observaciones extraordinariamente llamativas. Todo ello nos animó a profundizar en los mecanismos de regulación de DAX1 y estudiar su papel funcional en los tumores de la familia Ewing.

DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1.

En esta Tesis hemos demostrado que DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1. Esta afirmación está basada en las siguientes observaciones: i) el silenciamiento de EWS/FLI1 en células de Ewing mediante un sistema de ARN de interferencia inducible inhibe la expresión del ARNm de DAX1, ii) EWS/FLI1 induce la expresión de DAX1 en sistemas celulares heterólogos, iii) EWS/FLI1 es capaz de transactivar el promotor de DAX1 *in vitro*, iv) la inducción de DAX1 en sistemas celulares heterólogos y la transactivación del promotor *in vitro* son dependientes de la existencia de un dominio funcional de unión al ADN (tal y como ocurre en otros genes diana de EWS/FLI1 como *TPS2* (Potikyan et al. 2007), Uridina fosforilasa (Deneen et al. 2003a), o *IGFBP3* (Prieur et al. 2004) y por último, v) EWS/FLI1 se une físicamente al promotor de DAX1 como hemos demostrado mediante experimentos de ChIP. En este sentido DAX1 es uno de los pocos genes, junto con *TPS2* (Potikyan et al. 2007), *CAVI* (Tirado et al. 2006), Uridina fosforilasa (Deneen et al. 2003a), *IGFBP3* (Prieur et al. 2004) o *p57^{KIP2}* (Dauphinot et al. 2001) para los que se ha demostrado una regulación transcripcional directa por EWS/FLI1.

Nuestros resultados indican que FLI1 nativo es incapaz de inducir la expresión de DAX1. Este resultado es en principio bastante llamativo ya que FLI1 y EWS/FLI1 comparten exactamente el mismo dominio de unión al ADN. Sin embargo, un efecto similar ha sido descrito para algunos de los genes diana de EWS/FLI1, como *hTERT* (Takahashi et al. 2003), *ID2* (Nishimori et al. 2002) o Tenascina C (Watanabe et al. 2003). En estos casos, y al igual que ocurre con DAX1, EWS/FLI1, pero no FLI1, estimula su expresión. En otras ocasiones, el efecto de EWS/FLI1 y FLI1 sobre la expresión génica es incluso contrario. Así, EWS/FLI1 inhibe la expresión de *IGFBP3*, mientras que FLI1 la activa (Prieur et al. 2004) y lo mismo ocurre con *TGFBR2* cuya expresión está inhibida por EWS/FLI1, mientras que FLI1 la activa (Hahm 1999). Estos hechos sugieren que, aunque EWS/FLI1 y FLI1 comparten el mismo dominio de unión al ADN, su mecanismo de acción es diferente, probablemente porque en realidad reconozcan secuencias diferentes en el ADN o secuencias similares con diferente afinidad (ver más adelante). Por otro lado, el hecho que EWS/FLI1 y FLI1 regulen diferentes grupos de genes explica porqué EWS/FLI1 tiene capacidad transformante *in vitro*, mientras que FLI1 nativo no (Arvand and Denny 2001; May et al. 1993a; May et al. 1993b; Thompson et al. 1999; Yi et al. 1997).

Los miembros de la familia de factores de transcripción de la familia ETS se unen a secuencias del ADN que contienen el motivo GGAA/T (Wasylyk et al. 1993), como en el caso de FLI1. Las secuencias que flanquean este motivo son mucho más variables y parecen contribuir a la afinidad y especificidad de los diferentes factores de transcripción de la familia (Seth and Watson 2005; Sharrocks 2001; Szymczyna and Arrowsmith 2000). De este modo, podemos encontrar en un determinado promotor, sitios ETS de alta afinidad (ACCGGAAG/aT/c), normalmente localizados cerca del inicio de la transcripción y otros de baja afinidad, localizados frecuentemente en la proximidad de elementos de respuesta específicos de otros factores de transcripción con los que los factores de transcripción ETS pueden cooperar (Hollenhorst et al. 2007). En el caso concreto del promotor de DAX1, el análisis *in silico* reveló que el promotor de DAX1 no contenía elementos de respuesta ETS de alta afinidad, aunque si presentaba distintos sitios de unión ETS de baja afinidad, en diferentes localizaciones en el promotor. Según nuestros resultados, EWS/FLI1 es incapaz de transactivar el fragmento del promotor de DAX1 de 1,3 Kb que contiene los sitios ETS identificados *in silico*, lo que sugiere que EWS/FLI1 no reconoce estas secuencias con la suficiente afinidad para inducir la transcripción. De manera interesante, FLI1 es capaz de transactivar este fragmento del promotor moderadamente, indicando que FLI1 nativo si reconoce estos elementos de respuesta sobre un promotor sintético, aunque como hemos visto anteriormente, FLI1 sea incapaz de activar la transcripción del promotor endógeno de DAX1. Esta aparente contradicción puede ser explicada por la presencia de alteraciones epigenéticas o diferencias conformacionales presentes en el ADN cromosómico que impidan la activación de DAX1 por FLI1.

Lo más interesante de estos estudios fue descubrir que EWS/FLI1 era capaz de activar un fragmento del promotor de DAX1 de 1,6 Kb, que contenía una serie de repeticiones en tandem de la secuencia GGAA, el motivo central de los factores de transcripción ETS. Además, esta región de repeticiones de la secuencia GGAA resultó ser una región polimórfica (microsatélite). Cabe resaltar que esta región del promotor de DAX1 no respondió a la sobreexpresión de FLI1 nativo, indicando, como se ha sugerido anteriormente, que EWS/FLI1 y FLI1 reconocen, al menos en algunos genes, diferentes secuencias de ADN sobre el promotor.

El hecho que EWS/FLI1 active la transcripción de DAX1 a través de su unión a una secuencia polimórfica, constituida por repeticiones en tandem de la secuencia GGAA, resulta especialmente relevante, ya que hasta el momento no se habían descrito estos motivos en

ninguno de los genes diana directos de EWS/FLI1 identificados hasta la fecha. Por ejemplo, en el caso del gen *IGFBP3*, EWS/FLI1 se une a dos sitios ETS específicos (AACGGATGTA y GGTTTCCTGT) presentes en su promotor; en el caso del gen *CAVI*, EWS/FLI1 se une a una secuencia que no contiene el motivo GGAA/T característico de los sitios de unión ETS (CGTCCGGGCCA); y en el caso del gen *ID2*, EWS/FLI1 se une a dos de los tres sitios ETS con secuencias consenso de alta afinidad identificados en su promotor, aunque en este caso es necesaria la cooperación de c-Myc para su activación.

Durante la redacción de esta Tesis y coincidiendo con la publicación del artículo que describe estos resultados (Garcia-Aragoncillo et al. 2008), el grupo del Dr. Lessnick publicaba un trabajo que corroboraba nuestras observaciones de forma independiente a través de un abordaje diferente (Gangwal et al. 2008). Utilizando la técnica de “ChIP-on-ChIP”, este grupo demuestra que varios genes regulados por EWS/FLI1 presentan en sus promotores secuencias microsatélites del tetranucleótido GGAA. Entre estos genes se encuentran *FCGRT*, *CAVI*, *CACNB2*, *FEZF1*, *KIAA1797* y el propio DAX1 (*NR0B1*). Estas secuencias polimórficas son encontradas en los genes activados por la proteína de fusión, pero no en los genes que se encuentran inhibidos (Gangwal et al. 2008). Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de Lessnick y colaboradores, podemos concluir que las secuencias GGAA repetitivas y polimórficas, representan un nuevo elemento de respuesta específico para la proteína de fusión EWS/FLI1, que parece resultar, como en el caso de DAX1, clave para la regulación de algunos de estos genes diana. Por otro lado, estos resultados también sugieren que promotores con este tipo de secuencias polimórficas son claros candidatos a ser genes regulados directamente por la oncoproteína EWS/FLI1.

Implicaciones patológicas del elemento de respuesta polimórfico reconocido por EWS/FLI1 (microsatélite GGAA) en el promotor de DAX1.

La repetición en tandem del tetranucleótido GGAA que aparece en el promotor de DAX1, es polimórfica en la población y segrega de forma mendeliana (Guo et al. 1996). Este hecho nos hizo plantearnos la posibilidad que el número de repeticiones GGAA estuviera relacionado con los niveles de expresión de DAX1.

Los resultados obtenidos en las líneas celulares de Ewing indican que el número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de DAX1 correlacionan con los niveles de ARNm. Así, la línea celular de Ewing RDES, que tiene 17 repeticiones GGAA en el promotor de DAX1, expresa los niveles más bajos de ARNm, mientras que la línea celular SKPNDW,

que tiene 25 repeticiones, es una de las que expresa mayores niveles de DAX1. Esta observación sugiere que varios monómeros de EWS/FLI1 pueden unirse cooperativamente a la secuencia polimórfica, de tal forma que el número de moléculas de EWS/FLI1 unidas al promotor, estaría en función del número de repeticiones GGAA presentes en el mismo. Esta posibilidad ha sido abordada desde un punto de vista más mecanístico en el artículo recientemente publicado por Gangwal y colaboradores, comentado anteriormente (Gangwal et al. 2008). Como muestran estos autores, son necesarias un mínimo de cuatro repeticiones GGAA para que la unión de EWS/FLI1 a estas secuencias de ADN pueda ser detectada mediante la técnica de EMSA. Siempre utilizando esta técnica, los autores muestran que con un mayor número de repeticiones, el número de moléculas EWS/FLI1 unidas aumenta, apoyando la hipótesis de la unión cooperativa. Según nuestros resultados, sin embargo, parecen ser necesarias un mayor número de repeticiones para que la expresión de DAX1 sea eficientemente inducida por EWS/FLI1, ya que los niveles de expresión de DAX1 son muy bajos en las células RDES que tienen 17 repeticiones GGAA. Puede ser que EWS/FLI1 sea capaz de unirse a secuencias de ADN con sólo cuatro repeticiones, pero sea necesario un mayor número de moléculas de EWS/FLI1 unidas sobre el promotor para activar la transcripción. En cualquier caso, parece ser que se precisan un número mínimo de repeticiones para que el promotor de DAX1 pueda ser activado por EWS/FLI1.

Uno de los pocos casos descritos en los que se ha demostrado que un microsatélite puede afectar la expresión génica es el gen *HO-1* (*Heme oxygenase-1*). En este gen, el número de repeticiones del dinucleótido GT presentes en su promotor afecta su expresión, de tal manera que cuando hay menos de 25 repeticiones GT, la expresión del gen se ve aumentada. Este gen está relacionado con el aneurisma aórtico abdominal y su sobreexpresión se considera un factor antiinflamatorio en el desarrollo de esta patología (Schillinger et al. 2002). En este caso, el efecto de la longitud del microsatélite sobre la expresión génica es contrario al observado con DAX1.

Como discutiremos más adelante en detalle, DAX1 es un regulador del ciclo celular en tumores de Ewing, y su expresión es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. Por lo tanto, mayores niveles de expresión de DAX1, pueden correlacionar con un mayor índice proliferativo. Si los niveles de expresión de DAX1, están además en función del número de repeticiones GGAA presentes en su promotor, entonces, el número de repeticiones GGAA podría tener implicaciones pronósticas. Estudios preliminares llevados a cabo en una serie pequeña de tumores indican que el tamaño de la región polimórfica varía entre 22 y 26 repeticiones GGAA, siendo los alelos más frecuentes los correspondientes a 23, 24 y 25 repeticiones. Ya que estos alelos correlacionaron en células de Ewing con niveles elevados de

DAX1, es poco probable que en la muestra tumoral estudiada se encuentren diferencias significativas en los niveles de expresión de DAX1. Será necesario incrementar el número de tumores analizados para identificar casos con un menor número de repeticiones, con el objeto de confirmar la correlación observada entre el número de repeticiones GGAA y los niveles de expresión de DAX1 en tumores y valorar su posible valor pronóstico.

Papel oncogénico de DAX1 en los tumores de Ewing.

El hecho que DAX1 sea una diana directa de la oncoproteína EWS/FLI1, y que su expresión sea elevada en células y tumores de Ewing sugiere que DAX1 puede desempeñar un papel relevante en el desarrollo de los tumores de Ewing. Para profundizar en este aspecto, estudiamos el papel funcional de DAX1 en los tumores de Ewing mediante el empleo de sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible (a partir de la expresión inducible de shRNAs) establecidos en líneas celulares derivadas de tumores de Ewing. El sistema elegido presenta varias ventajas entre las que cabe destacar una mayor reproducibilidad y la posibilidad de realizar estudios a largo plazo, en comparación con los sistemas convencionales de transfección transitoria de ARNs de interferencia y la posibilidad de estudiar proteínas cuya expresión sea vital para la célula, lo cual no puede ser llevado a cabo con los sistemas de expresión constitutiva de shRNAs.

La primera conclusión a la que podemos llegar con el empleo de estos sistemas modelo, es que el silenciamiento de EWS/FLI1 provoca una acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular y en consecuencia una disminución de la proliferación celular. Este hecho confirma resultados previos de otros grupos utilizando distintas aproximaciones metodológicas, tales como la expresión constitutiva de cDNA antisentido o la transfección transitoria de ARNs de interferencia frente a EWS/FLI1 (Dohjima et al. 2003; Prieur et al. 2004; Tanaka et al. 1997). Estos estudios demuestran que el silenciamiento de EWS/FLI1 produce alteraciones en la expresión de factores reguladores del ciclo celular (como las ciclinas D1 y E), produciendo un arresto de las células en G0/G1 (Matsumoto et al. 2001).

Una de las contribuciones más importantes de esta Tesis es la demostración que el silenciamiento de DAX1 produce un efecto similar sobre la proliferación celular. De este modo, el silenciamiento de DAX1 produjo también una acumulación de las células de Ewing en la fase G1 del ciclo celular y por tanto redujo su proliferación. Hay que tener en cuenta que el silenciamiento de DAX1 no tuvo efectos sobre los niveles de expresión de EWS/FLI1, y por tanto, los efectos observados tras el silenciamiento de DAX1 deben ser exclusivamente atribuidos a esta proteína. Interesantemente, los efectos del silenciamiento de EWS/FLI1 y de

DAX1 sobre la proliferación celular fueron cuantitativamente comparables. En este sentido, nuestros resultados son especialmente relevantes, por que indican que el efecto que EWS/FLI1 tiene sobre la proliferación de las células de Ewing parece estar principalmente mediado por DAX1.

Los estudios de formación de focos de crecimiento en agar vienen también a corroborar el papel de DAX1 en la proliferación de las células de Ewing. Así, el silenciamiento de EWS/FLI1 produjo una reducción significativa tanto en el número de colonias creciendo en medio semisólido como en su tamaño medio. Cabe resaltar que el silenciamiento de DAX1 solo produjo una reducción en el tamaño de las mismas, lo que sugiere que DAX1 es importante para la proliferación de las células de Ewing, pero no para su capacidad transformante propiamente dicha (capacidad de crecer independientemente de anclaje).

Por otro lado, el silenciamiento de EWS/FLI1 o DAX1, inhibieron significativamente la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos. El efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre el crecimiento tumoral ha sido bien establecido en otros estudios. Por ejemplo, la utilización de un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARNm de EWS/FLI1 (Tanaka et al. 1997), o la utilización de un ARN de interferencia retroviral frente a EWS/FLI1 redujo el crecimiento de tumores en ratones atímicos (Owen and Lessnick 2006). Lo interesante de nuestro trabajo es que el silenciamiento de DAX1 también provocó una reducción muy importante en el crecimiento tumoral *in vivo*, comparable a la observada tras el silenciamiento de EWS/FLI1. Todos estos hechos indican que DAX1 desempeña un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing.

DAX1 y EWS/FLI1 regulan un mismo grupo de genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular.

Una vez demostrado que DAX1 desempeña un papel importante en el control de la proliferación celular de las células de Ewing, intentamos estudiar su posible mecanismo de acción. DAX1 es un potente represor transcripcional implicado en la regulación negativa de la síntesis de esteroides (Ito et al. 1997; Zazopoulos et al. 1997). Aunque la función de DAX1 en los tumores de Ewing no guarde relación con esta actividad fisiológica de DAX1, pensamos que DAX1 podría seguir actuando como un regulador transcripcional en tumores de Ewing. Por esta razón, analizamos el perfil de expresión génica regulado por DAX1 y lo comparamos al regulado por EWS/FLI1. Para ello, empleamos los sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible y micromatrices de oligonucleótidos (*microarrays*).

Estos estudios indicaron que aproximadamente un 10% de los genes regulados por EWS/FLI1 eran genes diana de DAX1. Este dato sugiere que una parte importante de los efectos de EWS/FLI1 sobre la fisiología de las células de Ewing podrían ser mediados por DAX1. Uno de estos efectos, tal y como hemos concluido en los párrafos anteriores, es el control de la proliferación celular. Un análisis más detallado de los resultados de los *microarrays*, utilizando varias herramientas bioinformáticas, corroboró la relación de DAX1 con el control de la proliferación. Así, de entre los genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1, destacaron aquellos implicados en la regulación de la proliferación celular y especialmente aquellos implicados en la regulación de la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.

El ciclo celular se divide en cuatro fases denominadas G1, S, G2 y M (Figura 28) (Taya 1997). En la fase S o de síntesis las células generan una copia de su material genético. En la fase M todos los componentes celulares se reparten a partes iguales entre las dos células hijas. Las dos fases G, o fases “gap”, son puntos preparatorios necesarios para completar satisfactoriamente las otras dos fases. La transición G1/S está regulada principalmente por la ciclina D1, que se une y activa a CDK4 y CDK6 y por la ciclina E que se une y activa CDK2. El complejo ciclina D1-CDK4 fosforila la proteína de retinoblastoma, permitiendo la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. La ciclina E, una subunidad reguladora de CDK2 también controla la transición G1/S (Keyomarsi et al. 1995). Por otro lado sabemos que los inhibidores de CDKs, p21, p27 y p57 inhiben la actividad kinasa de los complejos ciclina D-CDK4/6 y el complejo ciclina E-CDK2 (Gu et al. 1993). A su vez, SKP2 regula los niveles de estos inhibidores de CDKs, regulando su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (Assoian and Yung 2008; Bryant et al. 2006).

Ya que el silenciamiento de EWS/FLI1 produce un bloqueo del ciclo celular en la fase G1 y por tanto una disminución de la proliferación, tal y como ha quedado demostrado en esta Tesis y por otros autores (Tanaka et al. 1997), parece lógico pensar que EWS/FLI1 regule la expresión y/o actividad de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Matsumoto et al. 2001). Así, los resultados obtenidos mediante los estudios llevados a cabo con *microarrays* demuestran que varios de los genes que desempeñan funciones claves en el ciclo celular (como por ejemplo *ciclina E*, *CDC6*, *MCM10*, *CDK2*, *CDK4* o *SKP2*) son genes regulados por EWS/FLI1. Cabe resaltar que estos mismos genes son genes regulados por DAX1, indicando que EWS/FLI1 regula la expresión de estos genes a través de DAX1.

Uno de los genes regulados por DAX1, probablemente más interesantes, es *SKP2*. *SKP2* es una proteína F-box implicada en la degradación dependiente de ubiquitina de miembros de las familias KIP y CIP de inhibidores de CDKs (Assoian and Yung 2008; Bryant

et al. 2006). De este modo, niveles elevados de SKP2 promueven la transición G1/S y en consecuencia la proliferación, al disminuir los niveles de inhibidores de CDKs. Nuestros resultados indican que DAX1 es necesario para mantener los niveles de SKP2 elevados, ya que el silenciamiento de DAX1 reduce sus niveles drásticamente en las células de Ewing A673. El mecanismo exacto a través del cual DAX1 regula la expresión de SKP2 es desconocido, pero dada la importancia que SKP2 juega en la transición G1/S del ciclo celular, su desciframiento ayudará a comprender mejor como DAX1 regula la proliferación en las células de Ewing.

DAX1 afecta a la proliferación de las células de Ewing, regulando específicamente la expresión de genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular, pero no parece afectar a otras rutas. Así, mientras *IGFBP3* y *TGFBR2*, dos de los genes diana de EWS/FLI1 mejor estudiados (Hahm 1999; Prieur et al. 2004), aumentan su expresión tras silenciar EWS/FLI1, estos no sufren cambios significativos tras el silenciamiento de DAX1. Esto nos indica que el arresto del ciclo celular que se produce tras el silenciamiento de DAX1 no está mediado por estos dos genes. Este hecho refuerza la importancia de DAX1 en la fisiopatología de los tumores de Ewing e indica que el efecto de DAX1 sobre la proliferación de las células de Ewing es independiente de la vía IGF/Akt y del mecanismo de arresto del crecimiento dependiente de TGF- β .

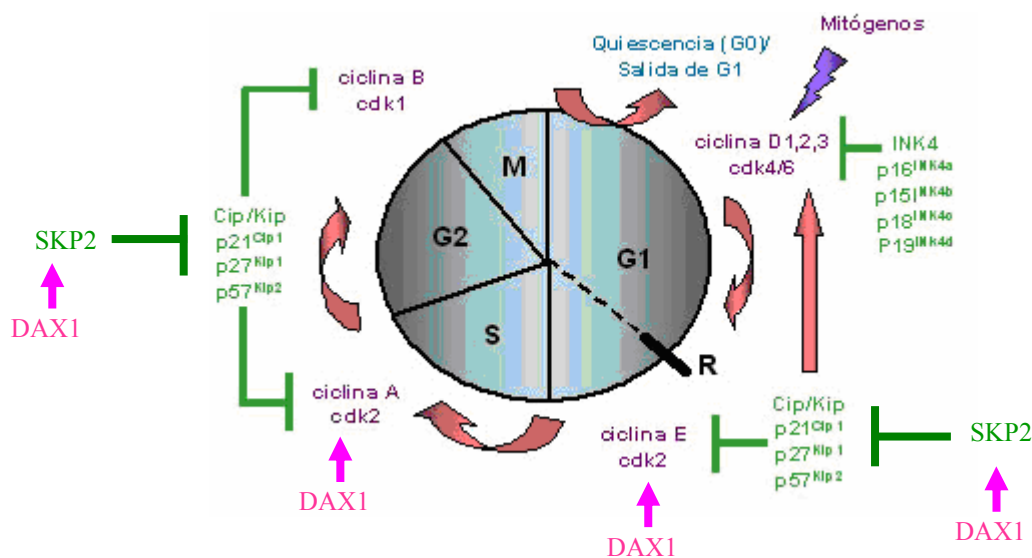


Figura 28. Esquema del ciclo celular mostrando algunos de los genes regulados por DAX1. El ciclo celular consta de cuatro fases: la fase S donde se sintetiza el ADN, la fase M donde la célula se divide en dos y las dos fases G o “gap” que son puntos reguladores de las dos fases anteriores. En cada una de las fases hay múltiples genes implicados, pero solo se muestran los más representativos en el contexto de esta Tesis. En nuestro caso nos interesan el grupo de genes implicados en la transición G1/S que están regulados por EWS/FLI1 y por DAX1, como es el caso de la *ciclina E* y *CDK2*. Estos complejos ciclinas/CDKs son a su vez inactivados por los inhibidores de ciclinas *p21^{cip1}*, *p27^{kip1}* y *p57^{kip2}*, cuyos niveles son regulados por *SKP2*, que a su vez es inducido por DAX1 en las células de Ewing. De esta manera, DAX1 puede favorecer la transición G1/S del ciclo celular y la proliferación celular.

El efecto de DAX1 sobre la proliferación es dependiente del contexto celular.

Nuestros resultados indican que el efecto de DAX1 sobre la proliferación es dependiente del contexto celular. Así, la sobreexpresión de DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32, las cuales no expresan DAX1 en condiciones basales, provocó una reducción en la tasa de la proliferación. Esto es lo contrario a lo observado en las células de Ewing, donde la expresión de DAX1 es necesaria para la proliferación celular. Este efecto fue dependiente de la actividad represora transcripcional característica de DAX1, ya que las mismas células de neuroblastoma transfectadas con un mutante que tiene esta actividad seriamente afectada (R267P), no produjo ningún efecto. El efecto inhibitorio de DAX1 sobre la proliferación de las células de neuroblastoma puede en parte ser explicado en función de los resultados de expresión génica. Con la excepción de *MCM10*, ninguno de los genes inducidos por DAX1 en células de Ewing, fue inducido por DAX1 en las células de neuroblastoma IMR32. Resultados similares fueron obtenidos con las células 293. Estos datos indican que el efecto de DAX1 sobre el perfil de expresión génica, y por tanto sobre la proliferación, son dependientes del contexto celular. Estas diferencias entre diferentes contextos celulares pueden ser debidas a la presencia de diferentes cofactores o a diferencias en la estructura de la cromatina.

¿Es DAX1 un represor transcripcional en células de Ewing?.

DAX1 es un receptor nuclear huérfano que posee una estructura peculiar formada por dos dominios: un dominio C-terminal, homólogo al dominio de unión a ligando característico de los receptores nucleares, que contiene el dominio transactivador dependiente de hormona AF-2, y un dominio amino-terminal, constituido por 3½ repeticiones de una secuencia de aminoácidos rica en Alanina y Glicina (Burriss et al. 1996). DAX1 actúa como un represor transcripcional gracias a su capacidad para interactuar con co-represores a través de su dominio C-terminal (Ito et al. 1997; Lalli et al. 1997).

Ya que DAX1 actúa como un represor transcripcional en su contexto fisiológico, quisimos analizar si mantenía esta propiedad en las células de Ewing. Para ello utilizamos unas proteínas de fusión formadas por el dominio C-terminal de DAX1 nativo y diversos mutantes, fusionados a un dominio heterólogo de unión al ADN, y analizamos el efecto de estas proteínas de fusión sobre un promotor sintético. Con la excepción de un mutante, todas las variantes de DAX1, incluyendo lógicamente el dominio C-terminal nativo, mantuvieron su actividad represora intacta cuando se transfectaron en células de Ewing. La única variante que perdió esta actividad represora, correspondió a un mutante que presentaba una delección de los últimos 19

aminoácidos del dominio C-terminal (DAX1 207-451), la cual destruye la hélice H12 donde reside el dominio AF-2 (Lehmann et al. 2003). Algunos estudios han descrito que este mutante se localiza preferentemente en el citoplasma y que está es la causa por la cual no puede actuar como un represor transcripcional al no poder translocarse al núcleo (Lehmann et al. 2002). En nuestro caso, sin embargo, todas las variantes, incluida esta, mantuvieron la misma distribución entre el núcleo y el citoplasma, por lo que la pérdida de actividad represora debe ser atribuida directamente a alteraciones en la estructura de la proteína. Estos resultados indican, por un lado, que el dominio C-terminal de DAX1 es capaz de funcionar también como un potente represor transcripcional en células de Ewing, y por otro, que la integridad de la hélice H12 y por tanto, la capacidad para interactuar con co-represores es esencial para el mantenimiento de esta actividad, como ha sido demostrado en todos los sistemas estudiados hasta la fecha (Lalli and Sassone-Corsi 2003; Lehmann et al. 2002).

Aproximadamente tres cuartas partes de los genes regulados por DAX1, entre los que se incluyen los genes reguladores de ciclo celular, resultaron ser genes inducidos. Esta observación parece entrar en contradicción con el hecho anteriormente comentado de que el dominio C-terminal de DAX1 mantenga su capacidad represora en células de Ewing, ya que si DAX1 actúa como un represor transcripcional, uno habría esperado, probablemente, un mayor porcentaje de genes reprimidos por DAX1. Existen varias alternativas que pueden explicar esta aparente contradicción. Una posibilidad es que DAX1 pudiera actuar como represor o activador transcripcional, en función de las condiciones fisiológicas, tal y como ha sido sugerido por algunos autores (Iyer and McCabe 2004). Otra posibilidad es que DAX1 actúe indirectamente sobre los genes reguladores del ciclo celular, reprimiendo la expresión de un gen diana directo que a su vez sea un regulador negativo del ciclo celular. Por último, DAX1 podría asociarse con polisomas en el citoplasma, regulando a nivel post-transcripcional la expresión de algunos genes, tal y como ha sido propuesto por otros autores (Lalli et al. 2000). En cualquier caso, la identificación de los genes diana directos de DAX1 en células de Ewing será de gran ayuda para comprender mejor su mecanismo de acción. En este sentido, estudios de “ChIP-on-Chip” o “ChIP-seq”, en combinación con estudios de expresión génica mediante *microarrays*, resultarán de gran utilidad.

¿Podría DAX1 ser una nueva diana terapéutica en los tumores de Ewing?

De los resultados presentados en esta Tesis y los trabajos previos de nuestro grupo podemos concluir que: i) DAX1 se expresa a elevados niveles en la mayoría de los tumores de Ewing, ii) DAX1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1, iii) DAX1 es necesario para la proliferación de las células de Ewing y iv) DAX1 regula la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular. Todo ello indica que DAX1 desempeña un papel importante en la oncogénesis de los tumores de Ewing y por tanto, la inhibición de su expresión y/o actividad puede representar nuevos abordajes terapéuticos en los tumores de la familia Ewing.

Una de las estrategias terapéuticas podría basarse en la inhibición de la expresión de DAX1. En esta Tesis hemos mostrado que es posible silenciar la expresión de DAX1 mediante la técnica del ARN de interferencia. Algunos estudios han mostrado que esta técnica es eficaz a la hora de silenciar la expresión de EWS/FLI1 *in vivo* en modelos animales (Carrillo et al. 2007; Kinsey et al. 2006; Owen and Lessnick 2006; Tanaka et al. 1997). Sin embargo, estas técnicas de silenciamiento génico resultan en la actualidad inviables para la práctica clínica y es necesario el desarrollo de vectores macromoleculares que faciliten el transporte específico de los ARNs de interferencia a sus tejidos diana.

Otra de las estrategias terapéuticas podría consistir en bloquear la acción de DAX1. Desafortunadamente, no existe ligando conocido de DAX1, y por tanto, no es posible actuar sobre él. Sin embargo, eso no implica que no puedan ser diseñadas pequeñas moléculas que puedan actuar como ligandos sintéticos de DAX1. En este sentido, se han llegado a producir ligandos sintéticos de receptores nucleares que pueden tener el efecto contrario que los ligandos fisiológicos (Vicent et al. 2002). En cualquier caso, es probable que sea necesario un conocimiento más profundo de la estructura tridimensional de DAX1, antes de proceder al diseño de tales moléculas. Por otro lado, es muy probable que DAX1 interactúe en células de Ewing con otros factores de transcripción y reguladores transcripcionales y que estas interacciones sean imprescindibles para llevar a cabo su función. En este sentido, la caracterización de estas interacciones macromoleculares será clave para diseñar moléculas capaces de bloquearlas e interferir con la función de DAX1 en las células de Ewing.

Como toda terapia, el bloqueo de la actividad de DAX1 puede tener también efectos indeseados. DAX1 se expresa en condiciones fisiológicas en los tejidos esteroideogénicos del organismo (eje hipotálamo-hipofisario-adrenales-gónadas) donde DAX1 ejerce como un regulador negativo de la síntesis de esteroides. Por lo tanto, un bloqueo de la actividad de

DAX1 llevaría consigo un desajuste hormonal caracterizado por un incremento en la síntesis de esteroides, fundamental cortisol producido por las cápsulas suprarrenales. El efecto de este desajuste hormonal sería similar a los observados con el tratamiento prolongado con corticoides (similar a un síndrome de Cushing atenuado) y en teoría desaparecería tras la interrupción del tratamiento. En cualquier caso, de ser efectiva la terapia “anti-DAX1”, es probable que las ventajas derivadas de la misma superasen a los efectos secundarios previstos.

6. Conclusiones

- 1. La oncoproteína EWS/FLI1, característica de los tumores de la familia Ewing, induce la expresión del receptor nuclear huérfano DAX1.** Utilizando sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible hemos demostrado que EWS/FLI1 induce la expresión de DAX1 en las células de tumor de Ewing A673 y SKPNDW.
- 2. DAX1 es una diana directa de EWS/FLI1.** EWS/FLI1 se une directamente a una secuencia polimórfica constituida por repeticiones de la secuencia GGAA en el promotor de DAX1, secuencia que coincide con el motivo que define los sitios de unión al ADN de los factores de transcripción de la familia ETS.
- 3. El número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de DAX1 correlaciona con sus niveles de expresión.** Esta observación sugiere que EWS/FLI1 puede unirse cooperativamente a la secuencia polimórfica, de tal forma que el número de moléculas de EWS/FLI1 unidas al promotor, estaría en función del número de repeticiones GGAA presentes en el mismo.
- 4. DAX1 desempeña un papel central en el control de la proliferación y las características tumorogénicas de las células de Ewing.** El silenciamiento de DAX1 provoca un arresto en la fase G1 del ciclo celular, disminuye la proliferación celular, y reduce la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Todo ello indica que una parte importante de los efectos producidos por EWS/FLI1 en las células de Ewing son mediados por DAX1.
- 5. EWS/FLI1 y DAX1 regulan un mismo grupo de genes implicados en la progresión del ciclo celular.** Utilizando la técnica de matrices de oligonucleótidos y a través de varios análisis bioinformáticos hemos demostrado que EWS/FLI1 y DAX1 regulan un mismo grupo de genes implicados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.
- 6. El efecto de DAX1 sobre la proliferación celular y el perfil de expresión génica es diferente en función del contexto celular.** Al contrario que en las células de Ewing, DAX1 reduce la capacidad proliferativa de las células de neuroblastoma IMR32 y no tiene efecto sobre los niveles de expresión de los genes que regulan el ciclo celular.

- 7. El dominio C-terminal de DAX1 mantiene su capacidad represora transcripcional en las células de Ewing.** Nuestros estudios indican que la hélice H12, capaz de interactuar con co-represores, es esencial para conservar esta actividad represora.

7. Bibliografía

- Abd-Elaziz, M., Akahira, J., Moriya, T., Suzuki, T., Yaegashi, N. and Sasano, H. (2003) Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: an independent prognostic factor of clinical outcome. **Cancer Sci**, **94**: 980-985.
- Agoulnik, I.U., Krause, W.C., Bingman, W.E., 3rd, Rahman, H.T., Amrikachi, M., Ayala, G.E. and Weigel, N.L. (2003) Repressors of androgen and progesterone receptor action. **J Biol Chem**, **278**: 31136-31148.
- Ahmed, A., Gilbert-Barness, E. and Lacson, A. (2004) Expression of c-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. **Pediatr Dev Pathol**, **7**: 342-347.
- Altincicek, B., Tenbaum, S.P., Dressel, U., Thormeyer, D., Renkawitz, R. and Baniahmad, A. (2000) Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. **J Biol Chem**, **275**: 7662-7667.
- Ambros, I.M., Ambros, P.F., Strehl, S., Kovar, H., Gardner, H. and Salzer-Kuntschik, M. (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. **Cancer**, **67**: 1886-1893.
- Armengol, G., Tarkkanen, M., Virolainen, M., Forus, A., Valle, J., Bohling, T., Asko-Seljavaara, S., Blomqvist, C., Elomaa, I., Karaharju, E., Kivioja, A.H., Siimes, M.A., Tukiainen, E., Caballin, M.R., Myklebost, O. and Knuutila, S. (1997) Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, **75**: 1403-1409.
- Arvand, A. and Denny, C.T. (2001) Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. **Oncogene**, **20**: 5747-5754.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. and Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, **25**: 25-29.
- Assoian, R.K. and Yung, Y. (2008) A reciprocal relationship between Rb and Skp2: implications for restriction point control, signal transduction to the cell cycle and cancer. **Cell Cycle**, **7**: 24-27.
- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Zucker, J.M. and Mazabraud, A. (1984) Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. **Cancer Genet Cytogenet**, **12**: 21-25.
- Baer, C., Nees, M., Breit, S., Selle, B., Kulozik, A.E., Schaefer, K.L., Braun, Y., Wai, D. and Poremba, C. (2004) Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. **Int J Cancer**, **110**: 687-694.
- Bailly, R.A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G. and Ghysdael, J. (1994) DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. **Mol Cell Biol**, **14**: 3230-3241.

- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R., Fraccaro, M. and et al. (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat Genet**, **7**: 497-501.
- Bastida, E., Escolar, G., Ordinas, A., Giardina, S.L. and Jamieson, G.A. (1985) Effects of divalent cations on the interaction of platelets with tumor cells: aggregation and perfusion studies with two homologous human systems. **J Lab Clin Med**, **106**: 68-74.
- Benini, S., Manara, M.C., Baldini, N., Cerisano, V., Massimo, S., Mercuri, M., Lollini, P.L., Nanni, P., Picci, P. and Scotlandi, K. (2001) Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. **Clin Cancer Res**, **7**: 1790-1797.
- Black, A.R., Black, J.D. and Azizkhan-Clifford, J. (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. **J Cell Physiol**, **188**: 143-160.
- Boronat, S. and Campbell, J.L. (2008) Linking mitosis with S-phase: Cdc6 at play. **Cell Cycle**, **7**: 597-601.
- Braun, B.S., Frieden, R., Lessnick, S.L., May, W.A. and Denny, C.T. (1995) Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. **Mol Cell Biol**, **15**: 4623-4630.
- Brinckerhoff, C.E. and Matrisian, L.M. (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nat Rev Mol Cell Biol**, **3**: 207-214.
- Bryant, P., Zheng, Q. and Pumiglia, K. (2006) Focal adhesion kinase controls cellular levels of p27/Kip1 and p21/Cip1 through Skp2-dependent and -independent mechanisms. **Mol Cell Biol**, **26**: 4201-4213.
- Burris, T.P., Guo, W. and McCabe, E.R. (1996) The gene responsible for adrenal hypoplasia congenita, DAX-1, encodes a nuclear hormone receptor that defines a new class within the superfamily. **Recent Prog Horm Res**, **51**: 241-259; discussion 259-260.
- Carrillo, J., Garcia-Aragoncillo, E., Azorin, D., Agra, N., Sastre, A., Gonzalez-Mediero, I., Garcia-Miguel, P., Pestana, A., Gallego, S., Segura, D. and Alonso, J. (2007) Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. **Clin Cancer Res**, **13**: 2429-2440.
- Cavazzana, A.O., Miser, J.S., Jefferson, J. and Triche, T.J. (1987) Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. **Am J Pathol**, **127**: 507-518.
- Clipsham, R. and McCabe, E.R. (2003) DAX1 and its network partners: exploring complexity in development. **Mol Genet Metab**, **80**: 81-120.
- Clipsham, R., Niakan, K. and McCabe, E.R. (2004) Nr0b1 and its network partners are expressed early in murine embryos prior to steroidogenic axis organogenesis. **Gene Expr Patterns**, **4**: 3-14.
- Collins, T.S. and Hurwitz, H.I. (2005) Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. **Semin Oncol**, **32**: 61-68.
- Conde, I., Alfaro, J.M., Fraile, B., Ruiz, A., Paniagua, R. and Arenas, M.I. (2004) DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. **Breast Cancer Res**, **6**: R140-148.

- Coussens, L.M., Fingleton, B. and Matrisian, L.M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, **295**: 2387-2392.
- Crawford, P.A., Dorn, C., Sadovsky, Y. and Milbrandt, J. (1998) Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. **Mol Cell Biol**, **18**: 2949-2956.
- Chansky, H.A., Barahmand-Pour, F., Mei, Q., Kahn-Farooqi, W., Zielinska-Kwiatkowska, A., Blackburn, M., Chansky, K., Conrad, E.U., 3rd, Bruckner, J.D., Greenlee, T.K. and Yang, L. (2004) Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. **J Orthop Res**, **22**: 910-917.
- Dalal, S., Berry, A.M., Cullinane, C.J., Mangham, D.C., Grimer, R., Lewis, I.J., Johnston, C., Laurence, V. and Burchill, S.A. (2005) Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. **Clin Cancer Res**, **11**: 2364-2378.
- Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V., Weissman, B.E. and Delattre, O. (2001) Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. **Oncogene**, **20**: 3258-3265.
- de Alava, E., Kawai, A., Healey, J.H., Fligman, I., Meyers, P.A., Huvos, A.G., Gerald, W.L., Jhanwar, S.C., Argani, P., Antonescu, C.R., Pardo-Mindan, F.J., Ginsberg, J., Womer, R., Lawlor, E.R., Wunder, J., Andrulis, I., Sorensen, P.H., Barr, F.G. and Ladanyi, M. (1998) EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. **J Clin Oncol**, **16**: 1248-1255.
- Delattre, O., Zucman, J., Melot, T., Garau, X.S., Zucker, J.M., Lenoir, G.M., Ambros, P.F., Sheer, D., Turc-Carel, C., Triche, T.J. and et al. (1994) The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. **N Engl J Med**, **331**: 294-299.
- Deneen, B. and Denny, C.T. (2001) Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. **Oncogene**, **20**: 6731-6741.
- Deneen, B., Hamidi, H. and Denny, C.T. (2003a) Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase. **Cancer Res**, **63**: 4268-4274.
- Deneen, B., Welford, S.M., Ho, T., Hernandez, F., Kurland, I. and Denny, C.T. (2003b) PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. **Mol Cell Biol**, **23**: 3897-3908.
- Desandes, E. (2007) Survival from adolescent cancer. **Cancer Treat Rev**, **33**: 609-615.
- Dohjima, T., Lee, N.S., Li, H., Ohno, T. and Rossi, J.J. (2003) Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/FlI-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. **Mol Ther**, **7**: 811-816.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, **2**: 161-174.
- Ewing, J. (1921) Diffuse endotelioma of bone. **Proc NY Pathol Soc**, **2**: 17-24.

- Finkenzeller, G., Sparacio, A., Technau, A., Marme, D. and Siemeister, G. (1997) Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. **Oncogene**, **15**: 669-676.
- Firth, S.M. and Baxter, R.C. (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocr Rev**, **23**: 824-854.
- Flick, D.A. and Gifford, G.E. (1984) Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **J Immunol Methods**, **68**: 167-175.
- Folpe, A.L., Hill, C.E., Parham, D.M., O'Shea, P.A. and Weiss, S.W. (2000) Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. **Am J Surg Pathol**, **24**: 1657-1662.
- Frolik, C.A., Roller, P.P., Cone, J.L., Dart, L.L., Smith, D.M. and Sporn, M.B. (1984) Inhibition of transforming growth factor-induced cell growth in soft agar by oxidized polyamines. **Arch Biochem Biophys**, **230**: 93-102.
- Fuchs, B., Inwards, C., Scully, S.P. and Janknecht, R. (2004a) hTERT is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. **Clin Orthop Relat Res**: 64-68.
- Fuchs, B., Inwards, C.Y. and Janknecht, R. (2003) Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300. **FEBS Lett**, **553**: 104-108.
- Fuchs, B., Inwards, C.Y. and Janknecht, R. (2004b) Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. **Clin Cancer Res**, **10**: 1344-1353.
- Fukuma, M., Okita, H., Hata, J. and Umezawa, A. (2003) Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. **Oncogene**, **22**: 1-9.
- Fults, D., Pedone, C.A., Morse, H.G., Rose, J.W. and McKay, R.D. (1992) Establishment and characterization of a human primitive neuroectodermal tumor cell line from the cerebral hemisphere. **J Neuropathol Exp Neurol**, **51**: 272-280.
- Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P.C., Kinsey, M., Haroldsen, S.C., Shah, A.A., Boucher, K.M., Watkins, W.S., Jorde, L.B., Graves, B.J. and Lessnick, S.L. (2008) Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **105**: 10149-10154.
- Garcia-Aragoncillo, E., Carrillo, J., Lalli, E., Agra, N., Gomez-Lopez, G., Pestana, A. and Alonso, J. (2008) DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. **Oncogene**.
- Gascoyne, D.M., Thomas, G.R. and Latchman, D.S. (2004) The effects of Brn-3a on neuronal differentiation and apoptosis are differentially modulated by EWS and its oncogenic derivative EWS/Fli-1. **Oncogene**, **23**: 3830-3840.
- Gelin, C., Aubrit, F., Phalipon, A., Raynal, B., Cole, S., Kaczorek, M. and Bernard, A. (1989) The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. **EMBO J**, **8**: 3253-3259.

- Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. **Endocr Rev**, **20**: 689-725.
- Ginsberg, J.P., de Alava, E., Ladanyi, M., Wexler, L.H., Kovar, H., Paulussen, M., Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Juergens, H., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Malik, R., Sorensen, P.H., Womer, R.B. and Barr, F.G. (1999) EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. **J Clin Oncol**, **17**: 1809-1814.
- Giovannini, M., Biegel, J.A., Serra, M., Wang, J.Y., Wei, Y.H., Nycum, L., Emanuel, B.S. and Evans, G.A. (1994) EWS-erg and EWS-Flil fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. **J Clin Invest**, **94**: 489-496.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, **36**: 59-74.
- Grier, H.E. (1997) The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. **Pediatr Clin North Am**, **44**: 991-1004.
- Grimberg, A. (2003) Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. **Cancer Biol Ther**, **2**: 630-635.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. **Nature**, **366**: 707-710.
- Guan, H., Zhou, Z., Wang, H., Jia, S.F., Liu, W. and Kleinerman, E.S. (2005) A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. **Clin Cancer Res**, **11**: 2662-2669.
- Guo, W., Burris, T.P., Zhang, Y.H., Huang, B.L., Mason, J., Copeland, K.C., Kupfer, S.R., Pagon, R.A. and McCabe, E.R. (1996) Genomic sequence of the DAX1 gene: an orphan nuclear receptor responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Endocrinol Metab**, **81**: 2481-2486.
- Guo, W., Mason, J.S., Stone, C.G., Jr., Morgan, S.A., Madu, S.I., Baldini, A., Lindsay, E.A., Biesecker, L.G., Copeland, K.C., Horlick, M.N. and et al. (1995) Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. **JAMA**, **274**: 324-330.
- Habiby, R.L., Boepple, P., Nachtigall, L., Sluss, P.M., Crowley, W.F., Jr. and Jameson, J.L. (1996) Adrenal hypoplasia congenita with hypogonadotropic hypogonadism: evidence that DAX-1 mutations lead to combined hypothalamic and pituitary defects in gonadotropin production. **J Clin Invest**, **98**: 1055-1062.
- Hahm, K.B. (1999) Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. **Nat Genet**, **23**: 481.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. **Cell**, **100**: 57-70.
- Hattinger, C.M., Rumpler, S., Strehl, S., Ambros, I.M., Zoubek, A., Potechger, U., Gadner, H. and Ambros, P.F. (1999) Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, **24**: 243-254.
- Hattinger, C.M., Zoubek, A. and Ambros, P.F. (2000) Molecular Cytogenetics in Ewing Tumors: Diagnostic and Prognostic Information. **Onkologie**, **23**: 416-422.

- Helson, L., Weinberger, C., Helson, C. and Lieberman, P. (1984) Neuroectodermal tumor and monoclonal antibodies. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, **6**: 227-231.
- Hendershot, E. (2005) Treatment approaches for metastatic Ewing's sarcoma: a review of the literature. **J Pediatr Oncol Nurs**, **22**: 339-352.
- Hershko, D.D. (2008) Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. **Cancer**, **112**: 1415-1424.
- Hibshoosh, H. and Lattes, R. (1997) Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. **Semin Oncol**, **24**: 515-525.
- Hiyama, E. and Hiyama, K. (2003) Telomerase as tumor marker. **Cancer Lett**, **194**: 221-233.
- Holter, E., Kotaja, N., Makela, S., Strauss, L., Kietz, S., Janne, O.A., Gustafsson, J.A., Palvimo, J.J. and Treuter, E. (2002) Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. **Mol Endocrinol**, **16**: 515-528.
- Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C. and Graves, B.J. (2007) Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. **Genes Dev**, **21**: 1882-1894.
- Hosack, D.A., Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C. and Lempicki, R.A. (2003) Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biol**, **4**: R70.
- Hossain, A., Li, C. and Saunders, G.F. (2004) Generation of two distinct functional isoforms of dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1) by alternative splicing. **Mol Endocrinol**, **18**: 1428-1437.
- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. and Triche, T.J. (2005) Sequence-Specific Knockdown of EWS-FLI1 by Targeted, Nonviral Delivery of Small Interfering RNA Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Metastatic Ewing's Sarcoma. **Cancer Res**, **65**: 8984-8992.
- Ikuyama, S., Mu, Y.M., Ohe, K., Nakagaki, H., Fukushima, T., Takayanagi, R. and Nawata, H. (1998) Expression of an orphan nuclear receptor DAX-1 in human pituitary adenomas. **Clin Endocrinol (Oxf)**, **48**: 647-654.
- Im, Y.H., Kim, H.T., Lee, C., Poulin, D., Welford, S., Sorensen, P.H., Denny, C.T. and Kim, S.J. (2000) EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. **Cancer Res**, **60**: 1536-1540.
- Ito, M., Yu, R. and Jameson, J.L. (1997) DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. **Mol Cell Biol**, **17**: 1476-1483.
- Iyer, A.K. and McCabe, E.R. (2004) Molecular mechanisms of DAX1 action. **Mol Genet Metab**, **83**: 60-73.
- Jaishankar, S., Zhang, J., Roussel, M.F. and Baker, S.J. (1999) Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. **Oncogene**, **18**: 5592-5597.
- Janknecht, R. (2004) On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. **FEBS Lett**, **564**: 9-13.

- Janknecht, R. (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. **Gene**, **363**: 1-14.
- Jeon, I.S., Davis, J.N., Braun, B.S., Sublett, J.E., Roussel, M.F., Denny, C.T. and Shapiro, D.N. (1995) A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. **Oncogene**, **10**: 1229-1234.
- Jimenez, P., Saner, K., Mayhew, B. and Rainey, W.E. (2003) GATA-6 is expressed in the human adrenal and regulates transcription of genes required for adrenal androgen biosynthesis. **Endocrinology**, **144**: 4285-4288.
- Jones, F.S. and Jones, P.L. (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. **Dev Dyn**, **218**: 235-259.
- Kaneko, Y., Yoshida, K., Handa, M., Toyoda, Y., Nishihira, H., Tanaka, Y., Sasaki, Y., Ishida, S., Higashino, F. and Fujinaga, K. (1996) Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. **Genes Chromosomes Cancer**, **15**: 115-121.
- Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, M. and Morohashi, K. (2003) Role of the LXXLL-motif and activation function 2 domain in subcellular localization of Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1). **Mol Endocrinol**, **17**: 994-1004.
- Keyomarsi, K., Conte, D., Jr., Toyofuku, W. and Fox, M.P. (1995) Dereglulation of cyclin E in breast cancer. **Oncogene**, **11**: 941-950.
- Khan, J., Wei, J.S., Ringner, M., Saal, L.H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C.R., Peterson, C. and Meltzer, P.S. (2001) Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. **Nat Med**, **7**: 673-679.
- Kim, G.E., Beach, B., Gastier-Foster, J.M., Murata-Collins, J.L., Rowland, J.M., O'Donnell, R.J. and Goldsby, R.E. (2005) Ewing sarcoma as a second malignant neoplasm after acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, **45**: 57-59.
- Kinsey, M., Smith, R. and Lessnick, S.L. (2006) NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. **Mol Cancer Res**, **4**: 851-859.
- Kolb, E.A., Gorlick, R., Houghton, P.J., Morton, C.L., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C.P., Maris, J.M., Keir, S.T., Billups, C.A. and Smith, M.A. (2008) Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program. **Pediatr Blood Cancer**, **50**: 1190-1197.
- Kovar, H. (1998) Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. **Curr Opin Oncol**, **10**: 334-342.
- Kovar, H., Aryee, D.N., Jug, G., Henockl, C., Schemper, M., Delattre, O., Thomas, G. and Gadner, H. (1996) EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. **Cell Growth Differ**, **7**: 429-437.
- Kovar, H., Ban, J. and Pospisilova, S. (2003) Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. **Semin Cancer Biol**, **13**: 275-281.

- Kovar, H., Dworzak, M., Strehl, S., Schnell, E., Ambros, I.M., Ambros, P.F. and Gadner, H. (1990) Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. **Oncogene**, **5**: 1067-1070.
- Kovar, H., Jug, G., Aryee, D.N., Zoubek, A., Ambros, P., Gruber, B., Windhager, R. and Gadner, H. (1997) Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. **Oncogene**, **15**: 2225-2232.
- Lalli, E., Bardoni, B., Zazopoulos, E., Wurtz, J.M., Strom, T.M., Moras, D. and Sassone-Corsi, P. (1997) A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. **Mol Endocrinol**, **11**: 1950-1960.
- Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C. and Sassone-Corsi, P. (2000) Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. **Mol Cell Biol**, **20**: 4910-4921.
- Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (2003) DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. **Mol Endocrinol**, **17**: 1445-1453.
- Lambert, G., Bertrand, J.R., Fattal, E., Subra, F., Pinto-Alphandary, H., Malvy, C., Auclair, C. and Couvreur, P. (2000) EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, **279**: 401-406.
- Lasorella, A., Uo, T. and Iavarone, A. (2001) Id proteins at the cross-road of development and cancer. **Oncogene**, **20**: 8326-8333.
- Leavey, P.J. and Collier, A.B. (2008) Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment. **Expert Rev Anticancer Ther**, **8**: 617-624.
- Lehmann, S.G., Lalli, E. and Sassone-Corsi, P. (2002) X-linked adrenal hypoplasia congenita is caused by abnormal nuclear localization of the DAX-1 protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **99**: 8225-8230.
- Lehmann, S.G., Wurtz, J.M., Renaud, J.P., Sassone-Corsi, P. and Lalli, E. (2003) Structure-function analysis reveals the molecular determinants of the impaired biological function of DAX-1 mutants in AHC patients. **Hum Mol Genet**, **12**: 1063-1072.
- Lessnick, S.L., Braun, B.S., Denny, C.T. and May, W.A. (1995) Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. **Oncogene**, **10**: 423-431.
- Lessnick, S.L., Dacwag, C.S. and Golub, T.R. (2002) The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. **Cancer Cell**, **1**: 393-401.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, **25**: 402.
- Luo, J., Dunn, T.A., Ewing, C.M., Walsh, P.C. and Isaacs, W.B. (2003) Decreased gene expression of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. **Prostate**, **57**: 134-139.
- Maiorano, D., Lutzmann, M. and Mechali, M. (2006) MCM proteins and DNA replication. **Curr Opin Cell Biol**, **18**: 130-136.

- Manara, M.C., Landuzzi, L., Nanni, P., Nicoletti, G., Zambelli, D., Lollini, P.L., Nanni, C., Hofmann, F., Garcia-Echeverria, C., Picci, P. and Scotlandi, K. (2007) Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. **Clin Cancer Res**, **13**: 1322-1330.
- Mao, X., Miesfeldt, S., Yang, H., Leiden, J.M. and Thompson, C.B. (1994) The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. **J Biol Chem**, **269**: 18216-18222.
- Martins, A.S., Mackintosh, C., Martin, D.H., Campos, M., Hernandez, T., Ordonez, J.L. and de Alava, E. (2006) Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. **Clin Cancer Res**, **12**: 3532-3540.
- Mateo-Lozano, S., Tirado, O.M. and Notario, V. (2003) Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. **Oncogene**, **22**: 9282-9287.
- Matsumoto, Y., Tanaka, K., Nakatani, F., Matsunobu, T., Matsuda, S. and Iwamoto, Y. (2001) Downregulation and forced expression of EWS-Flil fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes. **Br J Cancer**, **84**: 768-775.
- May, W.A., Gishizky, M.L., Lessnick, S.L., Lunsford, L.B., Lewis, B.C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G. and Denny, C.T. (1993a) Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **90**: 5752-5756.
- May, W.A., Lessnick, S.L., Braun, B.S., Klemsz, M., Lewis, B.C., Lunsford, L.B., Hromas, R. and Denny, C.T. (1993b) The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. **Mol Cell Biol**, **13**: 7393-7398.
- McKeon, C., Thiele, C.J., Ross, R.A., Kwan, M., Triche, T.J., Miser, J.S. and Israel, M.A. (1988) Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. **Cancer Res**, **48**: 4307-4311.
- Meeks, J.J., Crawford, S.E., Russell, T.A., Morohashi, K., Weiss, J. and Jameson, J.L. (2003a) Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. **Development**, **130**: 1029-1036.
- Meeks, J.J., Weiss, J. and Jameson, J.L. (2003b) Dax1 is required for testis determination. **Nat Genet**, **34**: 32-33.
- Mendiola, M., Carrillo, J., Garcia, E., Lalli, E., Hernandez, T., de Alava, E., Tirode, F., Delattre, O., Garcia-Miguel, P., Lopez-Barea, F., Pestana, A. and Alonso, J. (2006) The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. **Int J Cancer**, **118**: 1381-1389.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N. and Koutsilieris, M. (2004) The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. **Curr Cancer Drug Targets**, **4**: 235-256.
- Miyagawa, Y., Okita, H., Nakajima, H., Horiuchi, Y., Sato, B., Taguchi, T., Toyoda, M., Katagiri, Y.U., Fujimoto, J., Hata, J., Umezawa, A. and Kiyokawa, N. (2008) Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. **Mol Cell Biol**, **28**: 2125-2137.

- Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H.T., Ananth, S. and Sukhatme, V.P. (1997) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. **Mol Cell Biol**, **17**: 5629-5639.
- Muller, A.J., Young, J.C., Pendergast, A.M., Pondel, M., Landau, N.R., Littman, D.R. and Witte, O.N. (1991) BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. **Mol Cell Biol**, **11**: 1785-1792.
- Murray, A.W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell**, **116**: 221-234.
- Nakatani, F., Tanaka, K., Sakimura, R., Matsumoto, Y., Matsunobu, T., Li, X., Hanada, M., Okada, T. and Iwamoto, Y. (2003) Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. **J Biol Chem**, **278**: 15105-15115.
- Nakayama, K.I. and Nakayama, K. (2005) Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. **Semin Cell Dev Biol**, **16**: 323-333.
- Nishimori, H., Sasaki, Y., Yoshida, K., Irifune, H., Zembutsu, H., Tanaka, T., Aoyama, T., Hosaka, T., Kawaguchi, S., Wada, T., Hata, J., Toguchida, J., Nakamura, Y. and Tokino, T. (2002) The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. **Oncogene**, **21**: 8302-8309.
- Noguera, R., Triche, T.J., Navarro, S., Tsokos, M. and Llombart-Bosch, A. (1992) Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphologic, immunocytochemical, and oncogene expression parameters. **Lab Invest**, **66**: 143-151.
- O'Regan, S., Diebler, M.F., Meunier, F.M. and Vyas, S. (1995) A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. **J Neurochem**, **64**: 69-76.
- Ohali, A., Avigad, S., Cohen, I.J., Meller, I., Kollender, Y., Issakov, J., Goshen, Y., Yaniv, I. and Zaizov, R. (2004) High frequency of genomic instability in Ewing family of tumors. **Cancer Genet Cytogenet**, **150**: 50-56.
- Ohno, T., Rao, V.N. and Reddy, E.S. (1993) EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. **Cancer Res**, **53**: 5859-5863.
- Ouchida, M., Ohno, T., Fujimura, Y., Rao, V.N. and Reddy, E.S. (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. **Oncogene**, **11**: 1049-1054.
- Overall, C.M. and Lopez-Otin, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, **2**: 657-672.
- Owen, L.A. and Lessnick, S.L. (2006) Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. **Cell Cycle**, **5**: 2049-2053.
- Paulussen, M., Frohlich, B. and Jurgens, H. (2001) Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. **Paediatr Drugs**, **3**: 899-913.
- Peng, N., Kim, J.W., Rainey, W.E., Carr, B.R. and Attia, G.R. (2003) The role of the orphan nuclear receptor, liver receptor homologue-1, in the regulation of human corpus luteum 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. **J Clin Endocrinol Metab**, **88**: 6020-6028.

- Perlman, E.J., Dickman, P.S., Askin, F.B., Grier, H.E., Miser, J.S. and Link, M.P. (1994) Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. **Hum Pathol**, **25**: 304-307.
- Peter, M., Couturier, J., Pacquement, H., Michon, J., Thomas, G., Magdelenat, H. and Delattre, O. (1997) A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. **Oncogene**, **14**: 1159-1164.
- Pollak, M.N. (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. **Novartis Found Symp**, **262**: 84-98; discussion 98-107, 265-108.
- Potikyan, G., Savene, R.O., Gaulden, J.M., France, K.A., Zhou, Z., Kleinerman, E.S., Lessnick, S.L. and Denny, C.T. (2007) EWS/FLI1 regulates tumor angiogenesis in Ewing's sarcoma via suppression of thrombospondins. **Cancer Res**, **67**: 6675-6684.
- Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P. and Delattre, O. (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. **Mol Cell Biol**, **24**: 7275-7283.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Lalli, E., Arlt, W., Vay, S., Sassone-Corsi, P. and Allolio, B. (1998) DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, **83**: 2597-2600.
- Riggi, N., Suva, M.L., Suva, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J.M., Stehle, J.C., Baumer, K., Kindler, V. and Stamenkovic, I. (2008) EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. **Cancer Res**, **68**: 2176-2185.
- Rorie, C.J., Thomas, V.D., Chen, P., Pierce, H.H., O'Bryan, J.P. and Weissman, B.E. (2004) The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. **Cancer Res**, **64**: 1266-1277.
- Ruzinova, M.B. and Benezra, R. (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. **Trends Cell Biol**, **13**: 410-418.
- Scotlandi, K. (2006) Targeted therapies in Ewing's sarcoma. **Adv Exp Med Biol**, **587**: 13-22.
- Scotlandi, K., Manara, M.C., Nicoletti, G., Lollini, P.L., Lukas, S., Benini, S., Croci, S., Perdichizzi, S., Zambelli, D., Serra, M., Garcia-Echeverria, C., Hofmann, F. and Picci, P. (2005) Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. **Cancer Res**, **65**: 3868-3876.
- Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Bernard, G., Nicoletti, G., Nanni, P., Lollini, P.L., Curti, A., Manara, M.C., Benini, S., Bernard, A. and Picci, P. (2006) Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. **Eur J Cancer**, **42**: 91-96.
- Schillinger, M., Exner, M., Mlekusch, W., Domanovits, H., Huber, K., Mannhalter, C., Wagner, O. and Minar, E. (2002) Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. **Thromb Res**, **106**: 131-136.
- Seth, A. and Watson, D.K. (2005) ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. **Eur J Cancer**, **41**: 2462-2478.

- Sharrocks, A.D. (2001) The ETS-domain transcription factor family. **Nat Rev Mol Cell Biol**, **2**: 827-837.
- Shing, D.C., McMullan, D.J., Roberts, P., Smith, K., Chin, S.F., Nicholson, J., Tillman, R.M., Ramani, P., Cullinane, C. and Coleman, N. (2003) FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. **Cancer Res**, **63**: 4568-4576.
- Siligan, C., Ban, J., Bachmaier, R., Spahn, L., Kreppel, M., Schaefer, K.L., Poremba, C., Aryee, D.N. and Kovar, H. (2005) EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. **Oncogene**, **24**: 2512-2524.
- Sohn, H.W., Choi, E.Y., Kim, S.H., Lee, I.S., Chung, D.H., Sung, U.A., Hwang, D.H., Cho, S.S., Jun, B.H., Jang, J.J., Chi, J.G. and Park, S.H. (1998) Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells. **Am J Pathol**, **153**: 1937-1945.
- Song, K.H., Park, Y.Y., Park, K.C., Hong, C.Y., Park, J.H., Shong, M., Lee, K. and Choi, H.S. (2004) The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. **Mol Endocrinol**, **18**: 1929-1940.
- Sorensen, P.H., Lessnick, S.L., Lopez-Terrada, D., Liu, X.F., Triche, T.J. and Denny, C.T. (1994) A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. **Nat Genet**, **6**: 146-151.
- Staeger, M.S., Hansen, G., Baersch, G. and Burdach, S. (2004a) Functional and molecular characterization of interleukin-2 transgenic Ewing tumor cells for in vivo immunotherapy. **Pediatr Blood Cancer**, **43**: 23-34.
- Staeger, M.S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U.E., Hansen, G., Afar, D. and Burdach, S.E. (2004b) DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. **Cancer Res**, **64**: 8213-8221.
- Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Montecino, M., Zaidi, S.K. and Braastad, C. (2006) An architectural perspective of cell-cycle control at the G1/S phase cell-cycle transition. **J Cell Physiol**, **209**: 706-710.
- Stiller, C.A. and Parkin, D.M. (1996) Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. **Br Med Bull**, **52**: 682-703.
- Strammiello, R., Benini, S., Manara, M.C., Perdichizzi, S., Serra, M., Spisni, E., Picci, P. and Scotlandi, K. (2003) Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. **Horm Metab Res**, **35**: 675-684.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. and Mesirov, J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **102**: 15545-15550.
- Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. **Gene**, **238**: 291-300.
- Suzuki, T., Kasahara, M., Yoshioka, H., Morohashi, K. and Umesono, K. (2003) LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Mol Cell Biol**, **23**: 238-249.

- Suzuki, T., Kasahara, M., Yoshioka, H., Umesono, K. and Morohashi, K. (2002) LXXLL motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Endocr Res**, **28**: 537.
- Szymczyna, B.R. and Arrowsmith, C.H. (2000) DNA binding specificity studies of four ETS proteins support an indirect read-out mechanism of protein-DNA recognition. **J Biol Chem**, **275**: 28363-28370.
- Tabarin, A., Achermann, J.C., Recan, D., Bex, V., Bertagna, X., Christin-Maitre, S., Ito, M., Jameson, J.L. and Bouchard, P. (2000) A novel mutation in DAX1 causes delayed-onset adrenal insufficiency and incomplete hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Invest**, **105**: 321-328.
- Takahashi, A., Higashino, F., Aoyagi, M., Yoshida, K., Itoh, M., Kyo, S., Ohno, T., Taira, T., Ariga, H., Nakajima, K., Hatta, M., Kobayashi, M., Sano, H., Kohgo, T. and Shindoh, M. (2003) EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. **Cancer Res**, **63**: 8338-8344.
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. and Arai, N. (1988) SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. **Mol Cell Biol**, **8**: 466-472.
- Tanaka, K., Iwakuma, T., Harimaya, K., Sato, H. and Iwamoto, Y. (1997) EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. **J Clin Invest**, **99**: 239-247.
- Taya, Y. (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. **Trends Biochem Sci**, **22**: 14-17.
- Thompson, A.D., Teitell, M.A., Arvand, A. and Denny, C.T. (1999) Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. **Oncogene**, **18**: 5506-5513.
- Tirado, O.M., Mateo-Lozano, S., Villar, J., Dettin, L.E., Llorca, A., Gallego, S., Ban, J., Kovar, H. and Notario, V. (2006) Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. **Cancer Res**, **66**: 9937-9947.
- Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P. and Delattre, O. (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. **Cancer Cell**, **11**: 421-429.
- Toretsky, J.A., Connell, Y., Neckers, L. and Bhat, N.K. (1997) Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. **J Neurooncol**, **31**: 9-16.
- Triche, T.J. (1988) Diagnosis of small round cell tumors of childhood. **Bull Cancer**, **75**: 297-310.
- Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J. and Greene, A.E. (1970) Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. **Cancer Res**, **30**: 2110-2118.
- Turc-Carel, C., Philip, I., Berger, M.P., Philip, T. and Lenoir, G.M. (1984) Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). **Cancer Genet Cytogenet**, **12**: 1-19.

- Urano, F., Umezawa, A., Hong, W., Kikuchi, H. and Hata, J. (1996) A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. **Biochem Biophys Res Commun**, **219**: 608-612.
- Vicent, G.P., Pecci, A., Ghini, A., Piwien-Pilipuk, G. and Galigniana, M.D. (2002) Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses. **Exp Cell Res**, **276**: 142-154.
- Wai, D.H., Schaefer, K.L., Schramm, A., Korsching, E., Van Valen, F., Ozaki, T., Boecker, W., Schweigerer, L., Dockhorn-Dworniczak, B. and Poremba, C. (2002) Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. **Int J Oncol**, **20**: 441-451.
- Wanzel, M., Herold, S. and Eilers, M. (2003) Transcriptional repression by Myc. **Trends Cell Biol**, **13**: 146-150.
- Wasyluk, B., Hahn, S.L. and Giovane, A. (1993) The Ets family of transcription factors. **Eur J Biochem**, **211**: 7-18.
- Watanabe, G., Nishimori, H., Irifune, H., Sasaki, Y., Ishida, S., Zembutsu, H., Tanaka, T., Kawaguchi, S., Wada, T., Hata, J., Kusakabe, M., Yoshida, K., Nakamura, Y. and Tokino, T. (2003) Induction of tenascin-C by tumor-specific EWS-ETS fusion genes. **Genes Chromosomes Cancer**, **36**: 224-232.
- Welford, S.M., Hebert, S.P., Deneen, B., Arvand, A. and Denny, C.T. (2001) DNA binding domain-independent pathways are involved in EWS/FLI1-mediated oncogenesis. **J Biol Chem**, **276**: 41977-41984.
- West, D.C. (2000) Ewing sarcoma family of tumors. **Curr Opin Oncol**, **12**: 323-329.
- West, D.C., Grier, H.E., Swallow, M.M., Demetri, G.D., Granowetter, L. and Sklar, J. (1997) Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. **J Clin Oncol**, **15**: 583-588.
- Whang-Peng, J., Triche, T.J., Knutsen, T., Miser, J., Douglass, E.C. and Israel, M.A. (1984) Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. **N Engl J Med**, **311**: 584-585.
- Yabe, H., Fukuma, M., Urano, F., Yoshida, K., Kato, S., Toyama, Y., Hata, J. and Umezawa, A. (2002) Lack of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, **293**: 61-71.
- Yee, D., Favoni, R.E., Lebovic, G.S., Lombana, F., Powell, D.R., Reynolds, C.P. and Rosen, N. (1990) Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. **J Clin Invest**, **86**: 1806-1814.
- Yi, H., Fujimura, Y., Ouchida, M., Prasad, D.D., Rao, V.N. and Reddy, E.S. (1997) Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. **Oncogene**, **14**: 1259-1268.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A. and Jameson, J.L. (1998) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. **Nat Genet**, **20**: 353-357.

- Yuan, X., Lu, M.L., Li, T. and Balk, S.P. (2001) SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. **J Biol Chem**, **276**: 46647-46654.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R. and et al. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. **Nature**, **372**: 635-641.
- Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D.M. and Sassone-Corsi, P. (1997) DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. **Nature**, **390**: 311-315.
- Zebedee, Z. and Hara, E. (2001) Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. **Oncogene**, **20**: 8317-8325.
- Zhang, H., Thomsen, J.S., Johansson, L., Gustafsson, J.A. and Treuter, E. (2000) DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. **J Biol Chem**, **275**: 39855-39859.
- Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Delattre, O., Christiansen, H., Niggli, F., Gatterer-Menz, I., Smith, T.L., Jurgens, H., Gardner, H. and Kovar, H. (1996) Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? **J Clin Oncol**, **14**: 1245-1251.
- Zoubek, A., Ladenstein, R., Windhager, R., Amann, G., Fischmeister, G., Kager, L., Jugovic, D., Ambros, P.F., Gardner, H. and Kovar, H. (1998) Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. **Int J Cancer**, **79**: 56-60.
- Zoubek, A., Pfliederer, C., Salzer-Kuntschik, M., Amann, G., Windhager, R., Fink, F.M., Koscielniak, E., Delattre, O., Strehl, S., Ambros, P.F. and et al. (1994) Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. **Br J Cancer**, **70**: 908-913.
- Zucman-Rossi, J., Batzer, M.A., Stoneking, M., Delattre, O. and Thomas, G. (1997) Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. **Hum Genet**, **99**: 357-363.
- Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., Zucker, J.M., Triche, T.J., Sheer, D., Turc-Carel, C. and et al. (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. **EMBO J**, **12**: 4481-4487.
- Zwerner, J.P., Joo, J., Warner, K.L., Christensen, L., Hu-Lieskovan, S., Triche, T.J. and May, W.A. (2008) The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. **Oncogene**, **27**: 3282-3291.
- Zwerner, J.P. and May, W.A. (2001) PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. **Oncogene**, **20**: 626-633.

8. Anexo 1

Tabla A1. Genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1 (*NR0B1*) en la línea celular de tumor de Ewing, A673.

Tabla A2. Rutas reguladas por EWS/FLI1 (análisis GSEA).

Tabla A3. Rutas reguladas por DAX1 (análisis GSEA).

Tabla A1. Genes regulados por EWS/FLI1 y DAX1 (*NR0B1*) en la línea celular de tumor de Ewing, A673.

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE764531	NM_005950	Metallothionein 1G	MT1G	0.07	0.00000	0.20	0.00001
GE81866	NM_199329	Solute carrier family 43, member 3	SLC43A3	0.10	0.00000	0.19	0.00001
GE82413	NM_018575			0.12	0.00000	0.58	0.00074
GE62829	NM_000475	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	NR0B1	0.12	0.00000	0.43	0.00043
GE62878	NM_005472	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	KCNE3	0.18	0.00000	0.26	0.00001
GE57216	NM_012252	Transcription factor EC	TFEC	0.21	0.00000	0.25	0.00006
GE79704	NM_032756	Glyoxalase domain containing 1	GLOXD1	0.22	0.00000	0.42	0.00020
GE59846	NM_001034	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	RRM2	0.24	0.00000	0.44	0.00006
GE60323	NM_006021			0.26	0.00000	0.49	0.00070
GE574933	NM_004091	E2F transcription factor 2	E2F2	0.26	0.00004	0.48	0.00004
GE61764	NM_021914	Cofilin 2 (muscle)	CFL2	0.26	0.00000	0.42	0.00001
GE486426	AW083095	Transcribed locus		0.28	0.00003	0.28	0.00002
GE507996	NM_207459	FLJ35767 protein	FLJ35767	0.29	0.00000	0.48	0.00057
GE56379	NM_021095	Solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	SLC5A6	0.29	0.00000	0.52	0.00001
GE79301	NM_021076	Neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH	0.30	0.00059	0.23	0.00006
GE85867	NM_006044	Histone deacetylase 6	HDAC6	0.30	0.00044	0.21	0.00020
GE738593	AL833346	Hypothetical protein LOC283278	LOC283278	0.30	0.00001	0.59	0.00001
GE687891	N50846	Adenylosuccinate synthase	ADSS	0.30	0.00001	0.32	0.00028
GE494841	NM_032900	Rho GTPase activating protein 19	ARHGAP19	0.31	0.00000	0.48	0.00004
GE900488	AI888390	Myosin X	MYO10	0.31	0.00000	0.55	0.00005
GE86284	NM_138571	Histidine triad nucleotide binding protein 3	HINT3	0.32	0.00000	0.55	0.00075
GE809579	XM_293999			0.33	0.00004	0.62	0.00081
GE498546	NM_021076	Neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH	0.34	0.00010	0.25	0.00001
GE516375	BC008580	Homo sapiens, clone IMAGE:4179986		0.35	0.00003	0.58	0.00082
GE58099	NM_201567	Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC25A	0.35	0.00004	0.53	0.00081
GE475468	AB007976	KIAA0507	KIAA0507	0.36	0.00000	0.62	0.00072
GE83488	NM_199249	Chromosome 19 open reading frame 48	C19orf48	0.36	0.00000	0.52	0.00037
GE87004	NM_152307	Chromosome 14 open reading frame 172	C14orf172	0.37	0.00001	0.33	0.00065
GE82236	NM_017858	TIMELESS interacting protein	TIPIN	0.37	0.00006	0.51	0.00067

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE523227	NM_005454	Cerberus 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	CER1	0.37	0.00000	0.40	0.00003
GE81300	NM_003546	Histone cluster 1, H4l	HIST1H4L	0.37	0.00014	0.45	0.00088
GE82139	NM_016510	Selenocysteine lyase	SCLY	0.37	0.00002	0.62	0.00089
GE549391	BF064100	CDNA clone IMAGE:30414739		0.38	0.00063	0.12	0.00001
GE58499	NM_012456	Translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast)	TIMM10	0.38	0.00000	0.59	0.00069
GE53776	NM_016575	5'-nucleotidase domain containing 3	NT5DC3	0.38	0.00005	0.58	0.00063
GE79027	NM_016556	MAX-like protein X	MLX	0.38	0.00004	0.55	0.00009
GE57115	NM_004741	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	0.38	0.00004	0.44	0.00004
GE59163	NM_001884	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	HAPLN1	0.39	0.00004	0.51	0.00011
GE62369	NM_018518	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)	MCM10	0.39	0.00004	0.41	0.00003
GE79053	NM_021914	Cofilin 2 (muscle)	CFL2	0.39	0.00001	0.36	0.00000
GE81299	NM_003545	Histone cluster 1, H4e	HIST1H4E	0.39	0.00023	0.24	0.00009
GE572531	NM_003539	Histone cluster 1, H4d	HIST1H4D	0.39	0.00007	0.50	0.00070
GE564452	BU536871	Chorionic gonadotropin, beta polypeptide	CGB	0.39	0.00005	0.24	0.00001
GE58304	NM_003542	Histone cluster 1, H4c	HIST1H4C	0.39	0.00000	0.47	0.00016
GE56695	NM_022770	GIN5 complex subunit 3 (Psf3 homolog)	GIN53	0.39	0.00011	0.38	0.00001
GE63103	BX445857	Ribosomal protein S8	RPS8	0.40	0.00003	0.63	0.00015
GE56224	AI083587	Nucleoporin 50kDa	NUP50	0.40	0.00035	0.49	0.00054
GE59094	NM_005983	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	0.40	0.00018	0.47	0.00097
GE59420	NM_001254	Cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	0.41	0.00002	0.45	0.00000
GE79652	BC005107			0.41	0.00008	0.40	0.00004
GE625899	BM129339	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	PCSK2	0.41	0.00006	0.51	0.00015
GE58734	NM_016448	Denticleless homolog (Drosophila)	DTL	0.41	0.00001	0.47	0.00030
GE82507	NM_020162	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33	DHX33	0.41	0.00018	0.43	0.00018
GE839349	AW291675	Transcribed locus		0.41	0.00001	0.50	0.00004
GE60295	NM_006392	Nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat)	NOL5A	0.41	0.00001	0.41	0.00092
GE79662	AL389951	Nucleoporin 50kDa	NUP50	0.41	0.00001	0.44	0.00018
GE56535	AK074066	Gem (nuclear organelle) associated protein 5	GEMIN5	0.41	0.00000	0.66	0.00014
GE59592	NM_144998	Stimulated by retinoic acid 13 homolog (mouse)	STRA13	0.42	0.00008	0.57	0.00026
GE907136	AL832666	Establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)	ESCO2	0.43	0.00006	0.50	0.00013
GE81721	NM_007057	ZW10 interactor	ZWINT	0.43	0.00002	0.65	0.00010

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE85604	AF545864	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	UBA52	0.43	0.00003	0.66	0.00078
GE587208	AA971958	TRM1 tRNA methyltransferase 1 homolog (S. cerevisiae)	TRMT1	0.43	0.00016	0.56	0.00042
GE55142	NM_004704	RRP9, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	RRP9	0.43	0.00031	0.56	0.00039
GE55752	NM_018097	Centrosomal protein 27kDa	CEP27	0.44	0.00002	0.54	0.00006
GE478996	NM_080668	Cell division cycle associated 5	CDCA5	0.44	0.00004	0.56	0.00077
GE831468	BU620250	Transcribed locus		0.44	0.00001	0.44	0.00061
GE83489	BC006173	Chromosome 14 open reading frame 151	C14orf151	0.44	0.00024	0.34	0.00003
GE700185	BM976801			0.44	0.00000	0.62	0.00007
GE87473	NM_052960	Retinol binding protein 7, cellular	RBP7	0.44	0.00031	0.44	0.00026
GE500484	NM_199185	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NPM1	0.44	0.00004	0.50	0.00000
GE55217	NM_012140	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	SLC25A10	0.44	0.00001	0.43	0.00001
GE87840	NM_152292	RNA (guanine-9-) methyltransferase domain containing 2	RG9MTD2	0.45	0.00011	0.60	0.00060
GE83075	NM_025077	Target of EGR1, member 1 (nuclear)	TOE1	0.46	0.00000	0.49	0.00030
GE57733	NM_144563	Ribose 5-phosphate isomerase A (ribose 5-phosphate epimerase)	RPIA	0.46	0.00000	0.49	0.00000
GE59704	NM_001269	Regulator of chromosome condensation 1	RCC1	0.46	0.00004	0.41	0.00000
GE55632	NM_015659	Ribosomal L1 domain containing 1	RSL1D1	0.46	0.00002	0.55	0.00064
GE62283	NM_181425	Frataxin	FXN	0.46	0.00001	0.46	0.00070
GE58309	NM_003677	Density-regulated protein	DENR	0.47	0.00001	0.38	0.00000
GE79328	NM_015895	Geminin, DNA replication inhibitor	GMNN	0.47	0.00000	0.41	0.00026
GE86836	R00290	TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa	TAF3	0.47	0.00021	0.59	0.00027
GE512686	NM_057178	Ring finger and FYVE-like domain containing 1	RFFL	0.47	0.00004	0.48	0.00007
GE62924	NM_004111	Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	0.47	0.00007	0.51	0.00008
GE538216	NM_020799	STAM binding protein-like 1	STAMBPL1	0.47	0.00001	0.54	0.00060
GE59709	NM_002466	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	0.47	0.00006	0.48	0.00011
GE80450	NM_005573	Lamin B1	LMNB1	0.47	0.00020	0.47	0.00054
GE59081	NM_001948	DUTP pyrophosphatase	DUT	0.47	0.00001	0.40	0.00000
GE54726	NM_006869	Centaurin, alpha 1	CENTA1	0.47	0.00027	0.39	0.00057
GE56603	NM_018602	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	DNAAJ4	0.47	0.00003	0.48	0.00003
GE53800	NM_015939	CGI-09 protein	CGI-09	0.48	0.00000	0.49	0.00053
GE54378	AF043467	Neurexophilin 2	NXP2	0.48	0.00067	0.46	0.00016

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE62529	BC050383	Thymopoietin	TMPO	0.48	0.00036	0.61	0.00044
GE61373	NM_012388	Pallidin homolog (mouse)	PLDN	0.48	0.00065	0.59	0.00058
GE481820	AW473078	Sec1 family domain containing 1	SCFD1	0.48	0.00000	0.46	0.00083
GE83383	NM_032334	Chromosome 8 open reading frame 53	C8orf53	0.48	0.00001	0.63	0.00016
GE56581	AL133030	KIAA1666 protein	KIAA1666	0.48	0.00007	0.29	0.00000
GE55545	NM_017588	WD repeat domain 5	WDR5	0.49	0.00006	0.62	0.00003
GE62458	NM_001274	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	CHEK1	0.49	0.00001	0.66	0.00017
GE81105	NM_002041	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2	GABPB2	0.49	0.00009	0.49	0.00005
GE53996	CD699610	TWIST neighbor	TWISTNB	0.49	0.00009	0.42	0.00007
GE84096	AA766084			0.49	0.00031	0.67	0.00061
GE506177	AA057634	Hypothetical protein BC007540	LOC144097	0.49	0.00002	0.46	0.00007
GE58064	NM_005190	Cyclin C	CCNC	0.49	0.00005	0.62	0.00011
GE55120	BC033086	Transcription factor 19 (SC1)	TCF19	0.50	0.00041	0.51	0.00008
GE59416	NM_006413	Ribonuclease P/MRP 30kDa subunit	RPP30	0.50	0.00005	0.54	0.00010
GE80397	NM_000618	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	0.50	0.00017	0.67	0.00019
GE56927	NM_021823	Phosphopantothoenylcysteine decarboxylase	PPCDC	0.50	0.00009	0.40	0.00005
GE58665	NM_016058	TP53RK binding protein	TPRKB	0.50	0.00003	0.63	0.00002
GE88311	AK057104	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1895238		0.50	0.00003	0.57	0.00007
GE892634	NM_199234	Glial cell derived neurotrophic factor	GDNF	0.50	0.00024	0.55	0.00046
GE86918	NM_024945	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)	RMI1	0.50	0.00001	0.67	0.00012
GE81070	NM_001798	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	0.50	0.00019	0.51	0.00092
GE80787	NM_021922	Fanconi anemia, complementation group E	FANCE	0.51	0.00038	0.58	0.00007
GE55007	NM_016565	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8	CHCHD8	0.51	0.00001	0.64	0.00010
GE59639	NM_001071	Thymidylate synthetase	TYMS	0.51	0.00010	0.59	0.00070
GE55647	NM_017975	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	ZWILCH	0.51	0.00003	0.67	0.00052
GE58679	NM_016095	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)	GINS2	0.51	0.00005	0.45	0.00000
GE88019	NM_001238	Cyclin E1	CCNE1	0.51	0.00039	0.48	0.00041
GE83217	AK022550	Zinc finger protein 93	ZNF93	0.52	0.00007	0.39	0.00039
GE62273	NM_002106	H2A histone family, member Z	H2AFZ	0.52	0.00013	0.56	0.00018
GE554656	NM_145247	Chromosome 10 open reading frame 78	C10orf78	0.52	0.00004	0.52	0.00004
GE87469	W39159	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	SLC7A2	0.52	0.00003	0.52	0.00041
GE82997	NM_024908	WD repeat domain 76	WDR76	0.52	0.00029	0.54	0.00009

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE80921	NM_000523	Homeobox D13	HOXD13	0.52	0.00057	0.37	0.00011
GE79107	NM_000791	Dihydrofolate reductase	DHFR	0.53	0.00009	0.67	0.00016
GE86967	NM_152299	Non-SMC condensin II complex, subunit H2	NCAPH2	0.53	0.00013	0.57	0.00014
GE63013	NM_013237	Px19-like protein	PX19	0.53	0.00002	0.62	0.00083
GE744964	BC006136	Asparagine-linked glycosylation 9 homolog (S. cerevisiae, alpha-1,2-mannosyltransferase)	ALG9	0.54	0.00027	0.48	0.00021
GE62980	NM_013354	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7	CNOT7	0.54	0.00004	0.62	0.00019
GE62755	NM_012325	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	MAPRE1	0.54	0.00001	0.55	0.00004
GE87448	NM_024594	Pantothenate kinase 3	PANK3	0.54	0.00011	0.62	0.00016
GE55487	NM_017812	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	EEF1G	0.54	0.00009	0.60	0.00040
GE58666	NM_016059	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1	PPIL1	0.54	0.00011	0.49	0.00001
GE83308	NM_183041	Dystrobrevin binding protein 1	DTNBP1	0.54	0.00001	0.58	0.00011
GE53399	AB014599	Bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	BICD2	0.55	0.00003	0.52	0.00004
GE85997	NM_006476	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G	ATP5L	0.56	0.00053	0.25	0.00000
GE870783	BQ010325	N-acetylglucosamine kinase	NAGK	0.56	0.00002	0.51	0.00032
GE57793	NM_006246	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	PPP2R5E	0.56	0.00005	0.62	0.00068
GE582417	AK001796	Hypothetical LOC541471	LOC541471	0.56	0.00040	0.52	0.00014
GE61912	NM_020685	Chromosome 3 open reading frame 14	C3orf14	0.56	0.00010	0.30	0.00000
GE81323	NM_003797	Embryonic ectoderm development	EED	0.56	0.00002	0.64	0.00051
GE87517	NM_024053	Centromere protein M	CENPM	0.56	0.00009	0.54	0.00004
GE53792	AB032969	KIAA1143	KIAA1143	0.57	0.00012	0.45	0.00027
GE86710	NM_015033	Formin binding protein 1	FNBP1	0.57	0.00021	0.58	0.00029
GE61310	AK057889	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	TCEB1	0.57	0.00016	0.55	0.00066
GE54573	NM_007182	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	RASSF1	0.57	0.00078	0.43	0.00002
GE488362	NM_153608	Zinc finger protein 114	ZNF114	0.57	0.00038	0.50	0.00005
GE531442	INCYTE UNIQUE			0.57	0.00004	0.57	0.00016
GE893404	AV646689	DENN/MADD domain containing 2C	DENND2C	0.57	0.00063	0.56	0.00049
GE86761	INCYTE UNIQUE			0.57	0.00002	0.60	0.00003
GE53233	BX647922	Cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	CYB5B	0.57	0.00027	0.63	0.00082
GE80831	NM_015983	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 4 (putative)	UBE2D4	0.58	0.00065	0.58	0.00007
GE62076	NM_031432	Uridine-cytidine kinase 1	UCK1	0.58	0.00001	0.65	0.00030

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE81811	NM_013263	Bromodomain containing 7	BRD7	0.58	0.00001	0.62	0.00007
GE82070	NM_016050	Mitochondrial ribosomal protein L11	MRPL11	0.58	0.00012	0.58	0.00076
GE84484	INCYTE UNIQUE			0.58	0.00008	0.43	0.00013
GE58332	NM_004323	BCL2-associated athanogene	BAG1	0.58	0.00007	0.57	0.00079
GE59105	NM_002487	Necdin homolog (mouse)	NDN	0.58	0.00100	0.51	0.00088
GE62593	NM_005748	YY1 associated factor 2	YAF2	0.59	0.00010	0.61	0.00054
GE542933	NM_152476	Zinc finger protein 560	ZNF560	0.59	0.00044	0.46	0.00048
GE57694	NM_002208	Integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	ITGAE	0.60	0.00031	0.55	0.00008
GE87377	NM_145729	Mitochondrial ribosomal protein L24	MRPL24	0.60	0.00026	0.17	0.00000
GE687108	AK091543	Zinc finger protein 141	ZNF141	0.60	0.00007	0.51	0.00015
GE82071	NM_016055	Mitochondrial ribosomal protein L48	MRPL48	0.61	0.00008	0.64	0.00020
GE499854	BC031469	Hypothetical LOC554207	LOC554207	0.61	0.00007	0.60	0.00017
GE55711	NM_018054	Rho GTPase activating protein 17	ARHGAP17	0.61	0.00023	0.62	0.00078
GE62418	NM_001825	Creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)	CKMT2	0.61	0.00004	0.55	0.00057
GE80238	NM_014331	Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	SLC7A11	0.61	0.00021	0.29	0.00001
GE56825	BG354579	Chromobox homolog 2 (Pc class homolog, Drosophila)	CBX2	0.62	0.00092	0.39	0.00005
GE62467	NM_016111	TEL2, telomere maintenance 2, homolog (S. cerevisiae)	TELO2	0.62	0.00012	0.62	0.00015
GE88832	NM_015944	Amidohydrolase domain containing 2	AMDHD2	0.62	0.00079	0.40	0.00003
GE56195	NM_017895	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27	DDX27	0.62	0.00022	0.66	0.00037
GE86682	CB989658	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	SNRPC	0.62	0.00003	0.46	0.00011
GE633526	BE326717	Methyl-CpG binding domain protein 5	MBD5	0.63	0.00014	0.56	0.00069
GE58713	NM_016256	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester acetylglucosaminidase	alpha-N- NAGPA	0.63	0.00004	0.34	0.00001
GE83407	F37019	Polycomb group ring finger 5	PCGF5	0.63	0.00001	0.48	0.00000
GE88340	NM_021809	TGFB-induced factor 2 (TALE family homeobox)	TGIF2	0.63	0.00033	0.61	0.00020
GE657155	R46068			0.63	0.00095	0.58	0.00024
GE901842	AI082150			0.64	0.00023	0.58	0.00040
GE58937	NM_032983	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	CASP2	0.64	0.00063	0.52	0.00028
GE79758	NM_003093	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	SNRPC	0.64	0.00012	0.52	0.00053
GE57185	NM_002695	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa	POLR2E	0.64	0.00020	0.60	0.00029
GE499266	AV661762	Transcribed locus		0.64	0.00048	0.59	0.00012

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP	shEF/shGFP	shDAX1/shGFP	shDAX1/shGFP
				ratio	T Test	ratio	T Test
GE499219	BF513864	Hypothetical protein LOC730057	LOC730057	0.64	0.00014	0.53	0.00007
GE80389	NM_144988	Asparagine-linked glycosylation 14 homolog (yeast)	ALG14	0.64	0.00003	0.53	0.00006
GE657177	BC020896	SAM domain containing 1	RP5-875H10.1	0.65	0.00020	0.58	0.00006
GE53053	NM_014809	KIAA0319	KIAA0319	0.65	0.00028	0.62	0.00020
GE776392	AI625843	Growth arrest-specific 6	GAS6	0.65	0.00017	0.58	0.00013
GE86012	BF978276	Prothymosin, alpha (gene sequence 28)	PTMA	0.65	0.00007	0.64	0.00001
GE80424	NM_007065	Cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)	CDC37	0.66	0.00006	0.62	0.00006
GE80414	NM_024666	Hypothetical protein FLJ11506	FLJ11506	0.66	0.00011	0.21	0.00000
GE56881	NM_005441	Chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	CHAF1B	0.66	0.00002	0.58	0.00001
GE791040	CB857439	Ribosomal protein S10	RPS10	0.66	0.00056	0.60	0.00025
GE58606	W72781	Chromosome 17 open reading frame 81	C17orf81	0.66	0.00039	0.64	0.00099
GE59368	NM_002270	Transportin 1	TNPO1	0.66	0.00006	0.62	0.00008
GE54421	NM_005839	Serine/arginine repetitive matrix 1	SRRM1	0.66	0.00043	0.67	0.00010
GE62892	NM_002792	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	PSMA7	0.66	0.00056	0.52	0.00013
GE503711	AA525310	Transcribed locus		0.66	0.00049	0.63	0.00083
GE891959	AK025613	Spermatid perinuclear RNA binding protein	STRBP	0.67	0.00027	0.62	0.00010
GE55579	NM_021218	Chromosome 9 open reading frame 80	C9orf80	0.67	0.00018	0.61	0.00001
GE629457	XM_291393			0.67	0.00029	0.59	0.00004
GE506516	BC050399	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	RFNG	1.51	0.00093	1.89	0.00048
GE87365	NM_025132	WD repeat domain 19	WDR19	1.52	0.00093	2.24	0.00003
GE54100	NM_001189	Bagpipe homeobox homolog 1 (Drosophila)	BAPX1	1.54	0.00014	1.67	0.00023
GE54531	NM_015909	Neuroblastoma-amplified protein	NAG	1.55	0.00040	1.85	0.00018
GE60315	NM_001567	Inositol polyphosphate phosphatase-like 1	INPPL1	1.62	0.00018	1.70	0.00036
GE58927	NM_000053	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide	ATP7B	1.62	0.00005	1.74	0.00002
GE88646	NM_024608	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)	NEIL1	1.62	0.00020	2.30	0.00011
GE503839	NM_174922	AarF domain containing kinase 5	ADCK5	1.64	0.00054	1.92	0.00094
GE56930	F35754	Zinc finger protein 564	ZNF564	1.66	0.00048	2.57	0.00054
GE56035	NM_173546	Kelch domain containing 8B	KLHDC8B	1.71	0.00061	1.93	0.00011
GE53158	BC039204	RUN and TBC1 domain containing 1	RUTBC1	1.71	0.00075	1.54	0.00077
GE62731	NM_023039	Ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	ANKRA2	1.72	0.00046	2.82	0.00054
GE79403	NM_032039	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 3	ITFG3	1.73	0.00004	1.60	0.00025
GE86689	NM_173626	Solute carrier family 26, member 11	SLC26A11	1.74	0.00002	1.51	0.00004

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE87576	CB104564	GPI deacylase	PGAP1	1.74	0.00062	3.42	0.00094
GE60255	NM_004377	Carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	CPT1B	1.76	0.00053	2.38	0.00007
GE710199	BF435845	Transcribed locus		1.77	0.00001	1.71	0.00026
GE80179	BC040486	Zinc finger protein 90 homolog (mouse)	ZFP90	1.77	0.00009	1.61	0.00004
GE87770	NM_032520	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit	GNPTG	1.83	0.00001	1.58	0.00009
GE57192	NM_014780	Cullin 7	CUL7	1.85	0.00011	1.73	0.00045
GE568870	BX112276			1.88	0.00001	2.73	0.00040
GE686028	BU688263	Collagen, type XXV, alpha 1	COL25A1	1.90	0.00003	1.77	0.00019
GE79257	NM_006601	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	PTGES3	1.90	0.00003	3.18	0.00014
GE61365	NM_018113	Limb region 1 homolog (mouse)-like	LMBR1L	1.94	0.00003	2.06	0.00000
GE868575	AK125077	Full length insert cDNA clone YZ38E04		1.96	0.00007	2.26	0.00096
GE59228	NM_003156	Stromal interaction molecule 1	STIM1	1.97	0.00005	1.72	0.00072
GE83585	NM_032921			1.99	0.00002	1.55	0.00018
GE56943	N36921	Transcribed locus		1.99	0.00047	2.24	0.00051
GE53099	NM_004999	Myosin VI	MYO6	2.02	0.00002	1.91	0.00011
GE60540	NM_000191	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	HMGCL	2.04	0.00003	2.27	0.00017
GE867649	BE612695	Full length insert cDNA clone YZ38E04		2.06	0.00039	2.74	0.00053
GE601089	AW102654	Jumonji, AT rich interactive domain 1B	JARID1B	2.09	0.00002	2.38	0.00042
GE857137	BI758051			2.14	0.00044	1.74	0.00097
GE88400	NM_174921	Chromosome 4 open reading frame 34	C4orf34	2.15	0.00044	2.06	0.00006
GE54359	NM_006526	Zinc finger protein 217	ZNF217	2.18	0.00036	1.70	0.00006
GE87656	AI763182	Cold inducible RNA binding protein	CIRBP	2.25	0.00026	1.95	0.00070
GE54278	NM_020199	Chromosome 5 open reading frame 15	C5orf15	2.25	0.00000	2.40	0.00005
GE532031	CA420944	Transcribed locus		2.40	0.00000	4.46	0.00005
GE61697	NM_030801	Melanoma antigen family D, 4	MAGED4	2.45	0.00000	1.64	0.00034
GE58983	NM_005419	Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	STAT2	2.46	0.00001	1.71	0.00009
GE551162	BC020859	Deafness, autosomal recessive 59	DFNB59	2.57	0.00081	2.35	0.00010
GE81708	NM_006989	DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-related gene	POLR2J2	2.57	0.00000	2.00	0.00005
GE55459	NM_020468	Sorting nexin 14	SNX14	2.57	0.00005	2.62	0.00049
GE54537	NM_005817	Mannose-6-phosphate receptor binding protein 1	M6PRBP1	2.62	0.00002	1.93	0.00009
GE713973	CA434164	Dpy-19-like 2 (C. elegans)	DPY19L2	2.63	0.00067	1.69	0.00045
GE538056	NM_207363			2.65	0.00077	2.77	0.00015

Número	Acc:NCBI	Nombre	Símbolo	shEF/shGFP ratio	shEF/shGFP T Test	shDAX1/shGFP ratio	shDAX1/shGFP T Test
GE61690	NM_022823	Fibronectin type III domain containing 4	FNDC4	2.71	0.00008	1.96	0.00067
GE86337	NM_198272			2.71	0.00014	3.18	0.00034
GE605091	AI805522	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	ARID5B	2.72	0.00046	2.26	0.00049
GE854014	NM_199349			2.80	0.00095	2.41	0.00093
GE88576	R79128	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP3K1	2.82	0.00056	1.55	0.00095
GE88384	NM_020796	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	2.85	0.00028	2.21	0.00011
GE814829	H83823	Chromosome 20 open reading frame 194	C20orf194	2.96	0.00032	1.96	0.00013
GE53296	NM_014714	Intraflagellar transport 140 homolog (Chlamydomonas)	IFT140	3.02	0.00035	3.51	0.00023
GE80185	NM_004711	Synaptogyrin 1	SYNGR1	3.03	0.00020	3.96	0.00012
GE54813	NM_021738	Supervillin	SVIL	3.22	0.00047	1.54	0.00074
GE61370	X56841	Major histocompatibility complex, class I, E	HLA-E	3.27	0.00000	4.67	0.00038
GE54567	NM_198183	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	UBE2L6	3.76	0.00000	3.51	0.00036
GE58841	NM_020524	Pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	PBXIP1	3.89	0.00002	1.93	0.00005
GE62782	NM_006855	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	KDELR3	4.17	0.00001	1.77	0.00060
GE82156	NM_006855	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	KDELR3	4.22	0.00001	1.78	0.00043
GE54849	NM_014045	Low density lipoprotein receptor-related protein 10	LRP10	5.32	0.00034	2.04	0.00006
GE80497	NM_002305	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	LGALS1	5.51	0.00005	1.58	0.00092
GE55307	NM_014505	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4	10.22	0.00020	2.34	0.00018
GE80600	NM_014505	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4	11.63	0.00013	3.05	0.00021
GE54521	NM_000599	Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	35.20	0.00000	1.82	0.00036

Tabla A2. Rutas reguladas por EWS/FLI1 (análisis GSEA)

Nombre	ES	nominal p-value	FDR q-value	Breve descripción	Genes que forman parte de la ruta (*)
SKP2E2FPATHWAY	0.82	0.0001	0.0005	E2F-1, un factor de transcripción que promueve la transición G1/S, es reprimido por Rb y activado por cdk2/cyclin E.	<u>CCND1, CCNE1, E2F1, SKP1A, TFDP1, CUL1, CDK2, SKP2, CDC34, RB1</u>
ATRBRCAPATHWAY	0.65	0.0001	0.0005	BRCA1 y 2 bloquean la progresión del ciclo celular en respuesta al daño del ADN y promueven la reparación de la doble cadena de ADN	<u>CHK1, FANCD2, HUS1, RAD51, FANCE, RAD1, BRCA1, TREX1, RAD50, MRE11A, FANCA, BRCA2, FANCG, RAD9A, ATR, FANCC, ATM, RAD17, TREX1, TP53, FANCF</u>
P27PATHWAY	0.71	0.0001	0.0008	p27 bloquea la transición G1/S inhibiendo las quinasas de punto de control cdk2/cyclin E y es inhibido por la ubiquitinación mediada por Skp2.	<u>SKP2, CKS1B, SKP1A, E2F1, CDK2, TFDP1, CCNE1, CUL1, RBX1, NEDD8, CDKN1B, UBE2M, RB1</u>
PROTEASOMEPATHWAY	0.62	0.0001	0.0009	El proteasoma tiene como objeto la ubiquitinación de proteínas para su posterior degradación en péptidos pequeños en un proceso dependiente de ATP.	<u>PSMD14, PSMC3, PSMA1, PSMB3, UBE3A, RPN1, PSMB2, PSMA2, PSMA4, PSMA7, PSMB7, PSMB1, PSMB5, PSMB6, PSMA3, PSMA5, PSMA6, RPN2, UBE2A, PSMB4, UBE1</u>
G2PATHWAY	0.55	0.0020	0.0173	La quinsa Cdc2-cyclin B activada regula la transición G2/M; el daño en el ADN estimula las quinasas DNA-PK/ATM/ATR que activan Cdc2.	<u>CDC25A, CDC2, CHEK1, CCNB1, BRCA1, CHEK2, PRKDC, YWHAQ, YWHAH, CDC34, CDKN2D, WEE1, PRKDC, ATR, CDC25B, CDC25C, MDM2, ATM, TP53, RPS6KA1, EP300, MDM2, GADD45A, MYT1</u>
SARSPATHWAY	0.65	0.0039	0.0176	El coronavirus SARS tiene un genoma de ARN de 30kb, que contiene rep, un gen que codifica para la proteasa viral Mpro.	<u>NCL, FBL, LDHA, EIF4E, LDHB, CKM, MAPK14, GPT, ANPEP, LDHC</u>
RSPATHWAY	0.64	0.0001	0.0186	La protein-quinasa ATM reconoce el ADN dañado y bloquea la progresión del ciclo celular fosforilando chk1 y p53, que normalmente inhiben Rb para seguir la transición G1/S.	<u>CDC25A, CDC2, CHEK1, CDK2, YWHAH, CDK4, WEE1, CDC25B, CDC25C, ATM, RB1, TP53, MYT1</u>
EIF2PATHWAY	0.55	0.0100	0.0439	El factor de iniciación eucariótico 2 (EIF2) inicia la traducción transfiriendo Met-tRNA a la subunidad ribosomal 40S, proceso dependiente en GTP.	<u>EIF2S1, EIF5, EIF2S2, EIF2AK4, EIF2S3, GSK3B, EIF2AK3, PPPICA, EIF2BS</u>

Nombre	ES	nominal p-value	FDR q-value	Breve descripción	Genes que forman parte de la ruta (*)
ETCPATHWAY	0.60	0.0117	0.0505	La energía se obtiene de carbohidratos por oxidación y se transfiere por la cadena de electrones de la mitocondria, la cual obtiene ATP de la reducción de oxígeno en agua.	<u>CYCS</u> , <u>SDHB</u> , <u>SDHD</u> , <u>UQCRC1</u> , <u>ATP5A1</u> , <u>SDHC</u> , <u>GPD2</u> , <u>NDUFA1</u> , <u>SDHA</u> ,
CELLCYCLEPATHWAY	0.49	0.0115	0.0542	Las ciclinas interaccionan con las quinasas dependientes de ciclinas para formar complejos activos que regulan la progresión del ciclo celular.	<u>CDC25A</u> , <u>CDC2</u> , <u>E2F1</u> , <u>CDK2</u> , <u>TFDP1</u> , <u>CCNB1</u> , <u>CCNH</u> , <u>CCNE1</u> , <u>RBL1</u> , <u>CCNA1</u> , <u>CDK4</u> , <u>CDKN2D</u> , <u>CDK7</u> , <u>CCND3</u> , <u>CCNH</u> , <u>CDKN2C</u> , <u>CCND2</u> , <u>RB1</u> , <u>CDKN2B</u> , <u>CDKN2A</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>CDK6</u> , <u>CCND1</u>
PTC1PATHWAY	0.58	0.0282	0.0588	La unión de la proteína de señal extracelular de Sonic hedgehog al receptor Patched (Ptc1) permite la progresión G1/S y puede inhibir la transición G2/M.	<u>CDC25A</u> , <u>CDC2</u> , <u>MNAT1</u> , <u>CCNB1</u> , <u>CCNH</u> , <u>XPO1</u> , <u>CDK7</u> , <u>CDC25B</u> , <u>SHH</u> , <u>CDC25C</u>
GABAPATHWAY	0.54	0.0239	0.0730	El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un inhibidor de neurotransmisores cuyo receptor es regulado por Plic-1, gephyrin y GABARAP	<u>NFS</u> , <u>UBQLN1</u> , <u>GABRA4</u> , <u>GABRA2</u> , <u>GABARAP</u> , <u>GPHN</u> , <u>DNM1</u> , <u>GABRA1</u> , <u>GABRA5</u> , <u>GABRA3</u> , <u>GABRA6</u> , <u>SRC</u>
ERBB4PATHWAY	0.47	0.0438	0.1335	ErbB4 (HER4) es un receptor de tirosina quinasas que se une a neuroregulinas, así como a miembros de la familia EGF, que son diana de los receptores de EGF.	<u>PRKCB1</u> , <u>ERBB4</u> , <u>NRG2</u> , <u>PSEN1</u> , <u>NRG3</u> , <u>PRKCA</u> , <u>ADAM17</u>
SRCRPTPPATHWAY	0.55	0.0539	0.1335	Src se activa por la proteína tirosina fosfatasa alfa.	<u>PRKCB1</u> , <u>CDC25A</u> , <u>CDC2</u> , <u>CCNB1</u> , <u>CSK</u> , <u>GRB2</u> , <u>CDC25B</u> , <u>CDC25C</u> , <u>PRKCA</u> , <u>SRC</u> , <u>PTPRA</u>
RNAPATHWAY	0.43	0.0762	0.2486	La activación de proteínas quinasas dsRNA fosforila eIF2a, que generalmente inhibe la traducción y activa NF-Kβ que promueve la inflamación.	<u>CHUK</u> , <u>EIF2S1</u> , <u>EIF2S2</u> , <u>NFKB1</u> , <u>NFKIA</u> , <u>DNAJC3</u> , <u>RELA</u> , <u>MAP3K14</u> , <u>TPS3</u>

Tabla A3. Rutas reguladas por DAX1 (análisis GSEA)

Nombre	ES	nominal p-value	FDR q-value	Breve descripción	Genes que forman parte de la ruta (*)
G1PATHWAY	0.54	0.0020	0.0357	CDK4/6-cyclin D y CDK2-cyclin E fosforilan Rb, que promueve la transcripción de genes necesarios para la transición G1/S del ciclo celular.	<u>CDK6</u> , <u>TGFB2</u> , <u>CDC25A</u> , <u>CCNE1</u> , <u>TGFB3</u> , <u>SKP2</u> , <u>CDK4</u> , <u>CDK2</u> , <u>DHFR</u> , <u>GSK3B</u> , <u>CDKN1B</u> , <u>ABL1</u> , <u>HDAC1</u> , <u>TFDP1</u> , <u>E2F1</u> , <u>CCND1</u> , <u>ATR</u> , <u>ABL1</u> , <u>TGFB3</u> , <u>CCNA1</u> , <u>CDC2</u> , <u>TP53</u> , <u>CDKN2A</u> , <u>ATM</u> , <u>RB1</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>CDKN2B</u>
RBPATHWAY	0.64	0.0021	0.0602	La protein-kinasa ATM reconoce el ADN dañado y bloquea la progresión del ciclo celular fosforilando chk1 y p53, que normalmente inhiben Rb para seguir la transición G1/S.	<u>YWHAH</u> , <u>CDC25A</u> , <u>CDK4</u> , <u>CDK2</u> , <u>CHEK1</u> , <u>WEE1</u> , <u>CDC25B</u> , <u>MYT1</u> , <u>CDC2</u> , <u>ATM</u> , <u>RB1</u> , <u>CDC25C</u> , <u>TP53</u>
CELLCYCLEPATHWAY	0.47	0.0092	0.1629	Las ciclinas interactúan con las quinasas dependientes de ciclinas para formar complejos activos que regulan la progresión del ciclo celular.	<u>CDK6</u> , <u>CDC25A</u> , <u>CCNE1</u> , <u>CDK4</u> , <u>CDK2</u> , <u>CDKN2C</u> , <u>CCNB1</u> , <u>CDKN1B</u> , <u>CCNH</u> , <u>TFDP1</u> , <u>CCND2</u> , <u>E2F1</u> , <u>CCND1</u> , <u>RBL1</u> , <u>CCNA1</u> , <u>CDC2</u> , <u>CCND3</u> , <u>RB1</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>CDKN2B</u> , <u>CDKN2D</u> , <u>CDK7</u> , <u>CDKN2A</u>
FEEDERPATHWAY	0.60	0.0122	0.1795	Azúcares como la manosa, galactosa y la fructosa pueden pasar a glucosa por rutas que llevan a glicólisis.	<u>TPI1</u> , <u>LCT</u> , <u>MPI</u> , <u>HK1</u> , <u>KHK</u> , <u>PYGM</u> , <u>TREH</u> , <u>PYGL</u> , <u>PGM1</u>
ACTINYPATHWAY	0.46	0.0065	0.1845	El complejo Arp 2/3 se localiza junto a uniones Y de actina polimerizada que permite la extensión de lamelipodios y por lo tanto la movilidad celular.	<u>WASF2</u> , <u>ACTA1</u> , <u>PSMA7</u> , <u>WASL</u> , <u>RAC1</u> , <u>ARPC1B</u> , <u>NCKAP1</u> , <u>WASF3</u> , <u>ACTR3</u> , <u>ACTR2</u> , <u>ARPC3</u> , <u>ARPC4</u> , <u>NTRK1</u> , <u>ARPC1A</u> , <u>WASF1</u> , <u>PIR</u> , <u>ARPC2</u> , <u>NCK1</u>

(*) Se indican los genes que forman parte de la ruta correspondiente. Los genes subrayados son aquellos que están diferencialmente regulados por EWS/FLI1 y/o DAX1

ES (*Enrichment Score*), estadístico que mide el enriquecimiento de una ruta determinada en un determinado grupo de genes.

Nominal p-value. Indica la posibilidad de que una ruta determinada se encuentre significativamente representada en un determinado grupo de genes.

FDR q-value (*False Discovery Rate*) que como en el caso anterior indica la posibilidad de que una ruta determinada se encuentre significativamente representada en un determinado grupo de genes.

9. Anexo 2

Esta tesis ha sido parcialmente publicada en el siguiente artículo:

Garcia-Aragoncillo, E., Carrillo, J., Lalli, E., Agra, N., Gomez-Lopez, G., Pestana, A. and Alonso, J. (2008) DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. **Oncogene**. Publicado *on line* el 30 de junio de 2008, doi: 10.1038/onc.2008.203.

Además durante el transcurso de la tesis se han publicado los siguientes artículos:

Mendiola, M., Carrillo, J., Garcia, E., Lalli, E., Hernandez, T., de Alava, E., Tirode, F., Delattre, O., Garcia-Miguel, P., Lopez-Barea, F., Pestana, A. and Alonso, J. (2006) The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. **Int J Cancer**, **118**: 1381-1389.

Carrillo, J., Garcia-Aragoncillo, E., Azorin, D., Agra, N., Sastre, A., Gonzalez-Mediero, I., Garcia-Miguel, P., Pestana, A., Gallego, S., Segura, D. and Alonso, J. (2007) Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. **Clin Cancer Res**, **13**: 2429-2440.