

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**BÚSQUEDA DE GENES DIANA DE  
LA ONCOPROTEÍNA EWS/FLI1.  
IDENTIFICACIÓN DE LA  
COLECISTOQUININA (CCK) COMO  
UN FACTOR DE CRECIMIENTO  
AUTOCRINO PARA LOS TUMORES  
DE EWING.**

TESIS DOCTORAL

**Jaime Carrillo García**  
Madrid, 2007

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**BÚSQUEDA DE GENES DIANA DE  
LA ONCOPROTEÍNA EWS/FLI1.  
IDENTIFICACIÓN DE LA  
COLECISTOQUININA (CCK) COMO  
UN FACTOR DE CRECIMIENTO  
AUTOCRINO PARA LOS TUMORES  
DE EWING.**

Memoria presentada por Jaime Carrillo García, licenciado en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

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

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM  
Madrid, 2007

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

CERTIFICA:

que Jaime Carrillo García, Licenciado en Biología por la Universidad de Jaén, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

“Búsqueda de genes diana de la oncoproteína EWS/FLI1.  
Identificación de la colecistoquinina (CCK) como un factor de  
crecimiento autocrino para 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 2 de Febrero de 2007.

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

*A mis padres*

*A Asun*

## **-AGRADECIMIENTOS**

La presentación de esta Tesis Doctoral ha sido el culmen de todo el trabajo de investigación realizado durante los últimos años, gracias a la formación adquirida a nivel científico, a una cuidada supervisión y a la colaboración de mucha gente. Este trabajo no hubiera quedado igual sin toda la ilusión, el empeño y la paciencia con la que he afrontado cada uno de los retos planteados.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ángel Pestaña por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y por todo el apoyo recibido para llevar a fin este trabajo. Al Dr. Francisco Javier Alonso, por poner a mi disposición todos sus conocimientos, por la importante labor de dirección y supervisión, por la libertad permitida para orientar este trabajo, y por la confianza mostrada en multitud de ocasiones.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, cuyas infraestructuras han permitido desarrollar estos estudios, y al personal de todos sus servicios, tanto administrativos como de apoyo a la investigación, por facilitar en gran medida el trabajo diario. Al Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-01068), el Instituto de Salud Carlos III (G03/089 y C03/10), la Fundación Inocente Inocente, la Fundación Enriqueta Villavecchia y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid por la financiación aportada o las becas concedidas.

A las Dres. P. García Miguel, F. López-Barea y A. Sastre del Hospital Infantil La Paz, la Dra. S. Gallego del Hospital Vall d'Hebron, la Dra. D. Segura del Hospital Virgen del Rocío, los Dres. D. Azorín, I. González-Mediero y T. Contra del Hospital Niño Jesús, la Dra. A. Navajas del Hospital de Cruces, el Dr. A. Muñoz del Hospital Ramón y Cajal, la Dra. A. Cantalejo del Hospital Gregorio Marañón, el Dr. Molina del Hospital Virgen del Camino, la Dra. A. Carboné del Hospital Miguel Servet y al resto de médicos y patólogos de los servicios de oncología pediátrica de muchos de los hospitales de este país, gracias a los cuales se obtuvieron las muestras tumorales empleadas en esta Tesis. El Dr. D. Azorín y la Dra. I. González-Mediero colaboraron además con los estudios de inmunohistoquímica. A los miembros de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid por su eficacia. Al Dr. Enzo Lalli por proporcionarnos los anticuerpos frente a NROB1.

A todos los compañeros que han pasado por el 1.7, con los que he compartido el trabajo de laboratorio, comidas amenas y grandes momentos de diversión. Entre estos destacar a Virginia y Noemí, estudiantes de Bioquímica Experimental Avanzada de la Universidad Autónoma de Madrid, cuya colaboración ha permitido avanzar mucho más rápido en las

investigaciones. A Marta y Eva con las que he compartido línea de investigación, con quienes he celebrado los progresos y afrontado los obstáculos. A Noelia, el nuevo fichaje del laboratorio. A todo el apoyo de los técnicos de laboratorio Paloma, Christian e Isa, por su incondicional ayuda y disponibilidad. A Helena, Andrés, Ibis, Raquel, Ángelo e Izciar, integrantes de la otra línea de investigación del laboratorio por todo el apoyo mostrado.

A Marta Cortón doctorada en los últimos meses. A Valentina, Alan, David, Amparo y Juan, integrantes del 1.8 por su alegría, buen humor y disposición. Al laboratorio de Jorge Martín y a la gente que ha pasado por ahí desde Aurora, Alicia, Lorena, Alba, Jose, Teresa e Izciar, igualmente por todos los momentos compartidos. A Ana incorporada a nuestros almuerzos, a los chicos del 1.4.1, y a toda la gente de los diferentes laboratorios del IIB que he conocido y con los que he compartido multitud de experiencias. A Brenda, por todo su empeño en mejorar mi inglés.

Además, quisiera agradecer todo el apoyo emocional recibido por mis compañeros y amigos de Facultad, los amigos de Alcalá, de diferentes lugares de Jaén y los nuevos amigos de Madrid. A mi familia, especialmente a mis padres y a mis suegros, mis hermanas, cuñados, y sobrinos, por todo el ánimo que me han dado para la realización de este proyecto.

Por último, mis eternos agradecimientos van dedicados a Asun, quien siempre ha estado a mi lado y me ha apoyado en todo durante estos años de trabajo. Por toda la paciencia que ha mostrado, la ilusión con la que ha vivido mis avances e incluso la ayuda aportada en múltiples ocasiones. Esta etapa también la recordaremos por todas las vivencias en las que hemos disfrutado enormemente. Se que a mi lado tengo a una gran mujer.

*Jaime*

## **-RESUMEN**

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas entre el gen EWS y algunos miembros de la familia de factores de transcripción ETS, siendo FLI1 el más abundante de ellos. EWS/FLI1 es un factor de transcripción aberrante con propiedades oncogénicas y es esencial para el desarrollo de los tumores de Ewing. En esta Tesis hemos usado técnicas de análisis global de la expresión génica y de ARN de interferencia para identificar genes regulados por EWS/FLI1, mostrando que los genes CCK y NR0B1 son específicamente inducidos por EWS/FLI1 en las células de Ewing. Posteriormente, analizamos el papel fisiológico de CCK en los tumores de Ewing, demostrando que actúa tanto *in vivo* como *in vitro* como un factor de crecimiento autocrino en las células de Ewing. Las células de Ewing expresan diferentes receptores de CCK, aunque CCK parece no activar a los receptores clásicos. Por otro lado, el devazepide, un antagonista específico del receptor CCKAR, induce apoptosis e inhibe el crecimiento de las células de Ewing, probablemente por un mecanismo independiente de este receptor. Los datos mostrados en esta Tesis demuestran que CCK es un factor de crecimiento autocrino para las células de Ewing y sugieren que su bloqueo puede ser una nueva herramienta para el tratamiento de este agresivo tumor pediátrico.

## **-SUMMARY**

Ewing's family of tumors are characterized by the presence of translocations between the gen EWS and different members of the ETS family of transcription factors, being FLI1 the most abundant of them. EWS/FLI1 is an aberrant transcription factor with oncogenic properties and is essential for Ewing tumor development. We used global gene expression analysis and RNA interference technologies to identify genes regulated by EWS/FLI1 oncoprotein. We show that CCK and NR0B1 genes are specifically induced by EWS/FLI1 in Ewing cells. We then focus to analyse the physiological role of CCK in Ewing pathogenesis. We observe that CCK acts as an autocrine growth factor for Ewing cells, both *in vitro* and *in vivo* assays. Ewing cells express different CCK receptors, but it seems CCK doesn't active the classic CCK receptors in these cells. On the other hand, devazepide, a CCKAR specific antagonist, induces apoptosis and inhibits cell growth of Ewing cells by a mechanism that probably is independent of this receptor. The data shown in this Thesis demonstrate that CCK is an autocrine growth factor for Ewing cells and suggest that targeting CCK could be a new approach in the treatment of this aggressive pediatric tumor.

## *Índice*



<b>1. Introducción.....</b>	<b>11</b>
1.1 Los Tumores de la familia Ewing.....	12
1.2 Características moleculares y funcionales de los factores de transcripción quiméricos EWS/ETS.....	13
1.2.1 El factor de transcripción quimérico EWS/ETS.....	13
1.2.2 La familia TET: EWS, TLS/FUS y TAFII68.....	14
1.2.3 La familia de factores de transcripción ETS: FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1.....	16
1.2.4 Propiedades oncogénicas de la proteína quimérica EWS/FLI1.....	19
1.3 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1.....	21
1.3.1 Genes que estimulan la proliferación celular.....	22
1.3.2 Genes que ayudan a evadir las señales que inhiben el crecimiento celular.....	22
1.3.3 Telomerasa.....	23
1.3.4 Genes que ayudan a evadir la apoptosis.....	23
1.3.5 Angiogénesis.....	24
1.3.6 Invasión y metástasis.....	24
1.4 Estrategias terapéuticas.....	25
1.5 Técnicas de alto rendimiento para la identificación de genes implicados en enfermedades.....	27
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1 Material biológico.....	32
3.1.1 Líneas celulares.....	32
3.1.2 Muestras tumorales.....	32
3.2 Establecimiento de líneas celulares con expresión ectópica de EWS/FLI1.....	33
3.3 Establecimiento de líneas de Ewing con expresión inducible de shARN.....	34
3.4 Estudios de expresión génica.....	36
3.4.1 Análisis seriado de la expresión génica (SAGE, <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> ).....	36
3.4.2 Estudios de expresión mediante matrices de oligonucleótidos.....	38
3.4.3 RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	41
3.4.4 Detección de los ARNm de los receptores de CCK.....	42
3.4.5 Western blot.....	43
3.4.6 Radioinmunoensayo de CCK.....	45
3.5 Estudios de proliferación; ciclo celular y apoptosis.....	45
3.5.1 Ensayos de proliferación.....	45
3.5.2 Crecimiento en agar blando.....	46
3.5.3 Citometría de flujo.....	47
3.6 Estudios <i>in vivo</i> . Formación de tumores en ratones.....	48
3.7 Análisis estadístico.....	48
<b>4. Resultados.....</b>	<b>49</b>
4.1 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante el empleo de la técnica SAGE (Serial Analysis of Gene Expression).....	50
4.2 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante el empleo de matrices de oligonucleótidos ( <i>microarrays</i> ).....	56
4.2.1 Establecimiento de modelos de expresión inducible de EWS/FLI1.....	56
4.2.2 Efecto de la expresión de EWS/FLI1 sobre las células 293 EcR y HeLa TeT-On..	57
4.2.3 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1: CCK y NR0B1.....	59
4.3 Papel de CCK en las características tumorogénicas de los tumores de Ewing.....	73
4.3.1 Efecto del silenciamiento de CCK en líneas de Ewing.....	73
4.3.2 Expresión de los receptores de CCK en líneas y tumores de Ewing.....	78
4.3.3 Expresión de Gastrina en líneas y tumores de Ewing.....	82

---

4.3.4 Efecto de la administración exógena de agonistas de los receptores de CCK en la proliferación de las células de Ewing .....	84
4.3.5 Efecto de los antagonistas de los receptores de CCK en la proliferación celular de las líneas celulares de Ewing .....	86
<b>5. Discusión .....</b>	<b>93</b>
5.1 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante técnicas de análisis genómico de alto rendimiento.....	94
5.2 CCK es inducido por EWS/FLI1 en células de Ewing .....	95
5.3 CCK regula de forma autocrina la proliferación de las células de Ewing .....	98
5.4 El devazepide, un antagonista de los receptores CCKAR inhibe la proliferación de las células de Ewing tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> .....	103
5.5 Implicaciones terapéuticas de la inhibición de CCK y del devazepide en los tumores de Ewing .....	105
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>107</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>109</b>

---

## *Abreviaturas*

PNET	Tumores neuroectodérmicos primitivos
SE	Sarcoma de Ewing
NB	Neuroblastoma
OS	Osteosarcoma
RMSA	Rabdomiosarcoma alveolar
RMSE	Rabdomiosarcoma embrionario
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
HLH	Dominio de unión de proteína tipo hélice-lazo-hélice
SAGE	Análisis seriado de la expresión génica
siARN	ARN de interferencia pequeño
shARN	ARNs pequeños en forma de horquilla
CCK8s	CCK8 sulfatado
SD	Desviación estándar
BrEt	Bromuro de etidio
BrdU	Bromo-deoxi-uridina

## ***1. Introducción***

### **1.1 Los Tumores de la familia Ewing**

Los Tumores de la familia Ewing incluyen a los sarcomas de Ewing, descritos por primera vez por James Ewing en 1921, los tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) y los tumores de Askin. Típicamente aparecen como masas destructivas asociadas a hueso (especialmente en pelvis, fémur, fibula y tibia), aunque en el 15 % de los pacientes se encuentran en tejidos blandos sin aparente asociación a tejido óseo. A nivel histológico están formados por capas de células pequeñas redondeadas y azules muy indiferenciadas. En general, afectan a adultos jóvenes en su primera y segunda década de vida, tratándose de la segunda patología tumoral ósea más común en esta población (Grier 1997; Denny 1998; Kovar 1998; de Alava *et al.* 2000; Paulussen *et al.* 2001). Su frecuencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres, y en la población europea con respecto a la china o africana (Stiller *et al.* 1996; Zucman-Rossi *et al.* 1997).

El origen celular de estos tumores es desconocido, aunque se piensa que proceden de progenitores de la cresta neural. Esta hipótesis se basa en que algunos tumores de Ewing expresan enzimas neuronales típicas (como la catecol acetil transferasa, implicada en la biosíntesis de neurotransmisores en nervios colinérgicos, y la enolasa específica de neurona), en la capacidad de ciertas líneas celulares derivadas de los tumores de Ewing para formar dendritas primitivas en respuesta a agentes diferenciadores, y en presentar un perfil de expresión génica similar al de las células derivadas de la cresta neural (Cavazzana *et al.* 1987; O'Regan *et al.* 1995; Staeger *et al.* 2004).

Tradicionalmente, el diagnóstico de estos tumores ha presentado ciertas dificultades debido a la ausencia de características morfológicas diferenciales. La mayoría de estos tumores expresan altos niveles de la glicoproteína transmembrana MIC2/CD99 (Kovar *et al.* 1990; Perlman *et al.* 1994), pero este marcador se expresa también a niveles elevados en otros tumores, incluyendo algunos tumores de células pequeñas redondeadas y azules, tales como los osteosarcomas de células pequeñas, los sarcomas sinoviales y algunos rhabdomyosarcomas. En 1984 se descubrió la presencia de una translocación cromosómica en estos tumores, permitiendo desde entonces un diagnóstico más fiable por RT-PCR o hibridación in situ (Aurias *et al.* 1984; Turc-Carel *et al.* 1984; Delattre *et al.* 1994). Esta translocación está formada por el extremo amino terminal del gen EWS (y en raras ocasiones el gen TLS/FUS) que se fusiona al extremo carboxilo terminal de varios factores de transcripción de la familia ETS, siendo FLI1 el factor de transcripción más frecuentemente implicado. Existen

numerosas pruebas experimentales que indican que estos factores de transcripción quiméricos son esenciales para el desarrollo de estos tumores.

## **1.2 Características moleculares y funcionales de los factores de transcripción quiméricos EWS/ETS**

### **1.2.1 El factor de transcripción quimérico EWS/ETS**

En los tumores de Ewing, el gen EWS (*E*Wing *S*arcoma) aparece fusionado a 5 diferentes factores de transcripción de la familia ETS (FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1). En el 85 % de los casos interviene FLI1 (*F*riend *L*eukaemia *I*ntegration *I*) y en el 10 % ERG (*E*ts *R*elated *G*ene), mientras que FEV (*F*ifth *E*wing *V*ariant), E1AF (*E*1A *F*actor o *E*TV4, *E*ts *V*ariant gene 4) y ETV1 (*E*ts *T*ranslocation *V*ariant *I*) son muy infrecuentes. También se ha descrito la fusión entre el gen TLS/FUS (*T*raslocated in *L*iposarcoma/*F*usion, perteneciente a la misma familia que EWS) y el factor de transcripción ERG (Tabla 1). El factor de transcripción ETS, ETV5/ERM tiene gran homología con ETV1 y E1AF (Monte *et al.* 1994), lo que sugiere que también podría aparecer la fusión EWS/ETV5 en los tumores de Ewing.

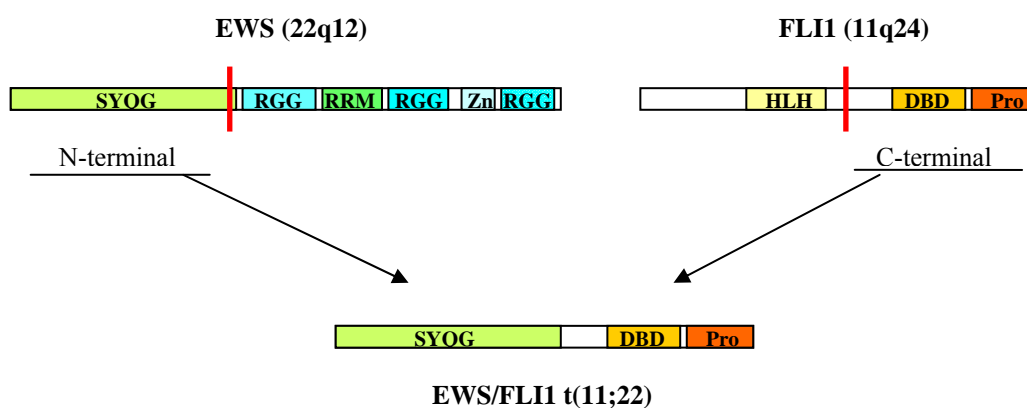
**Tabla 1. Tipos de translocaciones y sus proteínas quiméricas correspondientes, identificadas en los tumores de Ewing**

<b>Translocación</b>	<b>Proteína quimérica</b>	<b>Referencia</b>
t(11;22)(q24;q12)	EWS/FLI1	(Delattre <i>et al.</i> 1992)
t(21;22)(q22;q12)	EWS/ERG	(Zucman <i>et al.</i> 1993; Sorensen <i>et al.</i> 1994)
t(7;22)(p22;q12)	EWS/ETV1	(Jeon <i>et al.</i> 1995)
t(2;22)(q33;q12)	EWS/FEV	(Peter <i>et al.</i> 1997)
t(17;22)(q12;q12)	EWS/E1AF	(Kaneko <i>et al.</i> 1996; Urano <i>et al.</i> 1996)
t(16;21)(p11;q22)	FUS/ERG	(Shing <i>et al.</i> 2003)

En todos estos casos ocurre una fusión entre el extremo amino terminal del gen EWS o TLS/FUS con el extremo carboxilo terminal del factor de transcripción ETS implicado. El punto de fusión se origina a nivel de diferentes exones del gen EWS o TLS/FUS y del factor de transcripción. De este modo, se han descrito 12 variantes de EWS/FLI1 (Zucman *et al.*

1993; Zoubek *et al.* 1994; Zoubek *et al.* 1996), siendo las dos más comunes la denominada tipo I (en la que el exón 7 de EWS se yuxtapone al exón 6 de FLI1) y la tipo II (exón 7 de EWS yuxtapuesto al exón 5 de FLI1), que suponen el 80 % de los casos. Estas variantes pueden tener significado pronóstico (Zoubek *et al.* 1996; de Alava *et al.* 1998), de modo que pacientes con EWS/FLI1 tipo I parecen tener una mayor supervivencia que los que tienen otras variantes. Para EWS/ERG se han descrito cinco variantes, siendo la más abundante la fusión a nivel del exón 7 de EWS con el exón 6 de ERG (Zucman *et al.* 1993; Zoubek *et al.* 1994; Ginsberg *et al.* 1999).

Las características funcionales del factor de transcripción quimérico van a depender de los dominios aportados por cada gen (Figura 1). A continuación se describen brevemente las características moleculares de los genes implicados, para comprender mejor sus propiedades oncogénicas.



**Figura 1. Regiones de EWS y FLI1 que intervienen en el factor de transcripción quimérico EWS/FLI1.** RGG: región rica en arginina-glicina-glicina, RRM: motivo de reconocimiento de ARN, SYQG: región rica en serina-tirosina-glutamina-glicina que tiene un alto potencial de transactivación, Zn: dedos de Zinc, DBD: dominio de unión a ADN, Pro: dominio de activación rico en prolina, HLH: dominio de unión de proteínas tipo hélice-lazo-hélice.

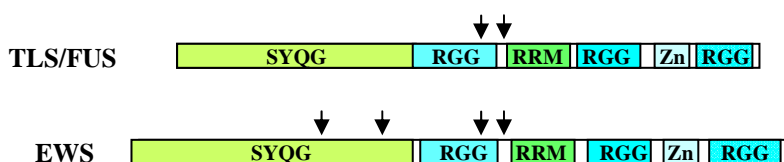
### 1.2.2 La familia TET: EWS, TLS/FUS y TAFII68

La familia de proteínas denominada TET está integrada por EWS (*Ewing Sarcoma*), TLS/FUS (*Traslocated in Liposarcoma/Fusion*) y TAFII68 (*human TBP (TATA binding protein) associated Factor 68*), cuyos miembros tienen en común la presencia de un dominio de 87 aminoácidos (RRM, *RNA Recognition Motif*) que media la unión de dichas proteínas con

el ARN (Bertolotti *et al.* 1996). Basado en estas características estructurales, se piensa que las proteínas TET intervienen en la transcripción y/o procesamiento del ARN (Figura 2).

El gen EWS, que mayoritariamente interviene en la formación de la translocación, se encuentra en el cromosoma 22, está formado por 17 exones, ocupa una región de 40 kb y codifica para una proteína de 656 aminoácidos. EWS tiene expresión ubicua en las células de mamíferos en crecimiento, localizándose fundamentalmente en el núcleo, aunque su expresión puede cambiar con diferentes estados fisiológicos. Se pueden originar dos transcritos por *splicing* alternativo (EWS y EWS-b), diferenciándose en la presencia o ausencia de los exones 8 y 9.

El extremo amino terminal, el cual formará parte de EWS/ETS, presenta una serie de repeticiones degenerativas del dipéptido Ser-Tyr en los primeros 7 exones, y es además rico en glutamina, treonina y prolina (SYQG). Esta región media la interacción proteína-proteína, de modo que EWS puede unirse al factor de transcripción basal TFIID, a la RNA polimerasa II (subunidad grande) y al coactivador CBP/p300, y puede así intervenir en la iniciación de la transcripción génica (Bertolotti *et al.* 1996; Bertolotti *et al.* 1998; Rossow *et al.* 2001). TLS/FUS puede unirse a varios receptores nucleares y al factor de transcripción NF-κB (Powers *et al.* 1998; Uranishi *et al.* 2001).



**Figura 2. Miembros de la familia TET que intervienen en las translocaciones características de los tumores de Ewing.** TLS/FUS se puede fusionar al factor de transcripción ERG de la familia ETS, y EWS a los factores de transcripción de la familia ETS, FLI1, ERG, FEV, ETV1 y E1AF para formar las translocaciones típicas de los tumores de Ewing. SYQG: región rica en serina-tirosina-glutamina-glicina que tiene alto potencial de transactivación, RGG: región rica en arginina-glicina-glicina, RRM: motivo de reconocimiento de RNA, Zn: dedos de Zinc. Las flechas indican los puntos de fusión con los factores de transcripción de la familia ETS.

En otros tipos de cáncer, la región N-terminal de los miembros de la familia TET aparece fusionada a la región C-terminal de factores de transcripción diferentes a los de la familia ETS, determinando la naturaleza del dominio de unión a ADN, el tipo de tumor asociado (Tabla 2).



**Tabla 2. Translocaciones cromosómicas en las que intervienen los miembros de la familia TET**

Translocación	Proteína quimérica	Tumor
t(12;16)(q13;q11)	TLS(FUS)/CHOP	Sarcoma indiferenciado / Liposarcoma mixoide
t(12;22)(q13;q12)	EWS/CHOP	Liposarcoma mixoide
t(9;22)(p22;q12)	EWS/CHN(TEC)	Condrosarcoma mixoide
t(9;17)(q22;q11)	TAFII68/CHN(TEC)	Condrosarcoma mixoide
t(12;22)(q13;q12)	EWS/ATF1	Melanoma de partes blandas
t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1	Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas
t(1;22)(q36;q12)	EWS/ZSG	Sarcoma de células redondeadas
t(16;21)(p11;q12)	TLS(FUS)/ERG	Leucemia mieloide / Tumores de Ewing

En el extremo carboxilo terminal (exones 11 al 13) se encuentra el dominio RRM (*RNA Recognition Motif*) que media la unión proteína-ARN (Ohno *et al.* 1994; Prasad *et al.* 1994; Zinszner *et al.* 1997) y una serie de regiones ricas en arginina-glicina-glicina (dominio RGG en los exones 8-9, 14 y 16) que también parecen facilitar la unión a ARN (Kim *et al.* 1999). Estas regiones no estarán presentes en las proteínas de fusión EWS/ETS o FUS/ERG. Las proteínas EWS y TLS/FUS también interactúan físicamente con proteínas implicadas en procesamiento del ARNm (Hallier *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998; Knoop *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000; Lerga *et al.* 2001). Así EWS se une a las proteínas TASR (familia de factores de *splicing* de ARN) a través de un dominio localizado en su región C-terminal y por tanto ausente en las proteínas de fusión EWS/ETS. Por esta razón EWS/ETS puede interferir en el normal procesamiento del ARN. Se ha descrito que EWS/FLI1 puede antagonizar el *splicing* de construcciones de ARNm modelo (Yang *et al.* 2000).

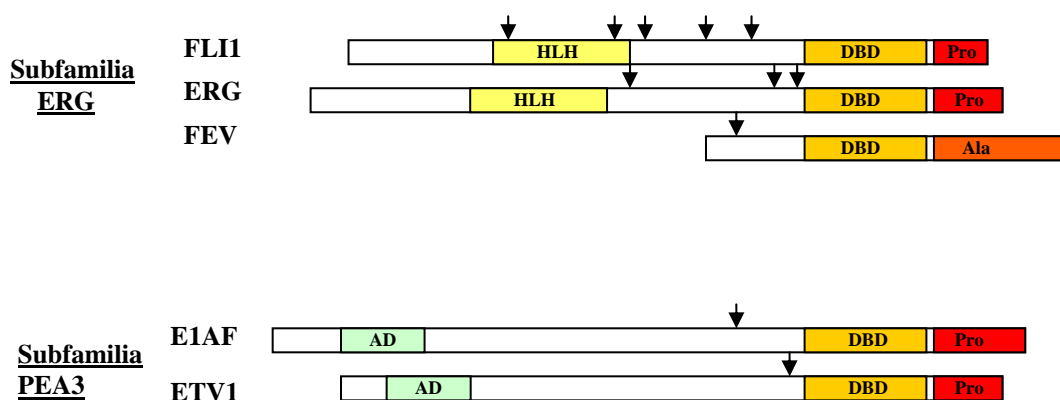
### 1.2.3 La familia de factores de transcripción ETS: FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1

En los tumores de Ewing los factores de transcripción FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1, pertenecientes a la familia ETS (*Erythroblastic Transforming Sequence*) aparecen fusionados a los genes EWS o TLS/FUS de la familia de proteínas TET. Estos factores de transcripción se caracterizan por la presencia de un dominio de unión a ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) formado por 87 aminoácidos (Figura 3), a través del cual se unen a una secuencia de ADN pequeña y degenerativa (GGAA/T), pudiéndose unir al mismo sitio diferentes miembros de esta familia. Los factores ETS típicamente forman complejos heterodiméricos con otros factores de transcripción como NF-EM5, Sp1, Ap1 y SRF. Estas

interacciones son reguladas por fosforilación, modulándose de esta forma su capacidad de unión a los sitios diana en el ADN (Fitzsimmons *et al.* 1996). Por tanto, la especificidad fisiológica intrínseca del factor de transcripción ETS depende de las interacciones proteína-ADN y proteína-proteína. Flanqueando el dominio de unión a ADN (DBD) hay dominios de interacción proteína-proteína del tipo hélice-lazo-hélice (HLH) que median la activación y/o represión transcripcional. Algunos de estos factores de transcripción poseen dominios autoinhibitorios que bloquean la unión a ADN en ausencia de cofactores. Como consecuencia de la fusión del gen ETS con el gen EWS o TLS/FUS, el dominio de unión a ADN (DBD) de estos factores de transcripción va a formar parte de los factores de transcripción quiméricos EWS/ETS o FUS/ERG.

Los factores de transcripción ETS regulan la expresión de genes diana implicados en oncogénesis, genes supresores de tumores y genes relacionados con apoptosis, diferenciación, angiogénesis e invasión y metástasis (Dittmer *et al.* 1998; Oikawa 2004).

Basándonos en el grado de homología del dominio de unión a ADN (DBD), los diferentes factores de transcripción (27 miembros conocidos de la familia ETS, Hollenhorst *et al.* 2004) se agrupan en subfamilias. FLI1, ERG y FEV pertenecen a la subfamilia ERG mostrando un 87 % de identidad y un 98 % de similitud entre ellos (Figura 3).



**Figura 3. Factores de transcripción de la familia ETS que intervienen en los tumores de Ewing.** Estos 5 factores de transcripción se pueden fusionar a EWS (ERG también se ha encontrado fusionado a TLS/FUS) para formar las translocaciones características de los tumores de Ewing. Se agrupan en las subfamilias ERG y PEA3 en base a la homología en el dominio de unión a ADN (DBD). Además presentan los siguientes dominios: HLH, dominio hélice-lazo-hélice; AD, dominio ácido que forma parte de un dominio de activación en la región N-terminal; Pro, dominio de activación rico en prolina; Ala, dominio rico en alanina. Las flechas indican los puntos de fusión con EWS o TLS/FUS.

Existen varias isoformas de FLI1 que difieren ligeramente en su región N-terminal (Dhulipala *et al.* 1998; Sarrazin *et al.* 2000), como consecuencia de la existencia de diferentes sitios de iniciación de la transcripción y de la transducción. FLI1 es una proteína nuclear, que interviene en el desarrollo embrionario temprano, expresándose en células de la cresta neural (Meyer *et al.* 1993; Melet *et al.* 1996; Mager *et al.* 1998; Brown *et al.* 2000); en fases posteriores del desarrollo, también se expresa en el endotelio vascular y en los precursores de las células sanguíneas, y por último, en adultos, la expresión de FLI1 está restringida principalmente a las células hematopoyéticas, detectándose niveles elevados de expresión en el timo y el hígado, debido a la gran cantidad de linfocitos, eritrocitos y progenitores megacariocíticos presentes en estos órganos. La distribución de FLI1 es pues compatible con un papel en la migración y diferenciación celular durante el desarrollo. FLI1 puede inhibir la diferenciación y promover la proliferación de células progenitoras eritroides (Pereira *et al.* 1999; Tamir *et al.* 1999). Los ratones *knock-out* de FLI1 indican que esta proteína es requerida para el desarrollo vascular y megacariopoyesis en ratón (Hart *et al.* 2000; Spyropoulos *et al.* 2000), mientras que su activación da lugar a eritroleucemia, sugiriendo que FLI1 es un proto-oncogén (Ben-David *et al.* 1991; Hart *et al.* 1995). Sin embargo, es interesante destacar que EWS/FLI1 es un activador transcripcional más potente que FLI1 a pesar de que ambas proteínas muestran la misma afinidad y especificidad de unión al ADN (May *et al.* 1993a; May *et al.* 1993b; Ohno *et al.* 1993; Bailly *et al.* 1994; Mao *et al.* 1994; Lessnick *et al.* 1995).

ERG-1 tiene un 98 % de homología con FLI1 en su dominio de unión a ADN (83 de 85 aminoácidos), difiriendo significativamente en el resto de la proteína (homología global del 68 %). La sobreexpresión de ERG en células NIH3T3 hace que adquieran un fenotipo transformante, sugiriendo que ERG puede comportarse como un oncogén en determinadas condiciones (Ben-David *et al.* 1991; Hart *et al.* 1995). Como en el caso de EWS/FLI1, EWS/ERG presenta mayor actividad transcripcional que la proteína nativa ERG (Ohno *et al.* 1994).

FEV se caracteriza por tener el extremo amino terminal más corto (42 aminoácidos) sugiriendo que le faltan importantes dominios de regulación transcripcional contenidos en FLI1 y ERG. El extremo carboxilo terminal presenta un dominio de 112 aminoácidos ricos en alanina, prolina, leucina y glicina. Además, a diferencia de FLI1 y ERG, este extremo presenta 12 alaninas contiguas, características de represores transcripcionales, por lo que FEV podría reprimir la transcripción (Kim *et al.* 1999; Maurer *et al.* 2003). Por estas razones, la proteína de fusión EWS/FEV podría ser menos activa que EWS/FLI1 y EWS/ERG, lo que explicaría su baja frecuencia en los tumores de Ewing.

La subfamilia PEA3 está integrada por ETV1 y E1AF (ETV4), los cuales comparten el 96 % de identidad, y el 100 % de similitud en sus dominios de unión a ADN (DBD, Figura 3). ETV1 tiene un 58 % y un 63 % de identidad en este dominio con FLI1 y ERG respectivamente. Además, poseen dominios homólogos adicionales, incluyendo los dominios de activación N y C terminal. Ambos son efectores de los genes oncogénicos Ras y HER2/Neu y han sido implicados en la formación de tumores mamarios que a menudo están asociados a la sobreexpresión de HER2/Neu (Kurpios *et al.* 2003).

#### 1.2.4 Propiedades oncogénicas de la proteína quimérica EWS/FLI1

Al originarse la translocación, el dominio transactivador del factor de transcripción ETS (localizado en su región N-terminal), es reemplazado por la región N-terminal de EWS. Esta región de EWS funciona entonces como un nuevo dominio transactivador ya que la eliminación de este dominio en las proteínas EWS/ETS, reduce su capacidad de transformación (Lessnick *et al.* 1995), y en ensayos *reporter*, este dominio exhibe una potente actividad transactivadora (May *et al.* 1993b; Ohno *et al.* 1993; Bailly *et al.* 1994; Mao *et al.* 1994). A pesar de la heterogeneidad estructural de las distintas translocaciones EWS/ETS, todas mantienen intacto el dominio de unión a ADN del miembro de la familia ETS (DBD, Figura 1), de modo que las mutaciones que interfieren con su capacidad de unión al ADN reducen o eliminan su potencial de transformación (May *et al.* 1993a; Jaishankar *et al.* 1999). Por tanto, ambas porciones de EWS/ETS (EWS y ETS) son imprescindibles y responsables de su actividad biológica completa, de modo que el dominio de activación transcripcional de EWS media en las interacciones proteína-proteína y el dominio de unión a ADN del factor de transcripción ETS, las interacciones proteína-ADN, seleccionando los genes que regula.

Se ha demostrado que EWS/FLI1 actúa como un oncogén dominante, de modo que en células NIH3T3, EWS/FLI1 promueve el crecimiento independiente de anclaje (May *et al.* 1993b) y la formación de tumores en ratones inmunodeficientes (Thompson *et al.* 1999; Arvand *et al.* 2001). Además, en estos fibroblastos, EWS/FLI1 induce cambios morfológicos, pasando de la característica forma en huso de los fibroblastos a un aspecto de células pequeñas y redondeadas, similares a las observadas en los tumores de Ewing (Teitell *et al.* 1999).

Por otro lado, la transducción de una construcción dominante negativa para FLI1 en líneas celulares de Ewing inhibe el crecimiento, y el tratamiento de las líneas de Ewing con oligonucleótidos antisentido o ARNs de interferencia dirigidos contra EWS/FLI1, disminuye su tasa de crecimiento, como consecuencia de una acumulación de las células en fase G1,

incrementa la susceptibilidad a la apoptosis, inhibe la capacidad de las células de Ewing para crecer independientemente de anclaje y previene la formación de tumores en ratones desnudos (Ouchida *et al.* 1995; Kovar *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 1997; Toretsky *et al.* 1997a; Yi *et al.* 1997; Lambert *et al.* 2000; Prieur *et al.* 2004; Hu-Lieskovan *et al.* 2005a; Siligan *et al.* 2005).

Todos estos datos indican que la expresión constitutiva de EWS/FLI1 o de alguna de las proteínas quiméricas homólogas, es necesaria para el desarrollo y crecimiento de los tumores de Ewing.

Además del efecto que EWS/FLI1 tiene sobre la transcripción génica (aspecto que se tratará en detalle en el siguiente apartado), se han descrito otras características del factor de transcripción quimérico que podrían estar también implicadas en su potencial oncogénico. Por ejemplo, la proteína EWS/ETS, que se localiza en el núcleo tanto en líneas celulares de Ewing como en células NIH3T3 transducidas, interacciona con al menos dos subunidades de la ARN polimerasa II (la subunidad mayor hiperfosforilada y hsRPB7) y el factor de splicing U1C (Petermann *et al.* 1998; Yang *et al.* 2000). De este modo, la proteína EWS/ETS puede avanzar junto a la polimerasa y afectar al *splicing* acoplado a la elongación de la transcripción (Knoop *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000; Knoop *et al.* 2001).

Otro modo de acción de EWS/FLI1 puede implicar su interacción física con BARD1 (Spahn *et al.* 2002) o con el complejo BARD1/BRCA1, que actúa como una ubiquitin ligasa (Irminger-Finger *et al.* 2002). BRCA1 interviene en la reparación del ADN (Narod *et al.* 2004), de modo que la inhibición del complejo BARD1/BRCA1 por EWS/FLI1, podría promover tumorigénesis.

En los tumores de Ewing, uno de los alelos de EWS (o TLS/FUS) se inactiva como consecuencia de la translocación, quedando este gen en hemicigosis. La reducción de dosis de uno de estos genes podría contribuir al desarrollo de los tumores de Ewing. EWS/FLI1 puede también formar complejos con EWS y FLI1 (Spahn *et al.* 2003) y así potencialmente modular su función. Las proteínas que interaccionan con la región N-terminal de EWS o la región C-terminal de uno de los miembros de la familia ETS, pueden también interaccionar con EWS/ETS y así ser secuestradas, interfiriendo con su normal funcionamiento (Rossow *et al.* 2001; Nakatani *et al.* 2003; Ramakrishnan *et al.* 2004).

En los últimos años, se ha propuesto que el fenotipo de los tumores de Ewing no es consecuencia únicamente de la expresión de EWS/ETS, sino que también refleja la propia histiogénesis de los tumores de Ewing. Esta hipótesis se apoya en que el patrón de expresión de los genes asociados a los tumores de Ewing, muestra una elevada similitud con el observado en los tejidos fetales, neuronales y endoteliales, soportando el concepto de que un progenitor

derivado de la cresta neural primitiva, en la transición de la diferenciación mesenquimal y endotelial originaría las células *stem* de Ewing, las cuales podrían residir en la médula ósea (Staege *et al.* 2004). De este modo, los tumores de Ewing probablemente se originan a partir de células progenitoras multipotentes primitivas que pueden diferenciar a derivados de la cresta neural. Por otro lado, se ha observado que la expresión de EWS/FLI1 en una línea celular de rhabdomyosarcoma embrionario (diferenciación miogénica) o de neuroblastoma (diferenciación simpática neural) bloquea los programas de diferenciación específicos e induce un programa fenotípico característico de la cresta neural y similar al de los tumores de Ewing (Rorie *et al.* 2004; Hu-Lieskovan *et al.* 2005b). En células de estroma derivadas de la médula ósea de ratón, la expresión de EWS/FLI1 o EWS/ERG induce cambios morfológicos y bloquea la diferenciación osteogénica y adipogénica impuesta por agentes diferenciadores (Torchia *et al.* 2003). A pesar de todo, seguimos sin saber cual es el origen celular de los tumores de Ewing, si estos tumores reflejan el fenotipo de la célula *stem* tumoral que tiene bloqueada la diferenciación como consecuencia de EWS/ETS, o si este oncogén impone un programa de diferenciación incompleta en un precursor celular pluripotente (Kovar 2005).

Por último, señalar que parece necesaria la existencia de otras alteraciones genéticas secundarias para el desarrollo de los tumores de Ewing (Castillero-Trejo *et al.* 2005), ya que la transfección de EWS/FLI1 en ciertos sistemas celulares es letal (Deneen *et al.* 2001; Lessnick *et al.* 2002). En los tumores de Ewing, se han descrito otros eventos oncogénicos además de la presencia de la translocación, como la delección homocigota del locus de p16 en el 25-30 % de los casos (Kovar *et al.* 1997), alteración que podría estar asociada con un peor pronóstico (Wei *et al.* 2000). También son frecuentes otras alteraciones como la ganancia de un cromosoma 8 (35-55 % de los casos) y/o 12 (25 %), la translocación t(1:16) (20 % ) o la presencia de delecciones en 1p36 (18 %) (Armengol *et al.* 1997; Hattinger *et al.* 1999; Hattinger *et al.* 2000).

### **1.3 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1**

EWS/FLI1 actúa como un factor de transcripción quimérico, como consecuencia de la unión de los dominios de transactivación y de unión a ADN aportados por los genes EWS y FLI1 respectivamente. Se han identificado diferentes genes regulados por EWS/FLI1 que pueden ser agrupados dependiendo de la función que desempeñan.

### 1.3.1 Genes que estimulan la proliferación celular

Se han descrito tres genes activados por EWS/FLI1 con una posible implicación en la estimulación de la proliferación de las células tumorales.

PDGF-C (factor de crecimiento derivado de plaquetas) se ha visto aumentado en células murinas NIH3T3 transfectadas con EWS/FLI1 y expresado en más del 60 % de los tumores de Ewing. La inhibición de su expresión en líneas de Ewing transfectadas con una proteína dominante negativa de EWS/FLI1, indica que PDGF-C es una diana de EWS/FLI1 (Zwerner *et al.* 2001).

CCND1 (ciclina D1) está sobreexpresada en muchos tumores de Ewing y su promotor es regulado por EWS/ETS (Khan *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2001; Wai *et al.* 2002; Baer *et al.* 2004). Su sobreexpresión está implicada en la desregulación del ciclo celular (Diehl 2002; Fu *et al.* 2004).

c-Myc es inducido, según algunos estudios, a nivel de promotor por EWS/FLI1 y se expresa a niveles elevados en líneas celulares y tumores de Ewing (Bailly *et al.* 1994; Dauphinot *et al.* 2001; Nishimori *et al.* 2002). c-Myc es un factor de transcripción muy importante implicado en oncogénesis, que induce CDK4 y el gen codificante de ciclina D2, por lo que induce proliferación celular (Luscher 2001; Pelengaris *et al.* 2002).

### 1.3.2 Genes que ayudan a evadir las señales que inhiben el crecimiento celular

El receptor tipo II de TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ IIIR) es inhibido por EWS/FLI1, como consecuencia de su unión al promotor de este gen tanto *in vivo* como *in vitro*. TGF $\beta$ IIIR no se ha detectado por inmunohistoquímica en tumores de Ewing (Hahm *et al.* 1999; Im *et al.* 2000; Fukuma *et al.* 2003; Kovar *et al.* 2003). Este receptor forma heterodímeros con el receptor del TGF- $\beta$  tipo I, a los que se une TGF- $\beta$  para controlar el crecimiento.

Los inhibidores de ciclinas dependientes de kinasas, tales como p21<sup>WAF1/CIP1</sup> y p57<sup>KIP2</sup> no se expresan en los tumores de Ewing. Oligonucleótidos antisentidos dirigidos contra EWS/FLI1 inducen la expresión de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> en líneas de Ewing. Además EWS/FLI1 puede unirse al promotor de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> *in vitro* y reducir su actividad en ensayos *reporter* (Nakatani *et al.* 2003). EWS/FLI1 también puede unirse indirectamente a este promotor vía interacciones proteína-proteína con el factor de transcripción Brn-3a, inhibiendo su capacidad de activación de dicho promotor (Gascoyne *et al.* 2004). Por otro lado, c-myc, que es inducido por EWS/FLI1, puede inhibir a su vez a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Wanzel *et al.* 2003). EWS/FLI1 inhibe

también p57<sup>KIP2</sup> y la expresión ectópica de p57<sup>KIP2</sup> bloquea la proliferación de las líneas celulares de Ewing (Dauphinot *et al.* 2001).

Id2 está aumentada por EWS/FLI1 como consecuencia de la unión a su promotor tanto *in vivo* como *in vitro*. Por inmunohistoquímica y *northern-blot* se ha observado que Id2 se expresa a elevados niveles en la mayoría de líneas y tumores de Ewing (Nishimori *et al.* 2002; Fukuma *et al.* 2003). Id2 es una proteína hélice-lazo-hélice a la que le falta el dominio de unión a ADN y funciona como un represor transcripcional. Id2 puede suprimir la diferenciación de gran variedad de células, impidiendo la unión al ADN de otros factores de transcripción tipo hélice-lazo-hélice como E2A, MyoD o miogenina. De esta manera, Id2 podría contribuir al mantenimiento del estado indiferenciado característico de las células de los tumores de Ewing. Por otro lado, Id2 puede promover el ciclo celular suprimiendo la activación de p21<sup>WAF/CIP1</sup> dependiente de E2A. Este efecto puede incrementarse por la interacción de Id2 con proteínas sin estructura hélice-lazo-hélice de la familia de supresores de tumores de retinoblastoma (pRb, p107 y p130). La unión de Id2 a estas proteínas parece obstruir su función vigilante en la regulación del ciclo celular, por la disociación de estas desde los complejos de factores de transcripción E2F/DP1 (Lasorella *et al.* 2001; Zebedee *et al.* 2001; Ruzinova *et al.* 2003).

### 1.3.3 Telomerasa

En la mayoría de las células tumorales el incremento de la expresión de hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) permite que estas escapen a la senescencia, y en consecuencia favorece la inmortalidad y progresión de la carcinogénesis (Hiyama *et al.* 2003; Janknecht 2004). La subunidad catalítica de la telomerasa es el factor limitante para la actividad telomerasa. EWS/FLI1 activa al promotor de hTERT y su expresión disminuye tras el silenciamiento de EWS/FLI1 con siARNs en las líneas celulares de Ewing (Takahashi *et al.* 2003; Fuchs *et al.* 2004a). Parece que EWS/FLI1 no activa directamente al promotor de hTERT sino que probablemente lo hace a través de CBP/p300, aunque también podría estar implicado en este proceso c-myc (Luscher 2001; Janknecht 2004). Por inmunohistoquímica, se ha observado que el 78 % de los tumores de Ewing son positivos para hTERT.

### 1.3.4 Genes que ayudan a evadir la apoptosis

EWS/FLI1 inhibe IGFBP-3 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3) tanto *in vivo* como *in vitro* a través de su promotor (Prieur *et al.* 2004). IGFBP-3 interacciona con IGF-



1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*), evitando la activación de su receptor y por tanto interfiriendo con la supervivencia celular, aunque IGFBP-3 puede ejercer funciones pro-apoptóticas independientes de IGF-1 (Firth *et al.* 2002; Grimberg 2003; Pollak *et al.* 2004). El receptor de IGF-1 se expresa en los tumores de Ewing, y se requiere para el crecimiento de las células tumorales de Ewing y para la transformación de fibroblastos NIH3T3 mediada por EWS/FLI1 (Sekyi-Otu *et al.* 1995; Toretsky *et al.* 1997b; Scotlandi *et al.* 1998; Scotlandi *et al.* 2002). Una de las principales rutas de señalización afectadas por IGF-1 es la ruta de supervivencia de Akt, activada frecuentemente en células cancerosas (Luo *et al.* 2003; Mitsiades *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005). El tratamiento de las células tumorales de Ewing con IGFBP-3 reduce la cantidad de Akt activado (Prieur *et al.* 2004). Tanto la inhibición de IGFBP-3 como la consecuente actividad de Akt en las células tumorales de Ewing pueden contribuir a la supresión de la apoptosis, la cual es fundamental para la formación tumoral.

#### 1.3.5 Angiogénesis

El crecimiento de las células tumorales, como el de cualquier otra célula, depende del suplemento de oxígeno y nutrientes. La ausencia de estos da lugar a necrosis tumoral, de modo que para evitarla los tumores inducen angiogénesis. En este proceso destaca el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que se expresa a niveles elevados en más de la mitad de los sarcomas de Ewing. Además, se han detectado elevados niveles de VEGF en suero de algunos pacientes con sarcoma de Ewing (Kushlinskii *et al.* 2000; Holzer *et al.* 2001; Pavlakovic *et al.* 2001). EWS/ETS puede activar el promotor de VEGF (Fuchs *et al.* 2004b; Dalal *et al.* 2005; Guan *et al.* 2005), aunque parece no unirse directamente al promotor, sino indirectamente vía Sp1 (factor de transcripción con dedos de zinc de expresión ubicua) (Finkenzeller *et al.* 1997; Mukhopadhyay *et al.* 1997; Suske 1999; Adrian R. Black 2001). VEGF también es indirectamente regulado por EWS/ETS vía IGF-1 y su receptor (Strammiello *et al.* 2003). La elevada expresión de VEGF es un indicador negativo de supervivencia en los sarcomas de Ewing (Fuchs *et al.* 2004b), sugiriendo que los niveles de VEGF pueden ser útiles en la monitorización de los pacientes con tumor de Ewing.

#### 1.3.6 Invasión y metástasis

La invasión tumoral y los procesos de metástasis requieren de la destrucción y remodelación de la matriz extracelular, destacando en este proceso las metaloproteinasas de la

matriz extracelular (MMPs). Se ha descrito que EWS/ETS activa el promotor de MMP-1 y MMP-3, aunque el nivel de expresión en los tumores de Ewing es muy bajo (Braun *et al.* 1995; Yabe *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2003). Sin embargo MMP-2, 9 y 14 si se expresan en la mayoría de tumores de Ewing analizados (Yabe *et al.* 2002), aunque la relación de estas MMPs con EWS/FLI1 no ha podido ser demostrada.

#### **1.4 Estrategias terapéuticas**

En la actualidad, los tumores de Ewing se tratan agresivamente con una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia (Meyers *et al.* 2000; Weber 2002; Rodriguez-Galindo *et al.* 2003). A pesar de que los tratamientos establecidos durante la pasada década han mejorado drásticamente el pronóstico de la enfermedad, la supervivencia global a los cinco años es todavía muy baja (60 %) y casi la mitad de estos pacientes han desarrollado metástasis en este periodo. Los tratamientos quimioterápicos actuales se basan en la administración de vincristina, ciclofosfamida (ifosfamida) y actinomicina D, combinada en algunos casos con doxorubicina o etopósido (West 2000). La supervivencia a largo plazo es baja debido a la recurrencia de la enfermedad. Además, se pueden producir daños secundarios como consecuencia de la radiación y la quimioterapia (fundamentalmente neuropatías y problemas de pulmón).

Hoy en día, el principal factor pronóstico por el que se clasifican los pacientes con vistas al tratamiento, es la presencia o no de metástasis en el momento del diagnóstico. Algunos estudios han valorado la utilidad, como marcador pronóstico, de la detección de micrometástasis o enfermedad residual mediante la técnica de RT-PCR, pero los resultados obtenidos son variables y no han sido incorporados aún a la práctica clínica (Pfleiderer *et al.* 1995; West *et al.* 1997; Zoubek *et al.* 1998). Entre otros factores con valor pronóstico se encuentran los niveles plasmáticos de lactato deshidrogenasa y la proteína S-100, de modo que niveles elevados de estas proteínas están asociados a una peor supervivencia (Burchill 2003; Riley *et al.* 2003).

Finalmente, aunque algunos estudios han indicado cierta relación entre el pronóstico de la enfermedad y la presencia de marcadores tumorales específicos como el tipo de proteína de fusión (Zoubek *et al.* 1996; de Alava *et al.* 1998), la sobreexpresión de VEGF o las alteraciones en el estatus de los supresores tumorales p53, p16<sup>INK4</sup>/p14<sup>ARF</sup> y p27<sup>KIP1</sup> (Kovar *et al.* 1997; Fuchs *et al.* 2004b; Matsunobu *et al.* 2004; Ohali *et al.* 2004; Huang *et al.* 2005), ninguno de ellos ha sido establecido como marcador pronóstico en la práctica clínica.

Nuestro mejor conocimiento de la biología de los tumores de Ewing desde un punto de vista molecular, permite esbozar algunas estrategias de tratamiento que podrían aplicarse a la práctica clínica en el futuro. Una de estas estrategias podría consistir en bloquear la expresión de las proteínas quiméricas EWS/ETS mediante por ejemplo el uso de ARNs de interferencia (Kovar *et al.* 2003), aunque el uso de estos sistemas no es todavía lo suficientemente seguro en el contexto clínico.

Hay drogas formadas por moléculas pequeñas como la rapamicina, usada para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos, que disminuye el nivel de expresión de la translocación por un mecanismo desconocido, y en consecuencia disminuye la proliferación celular (Mateo-Lozano *et al.* 2003).

Se ha mostrado que la inhibición de VEGF reduce el potencial oncogénico de las líneas celulares de Ewing (Guan *et al.* 2005). Un anticuerpo anti-VEGF humanizado, bevacizumab, ha dado buenos resultados en el tratamiento del cáncer colorectal, al igual que ciertas drogas dirigidas contra la acción de la actividad tirosín kinasa del receptor del VEGF. Ambas podrían usarse en el tratamiento de los tumores de Ewing (Ahmed *et al.* 2004; Collins *et al.* 2005). Otro inhibidor de tirosín kinasas es el imatinib/Gleevec, efectivo para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y que actualmente se está estudiando en otras patologías (Druker *et al.* 2004). Imatinib inhibe el receptor tirosín kinasa KIT, el cual se expresa en los tumores de Ewing, y cuyo ligando confiere protección frente apoptosis y favorece el crecimiento en las células tumorales de Ewing (Ricotti *et al.* 1998; Landuzzi *et al.* 2000; Smithey *et al.* 2002). Imatinib también puede reprimir los receptores de PDGF, importantes para la proliferación y motilidad de las células de Ewing (Uren *et al.* 2003). Actualmente, se están evaluando otras drogas más específicas frente a KIT (Corbin *et al.* 2004).

Los receptores tirosín kinasa como el de IGF-1 y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico básico (Toretzky *et al.* 1997b; Girnita *et al.* 2000) están implicados en los tumores de Ewing y pueden ser dianas terapéuticas. De hecho varios estudios han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, la eficiencia de un tratamiento en el que se combinan las drogas clásicas de quimioterapia junto con inhibidores de las rutas autocrinas de factores de crecimiento tales como la del IGF-1 (Benini *et al.* 2001; Scotlandi *et al.* 2005).

Por último, hay una serie de rutas cuya modulación afecta al crecimiento de células de Ewing. Así, la inhibición de NF- $\kappa$ B (un factor de transcripción con efecto antiapoptótico) sensibiliza a las líneas celulares de Ewing, a la muerte inducida por TNF $\alpha$  (Javelaud *et al.* 2000). CD99 (MIC2), una proteína de superficie expresada a alto nivel en células hematopoyéticas y de Ewing (Kovar *et al.* 1990; Scotlandi *et al.* 2000), se puede bloquear con

anticuerpos monoclonales anti-CD99, induciendo apoptosis por una ruta independiente de calcineurina (Sohn *et al.* 1998; Scotlandi *et al.* 2000). FAS y el ligando de FAS se expresan en los tumores de Ewing (Kontny *et al.* 1998), y hay ciertas líneas celulares de Ewing susceptibles a la apoptosis mediada por FAS por inhibición de metaloproteinasas de la matriz extracelular (Mitsiades *et al.* 1999). El interferón-beta puede inducir apoptosis en algunas líneas de Ewing (Sanceau *et al.* 2000). Sin embargo, no se conoce la conexión entre el factor de transcripción quimérico y todas estas vías de señalización.

Aunque todos los estudios citados en los párrafos anteriores han permitido descubrir vías de actuación potencialmente útiles en el tratamiento de los tumores de Ewing, sigue siendo necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Un posible abordaje para la identificación de nuevos genes dependientes de EWS/FLI1, es la utilización de técnicas genómicas para el análisis global de la expresión génica.

### **1.5 Técnicas de alto rendimiento para la identificación de genes implicados en enfermedades**

Debido a la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas que posibiliten introducir mejoras en el tratamiento de los tumores de Ewing, procederemos a estudiar en esta Tesis los genes regulados por la proteína quimérica EWS/FLI1, usando para ello, técnicas de alto rendimiento de análisis genómico tales como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) y micromatrices de ADN. Estas técnicas nos permitirán comparar diferentes situaciones experimentales con el fin de identificar los genes regulados por EWS/FLI1. En la técnica SAGE se hace un muestreo de todo el transcriptoma celular de modo que se puede determinar el nivel de expresión de cada uno de los ARNm presentes en la célula. Con las micromatrices de ADN se estudia el nivel de expresión relativo de los genes para los que están diseñadas, aunque en la actualidad, se dispone de micromatrices que cubren el genoma humano completo. Estas dos técnicas son complementarias, destacando con el SAGE la identificación de genes o transcritos desconocidos, mientras que con las micromatrices se puede hacer un rastreo más rápido de los genes catalogados.

Con este mismo planteamiento, otros autores han aplicado estas técnicas para la identificación de genes importantes en diferentes patologías. Algunos de estos trabajos como aquellos en los que estudian el perfil de expresión génica inducido por el factor de transcripción c-myc, tienen una gran similitud con nuestro proyecto (Nacht *et al.* 1999; Nacht *et al.* 2001;

Menssen *et al.* 2002). En nuestro caso, inducimos la expresión del factor de transcripción quimérico EWS/FLI1 en diferentes modelos celulares para identificar genes regulados por la oncoproteína EWS/FLI1.

## ***2. Objetivos***

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas que dan lugar a factores de transcripción quiméricos. Entre estos, EWS/FLI1 es el más frecuente, apareciendo en el 85 % de los casos. Esta oncoproteína es responsable del fenotipo tumoral de los tumores de Ewing como consecuencia de la desregulación de genes implicados en oncogénesis. Por tanto, la identificación de los genes regulados por estos factores de transcripción quiméricos es fundamental para comprender en detalle la biología de estos tumores y para la identificación de nuevas dianas moleculares.

Los objetivos concretos de esta Tesis son:

1.- Identificar nuevos genes regulados por EWS/FLI1 en diferentes modelos celulares de expresión ectópica de EWS/FLI1, mediante el empleo de técnicas de análisis de la expresión génica de alto rendimiento como el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) y las micromatrices de ADN.

2.- Confirmar la relevancia biológica de los genes identificados previamente, comprobando su expresión en células y tumores de Ewing, y confirmando su regulación en células de Ewing tras el silenciamiento de EWS/FLI1 mediante ARN de interferencia.

3.- Estudiar el papel funcional de alguno de estos genes en el desarrollo de los tumores de Ewing. Para ello utilizaremos técnicas de ARN de interferencia y determinaremos el efecto que tiene su silenciamiento sobre las propiedades tumorogénicas de las células de Ewing.

4.- Estudiar el efecto de los antagonistas y/o inhibidores funcionales del gen seleccionado, sobre el crecimiento tumoral, con el fin de valorar su utilidad terapéutica.

### ***3. Materiales y Métodos***



### 3.1 Material biológico

#### 3.1.1 Líneas celulares

En esta Tesis se han utilizado las siguientes líneas celulares derivadas de diferentes tumores infantiles. Todas las células se cultivaron en el medio indicado suplementado con 10 % de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin a (100 µg/ml).

**Tabla 3. Líneas celulares derivadas de tumores infantiles utilizadas en esta Tesis**

Nombre	Tipo <sup>(1)</sup>	Medio de Cultivo	Características <sup>(2)</sup>	Referencia
A673	SE	DMEM	EWS/FLI1 tipo I	Frolík et al., 1984; Dauphinot et al., 2001
SK-PN-DW	SE	IMDM	EWS/FLI1 tipo I	Nelson et al., 1984
RD-ES	SE	RPMI	EWS/FLI1 tipo II	Giovannini et al., 1994; Dauphinot et al., 2001
A4573	SE	DMEM	EWS/FLI1 10/6	McKeon et al., 1988
TC-71	SE	IMDM	EWS/FLI1 tipo I	Whang-Peng et al., 1984
SK-ES-1	SE	Mc Coy's	EWS/FLI1 tipo II	Giovannini et al., 1994; Dauphinot et al., 2001
SK-N-MC	PNET	IMDM	EWS/FLI1 tipo I	Bastida et al., 1985
TTC-466	PNET	RPMI	EWS/ERG tipo I	Fults et al., 1992
IMR-32	NB	RPMI	NMA+	Tumilowicz et al., 1970
SH-SY5Y	NB	RPMI	NMA-	Biedler et al., 1978
SAOS-2	OS	Mc Coy's	pRb <sup>-</sup> p53 <sup>-</sup>	Fogh et al., 1977a; Fogh et al., 1977b
U2-OS	OS	RPMI	pRb <sup>+</sup> p53 <sup>+</sup>	Ponten and Saksela, 1967
SJRH30	RMSA	RPMI	PAX3/FKHR	Douglass et al., 1987
CW9019	RMSA	RPMI	PAX7/FKHR	Edwards et al., 1997

(1) SE: Sarcoma de Ewing, PNET: Tumor neuroectodérmico primitivo (pertenece también a la familia de los tumores de Ewing), NB: Neuroblastoma, OS: Osteosarcoma, RMSA: Rbdomiosarcoma alveolar.

(2) Se indican algunas de las características moleculares más relevantes, como el tipo de proteína quimérica en los tumores de Ewing y rbdomiosarcomas, la existencia de amplificación (NMA+) o no (NMA-) del oncogén N-myc en neuroblastomas, y el estatus funcional de pRb y p53 en los osteosarcomas.

#### 3.1.2 Muestras tumorales

Nuestro laboratorio ofrece servicio de diagnóstico molecular a diferentes Hospitales pediátricos españoles. Entre estos servicios se incluyen la determinación de las translocaciones específicas en los tumores de Ewing y rbdomiosarcomas, la amplificación de N-myc en neuroblastomas y la caracterización de mutaciones germinales en pacientes con retinoblastoma.

Las muestras tumorales utilizadas en esta Tesis fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido tras la exéresis y enviadas desde los respectivos Hospitales a nuestro laboratorio. En todos los casos se recabó el preceptivo consentimiento informado de los padres o tutores para su uso en investigación, según los protocolos autorizados por los Comités Éticos de Investigación Clínica de cada Hospital.

Para la extracción de ARN, los tumores fueron pulverizados en nitrógeno líquido, y lisados en TRI-REAGENT (Sigma).

### **3.2 Establecimiento de líneas celulares con expresión ectópica de EWS/FLI1**

Para el establecimiento de un sistema celular con expresión estable de la proteína EWS/FLI1 se utilizaron las células 293 (derivadas de riñón embrionario humano e inmortalizadas con ADN del Adenovirus 5, Graham *et al.* 1977). El ADNc de EWS/FLI1 tipo I se sintetizó mediante RT-PCR a partir de la línea de Ewing A673, y se clonó en el vector de expresión pCIneo usando las enzimas Xba I y Sal I. Los vectores pCIneo y pCI-EWS/FLI1 se transfectaron con el método del cloruro cálcico (Graham *et al.* 1973) en células 293 y se seleccionaron cultivos policlonales de cada población con el antibiótico G418 (700 µg/ml). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y G418 (500 µg/ml).

Para el establecimiento de modelos celulares con expresión inducible de EWS/FLI1 se utilizaron las células comerciales 293 EcR (Invitrogen) y HeLa TeT-On (BD Clontech). Las células 293 EcR expresan constitutivamente el receptor para ecdisona EcR (No *et al.* 1996). En primer lugar, se clonaron los ADNc de EWS/FLI1 tipo I y FLI1 en el vector de expresión pIND. A continuación, las células 293 EcR se transfectaron con los vectores pIND, pIND-EWS/FLI1 o pIND-FLI1 y se aislaron cultivos policlonales de cada una de las transfecciones tras seleccionar con el antibiótico G418 (700 µg/ml). Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y G418 (500 µg/ml). La expresión de EWS/FLI1 ó FLI1 fue inducida con ponasterona A a una concentración de 2,5 µM.

Las células HeLa TeT-On (BD Clontech) expresan constitutivamente el activador transcripcional de respuesta a tetraciclina (Gossen *et al.* 1992; Gossen *et al.* 1995). En primer lugar se clonaron los ADNc de EWS/FLI1 tipo I y FLI1 en el vector de expresión pTET-splice. A continuación, las células HeLa TeT-On se cotransfectaron con los vectores pTET-splice, pTET-EWS/FLI1 y pTET-FLI1 y el vector pTK-Hyg (en relación 10:1), mediante liposomas

(JetPei, Qbiogene). Finalmente, se aislaron cultivos policlonales tras seleccionar con el antibiótico hygromicina B (200 µg/ml). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino libre de tetraciclina y derivados, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) e hygromicina B (100 µg/ml). Para la expresión de EWS/FLI1 y FLI1 se estimularon las células con doxiciclina (análogo de la tetraciclina) a una concentración de 1 µg/ml.

### **3.3 Establecimiento de líneas de Ewing con expresión inducible de shARN**

Para establecer una línea celular de Ewing que expresase ARNs de interferencia de manera regulada, utilizamos el sistema BLOCK-iT™ de Invitrogen. Este sistema utiliza las propiedades del represor de tetraciclina (TR) para controlar la expresión de los shARNs (ARNs pequeños en forma de horquilla), clonados en un vector de expresión bajo la dirección de un promotor H1 humano que tiene insertadas dos copias de TeTO<sub>2</sub> (*tetracycline operator 2*).

En primer lugar establecimos dos líneas de Ewing que expresasen elevados niveles del represor de tetraciclina (A673/TR y SK-PN-DW/TR). Para ello, las células A673 y SK-PN-DW se infectaron con lentivirus portadores del vector de expresión pLenti6/TR que codifica para la expresión del TR. Tras seleccionar con blasticidina (3 µg/ml) se aislaron varios clones que expresaron niveles elevados del represor de tetraciclina, uno de los cuales fue utilizado para el establecimiento de las células con expresión inducible de ARNs de interferencia.

Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos complementarios para construir un shARN específico de CCK, otro específico de EWS/FLI1 en la región de fusión y otro en la región de FLI1 con el *software BLOCK-iT™ RNAi designer* (Invitrogen, <https://rnaidesigner.invitrogen.com>). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue: shCCKF 5'- CAC CGG ACG AAT GTC CAT CGT TAA GCG AAC TTA ACG ATG GAC ATT CGT CC -3'; shCCKR 5'- AAA AGG ACG AAT GTC CAT CG TTA AGT TCG CTT AAC GAT GGA CAT TCG TCC -3'; shEWS/FLI1F 5'- CAC CGC AGC AGA ACC CTT CTT ATG ACG AAT CAT AAG AAG GGT TCT GCT GC -3'; shEWS/FLI1R 5'- AAA AGC AGC AGA ACC CTT CTT ATG ATT CGT CAT AAG AAG GGT TCT GCT GC -3'; shFLI1F 5'- CAC CGG GCA CAA ACG ATC AGT AAG ACG AAT CTT ACT GAT CGT TTG TGC CC -3'; shFLI1R 5'- AAA AGG GCA CAA ACG ATC AGT AAG ATT CGT CTT ACT GAT CGT TTG TGC CC -3'; Para alinear los oligonucleótidos, se diluyeron a 50 µM 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. Los oligonucleótidos alineados se volvieron a diluir en tampón de alineamiento, se ligaron al vector pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO (Invitrogen) y se transformaron bacterias competentes de *E. coli* One Shot TOP10 con 3 µl de esta reacción. Se seleccionaron las colonias positivas resistentes a kanamicina (50 µg/ml), se purificaron los correspondientes plásmidos pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO/shARNs, 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-iT<sup>TM</sup> Inducible H1 RNAi Entry Vector kit, Invitrogen).

Para crear un sistema inducible de expresión de shARNs se transfirió el fragmento H1/shARN clonado en pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO al vector pLenti4/BLOCK-iT<sup>TM</sup>-DEST mediante una reacción de recombinación. Esta reacción se preparó con 50 ng de pENTR<sup>TM</sup>/H1/TO/shARN, 150 ng de pLenti4/BLOCK-iT<sup>TM</sup>-DEST y 2 µl de la mezcla de enzimas *LR clonase* en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó una hora a 25 °C, tras los cuales se añadió 1 µl de solución de proteinasa K y se incubó 10 minutos adicionales a 37 °C. Se utilizaron 2 µl 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-iT<sup>TM</sup>-DEST-shARN y se confirmó su identidad mediante secuenciación.

Finalmente, las células A673/TR y SK-PN-DW/TR se infectaron con preparaciones lentivirales producidas con el vector pLenti4/BLOCK-iT<sup>TM</sup>-DEST-shARN, se seleccionaron las células resistentes a zeocina (100 µg/ml), y se aislaron cultivos policlonales y clones independientes. Para inducir la expresión de los shARNs (y en consecuencia el silenciamiento del ARNm correspondiente), las células A673/TR/shARNs y SK-PN-DW/TR/shARNs 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-PCRc.

Para la fabricación de los lentivirus utilizados en las infecciones anteriores 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-iT<sup>TM</sup>-DEST-shCCK, -shEWS/FLI1 y -shFLI1), diluidos en 1,5 ml de medio de cultivo OptiMEM I sin suero. En un tubo aparte 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 incubaron 20 minutos adicionales 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 junto con 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. A las 48 horas se recogió el sobrenadante con virus, se pasó por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , se alicuotó y se congeló rápidamente en nieve carbónica, conservándose a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su empleo. Para las infecciones, las células se sembraron a 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos, y tras 48 horas se incubaron con 1 ml de sobrenadante viral en presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de polibrina durante 24 horas. Tras esta incubación se eliminó el medio y se añadió medio fresco DMEM 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 3  $\mu\text{g/ml}$  para las células infectadas con pLenti6/TR, o zeocina a 100  $\mu\text{g/ml}$  para las infectadas con pLenti4/BLOCK-iT<sup>TM</sup>-DEST-shCCK, -shEWS/FLI1 o -shFLI1). 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.

### **3.4 Estudios de expresión génica**

#### **3.4.1 Análisis seriado de la expresión génica (SAGE, Serial Analysis of Gene Expression)**

Esta técnica permite llevar a cabo un muestreo completo del transcriptoma, y tras el análisis estadístico de los resultados, identificar genes diferencialmente expresados entre dos situaciones de interés. El método se basa en que una secuencia de 10 bases (denominada *tag*) en una localización determinada del ARNm, es suficiente para identificar cada uno de los mensajeros que se expresan en una célula. El método es además capaz de proporcionar información cuantitativa sobre los niveles de expresión de cada gen. Para su aplicación se siguieron los protocolos descritos (Powell 1998; Datson *et al.* 1999; Kenzelmann *et al.* 1999; Velculescu 1999; Liang 2002).

En primer lugar se extrajo el ARN total de cultivos policlonales de células 293-pCI y 293-EWS/FLI-1 con TRI-REAGENT (Sigma) y a partir de este se aisló el ARNm (paso 1, figura 4) con bolitas magnéticas de oligo (dT)<sub>25</sub> (Dynabeads-DYNAL). A continuación se sintetizó el ADNc de doble hebra (2) a partir de 5  $\mu\text{g}$  de ARN polyA, utilizando cebadores oligo dT marcados con biotina.



purificar el extremo 3' del ADNc. Los fragmentos purificados se ligaron a unos adaptadores de ADN de doble cadena que portan en su extremo 3' la secuencia compatible con NlaIII e inmediatamente 5' a esta, la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BsmFI (esta enzima corta el ADN a 12 pb en dirección 3' con respecto a su sitio de reconocimiento) (4). Tras digerir con BsmFI, se purificaron con bolitas magnéticas los fragmentos formados por los adaptadores (que contienen a su vez la secuencia de reconocimiento de BsmFI y NlaIII) y una secuencia de 10 pb correspondiente a la secuencia del ARNm (5). Estos fragmentos de 10 pb se denominan *tags* y son representativos de los ARNm presentes en la muestra inicial, siendo su secuencia única para cada ARNm. Los *tags* purificados se ligaron entre ellos para formar *ditags*, y se amplificaron mediante PCR con cebadores específicos para los adaptadores utilizados anteriormente (6). Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y se cortaron nuevamente con la enzima NlaIII, liberándose de esta manera los adaptadores y obteniéndose *ditags* compuestos únicamente por dos secuencias específicas (o *tags*) del ARNm del cual derivan. Los *ditags* fueron nuevamente purificados y ligados entre sí para formar concatémeros de 20-40 *ditags* (40-80 *tags*) (7), que se clonaron a través del sitio Sph I en el vector pZero (Invitrogen). Se transformaron en las bacterias ElectroMAX DH10B (GibcoBRL) por electroporación (2,5 Kvol., 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ ) y en las colonias positivas (resistentes a zeocina), se amplificaron los concatémeros con los cebadores M13 directo y reverso, secuenciando sólo aquellos de más de 500 pb. Las secuencias se revisaron visualmente para corregir posibles errores, y posteriormente se analizaron con un *software* específico (versión SAGE2000, [www.sagenet.org](http://www.sagenet.org)), el cual extrajo los *tags* válidos de cada secuencia eliminando los *ditags* repetidos. Este *software* fue cedido amablemente por el descubridor del método, el Dr. Velculescu del *Johns Hopkins Oncology Center* de Baltimore. La base de datos del SAGE, localizada en el NCBI se usó para identificar los genes asociados a cada *tag* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>).

#### 3.4.2 Estudios de expresión mediante matrices de oligonucleótidos

Se sembraron 320.000 células/placa P100 para el modelo de las células 293 EcR, y se dejaron 3 días para permitir su adhesión completa antes de añadirle la ponasterona A a 2.5  $\mu$ M. En el caso de las células HeLa TeT-On se sembraron 500.000 células/placa P100, se dejaron un día para que se adhirieran y se añadió medio fresco con 1  $\mu$ g/ml de doxiciclina. A los tiempos de 0, 24 y 72 horas de estimular las células se hizo la extracción del ARN total con TRI-REAGENT (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial, pero añadiendo un

cloroformo adicional para eliminar trazas de fenol en el precipitado final. Para la extracción del ARN de las muestras tumorales se usó un cilindro pulverizador enfriado previamente en nitrógeno líquido e inmediatamente se siguió el protocolo anterior. La cantidad e integridad del ARN se determinaron mediante espectrometría UV y electroforesis en un Bioanalyzer 2100 (Agilent).

La síntesis de ADNc y ARNc biotinilado se realizó con 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 10 minutos a 70 °C, se enfrió en hielo, se le 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 la síntesis del 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. La reacción se incubó 15 horas a 37 °C y el ARNc marcado con biotina se purificó con un kit comercial (RNeasy, Qiagen). La calidad y cantidad del ARNc biotinilado se determinó mediante espectrometría UV 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.

A continuación, 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. Trascorrido este tiempo se eliminó la muestra y 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 determinar los genes regulados por EWS/FLI1 o FLI1, se compararon los datos de intensidad normalizada en la población que expresaba EWS/FLI1 o FLI1 con respecto a las células transfectadas con el vector vacío a los tiempos de 24 y 72 horas. Se consideraron genes inducidos por EWS/FLI1 o FLI1 aquellos que en ambos experimentos tuvieron ratios mayores o iguales a 2, y además la intensidad del *spot* en las células que expresaban EWS/FLI1 o FLI1 era significativamente superior al fondo (marcado como “G” (*good*) por el *software* de análisis). Se consideraron genes inhibidos por EWS/FLI1 o FLI1, aquellos en los que esta ratio fue inferior o igual a 0,5 en los dos experimentos, y la intensidad del *spot* en las células transfectadas con el vector vacío era superior al *background* (marcado como “G”).

En las muestras tumorales, se usaron los valores de intensidad normalizada para calcular la media del valor de expresión de cada gen en el grupo de los tumores de Ewing y se comparó con el valor medio de cada gen obtenido para el grupo de neuroblastomas y rhabdomyosarcomas. Además se aplicó un test T de Student con la corrección de Bonferroni para determinar las diferencias estadísticas entre los dos grupos. Se consideraron genes sobreexpresados en los tumores de Ewing con respecto a los neuroblastomas y rhabdomyosarcomas, a aquellos con una ratio entre los dos grupos superior a 5 y una  $P < 0,005$ .

Alternativamente los datos se analizaron mediante el método denominado SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) con el programa informático TIGR MeV (Saeed *et al.* 2003) ([www.tm4.org](http://www.tm4.org)). Sobre los datos de intensidad normalizada se calculó el  $\log_2$  y se

procedió a aplicar el algoritmo SAM, el cual permitió identificar genes diferencialmente expresados entre dos grupos.

### 3.4.3 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 1  $\mu$ g de ARN, dNTPs 1 mM cada uno, DTT 10 mM, cebadores hexámeros 2,5  $\mu$ M (Promega) y tampón de transcripción reversa 1x. La mezcla se incubó 10 minutos a 70 °C para desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo. Finalmente se añadieron inhibidor de RNasas (RNasin, Promega) y transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) para que quedaran en la reacción a 2 U/ $\mu$ l y 10 U/ $\mu$ l respectivamente. La reacción se incubó 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, y finalmente 5 minutos a 95 °C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que se omitió la enzima transcriptasa reversa. Para la PCR cuantitativa utilizamos sondas Taqman en dos formatos, uno en tubos convencionales y otro en formato de tarjetas microfluídicas.

La PCR cuantitativa en tubos convencionales se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 80 ng de ADNc, dNTPs 800  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 1 $\mu$ l solución cebadores/sonda Taqman (Applied Biosystems), 0,5 U Taq polimerasa (Biotools) y tampón de reacción 1x. El programa de PCR consistió en: 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. Las reacciones se llevaron a cabo en un aparato de PCR cuantitativa modelo RotorGene 2000 (Corbett Research). La secuencia de los cebadores y sondas Taqman se muestran en la tabla 4.

El nivel de expresión de cada gen se normalizó con respecto al nivel de expresión del gen control TBP. Para cada gen, se extrajeron los datos de Ct (*Cycle Threshold*, ciclo en el que los productos de PCR inician la fase exponencial de la amplificación), usando un *software* específico (RotorGene versión 4.6). Para comparar los niveles de expresión de un determinado gen en dos muestras diferentes se usó el método de  $\Delta\Delta$ Ct (Livak *et al.* 2001). En primer lugar se calculó el valor de  $\Delta$ Ct de la muestra problema y de la muestra control usando la fórmula  $\Delta$ Ct = Ct<sub>gen muestra problema</sub> - Ct<sub>TBP</sub>. Posteriormente se calculó el valor  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>muestra problema</sub> - Ct<sub>muestra control</sub>. El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

**Tabla 4. Cebadores y sondas Taqman utilizadas para la cuantificación de los ARNm de los genes estudiados**

Gen	Cebadores-sonda Taqman
TBP	Sonda Taqman 5' FAM-CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG-TAMRA 3' TBP-F2 GAACATCATGGATCAGAACAACAG TBP-R2 ATT GGT GTTCTGAATAGGCTGTG
EWS/FLI1	Sonda Taqman 5' TET-AAC AGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA-TAMRA 3' EWS-F2 AGCCAAGCTCCAAGTCAATATAG FLI1-R3 TCCTCTTCTGACTGAGTCATAAG
NR0B1	Sonda Taqman 5' TET-CATCAGTACCAAGGAGTACGCCTACCT-TAMRA 3' DAX-F3 TTTCTTTCCAAATGCTGGAGTCTGA DAX-R2 GAATGTACTTCACGCACTGCAGG
CCK	Referencia: Hs00174937_m1 (Applied Biosystems)
CES1	Referencia: Hs00275607_m1 (Applied Biosystems)
AKR1B10	Referencia: Hs00252524_m1 (Applied Biosystems)

Para la PCR cuantitativa con tarjetas microfluídicas (*Micro Fluidic Card 7900HT*, Applied Biosystems) se utilizó un *kit* específico para la síntesis de ADNc (*High-Capacity cDNA Archive Kit*, Applied Biosystems). Para la PCR se usó el *kit Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) adicionando a cada carril de la tarjeta microfluídica 400 ng de ADNc. Se usó el termociclador AB 7900 HT (Applied Biosystems) con un programa de 10 minutos a 94°C y 40 ciclos de un paso de 30 segundos a 97 °C y 1 minuto a 59,7 °C. Se estudiaron un total de 36 genes, además de otros tres que se usaron como genes control (TBP, GAPDH y RPS19). Se analizaron los resultados con el *software SDS 2.1 (Applied)*, considerando genes diferencialmente regulados entre la muestra problema y el control, a aquellos que alcanzaron una significación estadística de  $P < 0,01$ .

#### 3.4.4 Detección de los ARNm de los receptores de CCK

La presencia de los ARNm de los receptores de CCK en células y tumores se determinó mediante RT-PCR convencional. El ARN total fue tratado previamente con DNasa para eliminar los posibles restos de ADN genómico. Para ello, se incubaron en un volumen final de 12 µl, 4 µg de ARN con 1 U de DNasa RQ1 (Promega) y 20 U de inhibidor de RNasas, (RNasin, Promega) diluidos en tampón DNasa 1x. La reacción se incubó 15 minutos a 37 °C, 10 minutos a 75 °C para inactivar las enzimas y se enfrió en hielo. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µg de ARN tratado con DNasa, dNTPs 1 mM cada uno, DTT 10 mM, cebadores hexámeros 2,5 µM (Promega) y tampón de transcripción reversa 1x. La mezcla se incubó 10 minutos a 70 °C para

desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo. Finalmente se añadió inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega) y transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) para que quedaran en la reacción a 2 U/μl y 10 U/μl respectivamente. Las reacciones se incubaron 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, y finalmente 5 minutos a 95 °C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que se omitió la enzima transcriptasa reversa.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl con tampón de reacción 1x, 150 ng de ADNc de la reacción de transcripción reversa, dNTPs 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, cebadores directo y reverso 0,6 μM cada uno y Taq polimerasa 0,02 U/μl (Biotools). Las reacciones se incubaron en un termociclador aplicando el siguiente programa: 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C, y 1 minuto a 72 °C; y 7 minutos de extensión final a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron mediante tinción con BrEt y luz UV. La identidad de los productos de amplificación se confirmó por secuenciación. La secuencia de los cebadores utilizados, su localización en el ARN, y el tamaño predicho del amplicón correspondiente, se encuentran resumidos en la tabla 5.

**Tabla 5. Cebadores utilizados para la detección de los ARNm de los diferentes receptores de CCK**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia referencia</b>	<b>Secuencia de los oligos</b>	<b>Localización en el ARN</b>	<b>Tamaño amplicón</b>
CCKAR	NM_000730	CCKA-F TGAACTCGGGCTCGAAAATGA CCKA-R CATGAAGTAGGTGGTGGTCTT	exón 1 exón 2	310 pb
CCKBR	NM_176875	CCKB-F ATCTCTCGCGAGCTCTACTTA CCKB-R CAGCAAGTGAATGAAGGAGAT	exón 4 exón 5	414 pb
CCKBlong	NM_176875	CCKBlong-F CCAGGTGGGGCTGGACCA CCKB-R GCAAGTGAATGAAGGAGAT	exón 4 exón 5	342 pb
CCKBRi4sv	NM_176875	CCKC-F AATGAAGGTGAGGGTGAGAA CCKB-R GCAAGTGAATGAAGGAGAT	exón 4 intrón 5	449 pb
GADPH	NM_002046	GAPDH-F ATGGCACCGTCAAGGCTGAG GAPDH-R AGACCACCTGGTGCTCAGTG	exón 4 exón 8	678 pb

### 3.4.5 *Western blot*

Para la extracción de proteína nuclear, las células se tripsinizaron, se lavaron dos veces con PBS 1x (NaCl 138 mM, KCl 27 mM y Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 10 mM ) y se lisaron las membranas plasmáticas con buffer C1 (Sacarosa 1,28 M, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, Tritón X-100 4 % y Tris-HCl pH 7,5 40 mM). Los núcleos resultantes se precipitaron por centrifugación y se lisaron en solución RIPA (NP-40 o Igepal 1 %, SDS 0,1 %, y DOC (deoxicolato) sódico 0,5 % en PBS 1x)

suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 100 µg/µl, aprotinina 62 µg/ml y EDTA 1 mM). Posteriormente se aplicaron 5 ciclos de sonicación en frío de 10 segundos cada uno. Por último se clarificaron por centrifugación para descartar los restos celulares.

Para la extracción de proteína total, las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se lisaron con solución RIPA suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 100 µg/µl, aprotinina 62 µg/ml, EDTA 1 mM, pirofosfato sódico pH 7,4 10 mM, ortovanadato sódico 0,1 mM y fluoruro sódico 10 mM).

La concentración de proteínas se determinó con el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce), en un lector de ELISA Versamax (Molecular Devices). Se cargaron entre 5-20 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida vertical al 10% (acrilamida: bisacrilamida 37,5:1) y se sometieron a electroforesis a 80 V. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Pall) usando un método semiseco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell Instruction Manual*, Bio-Rad Laboratories (1988)) a un amperaje constante de 3 mA por cm<sup>2</sup>. El bloqueo de la membrana y las incubaciones con los anticuerpos se hicieron con tampón TTBS (TBS 1x (tampón salino con Tris 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7,5) y Tween 20 0,5 %) conteniendo leche desnatada en polvo al 5 %. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios a las diluciones indicadas: anti-FLI1 policlonal de conejo (1:300) (Santa Cruz), anti-tubulina monoclonal de ratón (1:3.500) (Sigma), anti-Histona H2A monoclonal de ratón (1:1.000) (Santa Cruz), anti-Dax monoclonal de ratón clon 2F4 (1:1.000) proporcionado por el Dr. Enzo Lalli del *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire*, anti-Akt policlonal de conejo (1:1.000) (Cell Signaling), anti-P-Akt (ser473) policlonal de conejo (1:1.000) (Cell Signalling), anti-ciclina D1 monoclonal de ratón (1:2.000) (Cell Signalling) y anti-TeT-R policlonal de conejo (1:1.000) (MoBiTec). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de ratón (1:5.000) (Santa Cruz) y anti-IgG de conejo (1:7.500) (Santa Cruz), acoplados todos estos a HRP (Peroxidasa de rábano picante). Después de cada incubación con los anticuerpos, se hicieron 4 lavados de 15 minutos cada uno en TTBS 1x. Las proteínas se visualizaron con el sistema de detección ECL (Amersham). Las películas de revelado se escanearon y se cuantificaron las bandas con el programa ImageQuant5.0 (Amersham) aplicando la corrección del fondo local.

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

### 3.4.6 Radioinmunoensayo de CCK

Para cuantificar los niveles secretados de CCK en el medio de cultivo se usó un radioinmunoensayo comercial para CCK (EURICA-CCK, Euro-Diagnostica AB). Se sembraron 300.000 células/P100 y se dejaron 3 días para permitir su completa adhesión. Posteriormente las células se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina (1 µg/ml) para expresar el correspondiente siARN, y a las 24 horas se les adicionó medio fresco con o sin doxiciclina. Tras 48 horas de incubación adicional, se recogió el sobrenadante (4 ml), se centrifugó 5' a 1500 rpm para eliminar los restos celulares y se le añadió dos volúmenes de etanol (96°, v/v). Se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante, el cual se evaporó en un Speed-Vac y se reconstituyó en el volumen inicial (para las células SK-PN-DW) o en 1/10 de este volumen (para las células A673) con el tampón proporcionado para aplicar el radioinmunoensayo. Posteriormente se siguió el protocolo de este ensayo.

## **3.5 Estudios de proliferación; ciclo celular y apoptosis**

### 3.5.1 Ensayos de proliferación

Para los estudios de crecimiento celular en las células 293 EcR y HeLa TeT-On, se sembraron 100.000 o 20.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos respectivamente. Al día siguiente, se añadió el estímulo correspondiente (ponasterona A a 2,5 µM o doxiciclina a 1 µg/ml), y se cuantificó el crecimiento celular a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Las curvas de proliferación para los ensayos de silenciamiento de CCK, se hicieron sembrando 2.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos de las células A673/TR, A673/TR/shCCK policlonales, A673/TR/shCCK clon 1, SK-PN-DW/TR y SK-PN-DW/TR/shCCK policlonales y se dejaron 3 días para favorecer su completa adhesión. Posteriormente se le cambió el medio cada dos días añadiendo doxiciclina a 2 µg/µl, y se midió la tasa de crecimiento a los 0, 2, 4 y 6 días. Los ensayos de rescate se hicieron de igual modo añadiendo además cada 2 días los agonistas CCK8, CCK8s, CCK8-gly, CCK22 y CCK22-gly (NeoMPS) a diferentes concentraciones desde 1nM a 1pM. En este caso se cuantificó la tasa de crecimiento a los 6 días. Los diferentes agonistas tienen la siguiente secuencia: CCK8s (Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>), CCK8 (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>), CCK8-gly (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly), CCK22 (Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-

Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) y CCK22-gly (Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly).

En los ensayos con los antagonistas de CCK se sembraron 25.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos para cada una de las líneas estudiadas y se dejaron 3 días para permitir su completa adhesión. Posteriormente se le añadió medio fresco suplementado con 10 % de suero y los correspondientes antagonistas (10 µM) cada dos días. A los 4 días se midió el crecimiento celular.

En todos estos ensayos, se cuantificó el crecimiento celular siguiendo un protocolo de tinción con cristal violeta (Flick y Gifford, 1984) con algunas modificaciones. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1% durante 10 minutos, se lavaron con agua, se secaron y se tiñeron con cristal violeta al 0,1 % en agua destilada (v/v) durante 10 minutos. Tras esta incubación, las células se lavaron de nuevo con agua, se secaron, y el colorante absorbido se liberó con ácido acético al 10 % (v/v). Finalmente, se tomó una alícuota de 100 µl y se midió la absorbancia a 450 y 600 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices). La medida de absorbancia a 450 nm correspondiente al fondo, se restó a la de 600 nm.

También se midió la proliferación mediante la incorporación de BrdU con un *kit* comercial (Roche). En este caso, una vez finalizado el periodo de estudio, las células se incubaron 2 horas con BrdU a una concentración de 10 µM. Finalizada la incubación, se aspiró el medio y se secaron las placas durante 1 hora a 60°C. Posteriormente se fijaron las células y 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 20 minutos y se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices).

### 3.5.2 Crecimiento en agar blando

Para los experimentos de crecimiento independiente de anclaje, se prepararon placas P60 con una base de 3 ml de agar noble libre de endotoxinas al 0,5 % (p/v) (SIGMA), 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 base sirve para prevenir la unión de las células al plástico de la placa. Una vez solidificada esta base de agar, se sembraron 50.000 células por placa resuspendidas en 1,5 ml de agar al 0.3 % (p/v) en medio de cultivo DMEM suplementado como se ha indicado

anteriormente. Las células se incubaron a 37° C durante 4-5 semanas, añadiendo medio fresco (350 µl) cada 2 o 3 días (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, antibióticos y los estímulos correspondientes). Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,005 % (p/v) y se contaron manualmente en el microscopio.

### 3.5.3 Citometría de flujo

La determinación de las diferentes fases del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo, tiñendo las células con ioduro de propidio (IPr). En las células 293 EcR- EWS/FLI1 se sembraron 110.000 células/placa P60, y a los tres días se añadió medio fresco al 10 % de suero con o sin ponasterona A a 2,5 µM. Se prepararon las células para pasarlas por el citómetro en día 1, 2 y 3.

En los estudios con los antagonistas de CCK se sembraron 300.000 o 150.000 células/placa P100 de células A673 y SK-N-MC, respectivamente. Se dejaron 3 días para su completa adhesión y entonces se añadió medio fresco con 10 % de suero fetal bovino, devazepide o L365,260 a 10 µM, o el mismo volumen de DMSO para la muestra control, durante 1, 2 o 3 días.

Finalizado el experimento, las células adheridas se recogieron mediante tripsinización, y se juntaron con las células en suspensión. Después de lavar las células con PBS, se fijaron con etanol de 70° al menos durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente se resuspendieron en una solución de RNasa (100 µg/ml) e IPr (40 µg/ml) en PBS y se incubaron 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Se analizaron aproximadamente 10.000 células de cada muestra por un citómetro FACSCAN (BD Biosciences). Los datos se procesaron con el programa informático WinMDI v2.8.

En los estudios con antagonistas de CCK se determinó además el número de células apoptóticas mediante tinción con IPr y Anexina V usando un *kit* comercial (*Annexin-V-FLUOS Staining kit*, Roche). Finalizado el experimento, las células adheridas se tripsinización y se juntaron con las células en suspensión. Todas estas células se lavaron primero en PBS, después en tampón HEPES, y por último se incubaron con la solución de IPr y Anexina V-FITC durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se analizaron con un citómetro FACSCAN (BD Biosciences) y los resultados se procesaron con el *software* WinMDI v2.8.



### **3.6 Estudios *in vivo*. Formación de tumores en ratones**

En todos los experimentos se han utilizado ratones desnudos inmunodeprimidos *swiss/swiss* hembras de 6 semanas (Harlan Ibérica, Barcelona).

En los estudios para determinar el efecto del silenciamiento de CCK en la formación de tumores, se hicieron dos experimentos. En el primero, se inyectaron 5 millones de células A673/TR o A673/TR/shCCK en el flanco derecho de dos grupos de 5 ratones cada uno. Desde este día, se le añadió a los dos grupos doxiciclina a 1 mg/ml. Cada 2-3 días se añadió agua fresca con nueva doxiciclina y se midió el tamaño de los tumores con la fórmula  $L \cdot A \cdot \pi / 6$  donde L es el largo y A el ancho. Se siguió la progresión tumoral durante mes y medio.

En el segundo experimento se hicieron dos grupos de 10 ratones. Uno de los grupos se trató con doxiciclina a 1 mg/ml en el agua de bebida y a los 3 días, se inyectaron 5 millones de células A673/TR/shCCK masa en el flanco derecho de los 20 ratones. Cada 2-3 días se añadió agua fresca con nueva doxiciclina y se midió el peso del animal y el tamaño del tumor con la fórmula  $L \cdot A \cdot \pi / 6$ . Los animales se sacrificaron cuando el tamaño tumoral superó los 1,5 cm<sup>3</sup>. Se guardaron muestras del tumor a -80 °C para estudios de biología molecular e inmunohistoquímica.

Para determinar el efecto del devazepide sobre el crecimiento tumoral, se inyectaron 5 millones de células A673 s.c. en el flanco izquierdo de 20 ratones. A la mitad de los animales se les administró devazepide disuelto en DMSO a dosis de 10 mg/kg/día en solución con metil celulosa al 10% y suero salino al 0.5%, o vehículo subcutáneamente en el flanco derecho. Cada dos días se determinó el peso del animal y el tamaño del tumor con la fórmula  $L \cdot A \cdot \pi / 6$ . Los animales se sacrificaron cuando el tamaño tumoral superó los 1,3 cm<sup>3</sup>.

### **3.7 Análisis estadístico**

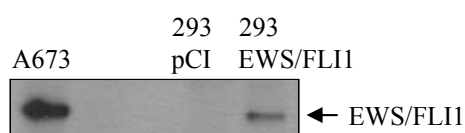
Para la comparación de dos grupos, se usó el test T-Student de dos colas. Para la comparación del tamaño tumoral entre el grupo control y el tratado, se usó un test de ANOVA de dos variables basado en el método Student-Newman-Keuls. Las diferencias en la aparición del tumor se analizaron con el test de *log-rank*. Para todos los análisis, se consideraron diferencias significativas aquellas con  $P < 0,05$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  SD.

## ***4. Resultados***

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan por la presencia de determinadas translocaciones cromosómicas que dan lugar a proteínas quiméricas en las que la región amino terminal del gen EWS, se fusiona con la región carboxilo terminal de varios factores de transcripción de la familia ETS. La más frecuente de estas alteraciones es la t(11:22), que da lugar al factor de transcripción quimérico EWS/FLI1. La expresión ectópica de EWS/FLI1 en fibroblastos murinos NIH3T3 promueve el crecimiento celular independiente de anclaje (May *et al.* 1993a), y acelera la formación de tumores en ratones inmunodeficientes (Thompson *et al.* 1999). Por otro lado, la inhibición de la expresión de EWS/FLI1 en células de Ewing, mediante el empleo de oligonucleótidos, ADNc antisentido o ARNs de interferencia, retrasa la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos (Ouchida *et al.* 1995; Kovar *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 1997; Toretsky *et al.* 1997a; Prieur *et al.* 2004; Hu-Lieskovan *et al.* 2005a). Además, la transducción de un dominante negativo de FLI1 inhibe también la proliferación de las células derivadas de los tumores de Ewing (Kovar *et al.* 1996). Todos estos hechos indican que estos factores de transcripción quiméricos desempeñan un papel central en el desarrollo de estos tumores, y de ahí el interés de identificar los genes regulados por estas proteínas oncogénicas.

#### **4.1 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante el empleo de la técnica SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)**

Para identificar nuevos genes regulados por EWS/FLI1, aplicamos la técnica de análisis seriado de la expresión génica (“*Serial Analysis of Gene Expression*”, SAGE) (Velculescu 1999) a células 293 transfectadas de forma estable con el vector de expresión pCI-EWS/FLI1 (293-EWS/FLI1), y que por tanto expresan EWS/FLI1 de tipo I. Como control, se utilizaron células 293 transfectadas de forma estable con el vector de expresión vacío pCIneo (293-pCI) (Figura 5).



**Figura 5. Expresión ectópica de EWS/FLI1 en células 293.** Detección por *western blot* de la expresión de EWS/FLI1 en las células 293 transfectadas establemente con el vector pCI-EWS/FLI1. Como controles, se incluyen las células 293 transfectadas con el vector vacío (293 pCI) y la línea celular A673, derivada de un tumor de Ewing.

La técnica SAGE se basa en que una secuencia de 10 pb (denominada *tag*), es suficiente para identificar y definir un determinado ARNm. Consiste en aislar estos *tags* (localizados adyacentes a la última diana NlaIII de cada ARNm) y originar largos concatémoros (30-120 *tags* por concatémoro), para posteriormente proceder a su secuenciación. Finalmente, cada *tag* se busca en bases de datos específicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SAGE>) para identificar el gen al que representa. En la tabla 6, se muestran el número total de clones analizados, *tags* secuenciados y genes identificados en las células 293-pCI y 293-EWS/FLI1.

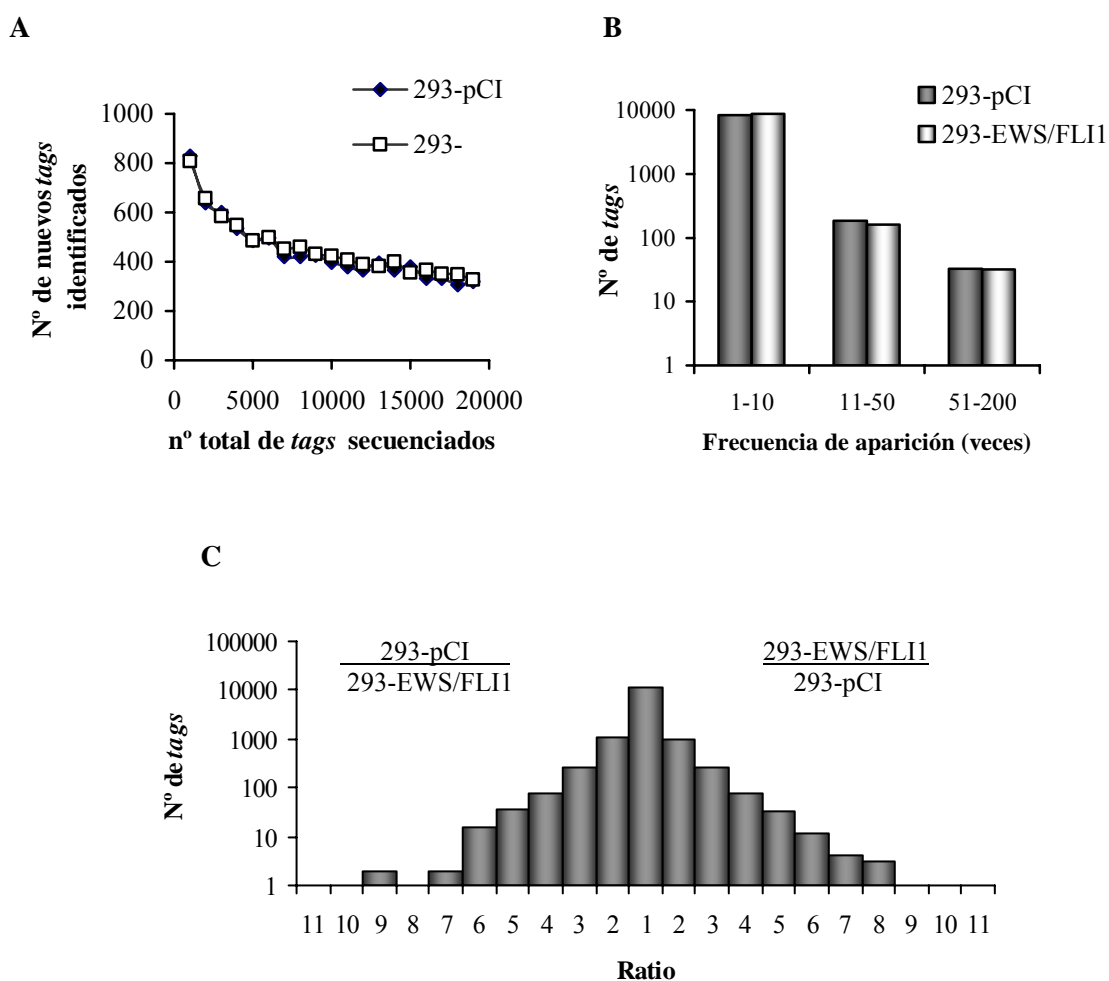
**Tabla 6. Número total de clones analizados, *tags* secuenciados y genes identificados mediante la técnica SAGE**

<b>Población</b>	<b>Nº de clones secuenciados</b>	<b>Tag totales secuenciados</b>	<b>Media nº <i>tags</i>/clon</b>	<b>Número de genes diferentes identificados</b>
293-pCI	634	19505	30,8	8596
293-EWS/FLI1	629	19476	30,9	8827

Como era de esperar, el número de nuevos *tags* identificados, disminuía conforme aumentaba el número de *tags* secuenciados (Figura 6A). Así en los primeros 1.000 *tags* secuenciados, se identificaron 820 *tags* (genes) diferentes, mientras que en los últimos 1.000 *tags* secuenciados, sólo se identificaron 320 nuevos *tags*. Este comportamiento fue idéntico en ambas librerías. Aproximadamente el 97 % del total de los *tags* (genes) identificados en las librerías 293-pCI y 293-EWS/FLI1 aparecieron menos de 10 veces. Por el contrario, sólo el 0,4 % de los *tags* (genes), estaban representados más de 50 veces, y correspondieron en su mayoría a genes que codifican para proteínas ribosomales (Figura 6B). Como se muestra en la Figura 6C, la mayoría de los *tags* (80 %) presentaron frecuencias de aparición iguales entre las dos librerías (ratio 293-EWS/FLI1 vs. 293-pCI=1), indicando que, al menos entre los *tags* identificados, hubo pocos *tags* (genes) diferencialmente regulados. A pesar de esto algunos genes mostraron incrementos en el nivel de mensajero de hasta 8 veces (3 genes) y otros, niveles de inhibición de hasta 11 veces (1 gen).

Para identificar los *tags* significativamente regulados, consideramos únicamente aquellos *tags* presentes como mínimo 2 veces en al menos una de las dos librerías, y aplicamos la simulación de Monte Carlo para calcular la significación estadística de cada *tag* (*p-chance*). Para esto, el análisis de Monte Carlo determinó la probabilidad relativa de obtener una

diferencia en el número de apariciones de un determinado *tag* igual o mayor a la observada experimentalmente, originando 100.000 simulaciones para cada *tag*. Para eliminar los *tag* con



**Figura 6. (A) Evolución del número de nuevos tags identificados.** Se muestra el número de *tags* diferentes por cada 1.000 *tags* secuenciados. En los 1.000 primeros *tags*, se identificaron 820 y 808 *tags* diferentes en la librería de las células 293-pCI y 293-EWS/FLI1 respectivamente, mientras que en los últimos 1.000 *tags* secuenciados, se aislaron 320 y 326 *tags* diferentes respectivamente. **(B) Distribución del número de tags en relación a la frecuencia de aparición.** En la librería de 293-pCI se identificaron 8.596 *tags* diferentes, de los cuales 8.378 aparecieron menos de 10 veces, 185 entre 11-50 veces y 33 *tags* entre 51-200 veces. En la librería de 293-EWS/FLI1 se identificaron 8.827 *tags* diferentes, de los que 8.635 aparecieron menos de 10 veces, 160 entre 11-50 veces y 32 *tags* entre 51 y 200 veces. **(C) Expresión relativa de todos los transcritos identificados en las dos librerías de SAGE.** Para cada *tag* se calculó la ratio 293-EWS/FLI1 vs. 293-pCI, de modo que los valores a la derecha de la ratio 1, corresponden a *tags* inducidos por EWS/FLI1 mientras que los de la izquierda corresponden a *tags* inhibidos por EWS/FLI1.

*p-chance* significativa pero consecuencia del azar (falsos positivos), el análisis de Monte Carlo hizo una simulación de 40 experimentos a nivel de librería. Con este análisis identificamos 92

*tags* en los cuales las diferencias observadas entre las células 293-EWS/FLI1 y 293-pCI tuvieron una significación estadística (*p-chance*) inferior a 0,05. Sin embargo, el análisis de Monte Carlo también indicó, que en un 67 % de estos genes, las diferencias fueron probablemente debidas al azar. De este modo, se esperaría encontrar que 30 de los genes con  $p\text{-chance} \leq 0,05$ , fueran realmente regulados por EWS/FLI1 en las células 293 (26 genes con  $p\text{-chance} \leq 0,05$ , 1 con  $p\text{-chance} \leq 0,01$  y 3 con  $p\text{-chance} \leq 0,005$ ), y que estos mostraran el mayor nivel de regulación. En las tablas 7 y 8 se indican los *tags* con valores de  $p\text{-chance} \leq 0,05$  y ratios 293-EWS/FLI1 vs. 293-pCI mayores de 6.

De entre todos los genes identificados mediante la técnica de SAGE, se seleccionaron un total de 36 genes para su validación mediante RT-PCR cuantitativa. Entre estos se incluyeron 9 genes con buena significación estadística ( $p\text{-chance} \leq 0,05$ ) y con una ratio 293-EWS/FLI1 vs. 293-pCI igual o superior a 6, elegidos a partir de las tablas 7 y 8 (genes subrayados). Estos genes serían los que con más probabilidad deberían confirmarse por una técnica alternativa como la RT-PCR cuantitativa. También elegimos 27 genes con una menor ratio EWS/FLI1 vs. pCI (entre 2-6 veces) y en consecuencia una baja significación estadística ( $p\text{-chance} > 0,05$ ), y entre los que se encontraban algunos genes interesantes por su función como MIC2 (*CD99 antigen*), CTNNB1 (*catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa*), PPP5C (*protein phosphatase 5, catalytic subunit*), APP (*amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)*), CCND1 (*cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)*) y TIAL1 (*TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1*). De este modo, analizamos genes con diferente nivel de regulación con el fin de determinar el mínimo nivel de cambio que podía ser validado por RT-PCR cuantitativa, y que nos pudiera dar una idea de la sensibilidad de la técnica SAGE. Sin embargo, la correlación entre los resultados obtenidos por SAGE y los obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa fue muy mala para todos los genes seleccionados, de modo que ningún gen quedó finalmente validado (datos no mostrados).

En conclusión, la aplicación de la técnica SAGE a nuestro sistema celular de expresión constitutiva de la oncoproteína EWS/FLI1, no nos permitió identificar ningún gen regulado por EWS/FLI1. Probablemente hubiera sido necesario incrementar el número de *tags* secuenciados. Sin embargo, dado el elevado coste de esta técnica, decidimos utilizar en su lugar matrices de oligonucleótidos (*microarrays*) que permiten estudiar los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente.

Tabla 7. Genes inducidos por EWS/FLI1 en células 293, identificados mediante la técnica SAGE

<i>Tag</i> <sup>(1)</sup>	ID	Secuencia de referencia	Símbolo (NCBI)	Nombre <sup>(2)</sup> (NCBI)	293 <sup>(3)</sup> pCI	293 <sup>(3)</sup> EWS/FLI1	Ratio	<i>p</i> -chance
AGAATCACTT	91442	NM_152266.1	MGC32020	<u>Hypothetical protein MGC32020</u>	0	8	≥ 8	0,004
AGGAAGAAGA					0	8	≥ 8	0,004
TAGAAAAATA	2821	NM_000175.2	GPI	<u>Glucose phosphate isomerase</u>	0	8	≥ 8	0,004
GACATAGGAG	1280	NM_001844.3	COL2A1	<u>collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia, congenital)</u>	1	7	7	0,035
		NM_033150.1						
CAGGGAGCTC	80233	NM_025161.3	C17orf70	<u>chromosome 17 open reading frame 70</u>	0	7	≥ 7	0,008
GATCTCATCT	81857	NM_030973.2	MED25	<u>Mediator of RNA polymerase II transcription, Subunit 25 homolog (yeast)</u>	1	7	7	0,035
TCTGCTTACA					1	7	7	0,035
ATTATTTTTC	6129	NM_000971.3	RPL7	<u>Ribosomal protein L7</u>	2	12	6	0,007
CTGCTTAAGG	84287	NM_198045.1	ZDHHC16	<u>zinc finger, DHHC domain containing 16</u>	2	11	6	0,012
		NM_198046.1						
		NM_198043.1						
		NM_198044.1						
		NM_032327.2						
ATTAAGAAGG					0	6	≥ 6	0,017
TGAGAGGGTG					0	6	≥ 6	0,017
TAATAAAACC	79734	NM_024681.1	KCTD17	<u>Potassium channel tetramerisation domain containing 17</u>	0	6	≥ 6	0,017

(1) Los *tags* sin gen asociado, corresponden a aquellos para los que no se ha descrito una secuencia de referencia. Datos actualizados en Enero de 2006.

(2) Los genes subrayados corresponden a genes que fueron seleccionados para su validación mediante RT-PCR cuantitativa.

(3) N° de apariciones del *tag* en cada librería.

Tabla 8. Genes inhibidos por EWS/FLI1 en células 293, identificados mediante la técnica SAGE

Tag <sup>(1)</sup>	ID	Secuencia de referencia	Símbolo (NCBI)	Nombre <sup>(2)</sup> (NCBI)	293 <sup>(3)</sup> pCI	293 <sup>(3)</sup> EWS/FLI1	Ratio	p-chance
TGCTGGGTGG	4714	NM_005004.2	NDUFB8	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa</i>	11	1	0,09	0,003
TGCTGGGTGG	2356	NM_004957.4 NM_001018078.1	FPGS	<i>folylpolyglutamate synthase</i>	11	1	0,09	0,003
ACTGGGGAAT	2273	NM_001449.3	FHL1	<i>Four and a half LIM domains 1</i>	10	1	0,1	0,006
TAATGACAAT					9	1	0,1	0,011
CTCACTTCTT					9	0	≤ 0,11	0,002
GGTCACACTA	7386	NM_006003.1	UQCRFS1	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1</i>	8	1	0,13	0,020
CAATGCTGCC	1144	NM_000751.1	CHRND	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide</i>	7	1	0,14	0,038
GGTGACAGAG					7	1	0,14	0,038
GTGGTGGGCA					6	0	≤ 0,17	0,014
TTCTATTTTG	10572	NM_006427.2 NM_021709.1	SIVA	<i>CD27-binding (Siva) protein</i>	6	0	≤ 0,17	0,014
CTGTGCTCGG	1892	NM_004092.2	ECHS1	<i>enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial</i>	6	0	≤ 0,17	0,014
GCTCAGAATC	51020	NM_016063.1	HDDC2	<i>HD domain containing 2</i>	6	0	≤ 0,17	0,014
GTGGTGGGCA					6	0	≤ 0,17	0,014
GATGAACACT					6	0	≤ 0,17	0,014

(1) Los tags sin gen asociado, corresponden a aquellos para los que no se ha descrito una secuencia de referencia. Datos actualizados en Enero de 2006.

(2) Los genes subrayados corresponden a genes que fueron seleccionados para su validación mediante RT-PCR cuantitativa.

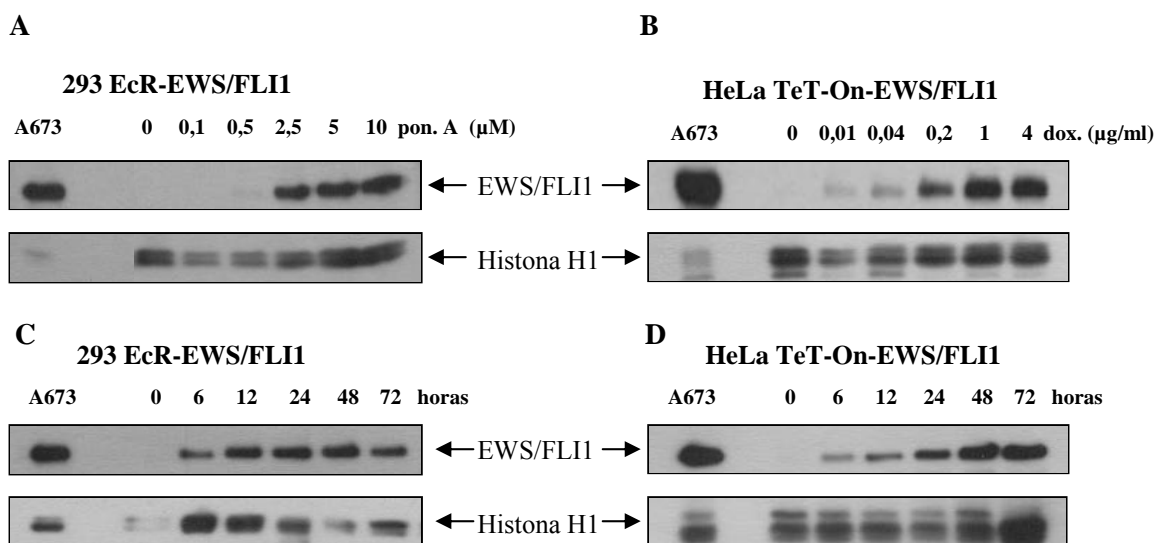
(3) N° de apariciones del tag en cada librería.



## 4.2 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante el empleo de matrices de oligonucleótidos (*microarrays*)

### 4.2.1 Establecimiento de modelos de expresión inducible de EWS/FLI1

Con el fin de continuar con el objetivo principal de esta Tesis, esto es, la identificación de genes regulados por la oncoproteína EWS/FLI1, decidimos establecer dos sistemas celulares de expresión inducible y emplear la técnica de matrices de oligonucleótidos para identificar genes potencialmente regulados por EWS/FLI1. Estos sistemas de expresión inducible se basaron en las células comerciales 293 EcR (Invitrogen) y HeLa TeT-On (BD Biosciences). En estos sistemas, la adición del estímulo adecuado (ponasterona A, un análogo de la hormona de insectos ecdisona, en el caso de las células 293 EcR, y tetraciclina o doxiciclina en el caso de las células HeLa TeT-On), permite inducir la expresión de la proteína de interés de manera regulada, y estudiar el efecto de su expresión a lo largo del tiempo.



**Figura 7. Expresión inducible de EWS/FLI1 en células 293 EcR y HeLa TeT-On.** Las células 293 EcR-EWS/FLI1 (A) y las células HeLa TeT-On-EWS/FLI1 (B), se estimularon, durante 48 horas, con diferentes dosis de ponasterona A (pon. A) y doxiciclina (dox.), respectivamente. La expresión de EWS/FLI1 fue máxima con 2,5 µM de ponasterona A (293 EcR) y 1 µg/ml de doxiciclina (HeLa TeT-On). Para estudiar los niveles de expresión de EWS/FLI1 a lo largo del tiempo, las células 293 EcR-EWS/FLI1 (C) y las células HeLa TeT-On-EWS/FLI1 (D), se incubaron durante periodos variables de tiempo con 2,5 µM de ponasterona A (293 EcR) y 1 µg/ml de doxiciclina (HeLa TeT-On). La expresión de EWS/FLI1 se determinó mediante *western-blot* de extractos nucleares (15 µg) con un anticuerpo anti-FLI1. En todos los casos, las membranas fueron rehibridadas con un anticuerpo anti-histona H1 que se utilizó como control de carga y de la eficiencia de la transferencia. En cada membrana, se incluyó un extracto nuclear de la línea celular de Ewing A673, con fines comparativos.

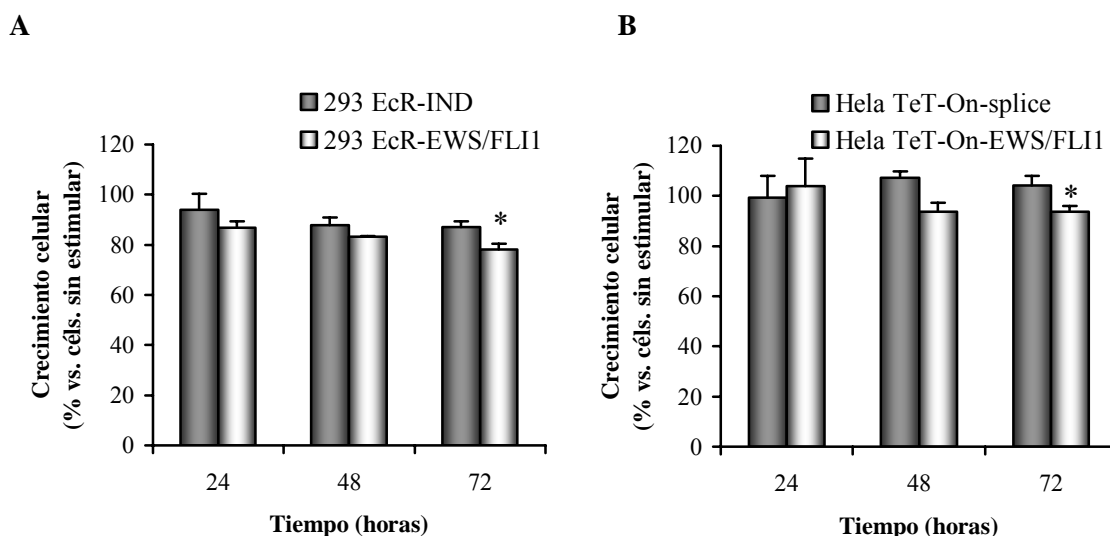
Cada una de estas células (293 EcR y HeLa TeT-On), se transfectaron con los correspondientes vectores de expresión vacíos (pIND o pTET-splice respectivamente), o con vectores que contenían el ADNc de las proteínas EWS/FLI1 o FLI1 nativa. Después de seleccionar una población policlonal para cada tipo celular y vector de expresión con el antibiótico adecuado, se hizo una curva de dosis del estímulo y una curva de tiempo, para determinar las condiciones experimentales en las que se producía la mayor inducción de EWS/FLI1 o FLI1 (Figura 7). En las células 293 EcR-EWS/FLI1, el mayor nivel de expresión de EWS/FLI1 se consiguió con 2,5  $\mu$ M de ponasterona A a las 24–48 horas. En las células HeLa TeT-On-EWS/FLI1, la dosis de doxiciclina con la que se consiguió la mayor expresión de EWS/FLI1 fue de 1  $\mu$ g/ml a las 24-48 horas. En ambos casos, los niveles máximos de expresión fueron comparables a los observados en la línea celular de Ewing A673. La expresión de EWS/FLI1 se empezó a detectar tan pronto como a las 6 horas de la adición del estímulo correspondiente. La cinética de expresión de FLI1 fue similar a la observada con EWS/FLI1 (datos no mostrados).

#### 4.2.2 Efecto de la expresión de EWS/FLI1 sobre las células 293 EcR y HeLa TeT-On

Una vez establecidas las dosis y tiempos óptimos de inducción de las proteínas EWS/FLI1 y FLI1, analizamos el efecto de la expresión de EWS/FLI1 sobre la fisiología celular.

En primer lugar, estudiamos el efecto de EWS/FLI1 sobre la proliferación celular. Para esto, incubamos las células 293 EcR-IND y 293 EcR-EWS/FLI1 en presencia o ausencia de 2,5  $\mu$ M de ponasterona A, y medimos el incremento de la masa celular a lo largo del tiempo. Como se muestra en la figura 8, la estimulación de las células 293 EcR-EWS/FLI1 con ponasterona A, produjo una disminución en la proliferación celular de un 22 % a las 72 horas, en comparación con las mismas células sin estimular. Sin embargo, parte de este efecto fue debido a una acción inespecífica de la ponasterona A, ya que la incubación de las células 293 EcR-IND con ponasterona A, provocó una disminución en la proliferación de un 14 % a las 72 horas, frente a las mismas células sin estimular. A pesar de este posible efecto inespecífico de la ponasterona A sobre las células 293 EcR, la estimulación de las células 293 EcR-EWS/FLI1 con ponasterona A, produjo una inhibición neta de la proliferación de un 8 %, que debe por tanto ser atribuida a la expresión de EWS/FLI1. En las células HeLa TeT-On-EWS/FLI1, la expresión de EWS/FLI1 redujo la proliferación celular en un 10 % a las 72 horas, en relación a las mismas células sin estimular. Al contrario que con las células 293 EcR, no observamos

efectos inespecíficos de la doxiciiclina sobre la proliferación celular de las células control HeLa TeT-On-splice.

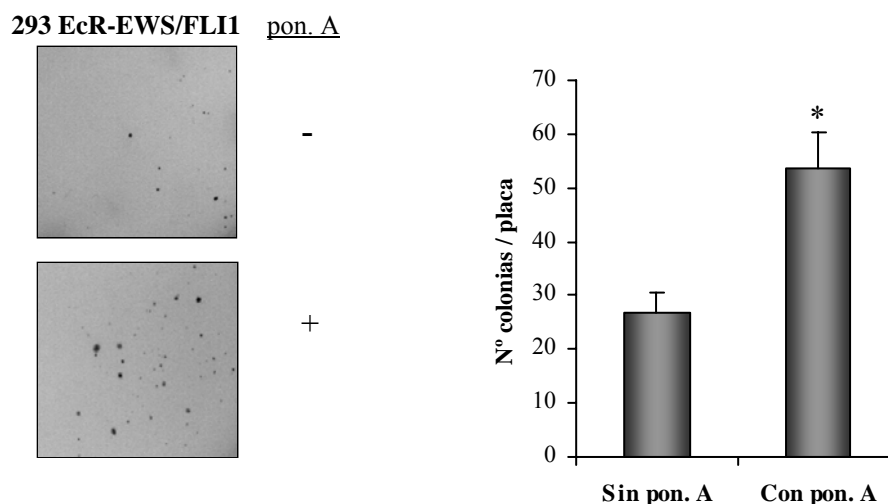


**Figura 8. Efecto de la expresión de EWS/FLI1 sobre la proliferación celular de las células 293 EcR y HeLa TeT-On.** Las células 293 EcR-IND y 293 EcR-EWS/FLI1 (A) se incubaron en presencia o ausencia de ponasterona A (2,5  $\mu$ M), y las células HeLa TeT-On-splice y HeLa TeT-On-EWS/FLI1 (B) se incubaron en presencia o ausencia de doxiciiclina (1  $\mu$ g/ml). Para cada una de las cuatro células se determinó el crecimiento celular mediante tinción con el colorante vital cristal violeta a lo largo del tiempo (24, 48 y 72 horas), y se comparó el nivel de crecimiento en presencia del estímulo frente a las células sin estimular. Las tasas de crecimiento de las células 293 EcR-EWS/FLI1 versus las células 293 EcR-IND y de las células HeLa TeT-On-EWS/FLI1 versus las células HeLa TeT-On-splice fueron menores a las 72 horas (\*,  $P < 0,05$ ). Media  $\pm$  SD de 3 experimentos realizados por triplicado.

Para profundizar en el efecto de EWS/FLI1 sobre el crecimiento celular, se realizaron estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo. Para ello, incubamos las células 293 EcR-EWS/FLI1 en presencia o ausencia de ponasterona A durante 72 horas, y medimos las diferentes fases del ciclo celular en células teñidas con IPr. La inducción de EWS/FLI1 incrementó en un 7% el número de células en fase G0/G1 y disminuyó en un 11% el número de células en fase S con respecto a las células no tratadas. No se observó un incremento significativo en el número de células en el área subG0/G1 correspondiente a células necróticas o apoptóticas (datos no mostrados).

Por último, estudiamos el efecto de EWS/FLI1 sobre la capacidad de las células 293 EcR-EWS/FLI1 para formar colonias en agar blando, como una medida del potencial transformador de EWS/FLI1. Como se muestra en la Figura 9, la inducción de EWS/FLI1 con

ponasterona A, incrementó significativamente el número de colonias tras 30 días de cultivo con respecto a las células sin estimular.



**Figura 9. Efecto de EWS/FLI1 sobre el crecimiento celular independiente de anclaje en las células 293 EcR.** Las células 293 EcR-EWS/FLI1 se cultivaron en agar blando en ausencia o presencia de 2,5  $\mu$ M de ponasterona A (pon. A). Cada 2-3 días, se añadió medio fresco con o sin estímulo durante un periodo total de 30 días. Posteriormente, se tiñeron las placas con cristal violeta y se contó manualmente el número de colonias. EWS/FLI1 indujo un incremento en el número de colonias (\*,  $P < 0,05$ ). Media  $\pm$  SD de un experimento realizado por triplicado.

En resumen, hemos establecido dos modelos de expresión inducible de la oncoproteína EWS/FLI1 en células 293 EcR y HeLa TeT-On. En estas células, la adición del estímulo correspondiente induce la expresión de EWS/FLI1 a niveles similares a los observados en las células de Ewing. La expresión de EWS/FLI1 produce una ligera inhibición del crecimiento celular aunque estadísticamente significativa, asociada a una ligera acumulación de las células en fase G0/G1. Por último, la expresión de EWS/FLI1 en las células 293 EcR induce un incremento significativo en su capacidad de crecimiento independiente de anclaje.

#### 4.2.3 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1: CCK y NROB1

A continuación, estudiamos el perfil de expresión génica en respuesta a la inducción de EWS/FLI1 y FLI1 en las células 293 EcR y HeLa TeT-On mediante el empleo de matrices de oligonucleótidos.

Para ello, llevamos a cabo dos experimentos independientes en cada sistema celular inducible. En estos experimentos, las células 293 EcR y HeLa TeT-On transfectadas con los

vectores de expresión vacíos, o con los correspondientes vectores que codifican para EWS/FLI1 o FLI1, se incubaron con el estímulo correspondiente y se extrajo el ARN total a las 0, 24 y 72 horas tras la estimulación. Estos ARNs se procesaron y se hibridaron a matrices de oligonucleótidos comerciales (Human Uniset I, GE Healthcare, Amersham Biosciences), que contienen sondas para 10451 genes diferentes, y se analizaron tal y como se describe en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Aquellos genes que fueron estimulados o inhibidos más de dos veces a 24 o 72 horas en ambos experimentos con respecto a las células control transfectadas con el vector vacío (es decir, 293 EcR-IND y HeLa TeT-On-splice), fueron considerados genes potencialmente regulados por EWS/FLI1 o FLI1 (Tablas 9 y 10).

Además de este análisis, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el método SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, Tusher *et al.* 2001) con ayuda del paquete informático TM4, desarrollado por *The Institute for Genome Research* (TIGR, [www.tm4.org](http://www.tm4.org), Saeed *et al.* 2003). El método SAM permite identificar genes que, superando un determinado nivel de significación estadística, se expresan diferencialmente entre dos situaciones experimentales. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 10.

Independientemente del método de análisis utilizado, el número de genes regulados por EWS/FLI1 fue mayor en el modelo de células HeLa Tet-On que en el de células 293 EcR. En todos los experimentos se observó un incremento significativo en la expresión de FLI1, indicando que en todos los casos se indujo la expresión de EWS/FLI1 o FLI1 en respuesta a los estímulos correspondientes.

En las células 293 EcR, 7 de los genes regulados por EWS/FLI1 fueron seleccionados por ambos métodos de análisis: 4 inducidos (NR0B1, CCK, PCDH19, CES1) y 3 inhibidos (F10, FUT1 y IL18). En las células HeLa TeT-On, ambos métodos coincidieron en 5 genes, todos ellos inducidos por EWS/FLI1 (MYBPC2, AKR1B10, CCK, NTRK1 y NR0B1). Entre estos genes, centramos nuestra atención en aquellos que fueron específicamente regulados por EWS/FLI1, pero no por FLI1. Cuatro genes, todos ellos inducidos, cumplieron estas condiciones: CCK y NR0B1, los cuales fueron además inducidos por EWS/FLI1 en las dos células utilizadas; CES1, inducido en las células 293 EcR; y AKR1B10, inducido en las células HeLa TeT-On. Los resultados obtenidos mediante matrices de oligonucleótidos en estos cuatro genes fueron validados mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 11A). En todos los casos se observó una elevada correlación ( $R^2$  entre 0,95 y 0,99) entre los resultados obtenidos con matrices de oligonucleótidos y los obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 11B), aunque los niveles de inducción fueron siempre superiores por RT-PCR cuantitativa.

Tabla 9. Genes regulados por EWS/FLI1 y/o FLI1 en células 293 Ecr, identificados mediante matrices de oligonucleótidos

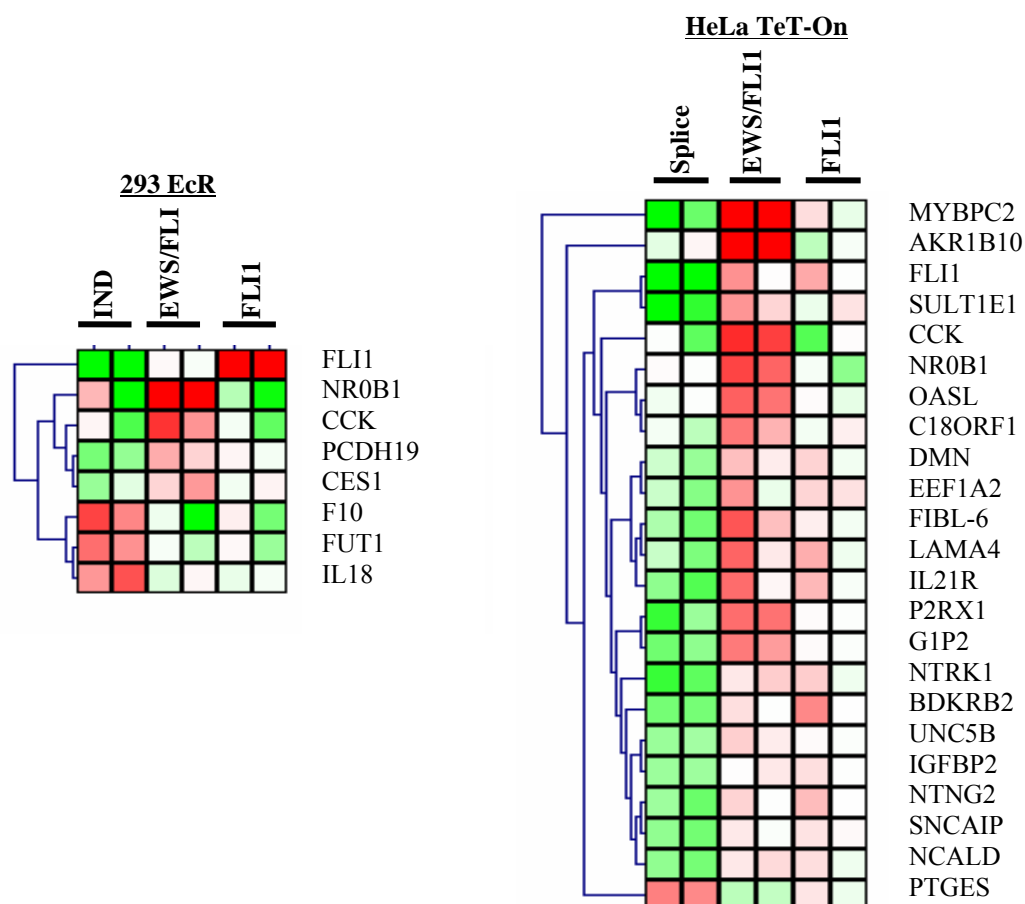
ID Gen	Símbolo	Ratio EWS/FLI1 vs. IND		Ratio FLI1 vs. IND		Nombre
		24h <sup>(1)</sup>	72h <sup>(1)</sup>	24h <sup>(1)</sup>	72h <sup>(1)</sup>	
190	NR0B1	6,6	13,9	0,3	0,8	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
2313	FLI1	13,6	9,5	42,7	59,9	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
885	CCK	2,7	3,8	0,7	1,0	<i>Cholecystokinin</i>
57526	PCDH19	1,8	2,8	1,8	2,0	<i>Protocadherin 19</i>
1066	CES1	0,9	2,1	1,1	1,4	<i>Carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)</i>
2523	FUT1	0,9	0,4	1,1	0,4	<i>fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, Bombay phenotype included)</i>
3606	IL18	0,5	0,4	0,7	0,4	<i>interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i>
2241	FER	0,36	0,21	0,45	0,67	<i>Fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)</i>
2159	F10	0,6	0,2	0,8	0,3	<i>coagulation factor X</i>

(1) Se muestran los genes en los que la media de la ratio EWS/FLI1 vs. IND o FLI1 vs. IND obtenida en los dos experimentos, a las 24 o 72 horas, es mayor de 2 (genes estimulados) o menor de 0,5 (genes inhibidos).

Tabla 10. Genes regulados por EWS/FLI1 y/o FLI1 en las células HeLa TeT-On, identificados mediante matrices de oligonucleótidos

ID Gen	Símbolo	Ratio EWS/FLI1 vs. IND		Ratio FLI1 vs. IND		Nombre
		24h <sup>(1)</sup>	72h <sup>(1)</sup>	24h <sup>(1)</sup>	72h <sup>(1)</sup>	
57016	AKR1B10	3,1	53,6	0,7	0,8	<i>aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)</i>
4606	MYBPC2	9,6	34,3	4,3	4,0	<i>Myosin binding protein C, fast type</i>
6696	SPP1	4,0	16,8	2,9	11,3	<i>secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)</i>
2313	FLI1	19,8	15,8	42,9	14,3	<i>Friend leukemia virus integration 1</i>
10656	KHDRBS3	2,8	7,9	4,8	15,5	<i>KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3</i>
885	CCK	1,4	6,9	2,5	2,0	<i>Cholecystokinin</i>
4914	NTRK1	2,0	5,3	2,2	5,0	<i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1</i>
9388	LIPG	1,1	3,0	1,2	2,4	<i>lipase, endothelial</i>
190	NR0B1	1,1	2,5	0,3	0,7	<i>Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
81614	NIPA2	1,6	2,2	1,3	1,9	<i>non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2</i>
79695	GALNT12	2,8	1,3	1,2	0,5	<i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12</i>
23261	CAMTA1	0,7	0,4	0,7	0,5	<i>calmodulin binding transcription activator 1</i>
54511	HMGCLL1	0,8	0,4	0,8	0,4	<i>3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1</i>
665	BNIP3L	0,5	0,4	0,7	0,5	<i>cDNA DKFZp566E034 (from clone DKFZp566E034)</i>
4842	NOS1	0,8	0,4	0,8	0,4	<i>Nitric oxide synthase 1 (neuronal)</i>
10529	NEBL	1,2	0,4	4,0	0,3	<i>Nebulette</i>
55287	FLJ11036	1,0	0,4	0,9	0,4	<i>hypothetical protein FLJ11036</i>
974	CD79B	0,5	0,3	0,8	0,3	<i>CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)</i>
51107	APH1A	0,6	0,2	0,5	0,2	<i>anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans)</i>
4239	MFAP4	0,5	0,2	0,5	0,2	<i>microfibril-associated glycoprotein 4</i>
566	AZU1	2,7	0,2	1,3	0,4	<i>azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)</i>
1634	DCN	0,3	0,2	0,4	0,2	<i>decorin</i>
57402	S100A14	0,6	0,2	0,7	0,2	<i>S100-type calcium binding protein A14</i>
3781	KCNN2	0,2	0,1	0,6	0,3	<i>potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2</i>
79785	FLJ22655	0,1	0,0	0,3	0,1	<i>hypothetical protein FLJ22655</i>
8309	ACOX2	0,1	0,6	0,2	0,5	<i>acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain</i>

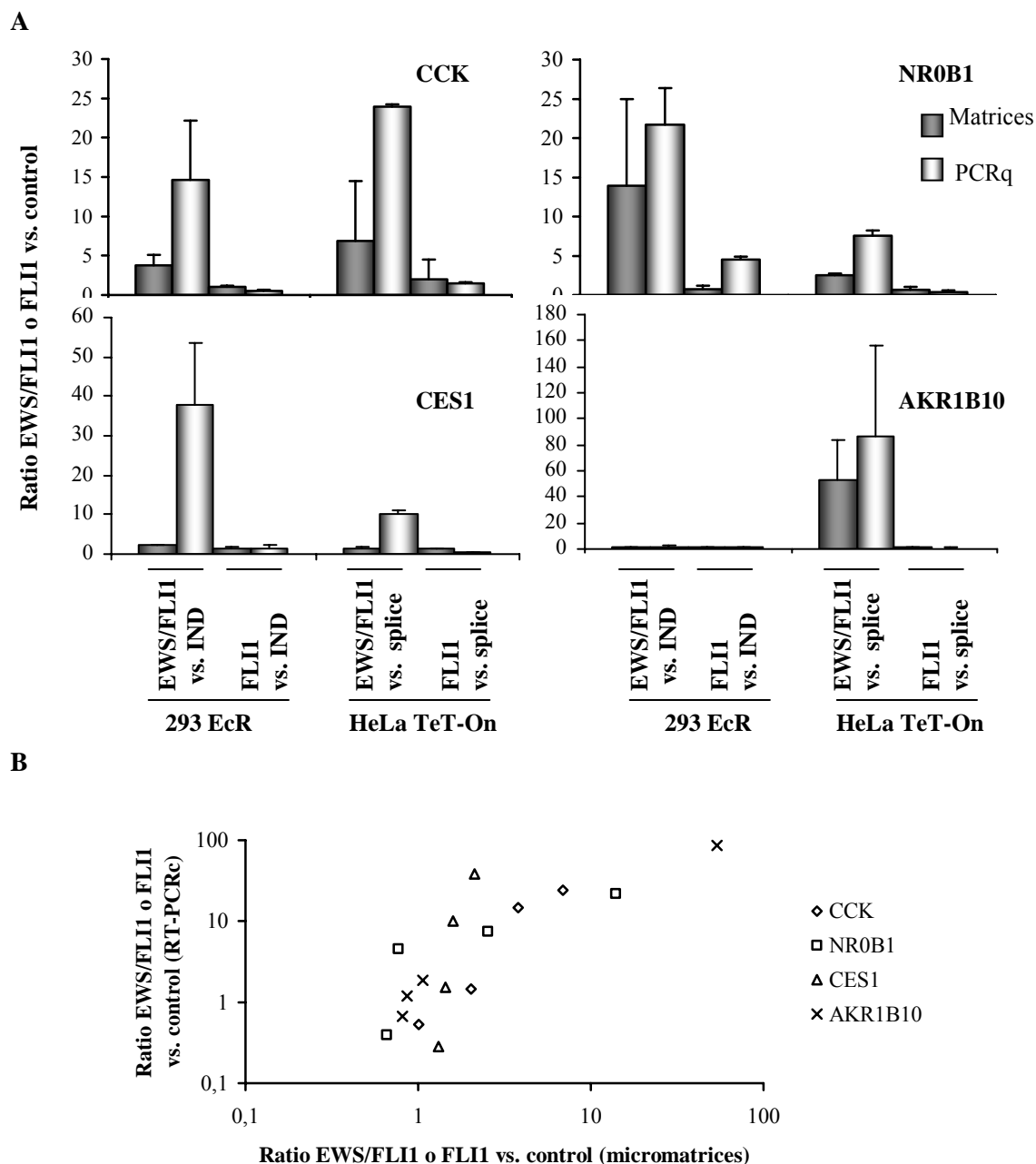
(1) Se muestran los genes en los que la media de la ratio EWS/FLI1 vs. splice o FLI1 vs. splice obtenida en los dos experimentos, a las 24 o 72 horas, es mayor de 2 (genes estimulados) o menor de 0,5 (genes inhibidos).



**Figura 10. Genes diferencialmente regulados por EWS/FLI1 y FLI1 en las células 293 EcR y HeLa TeT-On (Análisis SAM, *Significance Analysis of Microarrays*).** Los valores de intensidad normalizada obtenidos para cada gen en los experimentos con matrices, se transformaron a  $\log_2$  y se les aplicó el algoritmo SAM para identificar los genes con diferencias de expresión significativas. El color rojo indica altos niveles de expresión, el verde bajos niveles de expresión y el blanco representa niveles de expresión cercanos a la mediana.

Estos resultados indican que CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 son genes específicamente inducidos por EWS/FLI1, al menos en alguna de las células estudiadas. Sin embargo, que EWS/FLI1 sea capaz de inducir la expresión de estos genes en células 293 EcR o HeLa TeT-On, ninguna de las cuales guarda relación con los tumores de Ewing, no significa necesariamente que estos genes sean biológicamente relevantes para dichos tumores. En teoría, los genes biológicamente relevantes deberían, no sólo ser inducidos por EWS/FLI1, sino también ser expresados a niveles elevados en células y tumores de Ewing. Además, ya que EWS/FLI1 y sus variantes son exclusivamente expresados en los tumores de Ewing, parecería lógico pensar que una proporción importante de los genes regulados por EWS/FLI1 debería también expresarse preferentemente en tumores de Ewing en relación a otros tumores.



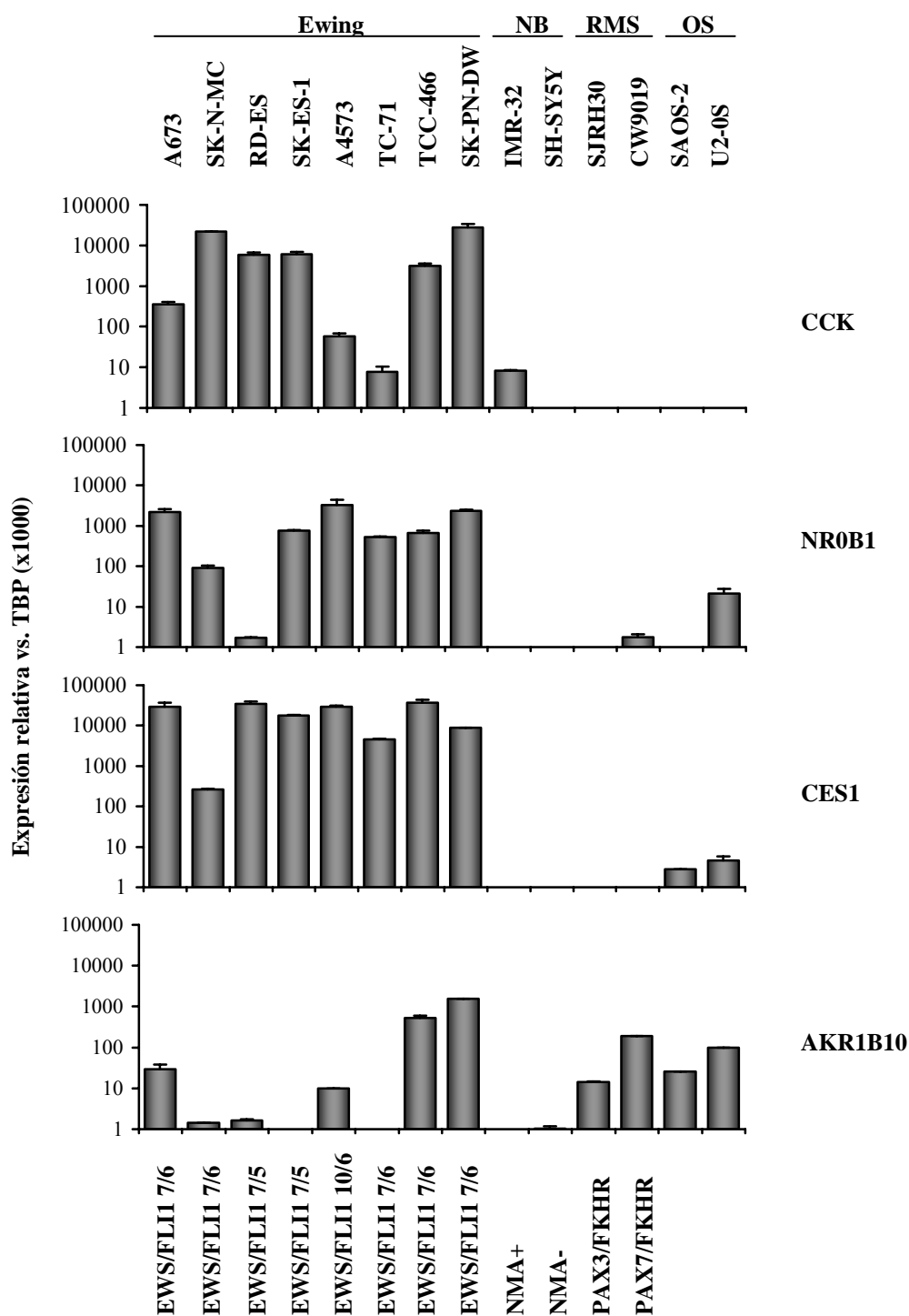


**Figura 11. (A) Validación mediante RT-PCR cuantitativa de los resultados obtenidos con matrices de oligonucleótidos.** En las células 293 EcR y HeLa TeT-On se comparó el nivel de inducción de los genes CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10, detectado por matrices de oligonucleótidos y por RT-PCR cuantitativa tras expresar EWS/FLI1 o FLI1 en relación a sus correspondientes células control (IND o splice). Se usaron muestras de ARN extraídas tras 72 horas de estimulación (con ponasterona A o doxiciclina). Las ratios se calcularon a partir de los datos de intensidad normalizada en las matrices de oligonucleótidos o de los niveles de expresión relativos al gen control TBP (*TATA binding protein*) en la RT-PCR cuantitativa. Se muestra la media  $\pm$  SD de dos experimentos realizados por duplicado. **(B) Correlación entre las matrices de oligonucleótidos y la RT-PCR cuantitativa (RT-PCRc).** Para cada uno de los genes estudiados (CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10), se representa la ratio EWS/FLI1 o FLI1 con respecto a los controles (IND o splice) de cada modelo inducible (293 EcR y HeLa TeT-On), obtenida por RT-PCR cuantitativa o matrices de oligonucleótidos.

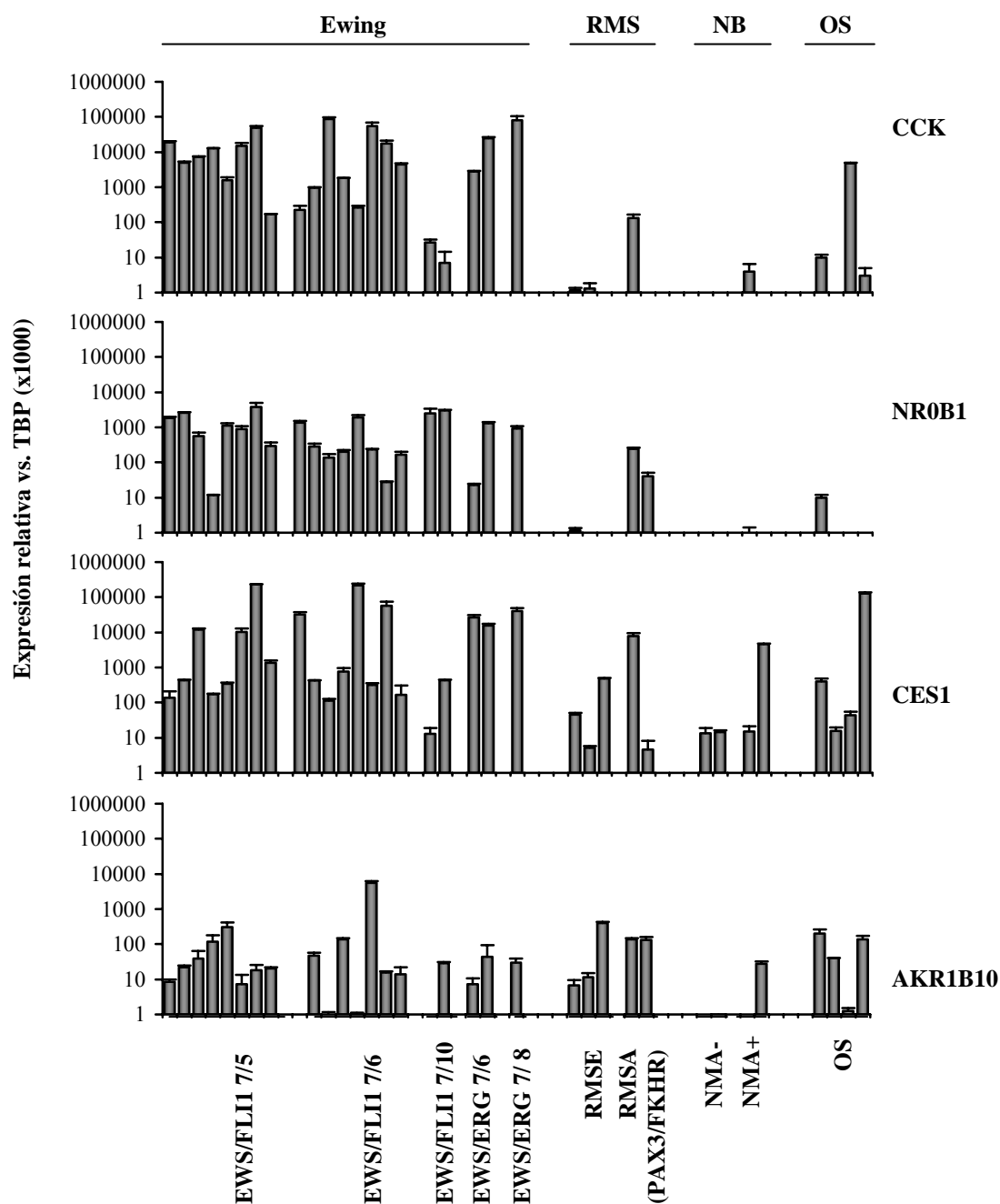
Por estas razones, analizamos mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión de CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 en diferentes líneas celulares de Ewing (con diferentes tipos de translocaciones) y en células derivadas de otros tumores pediátricos no relacionados (neuroblastoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma). Estos experimentos demostraron que CCK, NR0B1, y CES1 se expresaron a niveles elevados en el 85-100% de las células de Ewing, pero no en las células derivadas de neuroblastoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma estudiadas. Por el contrario AKR1B10 se expresó a niveles elevados en las células derivadas de rhabdomyosarcomas y osteosarcomas y solo en el 50% de las líneas de Ewing (Figura 12).

A continuación analizamos, también mediante RT-PCR cuantitativa, los niveles de expresión de CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 en biopsias procedentes de tumores de Ewing, neuroblastomas, rhabdomyosarcomas y osteosarcomas (Figura 13). CCK se expresó a niveles elevados en los tumores de Ewing, independientemente del tipo de translocación, aunque dos tumores con la variante EWS/FLI1 7/10 (exón 7 de EWS fusionado al exón 10 de FLI1), mostraron los niveles más bajos. Exceptuando a un rhabdomyosarcoma alveolar y un osteosarcoma, el resto de tumores no expresaron CCK o su expresión fue muy baja. NR0B1 también se expresó a niveles elevados en todos los tumores de Ewing estudiados, independientemente del tipo de translocación presente en los mismos. Los niveles de NR0B1 fueron indetectables en el resto de los tumores, exceptuando los dos rhabdomyosarcomas alveolares estudiados. CES1 mostró niveles de expresión elevados en los tumores de Ewing, aunque también fueron elevados en algunos de los otros tumores estudiados. Por último, AKR1B10 se expresó en una menor proporción de tumores y a niveles inferiores a los de los otros tres genes estudiados, además de mostrar niveles similares en todos los tumores analizados.

También analizamos el perfil de expresión génica mediante matrices de oligonucleótidos en una serie de tumores de Ewing, rhabdomyosarcomas y neuroblastomas (Figura 14). El ARN procedente de estas biopsias se procesó y se hibridó a matrices de oligonucleótidos Codeword Human Uniset 20K (GE Healthcare, Amersham Biosciences) que contienen sondas para 20461 genes diferentes. Tras el análisis de los datos de expresión (ver apartado Materiales y Métodos para los detalles del análisis), se obtuvo una lista de genes altamente específicos de los tumores de Ewing, que caracterizan a estos frente a los otros dos tumores analizados. CCK y NR0B1 se encontraron entre los 10 genes que presentaron mayores diferencias de expresión en los tumores de Ewing con respecto a los neuroblastomas y rhabdomyosarcomas, confirmando que ambos genes se expresan a elevados niveles en los tumores de Ewing, y por tanto son candidatos a ser genes biológicamente relevantes en estos

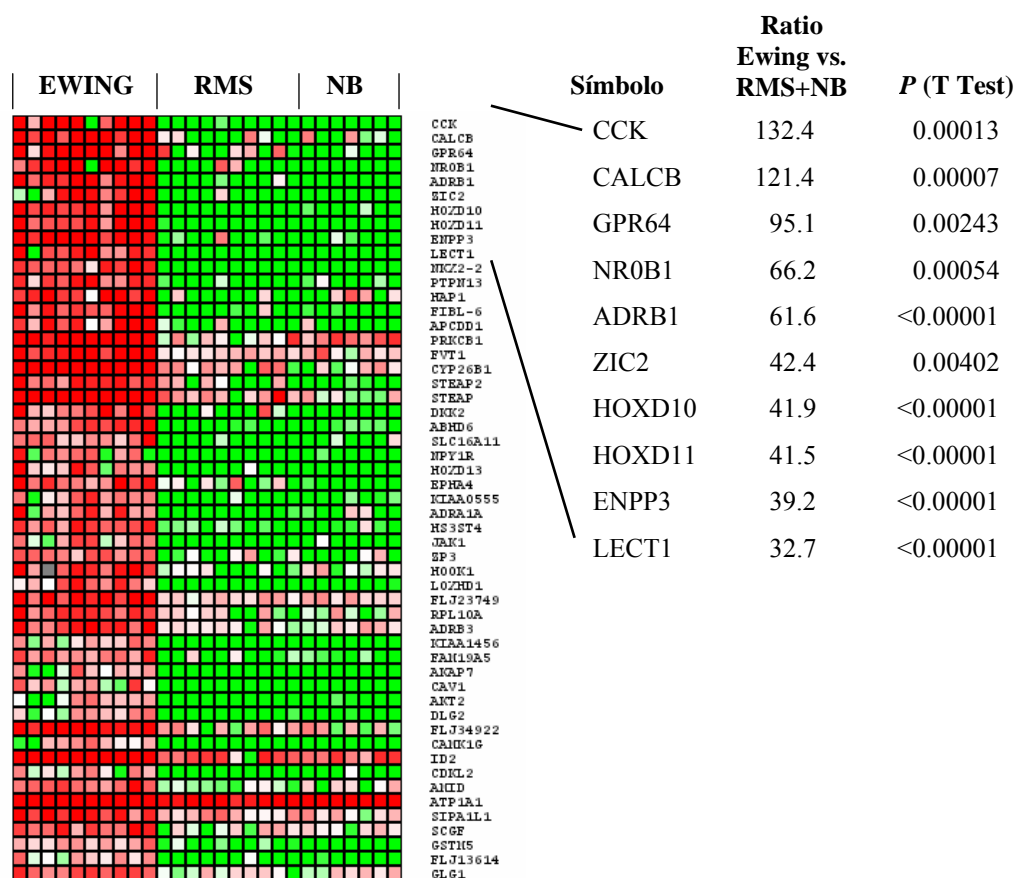


**Figura 12.** Niveles de expresión de CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 en líneas celulares de Ewing y en células derivadas de neuroblastomas, rhabdomyosarcomas y osteosarcomas. El nivel de expresión relativo de los genes CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10, con respecto al gen control TBP (*TATA binding protein*) se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en diferentes líneas de Ewing y en líneas procedentes de neuroblastomas (NB), rhabdomyosarcomas (RMS) y osteosarcomas (OS). Se indica el tipo de translocación para las líneas de Ewing y los rhabdomyosarcomas. Para los neuroblastomas se indica si son positivos (NMA+) o negativos (NMA-) para la amplificación del oncogén N-Myc. Se muestra la media  $\pm$  SD de un experimento realizado por duplicado.

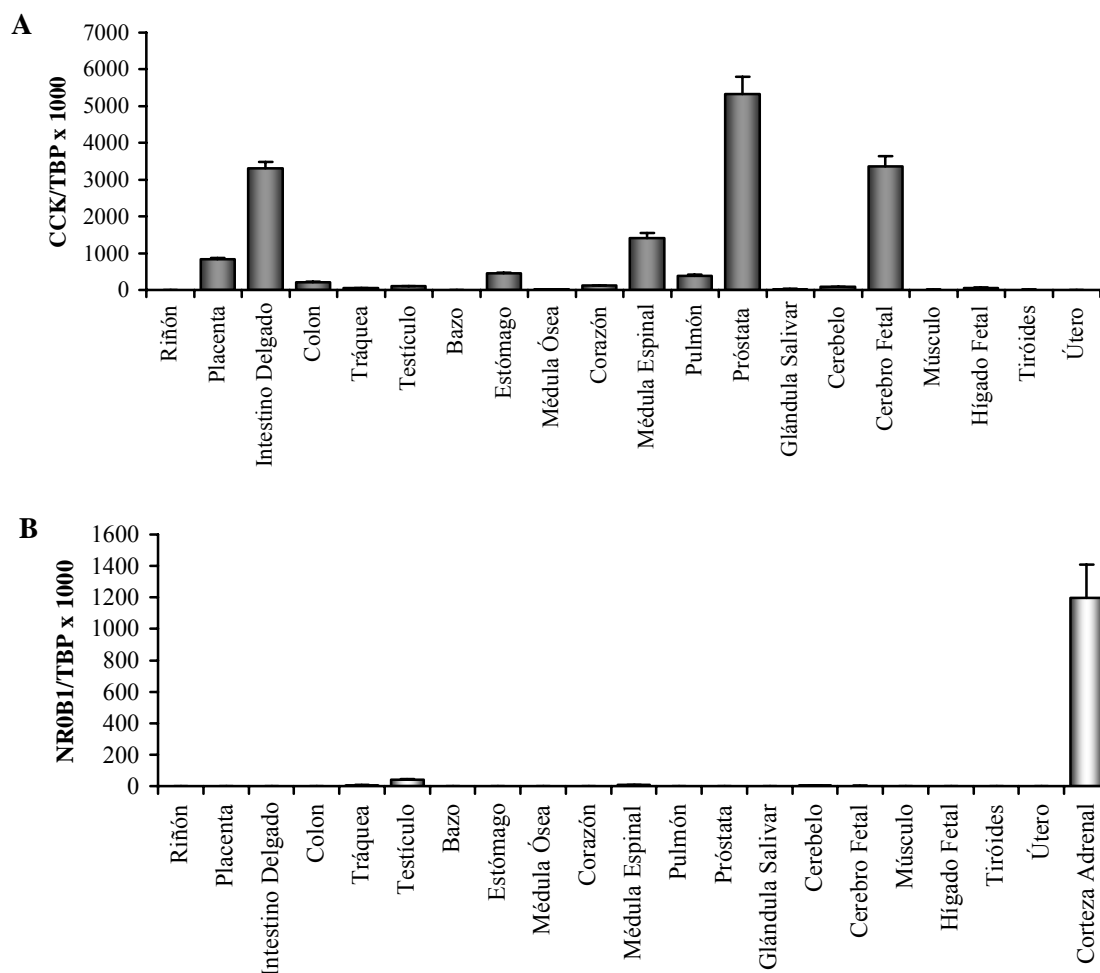


**Figura 13. Niveles de expresión de CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 en tumores de Ewing, neuroblastomas, rhabdomyosarcomas y osteosarcomas.** El nivel de expresión relativa de los genes CCK, NR0B1, CES1 y AKR1B10 con respecto al gen control TBP (*TATA binding protein*) se determinó mediante RT-PCR cuantitativa en diferentes tumores de Ewing (n=21), neuroblastomas (NB, n=4), rhabdomyosarcomas embrionarios (RMSE, n=3), rhabdomyosarcomas alveolares (RMSA, n=2) y osteosarcomas (OS, n=4). Se indica el tipo de translocación para los tumores de Ewing y para los rhabdomyosarcomas alveolares. En los neuroblastomas se indica si son negativos (NMA-) o positivos (NMA+) para la amplificación del oncogén N-Myc. Se muestra la media  $\pm$  SD de un experimento realizado por duplicado.

tumores. Por otro lado, ni CES1, ni AKR1B10, aparecieron en la lista de estos genes característicos de los tumores de Ewing.



elevados como los niveles de estos genes en sus principales tejidos productores (comparar figura 13 y 15).



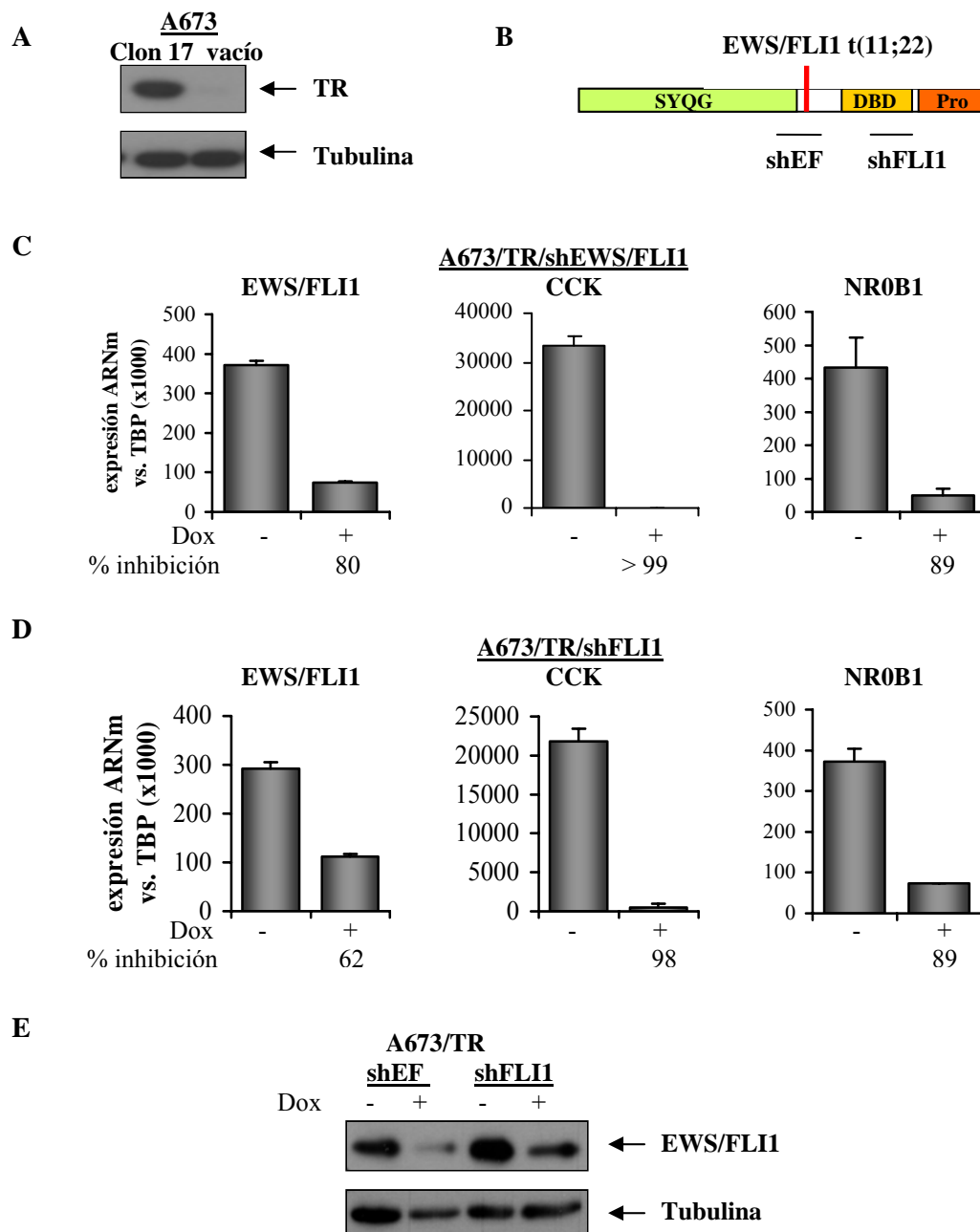
**Figura 15. Expresión de CCK y NR0B1 en tejidos humanos normales.** Nivel de expresión de CCK (A) y NR0B1 (B) en 20 tejidos humanos determinado por RT-PCR cuantitativa. Para NR0B1 también se muestra su nivel de expresión en la corteza adrenal. Cada muestra se estudió por duplicado y en todos los casos se normalizó frente al gen control TBP, multiplicando dicho valor por 1.000. Se muestra la media  $\pm$  SD de un experimento realizado por duplicado.

Integrando todos los estudios de expresión realizados en líneas y tumores de Ewing y en otros tumores pediátricos no relacionados, podemos concluir que CCK y NR0B1 cumplen todas las condiciones para considerarse genes biológicamente relevantes en los tumores de Ewing, ya que i) ambos fueron inducidos por EWS/FLI1 en dos sistemas celulares independientes, ii) se expresaron a elevados niveles en líneas celulares y tumores de Ewing, y

iii) resultaron ser característicos de los tumores de Ewing en relación a otros tumores pediátricos.

A pesar de todas estas evidencias, nuestros resultados no demuestran que CCK y NR0B1 son genes inducidos por EWS/FLI1 en los tumores de Ewing. Para demostrar inequívocamente que EWS/FLI1 induce la expresión de CCK y NR0B1 en los tumores de Ewing, recurrimos a la técnica de ARN de interferencia, usando un sistema de expresión inducible de *small hairpin RNAs* (shARN). Este sistema nos permite inducir a voluntad la expresión de un determinado shARN, el cual, una vez procesado a ARN de interferencia de pequeño tamaño (siARN) en el interior de la célula, se une al ARNm de nuestro gen de interés en presencia de un complejo multiproteico, mediando su degradación (Elbashir *et al.* 2001; Bonetta 2004).

En primer lugar infectamos las líneas celulares de Ewing A673 y SK-PN-DW con el vector de expresión lentiviral pLenti6/TR (Invitrogen), para obtener dos líneas celulares que expresaran elevados niveles del represor de tetraciclina (TR). La expresión de TR fue determinada por *western blot*, y uno de los clones con mayor expresión por cada línea celular (A673/TR y SK-PN-DW/TR) fue seleccionado para los estudios posteriores (Figura 16A). A continuación, las células A673/TR fueron infectadas con lentivirus portadores del vector de expresión pLenti4/shEWS/FLI1 o pLenti4/shFLI1, con el fin de obtener líneas celulares estables (A673/TR/shEWS/FLI1 o A673/TR/shFLI1) capaces de expresar el shARN específico para EWS/FLI1 o FLI1 en respuesta a doxiciclina. El shEWS/FLI1 se diseñó para la zona de fusión de EWS/FLI1, y el shFLI1 para la región 3' de FLI1 que también forma parte de EWS/FLI1 (Figura 16B). Puesto que las células de tumor de Ewing no expresan FLI1, la inducción del shARN específico para FLI1 también debería inhibir la expresión de EWS/FLI1. Como se muestra en la figura 16C, la inducción del shARN específico para EWS/FLI1 en las células A673/TR/shEWS/FLI1 provocó, tras 48 horas de inducción con doxiciclina, una reducción del 80 % en el nivel de mensajero de EWS/FLI1 respecto a las células no tratadas. De la misma manera, la inducción del shARN específico para FLI1 en las células A673/TR/shFLI1 indujo una reducción del 62 % en el nivel de mensajero de EWS/FLI1. Esta disminución en los niveles de mensajero se acompañó de una reducción en el nivel de proteína EWS/FLI1 del 50-60 % con los dos shARNs usados (Figura 16E). Además, la reducción en los niveles de expresión de EWS/FLI1 se acompañó con una reducción significativa de los niveles de expresión de CCK (>98 %) y NR0B1 (89 %) con ambos shARNs (Figura 16C y 16D).



**Figura 16. (A) Células A673 infectadas con lentivirus portadores de la proteína TR.** *Western blot* de las células A673 infectadas con lentivirus portadores del represor de tetraciclina (clon 17) o del vector vacío. De cada muestra se hizo extracción de proteína total y se normalizó la carga con un anticuerpo frente a tubulina. **(B) Localización de los shARNs específicos para la zona de fusión (shEF) y para la región 3' de FLI1 (shFLI1).** **(C) y (D) Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre los niveles de expresión de EWS/FLI1, CCK y NR0B1 en células de Ewing A673.** Las células A673/TR infectadas con un shARN específico para EWS/FLI1 (shEWS/FLI1, **C**) o FLI1 (shFLI1, **D**) se incubaron durante 48 horas en presencia o ausencia de doxiciclina (1  $\mu$ g/ml), y se cuantificó mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión de EWS/FLI1, CCK y NR0B1. La gráfica muestra los niveles de expresión respecto al gen control TBP (*TATA binding protein*) multiplicado por 1.000. Se indica también el porcentaje de inhibición. Media  $\pm$  SD de un experimento realizado por duplicado. **(E) Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 en las células de Ewing A673 sobre los niveles de proteína EWS/FLI1.** *Western blot* a partir de extractos totales de las células A673/TR infectadas con lentivirus portadores del shARN de EWS/FLI1 (shEF) o de FLI1 (shFLI1), estimulados o no con doxiciclina (1  $\mu$ g/ml) durante 48 horas.



Resultados similares se obtuvieron con la línea celular de tumor de Ewing SK-PN-DW. La inducción del shARN específico para EWS/FLI1 en las células SK-PN-DW/TR/shEWS/FLI1, indujo una reducción del 95 % en el nivel de mensajero de EWS/FLI1 tras 48 horas de estimulación con doxyciclina, respecto a las células no tratadas. De la misma manera la inducción del shFLI1 en las células SK-PN-DW/TR/shFLI1 indujo una reducción del 56 % en el nivel de mensajero de EWS/FLI1. En consecuencia, se observó una reducción en el nivel de proteína EWS/FLI1 del 50-60 % con los dos shARNs usados, y una reducción significativa en el nivel de mensajero de CCK y NR0B1 del 70-80 % (datos no mostrados).

A continuación, determinamos si los niveles de proteína de CCK y NR0B1 se veían reducidos tras la expresión de los shARNs específicos de EWS/FLI1. Para esto medimos el nivel de CCK secretado en el medio de cultivo de las líneas de Ewing A673 y SK-PN-DW usando un radioinmunoensayo específico de CCK. Como se muestra en la tabla 11, las células SK-PN-DW secretan de media 10 veces más CCK que las células A673 en condiciones basales. La expresión de los shARNs específicos para EWS/FLI1 y FLI1 redujo significativamente el nivel de CCK secretado en ambas células. Estos resultados, por tanto demuestran que EWS/FLI1 induce la expresión y secreción de CCK en los tumores de Ewing.

**Tabla 11. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 en las líneas de Ewing sobre la producción de CCK**

Línea celular	[CCK] en medio de cultivo (pmol/L) *	
	-dox	+dox
A673/TR/shEF	1,11 ± 0,05	n.d.
A673/TR/shFLI1	2,02 ± 0,07	0,15 ± 0,03 **
SK-PN-DW/TR/shEF	28,97 ± 0,53	11,72 ± 1,72 **
SK-PN-DW/TR/shFLI1	15,12 ± 0,16	0,29 ± 0,29 **

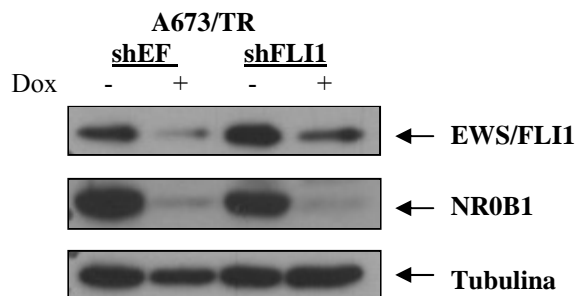
\* media ± SD de dos experimentos independientes.

\*\*  $P < 0,0005$  vs. células sin estimular.

n.d. no detectado, por debajo del límite de detección del ensayo.

Resultados similares fueron obtenidos cuando analizamos el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre los niveles de la proteína NR0B1, mediante *western blot*. Como se muestra en la figura 17, la inhibición de EWS/FLI1, mediante la inducción de los correspondientes

shARNs, provocó una importante reducción del nivel de proteína NR0B1 en ambas líneas celulares.



**Figura 17. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 en las células de Ewing A673 sobre los niveles de proteína NR0B1.** *Western blot* a partir de extractos totales de las células A673/TR infectadas con lentivirus portadores del shARN de EWS/FLI1 (shEF) o de FLI1 (shFLI1), estimulados o no con doxiciclina (1  $\mu$ g/ml) durante 48 horas.

Estos resultados demuestran que tanto CCK, como NR0B1 (Mendiola *et al.* 2006) son genes dependientes de EWS/FLI1 en los tumores de Ewing. Este hecho, unido a los datos mostrados anteriormente, justifican estudiar el papel funcional de estos genes en la patogénesis de los tumores de Ewing.

En esta Tesis nos centramos en el estudio funcional de CCK. A continuación se muestran los experimentos llevados a cabo para determinar el papel desempeñado por CCK en los tumores de Ewing.

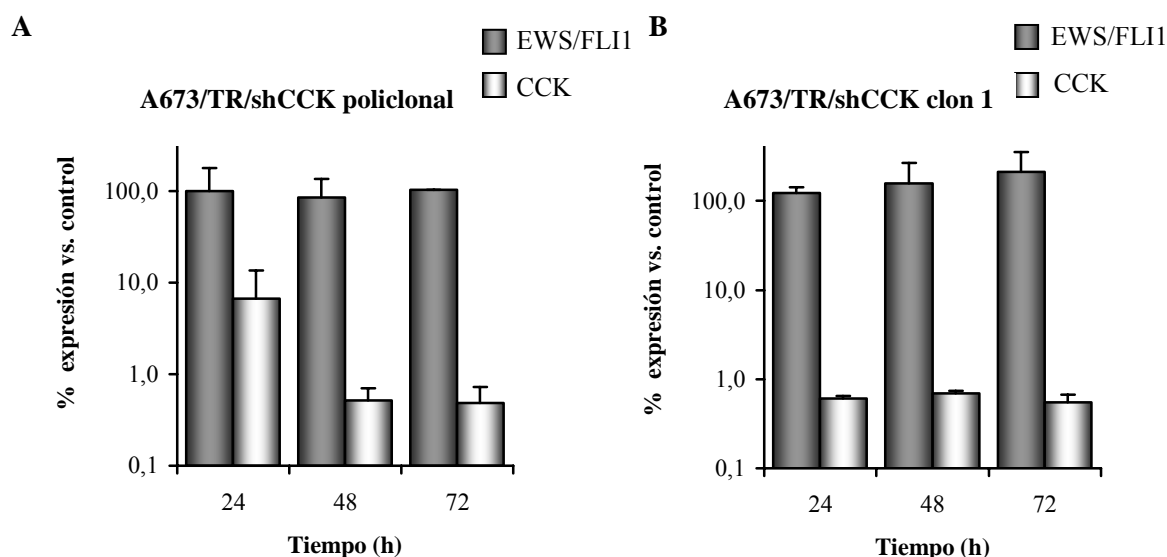
### **4.3 Papel de CCK en las características tumorogénicas de los tumores de Ewing**

#### **4.3.1 Efecto del silenciamiento de CCK en líneas de Ewing**

Una vez demostrado que EWS/FLI1 induce la expresión de CCK en los tumores de Ewing, estudiamos la posible implicación de CCK en la patogénesis de los mismos. Para ello, utilizamos la técnica de ARN de interferencia, ya que nos permite disminuir eficaz y específicamente los niveles de un determinado ARNm, y de esta manera estudiar los efectos que el gen de interés tiene sobre la fisiología celular. Las células A673/TR y SK-PN-DW/TR utilizadas anteriormente, fueron infectadas en esta ocasión con lentivirus portadores del vector de expresión pLenti4/shCCK, con el fin de obtener líneas celulares estables (A673/TR/shCCK

y SK-PN-DW/TR/shCCK) capaces de expresar un shARN específico para CCK (shCCK) en respuesta a doxiciclina.

Como se muestra en la figura 18, la inducción de la expresión del shCCK en un cultivo policlonal de A673/TR/shCCK con doxiciclina, redujo en un 93 % los niveles del ARNm de CCK a las 24 horas, alcanzando valores máximos de inhibición de un 99,5 % a las 48-72 horas, con respecto a las células sin estimular. En algunos de los clones analizados (Figura 18B y resultados no mostrados) se consiguieron valores de inhibición de hasta un 99,5 % a las 24 horas que se mantuvieron hasta las 72 horas. Por el contrario, la expresión de EWS/FLI1 permaneció constante a lo largo del tiempo, tanto en el cultivo policlonal como en los clones analizados. Los niveles de NROB1 tampoco se modificaron, indicando que CCK no regula



**Figura 18. Efecto de la expresión del shARN específico para CCK (shCCK) en las células A673/TR/shCCK sobre los niveles de mensajero de EWS/FLI1 y CCK.** Un cultivo policlonal de A673/TR/shCCK (A) y un clon (B) se cultivaron en presencia o ausencia de doxiciclina (1  $\mu$ g/ml). A las 24, 48 y 72 horas se extrajo el ARN y se determinó el nivel de ARNm de EWS/FLI1 y CCK mediante RT-PCR cuantitativa a los tiempos indicados. Cada muestra se normalizó frente a la expresión del gen control TBP (*TATA binding protein*). Media  $\pm$  SD de un experimento hecho por triplicado.

su expresión (datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con las células SK-PN-DW/TR/shCCK (datos no mostrados). Además, cuantificamos la cantidad de CCK secretada tras el silenciamiento de CCK, mediante RIA, observando una reducción del 90% en ambas líneas celulares de Ewing (Tabla 12).

**Tabla 12. Efecto del silenciamiento de CCK en las líneas de Ewing sobre la producción de CCK**

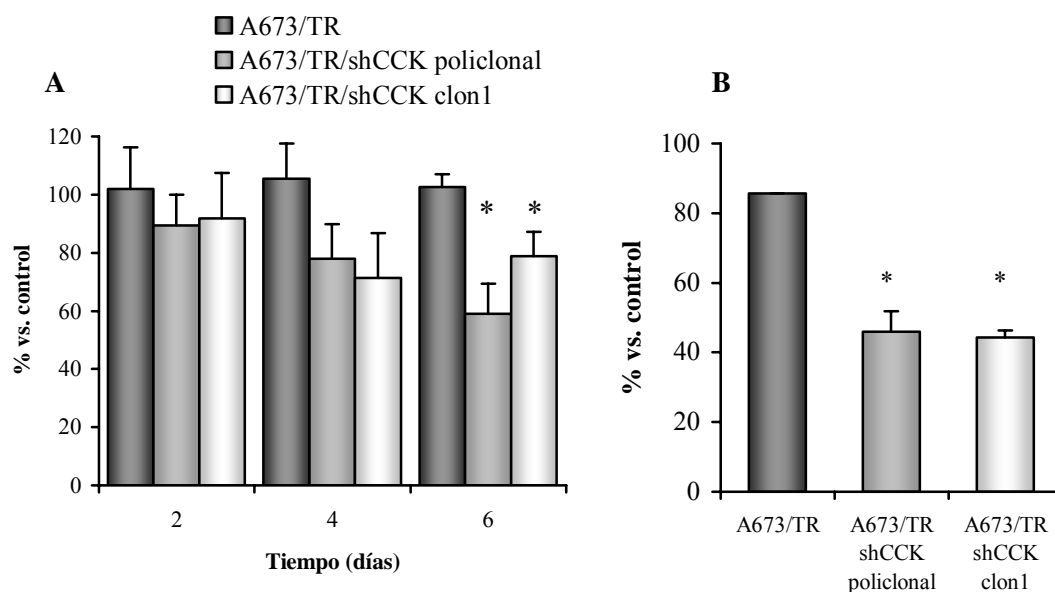
Línea celular	[CCK] en medio de cultivo (pmol/L) *	
	-dox	+dox
A673/TR/shCCK	1,32 ± 0,11	n.d.
SK-PN-DW/TR/shCCK	30,77 ± 0,95	4,03 ± 0,85 **

\* media ± SD de dos experimentos independientes.

\*\*  $P < 0,001$  vs. células sin estimular.

n.d. no detectado, por debajo del límite de detección del ensayo.

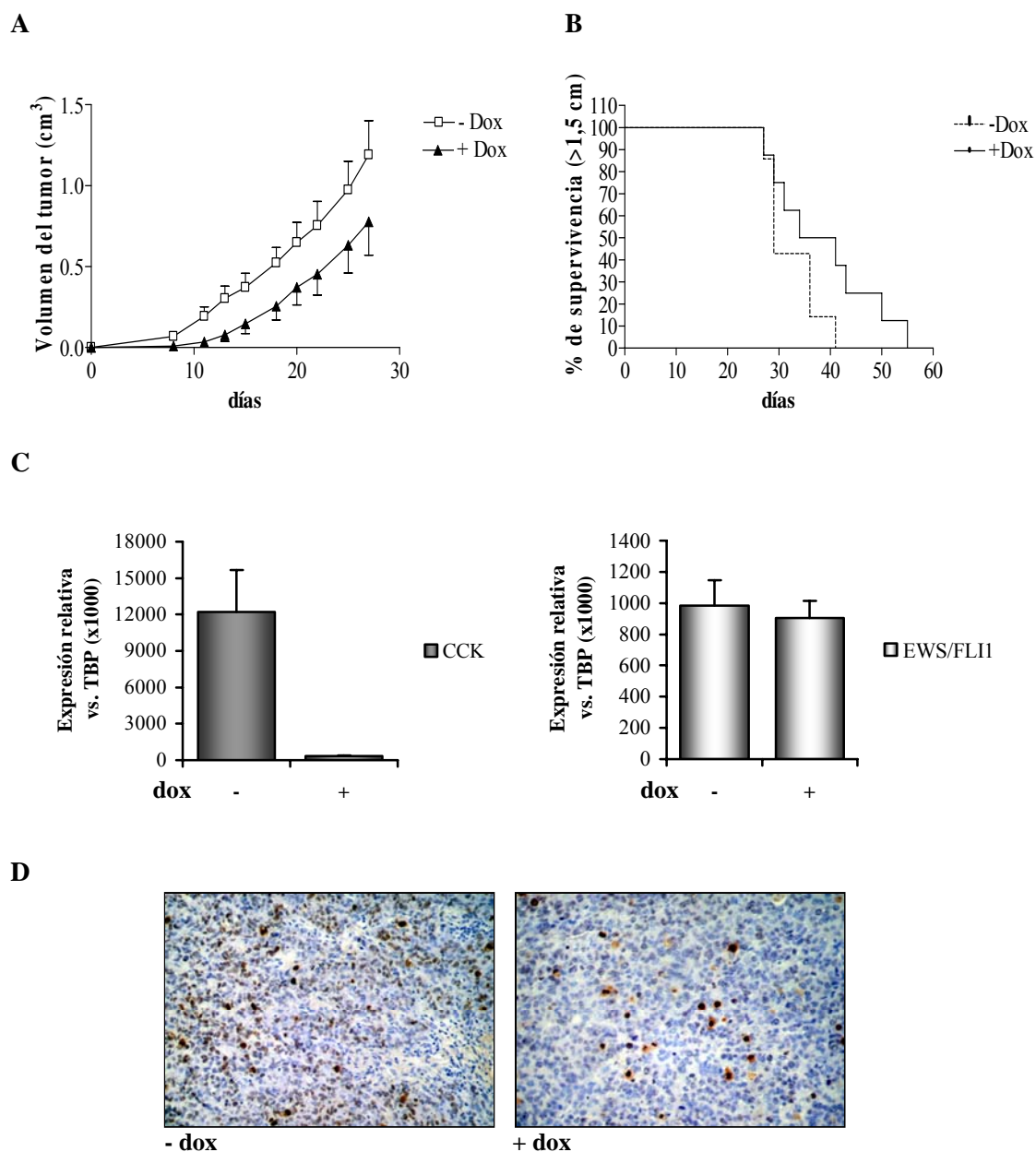
Varios estudios han mostrado que CCK y otros péptidos relacionados como Gastrina son potentes estimuladores del crecimiento celular, tanto en células normales como en algunos tipos de cáncer (Singh *et al.* 1995; Todisco *et al.* 1997; Rozengurt *et al.* 2001). Por tanto, se podría especular que CCK favorece la proliferación de las células de Ewing. Hicimos ensayos de proliferación para comprobar si el silenciamiento de CCK afectaba al crecimiento celular. Como se muestra en la figura 19A, la estimulación de las células A673/TR/shCCK policlonales con doxiciclina, provocó una disminución en el crecimiento celular de un 25 % a los 4 días y un 40 % a los 6 días. Este efecto también se observó en un clon independiente de A673/TR/shCCK. La adición de doxiciclina no afectó al crecimiento de las células control A673/TR. En las células SK-PN-DW/TR/shCCK se observó una reducción del 30 % en la proliferación celular al incubarlas con doxiciclina durante 6 días (datos no mostrados). Además, de forma alternativa cuantificamos la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU al ADN, observando una reducción del 40 % a los 4 días en las células A673/TR/shCCK con respecto a las células control A673/TR (Figura 19B), y un 25 % de reducción para las células SK-PN-DW/TR/shCCK con respecto a las células control SK-PN-DW/TR (datos no mostrados). A pesar de la disminución en la tasa de proliferación observada en ambas líneas celulares de Ewing, tras el silenciamiento de CCK, no observamos cambios morfológicos, ni un incremento en el número de células apoptóticas tal y como pudimos constatar al microscopio óptico y mediante citometría de flujo (datos no mostrados).



**Figura 19. Efecto del silenciamiento de CCK sobre el crecimiento celular.** (A) Las células A673/TR/shCCK policlonales, un clon independiente y las células control A673/TR, se incubaron en presencia o ausencia de doxiciclina (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cambiada cada dos días), y se midió el crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta a los 2, 4 y 6 días. Se muestra el porcentaje de crecimiento respecto a las células sin estimular (\* ,  $P < 0,05$  versus A673/TR). Media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes por triplicado. (B) Alternativamente se midió a los 4 días la tasa de proliferación mediante la incorporación de BrdU al ADN. Se muestra el porcentaje de incorporación de BrdU versus a las células sin estimular (\* ,  $P < 0,01$  versus A673/TR). Media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes por triplicado.

A continuación, estudiamos si la inhibición de la expresión de CCK, retrasaba también el crecimiento tumoral *in vivo*. Para esto inyectamos 5 millones de células A673/TR o A673/TR/shCCK en dos grupos de 5 ratones desnudos cada uno. A estos dos grupos se les administró doxiciclina en el agua de bebida (1 mg/ml) desde el mismo día en que se inyectaron las células tumorales. Al cabo de 23 días se observó que los tumores procedentes de ratones inyectados con células A673/TR/shCCK mostraron un retraso en su crecimiento del 36 % con respecto a los tumores de animales inyectados con las células control A673/TR ( $P < 0,02$  ANOVA, datos no mostrados). Como era de esperar, el nivel de expresión de CCK en los tumores originados en los ratones inyectados con células A673/TR/shCCK y tratados con doxiciclina, se redujo en más del 95 %, mientras que el nivel de expresión de EWS/FLI1 se mantuvo constante con respecto a los tumores originados a partir de las células A673/TR (datos no mostrados).

Posteriormente se hizo un segundo experimento en el que al grupo tratado se le dio a beber doxiciclina disuelta en el agua de bebida, desde 3 días antes de la inoculación de las



**Figura 20. Efecto del silenciamiento de CCK en el crecimiento tumoral *in vivo*.** En dos grupos de 10 ratones cada uno se inyectaron 5 millones de células A673/TR/shCCK. Al grupo tratado se le administró doxiciclina (dox) a 1 mg/ml en el agua de bebida, desde 3 días antes de inyectarle las células. Cada 2-3 días se midió el tamaño tumoral de cada ratón. Se muestra la media del volumen tumoral dentro de cada grupo (A), y la tasa de supervivencia (B) considerando un tamaño máximo del tumor de 1,5 cm<sup>3</sup>, a partir del cual los ratones eran sacrificados. (C) Nivel de expresión de CCK y EWS/FLI1 en los tumores originados por las células A673/TR/shCCK. Se extrajo el ARN de todos los tumores (grupo tratado y no tratado) tras alcanzar un tamaño de 1,5 cm<sup>3</sup>. Por RT-PCR cuantitativa se determinó el nivel de expresión de CCK y de EWS/FLI1 en cada tumor, normalizando frente al nivel de expresión del gen control TBP (*TATA binding protein*), y se multiplicó por 1.000. Se muestra la media ± Error estándar de expresión de cada gen dentro de cada grupo. (D) Inmunohistoquímica con Ki-67 (clon MIB-1) de tumores procedentes de ratones tratados o sin tratar con doxiciclina. La expresión de Ki-67 (un marcador de proliferación celular) fue significativamente menor en el grupo tratado con doxiciclina. Se muestra una tinción representativa de un tumor de cada grupo.

células, con el objetivo de conseguir los niveles efectivos de doxiciclina en sangre, necesarios para silenciar la expresión de CCK desde el mismo día de inyección de las células. Para esto se hicieron dos grupos de 10 ratones desnudos cada uno. Uno de estos grupos se trató con doxiciclina (1 mg/ml en el agua de bebida) y a los 3 días, se inyectaron en los dos grupos 5 millones de células A673/TR/shCCK. En los ratones tratados, se observó un retraso significativo de 5 días en el tiempo medio de aparición del tumor con respecto a los no tratados (11,2 y 16,3 días en los ratones no tratados y tratados, respectivamente). En consecuencia, a los 23 días se observó una inhibición del tamaño tumoral del 42 % ( $P < 0,001$  ANOVA), llegando a ser del 48 % a los 27 días (Figura 20A). Por tanto se consiguieron mayores niveles de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al experimento anterior. Por otro lado, considerando que los ratones eran sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1,5 cm<sup>3</sup>, se observó una mayor supervivencia en el grupo tratado aunque no llegó a ser estadísticamente significativa ( $P < 0,14$ , Figura 20B).

Como en el experimento anterior, la expresión de CCK en el grupo tratado se redujo en un 97,2 % con respecto a la del no tratado, mientras que la expresión de EWS/FLI1 no se vio afectada (Figura 20C). Además, analizamos por inmunohistoquímica la expresión del antígeno nuclear Ki-67, el cual es un marcador de proliferación celular. Como se muestra en la figura 20D, la tinción con Ki-67 se redujo un 35 % ( $P < 0,02$ ,  $n = 6-8$  tumores por grupo) en los tumores de los animales tratados con doxiciclina. En conjunto, estos datos indican que el silenciamiento de CCK reduce la proliferación celular y el crecimiento tumoral de las células de Ewing *in vivo*.

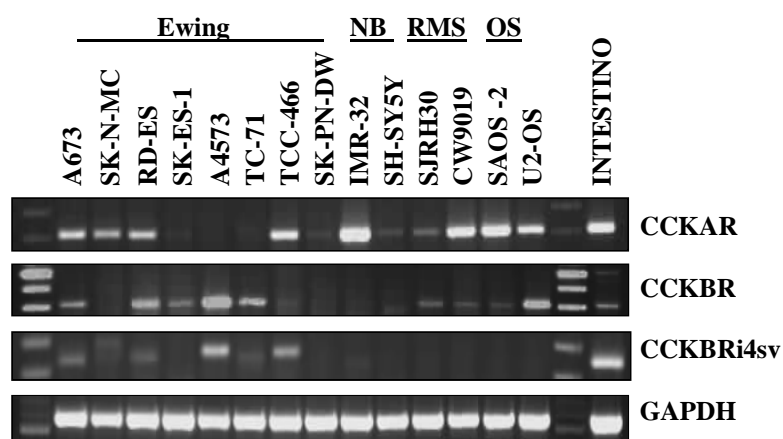
Según estos datos, la oncoproteína EWS/FLI1, presente en las líneas y tumores de Ewing, induce la expresión de CCK, la cual induce a su vez proliferación de las células de Ewing tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados sugieren que CCK podría estar actuando como un factor de crecimiento autocrino para las células de Ewing. Para estudiar más en detalle esta posibilidad, analizamos la presencia de receptores específicos de CCK en las células de Ewing.

#### 4.3.2 Expresión de los receptores de CCK en líneas y tumores de Ewing

CCK se sintetiza como una proteína inmadura de 95 aminoácidos que tras ser procesada por endoproteasas origina péptidos de distinto tamaño que conservan el extremo carboxilo terminal, responsable de su actividad biológica. Estos péptidos son convertidos en las formas activas por carboxipeptidasas y enzimas encargadas de la amidación, y se liberan al

medio donde pueden ejercer su función como agentes mitogénicos, al unirse a sus receptores específicos denominados CCKAR y CCKBR (Beinfeld 1997; Beinfeld *et al.* 2002; Rehfeld *et al.* 2003). Ya que los estudios realizados con ARN de interferencia sugieren que CCK es un factor de crecimiento autocrino para las células de Ewing, analizamos la presencia de los receptores de CCK en las células y tumores de Ewing.

Además de los dos receptores CCKAR y CCKBR, se han identificado dos variantes del receptor CCKBR como consecuencia de *splicing* alternativos en el exón 4: CCKBlong que contiene 5 aminoácidos adicionales (GGAGP del 4 intrón) y CCKBRi4sv, en el que el cuarto intrón es reconocido como un nuevo exón (Hellmich *et al.* 2000; Smith *et al.* 2002). Por tanto, estudiamos la presencia de estos receptores en líneas celulares y tumores de Ewing, y otras líneas celulares y tumores no relacionados como neuroblastomas, rabdomiosarcomas y osteosarcomas, mediante RT-PCR convencional (Figura 21), usando cebadores específicos para cada receptor (Song *et al.* 1993).



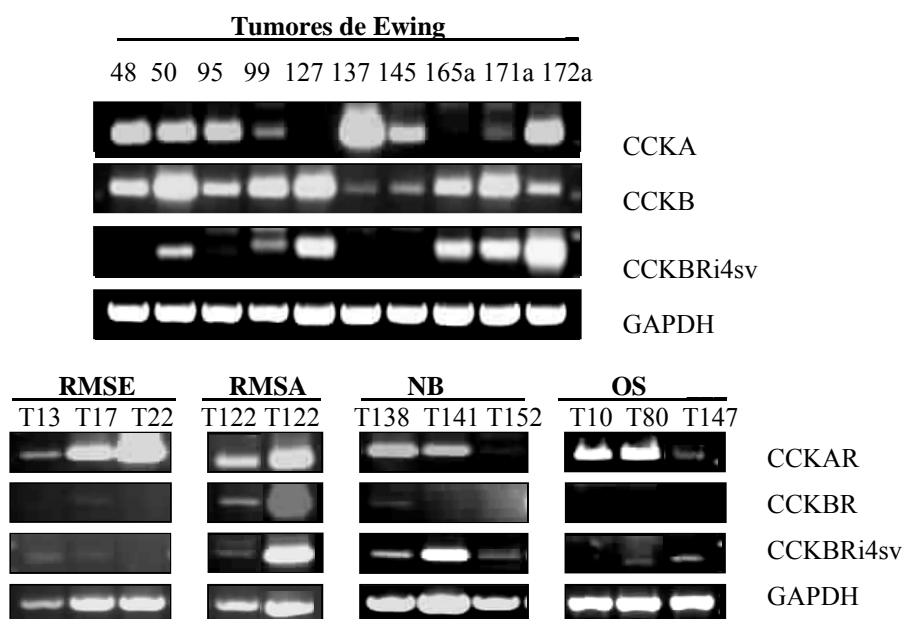
**Figura 21. Expresión de los receptores CCKAR, CCKBR y CCKBRi4sv en líneas celulares de Ewing y en líneas celulares derivadas de otros tumores infantiles.** Para cada una de las líneas celulares de Ewing, neuroblastoma (NB), rabdomiosarcoma (RMS) y osteosarcoma (OS) se extrajo el ARN, que se usó para amplificar cada uno de los receptores de CCK mediante RT-PCR convencional con cebadores específicos. Cada muestra fue también amplificada con cebadores específicos para GAPDH para confirmar la integridad del ARN. Como control positivo para cada receptor, se usó una muestra de ARN de intestino humano.

Todas las líneas de Ewing expresaron al menos uno de los receptores CCKAR o CCKBR. Solo dos de ellas (A673 y RD-ES) expresaron ambos receptores simultáneamente. En el resto de las líneas de neuroblastomas, rabdomiosarcomas y osteosarcomas, predominó



CCKAR, mientras que CCKBR solo fue detectado en las líneas de rhabdomiosarcomas y osteosarcomas (Figura 21). El ARNm para el receptor CCKBRi4sv pudo ser detectado en el 50 % de las líneas de Ewing pero no en el resto de las líneas celulares estudiadas. CCKBlong no se detectó en ninguna de las líneas celulares analizadas.

También analizamos la expresión de estos receptores en 21 tumores de Ewing, 3 rhabdomiosarcomas embrionarios, 2 rhabdomiosarcomas alveolares, 4 neuroblastomas y 4 osteosarcomas. Aproximadamente el 90 % de los tumores de Ewing expresaron al menos uno de los receptores CCKAR o CCKBR. CCKBRi4sv se detectó en el 57 % de los tumores de Ewing. En el resto de tumores infantiles estudiados, CCKAR y CCKBRi4sv se detectaron en un alto porcentaje de casos, mientras que CCKBR se detectó en un bajo porcentaje de casos excepto en los RMSA (Figura 22, tabla 13). La variante del receptor CCKBR, CCKBlong solo se detectó en un rhabdomiosarcoma alveolar y en un osteosarcoma (datos no mostrados).



**Figura 22. Expresión de los receptores CCKAR, CCKBR y CCKBRi4sv en tumores de Ewing y otros tumores pediátricos.** A partir de las piezas tumorales de pacientes con tumores de Ewing, neuroblastomas (NB), rhabdomiosarcomas alveolares (RMSA) o embrionarios (RMSE) y osteosarcomas (OS), se hizo una extracción de ARN que se usó para amplificar por RT-PCR convencional los receptores de CCK (CCKAR, CCKBR y CCKBRi4sv). Cada muestra fue también amplificada con cebadores específicos para GAPDH para confirmar la integridad del ARN.

La identidad de los productos de PCR se confirmó en casos seleccionados mediante secuenciación. La detección a nivel de proteína de estos receptores, confirmaría su expresión,

pero la ausencia de anticuerpos específicos comerciales ha obligado a diferentes grupos a su producción particular (de Weerth *et al.* 1998; Morisset *et al.* 2000; Schmitz *et al.* 2001a; Schmitz *et al.* 2001b; Blaker *et al.* 2002; Morisset *et al.* 2003; Schulz *et al.* 2005).

**Tabla 13. Expresión de CCKAR, CCKBR y CCKBRi4sv en tumores de Ewing y otros tumores pediátricos.**

	<b>Ewing</b>	<b>RMSE</b>	<b>RMSA</b>	<b>NB</b>	<b>OS</b>
<b>CCKAR</b>	17/21 <sup>(1)</sup> (-/+++) <sup>(2)</sup>	3/3 (+/+++)	2/2 (+/+++)	4/4 (+/+++)	4/4 (+/+++)
<b>CCKBR</b>	17/21 (-/++)	1/3 (-/+)	2/2 (+/+++)	1/4 (-/+)	1/4 (-/+)
<b>CCKBRi4sv</b>	12/21 (-/++)	2/3 (-/+)	2/2 (+/+++)	4/4 (+/+++)	2/4 (-/+)

- (1) Número de casos positivos con respecto al total analizados.  
 (2) Entre paréntesis se indica el rango de expresión cualitativa del receptor entre las distintas muestras analizadas. -: sin expresión; +, ++, +++ niveles crecientes de expresión.  
 RMSE: rhabdomyosarcoma embrionario, RMSA: rhabdomyosarcoma alveolar,  
 NB: neuroblastoma y OS: osteosarcoma.

Según estos resultados, un elevado porcentaje de líneas celulares y tumores de Ewing expresan los receptores de CCK. Por tanto, es comprensible que la elevada expresión de CCK pudiera actuar a través de estos receptores, regulando de forma autocrina la proliferación celular. Sin embargo, a estos receptores puede unirse otro péptido de características muy similares a CCK, denominado Gastrina. CCK y Gastrina comparten el mismo pentapéptido amida C-terminal (GWMDF), diferenciándose en la sulfatación del sexto (Gastrina) o séptimo (CCK) residuo de tirosina. CCKAR tiene 500 veces más afinidad por CCK sulfatado ( $K_d \approx 0,2$  nM) que por Gastrina, mientras que CCKBR tiene igual afinidad por ambos ( $K_d \approx 0,9$  nM para Gastrina). CCK sulfatado se une a CCKAR con 500 veces más afinidad/potencia que la forma no sulfatada, mientras que la afinidad de ambas formas por CCKBR es similar (Tabla 14). Esto es debido en parte a la gran homología en los sitios de unión del ligando al receptor (Fourmy *et al.* 2002). Según esto, Gastrina podría también interactuar con estos receptores en las células

**Tabla 14. Afinidad de los diferentes agonistas y antagonistas por los receptores de CCK**

	<b>CCKAR</b>	<b>CCKBR</b>
Afinidad agonistas	CCK8 >> Gastrina (500 veces) CCK8s >> CCK8 (500 veces)	CCK8 = Gastrina CCK8s = CCK8
Afinidad antagonistas	L364,718 (devazepide)	L365,260

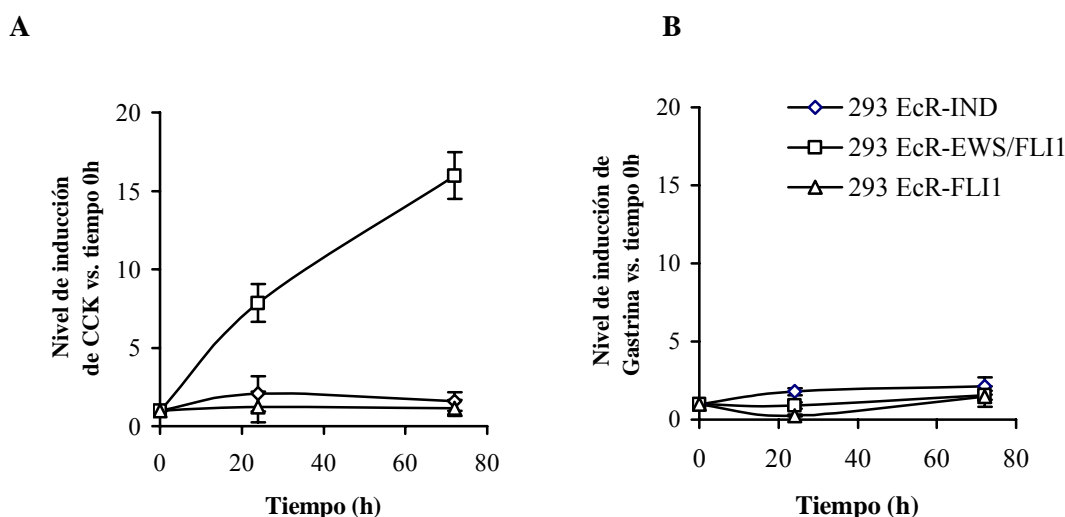
- CCK8: péptido activo de CCK formado por 8 aminoácidos.  
 CCK8s: formado por los mismos aminoácidos que CCK8 pero con el séptimo residuo de tirosina sulfatado.

de Ewing. Por estas razones estudiamos los niveles de expresión de Gastrina en células de Ewing y si estos se veían regulados por EWS/FLI1.

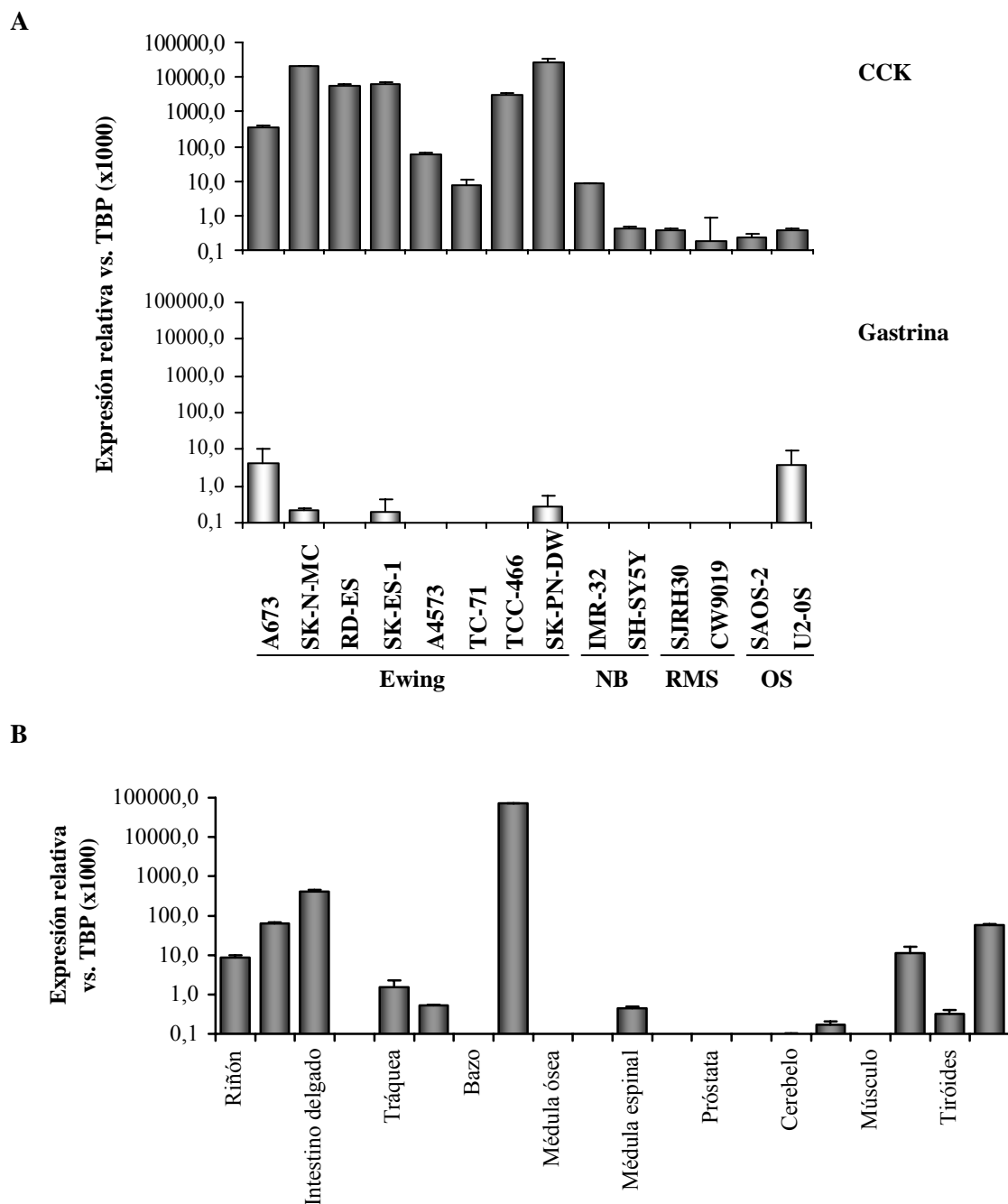
#### 4.3.3 *Expresión de Gastrina en líneas y tumores de Ewing*

En el sistema inducible de las células 293 EcR-EWS/FLI1, observamos que los niveles de mensajero de CCK incrementaron 3 veces a las 12 horas, y 20 a las 72 horas de la inducción de la expresión de EWS/FLI1, con respecto a las células control 293 EcR-IND. Esta inducción de CCK fue específica de EWS/FLI1, ya que FLI1 no fue capaz de producir este efecto (Figura 23A). Sin embargo, observamos que ni EWS/FLI1 ni FLI1 indujeron cambios en el nivel del mensajero de Gastrina (Figura 23B).

Los niveles de expresión de Gastrina fueron muy bajos o prácticamente indetectables, en las líneas celulares de Ewing y en el resto de líneas celulares derivadas de otros tumores pediátricos (neuroblastomas, rhabdomiosarcomas y osteosarcomas). Sin embargo, como ya demostramos anteriormente las líneas de Ewing mostraron altos niveles de expresión de CCK (Figura 24A).



**Figura 23. Inducción de CCK y Gastrina por EWS/FLI1 en las células 293 EcR.** Las células 293 EcR-IND, 293 EcR-EWS/FLI1 y 293 EcR-FLI1 se incubaron con 2,5  $\mu$ M de ponasterona A y se extrajo el ARN a las 0, 24 y 72 horas. A estos tiempos, se cuantificó la expresión de CCK (A) y Gastrina (B) mediante RT-PCR cuantitativa. Todas las muestras se normalizaron frente al nivel de expresión del gen control TBP (*TATA binding protein*) y se refirieron respecto al valor del tiempo 0, al que arbitrariamente se le asignó el valor de 1. Los valores son medias  $\pm$  SD de un experimento representativo de un total de dos experimentos independientes, en el que cada muestra se analizó por duplicado.

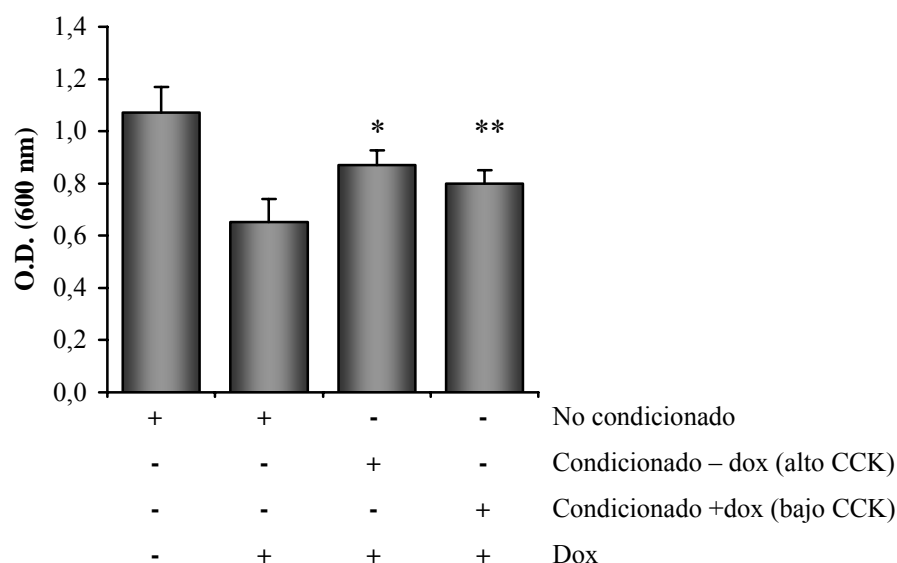


**Figura 24. (A) Expresión de CCK y Gastrina en líneas celulares de Ewing y de otros tumores pediátricos.** En diferentes líneas de Ewing, neuroblastomas (NB), rhabdomyosarcomas (RMS) y osteosarcomas (OS), se determinó el nivel de mensajero de CCK y Gastrina por RT-PCR cuantitativa. En todos los casos se indica la expresión relativa de CCK o Gastrina versus al gen control TBP (*TATA binding protein*). **(B) Expresión de Gastrina en tejidos humanos.** A partir de muestras de ARN de diferentes tejidos humanos, se determinó por RT-PCR cuantitativa la expresión relativa de Gastrina versus el gen control TBP. Media  $\pm$  SD de dos experimentos realizados por duplicado.

Resultados similares fueron obtenidos al estudiar las muestras tumorales, de modo que mientras que CCK presentó elevados niveles en los tumores de Ewing y en algún rhabdomyosarcoma alveolar y osteosarcoma (como se muestra en la figura 13), Gastrina prácticamente no se detectó en ninguno de los tumores analizados (datos no mostrados). Como era de esperar, los niveles de expresión de Gastrina fueron elevados en ciertos tejidos humanos tales como estómago e intestino delgado (Figura 24B). Por tanto las líneas y tumores de Ewing van a liberar elevadas cantidades de CCK pero no de Gastrina, de modo que no es probable que Gastrina desempeñe un papel fisiológico importante en las células de Ewing. Nuestros resultados indican que la inducción autocrina de la proliferación observada en los tumores de Ewing sería mediada por CCK.

#### 4.3.4 Efecto de la administración exógena de agonistas de los receptores de CCK en la proliferación de las células de Ewing

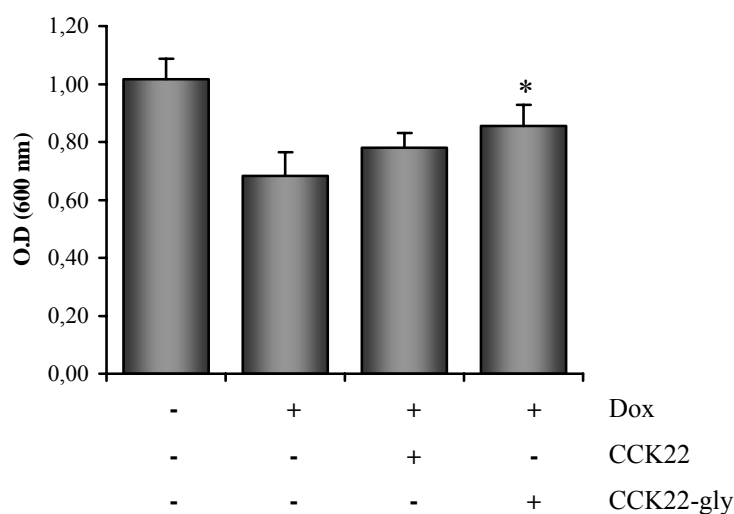
Para demostrar que CCK actúa como un factor de crecimiento autocrino/paracrino deberíamos poder revertir la inhibición en la proliferación observada en las líneas de Ewing tras la inhibición de CCK, con una fuente externa de CCK. Como fuente bioactiva de CCK, utilizamos medio condicionado de las células SK-PN-DW, debido a que tal y como hemos mostrado previamente (Tabla 12), estas células producen 10 veces más CCK que las células A673. En primer lugar recogimos el medio condicionado obtenido de las células SK-PN-DW/TR/shCCK incubadas en ausencia de doxiciclina y que como se muestra en la tabla 12 producen una elevada cantidad de CCK. La adición de este medio condicionado con alto contenido en CCK a otro cultivo de estas mismas células (SK-PN-DW/TR/shCCK), incubadas con doxiciclina, significativamente rescató ( $\approx 60\%$ ) la inhibición en el crecimiento producida por el silenciamiento de CCK (Figura 25). El medio condicionado obtenido de las células SK-PN-DW/TR/shCCK cultivadas en presencia de doxiciclina, y por tanto con un bajo contenido en CCK, también fue capaz de rescatar el efecto del silenciamiento de CCK, aunque en una menor medida ( $\approx 35\%$  de recuperación). El contenido en CCK fue 10 veces superior en el medio condicionado de las células SK-PN-DW/TR/shCCK cultivadas en ausencia de doxiciclina que en el de células cultivadas con doxiciclina (tabla 12), por lo que el grado de recuperación correlacionó con el contenido de CCK presente en el medio condicionado. Estos datos indican que CCK actúa como un factor de crecimiento autocrino/paracrino en los tumores de Ewing.



**Figura 25. El medio condicionado conteniendo altos niveles de CCK rescata a las células SK-PN-DW/TR/shCCK de la inhibición en el crecimiento producida por el silenciamiento de CCK.** Las células SK-PN-DW/TR/shCCK se cultivaron durante 6 días en ausencia o presencia de doxiciclina (dox) para inhibir la expresión de CCK. A las células incubadas con doxiciclina se les adicionó medio fresco (no condicionado), medio condicionado obtenido de otro cultivo de células SK-PN-DW/TR/shCCK cultivadas en ausencia de doxiciclina (alto contenido en CCK) o en presencia de doxiciclina (bajo contenido en CCK). El crecimiento celular fue cuantificado con cristal violeta. Media  $\pm$  SD de dos experimentos realizados por cuadruplicado. \*  $P < 0,005$  y \*\*  $P < 0,05$  vs. células incubadas en medio no condicionado + dox.

Se ha descrito que las células de Ewing no son capaces de procesar adecuadamente el péptido de CCK de modo que no se llegarían a liberar las formas activas de CCK (CCK8 y CCK8 sulfatado (CCK8s)), pero si los intermediarios no amidados (CCK-gly) (Schneider BS *et al.* 1989; Friedman *et al.* 1992b; Reubi *et al.* 2004). Estos intermediarios no amidados podrían ser funcionales ya que se ha descrito que la forma no amidada de Gastrina (Gastrina17-gly) es funcional en diferentes sistemas celulares (Blackmore *et al.* 1992; Todisco *et al.* 1995; Todisco *et al.* 1997; Kermorgant *et al.* 2001; Baba *et al.* 2004; Ahmed *et al.* 2005; He *et al.* 2005; Ottewell *et al.* 2005b; Beales *et al.* 2006; Ogunwobi *et al.* 2006). Por tanto, estudiamos el efecto de la administración exógena de los agonistas no amidados CCK8-gly y CCK22-gly y de las formas amidadas CCK8s, CCK8 y CCK22 sobre la capacidad para rescatar a las células de Ewing de la inhibición en la proliferación observada tras el silenciamiento de CCK. Para esto, se añadieron los agonistas cada 2 días a diferentes concentraciones desde 1nM a 1 pM, cuantificando a los 6 días el crecimiento celular con cristal violeta. En las células A673/TR/shCCK, se observó una ligera recuperación de un 15-30 % en la inhibición de la

proliferación con los diferentes agonistas a las concentraciones de 1-10 pM, que no fue estadísticamente significativa. En las células SK-PN-DW/TR/shCCK observamos una recuperación del 25 % con CCK22 y del 50 % con CCK22-gly a dosis de 1 pM, siendo este efecto estadísticamente significativo para CCK22-gly (Figura 26). Estos resultados indican que las formas no amidadas (como CCK22-gly), son biológicamente activas y pueden mediar en parte el efecto proliferativo de CCK en las células de Ewing.



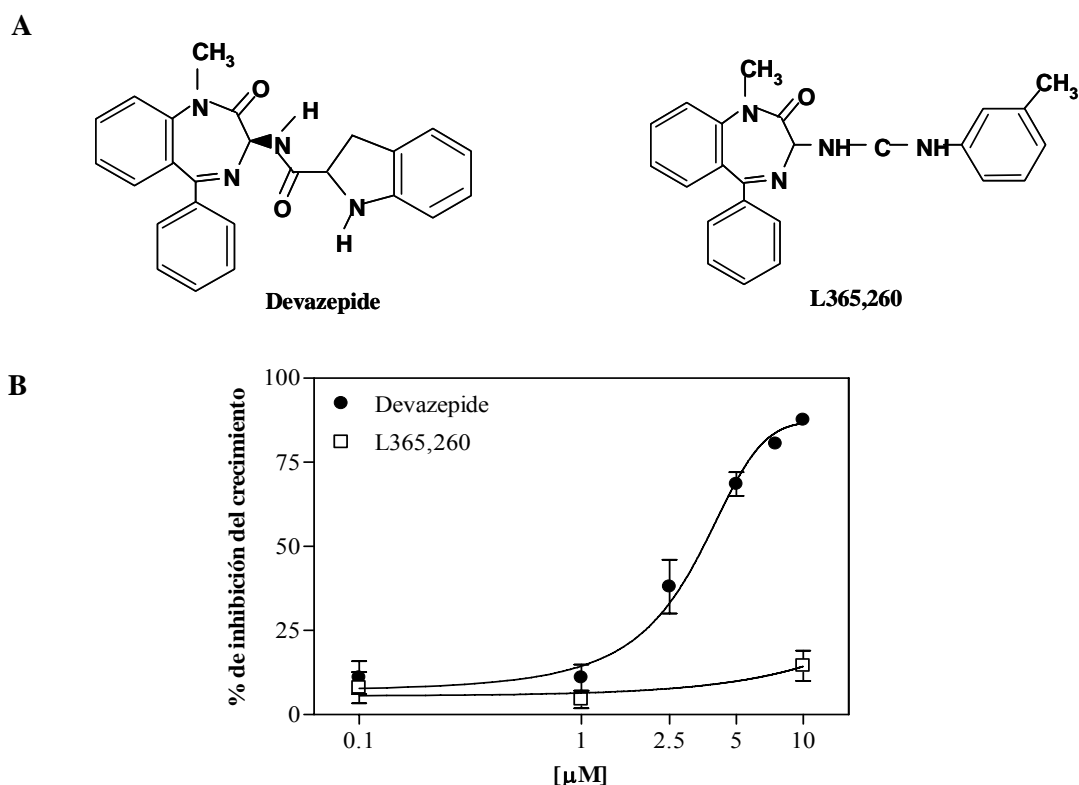
**Figura 26. Recuperación de la inhibición de la proliferación inducida por la expresión del shCCK en las células SK-PN-DW/TR/shCCK con diferentes agonistas de CCK.** Las células SK-PN-DW/TR/shCCK se incubaron en ausencia o presencia de doxiciclina a 2 µg/ml (dox) junto con los agonistas CCK22 o CCK22-gly, los cuales se adicionaron cada 2 días. A los 6 días se midió la proliferación celular mediante tinción con cristal violeta. Experimento representativo de un total de 6 experimentos realizados por cuadruplicado. \*  $P < 0,005$  vs. células tratadas solo con doxiciclina.

#### 4.3.5 Efecto de los antagonistas de los receptores de CCK en la proliferación celular de las líneas celulares de Ewing

Existen varios antagonistas de los receptores de CCK. Entre los más potentes se encuentran el devazepide ( $K_d \approx 0,08$  nM) y el L365,260 ( $K_d \approx 2,0$  nM), específicos para CCKAR y CCKBR respectivamente (Figura 27A), por lo que usamos estos antagonistas para determinar la implicación de estos receptores en la proliferación celular de los tumores de Ewing. Para esto, incubamos la línea celular de Ewing A673, la cual expresa ambos receptores, con diferentes concentraciones de antagonistas (rango 0,1-10 µM) durante 4 días en presencia de suero (10 %). En estas células, el devazepide usado a dosis de 10 µM,

produjo una inhibición en la proliferación del 90 % ( $IC_{50} = 3,13 \pm 0,52$ ) con respecto al tratamiento con el vehículo (DMSO, Figura 27B). Por el contrario los efectos del L365,260 sobre la proliferación de las células de Ewing A673 fueron despreciables (14 % de inhibición). Los antagonistas indujeron una inhibición ligeramente mayor, si las células se cultivaron en medio con menor porcentaje de suero (suero al 1 %) o en medio suplementado únicamente con ITS (Insulina-Transferrina-Selenio) (datos no mostrados).

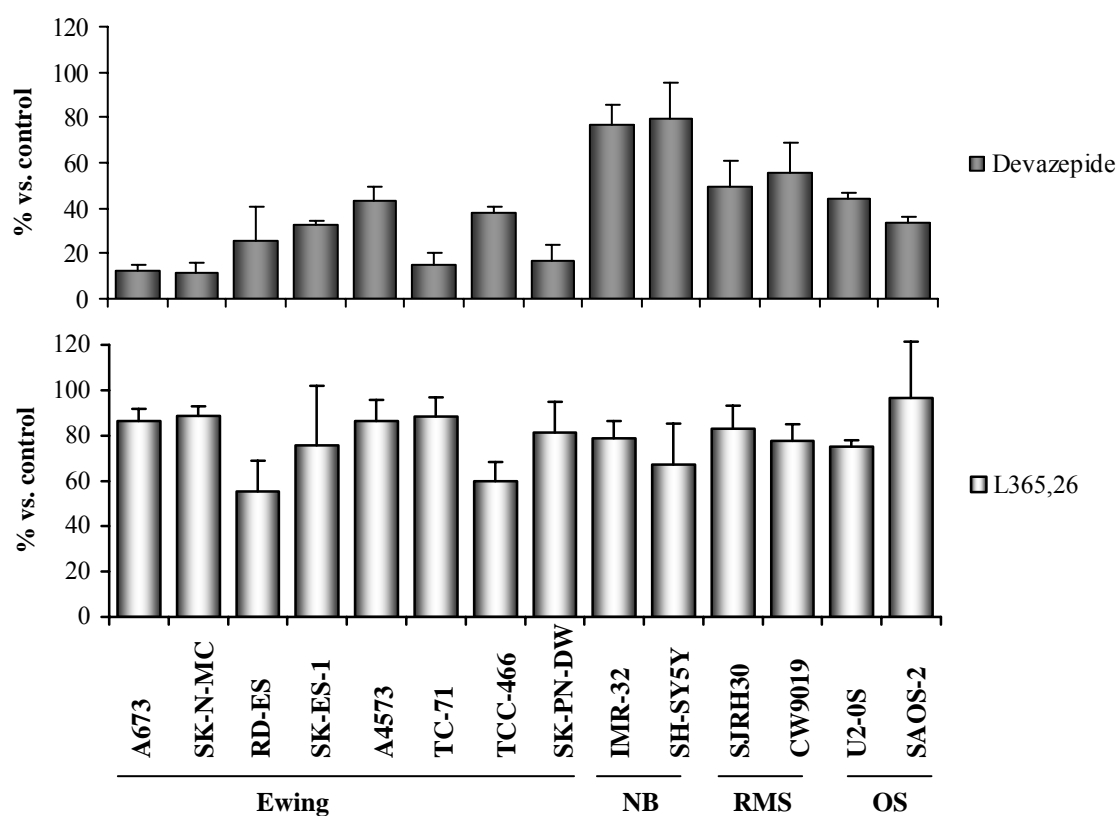
En base a estos resultados estudiamos el efecto de estos antagonistas sobre el crecimiento celular en el resto de líneas celulares de Ewing, neuroblastoma, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma. En estos experimentos las células se cultivaron en medio con suero y en ausencia o presencia de los antagonistas a la concentración de 10  $\mu$ M. Se observó que el devazepide produjo una inhibición significativa de la proliferación en las líneas de Ewing con valores comprendidos entre el 57 % (A4573) y 89 % (SK-N-MC). Para los osteosarcomas



**Figura 27. (A) Estructura molecular de los antagonistas de los receptores de CCK.** L364,718 o devazepide es un antagonista específico de CCKAR mientras que L365,260 es específico de CCKBR. Ambos antagonistas son derivados de las benzodiazepinas. **(B) Inhibición de la proliferación por los antagonistas de los receptores de CCK, devazepide y L365, 260.** En células A673 cultivadas en medio con suero al 10 % se hizo una curva de dosis (0,1, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10  $\mu$ M) de los antagonistas de CCK, devazepide y L365,260, estudiando su efecto sobre la proliferación tras 4 días de incubación. Para cada dosis se comparó la tasa de proliferación con respecto al tratamiento con vehículo (DMSO). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SD de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

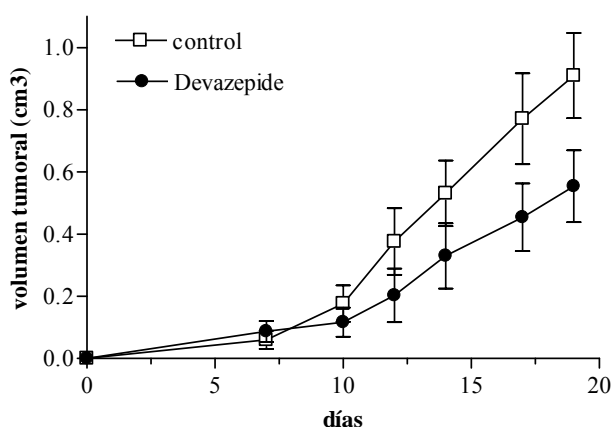


la inhibición fue entre el 56-66 %, y para los rhabdomiomas entre el 45-50 %. Sin embargo, en el caso de los neuroblastomas, esta inhibición fue significativamente menor (20-23 %). En todas las líneas celulares de Ewing, neuroblastomas, rhabdomiomas y osteosarcomas, el antagonista de los receptores CCKBR, L365,260, produjo una menor inhibición, que osciló entre el 10-30 %, excepto para dos líneas celulares de Ewing (RD-ES y TCC-466) en las que la inhibición fue superior (40-45 %). Estos datos indican que el devazepide produce una importante inhibición del crecimiento en las líneas celulares de Ewing, siendo menor en rhabdomiomas y osteosarcomas, y menor todavía en neuroblastomas. Sin embargo el efecto del L365,260 fue muy discreto en todas las líneas de Ewing excepto en las células RD-ES y TCC-466 (Figura 28A y 28B).



**Figura 28. Efecto de los antagonistas de los receptores de CCK devazepide y L365,260 sobre el crecimiento celular de las líneas de Ewing y de otros tumores pediátricos.** Las diferentes líneas celulares de Ewing, neuroblastomas (NB), rhabdomiomas (RMS) y osteosarcomas (OS), se cultivaron en medio suplementado con suero al 10 %, y se trataron con DMSO (control) o con los antagonistas devazepide o L365,260 a 10  $\mu$ M. A los 4 días se midió el crecimiento celular con cristal violeta. Se muestra el porcentaje de crecimiento de las células tratadas con respecto a las células control (DMSO). Los resultados corresponden a la media de tres experimentos  $\pm$  SD realizados por triplicado.

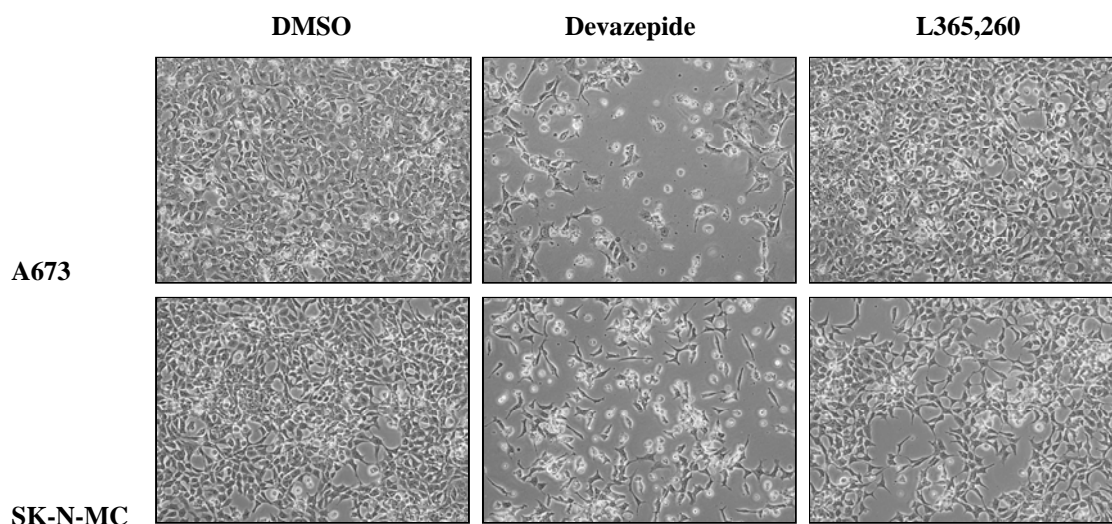
Posteriormente estudiamos si el devazepide tenía el mismo efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo*. Para ello, utilizamos el modelo de formación de tumores en ratones desnudos. Se hicieron dos grupos de 10 ratones desnudos cada uno y se les inyectaron 5 millones de células A673 en uno de los flancos. Desde este mismo día uno de los grupos se trató con una dosis diaria de devazepide (10 mg/kg de peso), y al otro grupo (grupo control) se le administró el mismo volumen de la solución vehículo con DMSO. A partir del día 10 se observó una inhibición en el crecimiento tumoral de los ratones tratados con devazepide con respecto a los controles, que continuó aumentando hasta llegar a ser de un 49 % a los 19 días (Figura 29). En un caso se observó que el tumor regresó completamente tras dos semanas de tratamiento.



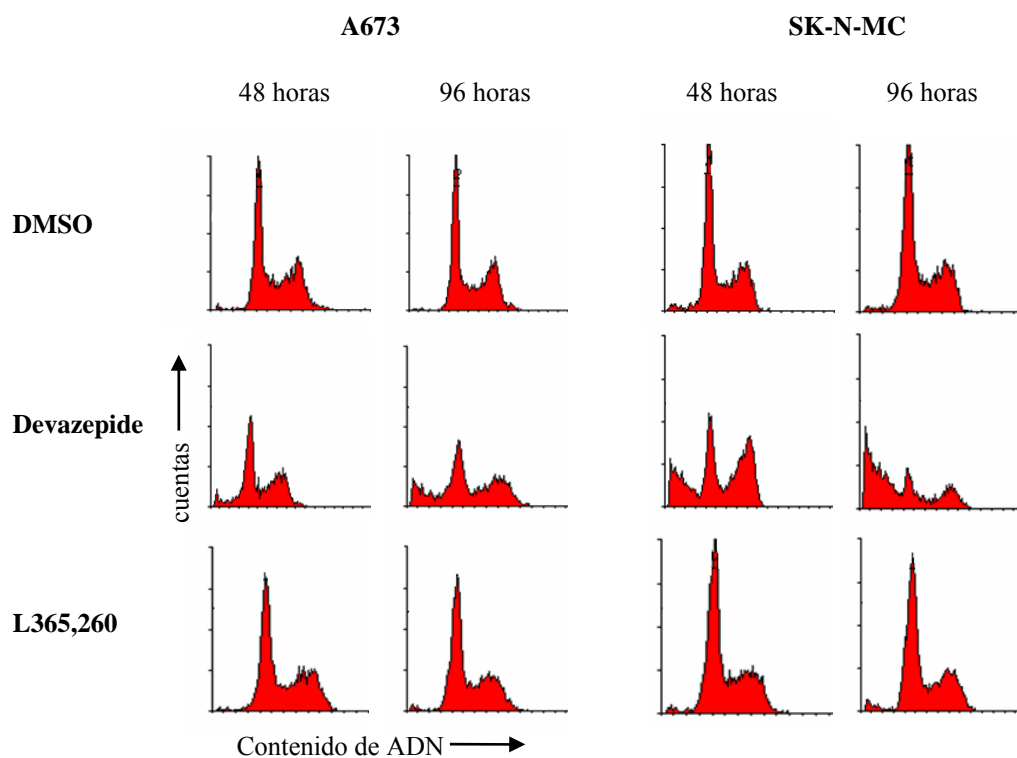
**Figura 29. Efecto del devazepide sobre el crecimiento tumoral *in vivo*.** Se inyectaron 5 millones de células A673 a dos grupos de 10 ratones desnudos cada uno. A uno de los grupos se le inyectó diariamente una dosis de devazepide a 10 mg/kg y al otro se le inyectó el mismo volumen del vehículo. Al cabo de los 17 días se observaron diferencias significativas en el tamaño del tumor entre los dos grupos ( $P < 0,0001$ , ANOVA).

A nivel morfológico, el tratamiento con devazepide durante 4 días indujo cambios visibles en las líneas de Ewing A673 y SK-N-MC en cultivo, las cuales pasaron a ser más redondeadas y dejaron de estar adheridas a la placa (Figura 30). Estas observaciones sugieren la inducción de procesos apoptóticos. Por el contrario, el L365,260 no produjo estos efectos, en consonancia con los resultados anteriores (Figura 30).

A continuación, hicimos estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo para determinar las causas de la inhibición del crecimiento inducida con el devazepide tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observó que las células A673 y SK-N-MC tratadas con devazepide, mostraron un gran incremento en el número de células en la región subG0 y una disminución en el número de células en fase G0/G1, con respecto a las células control (tratadas con DMSO) (Figura 31). Por

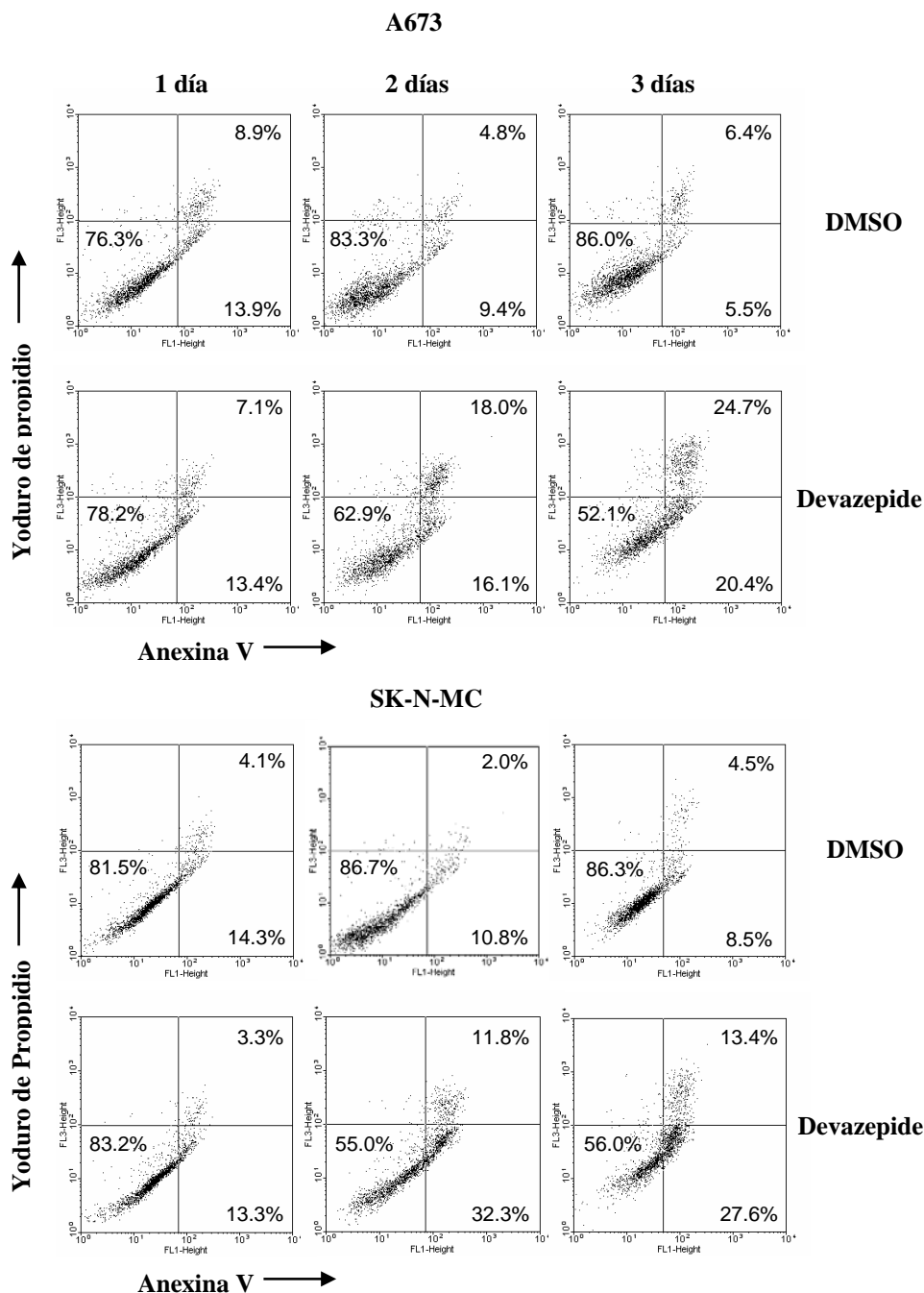


**Figura 30. Inducción de cambios morfológicos y muerte celular por el devazepide pero no por el L365,260 en las líneas de Ewing.** Las células A673 y SK-N-MC se cultivaron en medio suplementado con suero al 10 % y se trataron durante 4 días con DMSO, devazepide o L365,260 a 10  $\mu$ M. Las células se fotografiaron al microscopio (x100).



**Figura 31. Efecto del devazepide y L365,260 sobre el ciclo celular.** Las células A673 y SK-N-MC se cultivaron en medio con 10 % de suero, y se trataron con DMSO, devazepide o L365,260 a 10  $\mu$ M durante 1, 2 y 4 días. Posteriormente se fijaron, se permeabilizaron, se incubaron con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo.

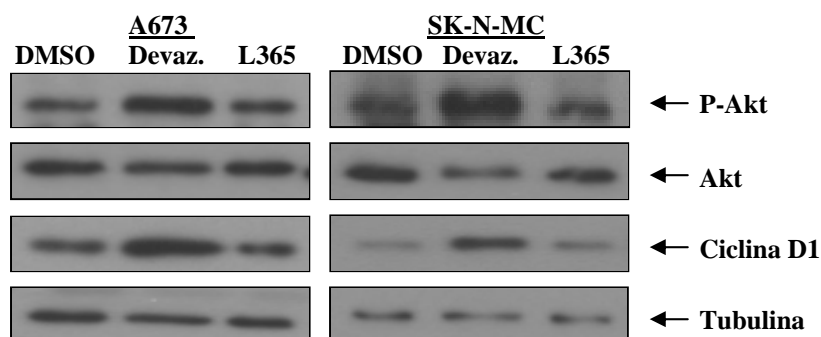
el contrario las células tratadas con L365,260 se comportaron de igual manera que las células control. Posteriormente, usamos un anticuerpo frente Anexina V, el cual detecta la pérdida de la asimetría de la membrana, como un marcador de apoptosis temprana. El número de células



**Figura 32. Efecto del devazepide sobre la inducción de apoptosis.** Las células A673 y SK-N-MC se cultivaron en medio con 10 % de suero, y se incubaron con DMSO o devazepide a 10  $\mu$ M durante 1, 2 y 3 días. Posteriormente, se incubaron con yoduro de propidio y un anticuerpo frente Anexina V y se analizaron mediante citometría de flujo.

apoptóticas (Anexina V positivas y yoduro de propidio negativas), aumentó de forma progresiva desde los primeros días de tratamiento con devazepide, tanto en las células A673 como en las SK-N-MC (Figura 32). Por tanto la inhibición en la tasa de crecimiento de las células de Ewing como consecuencia del tratamiento con devazepide, se debió a la inducción de apoptosis.

La ruta de señalización de Akt es un regulador principal en la proliferación celular y supervivencia, de modo que la hiperactivación de las kinasas Akt está asociada a diferentes tumores humanos, incluido los tumores de Ewing (Lawlor *et al.* 2002; Vivanco *et al.* 2002; Altomare *et al.* 2005). Para estudiar si el devazepide actúa sobre esta vía, incubamos durante 2 días las células A673 y SK-N-MC con DMSO, devazepide o L365,260 a 5  $\mu$ M en medio suplementado con ITS. En las dos líneas celulares, el devazepide incrementó entre 3-5 veces el nivel de fosforilación de Akt (ser473) con respecto a las células control (tratadas con DMSO) o a las tratadas con L365,260 (Figura 33). Estas diferencias fueron especialmente pronunciadas a los 4 días. Para determinar si la ruta Akt fue funcional en estas células, analizamos los niveles de expresión de ciclina D1, una diana de Akt activado (Muisse-Helmericks *et al.* 1998; Liang J. *et al.* 2003). Se detectó un incremento en la cantidad de ciclina D1 únicamente con el tratamiento con devazepide.



**Figura 33. El devazepide induce la fosforilación de Akt y un incremento en el nivel de ciclina D1.** Las líneas celulares de Ewing A673 y SK-N-MC se incubaron durante 2 días con DMSO, devazepide o L365,260 a 5  $\mu$ M en medio suplementado con ITS, y se extrajo la proteína total. Se muestra un *western blot* representativo de 3 experimentos independientes en el que se puede observar un incremento en la fosforilación de Akt (Ser473) y en la cantidad de ciclina D1. Los *blots* se hibridaron con anticuerpos frente a Akt y a tubulina como controles de carga y de transferencia.

Como conclusión, el tratamiento de las líneas de Ewing con devazepide, induce una inhibición del crecimiento celular *in vitro* e *in vivo*, consecuencia de un incremento en la apoptosis celular que podría ser debida a alteraciones en la vía de señalización de Akt.

## ***5. Discusión***

### **5.1 Identificación de genes regulados por EWS/FLI1 mediante técnicas de análisis genómico de alto rendimiento**

Como ya hemos comentado previamente, el factor de transcripción quimérico EWS/FLI1 desempeña un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing, a través de la regulación de genes implicados en oncogénesis (revisado en la Introducción). Ya que EWS/FLI1 está presente en el 85 % de los casos de tumores de Ewing, decidimos estudiar los genes regulados por este factor de transcripción quimérico, usando dos técnicas de análisis de la expresión génica de alto rendimiento: la técnica de Análisis Seriado de la Expresión Génica (o SAGE en sus siglas en inglés) y la técnica de micromatrices de oligonucleótidos. Estas dos técnicas son complementarias, de modo que mientras que con el SAGE es posible analizar todo el transcriptoma e incluso identificar nuevos genes o transcritos no descritos previamente, con las micromatrices es posible analizar de forma rápida y simultánea miles de genes conocidos.

En primer lugar aplicamos la técnica del SAGE a un modelo de expresión ectópica y constitutiva de EWS/FLI1 en células 293, aislando más de 19.000 *tags* que correspondieron a aproximadamente 8.600 genes diferentes. Sin embargo, a pesar de que los análisis estadísticos indicaron la existencia de 30 genes regulados diferencialmente por EWS/FLI1, ninguno de ellos pudo ser validado por una técnica alternativa como la RT-PCR cuantitativa. Para el uso de las micromatrices se crearon modelos inducibles de EWS/FLI1 en las células 293 EcR y HeLa TeT-On. Mediante este abordaje se identificaron varios genes inducidos por EWS/FLI1, que además se confirmaron alternativamente por RT-PCR cuantitativa. Entre estos genes destacaron CCK y NR0B1 que presentaron los mayores niveles de estimulación por EWS/FLI1, y además, fueron específicamente regulados por EWS/FLI1 pero no por FLI1. Estos resultados indican que mientras la técnica de matrices de oligonucleótidos permitió la identificación de nuevos genes diana de EWS/FLI1, la técnica SAGE no fue tan efectiva. Estas divergencias no pueden ser debidas a los diferentes sistemas celulares utilizados con cada una de las técnicas (esto es, un sistema de expresión ectópica frente a un sistema de expresión inducible), ya que los niveles de mensajero de CCK y NR0B1, medidos mediante RT-PCR cuantitativa, se encontraron significativamente incrementados en la muestra de ADNc de las células 293-EWS/FLI1 que se utilizó para la construcción de la librería SAGE. Más bien, la principal razón para estas divergencias debe residir en el bajo número de *tags* aislados mediante la técnica SAGE. De hecho, los *tags* asociados a CCK (GGCTGGATGG) y NR0B1 (AGGGAAGAAT) no aparecieron ni una sola vez en las correspondientes librerías, y solo dos de los genes (NTRK1 y NIPA2) que fueron identificados mediante matrices de

oligonucleótidos en las células 293 EcR y HeLa TeT-On, aparecieron 1 o 2 veces en la librería de las células control 293-pCI. Por tanto, la razón principal por la que no se ha identificado ningún gen diferencialmente expresado mediante la técnica SAGE es el bajo número de tags secuenciados. En teoría, el aislamiento de tags debe continuar hasta que el número de nuevos genes identificados con cada ronda de secuenciación haya disminuido significativamente, indicando que la mayoría de los genes han sido ya identificados al menos una vez. En nuestro caso, con los últimos 1000 tags secuenciados de cada librería, identificamos todavía más de 300 nuevos tags, correspondientes a otros tantos genes. De hecho, el número de tags que aislamos, es claramente inferior al de otros estudios publicados. Así, en un estudio para identificar genes regulados por el factor de transcripción c-myc, se aislaron entre 37.000 y 55.000 tags por librería consiguiendo validar por RT-PCR cuantitativa o matrices de oligonucleótidos un total de 56 genes inducidos por c-myc (Menssen *et al.* 2002). En otros estudios, llevados a cabo en diferentes tumores, líneas celulares o tejidos se llegaron a aislar del orden de 40.000-60.000 tags por librería (Lal *et al.* 1999; Velculescu 1999).

## **5.2 CCK es inducido por EWS/FLI1 en células de Ewing**

Actualmente se sigue sin saber cuales son las células de origen a partir de las cuales se desarrollan los tumores de Ewing. Por esta razón hemos usado tres estrategias diferentes y complementarias para identificar genes regulados por EWS/FLI1 en los tumores de Ewing: i) uso de modelos heterólogos de expresión ectópica de EWS/FLI1, ii) identificación de los genes diferencialmente expresados en líneas y tumores de Ewing con respecto a otras líneas celulares y tumores pediátricos de células pequeñas redondas y azules, tales como rhabdomyosarcomas, neuroblastomas y osteosarcomas, y iii) el uso de ARNs de interferencia frente a EWS/FLI1 en líneas celulares de Ewing.

En primer lugar creamos dos modelos de expresión ectópica de EWS/FLI1 en células humanas (293 EcR y HeLa TeT-On) acoplados a un sistema inducible, en los que detectamos niveles de expresión de EWS/FLI1 similares a los de las líneas celulares de Ewing. En las células 293 EcR, la expresión de EWS/FLI1 produjo una ligera inhibición en la proliferación que correlacionó con un ligero incremento en el número de células en fase G0/G1 y una disminución en el número de células en fase S (Lessnick *et al.* 2002). A pesar de esta inhibición en el crecimiento, EWS/FLI1 indujo un incremento en el número de colonias en ensayos de crecimiento independiente de anclaje, tal y como se había descrito para fibroblastos murinos



NIH3T3 transfectados con EWS/FLI1 (May *et al.* 1993b). Sin embargo, su expresión no supuso cambios morfológicos, tal y como se había descrito para las células NIH3T3, donde su morfología en huso cambiaba a la de células pequeñas y redondeadas (Teitell *et al.* 1999). Por tanto, nuestros modelos celulares fueron permisivos a la expresión de EWS/FLI1 y mostraron ciertos comportamientos similares a los descritos en fibroblastos primarios humanos y en células NIH3T3. Sin embargo, esta oncoproteína no indujo muerte celular, a diferencia de lo observado en otros modelos celulares (Deneen *et al.* 2001; Lessnick *et al.* 2002). Las diferencias con respecto a los efectos de EWS/FLI1 en los distintos sistemas celulares podrían ser consecuencia de las características intrínsecas de cada tipo celular. Usando la tecnología de micromatrices de ADN, hemos identificado varios genes inducidos por EWS/FLI1 pero no por FLI1 en los modelos inducibles. Entre estos destacan CCK y NR0B1 por presentar los mayores niveles de regulación. Sin embargo, no hemos detectado algunos de los genes regulados por EWS/FLI1 que se han descrito previamente (ver introducción). Estas diferencias pueden explicarse de nuevo por la utilización de diferentes modelos celulares, ya que se ha demostrado que la regulación de ciertos genes por EWS/FLI1 puede variar dependiendo del tipo celular en el que se exprese esta oncoproteína (Zwerner *et al.* 2003).

En segundo lugar, estudiamos el perfil de expresión en una serie de tumores de Ewing y lo comparamos con un grupo de neuroblastomas, rhabdomyosarcomas y osteosarcomas, usando para ello micromatrices de oligonucleótidos y RT-PCR cuantitativa. De este modo, determinamos que los genes CCK y NR0B1 son muy específicos de los tumores de Ewing, detectándose únicamente en algún rhabdomyosarcoma alveolar u osteosarcoma. Además, su expresión es muy elevada en líneas celulares y tumores de Ewing independientemente del tipo de translocación que presenten. Ya se había descrito que las líneas y tumores de Ewing mostraban altos niveles de mensajero de CCK en comparación con otros tumores pediátricos de células pequeñas redondeadas tales como neuroblastomas, sarcomas osteogénicos y la mayoría de rhabdomyosarcomas (Schneider BS *et al.* 1989; Friedman *et al.* 1992a; Schaer *et al.* 1999). Para NR0B1 también se ha publicado su especificidad con respecto a estos tumores pediátricos (Mendiola *et al.* 2006). Nosotros hemos mostrado que los elevados niveles de expresión de CCK, son similares a los de intestino delgado y cerebro fetal, los cuales presentan los mayores niveles de expresión de todos los tejidos normales que hemos testado. Se postulaba que el elevado nivel de expresión de CCK podía ser un marcador de las células de origen, derivadas de un progenitor de la cresta neural primitiva (Staege *et al.* 2004). Sin embargo, con los modelos inducibles hemos demostrado que la alta expresión de CCK es consecuencia de la expresión de EWS/FLI1, y por tanto, una característica adquirida ante la presencia de esta

oncoproteína. Este hecho se ha corroborado por otros autores que han mostrado que la expresión de EWS/FLI1 en una línea de rhabdomyosarcoma es capaz de inducir la expresión de CCK (Hu-Lieskovan *et al.* 2005b).

Por último, el uso de un siARN específico para EWS/FLI1 en las líneas celulares de Ewing A673 y SK-PN-DW, nos ha permitido demostrar que su silenciamiento reduce el nivel de expresión de CCK y de NR0B1 (Mendiola *et al.* 2006). Esta especificidad en la inducción de NR0B1 por parte de EWS/FLI1 también ha sido muy recientemente confirmada por otros autores (Kinsey *et al.* 2006).

Por tanto, los resultados con estos tres abordajes claramente indican que CCK y NR0B1 son genes regulados por EWS/FLI1, y altamente específicos de los tumores de Ewing. En esta Tesis nos hemos centrado en el estudio de CCK.

A pesar de que EWS/FLI1 activa la expresión de CCK, desconocemos como lo hace: si por unión directa al promotor de CCK, de forma indirecta tras modular la expresión de otro gen que regule la expresión de CCK o por estabilización del mensajero de CCK. En el promotor proximal al inicio de la transcripción de CCK, hay dos posibles sitios de unión a FLI1, y en consecuencia dos sitios potenciales de unión de EWS/FLI1. Sin embargo, tras la expresión de EWS/FLI1 no hemos detectado ningún tipo de activación en esta región del promotor con ensayos de luciferasa. Por tanto, esta región del promotor de CCK no parece estar implicada en su regulación por parte de EWS/FLI1. Siligan y colaboradores han identificado algunos genes inducidos directamente por EWS/FLI1, inmunoprecipitando los complejos de cromatina a los que se une esta oncoproteína. Estos autores describieron que los sitios de unión de EWS/FLI1 se localizaban en la región anterior al exón 1 (hasta 10 kb) en el 12 % de los genes, en el intrón/exón 1 en el 27 % y en el intrón/exón 2 en el 18 %. Según esto, puesto que en el intrón/exón 2 de CCK hay 3 sitios putativos de unión de FLI1, EWS/FLI1 se podría unir a estos, tal y como ocurrió con un elevado porcentaje de los genes identificados por estos autores. Sin embargo, entre los posibles genes diana de EWS/FLI1 identificados por Siligan y colaboradores, no se encontraba CCK ni la mayoría de los genes diana de EWS/FLI1 conocidos. Estos hechos no parecen apoyar la hipótesis de que EWS/FLI1 active directamente la expresión de CCK. EWS/FLI1 también podría activar la expresión de CCK de forma indirecta. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que la expresión de EWS/FLI1 en nuestros modelos inducibles, incrementa el nivel de mensajero de CCK de forma tardía sin que hayamos llegado a detectar un máximo de expresión al mayor de los tiempos analizados (72 horas). Otra posibilidad que también estaría en concordancia con estas observaciones sería que EWS/FLI1 actuara estabilizando el mensajero de CCK de modo que permitiera su acumulación

progresiva. En cualquier caso, parece ser que los exones 7,8 y 9 de FLI1 podrían tener relevancia en la inducción de la expresión de CCK, puesto que los tumores de Ewing con la variante EWS/FLI1 7/10, la cual carece de dichos exones, tienen niveles 100-1000 veces inferiores a los detectados en los tumores que presentan el resto de variantes (EWS/FLI1 7/5 y 7/6). El conocimiento de la vía a través de la cual EWS/FLI1 induce la expresión de CCK, podría tener gran importancia a la hora de buscar estrategias para bloquear su expresión y en consecuencia su actividad en los tumores de Ewing

### **5.3 CCK regula de forma autocrina la proliferación de las células de Ewing**

CCK es un péptido neuroendocrino producido por las células endocrinas I de la mucosa del intestino delgado, y las neuronas del sistema nervioso central (especialmente en córtex, hipocampo, tálamo y caudado-putamen) y periférico. Dependiendo del tejido donde se libera desempeña una determinada función, de modo que en intestino delgado pasa a la circulación para regular la secreción de enzimas pancreáticas, la contracción de la vesícula biliar, la motilidad intestinal y la secreción de ácidos gástricos, y en el sistema nervioso actúa como un potente neurotransmisor y modulador, interviniendo en funciones de memoria y aprendizaje, analgesia, ansiedad, conducta alimentaria y neuroprotección. Además, CCK se expresa en tumores como insulinomas, carcinomas de células c tiroideas, tumores intestinales y carcinomas gástricos, donde activa la proliferación de forma autocrina (Beinfeld 2003).

Para estudiar si CCK regula la proliferación de los tumores de Ewing recurrimos a la técnica del ARN de interferencia. El silenciamiento de CCK en las líneas celulares de Ewing A673 y SK-PN-DW, las cuales tienen niveles de expresión muy elevados de CCK, redujo en gran medida su expresión (90 %). Esto se tradujo en la reducción en un orden de magnitud de la cantidad de CCK sulfatado secretada al medio por estas líneas celulares. Como consecuencia, observamos un retraso importante en la proliferación o crecimiento tumoral (40-50 %), tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la adición de medio condicionado con un alto contenido en CCK revirtió casi en su totalidad la inhibición de la proliferación producida por el silenciamiento de CCK. En conjunto, estos datos indican que CCK es un importante factor de crecimiento autocrino/paracrino en los tumores de Ewing.

CCK se sintetiza como una proteína inmadura de 95 aminoácidos (proCCK) que tras ser procesada por endoproteasas origina péptidos de distinto tamaño que conservan el extremo carboxilo terminal, responsable de su actividad biológica. Estos péptidos son convertidos a las

formas activas por carboxipeptidasas y enzimas encargadas de la amidación. Posteriormente se liberan al medio donde pueden ejercer su función como agentes mitogénicos, al unirse a sus receptores específicos (CCKAR y CCKBR). En cerebro se sintetiza fundamentalmente CCK8, el cual tiene una vida media más corta, mientras que en el intestino y en plasma se liberan intermediarios largos de CCK como CCK22 o CCK33 con una mayor vida media (Beinfeld 1997; Rehfeld 1998b, 1998a; Wang *et al.* 1998; Rehfeld *et al.* 2001; Beinfeld 2003; Rehfeld *et al.* 2003; Beinfeld *et al.* 2005; Reynolds *et al.* 2006). Se ha descrito que la mayoría de las células de Ewing son capaces de secretar niveles elevados de los diferentes intermediarios no amidados de CCK (200-1800 pg/ml), mientras que las formas totalmente procesadas de CCK con la fenilalanina amidada en el extremo carboxilo terminal son únicamente secretadas a altos niveles por las células SK-PN-DW (800 pg/ml) y a bajos niveles por las células A673 (40-150 pg/ml) (Schneider BS *et al.* 1989; Friedman *et al.* 1992b). En pacientes con tumores de Ewing se han detectado elevados niveles de proCCK en plasma, de modo que se ha propuesto que la cuantificación de estos niveles podría ser útil en el diagnóstico y la monitorización del tratamiento, como predictor de recurrencia (Reubi *et al.* 2004). En otros tumores como en cáncer de páncreas, de tiroides y en gliomas, se ha descrito que expresan altos niveles de mensajero de CCK, pero son también incapaces de procesar proCCK, posiblemente debido a la falta de alguna o todas las enzimas encargadas de esta función (Paloheimo LI 1994; Paloheimo *et al.* 1995; Beinfeld 2003). Nosotros hemos observado que la adición de CCK8 tanto en su forma amidada (sulfatada y no sulfatada), como en la no amidada (CCK8-gly) rescata parcialmente la inhibición de la proliferación inducida por el silenciamiento de CCK en las líneas celulares de Ewing A673, pero no en las células SK-PN-DW. Sin embargo, las formas más largas de CCK como CCK22, especialmente en su forma no amidada (CCK22-gly), inducen una mayor recuperación de la proliferación en las líneas celulares A673 y SK-PN-DW, llegando a ser del 50 % en algunas condiciones (0,1-10 pM). Según esto, los intermediarios no amidados de CCK, que son liberados por la mayoría de las líneas de Ewing, son funcionales y activan la proliferación celular. Un fenómeno similar se ha descrito para otros péptidos relacionados con CCK como Gastrina, observándose que en cáncer de páncreas, gástrico y de colon se secreta la forma no amidada de Gastrina (Gastrina17-gly), y que esta induce proliferación celular (Seva *et al.* 1994). También, se ha descrito que formas más largas de Gastrina (como progastrina o Gastrina-17 sin procesar en el extremo C-terminal y que por tanto tiene 26 aminoácidos en vez de 17) son más activas que las formas más cortas (Ottewell *et al.* 2005a). Según esto, y debido a la elevada homología entre los péptidos CCK y Gastrina, es posible que proCCK o intermediarios no procesados de CCK (con el extremo C-terminal

intacto o sin amidar) de mayor tamaño que CCK22, pueden incluso ser más activos a la hora de inducir proliferación celular.

Todos estos resultados indican que CCK, además de ser un buen marcador molecular de los tumores de Ewing, podría ser una buena diana terapéutica, de modo que si consiguiéramos bloquear su expresión o sus vías de señalización, podríamos contribuir a mejorar en un futuro la tasa de progresión de la enfermedad.

Las formas amidadas de CCK, las cuales son liberadas a elevados niveles únicamente por las líneas celulares de Ewing A673 y SK-PN-DW (Friedman *et al.* 1992b), podrían interaccionar con los receptores clásicos CCKAR o CCKBR, ya que estas células expresan al menos uno de estos receptores. Sin embargo, esta vía de acción no parece ser relevante puesto que la adición exógena de CCK8s o CCK8, solo es capaz de recuperar ligeramente el retraso en la proliferación inducido por el silenciamiento de CCK en las células A673, pero no en las células SK-PN-DW. Para las formas no amidadas de CCK, liberadas por la gran mayoría de líneas celulares de Ewing, y sobre las que parece recaer en mayor medida la inducción de la proliferación celular tal y como hemos observado con CCK22-gly, se desconoce los receptores a través de los que ejercen su función. Algunos autores han descrito que fragmentos cortos de CCK y Gastrina con el extremo C-terminal sin procesar se pueden unir al receptor CCKBR (Lefranc *et al.* 2004), y que Gastrina17-gly se puede unir a una variante del receptor CCKBR denominada CCKBRi4sv (*intron 4-containing splice variant*). CCKBRi4sv tiene 69 aminoácidos más en el tercer lazo citoplasmático como consecuencia de la incorporación del cuarto intrón de CCKBR, y tiene un peso molecular de 49 KDa (Ding *et al.* 2002), mientras que CCKBR presenta un único sitio de unión para Gastrina17 (IC<sub>50</sub> de 0'63 nM). CCKBRi4sv presenta dos sitios de unión, uno de alta afinidad (IC<sub>50</sub> de 0'12 nM) y otro de baja (IC<sub>50</sub> de 315 nM), siendo este último al que parece unirse Gastrina17-gly, (Hellmich *et al.* 2000; Olszewska-Pazdrak *et al.* 2004; Smith *et al.* 2004; Chao *et al.* 2005). Además, en células de cáncer pancreático que también expresan el receptor CCKBRi4sv se ha conseguido inhibir en un 65 % su crecimiento con un anticuerpo frente a este receptor (Smith *et al.* 2002). Puesto que en el 100 % de las líneas de Ewing y en el 90 % de los tumores de Ewing se detecta al menos uno de los receptores CCKAR y CCKBR, y en el 50 % de las líneas y tumores de Ewing se detecta el receptor CCKBRi4sv por RT-PCR cuantitativa, CCK-gly podría interaccionar con alguno de estos receptores de igual modo que lo hace Gastrina-gly debido a la homología entre estos dos péptidos. Sin embargo, el uso de los antagonistas de CCKAR y CCKBR a dosis en las que efectivamente bloquean estos receptores (rango nM), no produjo ningún tipo de inhibición en la proliferación, por lo que es poco probable que estos receptores estén implicados.

Por otro lado, se ha propuesto la existencia de otros receptores a los que se podrían unir las formas no amidadas de CCK. Se ha identificado un nuevo receptor (CCKC) de 78 kDa en las líneas celulares de carcinoma gástrico, perteneciente a la familia de enzimas relacionadas con la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (universalmente expresado en mitocondria y peroxisomas). Este receptor no está relacionado con los receptores CCKAR y CCKBR, y une Gastrina amidada y Gastrina-gly con igual afinidad (Baldwin *et al.* 1993; Baldwin *et al.* 1994; Biagini *et al.* 1997; Lefranc *et al.* 2004). También se han descrito otras proteínas, una de ellas de 70 kDa (Yang *et al.* 2001) y otra de 45 kDa (Singh *et al.* 2003) a las que se puede unir Gastrina-gly. Por otro lado, se ha indicado que los aminoácidos del extremo C-terminal de Gastrina-gly, serían importantes para su unión a un receptor de baja afinidad que podría ser el receptor de 78 kDa, mientras que los del extremo N-terminal podrían usarse para su unión a otro receptor de alta afinidad (Ahmed *et al.* 2005). Debido a la gran homología entre los péptidos CCK y Gastrina, CCK-gly podría actuar igualmente a través de estos u otros receptores no identificados.

Los receptores clásicos (CCKAR y CCKBR) activan a diferentes proteínas G heterotriméricas. Algunas de estas proteínas G (como  $G_q$ ,  $G_{11}$ , y  $G_s$ ) inducen en último lugar el secuestro del  $Ca^{2+}$  intracelular, y la producción de diacilglicerol o AMPc. Estas vías de señalización están implicadas fundamentalmente en la secreción de enzimas digestivas (Wu *et al.* 1996a, 1996b; Wu *et al.* 1997; Wank 1998; Dawson *et al.* 2002; Piiper *et al.* 2003; Archer-Lahlou *et al.* 2005a; Archer-Lahlou *et al.* 2005b). Estos receptores activan también otras proteínas heterotriméricas G como  $G_{12/13}$ , o proteínas G pequeñas como Ras, Rac y Rho, implicadas en proliferación celular, expresión génica, control traslacional de la síntesis de proteínas, organización del citoesqueleto y metabolismo energético. De este modo, a través de la proteína G Ras se puede activar en último lugar a la MAPK ERK1/2, la cual activaría diferentes factores de transcripción como c-myc, el cual es un oncogén sobreexpresado en las células de Ewing (Dauphinot *et al.* 2001). A través de la proteína G Rac, PAK y Cdc42 se pueden activar las MAPKs JNKs (Jun kinasas) que fosforilan el dominio de transactivación amino terminal del factor de transcripción c-Jun, pudiendo dimerizar con fos y controlar la expresión de ciertos genes. Por último a través de la proteína G Cdc42 se activa la p38 MAPK. Por otro lado estos receptores pueden actuar sobre la vía PI3K-Akt-mTOR que desempeña un papel destacado en mitogénesis y en la inducción de efectos anti-apoptóticos. La activación de mTOR está relacionada con el control traslacional de la síntesis de proteínas ribosomales a través de la proteína p70 S6K y con la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E-BP) favoreciendo la traslación de los ARNm. Por último, se ha demostrado que CCK

activa tirosinas kinasas como Src, p125<sup>FAK</sup> y Pyk2, las cuales intervienen en la regulación de la actina del citoesqueleto, y también activa el factor de transcripción NF-κβ como consecuencia del aumento del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y de la activación de la proteína kinasa C (Williams *et al.* 2002).

Gastrina-gly activa algunas de estas vías de señalización a pesar de desconocerse los receptores implicados. Así Gastrina-gly activa a Rho y su efector ROCK en células epiteliales gástricas de ratón (He *et al.* 2005), fosforila a ERK y p38 MAPK (Ogunwobi *et al.* 2006) y activa las vías JNK y PI3-kinasa/Akt (a través de JAK2) en células de cáncer de colon (Todisco *et al.* 1995). De este modo se consigue estimular la proliferación e inhibir la apoptosis celular. También se ha descrito que Gastrina-gly estimula la fosforilación de tirosín kinasas de focos de adhesión en células epiteliales gástricas de ratón (He *et al.* 2005), induce la translocación nuclear de NF-κB activo (Ogunwobi *et al.* 2006) y la producción de metaloproteinasas como MMP-2 y MMP-9, las cuales favorecen su capacidad invasora en células de cáncer de colon (Kermorgant *et al.* 2001; Baba *et al.* 2004). En consecuencia las formas no amidadas de Gastrina activan vías que favorecen la evasión de la apoptosis, la proliferación celular y la capacidad invasora de estas células (Beales *et al.* 2006).

Algunas de las vías de señalización descritas para las formas no amidadas de Gastrina son comunes a las que se activarían con las formas amidadas de Gastrina o CCK. Según esto y como consecuencia de la gran homología entre CCK y Gastrina, podría ocurrir que tanto las formas no amidadas de CCK como las amidadas tuvieran vías de señalización comunes a pesar de activar a receptores diferentes. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que en células SK-PN-DW en las que silenciamos la expresión de CCK observamos que el nivel de fosforilación de ERK1 y ERK2 se redujo en 2-3 veces (datos no mostrados). Esto indicaría que CCK podría estar activando de forma constitutiva la fosforilación de ERK1 y ERK2 en los tumores de Ewing. Este efecto ya se había descrito en células NIH3T3 transfectadas con EWS/FLI1 indicándose que ocurría a través de la vía MEK1 (Ras/Raf/MEK), y que era mayor en líneas de Ewing con la translocación tipo II que con la I (Silvany *et al.* 2000). Por tanto, la fosforilación de ERK1 y ERK2 en los tumores de Ewing podría ser consecuencia de la inducción de CCK por parte de EWS/FLI1. Sin embargo, el uso de anticuerpos frente a IGFR1 inhibe la activación de ERK1 y ERK2, de modo que IGF-1 también podría activar esta vía de forma autocrina (Benini *et al.* 2004). Además este anticuerpo inhibe la activación de Akt la cual está activada de forma constitutiva (vía PI3-K) en los Sarcomas de Ewing (Lawlor *et al.* 2002; Vivanco *et al.* 2002; Altomare *et al.* 2005). Por tanto, es muy probable que CCK actúe de

forma conjunta con otros factores de crecimiento relevantes en la patogénesis de los tumores de Ewing.

En estudios preliminares realizados con micromatrices en células A673, tras el silenciamiento de CCK, hemos detectado un gran número de genes regulados, entre los que destacan proteínas acopladas a receptores, proteínas G, diferentes kinasas, ciclinas, factores de transcripción, metaloproteinasas, moléculas de adhesión y proteínas encargadas de las síntesis de ARNm. La gran mayoría de estos genes están inhibidos como consecuencia del silenciamiento de CCK, y por tanto de la reducción en la cantidad de formas no amidadas de CCK liberadas al medio. Estudios adicionales determinarán la conexión entre todos estos genes y las vías de señalización que potencialmente puedan verse reguladas por CCK.

Como conclusión, podemos decir que CCK induce proliferación celular de forma autocrina/paracrina en los tumores de Ewing aunque desconocemos los receptores y vías de señalización implicados. CCK es pues uno más de los factores de crecimiento, como IGF-I y PDGF, implicados en la regulación de la proliferación de los tumores de Ewing (Yee *et al.* 1990; Scotlandi *et al.* 1996; Uren *et al.* 2003).

#### **5.4 El devazepide, un antagonista de los receptores CCKAR inhibe la proliferación de las células de Ewing tanto *in vivo* como *in vitro***

Una vez demostrada la implicación de CCK como factor de crecimiento autocrino/paracrino en los tumores de Ewing, estudiamos si este efecto es ejercido a través de los receptores clásicos, usando para ello los antagonistas no peptídicos devazepide y L365,260, específicos de CCKAR y CCKBR respectivamente. El devazepide indujo una gran inhibición en la proliferación de las líneas celulares de Ewing, ligeramente mayor que en las líneas celulares de osteosarcomas y rabdomiosarcomas, y mucho mayor que en las líneas celulares de neuroblastomas, mientras que el L365,260 prácticamente no afectó la tasa de proliferación. Estos niveles de inhibición se consiguieron únicamente con dosis de devazepide en el orden  $\mu\text{M}$ , el cual es cuatro órdenes de magnitud mayor que la  $K_d$  del devazepide descrita para CCKAR (0,1 nM). Esto indicaría que el efecto del devazepide no sería una consecuencia del bloqueo del receptor CCKAR. Sin embargo, se ha descrito que el devazepide se puede unir al receptor CCKBR en el rango  $\mu\text{M}$  ( $K_d \approx 0,2 \mu\text{M}$ ) (Chang *et al.* 1986), pero el hecho de que este receptor no se detecta en todas las líneas celulares de Ewing, sugiere de nuevo que los efectos del devazepide no son mediados a través de este receptor en las células de Ewing. Otra posible



explicación sería el hecho de que CCKAR y CCKBR pueden homo o heterodimerizar, de modo que el devazepide tiene 100 veces menos afinidad por el heterodímero que por CCKAR y L365,260 tiene 5 veces menos afinidad por el heterodímero que por CCKBR (Cheng *et al.* 2003). En cualquier caso, es poco probable que el devazepide tenga un mero efecto tóxico sobre estas células por las siguientes razones: i) la misma dosis de L365,260, cuya estructura es muy similar a la del devazepide, prácticamente no inhibe la proliferación, ii) la inhibición de la proliferación es significativamente mayor en células de Ewing que en las líneas de neuroblastoma lo que indica cierta especificidad celular, iii) y por último, la eliminación del tratamiento con devazepide en las líneas de Ewing, permite que las células se recuperen y proliferen más rápido que las que continúan con el tratamiento (datos no mostrados).

Por otro lado, el hecho de que la adición de CCK o Gastrina en diferentes líneas tumorales no revierte el efecto de la inhibición en la proliferación originada por el devazepide (Thumwood *et al.* 1991; Gonzalez-Puga *et al.* 2005), junto con la observación de que la dosis de devazepide usada para conseguir inhibición de la proliferación, es mayor que la dosis necesaria para competir la unión de Gastrina-17 en estudios de células tumorales pancreáticas (Blackmore *et al.* 1992), parece indicar que el devazepide debe actuar sobre otra posible diana. De este modo, se ha descrito que el devazepide y el L365,260 pueden atravesar la membrana plasmática e inhibir selectivamente la actividad enzimática de la p38 MAP quinasa aunque no impide su fosforilación. Según simulaciones moleculares, esta interacción podría localizarse en el dominio de unión de ATP y sería consecuencia de cierta analogía estructural del receptor de CCK con el sitio de unión de ATP de p38 MAP quinasa. Sin embargo, otros miembros de la familia de MAPK como ERK1/2 y *stress-activated protein kinase*/JNK no se verían afectados por estos dos antagonistas (Morel *et al.* 2005). La vía MAPK está implicada en crecimiento, diferenciación y respuesta a stress, por lo que la inhibición en la proliferación que detectamos podría ser consecuencia del bloqueo de esta vía. A pesar de que ambos antagonistas pueden bloquear esta vía, observamos casi exclusivamente inhibición en la proliferación con el devazepide.

Hemos observado que la menor tasa de proliferación detectada con el devazepide es consecuencia de un incremento en el número de células apoptóticas. Así, la vía de PI3K/Akt/mTOR, implicada en procesos de proliferación y supervivencia (Vivanco *et al.* 2002), está alterada de modo que el devazepide induce un incremento en los niveles de fosforilación de Akt. Akt es un factor de supervivencia que ejerce múltiples actividades antiapoptóticas, previniendo el aumento de citocromo c en la mitocondria, induciendo la fosforilación y consecuente inactivación de los factores proapoptóticos BAD y procaspasa 9, o

la inactivación de los factores de transcripción FOXO que median la expresión de genes críticos para la apoptosis tales como Fas (Altomare *et al.* 2005). Por otro lado, Akt también media en la progresión del ciclo celular, por estimulación de la traslación e inhibición de la degradación de ciclinas tipo D (Liang J. *et al.* 2003). Hemos observado que como consecuencia de la fosforilación de Akt, los niveles de ciclina D1, una diana de Akt, también están aumentados. Sin embargo, L365,260 no incrementa la fosforilación de Akt, ni la acumulación de ciclina D1. El devazepide induce por tanto en las líneas de Ewing, la fosforilación de Akt y el incremento de células apoptóticas. El incremento de Akt fosforilado actuaría como un factor de supervivencia, pero según observamos, no debe ser suficiente para revertir el daño producido por el devazepide. El devazepide podría actuar de forma similar a la rapamicina la cual interacciona con mTOR (diana de Akt) e induce aumento de Akt fosforilado y del nivel de ciclina D1 (Takuwa *et al.* 1999; Sun *et al.* 2005; O'Reilly *et al.* 2006).

En conjunto, estos datos indican que el devazepide induce apoptosis celular en las líneas de Ewing y en consecuencia un retraso en la progresión tumoral a través de un mecanismo independiente de los receptores de CCK.

### **5.5 Implicaciones terapéuticas de la inhibición de CCK y del devazepide en los tumores de Ewing.**

La tasa de supervivencia de los tumores de Ewing mejoró notablemente con la llegada de los protocolos modernos basados en el empleo de altas dosis de quimioterapia, combinadas con cirugía y radioterapia. Sin embargo, en los últimos 20 años no se han conseguido mejoras significativas en la tasa de supervivencia, por lo que se hace necesaria la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

En esta Tesis hemos demostrado que el bloqueo de la expresión de CCK en las líneas celulares de Ewing reduce su tasa de proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*, y que el devazepide, un antagonista de CCKAR, induce apoptosis *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*. Por tanto, se podría esperar que el bloqueo de la expresión de CCK o el tratamiento con devazepide, en combinación con la quimioterapia estándar, fueran efectivos en el tratamiento de estos tumores. De hecho, varios estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado una mayor eficacia del tratamiento, al combinar las drogas clásicas de quimioterapia con inhibidores de vías de factores de crecimiento autocrino como IGF-1 o c-kit (Benini *et al.* 2001; Gonzalez *et al.* 2004; Scotlandi *et al.* 2005; Martins *et al.* 2006).

En la actualidad no se disponen de drogas capaces de bloquear la expresión de CCK, por lo que el conocimiento de como EWS/FLI1 activa la expresión de CCK, así como las vías de señalización de CCK en los tumores de Ewing, podrían ayudar a diseñar o identificar nuevas drogas que contribuyeran a mejorar el tratamiento de esta patología en el futuro.

El devazepide tiene la ventaja de que su farmacocinética y farmacodinámica se ha estudiado en detalle, de tal forma que la administración durante largos periodos de tiempo con dosis de hasta 2 mg/kg de peso (Jamshidipour R 1994; Smith *et al.* 1995; Moody *et al.* 2001), o durante periodos más cortos con dosis de hasta 125 mg/kg (Chang *et al.* 1986), no tiene efectos tóxicos. El devazepide tampoco tiene efecto nefrotóxico y es bien tolerado en diferentes especies, incluido en humanos (Abbruzzese 1992). Por tanto, aunque el devazepide no parece actuar a través de los receptores clásicos de CCK, el conocimiento de su mecanismo de acción, podría permitirnos identificar determinadas vías de señalización cuyo bloqueo podría inducir apoptosis en las células de Ewing, y contribuir de este modo a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

## ***6. Conclusiones***

**6.1 CCK y NR0B1 son genes inducidos por EWS/FLI1 en dos sistemas celulares diferentes.** EWS/FLI1, la oncoproteína característica de los tumores de Ewing, induce la expresión de CCK y NR0B1 en células 293 y HeLa. Ambos sistemas celulares son permisivos a la expresión de esta oncoproteína.

**6.2 CCK y NR0B1 se expresan a elevados niveles en células y tumores de Ewing en comparación con otros tumores pediátricos, como rhabdiosarcomas y neuroblastomas.** Además, sus niveles de expresión son similares a los observados en los tejidos normales que muestran los mayores niveles de expresión de estos genes.

**6.3 CCK y NR0B1 son genes regulados por EWS/FLI1 en células de tumor de Ewing.** La inhibición de la expresión de EWS/FLI1 mediante la técnica de ARN de interferencia en dos líneas celulares de Ewing (A673 y SK-PN-DW) inhibió la expresión de CCK y NR0B1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, indicando que ambos genes son regulados por EWS/FLI1 en células de tumor de Ewing.

**6.4 CCK es un factor de crecimiento autocrino para las células de tumor de Ewing.** La inhibición de la expresión de CCK mediante la técnica de ARN de interferencia inhibe la proliferación celular de las células de tumor de Ewing A673 y SK-PN-DW, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efecto puede ser parcialmente revertido *in vitro* por el cultivo de dichas células en medio condicionado con un alto contenido en CCK y por la adición de formas sintéticas no amidadas de CCK, y parece no estar mediado por los receptores clásicos de CCK, CCKAR y CCKBR. Estos resultados indican que las estrategias capaces de bloquear esta vía de proliferación pueden ser efectivas en el tratamiento de los tumores de Ewing.

**6.5 El devazepide, un antagonista de los receptores de CCKAR, inhibe el crecimiento de los tumores de Ewing.** El devazepide, a concentraciones en el rango micromolar, induce apoptosis en las células de Ewing, inhibiendo el crecimiento de estas células tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efecto es relativamente específico para las células de Ewing y parece ser independiente de la acción del devazepide sobre los receptores de CCK. Estos resultados sugieren que el devazepide podría ser efectivo en el tratamiento de los tumores de Ewing, en combinación con los tratamientos quimioterapéuticos.

## ***7. Bibliografía***

- Abbruzzese J. L. G., Charles F., Daugherty K., Larson E., DuBrow R., Berlin R., Levin B. (1992). A Pilot Clinical Trial of the Cholecystokinin Receptor Antagonist MK-329 in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. Pancreas **7**(2): 165-171.
- Adrian R. Black, J. D. B. J. A.-C. (2001). Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. Journal of Cellular Physiology **188**(2): 143-160.
- Ahmed, A., E. Gilbert-Barnes and A. Lacson (2004). Expression of c-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. Pediatr Dev Pathol **7**(4): 342-7.
- Ahmed, S., R. F. Murphy and S. Lovas (2005). Importance of N- and C-terminal regions of gastrin-Gly for preferential binding to high and low affinity gastrin-Gly receptors. Peptides **26**(7): 1207.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **24**(50): 7455.
- Archer-Lahlou, E., C. Escrieut, P. Clerc, J. Martinez, L. Moroder, C. Logsdon, A. Kopin, C. Seva, M. Dufresne, L. Pradayrol, B. Maigret and D. Fourmy (2005a). Molecular mechanism underlying partial and full agonism mediated by the human cholecystokinin-1 receptor. J Biol Chem **280**(11): 10664-74.
- Archer-Lahlou, E., I. Tikhonova, C. Escrieut, M. Dufresne, C. Seva, L. Pradayrol, L. Moroder, B. Maigret and D. Fourmy (2005b). Modeled structure of a G-protein-coupled receptor: the cholecystokinin-1 receptor. J Med Chem **48**(1): 180-91.
- Armengol, G., M. Tarkkanen, M. Virolainen, A. Forus, J. Valle, T. Bohling, S. Asko-Seljavaara, C. Blomqvist, I. Elomaa, E. Karaharju, A. H. Kivioja, M. A. Siimes, E. Tukiainen, M. R. Caballin, O. Myklebost and S. Knuutila (1997). Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. Br J Cancer **75**(10): 1403-9.
- Arvand, A., S. M. Welford, M. A. Teitell and C. T. Denny (2001). The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1. Cancer Res **61**(13): 5311-7.
- Aurias, A., C. Rimbaut, D. Buffe, J. M. Zucker and A. Mazabraud (1984). Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. Cancer Genet Cytogenet **12**(1): 21-5.
- Baba, M., K. Itoh and M. Tatsuta (2004). Glycine-extended gastrin induces matrix metalloproteinase-1- and -3-mediated invasion of human colon cancer cells through type I collagen gel and Matrigel. Int J Cancer **111**(1): 23-31.
- Baer, C., M. Nees, S. Breit, B. Selle, A. E. Kulozik, K. L. Schaefer, Y. Braun, D. Wai and C. Poremba (2004). Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. Int J Cancer **110**(5): 687-94.
- Bailly, R. A., R. Bosselut, J. Zucman, F. Cormier, O. Delattre, M. Roussel, G. Thomas and J. Ghysdael (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**(5): 3230-41.
- Baldwin, G. S., A. Casey and J. Weinstock (1993). Partial structure of the gene encoding the 78 kDa gastrin binding protein excludes a close relationship with the peroxisomal trifunctional enzyme. Biochem Biophys Res Commun **193**(2): 560-4.
- Baldwin, G. S., R. Chandler, B. Grego, M. R. Rubira, K. L. Seet and J. Weinstock (1994). Isolation and partial amino acid sequence of a 78 kDa porcine gastrin-binding protein. Int J Biochem **26**(4): 529-38.
- Beales, I. L. P. and O. Ogunwobi (2006). Glycine-extended gastrin inhibits apoptosis in colon cancer cells via separate activation of Akt and JNK pathways. Molecular and Cellular Endocrinology **247**(1-2): 140.
- Beinfeld, M. C. (1997). CCK biosynthesis and processing: Recent progress and future challenges. Life Sciences **61**(24): 2359.
- Beinfeld, M. C. (2003). What we know and what we need to know about the role of endogenous CCK in psychostimulant sensitization. Life Sci **73**(6): 643-54.
- Beinfeld, M. C., A. Blum, D. Vishnuvardhan, S. Fanous and J. E. Marchand (2005). Cholecystokinin (CCK) levels in prohormone convertase 2 knockout mouse brain regions reveal a complex phenotype of region- specific alterations. J Biol Chem.
- Beinfeld, M. C., D. K. Meyer, R. L. Eskay, R. T. Jensen and M. J. Brownstein (1981). The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. Brain Res **212**(1): 51-7.
- Beinfeld, M. C. and W. Wang (2002). CCK processing by pituitary GH3 cells, human teratocarcinoma cells NT2 and hNT differentiated human neuronal cells evidence for a differentiation-induced change in enzyme expression and pro CCK processing. Life Sci **70**(11): 1251-8.
- Ben-David, Y., E. B. Giddens, K. Letwin and A. Bernstein (1991). Erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1, closely linked to c-ets-1. Genes Dev **5**(6): 908-18.
- Benini, S., M. C. Manara, N. Baldini, V. Cerisano, S. Massimo, M. Mercuri, P. L. Lollini, P. Nanni, P. Picci and K. Scotlandi (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**(6): 1790-7.
- Benini, S., M. C. Manara, V. Cerisano, S. Perdichizzi, R. Strammiello, M. Serra, P. Picci and K. Scotlandi (2004). Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. Int J Cancer **108**(3): 358-66.
- Bertolotti, A., Y. Lutz, D. J. Heard, P. Chambon and L. Tora (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. EMBO J. **15** (18): 5022-5031.



- Bertolotti, A., T. Melot, J. Acker, M. Vigneron, O. Delattre and L. Tora (1998). EWS, but not EWS-FLI-1, is associated with both TFIID and RNA polymerase II: interactions between two members of the TET family, EWS and hTAFII68, and subunits of TFIID and RNA polymerase II complexes. Mol Cell Biol **18**(3): 1489-97.
- Biagini, P., G. Monges, V. Vuaroqueaux, D. Parriaux, J. F. Cantaloube and P. De Micco (1997). The human gastrin/cholecystokinin receptors: type B and type C expression in colonic tumors and cell lines. Life Sci **61**(10): 1009-18.
- Blackmore, M. and B. H. Hirst (1992). Autocrine stimulation of growth of AR4-2J rat pancreatic tumour cells by gastrin. Br J Cancer **66**(1): 32-8.
- Blaker, M., A. de Weerth, M. Tometten, M. Schulz, W. Hoppner, D. Arlt, C. Hoang-Vu, H. Dralle, H. Terpe, L. Jonas and T. von Schrenck (2002). Expression of the cholecystokinin 2-receptor in normal human thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. Eur J Endocrinol **146**(1): 89-96.
- Bonetta, L. (2004). RNAi: Silencing never sounded better. Nature Methods **1**: 79-86.
- Braun, B. S., R. Frieden, S. L. Lessnick, W. A. May and C. T. Denny (1995). Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. Mol Cell Biol **15**(8): 4623-30.
- Brown, L. A., A. R. Rodaway, T. F. Schilling, T. Jowett, P. W. Ingham, R. K. Patient and A. D. Sharrocks (2000). Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos. Mech Dev **90**(2): 237-52.
- Burchill, S. A. (2003). Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. J Clin Pathol **56**(2): 96-102.
- Castillero-Trejo, Y., S. Eliazer, L. Xiang, J. A. Richardson and R. L. Ilaria, Jr. (2005). Expression of the EWS/FLI-1 Oncogene in Murine Primary Bone-Derived Cells Results in EWS/FLI-1-Dependent, Ewing Sarcoma-Like Tumors. Cancer Res **65**(19): 8698-705.
- Cavazzana, A. O., J. S. Miser, J. Jefferson and T. J. Triche (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. Am J Pathol **127**(3): 507-18.
- Clipsham, R. and E. R. McCabe (2003). DAX1 and its network partners: exploring complexity in development. Mol Genet Metab **80**(1-2): 81-120.
- Collins and Hurwitz (2005). Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. Seminars in Oncology **32**(1): 61.
- Corbin, A. S., I. J. Griswold, P. La Rosee, K. W. H. Yee, M. C. Heinrich, C. L. Reimer, B. J. Druker and M. W. N. Deininger (2004). Sensitivity of oncogenic KIT mutants to the kinase inhibitors MLN518 and PD180970. Blood **104**(12): 3754-3757.
- Chang, R. S. L. and V. J. Lotti (1986). Biochemical and Pharmacological Characterization of an Extremely Potent and Selective Nonpeptide Cholecystokinin Antagonist. PNAS **83**(13): 4923-4926.

- Chao, C., K. L. Ives, E. Goluszko, A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey, C. M. Townsend, Jr. and M. R. Hellmich (2005). SRC regulates constitutive internalization and rapid resensitization of a cholecystokinin 2 receptor splice variant. J Biol Chem **280**(39): 33368-73.
- Cheng, Z. J., K. G. Harikumar, E. L. Holicky and L. J. Miller (2003). Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth. J Biol Chem **278**(52): 52972-9.
- Dalal, S., A. M. Berry, C. J. Cullinane, D. C. Mangham, R. Grimer, I. J. Lewis, C. Johnston, V. Laurence and S. A. Burchill (2005). Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. Clin Cancer Res **11**(6): 2364-78.
- Datson, N. A., J. van der Perk-de Jong, M. P. van den Berg, E. R. de Kloet and E. Vreugdenhil (1999). MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. Nucl. Acids Res. **27**(5): 1300-1307.
- Dauphinot, L., C. De Oliveira, T. Melot, N. Sevenet, V. Thomas, B. E. Weissman and O. Delattre (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. Oncogene **20**(25): 3258-65.
- Dawson, E. S., R. M. Henne, L. J. Miller and T. P. Lybrand (2002). Molecular Models for Cholecystokinin-A Receptor. Pharmacology and Toxicology **91**(6): 290-296.
- de Alava, E. and W. L. Gerald (2000). Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. J Clin Oncol **18**(1): 204-13.
- de Alava, E., A. Kawai, J. H. Healey, I. Fligman, P. A. Meyers, A. G. Huvos, W. L. Gerald, S. C. Jhanwar, P. Argani, C. R. Antonescu, F. J. Pardo-Mindan, J. Ginsberg, R. Womer, E. R. Lawlor, J. Wunder, I. Andrulis, P. H. Sorensen, F. G. Barr and M. Ladanyi (1998). EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol **16**(4): 1248-55.
- de Weerth, A., L. Jonas, R. Schade, T. Schoneberg, G. Wolf, A. Pace, F. Kirchhoff, M. Schulz, T. Heinig, H. Greten and T. von Schrenck (1998). Gastrin/cholecystokinin type B receptors in the kidney: molecular, pharmacological, functional characterization, and localization. Eur J Clin Invest **28**(7): 592-601.
- Delattre, O., J. Zucman, T. Melot, X. S. Garau, J. M. Zucker, G. M. Lenoir, P. F. Ambros, D. Sheer, C. Turc-Carel, T. J. Triche 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**(5): 294-9.
- Delattre, O., J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau and et al. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. Nature **359**(6391): 162-5.
- Deneen, B. and C. T. Denny (2001). Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. Oncogene **20**(46): 6731-41.
- Denny, C. T. (1998). Ewing's sarcoma--a clinical enigma coming into focus. J Pediatr Hematol Oncol **20**(5): 421-5.

- Dhulipala, P. D., L. Lee, V. N. Rao and E. S. Reddy (1998). Fli-1b is generated by usage of differential splicing and alternative promoter. Oncogene **17**(9): 1149-57.
- Diehl, J. A. (2002). Cycling to Cancer with Cyclin D1. Cancer biology and therapy **1**(3): 226-231.
- Ding, W. Q., S. M. Kuntz and L. J. Miller (2002). A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron. Cancer Res **62**(3): 947-52.
- Dittmer, J. and A. Nordheim (1998). Ets transcription factors and human disease. Biochim Biophys Acta **1377**(2): F1-11.
- Druker, B. J. and F. V. W. a. G. K. George (2004). Imatinib as a Paradigm of Targeted Therapies. Advances in Cancer Research, Academic Press. **Volume 91**: 1.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev. **15**(2): 188-200.
- Finkenzeller, G., A. Sparacio, A. Technau, D. Marmé and G. Siemeister (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**(6): 669-676.
- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. Endocr Rev **23**(6): 824-854.
- Fitzsimmons, D., W. Hodsdon, W. Wheat, S. M. Maira, B. Wasylyk and J. Hagman (1996). Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. Genes Dev. **10**(17): 2198-211.
- Fourmy, D., C. Escrieut, E. Archer, C. Gales, V. Gigoux, B. Maigret, L. Moroder, S. Silvente-Poirot, J. Martinez, J.-A. Fehrentz and L. Pradayrol (2002). Structure of Cholecystokinin Receptor Binding Sites and Mechanism of Activation/Inactivation by Agonists/Antagonists. Pharmacology and Toxicology **91**(6): 313-320.
- Friedman, J. M., M. Vitale, J. Maimon, M. A. Israel, M. E. Horowitz and B. S. Schneider (1992a). Expression of the cholecystokinin gene in pediatric tumors. Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5819-23.
- Friedman, J. M., M. Vitale, J. Maimon, M. A. Israel, M. E. Horowitz and B. S. Schneider (1992b). Expression of the Cholecystokinin Gene in Pediatric Tumors. PNAS **89**(13): 5819-5823.
- Fu, Y., A. Hoang, G. Escher, R. G. Parton, Z. Krozowski and D. Sviridov (2004). Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. J Biol Chem **279**(14): 14140-6.
- Fuchs, B., C. Inwards, S. P. Scully and R. Janknecht (2004a). hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. Clin Orthop(426): 64-8.

Fuchs, B., C. Y. Inwards and R. Janknecht (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**(1-2): 104-8.

Fuchs, B., C. Y. Inwards and R. Janknecht (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**(4): 1344-53.

Fukuma, M., H. Okita, J. Hata and A. Umezawa (2003). Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. Oncogene **22**(1): 1-9.

Gascoyne, D. M., G. R. Thomas and D. S. Latchman (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**(21): 3830-40.

Ginsberg, J. P., E. de Alava, M. Ladanyi, L. H. Wexler, H. Kovar, M. Paulussen, A. Zoubek, B. Dockhorn-Dworniczak, H. Juergens, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, R. Malik, P. H. Sorensen, R. B. Womer and F. G. Barr (1999). EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol **17**(6): 1809-14.

Girmita, L., M. Wang, Y. Xie, G. Nilsson, A. Dricu, J. Wejde and O. Larsson (2000). Inhibition of N-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills Ewing's sarcoma cells: therapeutic implications. Anticancer Drug Des **15**(1): 67-72.

Gonzalez-Puga, C., A. Garcia-Navarro, G. Escames, J. Leon, M. Lopez-Cantarero, E. Ros and D. Acuna-Castroviejo (2005). Selective CCK-A but not CCK-B receptor antagonists inhibit HT-29 cell proliferation: synergism with pharmacological levels of melatonin. J Pineal Res **39**(3): 243-50.

Gonzalez, I., E. J. Andreu, A. Panizo, S. Inoges, A. Fontalba, J. L. Fernandez-Luna, M. Gaboli, L. Sierrasesumaga, S. Martin-Algarra, J. Pardo, F. Prosper and E. de Alava (2004). Imatinib Inhibits Proliferation of Ewing Tumor Cells Mediated by the Stem Cell Factor/KIT Receptor Pathway, and Sensitizes Cells to Vincristine and Doxorubicin-Induced Apoptosis. Clin Cancer Res **10**(2): 751-761.

Gossen, M. and H. Bujard (1992). Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. PNAS **89**(12): 5547-5551.

Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science **268**(5218): 1766-9.

Graham, F., J. Smiley, W. Russell and R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. **36**(1): 59-74.

Graham, F. and A. van der Eb (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. Virology **54**(2): 536-539.

- Grier, H. E. (1997). The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. Pediatr Clin North Am **44**(4): 991-1004.
- Grimberg, A. (2003). Mechanisms by which IGF-I May Promote Cancer. Cancer biology and therapy **2**(6): 630-635.
- Guan, H., Z. Zhou, H. Wang, S. F. Jia, W. Liu and E. S. Kleinerman (2005). A Small Interfering RNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits Ewing's Sarcoma Growth in a Xenograft Mouse Model. Clin Cancer Res **11**(7): 2662-9.
- Hahm, K. B., K. Cho, C. Lee, Y. H. Im, J. Chang, S. G. Choi, P. H. Sorensen, C. J. Thiele and S. J. Kim (1999). Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. Nat Genet **23**(2): 222-7.
- Hallier, M., A. Lerga, S. Barnache, A. Tavitian and F. Moreau-Gachelin (1998). The Transcription Factor Spi-1/PU.1 Interacts with the Potential Splicing Factor TLS. J. Biol. Chem. **273**(9): 4838-4842.
- Hart, A., F. Melet, P. Grossfeld, K. Chien, C. Jones, A. Tunnacliffe, R. Favier and A. Bernstein (2000). Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizyously deleted in patients with thrombocytopenia. Immunity **13**(2): 167-77.
- Hart, A. H., C. M. Corrick, M. J. Tymms, P. J. Hertzog and I. Kola (1995). Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity. Oncogene **10**(7): 1423-30.
- Hattinger, C. M., S. Rumpler, S. Strehl, I. M. Ambros, A. Zoubek, U. Potschger, H. Gadner and P. F. Ambros (1999). Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. Genes Chromosomes Cancer **24**(3): 243-54.
- Hattinger, C. M., A. Zoubek and P. F. Ambros (2000). Molecular Cytogenetics in Ewing Tumors: Diagnostic and Prognostic Information. Onkologie **23**(5): 416-422.
- He, H., J. Pannequin, J. P. Tantiogco, A. Shulkes and G. S. Baldwin (2005). Glycine-Extended Gastrin Stimulates Cell Proliferation and Migration through a Rho- and ROCK-dependent Pathway, not a Rac/Cdc42-Dependent Pathway. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.
- Hellmich, M. R., X. L. Rui, H. L. Hellmich, R. Y. Fleming, B. M. Evers and C. M. Townsend, Jr. (2000). Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. J Biol Chem **275**(41): 32122-8.
- Hiyama, E., K. Hiyama, M. Nishiyama, C. P. Reynolds, J. W. Shay and T. Yokoyama (2003). Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. Journal of Pediatric Surgery **38**(12): 1730.
- Holzer, G., A. Obermair, M. Koschat, O. Preyer, R. Kotz and K. Trieb (2001). Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. Med Pediatr Oncol **36**(6): 601-4.

- Hollenhorst, P. C., D. A. Jones and B. J. Graves (2004). Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. Nucl. Acids Res. **32**(18): 5693-5702.
- Hu-Lieskovan, S., J. D. Heidel, D. W. Bartlett, M. E. Davis and T. J. Triche (2005a). 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**(19): 8984-92.
- Hu-Lieskovan, S., J. Zhang, L. Wu, H. Shimada, D. E. Schofield and T. J. Triche (2005b). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. Cancer Res **65**(11): 4633-44.
- Huang, H. Y., P. B. Illei, Z. Zhao, M. Mazumdar, A. G. Huvos, J. H. Healey, L. H. Wexler, R. Gorlick, P. Meyers and M. Ladanyi (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. J Clin Oncol **23**(3): 548-58.
- Im, Y. H., H. T. Kim, C. Lee, D. Poulin, S. Welford, P. H. Sorensen, C. T. Denny and S. J. Kim (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**(6): 1536-40.
- Irminger-Finger, I. and W.-C. Leung (2002). BRCA1-dependent and independent functions of BARD1. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **34**(6): 582.
- Jaishankar, S., J. Zhang, M. F. Roussel and S. J. Baker (1999). Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. Oncogene **18**(40): 5592-7.
- Jamshidipour R, P. E., Howell SB (1994). In vivo modulation of cisplatin cytotoxicity by the cholecystokinin antagonist MK-329 in human pancreatic cancer xenografts. Anticancer Res. **14**(6B): 2611-6.
- Janknecht, R. (2004). On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. FEBS Letters **564**(1-2): 9.
- Javelaud, D., J. Wietzerbin, O. Delattre and F. Besancon (2000). Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. Oncogene **19**(1): 61-8.
- Jeon, I. S., J. N. Davis, B. S. Braun, J. E. Sublett, M. F. Roussel, C. T. Denny and D. N. Shapiro (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. Oncogene **10**(6): 1229-34.
- Kaneko, Y., K. Yoshida, M. Handa, Y. Toyoda, H. Nishihira, Y. Tanaka, Y. Sasaki, S. Ishida, F. Higashino and K. Fujinaga (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**(2): 115-21.

- Kenzelmann, M. and K. Muhlemann (1999). Substantially enhanced cloning efficiency of SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) by adding a heating step to the original protocol. Nucl. Acids Res. **27**(3): 917-918.
- Kermorgant, S. and T. Lehy (2001). Glycine-extended gastrin promotes the invasiveness of human colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun **285**(1): 136-41.
- Khan, J., J. S. Wei, M. Ringner, L. H. Saal, M. Ladanyi, F. Westermann, F. Berthold, M. Schwab, C. R. Antonescu, C. Peterson and P. S. Meltzer (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med **7**(6): 673-9.
- Kim, G. E., B. Beach, J. M. Gastier-Foster, J. L. Murata-Collins, J. M. Rowland, J. O'Donnell R and R. E. Goldsby (2005). Ewing sarcoma as a second malignant neoplasm after acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Blood Cancer.
- Kim, J. and J. Pelletier (1999). Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. Physiol Genomics **1**(3): 127-38.
- Kinsey, M., R. Smith and S. L. Lessnick (2006). NR0B1 Is Required for the Oncogenic Phenotype Mediated by EWS/FLI in Ewing's Sarcoma. Mol Cancer Res **4**(11): 851-859.
- Knoop, L. L. and S. J. Baker (2000). The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. J Biol Chem **275**(32): 24865-71.
- Knoop, L. L. and S. J. Baker (2001). EWS/FLI alters 5'-splice site selection. J Biol Chem **276**(25): 22317-22.
- Kontny, H. U., T. M. Lehrnbecher, S. J. Chanock and C. L. Mackall (1998). Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. Cancer Res **58**(24): 5842-9.
- Kovar, H. (1998). Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. Curr Opin Oncol **10**(4): 334-42.
- Kovar, H. (2005). Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. Semin Cancer Biol **15**(3): 189-96.
- Kovar, H., D. N. Aryee, G. Jug, C. Henockl, M. Schemper, O. Delattre, G. Thomas and H. Gadner (1996). EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. Cell Growth Differ **7**(4): 429-37.
- Kovar, H., J. Ban and S. Pospisilova (2003). Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. Semin Cancer Biol **13**(4): 275-81.
- Kovar, H., M. Dworzak, S. Strehl, E. Schnell, I. M. Ambros, P. F. Ambros and H. Gadner (1990). Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. Oncogene **5**(7): 1067-70.
- Kovar, H., G. Jug, D. N. Aryee, A. Zoubek, P. Ambros, B. Gruber, R. Windhager and H. Gadner (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**(18): 2225-32.

Kurpios, N. A., N. A. Sabolic, T. G. Shepherd, G. M. Fidalgo and J. A. Hassell (2003). Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**(2): 177-90.

Kushlinskii, N. E., I. V. Babkina, Y. N. Solov'ev and N. N. Trapeznikov (2000). Vascular endothelium growth factor and angiogenin in the serum of patients with osteosarcoma and Ewing's tumor. *Bull Exp Biol Med* **130**(7): 691-3.

Lal, A., A. E. Lash, S. F. Altschul, V. Velculescu, L. Zhang, R. E. McLendon, M. A. Marra, C. Prange, P. J. Morin, K. Polyak, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, R. L. Strausberg and G. J. Riggins (1999). A Public Database for Gene Expression in Human Cancers. *Cancer Res* **59**(21): 5403-5407.

Lalli, E. and P. Sassone-Corsi (2003). DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Mol Endocrinol* **17**(8): 1445-53.

Lambert, G., J. R. Bertrand, E. Fattal, F. Subra, H. Pinto-Alphandary, C. Malvy, C. Auclair and P. Couvreur (2000). EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2): 401-6.

Landuzzi, L., C. De Giovanni, G. Nicoletti, I. Rossi, C. Ricci, A. Astolfi, L. Scopece, K. Scotlandi, M. Serra, G. P. Bagnara, P. Nanni and P. L. Lollini (2000). The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol* **157**(6): 2123-31.

Lasorella, A., T. Uo and A. Iavarone (2001). Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* **20**(58): 8326-8333.

Lawlor, E. R., C. Scheel, J. Irving and P. H. Sorensen (2002). Anchorage-independent multicellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* **21**(2): 307-18.

Lefranc, F., T. Mijatovic, V. Mathieu, S. Rorive, C. Decaestecker, O. Debeir, J. Brotchi, P. Van Ham, I. Salmon and R. Kiss (2004). Characterization of gastrin-induced proangiogenic effects in vivo in orthotopic U373 experimental human glioblastomas and in vitro in human umbilical vein endothelial cells. *Clin Cancer Res* **10**(24): 8250-65.

Lerga, A., M. Hallier, L. Delva, C. Orvain, I. Gallais, J. Marie and F. Moreau-Gachelin (2001). Identification of an RNA Binding Specificity for the Potential Splicing Factor TLS. *J. Biol. Chem.* **276**(9): 6807-6816.

Lessnick, S. L., B. S. Braun, C. T. Denny and W. A. May (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* **10**(3): 423-31.

Lessnick, S. L., C. S. Daewag and T. R. Golub (2002). The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* **1**(4): 393-401.



- Liang J. and Slingerland JM. (2003). Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. Landes Bioscience **2**(4): 339-345.
- Liang, P. (2002). SAGE Genie: A suite with panoramic view of gene expression. PNAS **99**(18): 11547-11548.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. Methods **25**(4): 402.
- Luo, J., T. A. Dunn, C. M. Ewing, P. C. Walsh and W. B. Isaacs (2003). Decreased gene expression of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. Prostate **57**(2): 134-9.
- Luscher, B. (2001). Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. Gene **277**(1-2): 1.
- Mager, A. M., A. Grapin-Botton, K. Ladjali, D. Meyer, C. M. Wolff, P. Stiegler, M. A. Bonnin and P. Remy (1998). The avian fli gene is specifically expressed during embryogenesis in a subset of neural crest cells giving rise to mesenchyme. Int J Dev Biol **42**(4): 561-72.
- Mao, X., S. Miesfeldt, H. Yang, J. M. Leiden and C. B. Thompson (1994). The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. J Biol Chem **269**(27): 18216-22.
- Martins, A. S., C. Mackintosh, D. H. Martin, M. Campos, T. Hernandez, J.-L. Ordonez and E. de Alava (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**(11): 3532-3540.
- Mateo-Lozano, S., O. M. Tirado and V. Notario (2003). Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. Oncogene **22**(58): 9282-7.
- Matsumoto, Y., K. Tanaka, F. Nakatani, T. Matsunobu, S. Matsuda and Y. Iwamoto (2001). Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes. Br J Cancer **84**(6): 768-75.
- Matsunobu, T., K. Tanaka, Y. Matsumoto, F. Nakatani, R. Sakimura, M. Hanada, X. Li, Y. Oda, I. Naruse, H. Hoshino, M. Tsuneyoshi, H. Miura and Y. Iwamoto (2004). The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. Clin Cancer Res **10**(3): 1003-12.
- Maurer, P., F. T'Sas, L. Coutte, N. Callens, C. Brenner, C. Van Lint, Y. de Launoit and J. L. Baert (2003). FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. Oncogene **22**(21): 3319-29.
- May, W. A., M. L. Gishizky, S. L. Lessnick, L. B. Lunsford, B. C. Lewis, O. Delattre, J. Zucman, G. Thomas and C. T. Denny (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**(12): 5752-6.

- May, W. A., S. L. Lessnick, B. S. Braun, M. Klemsz, B. C. Lewis, L. B. Lunsford, R. Hromas and C. T. Denny (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**(12): 7393-8.
- Melet, F., B. Motro, D. J. Rossi, L. Zhang and A. Bernstein (1996). Generation of a novel Fli-1 protein by gene targeting leads to a defect in thymus development and a delay in Friend virus-induced erythroleukemia. Mol Cell Biol **16**(6): 2708-18.
- Mendiola, M., J. Carrillo, E. Garcia, E. Lalli, T. Hernandez, E. de Alava, F. Tirode, O. Delattre, P. Garcia-Miguel, F. Lopez-Barea, A. Pestana and J. Alonso (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**(6): 1381-9.
- Menssen, A. and H. Hermeking (2002). From the Cover: Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: Identification and analysis of c-MYC target genes. PNAS **99**(9): 6274-6279.
- Meyer, D., C. Wolff, P. Stiegler, F. Senan, N. Befort, J. Befort and P. Remy (1993). Xl-fli, the Xenopus homologue of the fli-1 gene, is expressed during embryogenesis in a restricted pattern evocative of neural crest cell distribution. Mech Dev. **44**(2-3): 109-21.
- Meyers, P. A. and A. S. Levy (2000). Ewing's sarcoma. Curr Treat Options Oncol **1**(3): 247-57.
- Mitsiades, C. S., N. Mitsiades and M. Koutsilieris (2004). The Akt Pathway: Molecular Targets for Anti-Cancer Drug Development. Current Cancer Drug Targets **4**(3): 235-256.
- Mitsiades, N., V. Poulaki, A. Leone and M. Tsokos (1999). Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. J Natl Cancer Inst **91**(19): 1678-84.
- Monte, D., J. L. Baert, P. A. Defossez, Y. de Launoit and D. Stehelin (1994). Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. Oncogene **9**(5): 1397-406.
- Moody, T. W. and R. T. Jensen (2001). CI-988 Inhibits Growth of Small Cell Lung Cancer Cells. J Pharmacol Exp Ther **299**(3): 1154-1160.
- Morel, C., G. Ibarz, C. Oiry, E. Carnazzi, G. Berge, D. Gagne, J. C. Galleyrand and J. Martinez (2005). Cross-interactions of Two p38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Inhibitors and Two Cholecystokinin (CCK) Receptor Antagonists with the CCK1 Receptor and P38 MAP Kinase. J Biol Chem **280**(22): 21384-93.
- Morrisset, J., S. Julien and J. Laine (2003). Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas. J Histochem Cytochem **51**(11): 1501-13.
- Morrisset, J., H. Wong, J. H. Walsh, J. Laine and J. Bourassa (2000). Pancreatic CCK(B) receptors: their potential roles in somatostatin release and delta-cell proliferation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(1): G148-56.

- Muise-Helmericks, R. C., H. L. Grimes, A. Bellacosa, S. E. Malstrom, P. N. Tschlis and N. Rosen (1998). Cyclin D Expression Is Controlled Post-transcriptionally via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent Pathway. J. Biol. Chem. **273**(45): 29864-29872.
- Mukhopadhyay, D., B. Knebelmann, H. T. Cohen, S. Ananth and V. P. Sukhatme (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. Mol. Cell. Biol. **17**(9): 5629-5639.
- Nacht, M., T. Dracheva, Y. Gao, T. Fujii, Y. Chen, A. Player, V. Akmaev, B. Cook, M. Dufault, M. Zhang, W. Zhang, M. Guo, J. Curran, S. Han, D. Sidransky, K. Buetow, S. L. Madden and J. Jen (2001). Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. PNAS **98**(26): 15203-15208.
- Nacht, M., A. T. Ferguson, W. Zhang, J. M. Petroziello, B. P. Cook, Y. H. Gao, S. Maguire, D. Riley, G. Coppola, G. M. Landes, S. L. Madden and S. Sukumar (1999). Combining Serial Analysis of Gene Expression and Array Technologies to Identify Genes Differentially Expressed in Breast Cancer. Cancer Res **59**(21): 5464-5470.
- Nakatani, F., K. Tanaka, R. Sakimura, Y. Matsumoto, T. Matsunobu, X. Li, M. Hanada, T. Okada and Y. Iwamoto (2003). Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. J Biol Chem **278**(17): 15105-15.
- Narod, S. A. and W. D. Foulkes (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nature Reviews Cancer **4**(9): 665.
- Nishimori, H., Y. Sasaki, K. Yoshida, H. Irifune, H. Zembutsu, T. Tanaka, T. Aoyama, T. Hosaka, S. Kawaguchi, T. Wada, J. Hata, J. Toguchida, Y. Nakamura and T. Tokino (2002). The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. Oncogene **21**(54): 8302-9.
- No, D., T.-P. Yao and R. M. Evans (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. PNAS **93**(8): 3346-3351.
- O'Regan, S., M. F. Diebler, F. M. Meunier and S. Vyas (1995). A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. J Neurochem **64**(1): 69-76.
- O'Reilly, K. E., F. Rojo, Q.-B. She, D. Solit, G. B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D. J. Hicklin, D. L. Ludwig, J. Baselga and N. Rosen (2006). mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. Cancer Res **66**(3): 1500-1508.
- Ogunwobi, O. O. and I. L. P. Beales (2006). Glycine-extended gastrin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cells via cyclo-oxygenase-independent pathways. Regulatory Peptides **134**(1): 1.
- Ohali, A., S. Avigad, R. Zaizov, R. Ophir, S. Horn-Saban, I. J. Cohen, I. Meller, Y. Kollender, J. Issakov and I. Yaniv (2004). Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. Oncogene **23**(55): 8997-9006.
- Ohno, T., M. Ouchida, L. Lee, Z. Gatalica, V. N. Rao and E. S. Reddy (1994). The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small

round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. Oncogene **9**(10): 3087-97.

Ohno, T., V. N. Rao and E. S. Reddy (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. Cancer Res **53**(24): 5859-63.

Oikawa, T. (2004). ETS transcription factors: Possible targets for cancer therapy. Cancer Sci **95**(8): 626-33.

Olszewska-Pazdrak, B., C. M. Townsend, Jr. and M. R. Hellmich (2004). Agonist-independent activation of Src tyrosine kinase by a cholecystokinin-2 (CCK2) receptor splice variant. J Biol Chem **279**(39): 40400-4.

Ottewell, P. D., A. Varro, G. J. Dockray, C. M. Kirton, A. J. Watson, T. C. Wang, R. Dimaline and D. M. Pritchard (2005a). COOH-terminal 26-amino acid residues of progastrin are sufficient for stimulation of mitosis in murine colonic epithelium in vivo. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(3): G541-9.

Ottewell, P. D., A. Varro, G. J. Dockray, C. M. Kirton, A. J. M. Watson, T. C. Wang, R. Dimaline and D. M. Pritchard (2005b). COOH-terminal 26-amino acid residues of progastrin are sufficient for stimulation of mitosis in murine colonic epithelium in vivo. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(3): G541-549.

Ouchida, M., T. Ohno, Y. Fujimura, V. N. Rao and E. S. Reddy (1995). Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. Oncogene **11**(6): 1049-54.

Paloheimo, L. I. and J. F. Rehfeld (1995). Quantitation of procholecystokinin and its products in plasma by processing-independent analysis. Clinica Chimica Acta **238**(1): 21.

Paloheimo LI, R. J. (1994). A processing-independent assay for human procholecystokinin and its products. Clin Chim Acta. **229**(1-2): 49-65.

Paulussen, M., B. Frohlich and H. Jurgens (2001). Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. Paediatr Drugs **3**(12): 899-913.

Pavlakovic, H., V. Von Schutz, J. Rossler, E. Koscielniak, W. Havers and L. Schweigerer (2001). Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. Int J Cancer **92**(5): 756-60.

Pelengaris, S., M. Khan and G. Evan (2002). C-MYC: more than just a matter of life and death. Nature Reviews Cancer **2**(10): 764.

Pereira, R., C. T. Quang, I. Lesault, H. Dolznig, H. Beug and J. Ghysdael (1999). FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. Oncogene **18**(8): 1597-608.

Perlman, E. J., P. S. Dickman, F. B. Askin, H. E. Grier, J. S. Miser and M. P. Link (1994). Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. Hum Pathol **25**(3): 304-7.

- Peter, M., J. Couturier, H. Pacquement, J. Michon, G. Thomas, H. Magdelenat and O. Delattre (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. Oncogene **14**(10): 1159-64.
- Petermann, R., B. M. Mossier, D. N. Aryee, V. Khazak, E. A. Golemis and H. Kovar (1998). Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hsRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. Oncogene **17**(5): 603-10.
- Pfleiderer, C., A. Zoubek, B. Gruber, M. Kronberger, P. F. Ambros, T. Lion, F. M. Fink, H. Gadner and H. Kovar (1995). Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. Int J Cancer **64**(2): 135-9.
- Piiper, A., R. Elez, S. J. You, B. Kronenberger, S. Loitsch, S. Roche and S. Zeuzem (2003). Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the epidermal growth factor receptor, Yes, and protein kinase C. Signal amplification at the level of Raf by activation of protein kinase Cepsilon. J Biol Chem **278**(9): 7065-72.
- Pollak, M. N., E. S. Schernhammer and S. E. Hankinson (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. Nature Reviews Cancer **4**(7): 505.
- Powell, J. (1998). Enhanced concatemer cloning-a modification to the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique. Nucl. Acids Res. **26**(14): 3445-3446.
- Powers, C. A., M. Mathur, B. M. Raaka, D. Ron and H. H. Samuels (1998). TLS (Translocated-in-Liposarcoma) Is a High-Affinity Interactor for Steroid, Thyroid Hormone, and Retinoid Receptors. Mol Endocrinol **12**(1): 4-18.
- Prasad, D. D., M. Ouchida, L. Lee, V. N. Rao and E. S. Reddy (1994). TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. Oncogene **9**(12): 3717-29.
- Prieur, A., F. Tirode, P. Cohen and O. Delattre (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**(16): 7275-83.
- Ramakrishnan, R., Y. Fujimura, J. P. Zou, F. Liu, L. Lee, V. N. Rao and E. S. Reddy (2004). Role of protein-protein interactions in the antiapoptotic function of EWS-Fli-1. Oncogene.
- Rehfeld, J. F. (1978). Immunochemical studies on cholecystokinin. II. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and hog. J Biol Chem **253**(11): 4022-30.
- Rehfeld, J. F. (1998a). Accurate measurement of cholecystokinin in plasma. Clin Chem **44**(5): 991-1001.
- Rehfeld, J. F. (1998b). How to measure cholecystokinin in tissue, plasma and cerebrospinal fluid. Regul Pept **78**(1-3): 31-9.

- Rehfeld, J. F., J. R. Bungaard, L. Friis-Hansen and J. P. Goetze (2003). On the tissue-specific processing of procholecystokinin in the brain and gut - a short review. J Physiol Pharmacol **54 Suppl 4**: 73-9.
- Rehfeld, J. F., G. Sun, T. Christensen and J. G. Hillingsø (2001). The Predominant Cholecystokinin in Human Plasma and Intestine Is Cholecystokinin-33. J Clin Endocrinol Metab **86**(1): 251-258.
- Reubi, J. C., P. Koefoed, T. O. Hansen, E. Stauffer, D. Rauch, F. C. Nielsen and J. F. Rehfeld (2004). Procholecystokinin as marker of human Ewing sarcomas. Clin Cancer Res **10**(16): 5523-30.
- Reynolds, N. A., A. Blum, K. Kitagawa and M. C. Beinfeld (2006). Inhibition of PC5 expression decreases CCK secretion and increases PC2 expression. Peptides **27**(4): 901.
- Ricotti, E., F. Fagioli, E. Garelli, C. Linari, N. Crescenzo, A. L. Horenstein, P. Pistamiglio, S. Vai, M. Berger, L. C. di Montezemolo, E. Madon and G. Basso (1998). c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. Blood **91**(7): 2397-405.
- Riley, R. D., S. A. Burchill, K. R. Abrams, D. Heney, P. C. Lambert, D. R. Jones, A. J. Sutton, B. Young, A. J. Wailoo and I. J. Lewis (2003). A systematic review and evaluation of the use of tumour markers in paediatric oncology: Ewing's sarcoma and neuroblastoma. Health Technol Assess **7**(5): 1-162.
- Rodriguez-Galindo, C., S. L. Spunt and A. S. Pappo (2003). Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. Med Pediatr Oncol **40**(5): 276-87.
- Rorie, C. J., V. D. Thomas, P. Chen, H. H. Pierce, J. P. O'Bryan and B. E. Weissman (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. Cancer Res **64**(4): 1266-77.
- Rosow, K. L. and R. Janknecht (2001). The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. Cancer Res **61**(6): 2690-5.
- Rozengurt, E. and J. H. Walsh (2001). Gastrin, CCK, Signaling, and cancer. Annual Review of Physiology **63**(1): 49-76.
- Ruzinova, M. B. and R. Benezra (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. Trends in Cell Biology **13**(8): 410.
- Saeed, A., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. Biotechniques **34**(2): 374-8.
- Sanceau, J., J. Hiscott, O. Delattre and J. Wietzerbin (2000). IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. Oncogene **19**(30): 3372-83.

- Sarrazin, S., J. Starck, C. Gonnet, A. Doubeikovski, F. Melet and F. Morle (2000). Negative and Translation Termination-Dependent Positive Control of FLI-1 Protein Synthesis by Conserved Overlapping 5' Upstream Open Reading Frames in Fli-1 mRNA. Mol. Cell. Biol. **20**(9): 2959-2969.
- Scotlandi, K., S. Avnet, S. Benini, M. C. Manara, M. Serra, V. Cerisano, S. Perdichizzi, P. L. Lollini, C. De Giovanni, L. Landuzzi and P. Picci (2002). Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. Int J Cancer **101**(1): 11-6.
- Scotlandi, K., N. Baldini, V. Cerisano, M. C. Manara, S. Benini, M. Serra, P. L. Lollini, P. Nanni, G. Nicoletti, G. Bernard, A. Bernard and P. Picci (2000). CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. Cancer Res **60**(18): 5134-42.
- Scotlandi, K., S. Benini, P. Nanni, P. L. Lollini, G. Nicoletti, L. Landuzzi, M. Serra, M. C. Manara, P. Picci and N. Baldini (1998). Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. Cancer Res **58**(18): 4127-31.
- Scotlandi, K., S. Benini, M. Sarti, M. Serra, P. L. Lollini, D. Maurici, P. Picci, M. C. Manara and N. Baldini (1996). Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. Cancer Res **56**(20): 4570-4.
- Scotlandi, K., M. C. Manara, G. Nicoletti, P. L. Lollini, S. Lukas, S. Benini, S. Croci, S. Perdichizzi, D. Zambelli, M. Serra, C. Garcia-Echeverria, F. Hofmann and P. Picci (2005). Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. Cancer Res **65**(9): 3868-76.
- Schaer, J. C. and J. C. Reubi (1999). High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenic stem cell tumors: comparison with CCK-A and CCK-B receptor contents. J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 233-9.
- Schmitz, F., M. N. Goke, J. M. Otte, H. Schrader, B. Reimann, M. L. Kruse, E. G. Siegel, J. Peters, K. H. Herzig, U. R. Folsch and W. E. Schmidt (2001a). Cellular expression of CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in human gastric mucosa. Regul Pept **102**(2-3): 101-10.
- Schmitz, F., J. M. Otte, H. U. Stechele, B. Reimann, T. Banasiewicz, U. R. Folsch, W. E. Schmidt and K. H. Herzig (2001b). CCK-B/gastrin receptors in human colorectal cancer. Eur J Clin Invest **31**(9): 812-20.
- Schneider BS, Helson L, Monahan JW and F. JM (1989). Expression of the cholecystokinin gene by cultured human primitive neuroepithelioma cell lines. J Clin Endocrinol Metab. **69**(2): 411-9.
- Schulz, S., C. Rocken and C. Mawrin (2005). Immunohistochemical Localization of CCK1 Cholecystokinin Receptors in Normal and Neoplastic Human Tissues. J Clin Endocrinol Metab.
- Sekyi-Otu, A., R. Bell, C. Ohashi, M. Pollak and I. Andrulis (1995). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. Cancer Res. **55**(1): 129-134.

- Seva, C., C. J. Dickinson and T. Yamada (1994). Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. Science **265**(5170): 410-2.
- Shing, D. C., D. J. McMullan, P. Roberts, K. Smith, S. F. Chin, J. Nicholson, R. M. Tillman, P. Ramani, C. Cullinane and N. Coleman (2003). FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. Cancer Res **63**(15): 4568-76.
- Siligan, C., J. Ban, R. Bachmaier, L. Spahn, M. Kreppel, K. L. Schaefer, C. Poremba, D. N. Aryee and H. Kovar (2005). EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. Oncogene **24**(15): 2512-24.
- Silvany, R. E., S. Eliazer, N. C. Wolff and R. L. Ilaria, Jr. (2000). Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. Oncogene **19**(39): 4523-30.
- Singh, P., X. Lu, S. Cobb, B. T. Miller, N. Tarasova, A. Varro and A. Owlia (2003). Progastrin1-80 stimulates growth of intestinal epithelial cells in vitro via high-affinity binding sites. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(2): G328-39.
- Singh, P., A. Owlia, R. Espejo and B. Dai (1995). Novel gastrin receptors mediate mitogenic effects of gastrin and processing intermediates of gastrin on Swiss 3T3 fibroblasts. Absence of detectable cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B receptors. J Biol Chem **270**(15): 8429-38.
- Smith, J. P., A. P. Fantaskey, G. Liu and I. S. Zagon (1995). Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer. Am J Physiol **268**(1 Pt 2): R135-41.
- Smith, J. P., W. B. Stanley, M. F. Verderame and I. S. Zagon (2004). The functional significance of the cholecystokinin-C (CCK-C) receptor in human pancreatic cancer. Pancreas **29**(4): 271-7.
- Smith, J. P., M. F. Verderame, P. McLaughlin, M. Martenis, E. Ballard and I. S. Zagon (2002). Characterization of the CCK-C (cancer) receptor in human pancreatic cancer. Int J Mol Med **10**(6): 689-94.
- Smithey, B. E., A. S. Pappo and D. A. Hill (2002). C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. Am J Surg Pathol **26**(4): 486-92.
- Sohn, H. W., E. Y. Choi, S. H. Kim, I. S. Lee, D. H. Chung, U. A. Sung, D. H. Hwang, S. S. Cho, B. H. Jun, J. J. Jang, J. G. Chi and S. H. Park (1998). Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells. Am J Pathol **153**(6): 1937-45.
- Song, I., D. R. Brown, R. N. Wiltshire, I. Gantz, J. M. Trent and T. Yamada (1993). The human gastrin/cholecystokinin type B receptor gene: alternative splice donor site in exon 4 generates two variant mRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9085-9.
- Sorensen, P. H., S. L. Lessnick, D. Lopez-Terrada, X. F. Liu, T. J. Triche and C. T. Denny (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. Nat Genet **6**(2): 146-51.



- Spahn, L., R. Petermann, C. Siligan, J. A. Schmid, D. N. Aryee and H. Kovar (2002). Interaction of the EWS NH2 terminus with BARD1 links the Ewing's sarcoma gene to a common tumor suppressor pathway. Cancer Res **62**(16): 4583-7.
- Spahn, L., C. Siligan, R. Bachmaier, J. A. Schmid, D. N. Aryee and H. Kovar (2003). Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein. Oncogene **22**(44): 6819-29.
- Spyropoulos, D. D., P. N. Pharr, K. R. Lavenburg, P. Jackers, T. S. Papas, M. Ogawa and D. K. Watson (2000). Hemorrhage, Impaired Hematopoiesis, and Lethality in Mouse Embryos Carrying a Targeted Disruption of the Fli1 Transcription Factor. Mol. Cell. Biol. **20**(15): 5643-5652.
- Staege, M. S., C. Hutter, I. Neumann, S. Foja, U. E. Hattenhorst, G. Hansen, D. Afar and S. E. Burdach (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. Cancer Res **64**(22): 8213-21.
- Stiller, C. A. and D. M. Parkin (1996). Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. Br Med Bull **52**(4): 682-703.
- Strammiello, R., S. Benini, M. C. Manara, S. Perdichizzi, M. Serra, E. Spisni, P. Picci and K. Scotlandi (2003). Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenic properties of Ewing's sarcoma cells. Horm Metab Res **35**(11-12): 675-84.
- Sun, S.-Y., L. M. Rosenberg, X. Wang, Z. Zhou, P. Yue, H. Fu and F. R. Khuri (2005). Activation of Akt and eIF4E Survival Pathways by Rapamycin-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Inhibition. Cancer Res **65**(16): 7052-7058.
- Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. Gene **238**(2): 291.
- Takahashi, A., F. Higashino, M. Aoyagi, K. Yoshida, M. Itoh, S. Kyo, T. Ohno, T. Taira, H. Ariga, K. Nakajima, M. Hatta, M. Kobayashi, H. Sano, T. Kohgo and M. Shindoh (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. Cancer Res **63**(23): 8338-44.
- Takuwa, N., Y. Fukui and Y. Takuwa (1999). Cyclin D1 Expression Mediated by Phosphatidylinositol 3-Kinase through mTOR-p70S6K-Independent Signaling in Growth Factor-Stimulated NIH 3T3 Fibroblasts. Mol. Cell. Biol. **19**(2): 1346-1358.
- Tamir, A., J. Howard, R. R. Higgins, Y. J. Li, L. Berger, E. Zacksenhaus, M. Reis and Y. Ben-David (1999). Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. Mol Cell Biol **19**(6): 4452-64.
- Tanaka, K., T. Iwakuma, K. Harimaya, H. Sato and Y. Iwamoto (1997). EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. J Clin Invest **99**(2): 239-47.
- Teitell, M. A., A. D. Thompson, P. H. Sorensen, H. Shimada, T. J. Triche and C. T. Denny (1999). EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. Lab Invest **79**(12): 1535-43.

- Thompson, A. D., M. A. Teitell, A. Arvand and C. T. Denny (1999). Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. Oncogene **18**(40): 5506-13.
- Thumwood, C. M., J. Hong and G. S. Baldwin (1991). Inhibition of cell proliferation by the cholecystokinin antagonist L-364,718. Exp Cell Res **192**(1): 189-92.
- Todisco, A., Y. Takeuchi, C. Seva, C. J. Dickinson and T. Yamada (1995). Gastrin and glycine-extended progastrin processing intermediates induce different programs of early gene activation. J Biol Chem **270**(47): 28337-41.
- Todisco, A., Y. Takeuchi, A. Urumov, J. Yamada, V. M. Stepan and T. Yamada (1997). Molecular mechanisms for the growth factor action of gastrin. Am J Physiol **273**(4 Pt 1): G891-8.
- Torchia, E. C., S. Jaishankar and S. J. Baker (2003). Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. Cancer Res **63**(13): 3464-8.
- Toretsky, J. A., Y. Connell, L. Neckers and N. K. Bhat (1997a). Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. J Neurooncol **31**(1-2): 9-16.
- Toretsky, J. A., T. Kalebic, V. Blakesley, D. LeRoith and L. J. Helman (1997b). The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. J Biol Chem **272**(49): 30822-7.
- Turc-Carel, C., I. Philip, M. P. Berger, T. Philip and G. M. Lenoir (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): 1-19.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. PNAS **98**(9): 5116-5121.
- Uranishi, H., T. Tetsuka, M. Yamashita, K. Asamitsu, M. Shimizu, M. Itoh and T. Okamoto (2001). Involvement of the Pro-oncoprotein TLS (Translocated in Liposarcoma) in Nuclear Factor-kappa B p65-mediated Transcription as a Coactivator. J. Biol. Chem. **276**(16): 13395-13401.
- Urano, F., A. Umezawa, W. Hong, H. Kikuchi and J. Hata (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**(2): 608-12.
- Uren, A., M. S. Merchant, C. J. Sun, M. I. Vitolo, Y. Sun, M. Tsokos, P. B. Illei, M. Ladanyi, A. Passaniti, C. Mackall and J. A. Toretsky (2003). Beta-platelet-derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. Oncogene **22**(15): 2334-42.
- Velculescu, V. (1999). Tantalizing transcriptomes--SAGE and its use in global gene expression analysis. Science **286**(5444): 1491-2.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. Nature Reviews Cancer **2**(7): 489.

- Wai, D. H., K. L. Schaefer, A. Schramm, E. Korsching, F. Van Valen, T. Ozaki, W. Boecker, L. Schweigerer, B. Dockhorn-Dworniczak and C. Poremba (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. Int J Oncol **20**(3): 441-51.
- Wang, W., N. P. Birch and M. C. Beinfeld (1998). Prohormone convertase 1 (PC1) when expressed with pro cholecystokinin (pro CCK) in L cells performs three endoproteolytic cleavages which are observed in rat brain and in CCK-expressing endocrine cells in culture, including the production of glycine and arginine extended CCK8. Biochem Biophys Res Commun **248**(3): 538-41.
- Wank, S. A. (1998). G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family. Am J Physiol **274**(4 Pt 1): G607-13.
- Wanzel, M., S. Herold and M. Eilers (2003). Transcriptional repression by Myc. Trends in Cell Biology **13**(3): 146.
- Weber, K. L. (2002). Current concepts in the treatment of Ewing's sarcoma. Expert Rev Anticancer Ther **2**(6): 687-94.
- Wei, G., C. R. Antonescu, E. de Alava, D. Leung, A. G. Huvos, P. A. Meyers, J. H. Healey and M. Ladanyi (2000). Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. Cancer **89**(4): 793-9.
- West, D. C. (2000). Ewing sarcoma family of tumors. Curr Opin Oncol **12**(4): 323-9.
- West, D. C., H. E. Grier, M. M. Swallow, G. D. Demetri, L. Granowetter and J. Sklar (1997). Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. J Clin Oncol **15**(2): 583-8.
- Williams, J. A., M. D. Sans, M. Tashiro, C. Schafer, M. J. Bragado and A. Dabrowski (2002). Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. Pharmacol Toxicol **91**(6): 297-303.
- Wu, T. and H. L. Wang (1996a). The excitatory effect of cholecystokinin on rat neostriatal neurons: ionic and molecular mechanisms. Eur J Pharmacol **307**(2): 125-32.
- Wu, T. and H. L. Wang (1996b). G alpha q/11 mediates cholecystokinin activation of the cationic conductance in rat substantia nigra dopaminergic neurons. J Neurochem **66**(3): 1060-6.
- Wu, V., M. Yang, J. A. McRoberts, J. Ren, R. Seensalu, N. Zeng, M. Dagrak, M. Birnbaumer and J. H. Walsh (1997). First intracellular loop of the human cholecystokinin-A receptor is essential for cyclic AMP signaling in transfected HEK-293 cells. J Biol Chem **272**(14): 9037-42.
- Yabe, H., M. Fukuma, F. Urano, K. Yoshida, S. Kato, Y. Toyama, J. Hata and A. Umezawa (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**(1): 61-71.

- Yang, C. H., J. Ford, Y. Karelina, A. Shulkes, S. D. Xiao and G. S. Baldwin (2001). Identification of a 70-kDa gastrin-binding protein on DLD-1 human colorectal carcinoma cells. Int J Biochem Cell Biol **33**(11): 1071-9.
- Yang, L., H. A. Chansky and D. D. Hickstein (2000). EWS.Fli-1 fusion protein interacts with hyperphosphorylated RNA polymerase II and interferes with serine-arginine protein-mediated RNA splicing. J Biol Chem **275**(48): 37612-8.
- Yee, D., R. E. Favoni, G. S. Lebovic, F. Lombana, D. R. Powell, C. P. Reynolds and N. Rosen (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**(6): 1806-14.
- Yi, H., Y. Fujimura, M. Ouchida, D. D. Prasad, V. N. Rao and E. S. Reddy (1997). Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. Oncogene **14**(11): 1259-68.
- Zebedee, Z. and E. Hara (2001). Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. Oncogene **20**(58): 8317-8325.
- Zhang, D., A. J. Paley and G. Childs (1998). The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. J Biol Chem **273**(29): 18086-91.
- Zinszner, H., J. Sok, D. Immanuel, Y. Yin and D. Ron (1997). TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. J Cell Sci **110** (Pt 15): 1741-50.
- Zoubek, A., B. Dockhorn-Dworniczak, O. Delattre, H. Christiansen, F. Niggli, I. Gatterer-Menz, T. L. Smith, H. Jurgens, H. Gadner and H. Kovar (1996). Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? J Clin Oncol **14**(4): 1245-51.
- Zoubek, A., R. Ladenstein, R. Windhager, G. Amann, G. Fischmeister, L. Kager, D. Jugovic, P. F. Ambros, H. Gadner and H. Kovar (1998). Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. Int J Cancer **79**(1): 56-60.
- Zoubek, A., C. Pfliederer, M. Salzer-Kuntschik, G. Amann, R. Windhager, F. M. Fink, E. Koscielniak, O. Delattre, S. Strehl, P. F. Ambros and et al. (1994). Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. Br J Cancer **70**(5): 908-13.
- Zucman-Rossi, J., M. A. Batzer, M. Stoneking, O. Delattre and G. Thomas (1997). Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. Hum Genet **99**(3): 357-63.
- Zucman, J., T. Melot, C. Desmaze, J. Ghysdael, B. Plougastel, M. Peter, J. M. Zucker, T. J. Triche, D. Sheer, C. Turc-Carel and et al. (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. Embo J **12**(12): 4481-7.
- Zwerner, J. P., J. Guimbellot and W. A. May (2003). EWS/FLI function varies in different cellular backgrounds. Exp Cell Res **290**(2): 414-9.

Zwerner, J. P. and W. A. May (2001). PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. Oncogene **20**(5): 626-33.