



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca, España
Tel. +34 923 29 47 20
Fax +34 923 29 47 43
www.cicancer.org

TESIS DOCTORAL

Análisis de la función de EWS-FLI1 en la patogenia del Sarcoma de Ewing

David Herrero Martín

Salamanca 2008



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca, España
Tel. +34 923 29 47 20
Fax +34 923 29 47 43
www.cicancer.org

D. ENRIQUE DE ÁLAVA CASADO, Doctor en Medicina y Cirugía e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) de Salamanca,

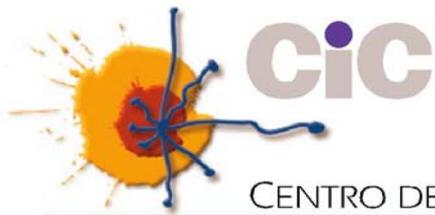
CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo mi dirección por el licenciado en Biología **D. DAVID HERRERO MARTÍN** titulado “Análisis de la función de EWS-FLI1 en la patogenia del Sarcoma de Ewing”, reúne a mi juicio las condiciones de originalidad y contenido requeridas para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 4 de Noviembre de 2008.

Firmado Dr. Enrique de Álava Casado

Vº Bº: Dr. Rogelio González Sarmiento
Catedrático Departamento de Medicina
Tutor del presente trabajo de doctorado.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
DEL CÁNCER

Universidad de Salamanca-CSIC



Campus Miguel de Unamuno
37007 Salamanca, España
Tel. +34 923 29 47 20
Fax +34 923 29 47 43
www.cicancer.org

Este proyecto de tesis ha sido financiado por:

Programa de Formación de Personal Investigador de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (2003-2007)

Fondo de Investigación Sanitaria, mediante los proyectos “*Valor patogenético de la expresión de c-kit en el Tumor de Ewing. Una posible diana terapéutica*” (PI020828) y “*Patología Molecular de los sarcomas, con énfasis en el Tumor de Ewing: diseño y validación de nuevas herramientas diagnósticas y de individualización terapéutica*” (PI052524).

La Red de Excelencia de la Comunidad Europea EUROBONET, con el Proyecto Europeo “*Molecular Pathology of Bone Tumors*” (FP6-2004-Lifescihealth-5, 018814).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Sarcomas	2
2. Tumores de la familia del Sarcoma de Ewing	8
3. ARN de interferencia	21
4. EWS	31
5. FLI-1	33
6. Fusiones génicas	36
7. EWS-FLI1	45
8. Contexto celular y origen del Sarcoma de Ewing	55
OBJETIVOS	69
MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. Líneas celulares	72
2. Cultivos celulares	76
3. ARN de interferencia	81
4. Métodos de transfección	91
5. Técnicas de detección de proteínas	99
6. Técnicas de detección de ácidos nucleicos	122
7. Hibridación genómica comparada (CGH array)	131
8. Técnicas de análisis de la expresión génica	148
9. Técnicas de interacción ADN-proteínas	154
10. Técnicas de citometría de flujo	157
11. Técnicas <i>in vitro</i>	160
12. Técnicas de inmunohistoquímica	165
13. Modelo animal para el estudio <i>in vivo</i>	170
14. Técnicas de trabajo con células madre mesenquimales humanas adultas	171

15. Tratamiento estadístico	181
<u>RESULTADOS</u>	<u>182</u>
1. Generación de un sistema estable de interferencia de la fusión EWS-FLI1 del SE	183
2. Efectos de la inhibición de EWS-FLI1 en la línea de SE, TC71. Caracterización del modelo shARNi.	190
3. Efectos de la inhibición de EWS-FLI1 en otros clones shARNi de TC71. Especificidad de la interferencia.	198
4. Estudio de los efectos de la interferencia de la fusión EWS-FLI1 tipo 3 (10-6) en la línea celular de SE, A4573.	202
5. Análisis del estatus genómico del clon shARNi	205
6. Estudio de la vía de IGF1/IGF1R	207
7. Análisis de la capacidad de diferenciación del clon shARNi	211
8. Análisis de la expresión génica del clon shARNi	213
9. Validación del análisis de la expresión génica del clon shARNi	220
10. TOPK es una nueva diana directa de EWS-FLI1 implicada en proliferación	225
11. Estatus de genes sensores y reparadores de daño en el ADN al inhibir TOPK y en el clon shARNi	235
12. Estudio proteómico del clon shARNi	237
13. La inhibición de EWS-FLI1 frena el desarrollo tumoral en un modelo murino de xenotransplante	245
14. Génesis del SE. Inducción de la fusión EWS-FLI1 en hMSCs	250
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>260</u>
<u>1. Impacto de las fusiones EWS-ets en la biología del Sarcoma de Ewing</u>	<u>261</u>
2. La reducción de forma estable de los niveles de EWS-FLI1 provoca un incremento en la fracción apoptótica, una reducción de la capacidad migratoria y de transformación oncogénica	264

3. Análisis de la expresión génica del clon shARNi	267
4. La interferencia de EWS-FLI1 reprime los niveles de IGF1 y sensibiliza a la acción de inhibidores de la vía de transducción de señales de IGF1-IGF1R	269
5. Análisis proteómico del clon shARNi	271
6. La inhibición de EWS-FLI1 frena el desarrollo tumoral en un modelo murino de xenotransplante	274
7. TOPK es una nueva diana directa de EWS-FLI1 involucrada en proliferación y motilidad	276
8. LRRC48, una diana directa de TOPK	280
9. Otras dianas putativas de EWS-FLI1	282
10. Origen del SE. Células madre mesenquimales	284
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>290</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>292</u>
<u>Abreviaturas</u>	<u>347</u>

INTRODUCCIÓN

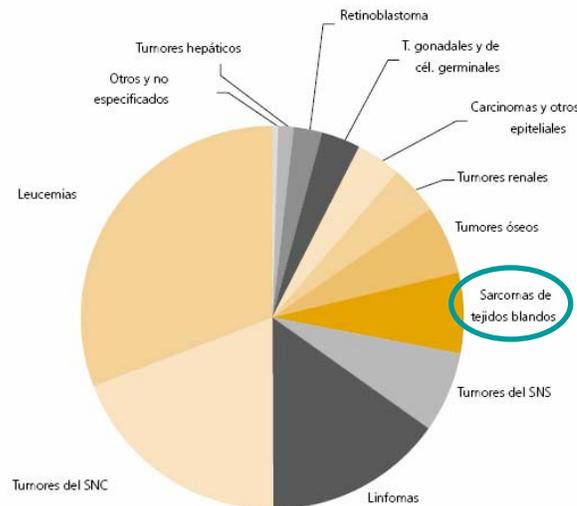
1.Sarcomas.

Bajo el término de sarcomas se agrupa un conjunto heterogéneo de tumores malignos surgidos a partir de tejidos con diferenciación mesenquimal. El término sarcoma procede del griego y significa literalmente tumores (-oma) de la carne (-sarcos). Los sarcomas se derivan de la capa embrionaria mesodérmica en contraposición a los carcinomas, de origen ecto y/o endodérmico aunque en algunos de ellos el origen no está totalmente confirmado. Histológicamente diversos, los sarcomas recapitulan por regla general características de tejidos conectivos tales como el muscular, adiposo, cartilaginoso u óseo. Algunos sarcomas se manifiestan con mayor frecuencia durante la adolescencia, como el sarcoma de Ewing (SE) o el sarcoma sinovial y en cambio otros como el condrosarcoma aparecen en torno a los 65 años de edad.

Los sarcomas suponen un 5-6% del total de tumores adultos y en torno a un 20% de los pediátricos. En España se diagnostican al año unos 1885 casos de tumores infantiles considerando aquellos por debajo de los 15 años y de acuerdo a las 12 grandes categorías diagnósticas establecidas por la *International Classification of Disease for Oncology* (ICD-O) de la OMS. Bajo la categoría de sarcomas de tejidos blandos la incidencia es de 9,4 casos por millón de habitantes y año (1). En los EEUU la cifra alcanza los 11000 casos diagnosticados por año (2). Este grupo de tumores se asocia a altos índices de mortalidad y morbilidad.

Figura 1. Distribución de tumores infantiles por grandes categorías diagnósticas en España (1).

FIGURA 8.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES INFANTILES POR GRANDES CATEGORÍAS DIAGNÓSTICAS EN ESPAÑA



Fuente: International Incidence of Childhood Cancer.

La etiología de los sarcomas es poco conocida. Hasta el momento se han descrito cuatro síndromes de predisposición genética asociados a sarcomas:

- a) Las mutaciones en el gen retinoblastoma (RB) se han asociado a una mayor incidencia de osteosarcomas (3).
- b) Los pacientes con el síndrome Li-Fraumeni y mutaciones germinales de p53 tienen una incidencia superior de distintos sarcomas antes de los 45 años (4,5).
- c) La pérdida del gen NF1 en pacientes afectados por neurofibromatosis 1 facilita en un 50% de los casos la aparición del tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos (MPNST) (6).
- d) Las mutaciones en la línea germinal del gen *c-kit* se asocian con el desarrollo del sarcoma del estroma gastrointestinal (GIST) (7).

Como factores ambientales probados causantes de sarcomas cabe mencionar la exposición a la radiación ionizante y al cloruro de vinilo. Los sarcomas suelen tardar en aparecer unos 7 años en pacientes expuestos a sesiones de radioterapia tras el fin de las mismas así como en afectados por contaminación radiactiva, estando su incidencia directamente ligada a la dosis de exposición (5000cGy) (8). En el caso del cloruro de vinilo, usado en la fabricación de plásticos, es causa establecida de angiosarcoma hepático (9).

El descubrimiento de translocaciones cromosómicas asociadas a tipos histológicos específicos ha cambiado la clasificación de estas neoplasias basada con anterioridad en el sitio de localización de las mismas; así, por citar por un ejemplo, lo que en su momento se había catalogado como dos entidades tumorales diferentes resultan ser la misma pero con diferentes localizaciones, nos referimos al fibrosarcoma congénito y el nefroma mesoblástico congénito, variante celular, que comparten la fusión ETV6-NTRK3, además de ser morfológicamente similares (10). Más que definirse de acuerdo a su lugar de origen como los carcinomas, los sarcomas se definen de acuerdo a su tipo de diferenciación y a sus características patológicas y moleculares.

Dentro de los sarcomas se pueden distinguir dos grandes grupos en función del estado de su cariotipo. Sarcomas como el SE, el rhabdomyosarcoma alveolar o el sarcoma sinovial cuentan con un cariotipo relativamente sencillo con un cierto grado de aneuploidia y se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas recíprocas que dan lugar a proteínas de fusión, necesarias pero no suficientes por sí solas para dar lugar a estas neoplasias. La colaboración de

otros eventos secundarios en un ambiente celular permisivo a partir de una célula madre mesenquimal o célula progenitora parece condición necesaria para la aparición de este tipo de neoplasias.

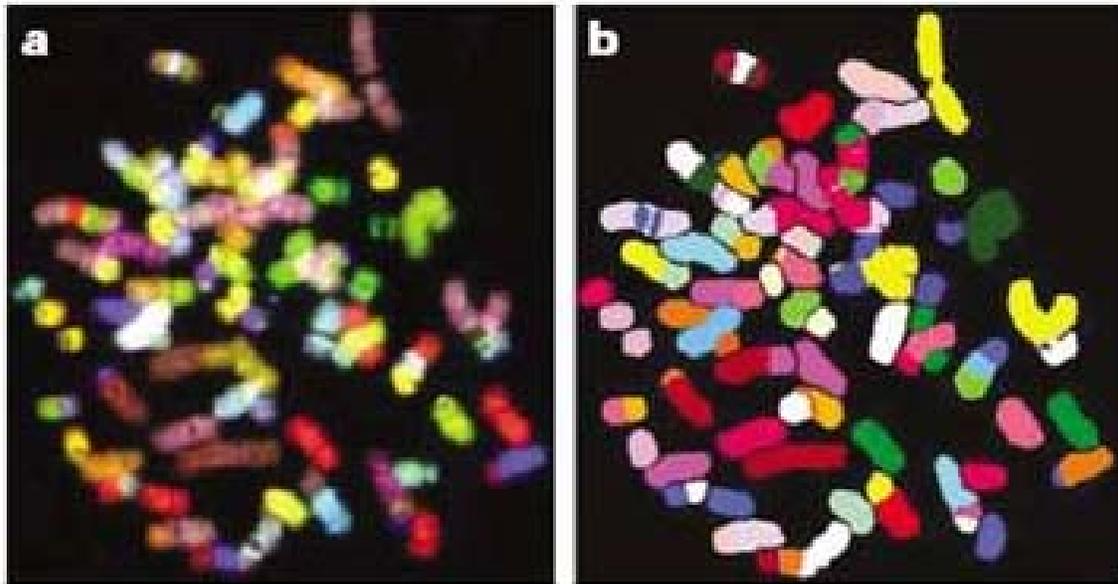
Las fusiones presentan variantes en función de los genes involucrados y las mismas influyen notablemente en el pronóstico del sarcoma (11, 12, 13). Un primer efecto de las proteínas quiméricas, generadas por las fusiones, sería el de paralizar el proceso de diferenciación de la célula primigenia redireccionándola hacia un nuevo tipo de linaje, por ejemplo lo que sucede al transfectar la fusión PAX3-FKHR, característica del rabdomiosarcoma alveolar, en la línea celular fibroblástica NIH3T3 rediriéndola hacia un fenotipo miogénico (14). Se crearía de esta forma un ambiente premaligno específico que en el contexto celular adecuado necesitaría tan solo un segundo *hit* o evento para dar lugar al tumor (15). También se ha postulado que las fusiones aparecerían en un rango celular más amplio no limitado tan solo a células madre, en momentos muy concretos del programa de diferenciación de los tejidos conectivos, en un modelo semejante al de la aparición de las leucemias, en las cuales la translocación detiene el proceso de diferenciación en alguna fase de la hematopoyesis y posteriormente un segundo agente actúa para inducir de pleno el fenotipo leucémico (16, 17).

Las alteraciones secundarias en este tipo de sarcomas bien sean mutaciones, deleciones, etc.... no suelen ser muy frecuentes, aunque probablemente se producen durante la progresión del tumor como sucede por ejemplo en el SE con la pérdida de p53 o la del locus INK4A, asociadas ambas a un peor pronóstico (18,19).

Un segundo grupo de sarcomas son aquellos que presentan un cariotipo complejo y sin translocaciones específicas. Algunos ejemplos de este subgrupo son el leiomioma, el osteosarcoma o el histiocitoma maligno fibroso. Son sarcomas con un alto grado de inestabilidad cromosómica con numerosas alteraciones en los mecanismos de reparación del daño al ADN como por ejemplo mutaciones en las vías de p53 y Rb o en los puntos de control del ciclo celular. Son el tipo de sarcomas que, con más frecuencia suelen aparecer en pacientes tratados con altas dosis de radioterapia (20, 21). Existe un modelo murino de este tipo de sarcomas que es defectuoso en los mecanismos de unión no homóloga de reparación del ADN debido a una inactivación de la ligasa 4; cuando se cruza con una estirpe nula para INK4/Arf da lugar no a un linfoma sino a un sarcoma con numerosas aberraciones cromosómicas como cambios en el número de copias, amplificaciones de regiones ricas en oncogenes o deleciones de genes supresores tumorales (22). Las amplificaciones

en este tipo de sarcomas afectan a genes tales como CDK4 o MDM2 o bien involucran regiones más amplias como es el caso de 1q en osteosarcomas en los cuales se van descubriendo posibles genes candidatos (23). Nuevas técnicas como las matrices de hibridación genómica comparada (*CGH array*) están facilitando el avance en el conocimiento de las alteraciones secundarias implicadas en las primeras fases de la tumorigénesis de este grupo en particular y del conjunto de sarcomas en general y permiten el descubrimiento de posibles genes candidatos, ya sean oncogenes o supresores tumorales.

Figura 2. Cariotipo espectral (SKY) de una metafase de un sarcoma citogenéticamente complejo (osteosarcoma). A) Imagen original B) Imagen procesada digitalmente. Cada cromosoma se identifica con un color distinto y las numerosas translocaciones existentes se reconocen como transiciones colorimétricas. (Figura adaptada de [Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer. 2003 Sep;3\(9\):685-94. Review](#)).



Los defectos observados en las vías de señalización en los sarcomas se pueden catalogar en función de su frecuencia. Dos de las alteraciones más destacadas son las siguientes:

- pérdidas de p16 o Rb, lo que implica progresión en el ciclo celular y entrada en fase S del mismo (24).
- mutaciones en p53 y amplificación de MDM2 (25, 26).

Importantes vías de señalización están activadas constitutivamente en los sarcomas como la de IGF1-IGF1R en rhabdomyosarcomas, leiomyosarcomas y SE, la de PDGFR en osteosarcomas y tumores desmoplásicos de células redondas, SCF/c-KIT en GIST y SE o la vía del receptor de c-MET en el sarcoma sinovial y los rhabdomyosarcomas (27, 28, 29, 30). En la gran mayoría de ocasiones la activación de estas vías de señalización no se realiza de forma directa por parte de las proteínas de fusión pero en ciertos sarcomas sí se ha comprobado este hecho, como sucede por ejemplo en el fibrosarcoma congénito, en el que la translocación t(12,15)(p13;q25) fusiona el factor de transcripción ETV6 con la tirosina quinasa NTRK3 afectando a la vía de señalización de dicha proteína-quinasa (31).

En algunos supuestos las alteraciones presentes en lesiones benignas previas cursan también en los sarcomas derivados de las mismas como es el caso de la pérdida de neurofibromina que ocurre en primera instancia en el tumor benigno neurofibroma plexiforme y en el sarcoma relacionado con él (o derivado del) mismo, el MPNST (32). Por contra también se da el caso de lesiones benignas como los leiomiomas y lipomas con una alta incidencia de reordenamientos recurrentes en el cromosoma 12q en torno al gen HMGIC (*high mobility protein group gene*) que sin embargo no están presentes en los leiomyosarcomas y liposarcomas (33).

Existen pocos modelos animales de sarcomas. Uno de los mismos logra recrear un liposarcoma mixoide caracterizado por la fusión entre FUS con el factor de transcripción inducible por estrés CHOP (DDIT3) que interfiere con el proceso de adipogénesis. A pesar de que la fusión se expresa en varios tipos celulares tan sólo se genera el sarcoma en el tejido adiposo, lo que demuestra la gran importancia del contexto celular en el origen de estas neoplasias (34). Sin embargo no es nada fácil reproducir en modelos animales el desarrollo de este tipo de tumores, así por ejemplo dirigiendo el gen Fkhr al locus de Pax3 se logró expresar la fusión Pax3-Fkhr en precursores musculares y en células de la cresta neural pero no se logró desarrollar el rhabdomyosarcoma alveolar (35). Un estudio reciente ha sido capaz de generar un modelo murino condicional de sarcoma sinovial induciendo la expresión de la fusión característica de este tumor, SYT-SSX2, en un tipo celular concreto, mioblastos (36). Respecto al grupo de sarcomas de cariotipo complejo se han desarrollado algunos modelos murinos *knockout*. La mutación del ligando de c-MET, Hgf/sf, en la cepa INK4/Arf nula da lugar a la aparición de un rhabdomyosarcoma. La superación del punto de control del ciclo celular G1 debido a la mutación permite a c-MET dirigir la expresión del conjunto de progenitores mioblásticos hacia el fenotipo tumoral (22).

Tres parámetros importantes para planear el tratamiento de los sarcomas son el grado histológico, los márgenes de reseccabilidad así como la presencia o ausencia de metástasis. Al contrario que los carcinomas, que se diseminan habitualmente por vía linfática, los sarcomas lo hacen habitualmente por vía sanguínea. Los pulmones y los huesos son los sitios más comunes de localización metastásica (37). El grado histológico, no es un factor de clasificación diagnóstica de los tumores *per se* sino un dato pronóstico basado en características patológicas como el número de mitosis, la presencia de necrosis o atipias. El diagnóstico anatomopatológico de estas neoplasias se complementa con nuevos marcadores moleculares. El uso de nuevas técnicas de biología molecular como las matrices de expresión génica ha permitido refinar la clasificación de los sarcomas y definir la firma genética de los mismos especialmente en aquellos sarcomas pobremente diferenciados (38, 39).

La cirugía en el caso de los sarcomas localizados y el uso de quimioterapia (doxorubicina e ifosfamida por regla general) y radioterapia en aquellos casos metastásicos o de recaída son las opciones estandar de tratamiento. Mientras que los sarcomas localizados tienen buenas tasas de supervivencia, ésta sigue siendo baja en los sarcomas metastásicos o quimio-resistentes, lo que obliga a buscar nuevas formas de tratar los mismos. El mayor grado de conocimiento de la biología de los sarcomas alcanzado gracias a los estudios moleculares ha favorecido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a la inhibición de genes clave en la biología de estos tumores. Un buen ejemplo de ello lo representan los GIST. Catalogados inicialmente en muchos casos como leiomiomas del tracto gastrointestinal, estos tumores no respondían a la quimioterapia convencional para los leiomiomas. Posteriormente se observó en los mismos la activación por mutación constitutiva del receptor tirosina-quinasa c-KIT. La aplicación del inhibidor de la fusión Bcr-Abl conocido como Imatinib o Gleevec a c-KIT ha supuesto un gran avance en el tratamiento de esta neoplasia (40). Un subgrupo de GIST carece de las mutaciones en c-KIT pero posee mutaciones activadoras del receptor de PDGFR α (PDGFRA) lo que permite también el uso de imatinib (41, 42). El desarrollo de nuevas terapias dirigidas mediante el uso de fármacos e inhibidores altamente selectivos en cuanto a su diana de acción está permitiendo una mejora de los índices de mortalidad y morbilidad de los sarcomas.

2. Tumores de la familia del sarcoma de Ewing (SE).

El SE es la principal neoplasia englobada dentro de lo que se denomina tumores de la familia del sarcoma de Ewing. Esta familia de sarcomas comprende aparte del ya citado SE, el sarcoma de Ewing extraóseo (SEE), los tumores neuroectodérmicos periféricos primitivos (PNET) y el tumor de Askin o PNET de la pared torácica, siendo el más frecuente el SE, que representa el 60% del total de los sarcomas de esta familia.

Este grupo de sarcomas constituye una misma entidad clinicopatológica con diferentes manifestaciones fundamentalmente en lo referente al grado de diferenciación neural. Se presentan con mayor frecuencia en la segunda década de vida con una media de edad de 15 años y comprenden cerca del 4% del total de tumores en niños y adolescentes, con una incidencia de 1 a 3 casos por millón de habitantes y año en los países del hemisferio norte. Tras los osteosarcomas, representan el segundo grupo de tumores más frecuentes en esta edad y localización anatómica. Se localizan fundamentalmente en las extremidades distales y proximales, pelvis, pecho o cabeza y cuello como es el caso del SEE y el PNET. La incidencia entre niños es ligeramente superior que en las niñas, a razón de 1,1:1 y muy inferior en individuos de raza negra (43).

Desde un punto de vista histológico se han catalogado tradicionalmente como un conjunto de neoplasias pertenecientes a lo que se conoce como tumores de células redondas pequeñas y azules de la infancia. El grado de diferenciación neural de estos tumores es variable y se ve reflejado en la presencia de estructuras en forma de roseta y en la expresión de distintos marcadores neuroendocrinos (44). Aquellos sarcomas con un mayor grado de diferenciación neural como el PNET no se consideran una entidad aparte sino simplemente sarcomas más diferenciados.

Figura 3. Imágenes de rayos X y resonancia magnética nuclear de un paciente de SE de 17 años de edad en las que se puede apreciar la afectación del hueso y de los tejidos blandos adyacentes al mismo.



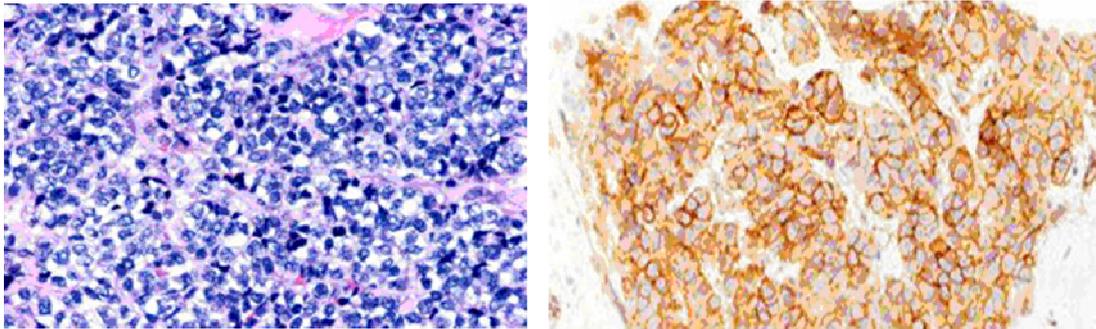
2a) Histología. Sarcoma de Ewing y extra esquelético.

Las células del SE y del sarcoma SEE se caracterizan por ser pequeñas, poseer núcleos prominentes que muestran formas redondeadas u ovaladas, carecer de nucléolo, presentar la cromatina de forma dispersa y fina y tener un índice mitótico bajo. Ocasionalmente, hay presencia de células con núcleos más pequeños, más hipercromáticos y probablemente degenerativos que dan lugar a un patrón conocido como de células claras/células oscuras. El citoplasma varía en cantidad pero por regla general es escaso, claro y contiene glucógeno, lo que hace a estas células positivas para la

tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS). Las células tumorales están apretadas unas contra otras, sin matriz extracelular y crecen siguiendo un patrón difuso sin ningún indicio de organización.

El 90% de las células del SE expresan el receptor de membrana CD99 presente así mismo en células linfoides. Otros marcadores presentes son la enolasa específica neural (NSE), S-100, CD57 y sinaptofisina y también en algunos casos (20%) hay presencia de citoqueratinas y neurofilamentos (45).

Figura 4. Estudio morfológico e inmunohistoquímico de una biopsia de un paciente de SE. Tinción de PAS con un patrón típico de células redondas azules con un citoplasma escaso (imagen izquierda). Inmunohistoquímica para CD99 con marcaje de membrana (imagen derecha).



Tumor neuroectodérmico primitivo periférico (PNET).

La apariencia histológica del PNET difiere en cierta forma del SE. Las células tumorales se agrupan típicamente en nidos y trabéculas formando rosetas variables con un lumen central, con frecuencia mal definido. El patrón de crecimiento clásico lobular de este tipo tumoral se aprecia mejor al microscopio usando aumentos bajos, y difiere del típico crecimiento difuso de los sarcomas clásicos de Ewing. Ocasionalmente se puede apreciar intercaladas grupos de células redondas citológicamente uniformes, con cromatina dispersa que semejan a las clásicas de Ewing en lo que de otra forma sería un típico PNET. Esta superposición de características fortalece el concepto de que estos tumores son en realidad la misma entidad con un amplio espectro de diferenciación. Los PNETs poseen inmunoreactividad para CD99, enolasa neuronal específica o beta 2 microglobulina siendo el grado de tinción ya variable con marcadores neurales tales como Leu-7, sinaptofisina, neurofilamento, y S100. La presencia de gránulos neurosecretorios en las células que pueden detectarse mediante microscopía electrónica es algo distintivo de cara a establecer un diagnóstico de

PNET (46, 47, 48). En cualquier caso el PNET se considera hoy día como parte de la familia de los sarcomas de Ewing debido fundamentalmente a la presencia de las mismas alteraciones citogenéticas.

2b) Alteraciones citogenéticas en el grupo de sarcomas de Ewing.

Estudios citogenéticos de los SE han permitido detectar una alteración sistemática del locus del gen EWS en la localización cromosómica 22 q12 que da lugar a la fusión del extremo amino-terminal del gen EWS con el término carboxi-terminal de otro gen. En la mayoría de los casos (90%), el extremo carboxi-terminal es proporcionado por el gen FLI1, un miembro de la familia de factores de transcripción Ets, ubicado en el cromosoma 11 (11q24). Otros miembros de la familia Ets que pueden combinarse con el gen EWS son, en orden de frecuencia, ERG, ubicado en el cromosoma 21, ETV 1, ubicado en el cromosoma 7 y E1AF, ubicado en el cromosoma 17, translocaciones t(21:22), t(7;22), y t(17;22), respectivamente (49). Extraordinariamente raros son los casos de SE con la fusión FUS-ERG, t(16;21)(p11;q22) (50), presente así mismo en algunas leucemias mieloides agudas. Este descubrimiento puso de manifiesto que los dominios de transactivación de los miembros de la familia TET como EWS y FUS se pueden intercambiar.

Figura 5. Fusiones más frecuentes en el SE.

<u>Fusión</u>	<u>Translocación</u>
EWS-FLI1	t(11;22)(q24;q12)
EWS-ERG	t(21;22)(q22;q12)
EWS-ETV1	t(7;22)(p22;q12)
EWS-FEV	t(2;22)(q33;q12)
EWS-ETV4	t(17;22)(q12;q12)
FUS-ERG	t(16;21)(p11;q22)

Además se han observado otras aberraciones numéricas y estructurales en los SE, como ganancias de los cromosomas 2, 5, 7, 8, 9 y 12 (51) la translocación no recíproca t(1;16)(q12;q11.2) (52) y la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 y 6 (53). La adquisición por parte de algunos tumores de estos eventos secundarios tiene consecuencias en el pronóstico de los mismos (54, 55, 56).

Una de las alteraciones más comunes es la pérdida de expresión del gen p21^{WAF1/CIP1} que sin embargo no está relacionada con el estatus del supresor tumoral p53 en la mayoría de SE. p53 está mutado en aproximadamente un 11% de SE (18). Aquellos pacientes con pérdida de p21^{WAF1/CIP1} y mutaciones de p53 debidas a deleciones homocigóticas de la región 9p21 constituyen un subgrupo de peor pronóstico (57). El locus *INK4A* que codifica para el inhibidor de CDKs p16 y el regulador positivo de la vía de p53, p14ARF (p19 en ratones) está perdido en algunos de estos tumores (58).

2c) Diagnóstico/Estadíaje.

Los síntomas clínicos más frecuentes de manifestación del SE son la presencia de dolor e inflamación en la zona afectada. El 85% de estas neoplasias se presentan como una masa tumoral asociada a hueso y el 15% restante se manifiesta como una masa en tejidos blandos extraesqueléticos.

En cuanto a las localizaciones anatómicas de este grupo de sarcomas son dispares (59, 60). Las más frecuentes en el SE son las siguientes: extremidades distales (27%) y proximales (25%), pelvis (20%), pecho (20%), columna vertebral y cráneo (9%). En cuanto al SEE, los sitios de origen más comunes son: tronco (32%), extremidades (26%), cabeza y cuello (18%), retroperitoneo (16%) y otras localizaciones (8%). La distribución varía en el caso del PNET: pecho (44%), abdomen/pelvis (26%), extremidades (20%), cabeza y cuello (6%) y otras localizaciones (4%).

Otros síntomas destacados son un incremento en la velocidad de sedimentación globular, leucocitosis y anemia. La progresiva degeneración del hueso afectado se puede apreciar mediante un examen radiológico y la reacción denominada como “en capas de cebolla” en el periostio cuando el tumor afecta a la diáfisis de huesos largos.

El diagnóstico anatomopatológico de este grupo de sarcomas es bastante complejo dado el alto grado de variabilidad fenotípica, la indiferenciación histológica y la ausencia de marcadores específicos que presentan lo que les hace compartir algunas características con otros tumores pediátricos como el neuroblastoma, el rhabdomyosarcoma, el linfoma no Hodgkin, el tumor desmoplásico de células pequeñas o el sarcoma sinovial. La inmunoreactividad para CD99 y vimentina se han considerado tradicionalmente como característicos en las células de estos sarcomas. El producto del gen MIC2, CD99, es una proteína superficial de membrana con un papel destacado en la migración de los leucocitos en el endotelio, que se manifiesta en la mayoría de los casos de SE y que resulta útil en el diagnóstico de estos tumores a pesar de manifestarse igualmente en las células linfoides y en tumores linfoblásticos (61). Sin embargo la positividad para CD99 no es exclusiva solamente de este grupo tumoral sino que también la poseen otros tumores como el sarcoma sinovial de células pequeñas poco diferenciadas, algunos linfomas no Hodgkin con fenotipo T, o el rhabdomyosarcoma. El SE no expresa CD45 mientras que sí lo expresan los linfomas; los neuroblastomas son positivos para S100 y NSE pero negativos para vimentina, el rhabdomyosarcoma alveolar expresa además los marcadores desmina, miogenina y MyoD1, que están ausentes en el SE. Como puede apreciarse, dada la falta de especificidad de la mayor parte de los marcadores citados, y para asegurar un diagnóstico lo más fiable posible se hace necesaria la ayuda de las técnicas de biología molecular. La introducción desde mediados de la década de los 90 de las técnicas de biología molecular ha revolucionado y simplificado el diagnóstico de este tipo de neoplasias. Mediante análisis moleculares como la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y el análisis de los fragmentos de restricción de los productos de la PCR (RFLP) se puede efectuar un diagnóstico de gran precisión detectando las translocaciones cromosómicas específicas de cada tipo tumoral, utilizando cantidades relativamente pequeñas de tejido obtenido mediante biopsias mínimamente invasivas y suministrando los resultados de manera más rápida que el análisis citogenético convencional (62, 63).

En los pacientes con un diagnóstico ya confirmado de SE los estudios de estadiaje antes de comenzar el tratamiento se llevan a cabo mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) o de tomografía computarizada (TAC). Su uso conjunto ayuda a una mejor definición de cara a la planificación del régimen radioterapéutico que se pretende administrar al enfermo (64). Estudios adicionales pretratamiento como la gammagrafía ósea, el TAC torácico, la biopsia por PAAF de la médula ósea o la tomografía por emisión de positrones (PET) son hoy en día en mayor o medida pruebas de rutina clínica. En ciertos estudios la determinación del volumen tumoral pretratamiento es una variable importante (Estudio Euro-Ewing 99). En el SE, el tumor se define

como localizado cuando, mediante técnicas clínicas y de imagen, este no se presenta más allá del sitio primario o no hay implicación de los ganglios linfáticos regionales, pero puede extenderse a regiones de tejido blando adyacentes.

2d) Factores pronósticos de los SE.

Existen dos tipos principales de factores pronósticos para los pacientes de esta familia de tumores: factores pre-tratamiento y factores de respuesta al tratamiento.

Factores pre-tratamiento.

Los criterios más destacados son los siguientes:

Localización: los pacientes que tienen el tumor situado en las extremidades distales, tienen mejor pronóstico que aquellos con el tumor situado en las extremidades proximales. Las localizaciones centrales o pélvicas son las que peor pronóstico poseen (65, 66, 67).

Tamaño: en la mayoría de los estudios, el tamaño del tumor ha demostrado ser un factor pronóstico importante. Para definir los tumores más grandes se usa un límite de 100 ml o 200 ml. Los tumores mayores tienden a presentarse en lugares de localización desfavorable (68).

Edad: los pacientes más jóvenes (<10 años de edad) tienen un mejor pronóstico que los adolescentes, los adultos jóvenes o los adultos (65, 66).

Género: las mujeres con SE tienen un mejor pronóstico que los varones (66).

Deshidrogenasa láctica: Altos niveles de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) previos al tratamiento se correlacionan con un mal pronóstico. Los tumores primarios grandes y los metastáticos presentan una elevada concentración de DHL (65).

Metástasis: la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico adverso. Entre un 20 y un 30% de los pacientes cuentan con metástasis en el momento de ser diagnosticados (69). Los pacientes con enfermedad metastásica confinada en el pulmón tienen mejor pronóstico que los pacientes con sitios metastásicos extrapulmonares como la médula ósea o

el hueso (70). Las metástasis localizadas en el cerebro, en los ganglios linfáticos y en el hígado son poco frecuentes (65, 71).

Histopatología: el grado de diferenciación neural no constituye un factor pronóstico (61, 72).

Patología molecular: en función del tipo de fusión génica presente el pronóstico puede variar. Existen distintas variantes de EWS-FLI1, fusión mayoritaria presente en el 85% de estos tumores, de acuerdo a donde se produzca la ruptura y el número de exones de cada gen involucrados en la fusión. Algunas variantes presentan mejor pronóstico que otras; los pacientes con una fusión de tipo EWS-FLI1 de tipo 1 poseen mejor pronóstico que aquellos con fusiones de los tipos 2 y 3 (11, 73) ya que la fusión de tipo 1 se ha asociado a una tasa de proliferación más baja de las células del SE (13, 74).

Presencia de transcritos de la fusión EWS-ETS en médula ósea: por medio de la retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se puede detectar la presencia de transcritos de la fusión en la médula ósea. La presencia de células con la fusión quimérica en médula ósea se ha asociado a un aumento en el riesgo de recidiva (75).

Otros factores biológicos: la sobreexpresión de la proteína p53 (76) y la pérdida del brazo corto del cromosoma 16 (77) podrían ser factores pronósticos adversos así como el aumento en la actividad de la telomerasa (78).

Factores de respuesta al tratamiento a la terapia preoperatoria.

Tras aplicar un régimen de quimioterapia prequirúrgica aquellos enfermos con tumores viables mínimos o no residuales muestran una tasa de supervivencia más alta en comparación con los pacientes con una mayor cantidad de tumor viable (79, 80, 81). En aquellos pacientes a los que se les somete a una quimioterapia de inducción pre y post-operatoria, la disminución en la reabsorción detectada mediante PET se correlaciona con una buena respuesta histológica al tratamiento farmacológico (82). La presencia de fractura patológica al diagnosticar no descarta la resección quirúrgica y no está relacionada con posibles resultados adversos de la misma. La biopsia debe tomarse de los tejidos blandos adyacentes en tanto sea posible para evitar un aumento en el riesgo de ocasionar fracturas.

2e) Tratamiento.

La tasa global de supervivencia se sitúa a los 5 años en torno al 50% (75% para enfermedad localizada y un 25% tan solo si hay metástasis en el momento del diagnóstico) y desciende por debajo del 30% a los 10 años (83).

El tratamiento de los pacientes con SE requiere quimioterapia sistémica (84, 85, 86, 87, 88, 89, 90) conjuntamente con cirugía, radioterapia o ambas modalidades para el control del tumoral localizado (91, 92, 93, 94, 95).

En general, los pacientes reciben quimioterapia adyuvante pre-operatoria antes de establecer otras medidas de control del tumor. En aquellos casos en los que se les somete a cirugía, de cara a la planificación de la terapia posoperatoria se toman en cuenta los márgenes quirúrgicos y la respuesta histológica. Los pacientes pueden recibir solamente radiación para el control local como en el estudio Euro-Ewing, en cuyo caso se tiene en consideración el volumen tumoral pretratamiento antes de iniciar la radioterapia.

La mayoría de los pacientes con enfermedad metastásica, presentan una buena respuesta inicial a la quimioterapia preoperatoria; sin embargo, en la mayoría de los casos, la enfermedad solo se controla parcialmente o acaba reapareciendo (96, 97, 98, 99). Un control local adecuado de los sitios metastásicos, particularmente en el caso de la metástasis ósea, es de vital importancia.

Un aspecto de gran relevancia es que los pacientes que han sido tratados de SE cuentan con un riesgo superior al de la población general de desarrollar segundas neoplasias malignas como por ejemplo la leucemia mieloide aguda (LMA) o el síndrome mielodisplásico (SMD) que por lo general surgen entre 2 y 5 años después del diagnóstico del tumor primario (100, 101, 102). La probabilidad de desarrollar un tumor sólido parece ser mayor en pacientes tratados con radioterapia y varía en función de la dosis recibida (103) con un riesgo acumulado a los 15 o 20 años después del diagnóstico de entre un 5% y un 10% (100, 101, 102, 104).

Se hace necesaria por tanto la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y de nuevas modalidades de tratamiento para mejorar no sólo la tasa de supervivencia de los pacientes de SE sino los índices de morbilidad de los mismos.

2f) Célula de origen.

El origen del SE continúa siendo una incógnita a día de hoy. En 1921 el patólogo norteamericano James Ewing describió esta entidad tumoral como un endotelioma difuso de hueso (105). No sería hasta 1984 cuando Turc-Carel y colaboradores detectaron, gracias al estudio de cinco líneas celulares de SE establecidas a partir de cuatro pacientes, la translocación recíproca $t(11;22)(q24;q12)$ (106).

Pocos años después se clasificaron los SE como tumores neuroectodérmicos primitivos en base al hecho de ser un tumor pobremente diferenciado, la expresión de determinados marcadores neurales y dado que en algunos casos se presenta un patrón de diferenciación neural bajo determinados estímulos (60, 107).

Sin embargo existen una serie de evidencias que apuntan a un posible punto de partida desde una célula madre mesenquimal en la que tendría lugar la transformación celular que originaría la neoplasia:

- el tumor aparece en muy distintas localizaciones tanto en hueso como en partes blandas lo que puede sugerir que la célula putativa de origen es una célula multipotente o que no es un único tipo celular de origen sino varios en función de la localización anatómica del tumor.
- la hipótesis del origen a partir de una célula de la cresta neural se sustenta en el hecho de que algunos marcadores neurales están presentes en algunos tumores. Sin embargo la fusión génica EWS-FLI1 es capaz, una vez introducida en un sistema celular totipotente, de permitir la expresión de alguno de esos marcadores (108).

Por lo tanto a día de hoy todavía quedan por aclarar dos grandes interrogantes en el SE:

1.¿Cuál es la célula de origen?

2.¿Es capaz la fusión por sí sola de desencadenar el proceso tumoral?

La teoría más aceptada apunta a un origen del SE a partir de progenitores mesenquimales por determinar (109).

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de identificar ese tipo celular primigenio permisivo a la acción de la fusión EWS-ETS. La introducción de EWS-FLI1 en la línea de fibroblastos murina MEF provoca parada de ciclo celular y muerte celular y aquellos que sobreviven pierden la expresión de la fusión. En MEFs extraídos de ratones nulos para p19 EWS-FLI1 es capaz de mantener su expresión pero no es capaz de lograr la formación de tumores *in vivo*. Tampoco el hecho de que falte p53 propicia que haya transformación tumoral por EWS-FLI1 en este tipo de células, lográndose sólo al transformar además con el antígeno del virus SV-40 T (15). Ya en fibroblastos humanos embrionarios inmortalizados con telomerasa los efectos causados por la transfección de EWS-FLI1 han sido similares, provocando una parada del crecimiento celular vía p53 e inducción de apoptosis (110). De estos estudios se desprende que los fibroblastos no son el punto de partida de origen del SE que en la mayoría de los casos además conserva intactas las vías de p53 y p19^{ARF} (111).

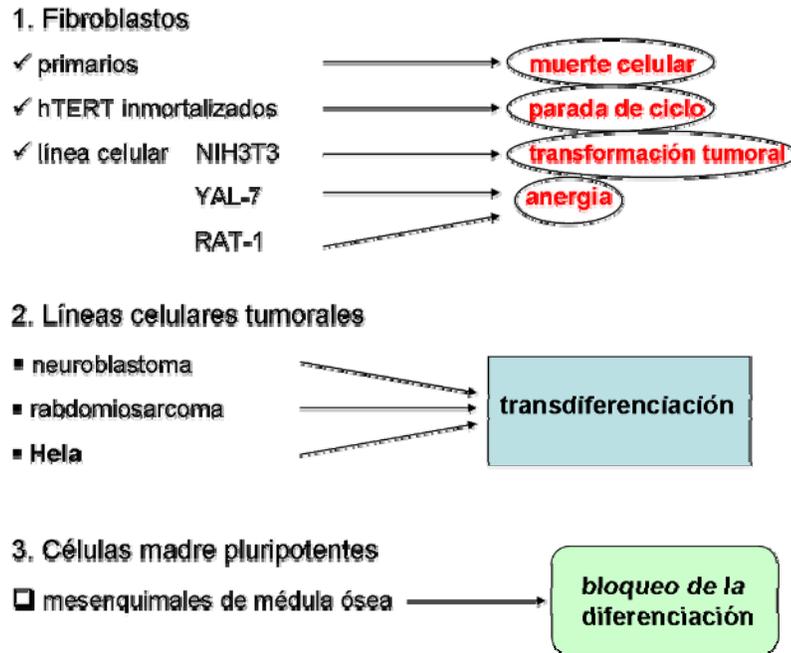
Otro estudio usó distintas células murinas de alto grado de plasticidad, transfectando la fusión EWS-FLI1 en células madre embrionarias murinas o en las llamadas células progenitoras mesenquimales primarias (MPC). Las células MPC obtenidas de la médula ósea son capaces de mantener la expresión de EWS-FLI1 durante meses con una importante activación de la vía de señalización de IGF1 y sus proteínas reguladoras IGFBP3 e IGFBP5. Tras ser inyectadas en ratones son capaces de originar tumores con un fenotipo de células pequeñas y redondas. Se altera la expresión de diversas dianas reconocidas de la fusión como es el caso de Myc e Id2, que son inducidas, o p21 y TGFβRII que son reprimidas. Estas células son sensibles a la inhibición de la vía de IGF1/IGF1R y expresan dos marcadores asociados al SE como son NSE y CD99. Así mismo estas células conservan intactos tanto p53 como p16INK4A/p19ARF (112). Un estudio en paralelo también introdujo la fusión en células progenitoras de médula ósea aunque sin seleccionarlas previamente por *sorting* obteniendo resultados similares y con tumores que ante la pérdida de p53 se tornaban más agresivos (113). Y un estudio anterior en MPC de ratones knock-out para p19 indica que la transfección de EWS-FLI1 provoca un bloqueo en los programas de diferenciación adipogénicos y osteogénicos (114). Estos tres estudios demuestran el papel fundamental de la fusión EWS-FLI1 como desencadenante del proceso tumoral y sugieren que este tipo celular, MPC, pudiera constituir el ambiente celular permisivo adecuado para ello. La facilidad para migrar de estas células desde la médula ósea a otros órganos podría explicar las localizaciones extraóseas del tumor. Un estudio en una línea mioblástica murina capaz de dar lugar a tejido óseo, muscular y adiposo demostró también una parada en el curso de la diferenciación miogénica al transfectar con EWS-FLI1 dicha línea (108).

La línea celular murina más usada para estas investigaciones ha sido la de fibroblastos NIH3T3 en la que se ha probado la capacidad tumorigénica de las distintos transcritos EWS-ETS así como la importancia de los diferentes dominios funcionales de estas proteínas quiméricas (115). Sin embargo las fusiones no son capaces de transformar el subclon de NIH3T3, YAL-7 ni la línea Rat-1, posiblemente ante la falta en dichas líneas de otros factores cooperadores de las fusiones EWS-ets (116). La cooperación de factores de crecimiento debe ser clave en la etiopatogenia de este tipo de tumores ya que la transformación en fibroblastos murinos depende por ejemplo de la activación de IGF1R y el bloqueo de esta vía reduce la tumorigenicidad en ratones desnudos (117, 118).

Sin embargo la conveniencia de usar NIH3T3 como modelo de estudios *in vitro* ha sido puesta en duda por Braunreiter CL *et al* ya que demuestran que dependiendo del tipo de fusión EWS-ETS (EWS y FLI, ERG, FEV, ETV1 y ETV4) transfectada los patrones de expresión difieren (119). Este estudio vuelve a poner de manifiesto la gran importancia del contexto celular en el origen del SE ya que los efectos inducidos por la expresión de las fusiones EWS-ETS van a variar en función del tipo celular. Se hace necesario pues el estudio de los efectos de las proteínas de fusión en modelos celulares autólogos. A pesar de todo, los estudios de expresión inducible de EWS-FLI1 en otros modelos heterólogos como HeLa o la línea de neuroblastoma NPG-2 han permitido la identificación de nuevas dianas de la fusión corroboradas posteriormente como es el caso de c-Myc y el inhibidor de CDK, p57^{Kip2} que son activadas y reprimidas respectivamente (120). Se ha demostrado que EWS-FLI1 es capaz de cambiar el programa de diferenciación de una línea celular de neuroblastoma a uno típico de SE suprimiendo marcadores típicos de neuroblastoma como MYCN, tirosina-hidroxilasa, hidroxilasa beta dopamina y beta-2-microglobulina e induciendo marcadores de SE como c-Myc y especialmente CD99 (121).

Así pues si bien la célula de origen no ha podido ser identificada fehacientemente a día de hoy, sí está claro el papel fundamental que desempeñan tanto el contexto celular como por otra parte la acción de la fusión quimérica la cual parece requerir la ayuda de otros factores para desencadenar el proceso de oncogénesis.

Figura 6. Modelos de origen del SE. Adaptado de [Kovar H.](#) Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 2005 Jun 15(3): 189-96. Review.



3. ARN de interferencia.

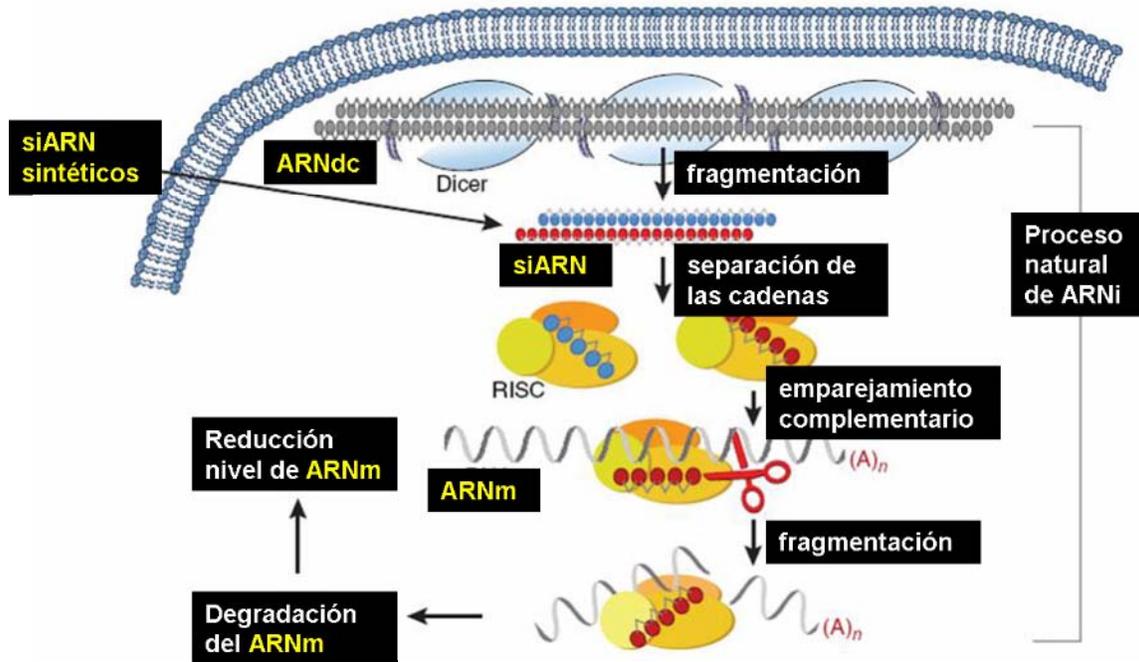
Es un fenómeno de silenciamiento genético post-transcripcional (PTGS) altamente conservado. Se identificó en primer lugar en plantas, concretamente en el género *Petunia* y con el gen chalcone sintetasa (CHS) siendo denominado como cosupresión (122) y posteriormente en eucariotas inferiores como el hongo *Neurospora crassa* recibiendo la denominación de “quelling” (123). Más tarde se descubrió su existencia en el nematodo *C.elegans* al introducir moléculas de ARN de doble cadena específicas del gen *unc-22^a*, cuya expresión se pretendía inhibir. Es entonces cuando recibe por primera vez el nombre de ARN de interferencia (124). Posteriormente se comprobó que esta evolutivamente conservado y que podía ser de gran utilidad en células de mamíferos (125). Existe sin embargo alguna diferencia como el hecho de que en protozoos, nematodos, plantas y hongos pero aparentemente no en insectos y vertebrados, una enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) es capaz de producir numerosas moléculas de siARN a partir de un molde de cadena sencilla en un fenómeno de retroalimentación positivo que amplifica los efectos (126).

Actualmente se ha generalizado su uso en líneas celulares en cultivo y en modelos animales convirtiéndose en un sustituto del uso del *knock-out* y en pieza fundamental en los análisis de función génica (127, 128, 129, 130).

Existen dos tipos de ARNi: *small interfering RNAs* (siARN) y *short hairpin RNA* (shARN).

Los *small interfering RNAs* (siARN) son moléculas de ARN de doble cadena de 21-22 nucleótidos con un extremo protuberante en 3' de dos nucleótidos para que puedan ser reconocidos por la maquinaria enzimática del ARNi que conducirá a la degradación del ARNm de la secuencia homóloga. En las células de mamíferos los siARN se generan a partir del procesamiento de dsARN, precursores de doble cadena de mayor longitud, por parte de la enzima ARNasa III Dicer (131, 132). La enzima Dicer se une a la proteína *TAR-RNA binding protein* (TRBP) para dirigir los siARNs al complejo conocido como *RNA-induced silencing complex* o RISC, el cual contiene la proteína de corte Argonauta 2 que procesa el ARNm del gen diana entre las bases 10 y 11 correspondientes al extremo 5' de la cadena antisentido del siARN (133).

Figura 7. Mecanismo de acción de los siARN sintéticos. Adaptado de [Gonzalez-Alegre P, Paulson HL. Technology insight: therapeutic RNA interference--how far from the neurology clinic? Nat Clin Pract Neurol. 2007 Jul;3\(7\):394-404. Review.](#)



Estrechamente relacionado con el mecanismo de ARNi, los microARNs son transcritos de cierta longitud (primiARNs) que son procesados en el núcleo de la célula por el complejo Drosha-DGCR8 para generar *hairpins* de entre 60 y 70 pares de bases (pb). El bucle o *loop* sufre el posterior procesamiento en el citoplasma por la enzima Dicer y una de las cadenas se incorpora al complejo RISC. Los miARNs maduros poseen una homología parcial con el extremo 3'UTR de los ARNm diana. El papel primordial de estas moléculas de ARN es el de represores transcripcionales pero también pueden inducir degradación del ARNm. En los sarcomas se han identificado distintos tipos de miARNs característicos de cada entidad tumoral (134). Los microARNs pueden actuar tanto como oncogenes como supresores tumorales lo que les convierte en una posible herramienta terapéutica con grandes posibilidades futuras (135).

Volviendo al ARN de interferencia en comparación con otras estrategias inhibitorias como los oligos antisentido de ADN o el uso de ribozimas el efecto logrado por el uso del ARNi es mucho más potente pudiendo funcionar a concentraciones mucho más bajas lo que es vital de cara a su posible uso en terapia (136, 137).

El diseño de los ARNi es un punto muy importante. Se utilizan programas bioinformáticos para buscar la parte más adecuada de la secuencia del gen que se quiere inhibir evitando los UTR's de los extremos 3' y 5', las 100-200 primeras pares de bases tras el codón de inicio AUG y procurando que el contenido en GC sea del 45-50%. Se usan varios diseños y se comprueba mediante una búsqueda en BLAST que no haya homología con otros genes ya que es sumamente importante que la inhibición sea específica (138, 139, 140).

Otro aspecto a tener en cuenta es cómo se produce la entrada de los siARN o los shARNs a la célula en cultivo. El principal cuello de botella en cuanto a la aplicabilidad terapéutica del ARNi es el acceso de estas macromoléculas al tejido, órgano o tipo celular deseado sobre todo en líneas celulares de difícil transfección como puedan ser células madre o cultivos primarios. Se han usado formulaciones lipídicas catiónicas especialmente efectivas con los siARNs pero tienen el inconveniente en modelos animales de una falta de especificidad tisular así como su rápida degradación por vía hepática (141, 142, 143). El silenciamiento ejercido por los siARNs tiene efecto durante 3 a 5 días en células en división pudiendo ser más prolongado en células que no se dividen. Una vez que acceden a la célula por vía endosomal tiene lugar la posterior liberación en el citoplasma para el ensamblaje del complejo RISC (144, 145, 146). También se ha probado conjugar los siARNs con colesterol o partículas de ciclodextrina por citar dos ejemplos de enfoques específicos de tejido o célula de cara a ampliar el potencial terapéutico de aplicación *in vivo* del ARNi (147, 148).

Aparte de los siARN, dúplex sintéticos de 21 bases, listos para usar y eficaces pero con respuesta de duración limitada existe otro tipo de ARNi denominada shARNi. La interferencia de ARN del tipo *short hairpin* permite conseguir un bloqueo estable de la expresión del gen diana. El mecanismo de la shARNi logra la generación de los siARN a partir de transcritos de ARN más largo en un proceso de síntesis nuclear a partir de un vector plasmídico. Posteriormente son transportados al citoplasma via maquinaria miARN para ser procesados por la enzima Dicer a formas siARN. Las ventajas de esta forma de interferencia son varias como un mayor grado de aplicabilidad terapéutica, la posibilidad de lograr efectos estables, dosis de administración única...

Tras descubrir que los duplex de doble cadena de ARN de 19-21 nucleótidos eran capaces de inducir el silenciamiento del gen diana contra el que eran diseñados sin desencadenar una respuesta genotóxica inespecífica por activación del interferón de tipo 1 se pasó a diseñar vectores de expresión plasmídicos que permitieran la síntesis intracelular, una vez transfectados, de shARNs.

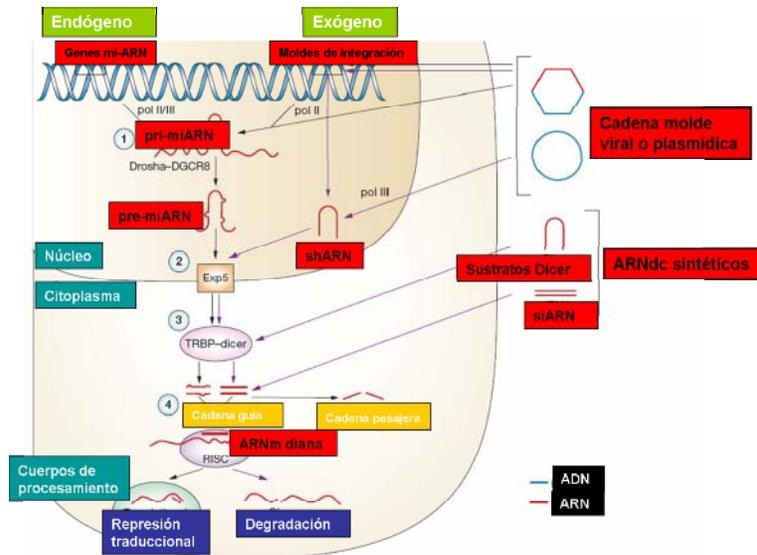
Los vectores cuentan con el promotor de la ARN polimerasa III para dirigir la síntesis de los shARNs. Los shARNs más sencillos constan de 19 nucleótidos de la secuencia sentido diana, un bucle o *loop* de entre 4 y 10 nucleótidos, la cadena antisentido complementaria y finalmente un extremo de 4 a 6 uridinas como señal de parada. Los shARNs se exportan al citoplasma vía exportina 5, se procesan mediante la enzima Dicer y se integran en el complejo RISC. Estos sistemas permiten una inhibición robusta y a largo plazo del gen seleccionado (149, 150, 151).

A medio camino entre los siARN y los shARNs está la síntesis de dsARN de 25-27 nucleótidos que una vez transfectados sufren su correspondiente procesamiento intracelular por la enzima Dicer lo que parece aumentar la potencia del efecto inhibitorio ejercido por los mismos (152).

Se han desarrollado sistemas de interferencia más complejos y regulables de carácter inducible. Se han modificado varios vectores con el promotor de la ARN polimerasa III para responder a compuestos como la tetraciclina/doxociclina, puromicina o ecdisona con el objeto de poder controlar muy bien la regulación de la interferencia, ser dosis-dependientes y reversibles (153, 154, 155). Recientemente se han introducido en el mercado nuevos modelos como el *RheoSwitch* de la casa comercial NEB, el uso de otros promotores alternativos como el de la ARN polimerasa II en combinación con promotores de expresión específicos de tejido para una regulación espacio-temporal precisa con el uso conjunto con la recombinasa Cre (156, 157, 158, 159).

También se han empleado sistemas adenovirales, virus adeno asociados (AAV) para estudios de inhibición a corto plazo y lentivirales o retrovirales de cara a una inhibición a largo plazo para mejorar la transfección (160, 161, 162, 163) o asociados a un sistema de inducción (164).

Figura 8. ARN de interferencia. Esquema general de las distintas vías de actuación (sh, si y miARN). Adaptado de [Bumerot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. \(2006\). RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2: 711-9. Review.](#)



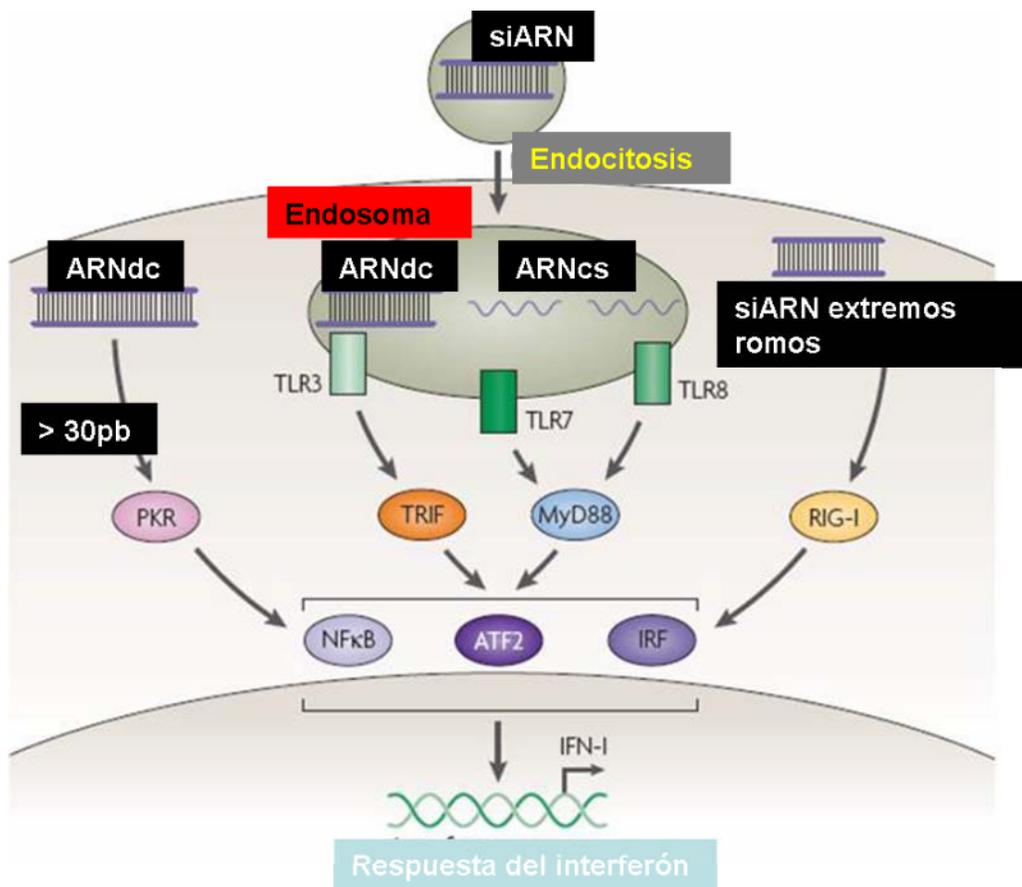
El ARN de interferencia, como toda técnica posee sus limitaciones, entre las cuales podemos citar éstas:

- competición con los ARNs endógenos. Se ha comprobado el papel fundamental de los microARNs en el equilibrio de la expresión génica (165). Puede producirse saturación de esa vía endógena de microARN en ratones que recibieron altas dosis de shARNs dirigidos al hígado mostraron una alta mortalidad asociada a la reducción de la expresión de microARN específicos del hígado (166). Hay que tener en cuenta que la maquinaria de ARNi es esencial y por tanto las mutaciones en ciertos componentes de la misma acarrear frecuentemente letalidad, como es el caso de ratones nulos para la enzima Dicer (167).

- estimulación de la respuesta inmune innata. Hasta el descubrimiento de Elbashir SM *et al* (125) se creía que la introducción de ARNs de doble cadena desencadenaba una respuesta inmune innata con activación de la vía de transducción del interferón 1. Se trata de un mecanismo conservado evolutivamente para combatir los patógenos virales mediado por la proteína quinasa de ARN de doble cadena (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa-ARNasa L o algunos receptores del tipo Toll (TLRs), con fosforilación del factor de inicio de traducción EIF2 y parada del proceso de síntesis proteica en primera instancia y muerte celular como resultado final. Así mismo interviene la

proteína de unión a ARN TRBP o *transactivating response (TAR) RNA-binding protein*. Sin embargo se pudo comprobar que la introducción de ARNs de doble cadena menores de 30 nucleótidos no generaba toxicidad aunque siempre se ha de tener cuidado en la aplicación terapéutica de los shARNs ya que en función del tipo celular incluso por debajo de 30 nucleótidos pueden desencadenarse respuestas genotóxicas (168, 169).

Figura 9. Mecanismo genotóxico de respuesta al interferón.



- obtención de efectos inespecíficos (170). Se cree que hasta un tercio de los siARNs usados provocarían estos efectos que generan toxicidad (171). Modificaciones como la del 2' O-Me en la segunda base de los siARNs reducen significativamente los efectos inespecíficos sin comprometer la eficacia de los mismos (172).

Figura 10. Métodos de distribución de ARNi. SNALP: ácido nucleico estable unido a una partícula lipídica. Fab: fragmento de la cadena pesada de un anticuerpo. AAV: virus adeno-asociado. dc: doble cadena. cs: cadena sencilla. Adaptado de [Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet. 2007 Mar;8\(3\):173-84. Review.](#)

Método	Tipo	Ventajas	Contras
NO-VIRALES			
Colesterol	siARN	Sistémico, estable	Inespecífico
SNALP	siARN	Sistémico, muy estable	Inespecífico
Fab	siARN	Específico de receptor	Formulación relativamente compleja
Aptámero	siARN	Específico de receptor	Screening de secuencias a larga escala
Nanopartícula	siARN	Específico de receptor	Preparación sofisticada
VIRALES			
Lentivirus	ARN (shARN)	Expresión estable	Riesgo de disrupción génica
Adenovirus	ADNdc (shARN)	Episomal, sin inserción mutagénica	Immunogénico
AAV	ADNdc/cs (shARN)	Episomal	Immunogénico, baja capacidad vectorial

Aplicaciones.

En los últimos años se ha generalizado el desarrollo y la aplicación de librerías de ARNi (173, 174, 175). Se han llevado a cabo experimentos en primates no humanos de cara comprobar su eficacia y seguridad como paso previo al paso a ensayos clínicos usando siARNs con liposomas (176).

Las aplicaciones farmacológicas de esta técnica no se han hecho esperar, contribuyendo el uso especialmente de las librerías de ARNi a elucidar la función de moléculas clave contra las

cuales poder diseñar inhibidores selectivos. Ensayos como el de la compañía farmacéutica Bristol Myers Squibb con un inhibidor de la farnesil transferasa (bloquea la activación de Ras) y una librería de ARNi sobre quinasas, proteasas, fosfatasa y receptores acoplados a proteínas G en *C. elegans* ha permitido identificar la enzima Rab geranyl-geranyl transferasa como activador proapoptótico (177). Otros han identificado con una librería de ARNi contra quinasas y fosfatasa varios factores mediadores de la evasión apoptótica desencadenada por agentes quimioterapéuticos varios como por ejemplo las quinasas JIK o mTOR o la enzima inactiva de la familia de las fosfatasa, MK-STYX (178). Otros estudios han usado una colección de shARN para profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de inhibidores de MDM2, como la nutlina 3, que activa la vía de p53 en un proceso activo de reparación en las células tumorales que puede ser aprovechado terapéuticamente (179) o una librería de siARNs contra el quinoma que identifica a la caseína quinasa g3 e inositol fosfato que permitió observar que promueven la muerte celular en presencia del inhibidor de la quinasa Akt A-443654 (180).

Se ha sacado partido al fenómeno de letalidad sintética: una mutación que por sí sola no es capaz de inducir fenotipo salvo en un ambiente propicio y específico, como por ejemplo la inhibición mediante ARNi de ATM en células deficientes en p53 como la línea de cáncer de próstata PC3 sensibiliza a la acción del agente inductor de daño en ADN doxorubicina pero no así en la línea IMR90 que mantiene p53 funcional (181). Los ejemplos de este aprovechamiento son numerosos (182, 183, 184). Así mismo se ha aprovechado la relación del ARNi con la metilación así como con la interacción con la cromatina para estudiar más a fondo el silenciamiento heterocromático (185).

El uso terapéutico del ARNi se ha extendido a numerosas enfermedades:

- genéticas como la esclerosis lateral amiotrófica o síndromes neurales (186, 187). En el caso de la esclerosis lateral amiotrófica la interferencia se efectuó contra el gen SOD1 mutado mientras que en los síndromes neurales la inhibición fue dirigida contra el alelo dominante sin afectar a la expresión del alelo normal.
- virales peq contra numerosos componentes del VIH como las proteínas tat, env, gag, el receptor de HIV CD4 o cofactores como CXCR4 y CXCR5 (188) y otros virus (189).

- oncológicas con numerosos ejemplos de su aplicación en la investigación tumoral para analizar los efectos de la pérdida de función de importantes genes como Ras, Bcr-Abl, VEGF o Bcl-2 (190, 191, 192, 193, 194). Uso de distintos sistemas de ARNi ya sea shARN virales (195) o siARNs conjugados (196). Muy interesante es el uso del ARNi para silenciar vías implicadas en la resistencia a drogas, por ejemplo con el fin de inhibir el gen de resistencia a multidroga (MDR1) para aumentar la sensibilidad quimioterápica (197) o con el fin de silenciar enzimas implicadas en el mecanismo de DSB (*double strand breaking*) para mejorar los efectos de la quimio y radioterapia (198). Como no podía ser de otra manera el grupo de los sarcomas también se ha beneficiado de las aplicaciones del ARNi (199) así como las células presumiblemente fuente de origen de los mismos (200).

Figura 11. Terapias basadas en el ARN de interferencia. Adaptado de [Kim DH, Rossi JJ. \(2007\).](#) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173-84. Review.

Enfermedad	Estado	Reactivo ARNi	Distribución	Compañía
Enfermedades oculares				
AMD	Preclínico	siARN	Inyección ocular	Quark Biotech
	Fase I	siARN	Inyección ocular	Sima
	Fase II	siARN	Inyección ocular	Acuity
Infecciones virales				
Hepatitis B y C	Preclínico	shARN	Nanopartícula	Nucleomics/Intradigm
RSV	Fase I	siARN	Aerosol	Alyniam
HIV	Fase I	shARN	Lentivirus	Benitec/City of Hope
Neoplasias oncológicas				
Tumor hepático	Preclínico	siARN	Nanopartícula	Calando
Tumores sólidos	Preclínico	siARN	Nanopartícula	Intradigm
Otras enfermedades				
ALS	Preclínico	siARN	N/A	CytRx
Enfermedades inflamatorias	Preclínico	siARN	Péptido	Nastech

ARNi en el SE.

Los primeros intentos de bloquear la expresión de EWS-FLI1 *in vitro* se llevaron a cabo mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (201, 202) o por medio de un ARN antisentido a partir de un vector de expresión transfectado (203, 204) consiguiendo una reducción parcial y temporal del crecimiento celular sin inducción de muerte.

Los primeros estudios como tales de ARNi en el SE han usado oligos siARN con un análisis de los efectos a las 48-72h post-transfección, describiendo efectos como reducción de la proliferación e inducción de apoptosis (205, 206, 207, 208, 209). Se han empleado diferentes fórmulas químicas como nanopartículas de ciclodextrina sin lípidos como por ejemplo la transferrina, polímeros o nanocápsulas para mejorar la distribución y el alcance de los oligos antisentido y oligos ARNi especialmente en modelos animales logrando de este modo una mayor efectividad en el bloqueo de la capacidad metastásica tumoral o la inhibición del desarrollo oncogénico (148, 210, 211).

El empleo de oligos siARN posee una gran limitación dado que sólo se pueden observar efectos durante un espacio temporal reducido debido a su limitada vida media. Por esa razón se ha pasado a llevar a cabo ensayos con shARNi para lograr una inhibición duradera con el transcurso de los pases celulares (149, 150). Se han usado distintos vectores ya sean del tipo pSUPER retroviral (212), pSRP retroviral con promotor H1 contra el UTR 3' de la fusión (logrando una reducción de la capacidad de transformación oncogénica pero con una tasa normal de proliferación en cultivo) (213, 214) o con reducción de ambas capacidades (215), pSRP (216) o inducibles lentivirales con doxiciclina (217). En todos los casos el análisis de los efectos de la interferencia de ARN se realizó tras la infección y selección con antibiótico si bien en algún estudio se hizo referencia a la desaparición de los efectos de interferencia con el transcurso de los pases celulares (213).

4.EWS.

El gen EWS consta de 18 exones distribuidos a lo largo de 40kb y se localiza en el cromosoma 22q12.2. La proteína a la que da lugar está compuesta por 656 aminoácidos y posee un peso molecular de 68kDa (218, 219). La proteína EWS es un gen perteneciente a la familia de proteínas TET que se caracteriza por la presencia de un dominio carboxiterminal de 87 aminoácidos con un número variable de repeticiones RGG (arginina-glicina-glicina) a través del cual tiene lugar la unión ARN-proteínas (220). Los siete primeros exones de EWS codifican para la región aminoterminal en la que se sitúa el dominio RRM/RNP-CS, que consiste en la repetición de un polipéptido degenerado de entre 7 y 12 residuos ricos en tirosina, serina, treonina, glicina y glutamina. Este dominio actúa como activador transcripcional siendo la tirosina el residuo clave (115, 221, 222); si por ejemplo se reemplaza el dominio EWS por un dominio represor KRAB se elimina el potencial transformador de la fusión EWS-FLI1 tanto en fibroblastos murinos como en las propias células del SE (223). Nos da idea del potencial de activación de este gen el hecho de que EWS, pero no la fusión EWS-FLI1, es capaz de activar la actividad transcripcional dependiente de CBP (proteína de unión al coactivador CREB) (224).

Los otros dos miembros de la familia TET son TLS/FUS y TAFII68, un factor asociado a TBP presente en varios complejos transcripcionales. Al igual que EWS, TLS/FUS se fusiona a un factor de transcripción, en este caso CHOP, debido a una translocación cromosómica en otro sarcoma, el liposarcoma mixoide (225).

Debido a sus características estructurales y a su capacidad de unión al ARN se cree que las proteínas de la familia TET participan en los procesos de transcripción y procesamiento del ARN. EWS es capaz de unirse in vitro al ARN y junto a TAFII68 pueden formar complejos transcripcionales con TFIID, ARN polimerasa II y los coactivadores CBP/p300 (220, 221), aparte de poder interactuar con activadores y reguladores transcripcionales varios que participan en el proceso de procesamiento alternativo. Estas proteínas actuarían de enlace entre la maquinaria de transcripción y la de procesamiento del ARNm (226, 227).

EWS es un gen muy conservado en el proceso evolutivo. La homología entre especies es elevada llegando al 96% como en el caso de las formas humana y murina (218, 219). Los motivos estructurales que hay en su promotor (ausencia de cajas TATA y la frecuente repetición del motivo

GC) así como su expresión ubicua y elevada hacen pensar que es un gen de expresión constitutiva ya que además el alelo que no se ve involucrado en las translocaciones se sigue expresando de forma normal en los tumores (228).

EWS así como TLS/FUS se localiza en el núcleo, aunque su distribución sub-celular puede modificarse en respuesta a estímulos o modificaciones post-traduccionales como la ejercida por la proteína quinasa C, PKC, de la cual ambos genes son sustrato o por metilación (229, 230, 231). TLS/FUS y EWS podrían estar relacionados con la estabilidad genómica, como demuestra el hecho de que los ratones knock-out para TLS/FUS muestran un alto grado de inestabilidad cromosómica e incremento de la sensibilidad a la exposición a radiaciones ionizantes lo que se ve acompañado por defectos en la espermatogénesis y en el desarrollo de los linfocitos B (232, 233).

EWS puede unirse en el SE no solamente a Fli1, aún cuando ésta sea la fusión mayoritaria en el mismo, sino a otros miembros de la familia Ets como ERG, ETV1, ETV4 o FEV (225). EWS no está únicamente translocado en el SE sino en una amplia serie de sarcomas, como el sarcoma de células claras (fusión EWS-ATF1), el tumor desmoplásico de células redondas pequeñas (fusión EWS-WT1), el condrosarcoma mixoide (fusión EWS-NR4A3) o el liposarcoma mixoide (fusión EWS-DDIT3) (225). La única excepción en lo concerniente a las fusiones que involucren a algún miembro de la familia TET fuera de este campo, es el de la leucemia linfoblástica aguda con el reordenamiento FUS-ERG (225, 234).

Figura 12. Estructura proteica de EWS. QSY: dominio rico en QSY; IQ: dominio IQ; RGG: caja RGG; RRM: dominio de reconocimiento de ARN; Zn: dominio de dedos de zinc; C-NLS: señal de localización nuclear C-terminal.

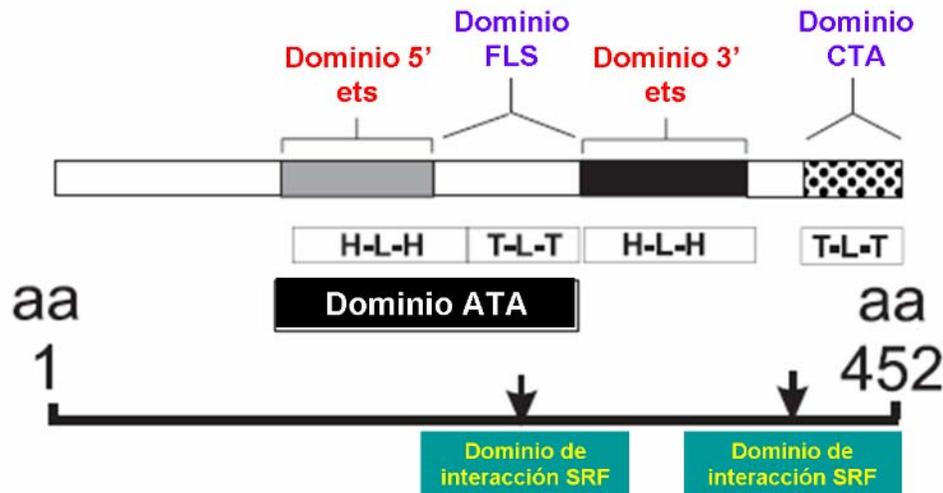


5. FLI-1.

El gen Fli-1 (*Friend leukemia integration site 1*) está localizado en el cromosoma 11q23-24, y cuenta con 118kb. La proteína a la que da lugar consta de 452 aminoácidos y un peso molecular de 51kDa (235). Se identificó en primer lugar como una pequeña región de ADN en el genoma murino en la que tenía lugar la integración de forma común de dos retrovirus inductores de leucemias murinas (236, 237). La región está cerca del centrómero del cromosoma 9 murino que posee homología con parte del brazo largo del cromosoma 11 humano.

Fli-1 pertenece a la familia de factores de transcripción ETS. La familia recibe ese nombre dado que el primer miembro aislado de la misma fue el oncogen retroviral de aves E26 y de ahí las siglas ETS o transformación específica por E26 (238). La familia ETS cuenta con una treintena de miembros, todos ellos factores de transcripción caracterizados por la presencia de un dominio ETS de unión al ADN de 85 aminoácidos y altamente conservado. El dominio ETS de unión a ADN media la unión a secuencias ricas en purinas, con una estructura central de consenso GGA(A/T), localizada en el promotor del gen diana. En el caso concreto de Fli-1 posee dominios ETS en ambos extremos, 5' y 3' ambos con una estructura del tipo hélice-giro-hélice (HLH) que media el contacto proteína- proteína (239) y separados por un dominio específico de Fli1 (FLS). El dominio ETS en 5' y el dominio FLS forman lo que se denomina como dominio amino terminal de activación transcripcional o ATA. El extremo 3' alberga el CTA o dominio carboxiterminal de transactivación que media la unión al ADN pero de inferior potencia al del dominio en 5' (240). La familia ETS se divide en diferentes subfamilias en función de la localización y de la similitud estructural del dominio ETS en la secuencia; Fli-1 pertenece al grupo II.

Figura 13. Dominios proteicos de la estructura de Fli-1. 452 aminoácidos. ATA: dominio de activación transcripcional amino-terminal; FLS: dominio específico de Fli-1; CTA: dominio de activación transcripcional carboxi-terminal; H-L-H: estructura hélice-bucle-hélice; T-L-T: estructura giro-bucle-giro.

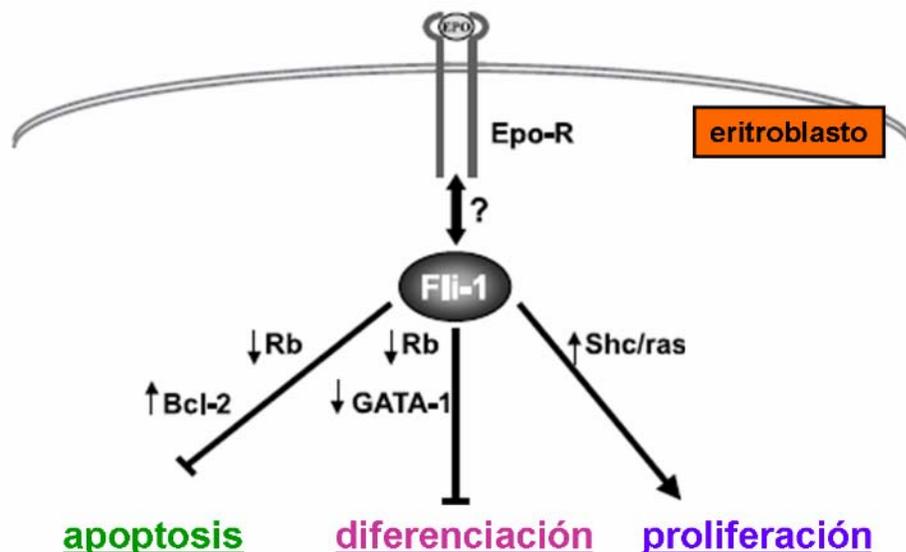


Fli-1 se expresa durante el desarrollo en las células hematopoyéticas y endoteliales y en las mesenquimales derivadas de la cresta neural (241, 242). Es un marcador temprano de hematopoyesis y se expresa en los hemangioblastos presentes en la sangre del saco vitelino. En las aves, Fli-1 se expresa igualmente en las células de la cresta neural mientras que en los embriones de pez cebra se detecta en los lugares de vasculogénesis (243). En tejidos adultos su expresión está restringida fundamentalmente al tejido hematopoyético aunque también está presente en timo e hígado debido a la elevada expresión en ambos órganos de precursores de linfocitos, eritrocitos y megacariocitos (244). Además se ha detectado su presencia en tejidos no hematopoyéticos como corazón, pulmón u ovario (237). Fli-1 desempeña un papel de gran importancia en el desarrollo de los megacariocitos, así lo atestigua que el ratón nulo para Fli-1 sea letal y muera en el estadio embrionario E 11.5 debido a una severa hemorragia craneal motivada por defectos vasculares (245). Su sobreexpresión en ratón conduce a un aumento de la proliferación de las células B dando lugar a un desorden autoinmune (246).

Fli-1 es capaz de unirse a los promotores de genes específicos de megacariocitos como la glicoproteína IX, la glicoproteína IIb (GpIIb) o el receptor de la trombopoyetina (MPL) y activar su transcripción (247, 248). Así mismo la transfección de Fli-1 en la línea celular K562 es capaz de promover la diferenciación megacariocítica (249). El papel de Fli-1 como agente transformador se

ha estudiado ampliamente ya que es una diana de integración proviral de F-MuLV. La inducción de leucemias eritrocíticas requiere la activación insercional de Fli-1 junto a mutaciones en p53 (250). Es capaz de bloquear procesos de diferenciación e inducir la renovación y proliferación de los progenitores eritroblásticos (251). Otras evidencias de su implicación en procesos de transformación tumoral son su capacidad para unirse al promotor del gen Rb inhibiendo su expresión y favoreciendo la transición G1/S en el ciclo celular y la inducción de p21 y del factor de supervivencia anti-apoptótico Bcl-2 (252, 253). Fli-1 está involucrado en la proliferación y angiogénesis de las células endoteliales mediante la activación del gen de la hemo oxigenasa (254). En consecuencia Fli-1 ejerce como transformador oncogénico promoviendo la supervivencia celular, favoreciendo la progresión del ciclo celular y en asociación con EWS actuando como un activador transcripcional aberrante.

Figura 14. Modelo de acción de Fli-1 en los eritroblastos. Figuras adaptadas de [Truong AH, Ben-David Y. \(2000\). The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 19: 6482-9. Review.](#)



6. Fusiones génicas.

Desde que fueron sugeridas por primera vez en 1914 por Boveri (255) hasta el momento actual se han identificado 358 fusiones génicas con 337 genes involucrados. Tuvieron que pasar varias décadas hasta que las técnicas de análisis cromosómico no evolucionaron y se pudo confirmar con el descubrimiento por Novell y Hungerford del cromosoma Filadelfia (256) la importancia de las translocaciones cromosómicas en los procesos de tumorigénesis. Años más tarde sería descubierta la primera translocación cromosómica $t(9;22)(q34;q11)$ en la leucemia mieloide crónica (257).

El desarrollo de las técnicas de citogenética y análisis cromosómico como FISH, SKY o CGH han permitido incrementar de forma exponencial con el paso del tiempo el número de fusiones detectadas con mapeos cada vez más precisos de los genes involucrados (258, 259, 260). Los reordenamientos recurrentes ordenados, más comúnmente conocidos como translocaciones, han sido descritos en prácticamente cualquier tipo tumoral siendo la leucemia mieloide aguda la entidad más estudiada a este respecto y con el mayor número de fusiones identificadas. La mayor parte de las mismas están asociadas a distintos perfiles clínicos y de expresión génica lo que convierte a esta información en fundamental a la hora del diagnóstico y manejo de estas enfermedades. Al contrario que otro tipo de aberraciones cromosómicas como deleciones o amplificaciones, que aparecen como eventos secundarios durante la progresión tumoral, las translocaciones suelen ser eventos primarios específicos muchas veces desencadenantes, o al menos relevantes en la patogenia de sus respectivos tumores. En algunos casos las translocaciones pueden asociarse a pérdidas o ganancias crípticas en torno a los puntos de ruptura cromosómica (261).

Las translocaciones tienen como consecuencia la creación de proteínas quiméricas, las cuales tienen un papel destacado en la generación del tumor o bien dan lugar a una pérdida de función génica o más frecuentemente a la sobreexpresión de uno de los genes implicados al quedar bajo el control de un potente promotor del otro gen involucrado en el reordenamiento.

Las fusiones representan una diana terapéutica de primer grado ya que la efectividad en el tratamiento de aquellos tumores en los que están presentes depende en gran medida de su inhibición (262, 263). El silenciamiento *in vitro* de estas fusiones revierte la malignidad tumoral y reduce la proliferación (264).

La generación de modelos animales con translocaciones da lugar a la generación de tumores de la misma naturaleza que los presentes en las neoplasias humanas con dichos reordenamientos (265, 266).

Las proteínas quiméricas generadas pueden actuar de distintas formas pero en general se comportan como factores transcripcionales aberrantes como por citar dos ejemplos FUS-CHOP o EWS-FLI1 (34, 74) o menos comúnmente como proteín-quinasas constitutivamente activadas tal y como sucede con ETV6-NTRK3 (267) o incluso como un factor de crecimiento aberrante, caso de la fusión COL1A1-PDGFB en el dermatofibrosarcoma protuberans (268).

Como hemos mencionado anteriormente la translocación puede suponer una pérdida de función génica (269) aunque es más habitual que se produzca la sobreexpresión de uno de los genes implicados al quedar bajo el control de un potente promotor del otro gen involucrado como es el caso de la t(8;14)(q24;q32) del linfoma de Burkitt en la cual el gen Myc queda yuxtapuesto a los elementos regulatorios del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH) (270, 271, 272, 273).

La gran mayoría de translocaciones cromosómicas son específicas de un tipo tumoral concreto pero existen algunas excepciones, la más notable es la t(12;15)(p13;q25) que fusiona el gen ETV6 con el receptor de la proteín-quinasa neurotrófica tipo 3 (ETV6-NTRK3) descubierta en el fibrosarcoma congénito y que está presente en entidades tan dispares como la leucemia mieloide aguda, el nefroma mesoblástico de riñón o el adenocarcinoma de mama tipo secretor (274). Esta fusión está ligada a distintas vías de señalización como la de Ras-MAP quinasa o la de PI3K-AKT a través de una proteína adaptadora IRS-1 con la participación del gen c-Src el cual a su vez está sobreexpresado en distintos tipos de cáncer como el de mama. Quizás esta sea la explicación de la falta de especificidad de esta fusión aún cuando el motivo exacto sigue sin ser conocido.

Algunos de los genes que participan en las fusiones pueden unirse a numerosos compañeros; es el caso de MLL, ETV6 y EWS con más de 40, 20 y 10 posibles acompañantes. Esto permite la interconexión entre los numerosos genes implicados creando una red que se agrupa básicamente en 3 subredes que concentran el 90% de los genes identificados a día de hoy como participantes en las fusiones.

La mayor parte de translocaciones cromosómicas son balanceadas (258, 260) pero se han descubierto fusiones génicas las cuales se deben a translocaciones cromosómicas no balanceadas como por ejemplo:

- COL1A1-PDGFB -dermatofibrosarcoma protuberans con cromosomas circulares supernumerarios (275).
- ASPSCR1-TFE3 der(17)t(X;17) (p11;q25) en el sarcoma alveolar de partes blandas (276).
- NUP214-ABL1 en episomas amplificados en la leucemia linfoblástica aguda de células T (277).

También tienen lugar fusiones por yuxtaposición física de los genes en torno a los cuales se producen microdelecciones como es el caso de la fusión *hyaluronan synthase 2* (HAS2)-PLAG1 en lipoblastoma (278), GOPC-ROS1 en el glioblastoma (279) o la unión *transmembrane protease serine 2* (TMPRSS2)-ERG en el carcinoma de próstata (280).

En los tumores hematológicos se han descubierto hasta el momento 264 fusiones distintas con 238 genes partícipes de las mismas lo que supone un 75% del total de fusiones conocidas (260). A pesar de tan alto número no son la única causa de origen de estas neoplasias salvo en casos muy definidos como son:

- BCR-ABL1 en la leucemia mieloide crónica, IGH-CCND1 en el linfoma de las células del manto, IGH-MYC en el linfoma de Burkitt y PML-RARA en la leucemia promielocítica aguda.

Por ejemplo en el caso de la leucemia más frecuente, el de la leucemia mieloide aguda, que representa el 33% del total de tumores hematológicos y el 27% del total de tumores con translocaciones el conjunto de las 10 fusiones más frecuentes no llega al 15% (281). En la leucemia linfoblástica aguda y en las neoplasias de células T y B maduras el porcentaje es similar y en los síndromes mielodisplásicos, desórdenes crónicos mieloproliferativos y linfomas tipo Hodgkin el porcentaje es inferior al 1%.

Figura 15. Translocaciones en tumores hematológicos. Adaptada de [Mitelman F, Johansson B, Mertens F. \(2007\). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7: 233-45.](#)

Neoplasia	Translocación	Fusión
Leucemia aguda megacarioblástica	t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL1
Linfoma anaplásico de células T	t(2;5)(p23;q35)	NPM1-ALK
Leucemia/Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	IGH-MYC
Leucemia mieloide aguda, tipo M2	t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1
Leucemia mieloide crónica	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1
Leucemia linfoblástica infantil aguda de células B precursoras	t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1
Mieloma múltiple	t(14;16)(q32;q23)	IGH-MAF
Leucemia aguda promielocítica	t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA

En los tumores sólidos se han descrito 70 fusiones génicas y 83 genes implicados en las mismas (260). El grado de conocimiento del papel de las translocaciones en los tumores sólidos es claramente inferior al que se tiene de las mismas en los tumores hematológicos. Existen varias causas que pueden explicarlo como la mala morfología de los cromosomas en muchos casos, la gran complejidad del cariotipo o la presencia de clones diversos cuestión bastante común entre los carcinomas (282).

Figura 16. Fusiones génicas en carcinomas. Adaptada de [Mitelman F, Johansson B, Mertens F. \(2007\). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7: 233-45.](#)

<u>Carcinoma</u>	<u>Fusión génica</u>
Carcinoma agresivo de línea media	BRD4-NUT*
Carcinoma de mama	ETV6-NTRK3*, ODZ4-NRG1*, TBL1XR1-RGS17
Carcinoma renal	ALPHA-TFEB*, ASPSCR1-TFE3*, PRCC-TFE3*, CLTC-TFE3, NONO-TFE3, SFPQ-TFE3
Carcinoma mucoepidermoide	MECT1-MAML2*
Carcinoma de próstata	TMPRSS2-ERG, TMPRSS2-ETV1, TMPRSS2-ETV4, RPS10-HPR
Carcinoma folicular de tiroides	AKAP9-BRAF*, PAX8-PPARG*, RET-CCDC6*, RET-GOLGA5*, RET-KTN1*, RET-NCOA4*, RET-PCM1*, RET-PRKAR1A*, RET-RAB6IP2*, RET-RFG9*, RET-TRIM24*, RET-TRIM33*, TFG-NTRK1*, TPM3-NTRK1*, TPM3-TPR

Como hemos mencionado anteriormente se cree que el número de fusiones descubiertas hasta el momento es bajo y que aún quedan numerosas más por descubrir. El uso de las técnicas de análisis de expresión génica o de número de copias ha desplazado al tradicional análisis de los cromosomas en metafase.

Parece claro que las rupturas de la doble hebra de ADN son necesarias para la mayor parte de fusiones (283, 284). Numerosos agentes externos pueden inducir estas rupturas pero muy pocos de ellos se han asociado a translocaciones específicas, tan sólo aquellos agentes que dañan a la topoisomerasa II por un lado y por otra parte las radiaciones ionizantes (285, 286). Existen algunos síndromes de ruptura cromosómica asociados a inestabilidad cromosómica y de ADN que pueden predisponer a cáncer. Sin embargo pocas translocaciones han sido descritas en pacientes con estos síndromes (287). Fallos en los procesos de reparación de las rupturas de la doble hélice de ADN (*double-strand breaks*) así como en la unión de los extremos no homólogos (NHEJ), la recombinación homóloga (HR) o en el anillamiento de cadena sencilla (SSA) podrían contribuir a la aparición de las translocaciones (288) como ya se ha demostrado en células madre embrionarias murinas en las que las translocaciones pueden generarse durante la reparación de las rupturas de la doble hélice de ADN (289). A pesar de todo las causas de estas fusiones siguen sin estar claras y se sigue considerando que las fusiones surgen al azar. La arquitectura tridimensional de los cromosomas en la interfase parece ser importante a la hora de dar lugar a las translocaciones debido a la proximidad espacial de los genes involucrados como sucede por ejemplo con BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica o PML-RARA en la leucemia promielocítica aguda (290, 291). Sin

embargo esta mera proximidad física no bastaría por sí sola. Otros factores como los motivos de secuencia compartidos en los puntos de ruptura cromosómicos podrían ayudar a generar las fusiones (292). Cada vez cobran mayor importancia los elementos repetitivos que suponen el 45% del genoma humano; dentro de los mismos destacan las secuencias Alu como la familia más numerosa. Estas secuencias están involucradas en reordenamientos intracromosómicos tanto en células germinales como somáticas (293, 294, 295). También se producen reordenamientos entre secuencias Alu y no Alu que generan translocaciones recíprocas (294, 296, 297).

Las translocaciones pueden ser detectadas a cualquier edad. En el caso de los tumores hematológicos primarios parece que las fusiones pueden aparecer *in utero* varios años antes pero en las leucemias en pacientes adultos así como en los tumores sólidos no se puede trazar ese seguimiento y es difícil determinar cuándo surgen las translocaciones (298).

La teoría del origen de las hemopatías a partir de células madres tumorales hematológicas capaces de generar y mantener el tumor está bastante aceptada hoy en día. El concepto de célula madre tumoral se ha extendido a otros tumores sólidos como por ejemplo de mama, pulmón o colon (299, 300, 301). Algunas fusiones se han localizado en células madre concretas pero en la mayoría de los casos no es así (302). Una pega es que en individuos sanos también se han detectado fusiones (303). Se pueden detectar células con fusiones en pacientes leucémicos tratados con éxito varios años después. Las fusiones parecen no ser suficientes *per se* para inducir una transformación neoplásica. Los datos de modelos murinos indican la necesidad de eventos genéticos secundarios (304, 305).

En el caso de los sarcomas se postula su origen a partir de células madre mesenquimales (306). En algunos sarcomas las evidencias de los modelos animales han puesto de manifiesto que las fusiones por sí solas pueden generarlos (36), mientras que en otros casos se hace necesaria la cooperación de un evento adicional (225). Recientemente se ha verificado la existencia de un número mayor de mutaciones del estimado lo que deja abierta la posibilidad de encontrar un mayor número de translocaciones cromosómicas (307, 308).

En los sarcomas se han detectado 41 fusiones génicas en 17 tipos. Entre un 15 y un 20% del total de sarcomas cuentan con translocaciones cromosómicas dando lugar a la formación de proteínas quiméricas las cuales debido a que frecuentemente los genes implicados en las translocaciones son factores de transcripción se comportan como factores transcripcionales

aberrantes más potentes que los respectivos genes *wild type* involucrados en la fusión. Por regla general solamente se expresa uno de los dos productos de la translocación. Prácticamente el 100% de los SE, liposarcomas mixoides y sarcomas sinoviales cuentan con fusiones pero éstas en cambio no se detectan en otros sarcomas como los osteosarcomas, condrosarcomas o leiomiomas.

Figura 17. Fusiones en sarcomas. Adaptada de [Helman LJ, Meltzer P. \(2003\). Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer.* 3: 685-94. Review.](#)

Tipo de sarcoma	Translocación	Genes	Función
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q21;q12) t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1-FLI1</i> <i>EWSR1-ERG</i> <i>EWSR1-ETV1</i> <i>EWSR1-ETV4</i> <i>EWSR1-FEV</i>	Factor de transcripción
Sarcoma de células claras	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i>	Factor de transcripción
Tumor desmoplástico de células redondas pequeñas	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWSR1-WT1</i>	Factor de transcripción
Condrosarcoma mixoide	t(9;22)(q22-31;q11-12)	<i>EWSR1-NR4A3</i>	Factor de transcripción
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>FUS-DDIT3</i> <i>EWSR1-DDIT3</i>	Factor de transcripción
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX3-FOXO1A</i> <i>PAX7-FOXO1A</i>	Factor de transcripción
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX</i>	Factor de transcripción
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>	Factor de crecimiento
Fibrosarcoma congénital	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>	Receptor de factor de transcripción
Tumor miofibroblástico inflamatorio	2p23 rearrangements	<i>TMP3-ALK; TMP4-ALK</i>	Receptor de factor de crecimiento
Sarcoma alveolar de partes blandas	t(X;17)(p11.2;q25)	<i>ASPL-TFE3</i>	Factor de transcripción

Estas proteínas quiméricas generadas son capaces de transformar células en cultivo; se ha podido demostrar el potencial oncogénico de las fusiones EWS-FLI1 en el SE t(11;22)- (q24;q12), PAX3-FKHR en el rabdomiosarcoma alveolar (2;13)(q35;q14), SYT-SSX1 en el sarcoma sinovial t(X;18)(p11;q11) y FUS-CHOP en el liposarcoma mixoide t(12;16)(q13;p11) (116, 309, 310, 311). Estas líneas celulares transformadas por las fusiones son capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes al ser inyectadas en los mismos, generalmente de forma subcutánea (312). Se han generado modelos murinos de expresión condicional de las fusiones y en ambos casos se generan fenotipos tumorales altamente semejantes al tumor característico de la fusión si bien la

incidencia tumoral es baja y cruzar los mismos con otras cepas portadoras de mutaciones en destacados loci aumenta las posibilidades de desarrollo tumoral lo que parece indicar la necesidad de un segundo evento oncogénico que acompañe a las translocaciones en la tumorigénesis (313, 314) aunque un reciente trabajo ha logrado mediante la simple acción de la proteína de fusión desarrollar el tumor lo que parece indicar que en el tipo celular adecuado y en el momento preciso sí sería capaz *per se* (36).

El abanico de acciones que pueden llevar a cabo estas fusiones es bastante amplio: incremento de la proliferación celular, inducción de la capacidad de transformación oncogénica, supresión de las inhibiciones por contacto célula-célula, represión de los programas de diferenciación, inhibición de la apoptosis, promoción de la invasividad, etc... afectando a las dianas de los genes implicados en la fusión y alterando distintas vías de señalización.

Las proteínas quiméricas pueden interactuar con otros factores de transcripción como sucede por ejemplo con la fusión EWS-ATF1 y el coactivador CBP reprimiendo la transactivación mediada por p53 (315). También son capaces de modular procesos post-transcripcionales como los de procesamiento alternativo en el caso de EWS-FLI1 (316).

Se han descrito distintas fusiones para una misma entidad tumoral en al menos seis tipos de sarcomas. Uno de los componentes de la fusión suele ser el mismo y el otro varía pero por lo general pertenecen a la misma familia. Estas variantes suelen ser poco frecuentes en relación a la que podríamos denominar como fusión principal, poseen una estructura y función semejante y suelen generar fenotipos similares (317, 318). Sin embargo un artículo cuestiona este hecho dado que en uno de los modelos de línea celular más usados en transformación oncogénica como es la línea NIH3T3 las diferentes variantes en este caso de la fusión EWS-FLI1 no dan lugar a un mismo fenotipo tumoral (119). Este estudio pone de manifiesto una vez la suma importancia del ámbito celular en el que actúa la fusión.

Parece más o menos claro que las fusiones por sí solas no son capaces de desencadenar el proceso de transformación tumoral salvo en sarcomas concretos (36) necesitando la cooperación de otros factores adicionales como puede ser una mutación activadora en un oncogen, la pérdida de un gen supresor tumoral o la activación de la enzima telomerasa (319). Algunos ejemplos son los citados a continuación:

- amplificación de MYCN en el rabdomiosarcoma alveolar (320).
- pérdida del supresor tumoral p16 en el SE (321).

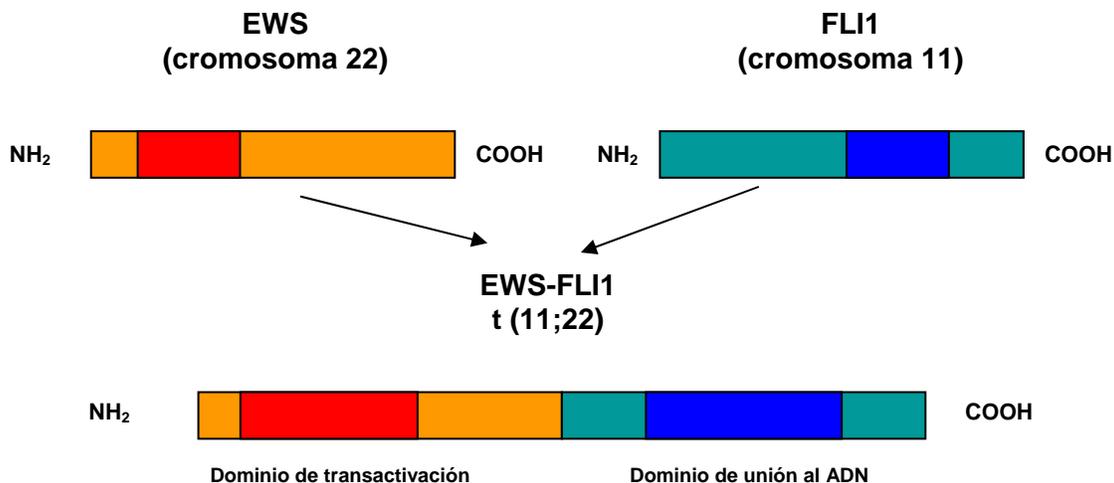
La familia de tumores del SE se caracteriza por la existencia de fusiones específicas entre el gen EWS y un miembro de la familia ETS. La translocación más representativa presente en un 80-85% de casos es la t(11;22)(q22.24) que implica a los genes EWS-FLI1. Aparte de Fli-1 otros 4 genes diferentes de la familia ETS se ven involucrados en translocaciones con EWS de las cuales la t(21;22)(q22;q12), EWS-ERG, es la más frecuente con un 5-10% del total de SE (322, 323). Otras fusiones minoritarias son EWS-ETV1 (324), EWS-E1AF (325), EWS-FEV (326). Se ha descrito también un caso de fusión FUS-ERG t(16,21)(p11;q22) (327).

Este tipo de fusiones EWS-ETS se consideraban específicas de este conjunto de neoplasias pero se han detectado igualmente en un reducido grupo de sarcomas y tumores (328, 329, 330, 331).

7. EWS-FLI1.

EWS-FLI1 es una proteína quimérica que se localiza en el núcleo. El dominio N-terminal de EWS se fusiona con el dominio C-terminal de Fli-1 en el que reside el dominio ETS de unión al ADN. El dominio aminoterminal aportado por EWS posee un potencial de transactivación superior al del dominio nativo de Fli-1 reemplazado en la fusión. Aún cuando la fusión EWS-FLI1 y el gen Fli-1 comparten la misma especificidad de unión al ADN la fusión es un activador/represor transcripcional mucho más fuerte (332, 333, 334, 335). Fli-1 no es capaz de por sí solo recapitular los efectos producidos por la fusión tales como crecimiento en agar blando o la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos (223).

Figura 18. Esquema de la proteína de fusión EWS-FLI1.



A nivel genómico los puntos de rotura para el gen EWS se extienden en una región de 8Kb mientras que los de Fli-1 están dispersos aproximadamente unos 35Kb (336). Existen 12 tipos descritos de fusiones EWS-FLI1 siendo las más frecuentes la de tipo 1 con el exón 7 de EWS unido al exón 6 de Fli-1, la de tipo 2 con el exón 7 de EWS yuxtapuesto al exón 5 de Fli-1 y la de tipo 3 con el exón 10 de EWS junto al 6 de Fli-1.

EWS-FLI1 es capaz de transformar líneas celulares como NIH3T3. Esta línea recapitula las características fibroblásticas y representa una línea no transformada inmortalizada con el protocolo 3T3. La facilidad de crecimiento y la disponibilidad de esta línea hacen que haya sido

ampliamente usada en estudios de estas características. La transfección de forma estable de plásmidos con la fusión ha permitido avanzar en el conocimiento de aspectos de la biología tumoral del SE. La fusión es capaz de promover el crecimiento independiente de anclaje en células transfectadas así como la formación de tumores al ser inyectadas en ratones inmunodeprimidos (318, 337). La inducción del transcrito quimérico en células inmortalizadas confiere capacidad tumorigénica y afecta profundamente a la morfología celular (338). Delecciones en el dominio transactivador de EWS reducen el potencial de la fusión así como mutaciones o sustituciones del dominio de unión a ADN de las proteínas ETS (223, 335, 339). Los mutantes de EWS-FLI1 deficientes en cualquiera de los dos dominios pierden toda la capacidad de transformación demostrando que hacen falta ambos dominios para que la fusión pueda ejercer su actividad oncogénica (116).

La fusión puede actuar como un factor de transcripción dominante de ETS, ya que tiene capacidad para unirse a complejos de transcripción a través del dominio aminoterminal cedido por EWS (115). Hay evidencias que demuestran que las fusiones EWS-FLI1 ejercen su potencial transformador a través de otras vías diferentes a la unión a promotores de genes ya que la sobre-expresión de Fli-1 no causa efectos semejantes a los inducidos por la fusión; dos explicaciones posibles son la interacciones con otras proteínas y cofactores y la posibilidad de que la fusión actúe como dominante negativo para las proteínas del tipo TET interfiriendo en los procesos de corte y empalme en el procesamiento alternativo del ARNm interaccionando por ejemplo con la proteína YB-1 (340). Existe un nexo de unión entre los procesos de procesamiento alternativo y de activación transcripcional de EWS-FLI1 como prueba por citar un ejemplo que la coexpresión del factor transcripcional y de procesamiento U1C interfiere con la fusión (227, 316).

Aspectos mecánicos de la proteína de fusión esenciales para el desarrollo de su función biológica.

El primer aspecto que hay que tener en cuenta es el hecho de que EWS-FLI1 es capaz de interaccionar con las proteínas nativas EWS y Fli-1 formando heterodímeros. A su vez EWS, pero no Fli-1, es capaz de formar homodímeros (341) Al contrario que la gran mayoría de factores de transcripción que se unen al ADN como dímeros la mayor parte de las proteínas de la familia ETS por ejemplo Fli-1 reconocen el ADN en forma de monómeros (342). Se ha comprobado mediante ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo que la fusión EWS-FLI1 se puede unir al

ADN como monómero por ejemplo al promotor del gen TGF- β (343) pero que es capaz así mismo de formar complejos multiméricos lo que puede ayudar a EWS-FLI1 a la hora de unirse a regiones de baja afinidad para los dominios ETS ampliando de esta forma el espectro de posibles dianas de la fusión. La oligomerización de EWS-FLI1 o la formación de heterodimeros con EWS son aspectos importantes en la capacidad tumorigénica de la fusión (341) y tienen incidencia en la heterogeneidad del SE (13).

El segundo aspecto que debemos considerar es que la fusión *per se* no es capaz de transformar líneas celulares primarias murinas o humanas induciendo bien parada del ciclo celular o muerte celular. La translocación es necesaria pero no suficiente por sí sola como generar el fenotipo tumoral. Se hace necesaria la colaboración de otros eventos tales como mutaciones o sobreexpresiones de genes. En torno a un 20% de los SE cuentan con pérdida homocigótica de p16. La introducción de la fusión en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) defectivos en p16 hace que los efectos de la fusión se atenuen en relación con las mismas células wild type por ejemplo con un rescate parcial de muerte celular y lo mismo sucede en MEFs con p53 o ARF mutados. Sin embargo estas células transformadas tienen un potencial tumorigénico muy limitado en ratones lo que evidencia la necesidad de otras alteraciones genéticas adicionales. La transfección de EWS-FLI1 en fibroblastos humanos primarios inmortalizados con telomerasa provoca parada de la proliferación celular aumentando los niveles de p53. La introducción en estas células del papilomavirus humano HPV16 E6, un inhibidor de p53, suprime la parada proliferativa pero no es suficiente para que las células puedan crecer en agar blando (15, 110).

La proteína quimérica EWS-ETV1 se comporta de forma similar a la fusión EWS-FLI1 en la generación de tumores en ratones inmunodeprimidos a pesar de las diferencias estructurales de los respectivos dominios ETS lo que hace pensar en rutas de activación oncogénica compartidas entre las diferentes fusiones EWS-ets (318).

Dianas de la fusión EWS-FLI1.

La proteína quimérica EWS-FLI1 tiene como dianas a numerosos genes a los que bien activa o reprime en función del contexto celular en el que se exprese.

EWS-FLI1 afecta a la proliferación celular alterando la expresión de reguladores clave del ciclo celular como CDKN1A o p21, diana directa de la misma (344). La expresión de EWS-FLI1 en

células Hela aumenta los niveles de ciclina D1 así como los de c-Myc y disminuye los de p57, inhibidor del complejo ciclina-CDK. La sobreexpresión de ciclina D1 en muestras de SE está comprobada. Si se transfecta una línea de rhabdomyosarcoma con EWS-FLI1 la expresión de ciclina D1 sube y la de D3 baja lo que confirma que la regulación de las ciclinas al menos por parte de la fusión depende del contexto celular (345). El uso de métodos como la inmunoprecipitación de cromatina ha permitido confirmar la unión directa de la fusión al promotor de dianas como c-Myc, Id2, p57 o ciclina D1 (120, 317).

Id2 promueve la proliferación celular inactivando al gen Rb y promoviendo la transición de la fase del ciclo celular G1; inhibe los procesos de diferenciación mediante la unión a los factores de transcripción básicos HLH (346). La sobreexpresión de Id2 dirige las células ectodérmicas hacia un fenotipo de cresta neural en lugar hacia un linaje epidérmico (347). Id2 es a su vez diana de c-Myc así como antagonista de los genes myod, miogenina y del inhibidor del ciclo celular p21 (348). c-Myc a su vez está conectado con p57 que es una diana reprimida por EWS-FLI1 (120).

La fusión afecta a componentes de distintas vías de señalización como por ejemplo TGF β RII (343). En líneas celulares de SE la expresión de TGF β RII es muy reducida o prácticamente indetectable así como la sensibilidad a TGF- β . La sobreexpresión de TGF β RII restaura la sensibilidad a TGF- β e inhibe la formación de tumores en ratones inmunodeficientes. Aunque se desconoce el mecanismo de supresión, un inhibidor de la histona deacetilasa puede restaurar la expresión de este gen en las líneas celulares de SE (349). Otra vía expuesta a la acción de EWS-FLI1 es la de IGF1/IGF1R cuya importancia en el SE está bien documentada (350, 351). EWS-FLI1 reprime la expresión de IGFBP3, regulador de esta vía (205) y activa IGF1R como se demuestra en la transformación inducida por la misma en fibroblastos (117).

En la línea celular NIH3T3 al transfectar la fusión la actividad telomerasa aumenta así como los niveles de ARNm de telomerasa (hTERT), en un proceso en el que también se ve implicado CBP/p300, componente de la maquinaria basal de transcripción. El papel de la telomerasa en el SE no está del todo definido pero sí parece haber una correlación entre una elevada actividad telomerasa detectada en sangre periférica y un pronóstico más adverso del SE (78, 352, 353).

PDGF-c (factor de crecimiento derivado de plaquetas) es otra diana de EWS-FLI1. Es un factor secretado por diversos tipos celulares con una potente actividad mitógena y quimiotáctica. Se expresa tanto en líneas celulares de SE como en muestras clínicas. Es importante su labor en el SE ya que su inhibición mediante el uso de dominantes negativos reduce la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de las células (354, 355).

Tres genes identificados utilizando la técnica de la hibridación substractiva son:

- MFNG (*manic fringe*). EWS-FLI1 en NIH3T3 potencia la expresión de este gen. MFNG codifica una glicoproteína que participa en procesos de diferenciación y desarrollo como el embrionario. En tejidos adultos está relacionado con la vía de Notch y con procesos de diferenciación hematopoyética, epidérmica y maduración neuronal. La expresión forzada de esta glicoproteína en ratones *nude* induce la formación de tumores pero que carecen del fenotipo de célula pequeña redondeada del SE (337).
- EAT-2, gen con dominio SH-2, inducido por EWS-FLI1 en la línea NIH3T3, involucrado en la respuesta inmune ya que participa en el control de la señal de transducción a través de los receptores CD84, CD150, CD229 y CD244 (356).
- mE2-C, ubiquitín ligasa selectiva de ciclinas sobreexpresada por EWS-FLI1 en la línea NIH3T3. Su expresión también se ve alterada al transformar dicha línea celular con los genes *cdc42*, *v-ABL* y *c-Myc* (357).

La mayor parte de los SE aparecen preferentemente en los huesos pero existen otras localizaciones distintas por lo que la célula de origen en la que surge la fusión puede ser totipotente y ser capaz de diferenciarse de distintas formas. La expresión de EWS-FLI1 afecta a los procesos de diferenciación como puede comprobarse en la línea biogénica murina C2C12 que es capaz de diferenciarse a hueso, tejido adiposo o muscular en presencia de los factores adecuados. La fusión se introduce con el objeto de conocer nuevos genes relevantes en la tumorigénesis inducida por EWS-FLI1. La fusión consigue parar el proceso de diferenciación biogénica y osteogénica ya que ni tan siquiera el rescate de esta vía mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción miogenina o MyoD revierte la acción de la proteína quimérica. El único marcador osteogénico positivo fue la fosfatasa alcalina siendo negativa la tinción para osteocalcina y el colágeno tipo I.

Dos dianas ya descritas en otras líneas se ven alteradas también en este tipo celular como son p21 y ciclina D1 con represión y activación respectivamente (108).

La transfección de líneas de neuroblastoma, tumor pediátrico derivado del sistema nervioso simpático, con EWS-FLI1, reprime un programa de diferenciación y activa otro. EWS-FLI1 suprime la expresión de marcadores típicos de neuroblastoma como MYCN o cromogranina A y aumenta los niveles de algunos otros típicos del SE como c-Myc o CD99. El perfil de expresión génica de estos tumores se asemeja más al de un SE que al de los neuroblastomas (121). El estatus de p53 cambia al expresar la fusión en una línea de neuroblastoma. De una localización citoplasmática se pasa a una nuclear y además su expresión se ve incrementada posiblemente debido a una mayor estabilización proteica por fosforilación de su residuo serina 15 lo que impide la unión de MDM2. Sin embargo a pesar de esto, p53 no es funcional en las líneas transfectadas mientras que por el contrario si mantiene su actividad en la línea parental (358).

Otros genes más recientemente identificados son:

- DAX1/NR0B1, receptor nuclear huérfano involucrado en el desarrollo de las gónadas, la determinación sexual y la génesis de esteroides que puede actuar como un potente represor transcripcional. Se induce por la fusión pero no por Fli-1 en la línea celular 293. Presente en 7 líneas de SE y en muestras clínicas pero ausente en neuroblastoma o en rhabdomyosarcoma embrionario (206, 215).
- PTPL1, proteína tirosina fosfatasa 1. Gen inducido por la fusión y con alta expresión en líneas de SE y en muestras tumorales. Posible candidato terapéutico ya que su inhibición aumenta la sensibilidad de las líneas de SE al tratamiento con drogas citotóxicas como el etopósido así como provoca una reducción del crecimiento en monocapa y del crecimiento en agar blando (359).
- PLD2, fosfolipasa 2. Activación mediante la unión directa al promotor de este gen por parte de la fusión en un dominio de transformación específico de eritroblastos. Su inhibición con butanol o con ARNi reduce la proliferación celular. Relación inversa con PLD1. Interviene en la señalización de PDGF (360).
- NKX2.2 es un gen inducido por EWS-FLI1 relacionado con diferenciación neural y necesario parece ser para el crecimiento tumoral *in vivo* (213).

- RXR. EWS-FLI1 inhibe la actividad transcripcional dependiente de CBP de RXR (el receptor del ácido retinoico) por medio de un mecanismo no relacionado con la unión a ADN restando sensibilidad celular a la diferenciación y apoptosis inducidas por el ácido retinoico (361).

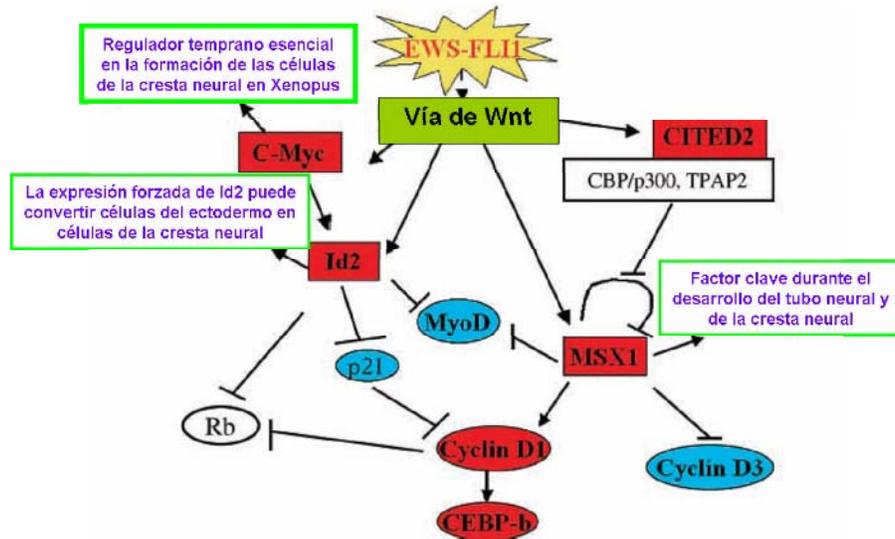
- VEGF. EWS-FLI1 activa directamente el promotor de VEGF. VEGF es inducido por la fusión junto a la expresión de ciclina D1 en un proceso en el que colabora el factor de transcripción Sp1. VEGF es un factor pronóstico negativo de supervivencia (362).

- Gli1. EWS-FLI1 promueve la sobreexpresión del gen GLI1 y a su vez de su diana transcripcional directa PATCHED1. Su inhibición vía ARNi reduce la capacidad de transformación de distintas líneas de SE. La activación de Gli1 tiene lugar de forma independiente de la del gen Hedgehog y necesita la cooperación del gen c-Myc. Gli1 está expresado en diferentes líneas de SE (363).

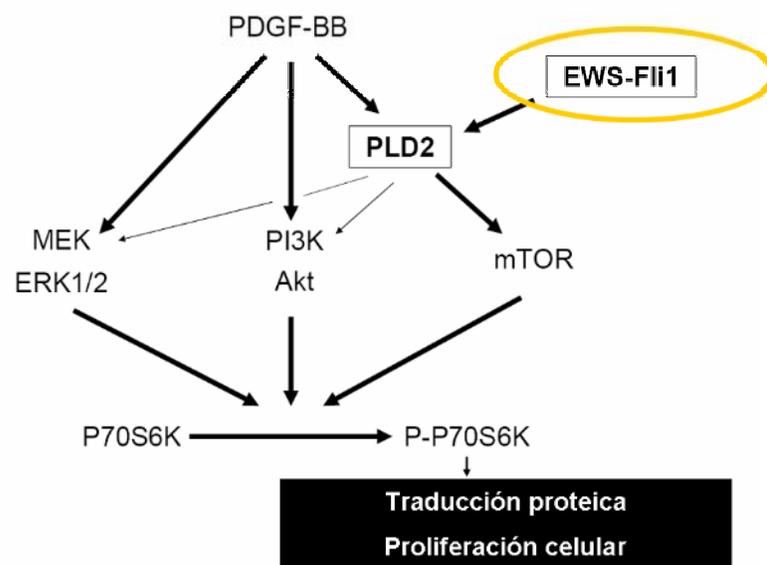
El uso de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) ha permitido identificar numerosas dianas potenciales de la fusión en un estudio (212) pero en cambio en otro se encontraron niveles inaceptables de “background” con los anticuerpos comerciales disponibles para EWS y Fli-1 (213).

Parece por tanto que las dianas de la fusión EWS-FLI1 pueden agruparse en dos grandes grupos: por un lado se inducen genes relacionados con la proliferación celular y la supervivencia como IGF1, c-Myc o PDGFC y por otro lado se reprimen dianas como p21, p57, TGFβRII y IGFBP3 lo que permite en conjunto al tumor escapar de la apoptosis y de la inhibición del crecimiento. El número de genes activados y reprimidos por la fusión tradicionalmente se ha considerado igualado (110, 312) aunque otros estudios apuntan a un papel de la fusión como un activador y no como un represor transcripcional (335, 364, 365). Sin embargo un estudio reciente pone de relieve que los genes reprimidos por la fusión son bastante más numerosos que los activados algo ya puesto de manifiesto previamente con una inhibición transitoria de EWS-FLI1 (205, 213, 214). En pocos casos se sabe si la diana es directa o no y la represión/inducción de genes por parte de la proteína de fusión depende en gran medida del contexto celular de actuación de la misma.

Figura 19. Dianas de EWS-FLI1. a) Adaptada de [Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. \(2005\). 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: 4633-44.](#)



b) Adaptada de [Nozawa S, Ohno T, Banno Y, Dohjima T, Wakahara K, Fan DG, Shimizu K. \(2005\). Inhibition of platelet-derived growth factor-induced cell growth signaling by a short interfering RNA for EWS-Fli1 via down-regulation of phospholipase D2 in Ewing sarcoma cells. *J Biol Chem* 280: 27544-51.](#)



EWS-ERG.

La fusión EWS-ERG fue descrita por primera vez en el SE en 1994 (366). Poco tiempo más tarde se identificó la fusión FUS-ERG en la leucemia mieloide aguda (234, 367).

La fusión EWS-ERG ha sido transfectada en distintos modelos celulares para estudiar los efectos de su expresión; su expresión condicional es capaz de dar lugar a un linfoma si se expresa en células hematopoyéticas de línea linfoide. Puede no sólo contribuir al inicio del tumor sino en el mantenimiento de la denominada célula madre tumoral. Dicho estudio demuestra el potencial universal de EWS-ERG como oncogen, cuyo efecto no está sólo limitado a sarcomas (368). EWS-ERG ha servido como base para el desarrollo de la técnica de ingeniería genética de modelos animales conocida como modelo condicional *inverted knock-in* (369).

La expresión de EWS-ERG es capaz de promover en la línea de fibroblastos NIH3T3 el crecimiento independiente de anclaje así como la formación de tumores en un modelo murino xenograft (119). Su transfección células madre mesenquimales origina un fenotipo de SE (370). EWS-ERG puede inhibir los procesos apoptóticos (371).

La inhibición de EWS-ERG mediante la expresión estable de plásmidos antisentido provoca una reducción efectiva en los niveles de la fusión con pérdida de la capacidad de crecimiento independiente de anclaje y de la formación de tumores en ratones desnudos.

Algunas dianas descritas de EWS-ERG son:

- COL11A2. El gen colágeno alfa-2 pertenece a la familia del colágeno fibrilar y parece desempeñar un papel importante en la fibrillogénesis al controlar el crecimiento lateral de las fibrillas de colágeno II. Se expresa en la línea de SE, CADO-ES1. EWS/ERG, pero no el gen ERG *wild-type*, transactiva el promotor de COL11A2 para lo que requiere no solamente la región N-terminal de EWS sino también el dominio intacto de unión al ADN de ERG. El gen COL11A2 es regulado tanto por la asociación de ERG con un complejo de histona deactilasa como por reclutamiento directo por parte de EWS/ERG de la ARN polimerasa II (372).

- Id2. El gen Id2 es también diana de la fusión EWS-ERG. Id2 promueve la proliferación celular inactivando Rb y promoviendo la transición de la fase G1 e inhibe la diferenciación vía la unión a los factores de transcripción básicos HLH. La sobreexpresión de Id2 dirige células ectodérmicas hacia un fenotipo de cresta neural en lugar hacia un linaje epidérmico. Id2 es además diana de c-myc así como antagonista de myod, miogenina y del inhibidor del ciclo celular p21 (346, 347, 348).
- Metaloproteinasas de matriz (MMP). Reprime su expresión. Ausencia de expresión de las MMP 1 y 3 en el SE. Las metaloproteinasas desempeñan una importante función en la remodelación de la matriz extracelular y en procesos como la invasión o la metástasis (373).
- TGFβRII. Supresión de su actividad por parte de EWS-ERG (374).

Se han llevado a cabo distintos estudios para averiguar posibles diferencias en la acción de las distintas proteínas de fusión pero más allá de la asociación de la fusión tipo 1 de EWS-FLI1 a una tasa de proliferación menor de las células del SE (375) no se han hallado correlaciones entre las diferentes transcritos quiméricos EWS-ets y distintos parámetros clínicos (73, 376, 377).

EWS-ERG se ha detectado así mismo en PNET (378).

Tanto en el SE como en el PNET la detección de EWS-ERG o EWS-FLI1 en sangre periférica es usada para el control de la enfermedad mínima residual (379).

8. Contexto celular y origen del sarcoma de

Ewing.

Si bien hemos mencionado con anterioridad en varias ocasiones esta importante cuestión pasamos a abordarla ahora en profundidad. Las dos grandes cuestiones que quedan por aclarar en cuanto a la biología del SE son:

1. la identidad de la célula de origen del tumor que es permisiva para la transformación mediada por EWS-FLI1.
2. determinar si EWS-FLI1 es el único evento iniciador en el desarrollo del SE.

Existe una visión más o menos general del origen del SE a partir de un progenitor mesenquimal de momento sin identificar. Esta hipótesis es acorde con las características histológicas del SE, que es un tumor pobremente diferenciado con características mesenquimales aunque también presenta algunas neuroectodérmicas (115, 380).

Se han probado distintos modelos celulares tratando de determinar el origen del tumor. La introducción de EWS-FLI1 en MEFs provoca parada de ciclo celular y muerte celular, los que sobreviven lograr eliminar la expresión de la fusión que les resulta, a la vista de los resultados, tóxica. Los MEFs de ratones nulos para p19 transfectados con la fusión mantienen su expresión pero no forman tumores *in vivo* y lo mismo sucede con la pérdida de p53. Sólo transformando con el antígeno SV40-T se logra inducir la formación de tumores parecidos al SE (15). En fibroblastos humanos primarios inmortalizados con hTERT, EWS-FLI1 induce una parada proliferativa e inducción apoptótica mediada por p53 (116). Estos estudios dejan claro que los fibroblastos no son el punto de partida del SE y es que además cuentan con p53 y p19-ARF funcionales. La mutación de p53 y la pérdida de p16 en el SE no llega al 20% (57).

Durante bastante tiempo se ha postulado el origen del SE a partir de células de la cresta neural. Dicha teoría está basada en la presencia en estos tumores de marcadores como la colecistoquinina (CCK), relacionado con el sistema endocrino difuso (381), y el hecho de que líneas celulares de SE puedan ser inducidas *in vitro* hacia un fenotipo marcadamente neural bajo la acción

de diferentes agentes de diferenciación (107, 382). La generación de un sistema inducible Tet con la fusión EWS-FLI1 en una línea celular de rhabdomyosarcoma propicia un cambio en la morfología celular al inducirse la fusión pasando a asemejarse a la de una línea de SE al igual que sucede en los xenotransplantes en ratones desnudos; dicho cambio va acompañado de la inhibición de varios marcadores miogénicos presentes en la línea de rhabdomyosarcoma. Gracias a estos estudios se han podido identificar genes involucrados en los procesos de diferenciación de la cresta neural como la CCK, el gen MAPT (*Neuron-specific microtubule*) o el marcador epitelial queratina 18 (209). El fenotipo parcialmente neural de los SE se debe a la acción de la fusión y no sólo a la célula de origen, con énfasis por tanto en la acción de la fusión. En una línea de neuroblastoma es capaz de revertir el fenotipo de la misma hacia uno más propio de SE aumentando los niveles de c-Myc y CD99 (121).

La hipótesis del origen mesenquimal del SE se basa también en distintos hallazgos. EWS-FLI1 altera la diferenciación mesodérmica en la línea C2C12 inhibiendo la miogénesis (108). Hay sarcomas bifenotípicos con las fusiones EWS-FLI1 o EWS-ERG que tienen un grado de diferenciación miogénica inferior al de los rhabdomyosarcomas y algunas características neurales (328).

EWS-FLI1 se ha inducido en células madre embrionarias murinas (ES), fibroblastos embrionarios y en células progenitoras primarias mesenquimales (MPCs) pero sin embargo tan solo las MPCs derivadas de médula ósea son capaces de retener la expresión de la fusión durante largo tiempo (meses) mientras en cambio los otros dos tipos celulares la pierden al cabo de dos semanas (112). Estas MPCs transfectadas muestran sobreexpresión de marcadores característicos del SE como los miembros de la vía de señalización de IGF1/IGF1R, IGF1, IGFBP3 e IGFBP5. Al ser inyectadas en ratones forman tumores que expresan marcadores típicos del SE como CD99 o NSE y que muestran una elevada sensibilidad a la inhibición de la vía de IGF1/IGF1R tal y como sucede en los SE. El análisis de los perfiles de expresión génica de dichos tumores desvela la activación de dianas tales como Id2 y c-Myc y la represión de otras como TGFBR2 y de p21, esto es, al igual que sucede en el SE. Estas MPCs no se immortalizaron previamente a la transfección con EWS-FLI1 y retienen p53 funcional así como p16 y p19. Si se introduce EWS-FLI1 en células murinas sin clasificar derivadas de médula ósea se originan tumores con fenotipos varios uno de los cuales se asemeja al SE. La pérdida de p53 aumenta la agresividad del tumor en ese caso (113). En MPCs defectivas en p19 la fusión bloquea la diferenciación hacia los linajes adipo y osteocítico (114). Estas MPCs transfectadas con la fusión sobreexpresan IGF1 y dependen de la señalización de la vía

de IGF1/IGF1R para su supervivencia en concordancia con el requerimiento de IGF1 por parte de las células del SE para crecer (383) y su alta sensibilidad a la inhibición de esta vía de transducción de señales (384). Un reciente estudio con MSCs humanas ha puesto de manifiesto de nuevo la importancia de la vía de transducción de señales de IGF1/IGF1R ya que se produce un incremento de la expresión de IGF1 y una activación de esta vía proliferativa y antiapoptótica al introducir la fusión EWS-FLI1 en dichas células madre mesenquimales (385). Además la funcionalidad de esta vía parece ser un requisito necesario para la transformación mediada por la fusión lo que pone de relieve la gran importancia de esta vía en los pasos iniciales de generación neoplásica (117). Quizás el hecho de que el pico de incidencia de esta enfermedad sea en la adolescencia con un aumento brusco de la producción hormonal explique el papel de IGF1 en el comportamiento molecular de esta neoplasia (118).

Parece pues que este tipo celular, las hMSC, es susceptible a la transformación de EWS-FLI1 y pudiera ser el nicho celular adecuado para el surgimiento del tumor. Además su capacidad para migrar desde la médula ósea a la mayoría de órganos pudiera explicar las localizaciones extraóseas del SE.

a) Células madre.

Las células madre poseen una alta capacidad de autorenovación. Con su potencial de diferenciación reflejan su microambiente de localización y su carencia de marcadores específicos pero bajo las condiciones adecuadas pueden diferenciarse dando lugar a distintos tipos celulares con un fenotipo distinto al del precursor. Las células madre en los tejidos adultos son reservorios de células con capacidad regenerativa prestas a movilizarse y diferenciarse en respuesta a los primeros signos de enfermedad o heridas. Estas células pueden ser aisladas y expandidas en cultivo in vitro manteniendo su potencial de diferenciación (386).

Las células madre se pueden clasificar según su origen en 3 grupos:

- embrionarias
- germinales
- somáticas (adultas o fetales)

y de acuerdo a su capacidad de diferenciación en :

- totipotentes. Pueden dar lugar a cualquier tipo celular peñ células de embriones tempranos (1-3 días).
- pluripotentes. Pueden originar casi cualquier tipo celular peñ algunas células del blastocisto (de 5 a 14 días).
- multipotentes. Pueden diferenciarse tan solo en linajes específicos peñ células de tejidos fetales, médula ósea, cordón umbilical, sangre periférica...

Las células madre embrionarias (ESCs) proceden de la capa interna de células del blastocisto formado unos días después de la fertilización. De esta masa celular derivará el ectodermo primitivo, que se diferenciará con posterioridad en las 3 capas embrionarias: ectodermo propiamente dicho, endodermo y mesodermo.

Las células madre embrionarias poseen un potencial superior al de las adultas como se demostró al inyectar las mismas en blastocistos murinos en los que fueron capaces de dar lugar a todos los tejidos adultos (387).

Las primeras líneas de ESCs fueron generadas en 1981 a partir de blastocistos murinos (388, 389) y la primera línea humana no aparecería hasta 1998 (390). A día de hoy existen unas 225 líneas de ESCs.

Existen 4 métodos para generar las líneas de SCs:

- estandar, a partir de la masa celular interna del blastocisto colocándolas en cultivo junto a una capa auxiliar de fibroblastos.
- transferencia nuclear somática celular (SCNT), transferencia de un núcleo de una célula somática a un óvulo enucleado permitiendo que crezca crecimiento hasta el estado de blastocisto para aislar la masa interna celular.

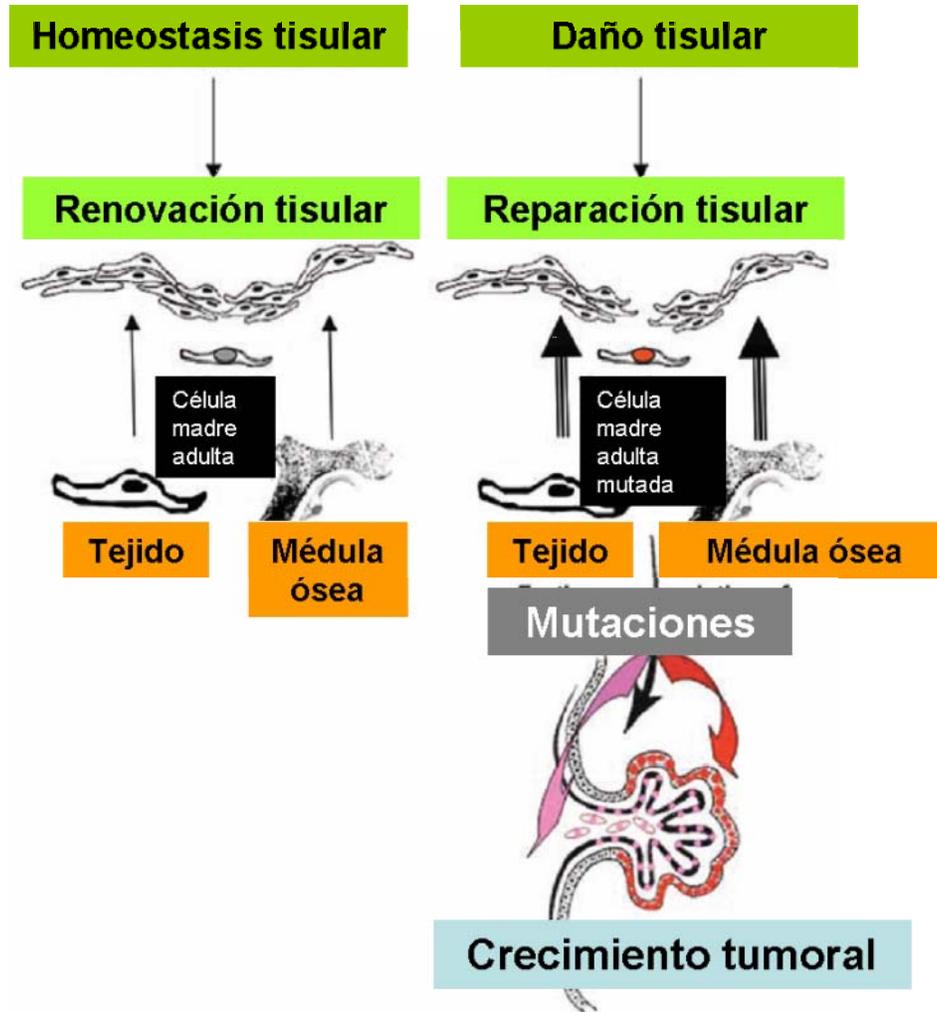
- ANT (transferencia nuclear alterada). Idéntica a la SCNT pero con la salvedad de que la célula somática posee una mutación en el gen *cdx-2* para evitar la implantación.
- blastómero simple. Se aísla un blastómero de un embrión de 8 células y se pone en cultivo mediante un procedimiento como el del diagnóstico pre-implantacional.

Las ESCs cuentan con una serie de marcadores característicos como pueden ser CD9, CD24, Oct-4, Nanog, aparte de un elevado nivel de telomerasa, lo que explica su capacidad para una autorenovación sin límites (391, 392). Recientemente se ha definido así mismo su perfil epigenético (393).

La terapia con células madre se basa en los principios de autorenovación y homeostasis de los tejidos del individuo adulto.

La homeostasis tisular está basada en una tasa de recambio celular normal dependiente de un conjunto de progenitores celulares o de células madre adultas en cada tejido que con las señales adecuadas se diferencian a tejido tisular adulto. La reparación de los tejidos dañados es un fuerte estímulo que desencadena todo el proceso. Estados de inflamación crónica (enfermedad de Crohn), gastritis crónica (causada por *Helicobacter pylori*) o daño físico crónico (gastritis por reflujo) están asociados a la aparición de tumores. Un fallo en los mecanismos de diferenciación puede dar lugar a un grupo de células madre hiperproliferativas las cuales ante una segunda mutación o evento pueden desencadenar un proceso neoplásico.

Figura 20. Adaptada de [Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, Singer S, Maki RG, Cordon-Cardo C. \(2007\). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 117: 3248-57.](#)



La capacidad de autorenovación conecta los procesos de transformación neoplásica y la biología de las células madre (394). Poco a poco se ha identificado la existencia de reservorios de células madre multipotentes en todos los tejidos adultos (394, 395, 396, 397) y en distintos tipos tumorales como por ejemplo mama o cerebro, por mencionar dos de ellos (398, 399, 400). Las células tumorales comparten algunas características con las células madre. Sin embargo no está claro si la transformación oncogénica induce características de las células madre en las células adultas o si bien ésta afecta a células madre adultas (401, 402). Por citar un ejemplo en las leucemias la célula madre hematopoyética y el clon neoplásico comparten mecanismos moleculares proliferativos (403).

Las células madre adultas quizá no posean el potencial de diferenciación de las embrionarias (404) pero plantean menos problemas éticos y su uso se encuentra más extendido. Con el transcurso del tiempo se han descubierto poblaciones de células madre adultas en numerosos tejidos y órganos como por ejemplo hematopoyéticas de médula ósea o de sangre del cordón umbilical (405), células madre mesenquimales a partir de médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo (406, 407, 408), células madre cardíacas, pancreáticas, ováricas, testiculares, epidérmicas o neurales (409).

A pesar de ciertos inconvenientes como la dificultad de aislamiento de las mismas a partir de ciertas fuentes, las condiciones de crecimiento o dilemas éticos en el caso de las células madre embrionarias, cada vez hay un mayor número de aplicaciones de las células madre. Las MSCs han sido usadas para tratar enfermedades óseas, hepáticas o la isquemia (410, 411), se han empleado células madre embrionarias neuronales capaces de dar lugar a neuronas, oligodendrocitos, astrocitos en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (412) o células madre de los islotes pancreáticos para tratar la diabetes de tipo I (413).

b) Células madre mesenquimales.

El descubrimiento de las células madre ha sido importante para determinar el punto de origen de los sarcomas (109, 225). La presencia de células madre no hematopoyéticas en la médula ósea fue sugerida ya en el siglo XIX por el patólogo alemán Cohnheim (414). Fueron inicialmente descritas en 1976 (415) como células aisladas a partir de la médula ósea de rata, capaces de crecer adheridas a la superficie de placas de cultivo, heteróneas en apariencia pero en su mayor parte con forma de huso, inactivas durante 2-4 días para luego pasar a crecer con rapidez y con potencial para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos recibiendo el nombre de células madre mesenquimales (MSCs) o células del estroma medular (416, 417, 418). Las células madre mesenquimales adultas poseen capacidad para diferenciarse en distintos linajes dando lugar a la formación de tejido adiposo, muscular, cartílago y hueso.

Se aíslan de la capa mononuclear de los aspirados de médula ósea tras la separación aplicando una centrifugación por gradiente de densidad usando por ejemplo Ficoll. Representan un porcentaje muy bajo de la fracción mononuclear, un 0,001-0,01% del total (419). Se siembran en una placa de cultivo celular a una densidad de 10^4 - $0,4 \times 10^6$ células por cm^2 y se cultivan con medio

DMEM alto en glucosa y 10% de FBS. Las MSCs se adhieren a la superficie plástica de la placa. Sin embargo las células hematopoyéticas quedan en suspensión; algunas pueden también pegarse al fondo de la placa aunque con los lavados, al cabo de unos días, terminan despegándose y se eliminan. Las MSCs presentan una morfología fibroblástica con forma de huso alargado. Tras una fase inicial de latencia de unos días las MSCs empiezan a crecer y a dividirse rápidamente con un tiempo de duplicación que varía dependiendo del donante y de la densidad inicial de plaqueo (420).

Las MSCs no sólo se han aislado de médula ósea (generalmente de la parte superior de la cresta ilíaca de la pelvis) sino también de otras fuentes como tejido adiposo, líquido amniótico, la sangre del cordón umbilical, periostio y tejidos fetales (406, 407, 408, 421, 422) y de otras localizaciones de la médula ósea en el fémur y la tibia (423) y de la parte lumbar y torácica de la columna vertebral (424). Así mismo han sido aisladas de tejidos patológicos como por ejemplo de una rodilla con artritis reumatoide (425). Se cree que en realidad las MSCs están presentes en cualquier órgano o tejido post-natal. Las MSCs se han obtenido en distintas especies animales como ratón, rata, conejo, cerdos, babuinos...

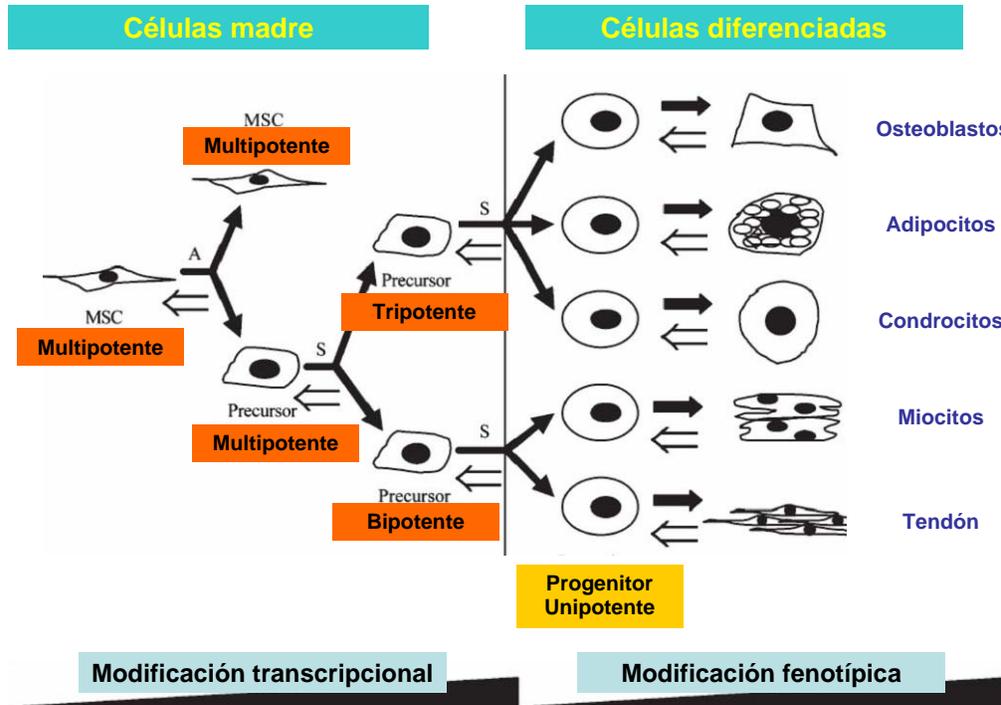
Fenotípicamente las MSCs expresan distintos marcadores, aunque por desgracia ninguno totalmente específico de las mismas. Se considera que no expresan los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 y CD11, tampoco las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, ni las moléculas de adhesión CD18, CD56 y PECAM-1 pero sí que expresan CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, Stro-1 así como las moléculas de adhesión VCAM-1, ALCAM, ICAM-1 o CD29 (419, 426). El aislamiento de las MSCs puede llevarse a cabo mediante una selección positiva o una negativa con el fin de enriquecer la población y evitar contaminación de células hematopoyéticas (427, 428). Los marcadores consenso en este caso de ausencia en las MSCs son el marcador hematopoyético CD45 y el endotelial CD31. Puede haber diferencias en la expresión de los marcadores de las MSCs *in vitro* e *in vivo* debido a distintos factores como por ejemplo el número de pases, el método y la fuente de aislamiento, la especie...(428). Por ejemplo el tejido adiposo es fuente de unas células madre denominadas LPA que al igual que las MSCs pueden diferenciarse a distintos linajes mesenquimales pero que presentan diferencias en la expresión de ciertos marcadores como por ejemplo CD49d y CD106 (407). Las BMPCs, células precursoras mesenquimales de la sangre han sido descritas en la sangre de individuos sanos, tienen en común con las MSC que comparten la expresión de bastantes marcadores, y que pueden diferenciarse en los linajes adipogénicos y osteogénicos pero sin embargo son precursoras de los fibrocitos, células precursoras mesenquimales circulantes en el torrente sanguíneo con capacidad de extravasación

tisular (429). Las MSCs derivadas de hígado fetal tienen distinto perfil antigénico MHC que las adultas (430). Todo esto no hace sino ilustrar la gran heterogeneidad de las MSCs.

Las MSCs son capaces de diferenciarse a:

- osteoblastos, en presencia de ácido ascórbico, β -glicerofosfato y dexametasona durante 2-3 semanas. Las células forman agregados y se incrementa la expresión de la fosfatasa alcalina. Tinción positiva para *alizarin red* y Von Kossa. Destacada contribución en este proceso de las proteínas formadoras de hueso, BMPs (419, 431).
- adipocitos, con dexametasona, insulina, indometacina e isobutil metil xantina. Aparecen vacuolas lipídicas en el interior celular. Expresión de marcadores como lipoproteína-lipasa, PPAR γ 2 o aP2 (419). Tinción con *oil red*.
- condrocitos. Las MSCs se centrifugan para formar un pellet y se les añade TGF- β . Las células se organizan en multicapas con una matriz compleja con presencia de glicosaminoglicanos que se tiñen con azul de toluidina. Producción de colágeno tipo 2 (432).
- mioblastos, con 5-aza y anfotericina B (433).
- células semejantes a neuronas con marcadores neurales adultos aunque al carecer de canales iónicos regulados por carga por tanto no pueden ser catalogadas como verdaderas neuronas funcionales (434, 435).
- miocitos esqueléticos, tenocitos y células endoteliales del mesodermo visceral (419).

Figura 21. Adaptada de [Baksh D, Song L, Tuan RS. \(2004\).](#) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8: 301-16. Review. MSC: célula madre mesenquimal.



El fenotipo inmune de las MSCs descrito como MHC I+, MCH II-, CD40-, CD80-, CD86- es considerado como no inmunogénico, lo que permite su trasplante sin necesidad de inmunosupresión. MHC I puede activar las células T pero la ausencia de coestimuladores bloquea una segunda respuesta de activación. Se han descrito propiedades inmunosupresoras de las MSCs que no guardan relación con el MHC e inmunomoduladoras de la maduración y función de las células dendríticas y de las células B (436, 437). Las MSCs se han administrado *in vivo* con el fin de mejorar el resultado de un trasplante alogénico promoviendo el injerto hematopoyético y la superación de la enfermedad injerto contra huésped (438). Se ha demostrado la utilidad de la administración de MSCs debido a sus propiedades inmunosupresoras en modelos murinos de enfermedades inflamatorias como la encefalomiелitis autoinmune pero no en otras como en el caso de la artritis inducida por colágeno (439, 440).

El hecho de que las MSCs se puedan diferenciar *in vitro* en distintos linajes, su fácil expansión en cultivo y sus características inmunológicas hace que el uso de estas células en la

reparación de tejidos y en terapia génica sea muy tentador. De esta forma han sido empleadas mediante administración directa mostrando que se injertan tanto en tejidos sanos como en tejidos que han sufrido heridas.

- Miocardio infartado. Promueven angiogénesis *de novo* y se diferencian en cardiomiocitos, células endoteliales, pericitos o células de la musculatura lisa (441, 442, 443).
- Médula espinal de ratas parapléjicas, promoviendo la recuperación mediante la secreción de diversos factores de crecimiento o diferenciación (435).
- En tejidos fetales o neonatales dando lugar a numerosos tipos celulares y estando ya desarrollado el sistema inmune aún están presentes en órganos y tejidos como el hígado, timo, bazo, pulmón, tejido adiposo, etc. (444). La capacidad de diferenciación sería mayor en el estado embrionario que en el adulto.
- En el cerebro, dando lugar a neuronas y astrocitos (445).

Las MSC también pueden inyectarse intravenosamente, aunque se corre el riesgo de que queden atrapadas en buen número en los pulmones si el número es alto, como se ha probado en cerebros de ratas que han sufrido isquemia en los que consiguen migrar hasta las localizaciones más afectadas (446). También se han liberado de forma sistémica por ejemplo en pacientes con osteogénesis imperfecta para reconstruir hueso (447, 448) o para promover la liberación de interferón β en tumores en ratones (449).

Se cree que los tejidos dañados secretan diversos ligandos que atraen a esas zonas a las MSCs que poseen capacidad para desplazarse e infiltrarse; los receptores de quemoquinas y sus ligandos tendrían bastante que ver en este proceso poco conocido hasta el momento. Los distintos estudios de quemoquinas en MSCs muestran gran variabilidad en cuanto a los niveles de expresión y la presencia o no de las mismas (450). Las MSCs pueden desplazarse sobre las células endoteliales de las paredes de los vasos sanguíneos en un tipo de movimiento semejante al de los leucocitos aunque con algunas diferencias significativas (451). Distintas integrinas y moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1, ALCAM o CD105 se expresan y son necesarias en ese tipo de desplazamiento de las MSCs (452). Las MSCs pueden movilizarse hasta la sangre periférica en respuesta a situaciones de estrés como heridas, quemaduras o hipoxia crónica (453, 454).

Un problema que presentan las MSCs es que no expresan hTERT *in vitro* y tienen una capacidad proliferativa finita que disminuye de acuerdo con los pases celulares, lo que limita su utilización (455, 456). La expresión de hTERT en las MSCs extiende la vida media de las mismas manteniendo el potencial de diferenciación (457). Las MSCs transfectadas con hTERT muestran pérdida de la inhibición por contacto y en algunos clones muestran además crecimiento independiente de anclaje y formación de tumores en modelos xenografts. El cariotipo es normal pero se produce la delección del locus INK4a/ARF. También con el transcurso de los pases se produce en algunos casos una mutación activadora de K-ras y el silenciamiento del gen asociado al ciclo celular DBCCR1 por hipermetilación del promotor en un proceso de evolución espontánea (458). El cariotipo normal contrasta con lo descrito en otros tumores surgidos espontáneamente de células madre mesenquimales embrionarias humanas de médula ósea (459) o adultas de tejido adiposo (460, 461) y algo parecido se ha descrito en una línea de un tipo de sarcoma (462). Estas observaciones encajan con el hecho de que las fusiones como por ejemplo EWS-FLI1 del SE activan la telomerasa y de que la mutación de INK4A/ARF que aparece en un porcentaje de sarcomas tales como el SE u osteosarcoma estabiliza la expresión de las fusiones y representa un factor pronóstico adverso (15, 19, 58, 352, 463).

A partir de células madre mesenquimales se han podido generar distintos sarcomas como por ejemplo un histiocitoma maligno fibroso (MFH), que es un sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grado (464, 465). En este proceso juega un papel clave el gen DKK1, inhibidor de la vía de Wnt y necesario para que las hMSCs proliferen. Impide la diferenciación de estos progenitores mesenquimales vía la señalización canónica de Wnt2/ β -catenina. El método usado en este estudio citado es menos artificial que la transformación de hMSCs sobreexpresando oncogenes o inactivando supresores tumorales por ejemplo la Cre recombinasa en ratones con mutaciones condicionales en p53 y K-ras (466) o en ratones en los que se inducen la expresión de EWS-FLI1 mediante Cre y el uso de un promotor ubicuo como Rosa26 para acabar generando al cruzarlos con una estirpe *Mxl-cre* no un sarcoma sino una leucemia mieloide/eritroide (467). Otro destacado ejemplo es la generación de un liposarcoma mixoide a partir de células primarias progenitoras mesenquimales transfectadas con FUS-CHOP pero no con EWS-ATF1 (306) y de un modelo de SE (112). Dos trabajos recientes han logrado obtener un fenotipo de SE a partir de células madre mesenquimales humanas. El estudio del grupo de Kiyokawa usa en realidad una variante de las MSC como es la línea celular UET-13. Estas células se obtienen prolongando la vida media de células estromales de médula ósea mediante la transfección de vectores retrovirales con los genes hTERT y E7. La expresión inducible controlada por tetraciclina de las fusiones EWS/FLI1 y

EWS/ERG en las células UET-13 permite llegar a un tumor de características morfológicas, inmunofenotípicas y de expresión génica muy semejantes a las de un SE (370). El segundo estudio llevado a cabo por el grupo de Ivan Stamenkovic ha generado un modelo de SE a partir ya sí de células madre mesenquimales humanas extraídas de la médula ósea de la cabeza del fémur (385).

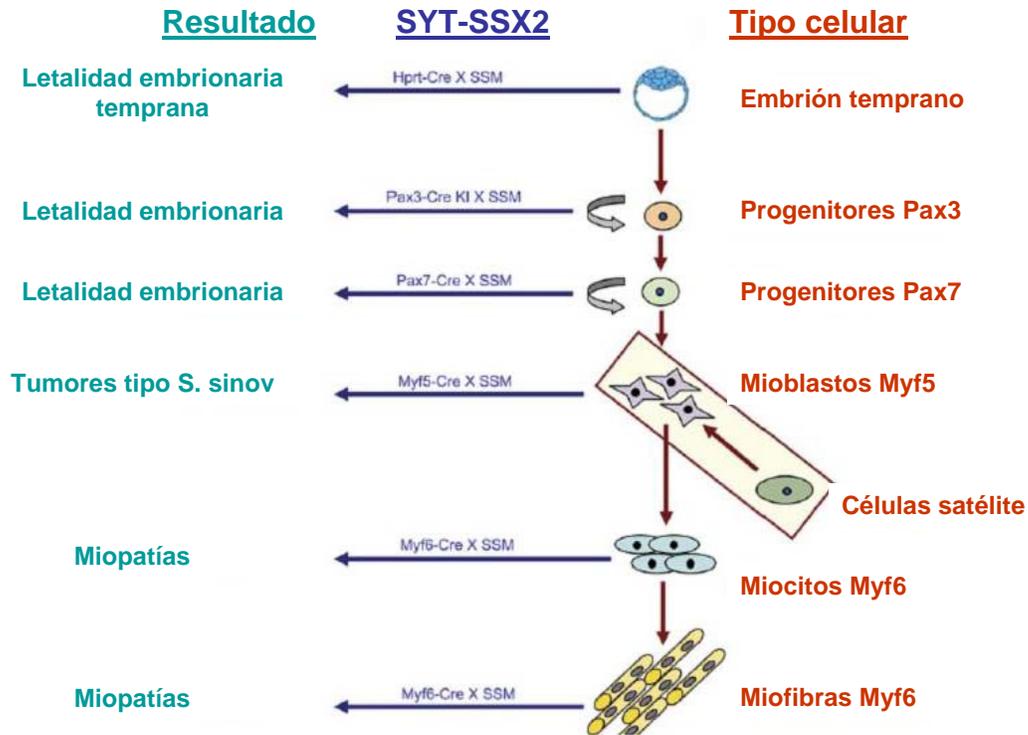
El perfil de expresión génica de las hMSCs ha sido examinado en varios estudios por ejemplo comparando los perfiles de 27 SE y 3 líneas tumorales con la fusión silenciada respecto a los de varios tejidos normales, hMSCs y células del estroma de la médula ósea. El silenciamiento de EWS-FLI1 hace que el perfil se aproxime al de las hMSCs y que estas líneas silenciadas puedan diferenciarse hacia un fenotipo osteo y adipogénico en presencia de los agentes de diferenciación adecuados. Este estudio identifica además genes modulados por la fusión y diferencialmente expresados entre las líneas de SE y las hMSCs (468). La comparativa de los perfiles de expresión de las MPCs transformadas con dos fusiones distintas, EWS-FLI1 y FUS-CHOP, permite diferenciar un conjunto de genes comunes los cuales estarían implicados en la transformación de las células primarias mesenquimales y un segundo grupo ya distinto y específico de cada fusión (469).

Las MSCs pueden dar lugar a células del estroma que sirven de apoyo en el proceso de hematopoyesis así como a células endoteliales y de la musculatura lisa vascular. Algún estudio de expresión génica con microarrays de ADN ha puesto de manifiesto una posible relación entre las células del SE y las células endoteliales (470). Los procesos de angiogénesis y vasculogénesis, en los que participan las células endoteliales, son importantes en el SE (471). Este sarcoma es capaz de secretar el factor angiogénico VEGF lo que atrae a células madre CD34+ de la médula ósea e inicia un proceso de vasculogénesis (472). Hay que tener en cuenta que algunas líneas de SE son capaces de formar *in vitro* estructuras vasculares semejantes a vasos en un fenómeno conocido como mimetismo vascular posiblemente inducido en condiciones de hipoxia con un suministro de oxígeno a las células tumorales reducido. En esas condiciones de falta de oxígeno se formaría un sistema circulatorio alternativo independiente (473). El microambiente que rodea a las células tumorales es muy importante en estas situaciones, por ejemplo la respuesta apoptótica de la microvasculatura a situaciones de hipoxia es distinta y se refleja en diferencias en la angioarquitectura vascular entre distintos clones de hMSCs inmortalizadas con telomerasa (474).

El microambiente es fundamental a la hora de inducir el fenotipo tumoral, como se pone de manifiesto en la siguiente figura por medio de la cual se puede apreciar que sólo el microambiente

correspondiente al contexto celular adecuado y al momento preciso la fusión SYT-SSX2 es capaz de generar el sarcoma sinovial.

Figura 22. Adaptada de [Haldar M, Hancock JD, Coffin CM, Lessnick SL, Capecchi MR. \(2007\). A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer Cell* 11: 375-88.](#)



OBJETIVOS

1. Inhibir de forma estable la expresión de la fusión EWS-FLI1 en líneas celulares de SE mediante el uso de la técnica de ARN de interferencia.
2. Analizar las consecuencias moleculares y celulares de dicha inhibición.
3. Identificar nuevas dianas de EWS-FLI1 y caracterizar su función.
4. Profundizar en el conocimiento del origen del SE. Inducir la expresión de EWS-FLI1 en células madre mesenquimales humanas adultas con el objetivo de reproducir el fenotipo del SE.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares.

Líneas celulares de sarcoma de Ewing.

Las líneas celulares de sarcoma de Ewing usadas en el estudio de ARN de interferencia fueron las siguientes: TC71, A4573, A673, SK-ES-1, TTC-466, CADO-ES-1, STA-ET-10, RM82 y SKNMC.

Las líneas TC71 y A4573 fueron un regalo de la Dra. Iranzu González de la Universidad de Navarra, Pamplona.

La línea celular A673 se obtuvo de la ECACC (Colección europea de cultivos tipo).

La línea SK-ES-1 fue obtenida a través de la ATCC (Colección americana de cultivos celulares).

La línea TTC-466 fue un regalo del Dr. Jaume Mora del Hospital St. Joan de Deu, Espulgues de Llobregat, Barcelona.

Las líneas CADO-ES-1, STA-ET-10, RM82 y SKNMC fueron obtenidas gracias al Dr. Christopher Poremba, Institut für Pathologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf, Alemania.

A continuación se detallan las características más importantes de cada línea celular.

TC71.

Línea celular que presenta una fusión EWS-FLI1 de tipo 1. Muestra una morfología de tipo epitelioide y su crecimiento es en monocapa. Es una de las líneas celulares de sarcoma de Ewing más ampliamente usada en numerosos estudios, por ejemplo de tumorigenicidad y de establecimiento de patrones metastáticos *in vivo* (475).

SK-ES-1.

Conocida como HTB-86™ en la ATCC (Colección americana de cultivos tipo) se trata de una línea establecida en 1971 a partir una biopsia ósea de un SE de un hombre de 18 años de raza caucásica.

Cuenta con una fusión EWS-FLI1 de tipo 2. Presenta morfología epitelioides y crece en monocapa aunque con relativamente baja adherencia al sustrato. Es capaz de formar pequeños tumores al ser inyectada en ratones inmunodeprimidos. Es una línea hiperdiploide en la que un 34% de las células presentan un número cromosómico de 49 mientras que otro 24% cuenta con 50 cromosomas (476).

A673.

Catalogada bajo el nombre de ECACC 85111504, A673 es una línea celular originada a partir de un tumor primario de una mujer de 15 años. Inicialmente fue catalogada como una línea de rhabdomyosarcoma y en la literatura ha sido descrita como tal pero así mismo como una línea de sarcoma de Ewing. Posteriormente se ha determinado su condición de línea de SE gracias a estudios moleculares que han puesto de manifiesto la fusión de tipo 1 de EWS-FLI1 que posee (477), además de no presentar ninguno de los reordenamientos cromosómicos característicos de los rhabdomyosarcomas (478). Esta línea es capaz de formar colonias en agar blando y dar lugar a tumores en ratones atímicos. Presenta una morfología epitelial, crece en monocapa y su cariotipo es diploide.

A4573.

Línea celular con una fusión de tipo 3, 10-6. Morfología epitelial, crece en monocapa. Capaz de crecer *in vivo* y generar tumores (479).

TTC-466.

La línea celular TTC466 posee la fusión EWS-ERG y crece en monocapa (480).

CADO-ES-1.

Línea establecida a partir de la metástasis pulmonar de un paciente de 19 años. Cuenta con una fusión EWS-ERG (481). Crece en monocapa pero necesita un recubrimiento de gelatina para adherirse.

STA-ET-10.

Posee una fusión EWS-FEV (482). Crece en monocapa pero necesita un recubrimiento de gelatina para adherirse.

RM-82

Cuenta con una fusión EWS-FLI1 de tipo 1 (7-6) (483). Crece en monocapa pero necesita un recubrimiento de gelatina para adherirse.

SK-N-MC.

Línea celular con una fusión EWS-FLI1 tipo 1, 7-6. Definida al ser descrita como un neuroepitelioma esta línea se caracteriza por presentar una morfología epitelial y un cariotipo diploide.

Otras líneas celulares.

La línea BD *AmphoPack-293* se obtuvo de BD Clontech (Mountain View, CA, EEUU).

La línea de mieloma múltiple MM1S fue proporcionada por el Dr. Jesús San Miguel (Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca/CIC, Salamanca).

Las líneas de neuroblastoma LAN-1 y SK-N-JD fueron obtenidas a través del Dr. Miguel Alaminos (Departamento de Histología, Universidad de Granada, Granada).

BD *AmphoPack-293*.

Línea celular empaquetadora anfotrópica usada para producir partículas virales recombinantes MMCV capaces de infectar un amplio espectro de líneas celulares de mamíferos (humano, rata, ratón, hamster, mink, perro, gato, mono). Deriva de la línea celular HEK-293, que se transfecta con facilidad. Produce retrovirus recombinantes en títulos en torno a 10^6 cfu/ml 24-72h después de ser transfectada con el plásmido de interés en el cual queda empaquetada en la partícula viral. La proteína de la envuelta viral que expresa reconoce el receptor anfotrópico (Ram-1) lo que posibilita que infecte a ese gran abanico de líneas celulares. Crecimiento en monocapa.

MM1S.

Línea celular de mieloma múltiple. Usada frecuentemente en estudios con fármacos (484).

MM1S ha sido usada en nuestro estudio como control positivo de la expresión de Fli1. Crecimiento en suspensión, con algunas células adherentes.

LAN-1.

Catalogada en la ECACC 06041201 esta línea de neuroblastoma fue establecida en 1977 a partir de la médula ósea de un niño de 2 años de edad con un neuroblastoma de estadio IV (485). Presenta una morfología neuroblástica con forma de lágrima y con numerosas prolongaciones neurales (neuritas). Las células son tumorigénicas en ratones desnudos. Línea de tipo N que cuenta con MYCN amplificado. Crecimiento en monocapa. Utilizada en nuestro estudio como control en los experimentos de Western Blot.

SK-N-JD.

Línea celular de neuroblastoma establecida a partir de un paciente con recidiva (486). Línea de tipo I que cuenta con MYCN amplificado. Crecimiento en monocapa. Utilizada en nuestro estudio como control en los experimentos de Western Blot.

2. Cultivos celulares.

Condiciones de cultivo normales.

Las líneas celulares fueron mantenidas en incubadores (Heraeus, Thermo, Waltham, MA, EEUU) en una atmósfera controlada a una temperatura de 37°C y con un porcentaje de CO₂ del 5%.

La línea celular TC71 se cultivó con medio Iscove's modified (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) complementado con 20% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen/Life Technologies).

La línea celular SK-ES-1 se creció con medio McCoy's (Invitrogen/Life Technologies) suplementado con 15% de FBS (Invitrogen/Life Technologies).

La línea A4573 se cultivó con medio RPMI (Invitrogen/Life Technologies) complementado con 15% de FBS (Invitrogen/Life Technologies)

La línea celular A673 así como la línea celular empaquetadora BD *AmphoPack* 293 se hicieron crecer con medio DMEM (Invitrogen/Life Technologies) suplementado con 10% de FBS (Invitrogen/Life Technologies)

Las líneas MM1S, LAN-1, SK-N-JD, CADO-ES, RM-82, TTC466 y SK-N-MC se crecieron en medio RPMI suplementado con 10% FBS (Invitrogen/Life Technologies).

La línea STA-ET-10 se creció en medio RPMI con 20% FBS (Invitrogen/Life Technologies).

Las líneas CADO-ES, STA-ET-10 y RM-82 se crecieron en placas con una base de gelatina al 0.1% en agua milliQ (Sigma, St Louis, MO, EEUU).

El suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen/Life Technologies) se inactivó previamente por calor, 30 minutos a 56°C.

Todos los medios de cultivos se complementaron al 1% con la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (Invitrogen/Life Technologies) y al 1% de L-glutamina en aquellos casos necesarios (Invitrogen/Life Technologies).

Previamente al uso de los medios de cultivos se calentaron durante al menos 10-15 minutos en un baño de cultivos (Julabo, Seelbach, Alemania) a 37°C.

La línea BD *AmphoPack* 293 contó con 100µl de piruvato sódico 100mM (Sigma) disuelto en agua MilliQ por cada placa con 10ml de medio de cultivo para una concentración final de 1mM.

Las líneas celulares se crecieron en placas de 10cm de diámetro (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EEUU).

Cada cierto tiempo se realizaron controles de contaminación por micoplasmas para descartar la presencia de estos microorganismos que pueden afectar al crecimiento normal celular ralentizándolo. Para la detección se usó el kit comercial VenorGeM Kit (Minerva Biolabs, Berlín, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del mismo. Las células en las que se detectó contaminación o se eliminaron o bien se trataron con Baycip (Bayer, Leverkusen, Alemania) durante 3 semanas.

Subcultivo celular.

Las células una vez alcanzado un cierto grado de confluencia se les dió pase celular mediante la adición a la placa de cultivo de tripsina/ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1X (Sigma) a razón de 5ml por placa de 10cm de diámetro y durante unos minutos (de 1 a 5 minutos en función del menor o mayor grado de adherencia de la línea celular) a 37°C para despegar las células de la placa.

En algunos experimentos y con ciertas líneas celulares de baja adherencia las células se levantaron del sustrato mediante lavados con PBS 1X previamente calentado a 37°C.

Las células despegadas de la placa de cultivo se recogieron en un tubo falcon de 15ml (BD Falcon), se centrifugaron durante 5 minutos a 1500rpm y temperatura ambiente (TA) en una centrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y posteriormente una vez eliminado el sobrenadante el pellet celular se resuspendió en nuevo medio de cultivo fresco y de acuerdo a una dilución (*splitting ratio*) establecida en función del tipo celular se sembraron en nuevas placas de cultivo contabilizando todo este proceso como un pase celular más.

Congelación/descongelación.

Las células se congelaron una vez alcanzado un grado de confluencia de un 80-90% de confluencia. Tras lavarlas con PBS 1X y tripsinizarlas, las células se recogieron con medio celular en un tubo falcon de 15ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500rpm en una centrífuga (Eppendorf). El pellet celular una vez retirado el sobrenadante, se resuspendió en 900 o 950µl de medio celular con FBS (Invitrogen/Life Technologies) junto a 50 o 100µl del agente congelador dimetil sulfóxido, (DMSO, Sigma) en función del tipo celular en cuestión. La suspensión celular se almacenó en criotubos (Nalgene-Nunc, Rochester, NY, EEUU) y se congeló de forma progresiva, pasando los criotubos de forma secuencial de hielo a -80°C resguardados en un *Mister Frosty* (Nalgene, Rochester, NY, EEUU) que favorece una congelación paulatina de las células y tras haber estado al menos 24h a -80°C se depositaron en un contenedor de N₂ líquido.

50µl de DMSO (Sigma) para congelar las líneas SK-ES-1, TC71, BD *AmphoPack* 293 y 100µl para las restantes.

La descongelación de los viales congelados se llevó a cabo calentando los mismos en un baño de cultivos (Julabo) a 37°C. Una vez licuado el contenido del criovial se añadieron las células a un tubo falcon con 24ml del correspondiente medio de cultivo celular completo. Tras centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm en una centrífuga, el pellet celular fue resuspendido en medio de cultivo y las células se sembraron en placas de cultivo.

Fármacos e inhibidores.

NVP-AEW541 fue obtenido por medio de la compañía farmacéutica Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza. Los inhibidores PD-98059 and LY-294002 fueron adquiridos a Stressgen, Victoria, BC, Canada. La geneticina o G418 para la selección clonal fue adquirida a Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU. La doxiciclina fue adquirida a BD Clontech. PD-98059 y LY-294002, se diluyeron en DMSO (Sigma) para crear una solución stock 1mM siendo de 10µM para NVP-AEW541.

Detección y eliminación de micoplasmas.

Detección de la presencia de contaminación por micoplasmas en las células en cultivo por PCR. Kit VenorGeM *Mycoplasma Detection Kit* (Minerva Biolabs).

Una vez que las placas llegaron en torno a un 80% de confluencia se tomó una muestra de 100µl de medio de cultivo de las mismas. De esos 100µl se calentaron 10µl durante 10 minutos a 90°C en un bloque térmico (VWR, Cerdanyola del Vallès ,Barcelona). El resto del volumen de medio recogido se guardó a -20°C.

H ₂ O-DEPC	13,8µl
Tampón 10X	2µl
dNTP's /primer mix	2µl
control interno	1µl
enzima Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, EEUU)	0,2µl

A los 19µl de cada reacción se les añadió 1µl del sobrenadante calentado. Así mismo se estableció un control positivo de la reacción con 1µl de control positivo y un control negativo con 1µl de H₂O.

Programa de la PCR:

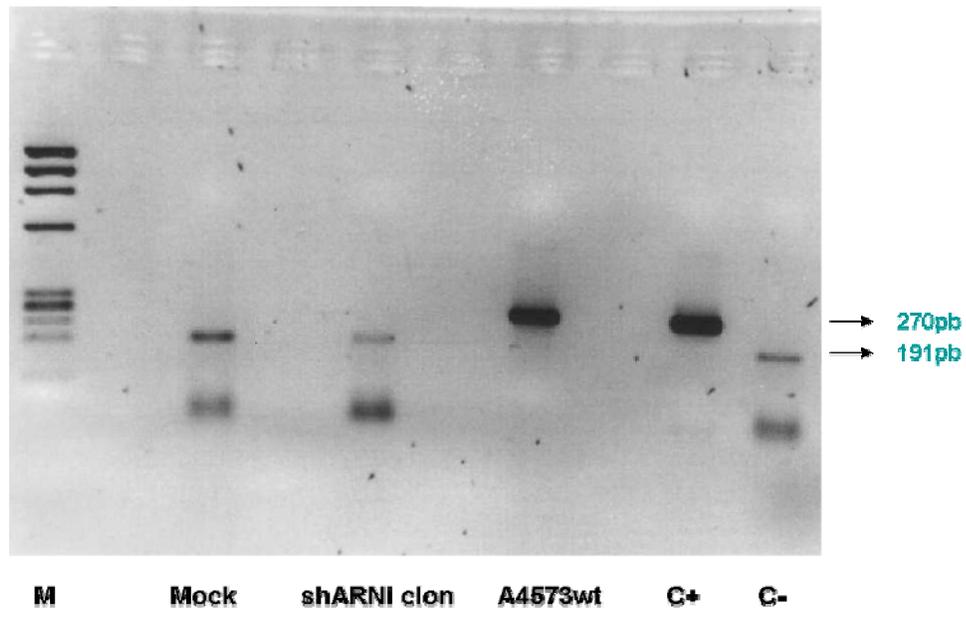
94°C	2'	
55°C	2'	
72°C	2'	
94°C	30''	35 ciclos
55°C	1'	
72°C	1'	
72°C	4'	
4°C	infinito	

Tras la PCR sus productos se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid) al 1.5% durante 1h a 90V. Para el control

negativo (ausencia de contaminación) se detecta una banda en el gel de 191pb mientras que la del control positivo (presencia de contaminación) es de 270pb.

El tratamiento para la contaminación con micoplasmas fue la aplicación de un antibiótico del tipo quinolona, Baycip (Bayer) durante 3 semanas en la línea afectada. Al cabo de esas 3 semanas de tratamiento se repitió la toma de muestra del sobrenadante y la PCR para corroborar si la contaminación por micoplasmas había desaparecido.

Figura 1. Detección de micoplasmas. PCR con el kit VenorGeM. Tanto el clon shARNi como el mock están libre de contaminación no así una línea celular de SE testada en ese momento, A4573. C+: control positivo (banda de 270pb); C-: control negativo (banda de 191pb).



3. ARN de interferencia.

Construcciones plasmídicas shRNAi.

Las construcciones plasmídicas de ARN de interferencia del tipo *short hairpin* se realizaron partiendo del plásmido pSUPER neo GFP de la casa comercial Oligoengine, Seattle, WA, EEUU. El sistema pSUPER ARNi proporciona un vector plasmídico de expresión en células de mamíferos que permite la síntesis intracelular de transcritos del tipo *siRNA-like* que llevan a cabo una represión de forma estable de la expresión del gen en cuestión que se pretende inhibir, permitiendo un análisis a largo plazo de la pérdida de función del gen referido. Este vector contiene el promotor de la H1-ARN-polimerasa-III que genera un transcrito siARN carente de una cola de poliadenosinas, con un inicio de transcripción bien definido y una señal de parada de cinco timidinas seguidas. (T5), este transcrito se procesa en la segunda uridina tras el sitio de stop dando lugar a otro transcrito que se asemeja a los extremos de los siRNAs sintéticos que también contiene dos *overhanging* timidinas o uridinas en el extremo 3'.

El vector pSUPER (Oligoengine) fue usado conjuntamente con un par de oligonucleótidos que contienen, entre otra serie de características, una secuencia única de 19 nucleótidos generada a partir del transcrito de ARNm del gen de interés, en nuestro caso EWS-FLI1 (*the N-19 target sequence*). *The N-19 target sequence* se corresponde con la cadena sentido del *pSUPER-generated siRNA*, la cual a su vez se corresponde con la secuencia de 19 nucleótidos elegida del ARNm. De acuerdo al funcionamiento del ARN de interferencia la cadena antisentido del dúplex siARN hibrida con la región gemela del ARNm del gen promoviendo su degradación.

Figura 2. Mapa del vector pSUPER neo+GFP. (www.oligoengine.com)

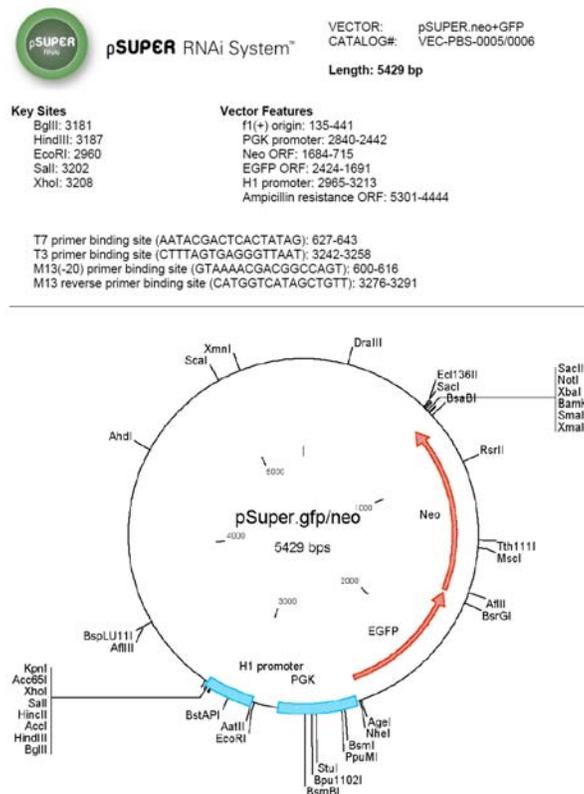
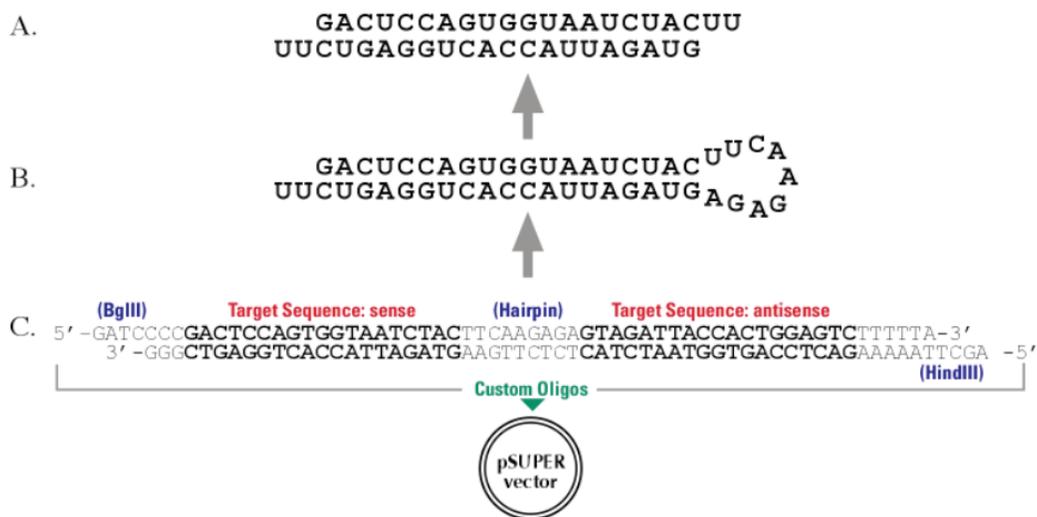


Figura 3. Esquema de las construcciones plasmídicas shARNi. *Target sequence*: secuencia diana. *Hairpin*: bucle.



El diseño de las construcciones plasmídicas fue realizado contra el punto de fusión de los dos genes EWS y FLI1 en los tres tipos de fusión EWS-FLI1 de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial y con el objetivo último de conseguir un mayor grado de especificidad en la inhibición de la fusión génica y evitar afectar a los genes *wild type* EWS y Fli1. La secuencia de EWS-FLI1 elegida como objetivo fue:

<u>Nombre del diseño</u>	<u>Secuencia</u>
7-6 shARNi	5'-CAGAGCAGCAGCTACGGGCAGCAGAACC-3'
7-6 M shARNi	5'-GGGCAGCAGAACCCTTCTT-3'

<u>Nombre del diseño</u>	<u>Secuencia</u>
7-5 shARNi	5'- CAGAGCAGCAGCTACGGGCAGCAGACAA-3'
7-5 M shARNi	5'- GGGCAGCAGACAAGAAGAA-3'

<u>Nombre del diseño</u>	<u>Secuencia</u>
10-6 shARNi	5'- GGACCAGATCACCTTCTT-3'

La secuencia de los oligos incluye la región única de 19 nucleótidos, *N-19 target sequence*, en orientación sentido y antisentido separados por una secuencia espaciadora de 9 nucleótidos denominada hairpin, 5'-TTCAAGAGA-3'. El extremo 5' corresponde al sitio de corte de la enzima BglIII, GATCCC y el 3' consta de la secuencia T5 y del sitio de HindIII, TCGA. El 5' *overhang* del oligo se corresponde con el 3' BglIII *overhang* del plásmido y la ligación del plásmido y el oligo permite la desaparición de ese sitio de corte BglIII, circunstancia que pudo ser usada para comprobar si la ligación se ha llevado a cabo realmente. El transcrito resultante a partir del vector recombinante va a doblarse sobre sí mismo dando lugar a una molécula en forma de bucle de 19 nucleótidos, esta estructura precursora va a ser rápidamente procesada para generar un siARN funcional.

De cara al diseño de los oligos de ARNi se tuvieron en cuenta una serie de premisas:

- longitud entre 19 y 30 nucleótidos
- contenido en G y C igual o superior al 50%
- comienzo en 5' tras un dímero AA
- ausencia de series de 4 o más adeninas o timinas seguidas

El diseño 7-6 shARNi comienza tras un dímero AA pero alcanza una longitud de 28 nucleótidos. El diseño 7-6 M shARNi prescinde de comenzar tras un dímero AA pero a cambio posee una longitud inferior, 19 nucleótidos, teóricamente más idónea. Exactamente lo mismo sucedió con los diseños 7-5 shARNi y 7-5 M shARNi respectivamente. En cambio para el diseño 10-6 shARNi se pudo cumplir la premisa de empezar tras un dímero AA y ajustarse a una longitud de 19 nucleótidos.

Una vez elegida la secuencia de EWS-FLI1 sobre la que íbamos a diseñar los cebadores para la expresión del shARNi se pidieron los mismos a la empresa Metabion, Martinsried, Alemania. Una vez recibidos en forma liofilizada los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua estéril, libre de nucleasas a una concentración de 3µg/µl.

La reacción de anillamiento de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen final de 50µl con:

1 µl de oligo sentido

1 µl de oligo antisentido

48µl de tampón de anillamiento 100 mM NaCl and 50 mM HEPES pH 7.4.

5 reacciones de ligación en total, para el par de oligos 7-6, 7-6 M, 7-5, 7-5 M y 10-6.

La reacción se incubó a 90°C durante 4 minutos en un bloque térmico (VWR), 10 minutos a 70°C en un baño (Julabo) y para enfriar poco a poco los oligos anillados se dejaron 20 minutos a TA.

Una vez anillados los oligos tuvo lugar la reacción de ligación. Antes de ello se digirió el vector pSUPER neoGFP (Oligoengine) que estaba en forma circular. En primer lugar con la enzima de restricción HindIII (Promega) durante 2 horas a 37°C y más tarde con la enzima BglII (Promega) tres horas más a la misma temperatura hasta que la reacción se desactivó por calor, 65°C durante 20 minutos para inactivar HindIII (Promega) y 20 minutos a 80°C para la enzima BglII (Promega), consiguiendo de esta manera anular las enzimas para que no pudieran interferir en reacciones posteriores.

Reacción de restricción, volumen de 20µl:

2µl de tampón 10X de la enzima de restricción HindIII (Promega)

1-2µg de ADN plasmídico pSUPER neo gfp (Oligoengine)

tampón TE 1X hasta completar los 20µl

1µl de Hind III (Promega)

Tras cortar con HindIII (Promega) se llevó el volumen de la reacción de restricción hasta 60µl para diluir el tampón de HindIII (Promega) y que el tampón de BglII (Promega) permitiera funcionar correctamente a su enzima de restricción.

20µl de la digestión con HindIII (Promega)

6µl de tampón 10X de BglII (Promega)

34µl de tampón TE 1X

1µl de enzima BglII (Promega)

De esta forma el vector quedó linearizado y listo para la reacción de clonación.

De idéntica manera se digirieron las cinco parejas de oligos anillados. En primer lugar con la enzima de restricción HindIII (Promega) durante 2 horas a 37°C y más tarde con la enzima BglII (Promega) tres horas más a la misma temperatura hasta que la reacción se desactivó por calor en el bloque térmico (VWR, Cerdanyola del Vallès ,Barcelona), 65°C durante 20 minutos para inactivar HindIII (Promega) y 20 minutos a 80°C para la enzima BglII (Promega)

Reacción de restricción, volumen de 20µl:

13µl de tampón TE 1X

5µl de la reacción de anillamiento de los oligos

2µl del tampón 10X de la enzima de restricción HindIII (Promega)

1µl de Hind III (Promega)

Tras cortar con HindIII (Promega) se llevó el volumen de la reacción de restricción hasta 60µl para diluir el tampón de HindIII (Promega) y que el tampón de BglII (Promega) permitiera funcionar correctamente a su enzima de restricción.

20µl de la digestión con HindIII (Promega)

6µl de tampón 10X de BglII (Promega)

34µl de tampón TE 1X

1µl de enzima BglII (Promega)

Tras la restricción los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 1% para comprobar si efectivamente la digestión había tenido lugar y separar los fragmentos por tamaño; nos quedamos con la banda correspondiente al vector digerido, que fue recortada evitando tomar aquella que pudiera corresponder al plásmido circular sin digerir. Purificamos la banda recortada usando el kit *Jetquick DNA Gel Extraction* (Genycell, Santa Fe, Granada), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo en 50µl de tampón TE 1X. Eliminamos de esta forma el fragmento de vector entre los sitios de corte de HindIII y BglII (Promega) así como nos deshacemos de los fragmentos de plásmido sin cortar lo que nos permitió reducir el *background* en la posterior ligación y transformación. Antes de pasar a clonar la concentración del plásmido digerido se normalizó a 0.2-0.5 µg/µl. Dado que el plásmido pSUPER neo gfp (Oligoengine) se digirió bien y los extremos del mismo eran incompatibles no hizo falta tratarlo con la enzima CIP (Promega), 1µl a 37°C durante media hora. Si hubiésemos tratado el vector con CIP (Promega) así mismo deberíamos haber fosforilado los oligonucleótidos.

Una vez digeridos los duplex de oligonucleótidos anillados con las enzimas de restricción BglII y HindIII (Promega) se pasaron posteriormente a clonar en esas posiciones únicas de corte único del vector con el oligo sentido clonado por debajo de la caja TATA del promotor de H1 para así permitir que se generara el siARN duplex.

Reacción de clonación para cada par de oligonucleótidos, volumen de 10µl:

2 µl de oligos anillados y digeridos por HindIII/BglII (Promega)

1 µl de vector pSUPER neo GFP (Oligoengine) digerido por HindIII/BglII y purificado

1 µl del tampón 10X de la enzima T4 ADN ligasa (Promega)

5 µl agua MilliQ

1 µl de la enzima T4 ADN ligasa (Promega)

La mezcla se incubó durante toda la noche a TA. Se incluyó un control negativo con el vector linearizado solamente, sin inserto que se sustituye por agua MilliQ. Después de clonar y antes de pasar a transformar las bacterias se trataron los plásmidos con la enzima BglIII (Promega), 1µl, durante 30 minutos a 37°C para reducir los niveles de *background* en la posterior transformación. La enzima BglIII (Promega) cortó aquellos vectores en los cuales la ligación no tuvo lugar y por tanto mantenían el sitio para esta enzima ya que en aquellos en los cuales la ligación se llevó a cabo de forma correcta el sitio de corte de BglIII (Promega) se perdió. La transformación tuvo lugar en bacterias competentes DH5α. 80µl de bacterias DH5α y 3,5µl del volumen de la ligación en ese orden y bien resuspendidas. 30 minutos en hielo, 45 segundos a 42°C en el baño (Julabo) para el choque térmico y 2 minutos en hielo. Antes de plaquear se añadió 1ml de medio LB líquido a cada tubo y se dejaron en agitación 90 minutos a 37°C a 250rpm. Al cabo de ese intervalo se centrifugó el contenido de los tubos 3 minutos a 13,200rpm en una centrífuga de mesa (Eppendorf), se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40µl de LB líquido. La finalidad de este paso fue dar tiempo a las bacterias transformadas para que pudieran expresar el gen de resistencia a ampicilina del vector antes de plaquear las mismas en la placa de agar con ampicilina. Las bacterias se plaquearon con un asa de siembra estéril (VWR) y se crecieron en placas petri de cultivo de LB-agar 2% con ampicilina 100µg/ml (Invitrogen) durante 16-24 horas en una estufa (Mettler, Schawabach, Alemania) a 37°C. Las colonias bacterianas transformadas se recogieron de la placa de agar con palillos estériles y se crecieron en medio de cultivo líquido LB a 37°C con ampicilina (Invitrogen); 4ml de medio LB líquido por cada tubo junto a 4µl de ampicilina 100µg/ml (Invitrogen). Las placas se guardaron a 4°C por si hiciera falta usarlas de nuevo. Tras dejar crecer las bacterias DH5α *overnight* en el agitador orbital (Mettler) a 250rpm a 37°C con los tubos inclinados para favorecer la oxigenación cada pellet bacteriano se procesa para extraer el ADN plasmídico (BD Macherey Nagel, Franklin Lakes, NJ, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Para comprobar la presencia de clones positivos (aquellos que contienen el vector con el oligo insertado) mediante una digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII (Promega).

Reacción de digestión del vector pSUPER neo gfp anillado, volumen 20µl:

13µl de tampón TE 1X

2µl de tampón 10X de la enzima HindIII (Promega)

5µl de ADN de la *miniprep*

1µl de la enzima HindIII (Promega)

1µl de la enzima EcoRI (Promega)

Digestión a 37°C durante 1 hora 45 minutos. Como control se digirió el vector pSUPER neo gfp (Oligoengine) sin inserto.

Reacción de digestión, volumen 20µl:

15µl de tampón TE 1X

2µl de tampón 10X de la enzima HindIII (Promega)

3µl de ADN de la *miniprep*

1µl de la enzima HindIII (Promega)

1µl de la enzima EcoRI (Promega)

Digestión a 37°C durante 1 hora 45 minutos.

Los clones positivos son aquellos que al correr los fragmentos digeridos en un gel de agarosa al 2% dan una banda de un tamaño de 287 pares de bases mientras que los clones negativos, aquellos solamente con vector, dan una banda de 227 pares de bases. Además la presencia del inserto correcto en el vector recombinante fue confirmada mediante secuenciación.

Reacción de secuenciación.

La secuenciación tuvo lugar en un secuenciador del tipo *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Volumen final de 8µl para una cantidad de ADN plasmídico de doble cadena de 400 a 600ng en un volumen máximo de 5µl y 3pmol de primer de secuenciación en un volumen máximo de 3µl; el resto del volumen hasta esos 8µl se completaron con agua milliQ. Cebador universal antisentido y lectura en dirección 3'→5' con el programa de software *Chromas*.

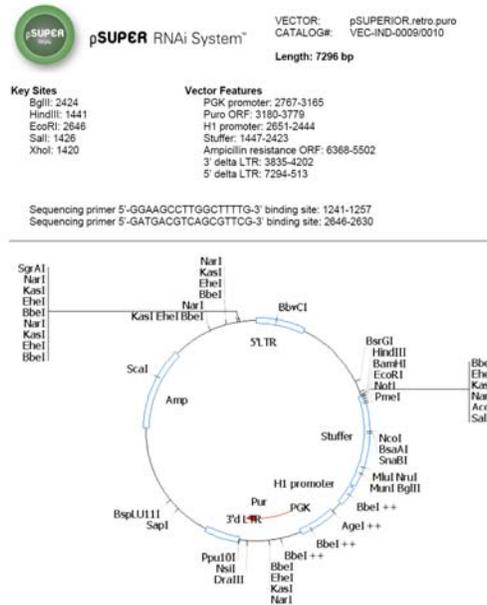
Secuenciación con el cebador: 5' GGAAGCCTTGGCTTTTG 3'. Disolución en agua MilliQ para una concentración de 100pmol/µl. Para secuenciar se necesitaron 3pmoles de cebador en 3µl de agua MilliQ.

Una vez comprobada por secuenciación se retransformaron bacterias competentes DH5α, 50µl con 1µl de la construcción plasmídica. 30' en hielo, 45'' a 42°C en el baño (Julabo) para el choque térmico y 2' en hielo. Antes de plaquear se añadió 1ml de medio LB líquido a cada tubo y

se dejaron en agitación 90 minutos a 37°C. Al cabo de esos 90 minutos se centrifugó el contenido de los tubos 3 minutos a 13,200rpm en una centrífuga de mesa Eppendorf, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40µl de LB líquido plaqueándolas en placas de LB-agar 2% con ampicilina 100µg/ml. Se dejaron crecer durante 16-24 horas en una estufa (Memmert) a 37°C. Las colonias bacterianas transformadas se recogieron de la placa de agar con palillos estériles y se crecieron en medio de cultivo líquido LB a 37°C con ampicilina (Invitrogen). 4ml de medio LB líquido por cada tubo junto a 4µl de ampicilina 100µg/ml (Invitrogen). Las placas se guardaron a 4°C por si hiciera falta usarlas de nuevo. Tras dejar crecer las bacterias *DH5α overnight* en el agitador orbital (Memmert) a 250rpm a 37°C con los tubos inclinados para favorecer la oxigenación cada pellet bacteriano se añadió el contenido de cada tubo a un eppendorf de dos veces centrifugando durante 4 minutos a 13.200rpm para quedarnos con el pellet que se procesó para extraer el ADN plasmídico (BD Macherey Nagel) según las instrucciones del fabricante así como con 100µl del sobrenadante con los que se inocularon 150ml de medio LB líquido con 150µl de ampicilina 100µg/ml. El matraz se dejó toda la noche en el agitador orbital (Memmert) a 37°C y 250rpm. Al día siguiente se pasó el contenido del mismo a un tubo de centrífuga, se centrifugó a 6.500rpm durante 15' a 4°C en una centrífuga (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) con un rotor JA-14. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se procesó para extraer el ADN plasmídico, maxiprep (BD Macherey Nagel) según las instrucciones del fabricante. También se guardó a -20°C el pellet cuando no se pudo procesar en ese momento para hacer posteriormente.

Generación de las construcciones retrovirales shARNi a partir del vector pSUPER retro (Oligoengine) siguiendo el mismo esquema que en el caso del vector pSUPER neo GFP (Oligoengine). Este vector pSUPER retro (Oligoengine) emplea puromicina (Invitrogen) como agente selectivo eucariota.

Figura 4. Mapa del vector pSUPER retro puro. Mismo procedimiento de generación de las construcciones plasmídicas que para el vector pSUPER neo GFP. Uso de los mismos oligonucleótidos para los diseños 7-5, 7-5M, 7-6, 7-6M y 10-6.



Recuperación de plásmidos.

Protocolo que permite la recuperación de plásmidos impregnados en papel *Whatman* (Biometra, Gottingen, Alemania). Se recortó el área en la que se encontraba el plásmido en el papel y se sumergió en un eppendorf con 50µl de TE 1X, se le dió un vórtex y lo dejamos hidratar 5 minutos a TA. Centrifugación 1 minuto a 13,000rpm a TA. Retiramos el papel guardándolo por si hiciera falta. Teóricamente el ADN plasmídico se desprende de esta manera del papel y se disuelve en el tampón TE 1X.

Oligos siARN.

Los oligos siARN validados de TOPK fueron comprados a Ambion (Austin, TX, EEUU). La línea celular TC71 fue transfectada usando jetPEI, Polyplus-transfection, Illkirch, Francia.

4. Métodos de transfección.

Electroporación.

Método usado para la transfección de líneas difíciles de transfectar por otros métodos. Partimos de una placa de cultivo celular de 10cm con un alto grado de confluencia (90-95% de confluencia). Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. Se aspiró el PBS 1X y se añadieron 500µl de tripsina/EDTA (Invitrogen/Life Technologies) por placa retirándolos rápidamente. Las células se levantaron con el medio de cultivo correspondiente añadido tras tripsimizar y se pasaron a un tubo falcon de 10ml. 10 minutos de centrifugación a 1500rpm a TA. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 200µl de medio de cultivo. Se pasó el pellet resuspendido a la cubeta de electroporación Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA, EEUU) a la que previamente se había añadido:

5-15µg del ADN para electroporar

5µl de NaCl 1.5M

20µg de ADN transportador (esperma de salmón) (Sigma).

Las condiciones de electroporación usadas fueron las siguientes:

126V

800µF

45-50mseg

Electroporador modelo Gene Pulser II (BioRad).

Tras el choque eléctrico se agitó el contenido de la cubeta, se añadió 1ml de medio de cultivo a la cubeta y se resuspendió bien pasando el contenido de la misma a una placa de 10cm de diámetro con 11ml de medio que se dejó en el incubador (37°C, 5%CO₂) (Heraeus, Thermo). Se dejó recuperar a las células durante 24 horas. A las 24 horas se añadió el agente selectivo eucariota G418 (Invitrogen) durante 3 semanas de cara a seleccionar aquellas células realmente transfectadas

y matar todas aquellas que no lo hubieran sido. Una placa de cada línea celular *wild type* sin transfectar fue utilizada como placa control siendo sometida exactamente al mismo tratamiento.

Se comprobó que la electroporación tuvo lugar con éxito siguiendo la evolución de las células transfectadas y chequeando el marcador de selección introducido por ejemplo un gen de resistencia a un antibiótico o un gen de expresión de β -galactosidasa estableciendo un control sin transfectar.

Factores que afectan a la eficacia de esta técnica:

- que el ADN tenga una buena calidad
- células en buen estado y preferentemente de bajo pase

Aislamiento de los clones.

Las células transfectadas se dejaron crecer durante 2-3 semanas adicionales para obtener clones celulares transfectados manteniendo durante ese período de tiempo la presión selectiva antibiótica.

Una vez que los clones celulares alcanzaron un número de células comprendidas entre 50 y 100 se levantaron de la placa de cultivo. Los clones se recogieron de la placa de cultivos usando para ello puntas de pipeta recortadas y esterilizadas por autoclave. Cada punta previamente impregnada en vaselina estéril para fijarla al fondo de la placa de cultivo se situó en torno al clon que se pretendía aislar. Al cerco formado por la punta en torno al clon celular se añadió un pequeño volumen de tripsina (30 μ l) para facilitar el levantamiento de las células del clon y conjuntamente con medio de cultivo se pasó a un pocillo de una placa de 24 pocillos con 500 μ l de medio de cultivo.

Las células se dejan crecer hasta llegar a confluencia pasándolas progresivamente de cada pocillo de la placa de 24 a uno de una placa de 12 pocillos, a una de 6 de pocillos y finalmente crecimos el clon en una placa de 10cm de diámetro. Cada placa se expandió a su vez en 3 placas de 10cm, a partir de una se extrajeron proteínas, de otra se extrajo ARN y la tercera se congeló para formar un stock de clones.

Para comprobar si fusión quimérica estaba realmente interferida empleamos las técnicas de Western Blot y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Ensayo de citotoxicidad.

Se trata de un estudio previo a la administración de la neomicina (G418) (Invitrogen) y de puromicina (Invitrogen) para la selección clonal. Se llevó a cabo para cada tipo celular en placas de 6 pocillos, 500.000 células por pocillo o de 12 con 200.000 células por pocillo. 4 ó 2ml de medio por pocillo. Se dejaron crecer las células y adquirir un cierto grado de confluencia (70%) antes de añadir el G418 (Invitrogen). Se disolvió el G418 (Invitrogen) en agua milliQ a razón de 1g por cada 10ml de agua milliQ. De cada gramo en realidad son 0,71g (potencia del antibiótico que viene indicada en cada lote). Concentración final de 71,1µg/µl. Tiempo de actuación de 8 a 14 días. Monitorización del estado celular cada día. Se elige aquella concentración menor de G418 (Invitrogen) capaz de matar a todas las células en cultivo.

Concentración de neomicina (Invitrogen) establecida para las distintas líneas celulares:

TC71 500µg/ml de medio de cultivo

A4573 250µg/ml de medio de cultivo

A673 100µg/ml de medio de cultivo

SK-ES-1 250µg/ml de medio de cultivo

Concentración de puromicina (Invitrogen) establecida para las distintas líneas celulares:

A4573 A673, SK-ES-1, TC71: 20-60µg por 10ml de medio de cultivo, posterior reducción a 10µg.

Transfección con fosfato cálcico.

Transfección en placa de 24 pocillos, con 500µl de medio de cultivo y 150.000 células por pocillo.

Reactivos:

- CaCl₂ 2.5M filtrado (Merck, Darmstadt, Alemania)

- HEBS 2X pH 7.05 (NaCl 140mM, Hepes 50mM, Na₂HPO₄·2H₂O 1,5 mM, Agua Milli-Q).

Mezcla de transfección:

25µl de HEBS 2X

25µl de la mezcla ADN-Agua MilliQ- CaCl₂ que contiene 1µg de ADN en 22.5µl de Agua MilliQ y 2,5µl de CaCl₂ (Merck).

Se mezclaron bien ambos volúmenes, se incubaron tan solo 10 segundos a TA y se añadieron despacio gota a gota los 50µl de la mezcla a cada pocillo.

Transfección con reactivos lipídicos o basados en la transferrina.

1. Transfección con DOTAP-Megafectina (Qbiogene, Irving, CA, EEUU).

Transfección en placas de 6 pocillos, 2ml de medio por pocillo y de 100 a 300.000 células por pocillo, grado de confluencia del 60-80%. Ratio ADN/lípido catiónico 0,5 o 1 (ratio molar). Uso del *enhancer*.

Valores para un pocillo de una placa de seis con volumen de mezcla transfectiva de 50µl por pocillo:

ADN plasmídico a una concentración de 67ng/µl.

ADN plasmídico 25µl Liposomas 10µl Hepes 20 mM 15µl ratio 0,5

ADN plasmídico 25µl Liposomas 5µl Hepes 20 mM 20µl ratio 1 tb ratio 2

Controles negativos sin ADN y con el vector sin inserto.

La megafectina liofilizada y estéril se resuspendió en Hepes 20 mM y se protegió de la luz. Resuspensión por vórtex para que se formaran bien los liposomas catiónicos. Concentración final de la solución 1mM.

Transfección con medio sin suero y sin antibióticos OPTIMEM (Invitrogen) ya que la mezcla lípidos más antibióticos es tóxica para las células. Mezclamos en primer lugar el Hepes y la megafectina y posteriormente se añadió el ADN plasmídico pipeteando varias veces para mezclar todo bien. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a TA en oscuridad. Mientras tanto se reemplazó el medio de cultivo de los pocillos por medio fresco sin suero ni antibióticos. Tras los 15 minutos de incubación se añadieron los 50µl correspondientes gota a gota a cada pocillo. Rango de tiempo de incubación de las células con la mezcla transfectiva de 2 a 6 horas. Cambio de medio y se añade nuevo medio con suero ya pero sin antibióticos todavía. Aumento de la cantidad de ADN por 3, 4 y 6 pero aún así con bajísima efectividad.

Transfección con lipofectamina (Invitrogen).

Transfección con un grado de confluencia de las células del 90-95%. Se sembraron de 300.000 a 1.200.000 células para transfectar por placa de 10cm de diámetro. Medio sin suero ni antibióticos ya que interfieren con la lipofectamina.

Solución A: 24µg de ADN plasmídico en 1500µl de medio OPTIMEM (Invitrogen). Se agitó bien la lipofectamina (Invitrogen) antes de usarla. Mezcla e incubación 5' a temperatura ambiente.

Solución B: 60µl de lipofectamina (Invitrogen) en 1500µl de medio OPTIMEM (Invitrogen). Mezcla e incubación 5 minutos a TA.

Las dos soluciones se mezclaron e incubaron 20 minutos a TA. Se añadieron los 3ml de la mezcla a la placa ya con el medio OPTIMEM (Invitrogen). Cambio de medio a las 4-6h o a las 24h. Se añadió entonces el medio con suero y antibióticos.

Placas de 12 pocillos, 200.000 células por pocillo. 2ml medio de cultivo/pocillo. Ratio ADN (µg) / lipofectamina (µl) 1:2, 1:3.

Mezcla para un pocillo:

1,6µg ADN en 100µl medio de cultivo.

4µl lipofectamina (Invitrogen) en 100µl medio de cultivo. 5 minutos de incubación a TA.

Mezcla total, incubación 20 minutos a TA. Tras los 20 minutos se añaden los 200µl de la mezcla a cada pocillo.

Transfección con transfectina (BioRad).

Lavado de las placas con PBS 1X tras retirar el medio de cultivo de las mismas. Se usó medio sin suero OPTIMEM (Invitrogen). 60-70% de confluencia celular.

Cantidades para un pocillo de una placa de 6:

- 4µg de ADN en 250µl de OPTIMEM (Invitrogen) y 5µl de transfectina (BioRad) en 250µl de OPTIMEM (Invitrogen).

Se mezclaron bien y se incubaron a TA durante 20 minutos para posteriormente añadir los 500µl al pocillo.

Retirada de la mezcla transfectiva a las 3-5h y se añadió el medio con suero.

Transfección con JetPei (Polyplus).

Se sembraron 1-2.000.000 células por placa de 10cm con 10ml de medio de cultivo. Transfección con un grado de confluencia del 50-60%.

Mezcla transfectiva:

7-8µg de ADN en 500µl de NaCl 150mM solución estéril

14-16µl de JetPei (Polyplus) en 500µl de NaCl 150mM solución estéril

Ratio N/P=5, ratio de inicio recomendado.

Vórtex para mezclar y spin. La solución con el JetPei (Polyplus) se añadió a la solución con el ADN. Nuevo vórtex para mezclar y nuevo *spin*. 20 minutos de incubación a TA y se añadió el ml gota a gota a cada placa.

Transfección con Duofect (Qbiogene, Illkirch, Francia).

Se sembraron 1.000.000 células por placa de 10cm. Transfección con un 50-60% de confluencia. 24h antes de la transfección se añadió deferroxamina, 10µl de una solución stock 1000X a cada placa con 10ml de medio para tener una concentración de 50µM. La deferroxamina estéril del kit de transfección se disolvió en 500µl de agua MilliQ para una concentración de 1000X (50mM).

Duofect (Polietilenimina-Transferrina): se diluyó en 120µl de agua MilliQ.

Tampón de HBS: El concentrado del kit (1ml) se diluyó en 19ml de agua MilliQ calentando si es necesario para disolver los cristales que se pudieran formar.

N/P ratios de 4 y 4,8.

Antes de transfectar se retiró el medio con deferroxamina y se añadió nuevo medio, 8,9ml de OPTIMEM (Invitrogen) con 10%FBS (Invitrogen/Life Technologies) a cada placa.

N/P 4 Duofect 11µl 22µg ADN en 550µl HBS1X 539µl HBS 1X

N/P 4,8 Duofect 13,2µl 22µg ADN en 550µl HBS1X 536,8µl HBS 1X

Volumen total de complejo transfectivo para ambos de 1100µl.

Se mezcló todo pipeteando bien y se dejó incubar 20 minutos a TA. Tras esos 20 minutos se añadió gota a gota la mezcla a la placa.

Incubación durante 4h a 37°C 5% CO₂ tras las cuales se eliminó el medio de cultivo con la mezcla transfectiva, se lavó dos veces con su correspondiente medio de cultivo y se añadieron 10ml de medio de cultivo a cada placa.

Transfección retroviral.

En primer lugar se transfectó la línea empaquetadora retroviral BD *AmphoPack* 293 con lipofectamina según protocolo con un nivel del 90-95% de confluencia. Se usó medio OPTIMEM (Invitrogen) sin suero ni antibióticos (Invitrogen/Life Technologies). A las 24h se cambió el medio añadiendo 10ml de medio DMEM+10%FBS (Invitrogen/Life Technologies). 48h más tarde se procedió a recoger el sobrenadante retroviral.

Se retiró el medio de cada placa pasándolo a un tubo falcon de 15ml. 5 minutos de centrifugación a TA a 1000rpm. Tras centrifugar nos quedamos con el sobrenadante pasándolo por un filtro de 45 μ con jeringa para así eliminar posibles restos y detritos celulares y quedarnos tan solo con las partículas virales. Una vez filtrado se guardó a -70°C si no se usó en ese momento o bien se utilizó para infectar las líneas celulares de interés. El sobrenadante retroviral se diluyó 1/2, 1/4 y 1/6 para infectar en una placa de 10cm de la línea de interés con al menos un 70% de confluencia. El resto de volumen de cada placa se completó con medio de cultivo normal. El trabajo se llevó a cabo en una campana de bioseguridad nivel 2 (Telstar, Bristol, PA, EEUU).

Tras 24h en contacto con el sobrenadante retroviral se aspiró, se lavó la placa con PBS1X y se añadió medio de cultivo nuevo. 48h después se empezaron a seleccionar los clones. Selección con puomicina (Invitrogen). Placas control con la misma dosis de puomicina (Invitrogen).

5. Técnicas de detección de proteínas.

- *Western Blot.*

a) Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas de las líneas celulares se llevó a cabo a partir de placas de cultivo de 10 cm de diámetro, con un grado de confluencia del 80-90%.

Se aspiró el medio de cultivo de cada placa colocando las mismas en hielo. Se realizaron dos lavados con 7-8ml de PBS 1X frío con especial cuidado en aquellas líneas celulares con un menor grado de adherencia a la placa. Se añadió 1ml de tampón de lisis proteica por placa al que previamente se incorporaron los inhibidores de proteasas (IPs) (Roche, Basilea, Suiza) a razón de 150µl de IPs por mililitro de tampón de lisis. Cada pastilla de inhibidor de proteasas se disolvió en 1,5ml de agua milliQ. El tampón de lisis estaba compuesto por NP40 1% (Fluka-BioChemika, Sigma), NaCl 150mM (Merck), EDTA 50mM (Sigma), Glicerol 10% (Sigma), Tris-HCl 20mM (Sigma) y H₂O miliQ. De cara a analizar la fosforilación proteica, se añadieron cuando fue necesario los inhibidores de fosfatasa, NaF 50mM (Sigma) y ortovanadato de sodio 2mM (Sigma) en un ratio 1/25. Se levantaron las células de la placa con ayuda de un raspador (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y se pasaron a tubos eppendorf de 1,5ml. Se dejó actuar el tampón de lisis durante 15 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 13000rpm a 4°C 15 minutos. En aquellos casos en los que se pretendió estudiar la expresión de una proteína de membrana, antes de centrifugar los extractos se pasaron por una jeringa con una aguja de 25G. Una vez terminada la centrifugación se recogió el sobrenadante con las proteínas guardando los extractos a -20°C previa determinación de la concentración proteica.

Cuando se quiso analizar la fosforilación de una determinada proteína o proteínas se continuó el proceso hasta desnaturalizar las muestras antes de almacenarlas.

Para la línea celular de mieloma múltiple MM1S al ser una línea celular que crece en suspensión el protocolo de extracción proteica incorpora un paso previo en el que se recoge todo el medio de la placa con las células y se centrifuga a 1200rpm durante 3 minutos a TA para

posteriormente eliminar el sobrenadante y quedarnos con el pellet celular a partir del cual se procede como ya se ha descrito.

b) Determinación de la concentración de proteínas.

Uso del kit comercial BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU).

Se prepararon las soluciones stock de albúmina de suero bovina (BSA) con concentraciones conocidas: 2000 μ g, 1500 μ g, 1000 μ g, 500 μ g, 250 μ g y 100 μ g usando como diluyente el tampón de lisis proteica. Así mismo se estableció un tubo como blanco con tan solo tampón de lisis. Se rotuló por cada muestra y solución estandar de BSA un par de tubos eppendorf. En los tubos de las soluciones estandar de BSA se añadieron 50 μ l de cada una y en los de las muestras 10 μ l de las mismas y 40 μ l del tampón de lisis. Se preparó la solución de trabajo compuesta por los reactivos A y B del kit en una proporción 50:1, añadiendo el componente B sobre el A. Se añadió 1ml a cada tubo de muestra y solución estandar y se incubaron por espacio de 30 minutos a 37°C en el baño (Julabo). Tras dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente unos minutos se procedió a medir la concentración de los mismos en un espectrofotómetro a 562nm (BioRad). Se hizo una curva patrón retirando el valor del blanco a todos los estándares y muestras, determinando la concentración de proteína sin olvidar multiplicar la concentración de las muestras por el factor de dilución.

c) Preparación de las muestras.

En primer lugar se descongelaron los extractos proteicos y en función de la concentración de cada muestra y la cantidad de proteína que se quiso cargar se añadió el volumen correspondiente del tampón de muestra para una dilución 1:4 y se hirvieron las muestras en un termobloque a 95°C durante 5 minutos. La cantidad de proteína cargada varió en función de la concentración del extracto proteico así como de la proteína que se pretendía detectar y el anticuerpo usado pero osciló entre los 50 y los 100 μ g.

El tampón de carga constaba de:

Tris 200mM (Sigma)

DTT 400Mm (Sigma)

SDS 8% (Sigma)

Azul de Bromofenol 0.05% (Sigma)

Mercaptoetanol 4% (Sigma)

Glicerol 40% (Sigma)

d) Electroforesis.

Las proteínas fueron separadas en función de su tamaño y carga por electroforesis en geles desnaturizantes de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). Se montó el sistema de electroforesis con los cristales adecuados (0.75mm, 1.0mm, ó 1.5mm) en función del volumen de proteína cargada en el gel. El porcentaje de acrilamida (Biorad) del gel de resolución (*resolving gel*) se eligió en función del tamaño de la proteína que se quiso detectar. Se prepararon los geles de concentración (*stacking*) y resolución (*resolving*) de acuerdo al tanto por ciento elegido, por regla general los porcentajes elegidos serán del 4% para el *stacking gel* y del 8-10% para el *resolving gel*.

Geles	H ₂ O	Acrilamida/Bis 29:1	Tris- HCl*	SDS 10%	TEMED	APS 10mg/100µl
4%	12,68	2	5	0.2	20µl	100 µl
6%	11,68	3	5	0,2	20µl	100 µl
8%	10,68	4	5	0,2	20µl	100 µl
10%	9,68	5	5	0,2	20µl	100 µl
12%	8,68	6	5	0,2	20µl	100 µl

*1.5 M, pH 8.8 para el *resolving gel* y 0.5M, pH 6.8 para el *stacking gel*.

Los agentes polimerizadores APS (Roche) y TEMED (Sigma) se añadieron al final. Se homogeneizó la mezcla y se depositó sobre los cristales con mucho cuidado de no hacer burbujas. Primero el *resolving gel* al que se añadió isopropanol para evitar la aparición de burbujas y se dejó polimerizar 30-45 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo se eliminó el isopropanol y se añadió el *stacking gel* sobre el *resolving gel* ya polimerizado. Se esperó 30-45 minutos para que el *stacking gel* polimerizara.

Una vez que el *resolving gel* hubo polimerizado se colocó el gel en el sistema de electroforesis. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular coloreado (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo con el tampón SDS-PAGE 1X.

La separación electroforética de las proteínas se realizó en el sistema *Miniprotean* de BioRad a voltaje constante, 90V durante 30 minutos para concentrar las muestras y entre 2 y 3h en función del grado de resolución necesario a 120V.

e) Transferencia.

Este paso se llevó a cabo de dos formas alternativas:

- A) Transferencia húmeda
- B) Transferencia en semiseco.

A) Transferencia húmeda:

Se realizó con el sistema *Mini-Trans Blot Cell* de BioRad a 40V durante 14h a 4°C o bien a 500mA durante 1h 20 minutos a TA pero con el *Trans Blot* sobre hielo. El tampón de transferencia usado contenía un 20% de metanol (Merck).

Las proteínas fueron transferidas a membranas de 9x6 cm de PVDF (*Immun-blot PVDF* membrana, BioRad). Las membranas se activaron previamente con metanol (Merck) durante 5 segundos, luego se dejaron en agua durante 5 minutos para sumergirlas en el tampón de transferencia antes de colocarlas en el sistema de transferencia. Las esponjas del cassette de transferencia y los papeles de filtro (BioRad) también se sumergieron previamente en tampón de transferencia. Se retiró el gel del sistema de electroforesis eliminando el *stacking gel*.

La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana tiene lugar del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo) por lo que el gel se situó siempre del lado del cátodo y la membrana de transferencia del lado del ánodo. Se evitó la formación de burbujas ya que éstas pueden perjudicar la transferencia.

Ensamblaje del cassette de transferencia:

(+) Electrodo positivo (Ánodo).

Esponja

Papel de filtro

Membrana de PVDF

Gel de poliacrilamida

Papel de filtro

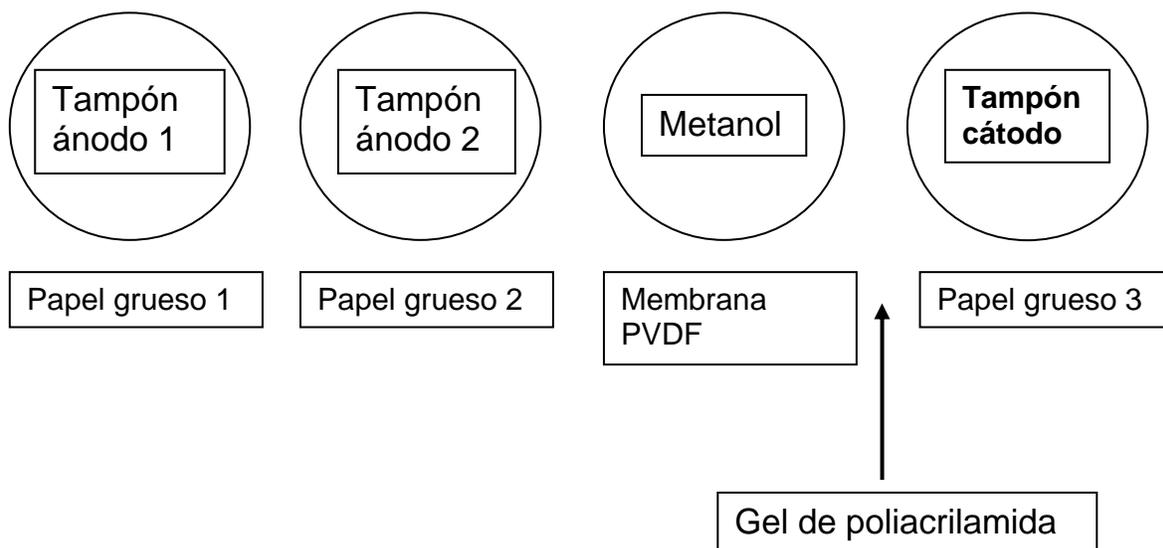
Esponja

(-) Electrodo negativo (Cátodo).

B) Transferencia semiseca:

Con el sistema *Trans-Blot Semi Dry* (BioRad). Se retiró el gel del sistema de electroforesis y se eliminó el *stacking gel*.

Se prepararon los papeles de filtro y se activó la membrana de transferencia según el esquema siguiente que reproduce de igual forma el orden de la transferencia:



La composición de los tampones de transferencia semi-seca fue la siguiente:

Tampón del ánodo 1: 18,72g de Tris (Sigma) en 500ml de Agua MiliQ para una concentración final de 0,3M (El pH de esta solución no necesita ajustarse).

Tampón del ánodo 2: 1,51g de Tris (Sigma) en 500ml de Agua MiliQ para una concentración final de 0,025M (El pH de esta solución no necesita ajustarse).

Tampón del cátodo: 1,51g de Tris (Sigma) en aproximadamente 500ml de Agua MiliQ para una concentración final de 0,025M y se ajustó el pH a 9,4 mediante la adición de 0,1gr glicina (Merck).

La transferencia proteica se llevó a cabo a amperaje constante, 200mA, durante 2horas.

f) Inmunodetección.

Para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana, ésta se incubó con una solución de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) o leche desnatada en polvo (Nestlé, Vevey, Suiza) según las indicaciones de cada anticuerpo utilizado. La solución de bloqueo contiene BSA o leche desnatada en polvo 5% en TBS-T (TBS 1X + Tween 20 0.1%). El bloqueo de la membrana de incubación tuvo lugar con 20ml de la solución de bloqueo durante 90 minutos a TA en un agitador orbital (Heidolph, Schwabach, Alemania) o bien *overnight* a 4°C. La incubación con cada anticuerpo primario varió en función de las especificaciones concretas de cada uno llevándose a cabo la incubación bien con 10ml de TBS-T 5% de leche o BSA durante 1 hora a TA o durante toda la noche a 4°C, en ambos casos en agitación.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados. La concentración de cada anticuerpo utilizado, el tiempo de incubación así como otra serie de características viene detallada en la siguiente tabla.

Nombre	Casa Comercial	Agente de Dilución y Rango	Tiempo de incubación	Secundario
anti FLI-1	Santa Cruz BT, Santa Cruz, CA, EEUU	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	1h a TA <i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-phospho-p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling, Danvers, MA, EEUU	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-p44/42	Cell Signaling	1: 1.000	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo

MAPK		TBS-T 5% BSA		
anti-AKT	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-p57/Kip2	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-caspasa 9	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% leche desnatada en polvo	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-eIF4	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-DAX	Dr. Javier Alonso-IIB, Madrid, Spain	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Ratón
anti-PARP/Caspasa 9	Serotec Germany, Düsseldorf, Alemania	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Ratón
anti-EWS	Santa Cruz BT	1: 750 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Cabra
anti-actina	Sigma	1: 5.000 TBS-T 5% BSA	45 minutos a TA	Conejo
anti-GAPDH	Stressgen	1: 5.000 TBS-T 5% BSA	45 minutos a TA	Conejo
anti-IGF1	Abnova, Taipei Taiwan	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Ratón
anti-TK1	Abnova	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Ratón
anti-Zyxin	Abnova	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Ratón
anti-RHA	Dr. Frank Grosse, Fritz Lipmann Institute, Jena, Alemania	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-LSM1	Abcam, Cambridge, UK	1: 2.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo
anti-NKX2.2	Santa Cruz BT	1: 500 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight</i> a 4°C	Conejo

anti-PBK(TOPK)	BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU	1:1000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Ratón
anti-p73	Abcam	1:1000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Conejo
anti-MLH1	Abcam	1:1000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Conejo
anti-mTOR	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Conejo
anti- phospho-mTOR	Cell Signaling	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Conejo
anti IGF-IR β	Santa Cruz BT	1: 1.000 TBS-T 5% BSA	<i>Overnight a 4°C</i>	Conejo

Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavó la membrana con TBS-T 0.5% BSA o leche 3 veces durante 25 minutos con agitación vigorosa. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo secundario específico de acuerdo al tipo de anticuerpo primario anteriormente empleado. Esta incubación tuvo lugar durante 40-50 minutos a TA en agitación con una solución de 10 ml de TBS-T 1% BSA o leche. Nuevamente la membrana se lavó con una solución de TBS-T 0.5% BSA o leche 5 veces por espacio de 35 minutos en total y se procedió a la detección de la actividad enzimática del anticuerpo secundario.

Los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados con peroxidasa y se empleó como sistema de detección el kit de luminiscencia ECL (Amersham, Piscataway, NJ, EEUU). Se incubó la membrana durante 1 minuto en la oscuridad con un total de 2ml de la mezcla 1:1 de los reactivos A y B del kit. Tras escurrir el exceso de solución de revelado se introdujo la membrana en una funda de plástico transparente que se colocó en el interior del cassette de relevado (Amersham) y se expuso a películas de detección quimioluminiscente (Kodak, East Rutheford, NJ, EEUU). El tiempo de exposición de las películas a las membranas varió entre los 5 segundos y los 60 minutos de acuerdo a la intensidad de luminiscencia observada inicialmente.

Para reutilizar la membrana con otro anticuerpo distinto al usado en primer lugar se procedió de la siguiente manera:

1. Lavado de la membrana en TBS-T (2 veces durante 5 minutos)
2. Incubación de la membrana en la solución de *stripping* (previamente calentada a 50°-65°C antes de usar) durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos.
3. Lavado de la membrana con TBS-T 2 veces durante 10 minutos.
4. A partir de ahí se continuó con el proceso típico del WB comenzando con el bloqueo.

Solución de *stripping* (para un volumen de reacción de 100ml):

SDS 10%	20ml
<i>Upper Tris</i> 0.5M	6,2ml
Agua milliQ	73,1ml
β -mercaptoetanol	0,7ml (Sigma)

• *Electroforesis bidimensional de proteínas.*

Método para analizar la expresión de proteínas en muestras de extractos (celulas, tejidos, sueros, etc) basándose en dos propiedades de las proteínas: el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular.

Consta de dos partes:

a) Isoelectroenfoque (primera dimensión).

Consiste en separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI). El pI que se define como el pH en el cual una proteína sometida a un campo eléctrico no migra viene determinado por el número y tipo de grupos cargados en la proteína. Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, pueden adquirir carga positiva, negativa o ser su carga neta igual a 0, dependiendo del medio en el que se encuentren. Para cada proteína hay un pH específico en el cual su carga neta es igual a 0, este

es su pI. Las proteínas muestran considerables variaciones en el pI, aunque normalmente los valores se sitúan en un intervalo de pH 3-12 (y la mayoría entre pH 4 y 7). Las proteínas tienen carga positiva en soluciones con valores de pH por debajo de su pI y carga negativa en valores de pH por encima de su pI. De esa forma, cuando las proteínas son colocadas en un medio con gradiente de pH y sometidas a un campo eléctrico, se mueven hacia el electrodo con carga opuesta. Durante la migración a través del gradiente de pH, las proteínas ganan o pierden protones. Asimismo, su carga neta y movilidad va disminuyendo de tal manera que la proteína corre más despacio; cuando alcanza el pH de su pI (carga neta = 0) la proteína deja de migrar. Las proteínas se acercan a sus valores de pI en tiempos diferentes pero quedan relativamente fijas a esos valores de pH por largos periodos.

b) Segunda dimensión.

En la segunda dimensión se produce una separación de las proteínas en función de su masa usando electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas resueltas en las tiras de IPG son aplicadas a los geles de la segunda dimensión y se separan perpendicularmente a la primera dimensión. El efecto neto es que las proteínas migran como elipsoides con una ratio carga-masa uniforme y negativa. El porcentaje de acrilamida determina el tamaño de poro del gel. La mayoría de las separaciones de proteínas usan 37,5 partes de acrilamida en una parte de bis-acrilamida.

Se partió de una placa de 10cm con un grado de confluencia del 80-90%. Se eliminó el medio de cultivo de la placa y se añadieron 10ml de PBS 1X en el borde de la placa para evitar despegar las células. Se agitó suavemente la placa y se retiró el PBS 1X repitiendo este paso dos veces más. Se levantaron las células de la placa con ayuda de un raspador (Sarstedt) y se pasaron a un tubo eppendorf de 1,5ml. Se centrifugó durante 10 minutos a 12.000rpm y se eliminó el PBS 1X retirandolo cuidadosamente con una micropipeta y con cuidado de no llevarse el pellet. Este paso se repitió 3 veces asegurándose la última vez de eliminar bien todo el PBS 1X. Se descongeló el tampón de lisis y se pesaron en un eppendorf 10mg de DTT (Sigma) que se disolvieron en 130µl de tampón lisis (DTT + lisis) (El agente reductor que se usó se añadió siempre justo en el momento de ser utilizado). La concentración final fue de 2mM y para ello se añadió en proporción 1:1000 (stock: tampón lisis) a partir de un stock preparado con anterioridad a una concentración 0.2 M. Se añadió al pellet 200µl de tampón de lisis y 8µl de DTT + lisis y se agitó el tubo suavemente hasta que el pellet se disolvió y se dejó incubando en hielo 30 minutos.

Composición del tampón de lisis:

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Urea	12 g	8 M
Tiourea	3,8 g	2 M
CHAPS	1,0 g	4 % (p/v)
Hasta 25 ml con agua.		

Urea, tiourea y CHAPS (Sigma).

Transcurridos los 30 minutos se pasó a eliminar el “moco” formado con ayuda de una micropipeta para a continuación añadir a la muestra 200µl de tampón de lisis y 8µl de DTT (Sigma). El sonicador Vibracell (Sonics, Newtown, CT, EEUU) estaba en un porcentaje entre 5-10. La sonicación de la muestra se llevó a cabo con el tubo en hielo durante 18 segundos evitando que la punta del sonicador tocara las paredes ni el fondo del tubo. Se dejó la muestra 5 minutos en hielo y se centrifugó 2 minutos a 4°C y 12.000rpm. Se repitió todo este paso desde la sonicación dos veces más centrifugando 10-15 minutos en el último.

Se llevó a cabo el lavado de la muestra mediante el kit *2-D Clean-up* (Amersham) lavado para volúmenes de 1 a 100µl (para muestras con de 1 a 100µg). Se transfirió la muestra proteica a un tubo eppendorf de 1,5ml y se le añadió 300µl de precipitante mezclando bien por vórtex o inversión e incubando en hielo durante 15 minutos. Se añadieron otros 300µl de co-precipitante en este caso y se volvió a mezclar brevemente por medio de vórtex. Se centrifugaron los tubos a 12.000rpm durante 5 minutos obteniendo un pellet de color blanco. Se eliminó el sobrenadante con una micropipeta sin tocar el pellet. Nueva centrifugación para retirar lo que reste de sobrenadante. Se añadieron 40µl de co-precipitante en la parte de arriba y dejó incubar 5 minutos. Centrifugación a 12.000rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante de nuevo. Se adicionaron 25µl de agua mili-Q dando un vórtex breve de tal forma que el pellet se dispersó pero sin disolverse en el agua. Se añadió 1ml de tampón de lavado y 5µl de aditivo de lavado, se dio un vórtex breve para que el pellet se dispersara completamente y se incubó a -20°C al menos 30 minutos dando un vórtex de 20-30 segundos cada 10 minutos. Nueva centrifugación a 12.000rpm durante 5 minutos eliminando el sobrenadante. Se dejó secar el pellet pero no más de 5 minutos ya que más tiempo hubiera dificultado la resuspensión del mismo y se disolvió en 200µl de tampón de lisis.

Para muestras de más de 100µg de proteína varió el protocolo. Se transfirió la muestra a un tubo eppendorf de 2ml y se añadieron tres volúmenes de precipitante por cada volumen de muestra, mezclando por vórtex o inversión e incubando a 4°C durante 15 minutos. Se añadieron así mismo tres volúmenes de co-precipitante por cada volumen de muestra y mezclaron brevemente por vórtex. Centrifugación a 8.000rpm durante 10 minutos obteniendo un pellet blanco. Se decantó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se volvió a centrifugar retirando el sobrenadante. Se volvió a añadir co-precipitante (3-4 veces el volumen del pellet) y se centrifugó a 8.000g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se cubrió el pellet con agua mili-Q y se dió un vórtex. Se añadió 1ml de tampón de lavado y 5µl de aditivo de lavado, se dió vórtex y se incubó a -20°C al menos 30 minutos dando un vórtex de 20-30 segundos cada 10 minutos. Se centrifugó a 12.000rpm durante minutos, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar el pellet blanco no más de 5 minutos disolviéndolo en 200µl de tampón lisis.

La cuantificación se llevó a cabo con el kit *2-D Quant* (Amersham). Se preparó una curva estándar con una solución de BSA (concentración 2mg/ml) de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen de BSA (µl)	0	5	10	15	20	25
Cantidad de proteína (µg)	0	10	20	30	40	50

Se preparó la mezcla reactivo de color B/ reactivo de color A en la proporción 1:100; 1ml por muestra. Se añadieron 500µl de precipitante a cada eppendorf, vórtex breve e incubación durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Adición de 500µl de co-precipitante y mezcla por vórtex o inversión. Centrifugación a 10.000rpm durante 5 minutos. Las proteínas sedimentaron formando un pellet blanco visible. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó durante 2 minutos a 10.000rpm. Se añadieron 100µl de la solución *cooper* y 400µl de agua mili-Q mezclando por vórtex para disolver las proteínas. Se añadió 1ml de la reacción de color a cada eppendorf y se invirtieron los tubos. Incubación a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (BioRad) a 480nm usando como referencia un tubo con agua. La absorbancia se midió en un plazo de 40 minutos desde la adición del reactivo de color.

Una vez listos los extractos proteicos se rehidrataron, para introducir las en las tiras (Amersham), las muestras bien de forma activa o pasiva:

Rehidratación activa: Se aplicó un voltaje bajo durante la rehidratación de las tiras (Amersham). Las proteínas entraron en la matriz del gel bajo corriente y por absorción. Este tipo de rehidratación activa está pensada para facilitar la entrada en las tiras de proteínas de alto peso molecular mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Rehidratación pasiva: Las tiras (Amersham) se rehidrataron en los sarcófagos (Amersham) previamente al enfoque. Las proteínas entran en la matriz de las tiras solo por absorción. En ambos casos es muy importante incubar las tiras (Amersham) con la muestra al menos 11 horas antes de que comiencen a enfocarse.

Rehidratación con muestra: la elección de la longitud de la tira, y el gradiente de pH, se realizó en función de la resolución deseada. El volumen de muestra cargada en cada gel varió en función del tipo de gel, geles analíticos en torno a 100µg, geles semipreparativos sobre 300-500µg y geles preparativos por encima de 500µg.

El volumen de carga de muestra se ajustó en función a la longitud de la tira por ejemplo 100-300µg de proteína para una tira de 18cm. En el mismo tubo de la muestra se añadió de 0,5 a 2 % del tampón IPG que se eligió del mismo rango de pH que el de la tira y se completó con la solución de rehidratación *Destrack* (Amersham) hasta alcanzar el volumen óptimo de hidratación.

Longitud de la tira IPG (cm)	Volumen final de rehidratación (µl)
11	200
18	350
24	450

Se colocó la muestra con el tampón IPG y la solución de rehidratación *Destrack* en el sarcófago (Amersham) con una micropipeta (de un lado a otro lo mas homogéneo posible), evitando la formación de burbujas y que se depositara mucha muestra en los extremos. Se colocaron las tiras con una pinza sobre la muestra y se añadió aceite mineral para evitar que se pudieran secar, 1,5ml para tiras de 18cm, sin exceder de esa cantidad ya que puede rebosar del sarcófago (Amersham) al aplicar el voltaje. La rehidratación sin muestra se llevó a cabo de igual forma pero sin muestra lógicamente, con un mínimo de 10horas. La muestra se aplicó después de la rehidratación, antes de iniciar el isoelectroenfoco.

a) Isoelectroenfoco-Primera dimensión.

Se colocó el sarcófago con la tira IPG en el *IPGphor* (Amersham) en la posición correcta (ánodo-cátodo) y alineado según la longitud. Se establecieron los pasos del programa.

Se programaron las condiciones (en general, los pasos S1-S6 se dejaron igual y se modificó el último en función de la longitud y gradiente de pH de la tira) Las condiciones que se detallan a continuación fueron las establecidas para una tira (Amersham) de 11cm, con un gradiente 4-7 y 3-10(pH3-11,4-7,3-10).

1. S1: 30 V, *step-n-hold*, 10h
2. S2: 100 V, *step-n-hold*, 1h
3. S3: 250 V, *step-n-hold*, 1h
4. S4: 500 V, *step-n-hold*, 1h
5. S5: 1000 V, *step-n-hold*, 1h
6. S6: 8000 V, gradiente, 1h
7. S7: 8000 V, *step-n-hold*, 12.000
8. Fijación del número de tiras IPG (Amersham).

b) SDS-PAGE-Segunda dimensión.

Montaje del sistema de electroforesis, según el protocolo de la casa comercial. Preparación de los geles. Se eligió el porcentaje en función del tamaño de la proteína optando generalmente por un 12%. Se añadieron en el último momento los agentes polimerizadores APS y el TEMED (Sigma).

Reactivos / soluciones	15%	12,50%	12%	7,50%
H2O	7,2 ml	8,5ml	8,7 ml	10,9 ml
Acilamida/bis 40%	7,5 ml	6,25 ml	6 ml	3,75 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
SDS 10%	200µl	200µl	200µl	200µl
APS 10%	100µl	100µl	100µl	100µl

TEMED	10µl	10µl	10µl	10µl
volumen final	20ml	20ml	20ml	20ml

Los siguientes volúmenes corresponden a un tamaño de cristal de 20x20 cm.

12%	1 Gel	2 Geles
H2O	21.75 ml	43,5 ml
Acilamida/bis 40%	15 ml	30 ml
Tris-HCl 1,5 M, Ph 8,8	12,5 ml	25 ml
SDS 10%	500 µl	1000 µl
APS 10% (0,1g/ 1ml)	250 µl	500 µl
TEMED	25 µl	50 µl
volumen final	50 ml	100 ml

Durante la polimerización el gel merma lo suficiente como para que se pudiera colocar posteriormente la tira. Se dejó polimerizar el gel durante una hora añadiendo isopropanol en la parte superior para evitar la aparición de burbujas. Mientras tanto se equilibraron las tiras para que estuvieran en las condiciones adecuadas para la electroforesis. Se añadió el DTT (Sigma) al tampón de equilibrado. Se añadieron a la cubeta de equilibrado 4ml de tampón de equilibrado + DTT.

Tampón de equilibrado (T-EQ):

Reactivos/Soluciones	Cantidad	Concentración final
Tris 1,5 M. pH 8,8	10 ml	50mM
Urea	72,1 g	6M
Glicerol 87%	69ml	30%
SDS	4g	2%
Azul de bromofenol	400 µl	

Hasta 200 ml con H ₂ O

Se sacó la tira del sarcófago (Amersham) y se secó con papel. Se sumergió la tira en una probeta con agua destilada (para eliminar algo de aceite mineral) y se volvió a secar. A continuación se sumergió la tira en el T-EQ + DTT (Sigma) y se dejó en agitación suave durante al menos 15 minutos. Tras esos 15 minutos se añadieron a la cubeta de equilibrado 4ml de T-EQ + IDA (Iodoacetamida) (Amersham).

Se volvió a lavar la tira (Amersham) en una probeta con agua y se secó nuevamente con papel. Se sumergió en T-EQ + IDA (Amersham) dejando en agitación suave otros 15 minutos. Antes de pasar a colocar la tira sobre el gel se eliminó el isopropanol (Merck) de la parte superior del gel. Una vez equilibrada se sacó la tira de la cubeta de equilibrado, se lavó un par de veces en una probeta con agua fresca y se secó. Con ayuda de unas pinzas se colocó la tira (Amersham) en el cristal hasta que quedó perfectamente unida al gel sin formar burbujas. Se selló la tira (Amersham) con una solución de agarosa (Laboratorios Conda) dejando que polimerizara.

Se colocaron los cristales dentro de la cubeta de electroforesis (Amersham) según protocolo y se añadió el tampón de carga SDS-PAGE 1X corriendo el gel durante 4h a 35W. Se dejaron de correr los geles una vez que el frente de corrida llegó hasta el final del cristal. Una vez terminada la carrera, se desconectó la cubeta (Amersham) de la fuente de alimentación (Amersham) y se sacaron los cristales. Con una espátula se separaron los cristales y se depositó el gel en un recipiente con la solución adecuada del proceso de tinción. Corte de las bandas indicadas, digestión en gel con tripsina (Invitrogen), análisis de los fragmentos tripticos obtenidos mediante MALDI-TOF y búsqueda en base de datos *SwissProt* (<http://www.expasy.ch/sprot/>) o *MSDB* (<http://csc-fserve.hh.med.ic.ac.uk/msdb.html>) no redundante.

c) Tinción de los geles.

Los geles se pusieron en recipientes de tinción con 200ml de una solución de fijación que contenía 40% etanol y 10% ácido acético (Merck) en agua mili-Q y se dejó en agitación suave durante 30 minutos. A continuación se desechó la solución de fijación y se añadieron 200ml de la solución de sensibilización con 30% etanol (Merck), 0,2% (p/v) tiosulfato sódico (Sigma), 6,8% (p/v) acetato sódico (Merck) en agua miliQ dejando los geles en agitación durante 30 minutos más. Seguidamente se desechó la solución de sensibilización y se añadieron 200ml de agua mili-Q, agitando durante 5 minutos y se repitió este paso 3 veces, durante el cual se preparó la solución de tinción, 0,25% (p/v) de nitrato de plata (Sigma) y 400 µl de formaldehído (Sigma), en agua mili-Q.

A continuación, se desechó el agua, se añadieron 250ml de la solución de tinción y se dejó en agitación durante 20 minutos. Se eliminó la solución de tinción y se añadieron 200ml de agua mili-Q, dejando en agitación un minuto, se repitió este paso 2 veces. Se desechó el agua mili-Q y se añadieron 250ml de la solución de revelado (2,5% (p/v) carbonato sódico (Merck) y 0,04% formaldehído en agua mili-Q, se mantuvieron los geles en agitación de 2 a 5 minutos (el tiempo necesario para que se revelasen bien las proteínas pero evitando que se pudieran quemar). Seguidamente se eliminó la solución de revelado e inmediatamente se añadieron 200ml de la solución de parada: 1,46 % (p/v) de EDTA (Merck) en agua mili-Q, dejando los geles en agitación durante 10 minutos. Seguidamente se desechó la solución de parada y se añadieron 200ml de agua mili-Q, se dejaron los geles en agitación durante 5 minutos y se repitió este punto 3 veces. Finalmente se dejaron los geles en agua mili-Q para proceder a escanear (para almacenar los geles después del escaneado se utilizó una solución de almacenamiento constituida por 300 ml de etanol, 46ml de glicerol y 654ml de agua mili-Q, en este caso en cantidad suficiente para cubrir los geles).

d) Visualización y análisis de los geles.

Tras el escaneo y visualización por tinción, se identificaron varios miles de puntos proteicos. Los geles fueron analizados manualmente para determinar cambios cuantitativos de los puntos proteicos entre controles y problemas. Se seleccionaron distintos puntos y se entregaron para su análisis por espectroscopia de masas *MALDI-ToF* al servicio de proteómica del CIC (Salamanca).

e) Espectroscopía de Masas por MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight).

Preparación de la Muestra

Escisión de bandas

Inicialmente se empezó por escindir los puntos elegidos de los geles mediante un sistema robotizado (*ProteomeWorks™ Spot Cutter*, BioRad).

Digestión de las muestras

A continuación se sometieron los puntos a una degradación proteolítica:

Destinción de los puntos

Se empezó por añadir 50µl de ferrocianuro potásico 30mM (Merck) y 50µl de tiosulfato sódico 100mM a los puntos, durante aproximadamente 3 minutos, hasta que estos se destiñeran. Se realizaron 2 lavados durante 5 minutos con 100µl de agua mili-Q y después se añadieron 100µl de acetonitrilo (ACN) (Merck), durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante a continuación.

Reducción/Alquilación

Se empezó por añadir a las muestras 100µl de TCEP 20mM (Sigma) en bicarbonato amónico 25mM (BA) (Sigma), incubándolas durante 15 minutos a 37°C en agitación. Se quitó el sobrenadante, se añadieron 100µl de IDA 40mM (Merck) (en BA 25mM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación. A continuación se realizaron 2 lavados durante 15 minutos, a 37°C y agitación, con 200µl de BA 25mM y después se hizo un lavado mas, durante 15 minutos, a 37°C y agitación, con 200µl de BA 25mM/ ACN 50%. Se secaron las muestras en un secador a vacío (*SpeedVac*, Thermo) durante 30 minutos.

Digestión

Seguidamente se diluyó la tripsina (Invitrogen) (1µg/µl) a 12.5ng/µl con BA 25mM y se añadieron entre 10 y 15µl a las muestras, dejándolas en hielo durante 30-45 minutos. Se eliminó el volumen sobrante y se añadieron 10µl (cubriendo los puntos) de BA 25mM / ACN 9%, incubando a 37°C, entre 12 y 18 horas.

Extracción de los péptidos

A continuación se recogió el sobrenadante en un microvial correctamente etiquetado y se hizo un lavado de los fragmentos de gel, cubriéndolos con 25 mM BA/50% ACN, dando un centrifugado rápido. Tras este paso se recogió el sobrenadante en el mismo microvial y se secó en el *SpeedVac* (Termo) resuspendiendo en 5-10µl de acetonitrilo 50%/ TFA 0.1% (Merck), sonicando posteriormente las muestras.

Análisis de la muestra en el Espectrómetro de masas MALDI-TOF

Se empezó por depositar 0,5µl de solución de matriz (DHB/HCCA) (del kit *Starter for Maldi-ToF MS*, Bruker-Daltonics, Billerica, MA, EEUU) sobre una placa *Anchor* de *Maldi-Tof*, y después 1µl del calibrante de péptidos (del kit *Starter for Maldi-ToF MS*) y 1µl de cada una de las muestras, esperando que las muestras y el calibrante de péptidos cristalizaran. Posteriormente se introdujo la placa *Anchor* en el aparato *Maldi-Tof*, calibrando el equipo usando el pocillo en el que se han depositado los calibrantes de péptidos, mediante el programa *Flex Control*. A continuación se obtuvo el patrón peptídico de cada muestra, mediante el programa *Flex Control* y con el programa *X-TOF* se hizo una calibración del espectro mediante ajuste cuadrático utilizando para ello 2 picos de tripsina de masa conocida u otros picos conocidos. Se comprobó la calidad de los espectros de cada uno de los picos obtenidos y se eliminaron los de mala calidad. Mediante el programa *BIOTOOLS* y el motor de búsqueda *MASCOT*, se buscaron en las bases de datos disponibles la proteína cuyo patrón peptídico correspondía con el patrón peptídico obtenido. Esto se debe a que el conjunto de masas de los péptidos resultantes de la degradación constituyeron una "huella dactilar" de la proteína en análisis. Así, con los datos de m/z de los iones cuasimoleculares (obtenidos en modo lineal), así como con los datos de fragmentación espontánea (PSD, *Post-Source Decay*; ISD, *In-Source Decay*) o de iones seleccionados (CID, *Collision-Induced Dissociation*) se pudo hacer una identificación preliminar de las proteínas cuyos cambios se habían detectado en los geles 2D.

La reducción y la alquilación se hicieron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BioRad). Los geles de la segunda dimensión se fijaron y se tiñeron con plata sin solución de fijación de glutaraldehído.

La selección de los spots de interés se llevó a cabo de forma manual. Aquellas spots proteicos expresadas diferencialmente fueron recortados de los geles, digeridos con tripsina y procesados para un análisis de espectrometría de masas por MALDI-ToF (Ultraflex, Bruker Daltonics).

Las proteínas fueron identificadas por *matching peptide-mass fingerprinting* contra la base de datos *Swiss-Prot non-redundant human database*, estableciendo un *minimal score change cut-off* de 65 y un $p < 0.05$.

Se usó el programa de análisis de imagen *IMAGE MASTER / MELANIE* (Instituto Suizo de Bioinformática, Ginebra, Suiza) para el análisis digital de los geles 2-D *PAGE*.

Criterios de Búsqueda.

Database: Sprot 20061011 (234112 sequences; 85963701 residues)

Taxonomía: Homo sapiens (14780 sequences)

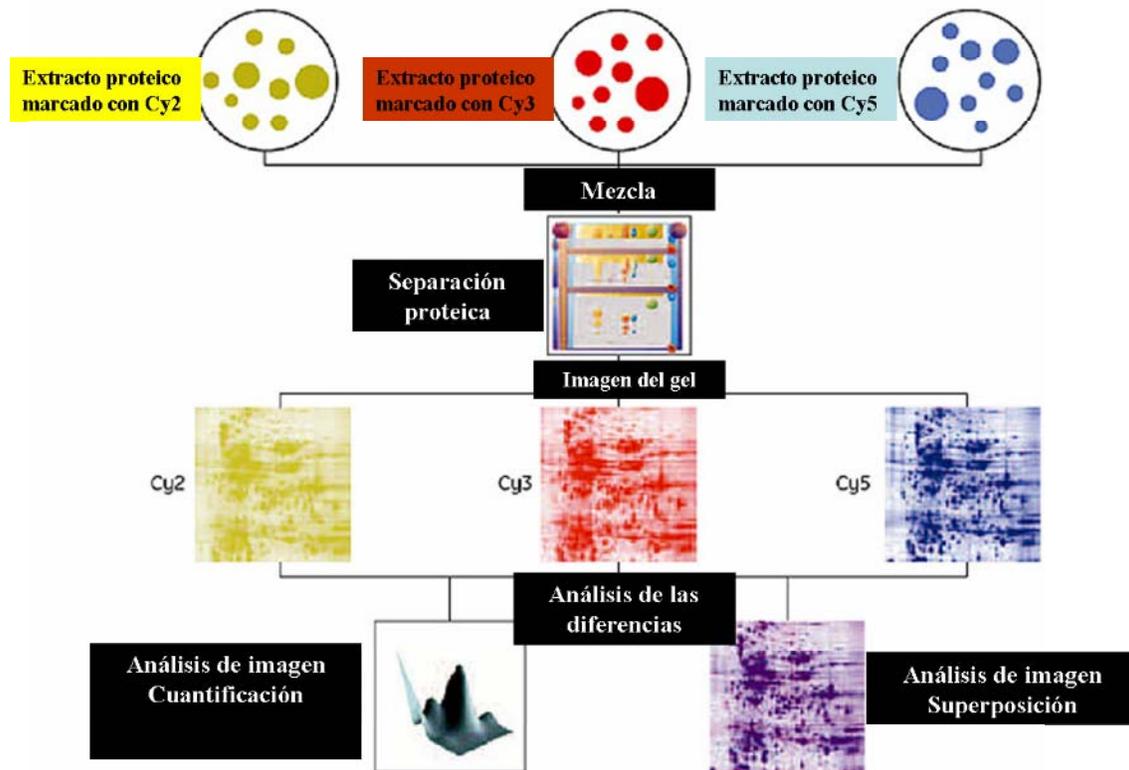
Modificaciones: carbamidometil (C), oxidación (M)

El valor *Score* es $-10 \cdot \log(P)$, siendo P la probabilidad de que el resultado obtenido sea al azar. Un resultado es significativo ($p < 0.05$) cuando el valor del *Score* supera 54.

• *DiGE (Difference Gel Electrophoresis).*

El método DiGE es una modificación del método de electroforesis bidimensional de proteínas 2-D *PAGE*. Consiste básicamente en que dos o tres muestras proteicas diferentes se marcan con sondas fluorescentes antes de que tenga lugar la separación de las proteínas lo que nos va a permitir al final un análisis preciso y detallado de las diferencias en la abundancia de las proteínas entre las distintas muestras analizadas.

Figura 5. Esquema del método DiGE. Adaptado de biology.mcgill.ca/CIAN/DiGE_PAGE.htm



Por regla general se usan los fluoróforos Cy2, Cy3 y Cy5 como sondas marcadoras. Estas sondas poseen las siguientes características: la misma proteína marcada en distintas muestras migrará a la misma posición, en función de su tamaño y carga, con independencia de cómo se haya marcado; no hay cambios en función del pH usado; hasta 125pg de proteína pueden ser detectados; son fotoestables lo que hace que la pérdida de señal sea mínima durante el marcaje, la separación y el escaneo.

El DiGE posee una serie de ventajas con respecto a la electroforesis 2-D tradicional como por ejemplo:

- las muestras marcadas se mezclan y posteriormente se separan en el mismo gel 2-D PAGE lo que supone que las variación entre las réplicas de los geles se reduce muchísimo y además el número de geles que se precisa es mucho menor
- se puede crear un gel estandar interno mezcla de las mismas cantidades de las muestras proteicas.
- Los geles no se tienen que manipular tras la electroforesis y se manipulan con mayor facilidad.

Digestión de las proteínas en gel.

Las manchas de proteína fueron escindidas manualmente y digeridas de forma automática en un robot digestor Proteineer DP (Bruker-Daltonics). Se empleó el protocolo de digestión de Schevchenko *et al.* (487) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con ditioneitol (Amersham) 10 mM en bicarbonato amónico de pureza 99,5% (Sigma) 50 mM y alquilados con IDA (Sigma) 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM (Sigma). Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico (Sigma) 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck) y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega) a una concentración de 8ng/μl en bicarbonato amónico (Sigma) 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 horas. Por último, se añadió ácido trifluoroacético (pureza: 99.5%; Sigma) al 0,5% para extraer péptidos.

MALDI-MS(/MS) y búsqueda en bases de datos.

Se mezcló una alícuota del digerido descrito más arriba con una alícuota de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,25% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado *AnchorChip* de 600 μm (Bruker-Daltonics) y se dejó secar a TA. Los datos de MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma automática en un espectrómetro de masas MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (488). Los espectros de masas se midieron en modo positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon entre 100 y 1000 espectros individuales. Para el análisis de iones fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el *software flexAnalysis* (Bruker-Daltonics). Los espectros MALDI-TOF fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con $m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$; la calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo $m/z = 800-3200$. Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa *BioTools* (Bruker-Daltonics) para buscar en una base de datos no redundante (NCBI; ~4,8 x 10⁶ entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.; o SwissProt; ~2.6 x 10⁵ entradas; Swiss Institute for Bioinformatics, Suiza) empleando el *software Mascot* (Matrix Science, Londres, Reino Unido)

(489). Tanto los espectros MALDI-MS/MS) como los resultados de la búsqueda en bases de datos fueron revisados manualmente en detalle utilizando los programas arriba mencionados y programas caseros.

6. Técnicas de detección de ácidos nucleicos.

a) Extracción de ARN.

Tratamiento de las células antes del aislamiento del ARN.

La extracción de ARN total de las líneas celulares se llevó a cabo con el reactivo comercial Trizol® (Invitrogen). Una vez alcanzado un grado de confluencia del 80-90% en la placa de cultivo celular se procedió a eliminar el medio de cultivo de cada placa de 10cm de diámetro. Se añadió 1ml del medio de cultivo correspondiente y se levantaron las células con ayuda de un raspador (Sarstedt). El contenido celular se recogió con una pipeta y se pasó a un eppendorf de 2ml. Se centrifugó a 1200rpm a TA durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió nuevo medio de cultivo al tubo eppendorf y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. En el fondo del tubo quedó un botón celular no demasiado grande ya que aumentaría el riesgo de contaminación por ADN o proteínas.

Lisis celular.

Se añadió 1ml de Trizol® al tubo eppendorf con el pellet celular y se resuspendió vigorosamente por pipeteo. Se incubaron las muestras a TA durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos nucleóticos (se pudo parar el proceso en este punto y guardar las muestras a -70°C durante un mes. En este caso se descongelaron luego las muestras a 37°C durante 10 minutos mezclando bien por pipeteo). Tras los 5 minutos se añadieron 200µl de cloroformo (Merck) agitando vigorosamente 15segundos con la mano para a continuación incubar a TA durante 2-3 minutos. Se centrifugó a 4°C, a 12.000rpm durante 15 minutos. A partir de ese instante se mantuvieron los tubos siempre en hielo para evitar la degradación del ARN. Tras la centrifugación se formaron tres fases, una inferior de color rojo (proteínas), una intermedia blanquecina (ADN) y una superior acuosa (ARN).

Precipitación del ARN.

Se transfirió la fase acuosa con el ARN a un nuevo eppendorf de 1.5ml (facilita la posterior observación del pellet tras centrifugar) poniendo muchísimo cuidado en no tocar la interfase para evitar posibles contaminaciones de ADN o proteínas. Se añadieron 500µl de alcohol isopropílico (Merck), se mezcló bien y se incubaron las muestras a 4°C durante 10 minutos, se centrifugaron a 4°C, a 12.000rpm, durante 10 minutos (se pudo parar aquí el protocolo guardando el ARN en isopropanol a 4°C si iba a ser utilizado en una semana, o a -20°C si iba a ser utilizado en un año. Cuando fue a ser utilizado nuevamente se centrifugó a 4°C a 12500 rpm durante 30 minutos).

Lavado y resuspensión del ARN.

Se eliminó el sobrenadante utilizando una pipeta y se añadió 1ml de etanol 75% (Merck). Se dió un vórtex para mezclar bien y se centrifugó a 4°C 11000rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con la pipeta y se dejó secar el pellet brevemente porque en caso contrario resulta muy complicado disolverlo después con el tubo abierto y en hielo. Se secaron las paredes del tubo con una pipeta y mucho cuidado y finalmente se resuspendió el ARN en 100µl de agua DEPC (Ambion).

Purificación del ARN.

La purificación se lleva a cabo con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Una vez resuspendido el ARN en 100µl de agua DEPC se añadieron 350µl del buffer RLT al que previamente se había añadido el beta-mercaptoetanol (Sigma) a razón de 1ml/10µl de beta-mercaptoetanol 14.5M. Se mezcló bien por pipeteo y se añadieron 250µl de etanol 100% (Merck) y se volvió a mezclar por pipeteo. Una vez mezclado todo se pasó todo el volumen a una columna del kit y se centrifugó a 10.000rpm 15segundos a TA. Se decantó el líquido y se reutilizó el tubo después de cada paso. Se añadieron 350µl del buffer RW1 y se centrifugó a 10.000rpm 15segundos. Un paso importante del proceso de purificación es el tratamiento con la enzima ADNasa (Qiagen) para eliminar cualquier posible traza de ADN que pudiera estar contaminando la muestra de ARN. Por cada muestra se mezclaron 10µl de ADNasa (Qiagen) con 70µl del buffer RDD y se añadió el total de 80µl sobre la columna para incubar a TA durante 15 minutos (la ADNasa es muy lábil así que no se le puede dar vortex, se mezcla por inversión). Tras el tratamiento con la ADNasa (Qiagen) se añadieron 350µl del buffer RW1 y se centrifugó a 10.000rpm durante 15segundos. Se

eliminó el sobrenadante y se añadieron 500µl de buffer RPE al que previamente se le había incorporado el etanol y se centrifugó a 10.000rpm 2 minutos, repitiendo de nuevo este paso. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se centrifugó a 10.000rpm 1 minuto. Se insertó la columna en un eppendorf de 1.5ml y se añadieron 50µl de agua DEPC (Ambion) para eluir el ARN, se dejó incubar 5 minutos a TA y se centrifugó a 10.000rpm 1 minuto. Se repitió repetir este paso una vez más cuando se quiso tener menos concentrado el ARN. Ya por último se leyó la concentración de las muestras en el Nanodrop (Thermo Fisher, Wilmington, DE, EEUU) tomando como referencia del grado de calidad de la muestra el ratio de absorbancia 260/280. Se alicuotaron las muestras de ARN para evitar la degradación de las mismas con las descongelaciones y se guardaron a -70°C.

b) RT-PCR, síntesis de ADNc con oligodT/RHP.

La retrotranscripción es un método enzimático que utiliza oligonucleótidos como cebadores para sintetizar moléculas de ADN monocatenario de secuencia complementaria a la de los ARNs presentes en la muestra. Los oligonucleótidos pueden ser hexámeros de secuencia aleatoria (RHP) u oligodT, un primer de poli T (timidina) que se une a la cola de poliA (adenina) del ARN mensajero para retrotranscribir de forma específica el mismo. Los RHP sin embargo amplifican además del ARN mensajero el ARN ribosómico por lo tanto el proceso es menos específico.

Se ha utilizado el sistema de retrotranscripción de Invitrogen, enzima transcriptasa Reversa Superscript II 132U (SSII) (Invitrogen).

Se partió de 1µg de RNA por cada muestra. Por cada muestra se rotularon dos tubos eppendorf de 200µl (RT+ y RT-):

RT+: muestra + *master Mix* RT+.

RT-: muestra + *master Mix* RT- (sin la enzima superscript II para verificar la pureza de los componentes de la retrotranscripción).

Aparte se rotuló otro tubo de 200µl No ARN para verificar si había impureza por contaminación con ADN genómico.

No ARN: agua + *master Mix* RT+.

Se ajustó el volumen de muestra necesaria que se debía añadir para partir de 1µg de ARN hasta llegar a 10µl y completar el resto con agua DEPC (Ambion) salvo en el tubo control no ARN en el que la muestra se sustituyó por agua DEPC (Ambion). Se añadió 1µl de oligodT o de RHP (Invitrogen), se mezcló bien por pipeteo y se pasaron los tubos al termociclador (BioRad).

Ciclo inicial de 5' a 65°C para pasar a 4°C durante 5'.

Durante el tiempo que los tubos están a 4°C se preparon las *master mix* que contenían el tampón 5X, DTT, los dNTP's (Eppendorf), el inhibidor de la ARNasa (RI) (Ambion) y la enzima transcriptasa Reversa Superscript II 132U (SSII).

MASTER MIX+

5X buffer	4µl
0.1M DTT	2µl
10mM DNTP's	1µl
RI	1µl
SSII	1µl

MASTER MIX-

5X buffer	4µl
0.1M DTT	2µl
10mM DNTP's	1µl
RI	1µl
H2O	1µl

De cada *master mix* se añadieron 9µl a cada tubo, que fueron sacados del termociclador (BioRad), para un volumen final de 20µl. Se mezcló todo bien por pipeteo y se llevaron de nuevo los tubos al termociclador continuando el programa de retrotranscripción:

42°C 50', 70°C 15', 4 °C ∞.

El ciclo para la síntesis de ADNc es el siguiente:

65°C 5', 4°C 5', 25 °C 5', 42°C 50', 70°C 10', 4 °C ∞.

Una vez terminado el programa de de RT-PCR se añadió a cada tubo 30µl de agua-DEPC (Ambion) para tener un volumen final de 50µl por tubo. Los ADNc se guardaron a -20 °C.

c) RT-PCR en tiempo real.

En primer lugar se extrajo el ARN y se retranscribió tal y como hemos descrito. Antes de empezar con la PCR cuantitativa en tiempo real nos aseguramos que no hubiera contaminación en los ADNc

realizando una PCR para el gen control (*housekeeping gene*) GAPDH (gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa). Se generaron curvas estándar para el gen de interés y el gen control, GAPDH, usando diluciones seriadas de la muestra establecida como referencia (10, 1 y 0.1ng). Cada muestra problema contaba con 10ng de su ARN por triplicado. Se introdujeron dos pocillos de C- sin ADNc pero con los cebadores del gen en cuestión que se analizaba en ese momento y otros dos C- sin ADNc pero con los cebadores para GAPDH.

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo con:

10.7µl de agua-DEPC (Ambion)
0.4µl de cebador sentido y 0.4µl de cebador anti-sentido
12.5µL de iQ SYBR Green Mix (BioRad)
1µl de ADNc (ajustado a una concentración de 10ng/µl).

Volumen final de la reacción, 25µl por pocillo.

La placa de 96 pocillos (BioRad) se selló bien con una placa de sellado (BioRad). La placa se centrifugó brevemente a TA a 1300rpm.

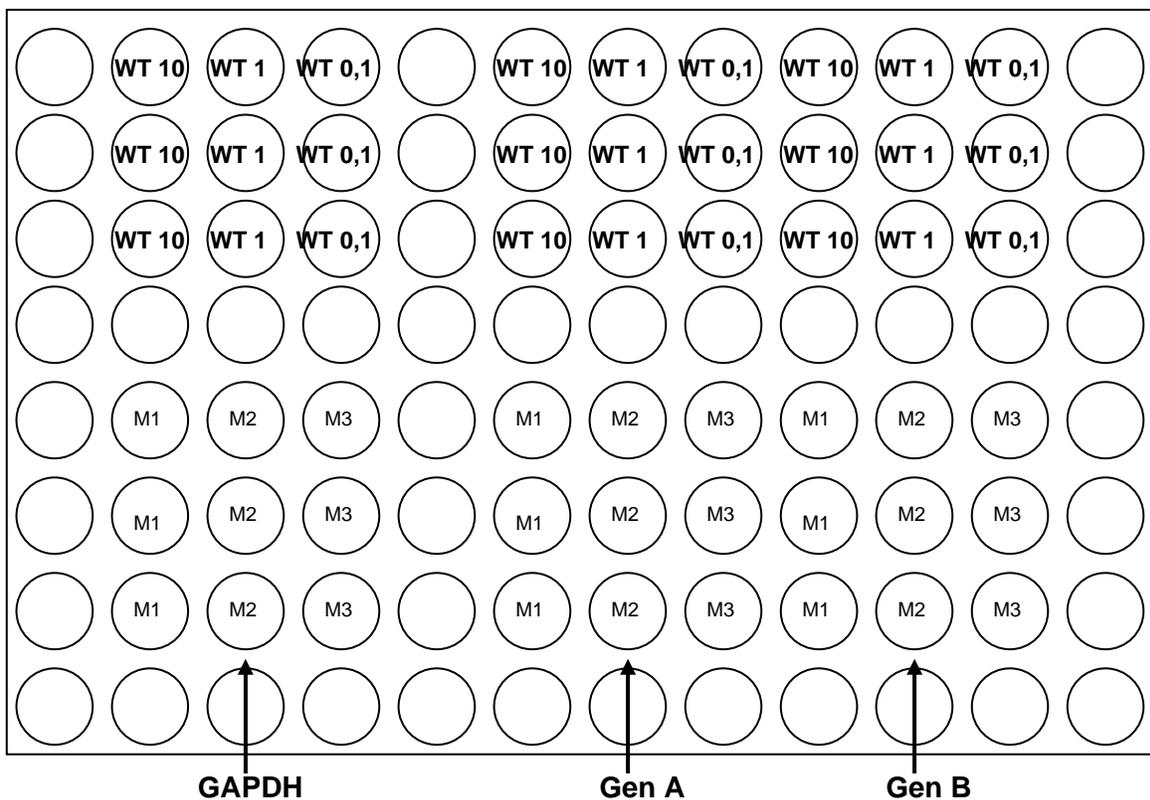
La reacción tuvo lugar en un termociclador de tiempo real iQ5 (BioRad). La reacción constó de las siguientes etapas:

Desnaturalización inicial: 95°C durante 10 minutos.

Reacción cíclica: 50 ciclos a 95°C durante 15segundos y a 60°C durante 1 minuto, 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 1 ciclo a 65°C durante 1 minuto.

Curva de *melting*: 60 ciclos con una rampa de temperatura de +/- 0.5°C durante 10segundos empezando a 65°C.

Figura 6. Diseño de una placa de 96 pocillos de RT- PCR en tiempo real. 3 muestras y dos genes para analizar, A y B. GAPDH como gen control. WT: control (diluciones de 10,1 y 0,1ng). M1, M2, M3: muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Todos los restantes pocillos que están en blanco se rellenan de agua.



El análisis de los datos fue realizado con el programa informático BioRad IQ5 2.0 *Standard Edition Optical System Software Version 3.1*. Cada muestra se analizó al menos por triplicado en los dos estadios temporales: temprano y tardío. El valor medio del umbral de ciclo o *Threshold Cycle (CT)* fue el usado como parámetro de referencia. Para cada muestra analizada el CT de cada gen estudiado se normalizó usando el valor para el gen control (GAPDH) de acuerdo a la fórmula matemática de Pfaffl (490).

Diseño de los cebadores de PCR en tiempo real.

En primer lugar se buscó en bases de datos públicas como Ensembl (www.ensembl.org) o la de UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) el gen o proteína para el cual queríamos diseñar los cebadores. Una vez que accedimos a la información del gen en cuestión buscándolo bien por su *Accession number* en el caso de que por ejemplo se trate de una proteína identificada por MALDI-TOF, por su nombre o símbolo, se usó como secuencia de referencia para el diseño la *transcript information* o secuencia

del ARNm del gen sin intrones. Los cebadores para los distintos genes seleccionados se diseñaron usando el programa bioinformática *primer3* (MIT, Cambridge, MT, EEUU).

Se siguieron una serie de reglas a la hora de llevar a cabo el diseño:

- Los cebadores deben ser interexónicos: es decir, al menos una parte de uno de ellos tiene que asentarse en un exón distinto al que se asiente el otro.
- El tamaño del amplicón (secuencia amplificada por los cebadores) debe ser de alrededor de 100 pares de bases (90 – 110).
- La temperatura de *melting* de ambos cebadores debe estar entre 60 °C y 61 °C.
- El contenido en GC de los cebadores debe ser del 50 - 55 %.
- Intentar que el último o últimos nucleótidos en el extremo 3' sean C o G.
- Valores de autocomplementariedad, autocomplementariedad en 3' y complementariedad. en 3' o en cualquier zona inferiores a 3, o en su defecto a 4.

Los cebadores diseñados funcionaron correctamente con un tampón de PCR con una concentración de KCl de 50 mM; la concentración de KCl del tampón influye en la temperatura de *melting* de los cebadores, alterándola, por lo que la temperatura de anillamiento de 60°C de sólo será la adecuada para este tipo de tampones.

Para verificar la idoneidad de los cebadores sintetizados se corrió una PCR a partir de los ADNc en un termociclador normal con un programa denominado pseudo-real que imita las condiciones establecidas en la PCR en tiempo real pero sin la fase de *melting* y posteriormente se visualizaron los resultados en un gel de agarosa (Laboratorios Conda) al 1% cargando en los pocillos todo el contenido de la reacción (25 µl). El resultado en los casos positivos fue de una única banda, intensa, a la altura de 90 – 110 pb. Si no se observó banda o bien se detectó un bandeo propio de una unión inespecífica de los cebadores al ADN se diseñaron nuevos cebadores tal y como se ha descrito.

Figura 7. Comprobación de la idoneidad de los cebadores diseñados para RT-PCR en tiempo real. Programa “pseudo real” PCR. El resultado en los casos positivos fue de una única banda, intensa, a la altura de 90 – 110 pb excepto en el caso de la calle “e” en la cual se detectó un bandeo propio de una unión inespecífica de los cebadores al ADN por lo que se descartaron dichos cebadores y se diseñaron unos nuevos. pb: pares de bases.

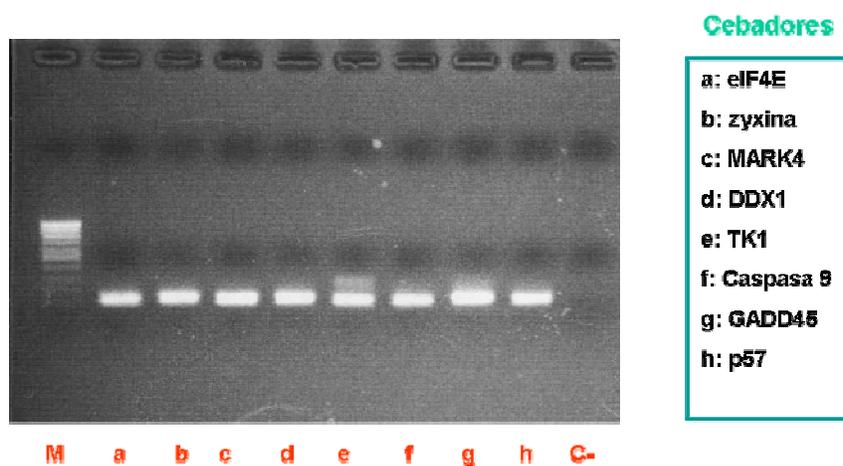


Tabla 2. Lista de cebadores de RT-PCR en tiempo real.

<u>Nombre del cebador</u>	<u>Secuencia 5'→3'</u>
<i>ZYX forward</i>	CAG AAT GTG GCT GTC AAC GA
<i>ZYX reverse</i>	GAA GCA GGC GAT GTG GAA C
<i>Caspasa 9 forward</i>	TGC GTG GTG GTC ATT CTC TC
<i>Caspasa 9 reverse</i>	CGA CAC AGG GCA TCC ATC
<i>CDKN1C forward</i>	CTG TCC GGG CCT CTG ATC T
<i>CDKN1C reverse</i>	GCG CTT GGA GAG GGA CAC
<i>p27/Kip1 forward</i>	TTG GTG GAC CCA AAG ACT GA
<i>p27/Kip1 reverse</i>	TGA TGT ATC GTC GGT TGC AG
<i>EIF4E forward</i>	AAA CAG CAG AGA CGA AGT GAC C
<i>EIF4E reverse</i>	CAG CGC CAC ATA CAT CAT CA
<i>GADD45G forward</i>	CTG CAT GAG TTG CTG CTG TC
<i>GADD45G reverse</i>	CCA GCA CAC AGA AGG TCA CA
<i>MARK4 forward</i>	CGA GCC AAG TTC CGA CAG AT
<i>MARK4 reverse</i>	GGC ATC CAG CAA GAG GTT CT

TK1 <i>forward</i>	TCG CTT CCA GAT TGC TCA GT
TK1 <i>reverse</i>	ATG GTG TTC CGG TCA TGT GT
GAPDH <i>forward</i>	GCT CCT CCT GTT CGA CAG TCA
GAPDH <i>reverse</i>	AAT CCG TTG ACT CCG ACC TTC
EWS-FLI1 tipo 1 (7-6) <i>forward</i>	GAT CCT ACA GCC AAG CTC CA
EWS-FLI1 tipo 1 (7-6) <i>reverse</i>	ATT GCC CCA AGC TCC TCT TC
TOPK <i>forward</i>	GAG AGT GGC TTT CAC AAT GGA
TOPK <i>reverse</i>	GGC CGG GAT ATT TAT AGT TGG A
IGF-1 <i>forward</i>	GGT GGA TGC TCT TCA GTT CGT
IGF-1 <i>reverse</i>	CCA CGA TGC CTG TCT GAG G
LSM1 <i>forward</i>	GCA CTT GGT TCT GCT TCG AG
LSM1 <i>reverse</i>	CCC ACA TGA ATA CGC TCC AC
BEX1-2 <i>forward</i>	CGT CAC TCG TGT CTC GCT AC
BEX1-2 <i>reverse</i>	ACC TGC AGA AGG GCT GGT
EWS-FLI1 tipo 3 (10-6) <i>forward</i>	GAG CGA GGT GGC TTC AAT AAG
EWS-FLI1 tipo 3 (10-6) <i>reverse</i>	CCC CAA GCT CCT CTT CTG AC

7. Hibridación genómica comparada (GCH Array).

Extracción de ADN genómico.

Aislamiento de ADN genómico mediante el kit comercial QIAamp DNA miniKit (Qiagen).

Se partió de una placa de cultivo celular con un grado de confluencia del 80-90%. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se lavó la placa con 7-8ml de PBS 1X. Se despegaron las células de la placa usando para ello un raspador (Sarstedt), se recogieron con un par de mililitros de PBS 1X o el correspondiente medio de cultivo y se pasaron a un tubo eppendorf de 1.5ml. Se centrifugó a 5 minutos a 300g a TA al igual que en el resto de centrifugaciones subsiguientes y se resuspendió el pellet celular en 200µl de PBS 1X. Se añadieron 4µl de RNasa A (100mg/ml) (Ambion) y se incubó 2 minutos a TA para eliminar posibles trazas de ARN presentes en la muestra. Seguidamente se añadieron 20µl de proteinasa K (Qiagen) y 200µl de tampón AL a la muestra mezclando bien por vortex durante 15 segundos (se evitó siempre añadir la proteinasa K sobre el tampón AL directamente) y se incubó a 56°C durante 10 minutos. El tampón AL se agitó previamente para evitar la formación de precipitados. Se centrifugó nuevamente a 300g durante 5 minutos. Se añadieron 200µl de etanol 96-100% (Merck) mezclándolo bien por vortex durante 15 segundos y dándole un spin. Se formó un precipitado blanco que se pasó junto al resto de la muestra a una columna del kit. Se centrifugó a 10,000rpm 3 minutos. El tubo colector junto al sobrenadante se desechó y se colocó la columna sobre uno nuevo añadiendo 500µl de tampón AW1, al que previamente se añadió etanol 96-100% (Merck) sobre la misma. Se centrifugó a 10.000rpm 2 minutos, se descartó nuevamente el tubo colector con el sobrenadante y se colocó sobre uno nuevo. 500µl de tampón AW2, al que previamente se añadió etanol 96-100% (Merck), fueron añadidos a la columna que se centrifugó posteriormente a 14,000rpm 3 minutos. Se sacó la columna con cuidado de no rozar el eluido ya que los restos de etanol podrían interferir en la extracción. La columna se colocó sobre un tubo eppendorf de un 2ml y se centrifugó de nuevo a 14,000rpm 1 minuto. Ya por último se colocó la columna sobre un eppendorf de 1.5ml y se pipetearon 200µl de tampón AE directamente sobre la membrana de la columna para eluir el ADN. Se dejó incubar 1 minuto a TA y se centrifugó a 8,000rpm 2 minutos. En aquellos casos en los que el número de células de partida era bajo se eluyó con sólo 100µl para incrementar la concentración de la muestra. Se midió la

concentración a 260nm y el grado de pureza (ratio 260/280) del ADN antes de ser guardado a a -20 o a -70°C así como se visualizó el estado del ADN cargando una pequeña cantidad de muestra del mismo, 1-2 µl, en un gel de agarosa (Laboratorios Conda) al 1% para tener una imagen concreta del estado del ADN indicándonos el grado de degradación del mismo en el caso de que así sucediera.

Marcaje del ADN.

Se partió de 500 ng de ADN, con una ratio de absorbancia 260/280 de al menos 1'70. Fue muy importante medir correctamente con el Nanodrop (Thermo Fisher) la concentración y el ratio 260/280 de la muestra de ADN que se pretendía marcar ya que con ratios 260/280 inferiores a 1'70 no se rindió marcaje en absoluto o bien fue muy débil y por otra parte concentraciones superiores a 1µg e inferiores a 0'1µg de ADN dieron lugar a excesivo ruido a la hora de analizar los datos. Para medir correctamente en el espectrofotómetro se realizó una dilución 1/20 para un total de 70µl en una cubeta de cuarzo. Con el Nanodrop (Thermo Fisher) bastó con 1,5µl. No se hizo necesario digerir el ADN con una enzima de restricción antes de proceder a marcarlo.

En cuanto a la configuración del marcaje el protocolo habitual de *CGH array* marca el ADN tumoral con Cy5 y el ADN de referencia (ADN sano preferiblemente un conjunto de ADN's de cuantos más individuos mejor, debido a la presencia natural de polimorfismos de número de copia-SNPs) con Cy3. Ello se debe a que el *software GenePix* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU) genera una señal de salida (*output*) de ratio Cy5/Cy3 de modo que marcando de este modo se obtiene directamente la relación tumor/referencia. Sin embargo otros protocolos como el del Instituto Sanger (Hixton, Reino Unido) marcan de modo inverso (ADN sano con Cy3 y ADN tumoral con Cy5). Dado que la eficiencia de incorporación es mayor en el caso del Cy3 (se incorporan más nucleótidos marcados de Cy3 que de Cy5) es más lógico hacerlo de este modo ya que el ADN tumoral suele ser limitante en cantidad y calidad. Así, para una cantidad menor de ADN de partida conseguiremos una mayor señal de fluorescencia si marcamos con Cy3. De este modo hay que multiplicar por -1 el *output* en log2 que nos da el *GenePix* (Molecular Devices) o bien seleccionar en el análisis el ratio inverso (Cy3/Cy5). El ADN de referencia constaba de un pool equimolar de 40 individuos sanos (obtenido gracias al Banco Nacional de ADN, Salamanca).

La mezcla de marcaje constaba de:

Agua	21 – x μ l
ADN (volumen correspondiente a 500ng)	x μ l
NaCl 1M	1 μ l
Solución 2'5X Cebadores al azar	20 μ l

Volumen final de 52 μ l por tubo de 0,2ml. La solución de cebadores al azar 2,5X (Thermo) está formada por oligonucleótidos de 8 pares de base con secuencia al azar:

125 mM Tris pH 6.8 (Sigma)

12'5 mM MgCl₂ (Merck)

25 mM β -mercaptoetanol (Sigma)

Los cebadores al azar liofilizados (Thermo) se resuspendieron en el volumen adecuado de tampón de reacción para alcanzar una concentración de 0,75 μ g/ μ l.

Dilución 4 veces del tampón de reacción 10X de la enzima Exo-Minus Klenow (Eppicentre, Madison, WI, EEUU), filtrado con filtro *millipore* de 0,22 μ m (Millipore, Bedford, MA, EEUU) y esterilización mediante radiación UV durante 1 hora en una campana de flujo laminar (Telstar)

Tras mezclar por pipeteo se llevaron los tubos al termociclador (BioRad). Solución NaCl 1M dado que los fluorocromos Cy tienen más cargas eléctricas que la biotina y la adición de NaCl mejora ligeramente el marcaje al estabilizar estas cargas extra.

Protocolo de marcaje en el termociclador (BioRad):

Primer paso: 1 ciclo de 5 minutos a 99°C y 2 minutos a 4°C.

Segundo paso: 17 ciclos de 60 minutos a 37°C.

Tercer paso: ∞ a 4°C.

Se incubó la reacción de marcaje en un baño (cuidado con la evaporación y condensación en la tapa) (Julabo) o en un cazo sobre un termoagitador (VWR) (desnaturalización).

Tras la desnaturalización a 99°C, se paró el programa a 4°C, se retiraron los tubos del termociclador (BioRad) y se añadieron a cada tubo:

Solución 10X dCTPmix	5µl
dCTP-Cy3 o dCTP-Cy5	2µl
enzima Exo Minus Klenow	1µl

Exo-Minus Klenow ADN polimerasa – fragmento klenow de la enzima polimerasa I de *E. coli* mutada de modo que carece de ambas actividades exonucleasas (tanto la 5'→3' como la 3'→5') lo cual mejora la eficiencia de marcaje. Producida de forma recombinante (Eppicentre).

Solución 10X dCTP Mix: Mezcla de nucleótidos en la que cada nucleótido trifosfato está a una concentración de 2mM salvo el dCTP que está a 1mM en Tris-EDTA (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA). En solución Tris-EDTA para mejorar su estabilidad. La concentración de dCTP se completa al añadir la solución de dCTP-Cy3/5. La finalidad de rebajar la concentración de dCTP en el mix es aumentar la probabilidad de que la enzima incorpore el dCTP unido al fluorocromo.

dCTP-Cy3/dCTP-Cy5: solución del nucleótido dCTP unido covalentemente a los fluorocromos Cy3 o Cy5 a una concentración de 1mM (25µl por vial).

Se mezcló por pipeteo suave manteniendo los tubos en hielo, se dió un spin y se colocaron de nuevo los tubos en el termociclador (BioRad) reanudando el programa. Incubación *overnight*. Aunque el protocolo original describe una incubación de 2 horas, los tiempos de incubación más largos mejoraron notablemente el rendimiento de la reacción (tiempos de entre 12-16 horas deberían originar un producto similar).

Tras el período de incubación se añadieron 5µl del tampón de parada por tubo que detendrá la reacción enzimática. El tampón de parada es una solución de EDTA 0,5M pH 8'0 que sirve para detener la reacción enzimática de marcaje y prolonga la unión del fluorocromo al ADN, esto es especialmente útil en caso de que el ADN marcado no se vaya a hibridar hasta pasado un tiempo pero interfiere en la precipitación con AcNa y Etanol (Merck).

Purificación del ADN marcado.

Se usaron columnas de purificación Illustra G-50 *Microspin Columns* (Amersham) en las que la resina sephadex de las mismas se encarga de retener las pequeñas moléculas de nucleótidos no incorporados y el exceso de cebadores mientras que el ADN es capaz de atravesar la resina sin quedar retenido. Vórtex previo a las columnas antes de que se colocaran en los tubos colectores. Centrifugación a 3000rpm durante 1 minuto para eliminar el tampón de equilibrado de la columna. Se descartó el tubo colector y con cuidado de no alterar la disposición de la columna de resina se colocó la columna en un microtubo *Safe-Lock* ámbar de 1'5ml (Eppendorf). Estos microtubos de 1,5ml de color oscuro protegen el fluorocromo de la luz ya que tanto los fluorocromos (dCTPCy3/Cy5) como el ADN marcado no deben estar expuestos a la luz más que durante los cortos intervalos necesarios. El ADN una vez marcado conserva la fluorescencia (disminuyendo en intensidad conforme al tiempo) durante unos meses (3-5) si se mantiene a -20°C. Se añadieron los 55µl de la reacción de marcaje al centro de columna para que la resina tuviera tiempo de absorber el volumen. Centrifugación durante 2 minutos a 3000rpm. Se desechó la columna y se recogió el eluido con el ADN marcado purificado.

Evaluación de la reacción de marcaje.

Paso opcional para comprobar el rendimiento de la reacción de marcaje. Se midió en el Nanodrop (Thermo Fisher) en las longitudes de onda siguientes: 260, 320, 550 ó 650 (Cy3 / Cy5 respectivamente), 650 ó 750nm (Cy3 / Cy5 respectivamente). El resultado esperado, sin diluir el producto de marcaje, fue de A260 en torno a 3.0, A650 en torno a 2.2 y A550 en torno a 2.0. Se llevó a cabo un barrido desde 200 a 800nm para las muestras marcadas con Cy5 y desde 200 a 700nm para las muestras marcadas con Cy3 para leer la absorbancia en todo ese rango de longitudes de onda. Se imprimió una gráfica con el resultado, idealmente debían encontrarse dos picos de absorbancia en la gráfica: uno a 260nm debido a la absorbancia del ADN y otro a 550/650nm (Cy3/Cy5 respectivamente) correspondiente al pico de absorbancia del fluorocromo incorporado al ADN, otro tipo de perfil supone un fallo en el proceso de marcaje.

De acuerdo a las siguientes fórmulas se calcularon:

Cantidad de ADN. La reacción de marcaje amplifica hasta por 3 la cantidad de ADN de inicio.

Cantidad de ADN (en μg) = $(\text{Abs}260 - \text{Abs}320) \times 50 \times 0.07$ (volumen de elución en ml)

Cantidad de dCTP-Cy3 incorporado en pico moles

pmoles de Cy3 = $(\text{Abs}550 - \text{Abs}650) / 0.15 \times 70$ (volumen de elución en μl)

Cantidad de dCTP-Cy5 incorporado en pico moles

pmoles de Cy5 = $(\text{Abs}650 - \text{Abs}750) / 0.25 \times 70$ (volumen de elución en μl)

Eficiencia de incorporación de los nucleótidos unidos a fluorocromo, expresado como número de nucleótidos no marcados incorporados por cada nucleótido marcado incorporado.

Cy3: $(\text{Abs}260 \times 150000) / (\text{Abs}550 \times 6600)$

Cy5: $(\text{Abs}260 \times 250000) / (\text{Abs}550 \times 6600)$

Normalmente el valor para Cy3 debió ser de 25 – 35 y el de Cy5 de 40 – 50. Valores distantes de los reseñados indicaron que el marcaje no había sido correcto.

Se ajustó el volumen a añadir en la mezcla de hibridación de cada uno de los ADN's marcados para igualar los pmoles de Cy3 y Cy5 y equilibrar en lo posible la intensidad de señal de ambos fluorocromos. En la fase de análisis de los datos realizamos una normalización de los puntos del array usando el software *GenePix* (Molecular Devices), esto es dividiendo el valor de cada spot del array por la media o mediana de todo el *array*, haciendo que la señal Cy3/Cy5 sea igual a 1 para todos los spots. Se resolvió en un gel de agarosa (Laboratorios Conda) al 1% 3 μl del producto marcado. El rango de tamaño de bandas observado abarcó desde los 100pb hasta las 10kb.

Hibridación manual CGH array para portas Codelink.

Pre-espoteo.

Se usaron portas *Codelink* (Amersham). Se acopló la placa de filtro *Multiscreen* HTS de 96 pocillos (Millipore) sobre una placa colectora *Microtest* de 96 pocillos (Falcon, BD). Se prehumedeció la

placa de filtrado *millipore* de 96 pocillos añadiendo 100µl de agua milliQ estéril a cada pocillo y centrifugando 10 minutos a 1500rpm a 4°C. Se descartó la placa colectora y se colocó la placa de filtro sobre una nueva placa colectora. Se mezclaron los productos *aminolinking* PCR DOP1, *aminolinking* PCR DOP2 y *aminolinking* PCR DOP3 y se añadieron sobre la placa de filtro (Millipore). A los aproximadamente 120µl de mezcla de PCRs se añadieron 30µl de la solución de espoteo 5X – 0,005% Sarcosil (Sigma) (PBS 1M pH 8,5 con sarcosil 0'005%, el pH de la solución es fundamental para una fijación óptima del ADN a la superficie del porta *Codelink* (Amersham). Se centrifugó la placa de filtro junto a la placa colectora a 1500rpm durante 10 minutos a 4°C. Se guardó la placa colectora con la mezcla de PCRs ya filtrada a -20°C lista para ser ya espoteada.

Espoteo.

Se llevó a cabo en un espoteador *MicroGrid II* (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, EEUU) en un ambiente de humedad relativa del 45 - 50% en triplicados adyacentes.

Post-espoteo y tratamiento del porta.

Se mantuvieron los portas espoteados en una atmósfera saturada al 75% durante 20 - 24 horas en un recipiente hermético con un fondo de agua y un depósito de 1cm de alto de sal. En el interior de se introdujo una gradilla sobre la que se colocaron los portas protegidos por dos tapas de racks de puntas pequeñas, cada uno de los cuales contenía 4 portas *Codelink* (Amersham) colocados boca arriba. Con un lápiz de diamante se delimitaron los límites del área de espoteo con cuidado de no invadirla en ningún momento. Una vez pasado ese tiempo se retiraron los portas del recipiente tratando de evitar que se pudieran secar y se mantuvieron 30 minutos en el baño (Julabo) a 50°C con la solución de bloqueo precalentada en una cubeta de vidrio con cestillo. La solución de bloqueo se precalentó a 50°C al menos 40 minutos.

Solución de bloqueo post-espoteo (1000ml):

Trizma base 6,06g (Sigma)

Trizma HCL 7,88g (Sigma)

Etanolamina 3ml (Sigma)

Agua milliQ completar hasta 1000ml

Se ajustó el pH 9.0 y se filtró.

Se lavó dos veces con agua destilada cambiando la solución de la cubeta. Se añadió la solución de lavado, SSC 4X- SDS 0,1% precalentada a 50°C a la cubeta de vidrio (Afora, Barcelona, España) con los portas hasta cubrirlos por entero. Se agitaron las cubetas por espacio de 30 minutos a 100rpm. Se lavó con agua destilada, los portas se pasaron a un cestillo de polipropileno (Afora) y se mantuvieron 2 minutos a 100°C con el fin de desnaturalizar las dobles hebras unidas al porta quedándonos así con cadenas de hebra sencilla, mucho mejores para la reacción de hibridación. Nuevo lavado con agua destilada.

Se colocó cada porta en un tubo falcon de 50ml y se centrifugó 5 minutos a 1500rpm a TA. Finalmente los portas fueron guardados en presencia de desecante hasta el momento de la hibridación.

Solución de lavado post-espoteo (para 250ml):

50ml SSC 20X (Sigma)

2,5ml SDS 10%

197,5ml H₂O milliQ limpia.

pH ajustado a 7.

Antes de hibridar se aplicó la solución de *rubber cement* (Talens, Apeldoorn, Holanda). Se dispensó el *rubber cement* (Talens) con jeringa de 5ml y puntas de 200µl alrededor del área marcada evitando la formación de burbujas y la invasión del área de espoteo. Una vez seco el primer anillo se depositaron sucesivos anillos sobre el mismo hasta conseguir una barrera suficientemente elevada (2-3mm). Se dejó secar al menos 10 minutos antes de añadir la solución de prehibridación.

Precipitación del ADN marcado y resuspensión en solución de hibridación.

Se calentó el volumen de espermatozoides de salmón en el termobloque (VWR) a 70°C durante 5 minutos.

Se prepararon dos mezclas por cada hibridación.

Tubo 1: misma cantidad de marcaje (pmoles de fluorocromo) del ADN tumoral y de referencia marcados junto a 100µl de Cot-1 Human DNA 1 µg/µl (Roche)
(mezcla de hibridación).

Tubo 2: 80µl de esperma de salmón (Sigma) + 100µl de Cot-1 Human DNA 1 µg/µl (Roche)
(mezcla de prehibridación).

Se añadió 1/10 del volumen de NaAc 3M pH 5,2 (Merck) mezclando. Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (Merck) y se mezcló por inversión lentamente para que no se formara precipitado alguno. Se mantuvo en hielo seco durante 30 minutos. Se centrifugó a 13200 rpm, 20 minutos, 4°C. Se descartó el sobrenadante con pipeta, se añadieron 500µl etanol 70% frío (Merck). Centrifugación a 13200rpm 5 minutos. Se descartó el sobrenadante con ayuda de una pipeta con cuidado de no arrastrar el pellet. Se dejó secar en oscuridad 5 - 10 minutos. Pre calentamos el volumen a utilizar de la solución de hibridación a 70°C en el termobloque (VWR). Se resuspendió en dos tubos:

Tubo 1: 60-100µl solución de hibridación (Dependiendo del tamaño del área de espoteo) + 6µl de *yeast t-RNA* (Invitrogen).

Tubo 2: 160µl de solución de hibridación.

Ambos tubos se calentaron en el termobloque (VWR) a 70°C, 15 minutos. Tras un par de minutos se agitó con fuerza el tubo 1 hasta resuspender por completo el pellet. Se dio un pulso al tubo 1 y tras ello se incubó en el baño (Julabo) a 37°C, 1 hora 30 minutos, tiempo durante el cual el Cot (Roche) hibridó con los ADNs marcados neutralizando el ADN repetitivo que contuvieran.

Prehibridación.

Se dió un pulso al tubo 2 y tras ello se aplicó el volumen al porta dentro del anillo de *rubber cement* (Talens) evitando la formación de burbujas. Se introdujo el porta en la cámara de hibridación sellando el cierre con *parafilm* (Alcan, Neenah, WI, EEUU). Siempre se mantuvo la cámara en horizontal para que la solución de prehibridación no pudiera desbordar el anillo de *rubber cement* (Talens). Se llevó a la estufa (Memmert) en la que se mantuvo en agitación rotatoria (ángulo de 12°) 1 hora 30 minutos a 42°C a una velocidad de 6rpm.

Hibridación.

A continuación se preparó la cámara de hibridación. Se introdujo en el cartucho de portas (*slide mailer* con capacidad para 5 portas) 2 recortes de papel *Whatman* (Biometra) del tamaño de un porta: uno en la bandeja superior y otro en la inferior. Se utilizó un cartucho para cada hibridación (no más de un porta por cartucho). Se empapó cada papel con 750µl de solución humidificadora SSC 2X (Sigma)- 20 % Formamida (Merck) y se eliminó el volumen restante de solución no absorbida por el papel.

El primer paso de la hibridación consistió en sacar de la estufa (Memmert) el cartucho de hibridación con la mezcla de prehibridación. Así mismo se sacó del baño (Julabo) el tubo 1 y se dió un pulso. Del cartucho de hibridación se extrajo el porta que se inclinó para llevar la mezcla de prehibridación a una esquina del anillo y retirarla desde allí. Se aplicó la mezcla de hibridación al porta dentro del anillo de *rubber cement* (Talens) sin formar burbujas. Se trabajó lo más rápidamente posible para evitar la evaporación de la sonda y la pérdida de fluorescencia por la luz. Se distribuyó la mezcla de hibridación por toda la superficie delimitada por el anillo de *rubber cement* (Talens) de forma homogénea. Se colocó nuevamente el porta en la cámara de hibridación, se selló el cierre con *parafilm* (Alcan) y se protegió de la luz cubriendo la cámara con papel de aluminio. 48 horas de incubación en la estufa (Memmert) a 42°C con un ligero balanceo de 6rpm sin llegar a perder nunca la horizontalidad para que la solución de hibridación no desbordara el anillo de *rubber cement* (Talens).

Solución de hibridación (para 15ml):

Formamida	7,5ml	(Formamida 50%, Merck)
Dextrán Sulfato	1,5gr	(Dextrán sulfato 10%, Sigma)
Tween 20	15µl	(Tween 20 0,1%, Sigma)
SSC 20x	1,5ml	(SSC 2X, Sigma)
Tris 1M pH 7,5	150µl	(10 mM Tris pH 7,4)

Lavados del porta hibridado.

Se precalentó la solución de lavado 1 a 42°C en el baño (Julabo) al menos 30 minutos. Se sacó el cartucho de hibridación de la estufa (Memmert) y el porta del cartucho.

Solución de lavado 1 (para 130ml):

Formamida	65ml	(Formamida 50%, Merck)
SSC 20X	13ml	(SSC 2X, Sigma)
H ₂ O milliQ	52ml	

pH ajustado a 7.

Se trabajó lo más rápido posible para minimizar la pérdida de fluorescencia por la presencia de luz. Se retiró la solución de hibridación del porta así como el anillo de *rubber cement* (Talens) con cuidado con la ayuda de unas pinzas. Se evitó la presencia de restos de *rubber cement* (Talens) en el porta ya que con los lavados pueden extenderse por el área de espoteo manchándola.

Solución de lavado 2:

PBS 1X	350ml
Tween 20	350µl (Tween 20 0,1%, Sigma)

Se pasó el porta a un falcon de 50ml recubierto de papel de aluminio con la solución de lavado 2. Se recubrió el cierre de la tapa de la cubeta de tinción (Afora) con *parafilm* (Alcan) sumergiendo el porta en la solución de lavado 2, se cubrió con papel de aluminio y se aseguró el cierre con cinta aislante. 10 minutos en agitación a 250rpm. Se sacó el porta de la cubeta, se reemplazó la solución de lavado 2 por solución de lavado 1 precalentada (cubeta enjuagada y secada con agua antes) y se sumergió el porta de nuevo, cambiando el *parafilm* (Alcan) de la tapa y cubriendo con papel de aluminio. 30 minutos de agitación dentro de la estufa (Memmert) a 42°C a alta velocidad. Se sacó de nuevo el porta de la cubeta sustituyendo la solución de lavado 1 por solución de lavado 2 (enjuagar con agua y secar antes), se sumergió el porta, se cambió el *parafilm* (Alcan) de la tapa y se cubrió con papel de aluminio dejando 10 minutos en agitación a 250rpm. Centrifugación a 1500rpm 5 minutos a TA. El porta bien se escaneó o cuando no fue posible en ese

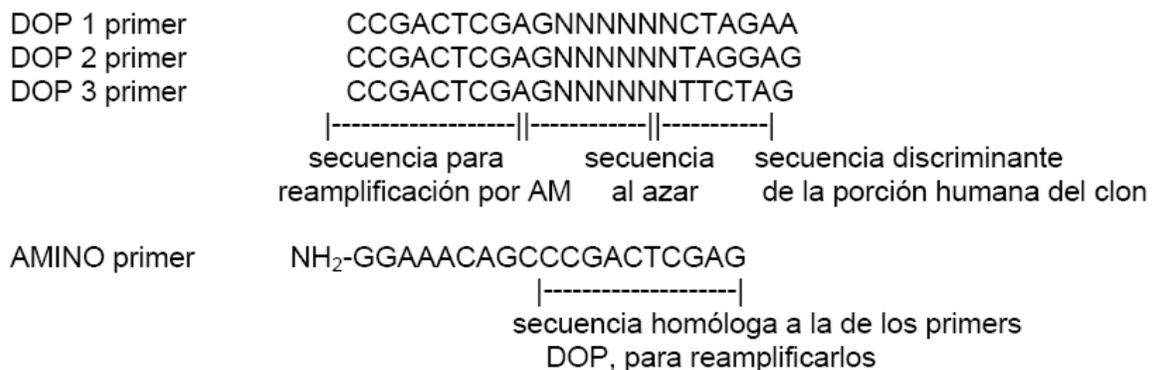
momento se almacenó en un falcon de 50ml con papel en el fondo y recubierto de papel de aluminio para protegerlo de la luz hasta el momento del escaneo.

DOP-PCR y Aminolinking PCR para CGH array sobre portas Codelink.

El objetivo fue el de contar con una representación de la secuencia humana contenida en los clones BAC, extraídos previamente mediante *miniprep*. Los clones fueron amplificados por PCR mediante oligonucleótidos con secuencia al azar (DOP-PCR, *degenerated oligo-primed PCR*, Thermo) y posteriormente se reamplificó este primer producto por *Aminolinking PCR*. En esta segunda amplificación se añadió además un extremo amino en 5' a todos los productos amplificados lo que les permitió anclarse a los portas *Codelink* (Amersham) en el paso de espoteo.

Figura 8. Esquema de la constitución de los cebadores DOP.

Secuencia de primers DOP:



DOP-PCR.

Partimos de ADN extraído de los cultivos de BACs o PACs. Trabajando con ADN extraído de forma manual para la amplificación por DOP-PCR fue suficiente 1µl de los 50µl finales que se consiguen con dicho protocolo. Igualmente en caso de partir de ADN extraído por biorrobot también fue suficiente con 1µl. Los cebadores DOP tienen distintas temperaturas de *melting* por lo

que la temperatura de anillamiento del programa de ciclos de PCR varía de unos a otros: DOP1 y DOP3 amplificaron de forma óptima con una temperatura de anillamiento de 60°C mientras que DOP2 lo hace con una de 62°C.

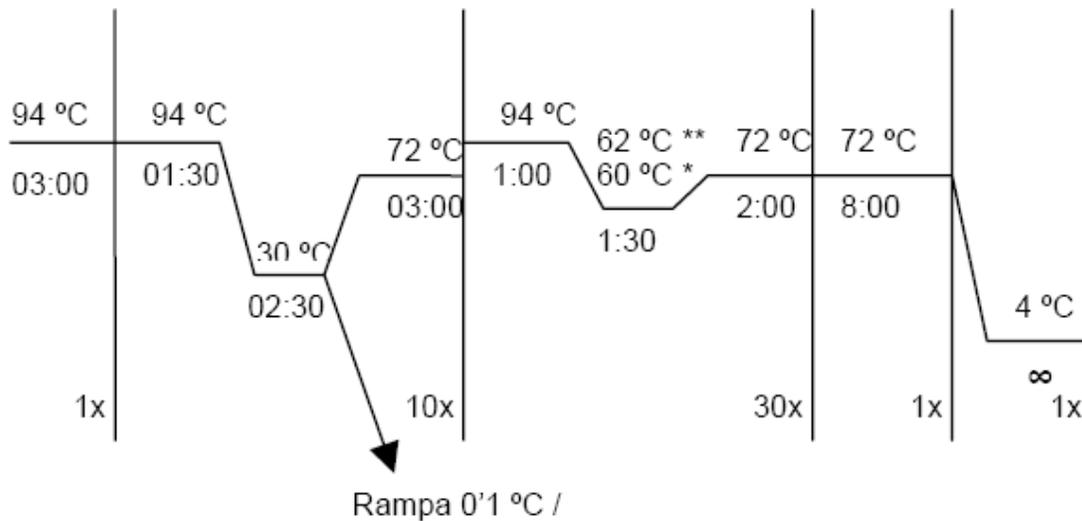
Se dispensó en una placa de 96 pocillos *Axygen* (Bonsai Technologies, Alcobendas, España) los ADNs de cada *miniprep* de BAC que se quería amplificar. Se preparó una mezcla de reacción añadiendo todos los reactivos salvo la enzima Taq polimerasa (Promega) que se añadió en última instancia.

Volumen para una reacción:

ADN DOP-PCR	2µl
Tampón de <i>Aminolinking</i>	5µl
Cebador de <i>Aminolinking</i> 20µM	4,16µl
dNTP's (10mM cada) (Eppendorf)	1,25µl
Taq Polimerasa (Promega)	0,5µl
H ₂ O (milliQ autoclavada)	37,09µl

Se dispensaron los 23,5µl de la mezcla de reacción por pocillo y se encajó la tapa selladora de placas de 96 *Axygen* (Bonsai Technologies) sobre la placa de PCR con el fin de evitar cualquier pérdida del contenido por evaporación. Una vez rotulada la placa de 96 con la clase de DOP-PCR en cuestión y el tipo de muestra se le dio un breve pulso de centrifuga. Se llevó luego la placa al termociclador (BioRad)

El programa del termociclador (BioRad) fue el siguiente:



Se hicieron dos programas de PCR: uno para PCRs con los primers DOP1 y DOP3, otro para PCRs con DOP2 (la única variación será la temperatura de anillamiento del segundo ciclo de amplificación). Una vez finalizada la PCR se corrió una porción de la DOP-PCR en un gel de agarosa al 1% para evaluar el resultado. Se reemplazó la tapa selladora de la placa de DOP-PCR por una tapa de plástico. Las tapas selladoras se lavaron con agua y se dejaron secar en la estufa (Memmert). Se cargaron 4µl de cada DOP-PCR en el gel. El aspecto de la DOP-PCR fue el de un conjunto de bandas de entre 2kb y 200 pb. Las placas de DOP-PCR se conservaron con las tapas de plástico, en el congelador a -20°C.

Aminolinking PCR.

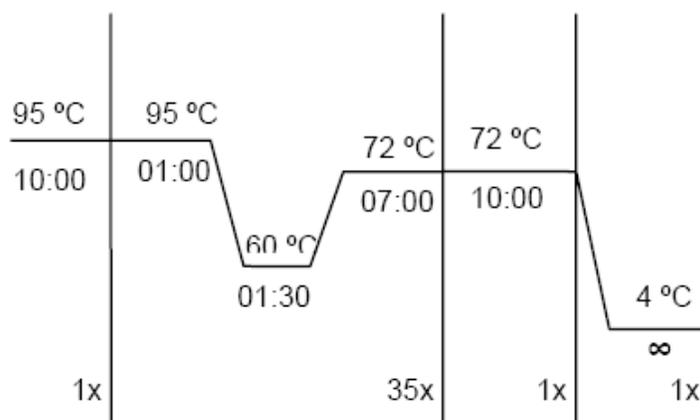
El modo de trabajo es idéntico al de la DOP-PCR aunque varían los reactivos y los ciclos de PCR. En la *Aminolinking-PCR* partimos de 2µl del producto de DOP-PCR para su reamplificación con un volumen total de reacción ahora de 50µl. Se realizó *aminolinkig* PCR para cada placa de DOP-PCR, *Aminolinking* de la DOP1 – PCR, de la DOP2-PCR y de la DOP3-PCR por separado. Se dispensó en una placa de 96 pocillos 2µl del producto de la DOP-PCR en cada pocillo. Se preparó la mezcla de reacción añadiendo en último lugar la enzima Taq polimerasa (Promega).

Volumen de reacción para un pocillo

ADN DOP-PCR	2 μ l
Tampón de <i>Aminolinking</i>	5 μ l
Cebador de <i>Aminolinking</i> 20 μ M	4,16 μ l
dNTP's (10mM cada) (Eppendorf)	1,25 μ l
Enzima Taq Polimerasa (Promega)	0,5 μ l
H ₂ O (milliQ autoclavada)	37,09 μ l

48 μ l de mezcla de reacción en cada pocillo de la placa de 96 *Axygen* (Bonsai Technologies). Se selló a continuación la placa de PCR asegurándose que todos los pocillos quedaran bien cubiertos para evitar perder parte del contenido por evaporación y se rotuló cada una adecuadamente (*AMINOLINKING-DOP1*, *AM-DOP2* ó *AM-DOP3*). Se le dio un pulso de centrifuga a las placas y se llevaron al termociclador (BioRad).

El programa del termociclador (BioRad) de la *AMINOLINKING-PCR* fue el siguiente:



Tras la PCR se comprobó que había salido bien cargando 3 μ l de la DOP-PCR en un gel de agarosa (Laboratorios Conda). Debió aparecer un patrón de bandas semejante al obtenido tras correr la DOP-PCR ya que la *aminolinking* PCR es tan solo una amplificación de los productos de la

DOP-PCR. Finalmente se guardaron las placas en el congelador a -20 °C hasta el momento de procesarlas para el espoteo.

En cada placa amplificada se dejó un pocillo sin añadir ADN de BAC, al que se añadió mezcla de reacción como al resto de pocillos y que se sirvió de control negativo.

Tampón TAPS, para 100ml:

6,08g de TAPS (N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-amino-proanesulphonic acid) (Sigma)

2,20g de Sulfato Amónico (Sigma)

60ml de agua milliQ

2,5ml de MgCl₂ 1M (Merck)

Se ajustó el pH a 9'3 con una solución de KOH 2M. Filtrado con filtro de 0'22µm (Millipore). Esterilización con luz UV 1 hora. Al buffer TAPS se le añadió BSA (Sigma) y β-mercaptoetanol (Sigma) antes de hacer la DOP-PCR de acuerdo a la siguiente relación:

480µl de Solución TAPS + 16'5µl de BSA 5% + 3,5µl de β-mercaptoetanol

Solución W-1 1%:

0'25g de W-1 o Brij58 (*Polyethylene glycol hexadecyl ether*, Sigma) en 25ml de agua milliQ.

Filtrado con filtro de 0'22µm (Millipore) y esterilizado con UV en campana (Telstar) 30 minutos.

Tampón de AMINOLINKING, para 10 ml:

Tris-HCl 1M pH 8'5 0,5ml (50 mM en la solución final)

MgCl₂ 1M 0'25ml (25 mM en la solución final; Merck)

KCl 3M 1'67ml (500 mM en la solución final; Merck)

Agua milliQ autoclavada 7'58ml

Filtrado con filtro de 0'22µm (Millipore). Esterilización con UV durante 30 minutos.

Cebadores DOP y cebador de Aminolinking (Metabion).

Cebadores purificados por HPLC. El cebador de *Aminolinking* se pidió aminomarcado en 5' en el carbono C6. Los cebadores una vez recibidos liofilizados se resuspendieron en agua milliQ a una

concentración de 100pmoles/ μ l (100 μ M). A partir de este vial stock se crearon alícuotas de 20 μ M que fueron las usadas en el experimento.

dNTP's (Eppendorf).

Mezcla de dNTP's a una concentración de 10mM cada dNTP.

Amplitaq DNA Taq Polimerasa (Applied Biosystems).

8. Técnicas de análisis de la expresión génica.

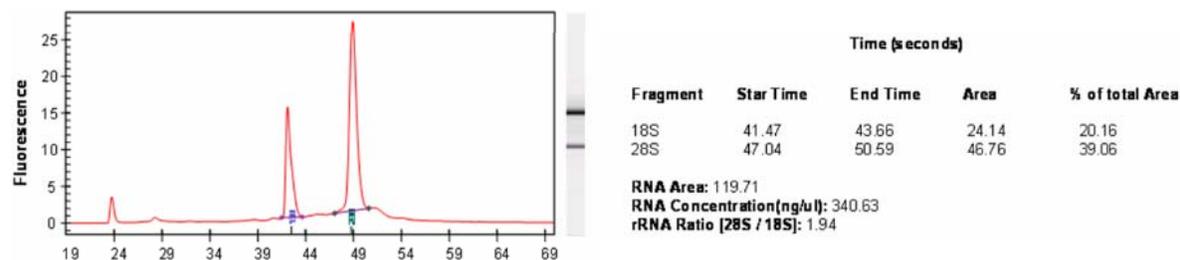
Microarrays de ARN.

Medida de la concentración y calidad del ARN.

Se usó ARN extraído y purificado con el kit *RNeasy mini* (Qiagen). La evaluación de la integridad y calidad del ARN fue un paso fundamental previo en el análisis de la expresión génica. Se utilizó el sistema de *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent, Palo Alto, CA, EEUU), para medir la concentración y al mismo tiempo valorar la calidad del ARN, con el kit *RNA 6000 Nano LabChip* (Agilent) con el que se pueden medir hasta 12 muestras (1µl por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250ng/µl.

Para cada muestra el bioanalizador calculó automáticamente la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1, siendo este parámetro utilizado como indicador de la calidad de la muestra. Un ratio distinto al mencionado indicó degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma pudiendo llegar a desaparecer las bandas si el ARN estaba degradado totalmente. Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 28S y la fracción 18S ha de ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN.

Figura 9. Cuantificación de ARN y determinación de su calidad.



Síntesis de ADNc a partir del ARN total.

Se partió de 5µg de ARN total para todas las muestras. Se utilizó el kit *One Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU).

Síntesis de la primera hebra de ADNc.

Se mezcló en un tubo eppendorf el ARN de cada muestra y el primer T7-(dT). Se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se enfrió la reacción en hielo durante 2 minutos y se añadieron el tampón de síntesis de la primera hebra de ADNc 5X, el DTT (0,1M) y la mezcla de dNTPs (10mM). Se incubó todo a 42°C durante 2 minutos y por último se añadió 1.5µl de la enzima *SuperScript II RT*. Se mezcló todo y se dejó 1 hora a 42°C.

Síntesis de la segunda hebra de ADNc.

Se enfrió la reacción y se añadieron:

H₂O DEPC, el tampón de síntesis de la segunda hebra de ADNc 5X, la mezcla de dNTPs (10mM), la enzima ADN ligasa (10U/µl), la enzima ADN polimerasa I (10U/µl), y la enzima ARNasa H. Se mezcló todo bien y se incubó a 16°C durante 2 horas. Se añadieron 2µl (10U/µl) de la enzima T4 ADN polimerasa con 5 minutos más de incubación a 16°C. Finalmente se adicionaron 10µl de EDTA 0,5M.

Purificación de la doble hebra de ADNc.

Se realizó a temperatura ambiente. Purificación mediante una extracción con Fenol/Cloroformo (*PLG -Phase Lock Gels*, Eppendorf). El PLG formó una barrera inerte entre las fases acuosa y orgánica. A este gel, en alícuotas de 1,5ml, se añadieron la muestra y el fenol/cloroformo. El mismo volumen de muestra que se tenía de ADNc se añadió de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó el tubo de PLG a 13.000g durante 20-30segundos, para precipitar el gel. Se transfirió todo el volumen a otro tubo de PLG y se centrifugó a 13.000g durante 2 minutos (no se

dió vórtex ya que el gel no debía llegar a ser parte de la suspensión). Se pasó la fase acuosa con el ADN a un tubo nuevo de 1,5ml.

Precipitación del ADN con etanol.

Se añadieron 0,5 volúmenes de NH₄AC 7,5M (Sigma) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (Merck) frío a la muestra y se mezcló. Centrifugación a 13.000g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 0,5μl de etanol frío al 80% (Merck). Nueva centrifugación a 13.000g durante 5 minutos a TA. Se dejó secar el ADN y una vez seco se resuspendió en 12μl de agua DEPC (Ambion). Se comprobó la síntesis del ADNc en un gel de agarosa (Laboratorios Conda) disolviendo 0,8g en 50ml de TBE (Tris base 0,004 M, ácido bórico 0,001 M; EDTA 0,5 M; pH 8) con BrEt (0,5 mg/mL) para un gel al 1,6%.

Síntesis de ARNc marcado con biotina. Purificación y fragmentación.

Una vez sintetizado el ADNc de doble cadena, se realizó una transcripción *in vitro* (IVT) y marcado fluorescente mediante el kit *BioArray RNA labeling* (Enzo, Farmingdale, NY, EEUU). El resultado final fue una amplificación lineal (entre 40-80 veces) del ARN.

IVT.

Se juntaron el ADNc con el tampón de reacción HY10X, la mezcla 10X de ribonucleótidos marcados con biotina, el DTT 10X, el inhibidor de ARNasa 10X y la enzima 20X T7 ARN polimerasa. Se incubó a 37°C en un baño (Julabo) durante 5 horas, mezclando cada 45 minutos. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se siguió con el proceso de purificación como se ha descrito.

Cuantificación del ARNc.

La concentración del ARNc se determinó midiendo la absorbancia a 260nm (A_{260}) en un Nanodrop (Termo Fisher). Hay que tener en cuenta que la absorbancia de una unidad a 260nm se corresponde con 40 μ g de ARN por ml.

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = 40 \times A_{260} \times \text{factor de dilución.}$$

La relación entre los valores A_{260}/A_{280} debió ser aproximadamente 2. Los rangos entre 1,65 – 2,2 también se consideraron aceptables para disponer de un ARN de buena calidad. Se comprobó este ARNc en un gel de agarosa al 1% (Laboratorios Conda).

Fragmentación del ARNc.

Posteriormente tuvo lugar la fragmentación de 25 μ g de ARNc a 95°C con MgCl_2 a 10mM. En dicho proceso se obtuvieron fragmentos de ARNc de entre 35 y 200 pares de bases, óptimos para la correcta hibridación en los chips. Affymetrix recomienda que el ARN utilizado en la fragmentación estuviera lo suficientemente concentrado (como mínimo una concentración de 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para mantener un volumen pequeño durante este proceso.

Se añadieron 2 μl del tampón de fragmentación 5X (200mM Tris-acetate pH 8,1, 500mM KOAc, 150mM MgOAc) por cada 8 μl de ARNc. Se incubó a 94°C durante 35 minutos enfriando en hielo tras la incubación. Se guardó una alícuota con al menos 1 μg del ARNc fragmentado para correr en un gel de agarosa (Laboratorios Conda).

Hibridación, tinción y lavado de los arrays de Affymetrix®:

Test3 y HG-U133A.

Se hibridaron 15 μg del ARNc fragmentado de cada muestra, junto con los controles internos de la transcripción, hibridación y marcaje en el array de Affymetrix durante 16horas a 45°C con rotación constante a 0,4g. Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina

(SAPE) (10µg/µl) y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados (3µg/µl). Tras las tinciones y lavados, estos chips fueron escaneados con un *Agilent GeneArray Scanner* Versión G2.500^a (Agilent). Cada chip fue escaneado dos veces, durante 5 minutos cada vez y el resultado se comprobó con el programa *Microarray Suite 5.0* (MAS 5.0, Affymetrix), con el que también se realizaron los análisis de las intensidades absolutas de cada sonda.

Test 3.

Antes de la hibridación de los chips humanos (HG-U133A) se hibridaron los test que proporcionaron información sobre el estado del ARNc fragmentado de cada muestra. Los chips comerciales tipo Test3 contienen únicamente genes control, necesarios para numerosos procesos celulares en un amplio rango de tipos celulares y tejidos, y cuya expresión no depende del estado de desarrollo, físico o patológico de la célula, como GAPDH y otros genes que no pertenecen al organismo en estudio.

GeneChip Human Genome-U133A (HG-U133A).

El protocolo de hibridación del HG-U133A es igual al de hibridación del Test3. Se emplearon los 15µg de ARN usados en la hibridación del Test3.

Análisis de los datos.

Los *arrays* fueron escaneados usando el *Gene Array Scanner* de Affymetrix y verificados mediante el programa *DNA-Chip Analyzer* (DChip) (Affymetrix). Todos los experimentos se llevaron a cabo con duplicados biológicos de cada una de las muestras (clon shARNi, mock y TC71 wt) y en los dos estadios temporales, temprano (T1) y tardío (T8). El modelo de chip empleado fue el Affymetrix HG-U133A. Los datos de los *arrays* de expresión fueron analizados mediante dos programas bioinformáticos diferentes: *GeneData Refiner* (GeneData, Basilea, Suiza) basado en el método MAS5 y *Genetrix* (EpiCenter Software, Pasadena, CA, EEUU). *Genetrix* emplea el *software Probe Profiler* y lleva a cabo un análisis del tipo *Gene Screen* mediante la regresión de Cox. *GeneScreen* da dos valores para cada gen: el primero es un valor de p que mide la "significación de la asociación" (en este caso la asociación con el clon shRNAi); el segundo valor es

el valor de la t estadística que mide la fuerza o magnitud de la asociación. Obtuvimos listas de los 300 genes más significativamente asociados a con la inhibición de la fusión y de los 300 que no lo estaban; todos ellos se combinaron en una única lista sobre la que se llevó a cabo un análisis del tipo de agrupamiento jerárquico que claramente nos permite diferenciar entre el clon shRNAi y el mock y TC71 wt. El otro programa de análisis, *GeneData Refiner* se basa en el método MAS5. Los valores de expresión absolutos para cada sonda se calcularon mediante el *software* MAS 5.0. En todos los casos se cumplían los criterios de una hibridación de buena calidad: *Scaling factor* (SF) menor de tres veces, es decir, el SF más elevado no superaba en 3 veces al más bajo; proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5; y número de sondas presentes en el chip superior al 40%. La normalización se realizó con la mediana. Para filtrar aquellos genes cuya señal no era fiable se usaron los ratios 3'/5' de los genes controles *housekeeping* GAPDH y β -Actina y la condensación de las intensidades de los valores señal usando la denominada *Absent Detection Call*. El agrupamiento se basó en este caso en la medida de la distancia euclídea y en los métodos de *Single Linkage / Complete Linkage*. Para la identificación de genes de expresión diferencial se realizaron tests del tipo *two-sample, two-sided t* entre las muestras "shRNAi" / "TC71wt", "pS" / "TC71wt" para cada condición y en cada estadio temporal. Se seleccionaron como genes candidatos aquellos con un valor de p inferior a 0,05 y con un cambio del nivel de expresión de al menos 2.

9. Técnicas de interacción ADN-proteínas.

Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP).

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se hizo con el *EpiQuik™ Chromatin Immunoprecipitation Kit* (Epigentek, Brooklyn, NY, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para cada muestra analizada se empleó un set de anticuerpos:

1.8µg de IgG como control negativo

1.8µg del anticuerpo anti-ARN polimerasa II como control positivo (proporcionado por el Kit)

4.0µg del anticuerpo policlonal anti-cabra EWS (C-19, Santa Cruz BT)

5.0µg anticuerpo anti-V5 (Invitrogen). Anticuerpo anti-V5 para inmunoprecipitar las proteínas de fusión con el epítipo V5.

Como control adicional bajo el nombre *Input DNA*: mezcla sin anticuerpo de la cromatina pre-limpiada y de los complejos ADN-proteína antes de la inmunoprecipitación.

Los extractos celulares se sonicaron en 4 ocasiones mediante un pulso constante de 10 segundos (100Julios; 40% de amplitud) en un sonicador del tipo Vibra Cell 500 Watts (Sonics) generando fragmentos de 300 a 1000 pb. El ADN purificado fue clonado y sometido a una amplificación por PCR. Como cebadores control para la PCR se usaron los descritos en el artículo de Zupanska *et al* (491). Los controles, uno anti-ARN polimerasa II con secuencias regulatorias inmunoprecipitadas del promotor del gen G3PDH y otro IgG de ratón, reconocieron la region genómica no codificante localizada entre el gen G3PDH y el gen CNAP1 y generaron productos de PCR para cada muestra en los que no encontramos diferencia alguna entre el mock (pSUPER) y el clon shARNi. Los cebadores usados para la secuencia putativa de reconocimiento de EWS-FLI1 en el promotor de TOPK fueron:

Cebador del promotor de TOPK sentido: 5'- GGGCCGCTCATTCTGTTTCGAGGTA-3'

Cebador del promotor de TOPK antisentido: 5'- AGTTGCGGGGCTTTGTCACCTACAT-3'.

Amplicón de 117 pb. Los cebadores se localizaron entre el sitio +1 del inicio de transcripción y las 500 primeras pb aguas arriba de la secuencia proximal del promotor del gen. El programa de PCR constó de 38 ciclos de amplificación de 20s a 94°C, 30s a 57°C y 30s a 72°C con un paso previo de desnaturalización de 3 minutos a 94°C y una fase de extensión final de 2 minutos. Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2% (Laboratorios Conda).

PCR de cebador único en los productos de ChIP.

La sonicación generó en el ADN extremos protuberantes cortos (predominantemente 5'-P y 3'-OH), que fueron tratados con la enzima T4 ADN polimerasa (Promega) para rellenar los mismos. El paso siguiente consistió en el tratamiento de los cebadores adaptadores con la enzima fosfatasa alcalina de ternero (Fermentas, Vilnius, Lituania). Debido a que los cebadores adaptadores no fueron modificados con un grupo fosfato en el extremo 5', los cebadores adaptadores se ligaron con el extremo 5' del transcrito de ADN.

Secuencia de los cebadores adaptadores 1 y 2:

Cebador adaptador 1: 5'-GCC GAT TCA TTA ATG CAG ATC TCG ATC CCG-3'

Cebador adaptador 2: 5'-CGG GAT CGA GAT CTG CAT TAA TGA ATC GGC-3'

Ligación del cebador adaptador 1 con el transcrito de ADN. La concentración del ADN adaptador era de 10nM y el número esperado de moléculas del transcrito de ADN en la solución fue ajustado mediante dilución a la unidad. Volumen de ligación de 10µl. Ligación a 16°C durante 2 horas, con posterior inactivación de la ligasa durante 5 minutos a 65°C.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con el cebador adaptador 2 y la enzima Taq ADN polimerasa Industrial GMP Grade (Roche) generando extremos protuberantes A compatibles con los extremos protuberantes en T del vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega).

Programa de la PCR: primer paso de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, 60 ciclos consistentes en 30s a 95°C, 20s a 60°C y 1 minuto a 72°C y un paso de extensión adicional de 5 minutos a 72°C. Los productos amplificados de la PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Immunoprecipitación.

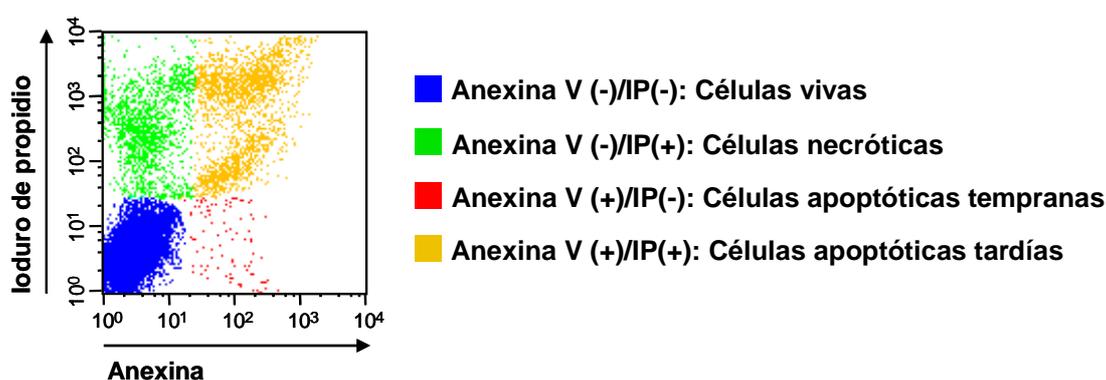
Se usó el anticuerpo Anti-V5 para inmunoprecipitar la proteína de fusión con el epítipo V5 según el protocolo detallado por el fabricante (Invitrogen). Se procedió a la secuenciación de los complejos inmunoprecipitados de la proteína de fusión EWS-FLI1 y análisis por medio de la trampa iónica (Thermo).

10. Técnicas de citometría de flujo.

Análisis de muerte celular y apoptosis por citometría de flujo.

Durante la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular. Un proceso temprano es la pérdida de asimetría en los fosfolípidos de la membrana, que altera la carga e hidrofobia de la misma. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos, dependiente de Ca^{++} , que se une con gran afinidad a los residuos de fosfatidilserina de la membrana celular. En una célula normal, estos residuos están en la cara interna de la membrana y son inaccesibles para la anexina V, a menos que se permeabilice la membrana. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan expuestos en la cara externa de la membrana, este proceso es irreversible y la célula termina muriendo por apoptosis. Cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza, y el yoduro de propidio (IP) (Sigma) es capaz de marcar el ADN del núcleo. Este marcaje adicional nos permite diferenciar entre las células en apoptosis tardía y las células necróticas.

Figura 10. Esquema de la distribución celular de acuerdo al marcaje con Anexina V-IP.



El análisis se llevó a cabo mediante marcaje con anexina V e IP con un kit comercial de Immunostep, Salamanca, España.

Se sembraron las células a una densidad de 100.000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos. Cuando se hubo de incubar con fármacos se sembraron a una densidad inferior en

función del tiempo de incubación con los fármacos: 24, 48 o 72h, tratando siempre de evitar que las células llegaran a confluencia.

Se recogió el medio de cada pocillo y se pasó a un tubo de citometría de 1,5ml (Falcon, BD). Se añadieron 300µl de tripsina/EDTA (Invitrogen/Life Technologies) a cada pocillo y se dejó actuar entre 3 y 5 minutos para añadir a posteriori 500µl de PBS 1X y levantar las células de cada pocillo que se depositaron en su tubo de citometría correspondiente. Se centrifugó a 1300rpm durante 5 minutos, se aspiró el PBS y se añadió nuevamente 1ml de PBS 1X y se resuspendió el pellet celular por vortex. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y se incubó con una mezcla de:

2,5µl de Anexina V

10µl de IP

Tampón de unión hasta 200µl

La solución de tampón de unión se diluyó 1:4 en agua destilada. 15 minutos de incubación en la oscuridad e inmediato análisis en el citómetro de flujo *FACSort* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) mediante el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) pasando al menos 20.000 células a una velocidad de no más de 500-800cél/segundo. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el *software Paint-a-Gate* (Becton Dickinson).

Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

Análisis de ciclo celular mediante marcaje con IP que se une al ADN permitiendo analizar el contenido en ADN de cada célula marcada. Se sembraron las células a una densidad de 100.000 células por pocillo de una placa de seis pocillos. Si se incubaron con fármacos se sembraron a una densidad inferior en función del tiempo de incubación con los fármacos: 24, 48 o 72h, siendo el aspecto más importante el evitar que las células llegaran a confluencia para no tener un análisis sesgado del ciclo celular además si es demasiado alto el número de células, éstas tienen tendencia a agregarse debido al IP pudiendo atascar el citómetro de flujo.

En primer lugar se aspiró el medio de cultivo de cada pocillo y se levantaron las células usando 300µl de tripsina/EDTA (Invitrogen/Life Technologies) durante 3-5 minutos y añadiendo posteriormente 500µl de PBS 1X. Las células una vez levantadas se pasaron a tubos

de citometría de 1,5ml y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos. Tras centrifugar se eliminó el sobrenadante y se fijó el pellet celular con 700µl de etanol 70% (preenfriado a -20°C) (Merck) durante toda la noche habiendo tapado previamente los tubos con *parafilm* (Alcan). Al día siguiente se retiró el *parafilm* (Alcan) y se añadió a cada tubo 1ml de PBS 1X y se centrifugó a 1800rpm 5 minutos repitiendo este paso de lavado una segunda vez. Tras el segundo lavado se pasó a marcar con IP de acuerdo a la siguiente fórmula por tubo:

PBS 1X 1 ml

IP 5µl

ARNasa 5µl

Se añadió ARNasa para degradar el ARN presente en las muestras. Se dejaron incubar los tubos marcados durante 1 hora, en agitación a TA y protegidos de la luz en posición horizontal en un agitador de balanceo (Heidolph) para que se mezclara bien el contenido. Tras esa hora se procedió a analizar los tubos en un citómetro de flujo *FACSort* (Becton Dickinson) mediante el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) pasando al menos 20.000 células por tubo a una velocidad no superior a 400-500 células por segundo para evitar la aparición de dobletes. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el *software Paint-a-Gate* (Becton Dickinson).

11. Técnicas in vitro.

Ensayo de proliferación por MTT.

Medición del grado de proliferación celular de un cultivo celular mediante la utilización del ensayo MTT que mide la actividad deshidrogenasa mitocondrial. El reactivo MTT es el 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma). El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Las células metabólicamente activas reducen en la mitocondria la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT (Sigma), las células se rompen y se solubiliza el formazán con DMSO (Merck). La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

Se analizaron 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado, los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de cuadruplicados. El IC₅₀ se calculó con el programa Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, EEUU).

Se sembraron 200.000 células por pocillo de placa 24 por duplicado o triplicado para cada condición. Se dejaron crecer las células durante 24 o 48h. El experimento se llevó a cabo con las células en fase exponencial de crecimiento evitando que llegaran a estar confluentes. Una vez que los pocillos estuvieron listos se aspiró el medio de cultivo de los mismos. Se preparó una mezcla 1:10 de MTT (Sigma) y el correspondiente medio de cultivo celular para añadir 300 μ l por pocillo. El MTT (Sigma) se disolvió en PBS 1X a una concentración de 5 μ g/ μ l y se guardó a -20°C protegido de la luz. Los 300 μ l de la mezcla se depositaron poco a poco sobre cada pocillo y se incubaron las placas, 1h a 37°C en el incubador (Heraeus, Thermo), protegidas de la luz. Transcurrida la hora se aspiró la mezcla de los pocillos y se añadió el dimetil sulfóxido, DMSO (Merck). El volumen de DMSO (Merck) a añadir dependerá de lo oscuro que estuviera el pocillo, si estaba muy oscuro se añadió más volumen (1000 μ l) para que se diluyera la señal y no saturara la lectura posterior y viceversa, si la señal era escasa se añadió menos DMSO (250-500 μ l) (Merck) para no diluir en exceso. Se dejaron agitando las placas protegidas de la luz en un agitador (Heidolph) de 10 a 15 minutos a TA para que se mezclara bien el DMSO (Merck). Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placas (*Ultra Evolution Microplate Reader*, TECAN, Männedorf, Suiza).

La dosis respuesta de proliferación de las líneas celulares tras la administración de NVP-AEW541, LY294002 y PD98059 se calculó para determinar el IC₅₀ de proliferación. Las células fueron incubadas con NVP-AEW541, LY294002 y PD98059 durante 72 horas hasta alcanzar un grado de confluencia del 30%-50%. Este experimento fue repetido en varias ocasiones. Los datos se presentan como la media \pm sd de cuadruplicados.

Análisis de crecimiento en agar blando.

Ensayo usado para analizar el efecto de la inhibición de EWS-FLI1 en el crecimiento independiente de anclaje mediante la formación de colonias en agar blando. 1000 células/1ml de medio de cultivo fueron resuspendidas en el respectivo medio de cultivo con 0.3% Agar Noble (DIFCO, BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) y posteriormente se sembraron en los pocillos de una placa de seis previamente revestidos con 2ml de una capa basal de medio con 0.6% Agar Noble (DIFCO, BD) a la que se dejó solidificar. Las colonias celulares surgidas fueron contadas y fotografiadas a los 7 días con una cámara digital (Sony, Tokio, Japón).

Este experimento fue repetido en varias ocasiones. Los datos se presentan como la media \pm sd de cuadruplicados.

Ensayo de movilidad.

Por cada punto a analizar se usaron las placas crecidas en confluencia en una placa de 10 cm de diámetro. Se cambió el medio de cultivo celular a cada placa y se lavó con PBS 1X, para posteriormente levantar las células con tripsina/EDTA (Invitrogen). Las células se recogieron en un falcon de 15ml y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en medio sin suero.

Con la ayuda de una cámara Neubauer (Nahita, Auxilab Beriain, Pamplona) se contabilizó el número de células por ml de medio y se sembraron 100,000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EEUU). Cada pocillo llevaba incorporado un *transwell* (BD). Previamente se había añadido 500 μ l de medio de cultivo celular al fondo de cada pocillo. Se dejaron incubar las placas *overnight* en el incubador (Heraeus, Thermo) (37°C y 5%CO₂). Al día siguiente se eliminó con ayuda de un bastoncillo las células que no habían migrado y que continuaban en la parte superior del

transwell (BD). Aquellas células que migraron a la parte inferior del *transwell* (BD) se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% (Merck) en PBS durante 15 minutos. Tras 3 lavados con PBS 1X, se tiñeron con una solución de azul violeta (Sigma) por espacio de 30 minutos, se aclararon bien con agua y se dejaron secar brevemente. Se recortaron entonces las membranas de los *transwell* (BD) y se depositó cada una en un pocillo de una placa de 96 pocillos (Falcon, BD) con 300µl de ácido acético glacial 10% (Merck). Se leyó entonces la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas a 570nm (TECAN).

Este experimento fue repetido en varias ocasiones. Los datos se presentan como la media \pm sd de cuadruplicados.

Ensayo de determinación de la longitud de los telómeros.

Primera parte.

En primer lugar se crecieron las células en una placa de 10cm de diámetro hasta alcanzar un grado alto de confluencia. Se extrajeron las proteínas lavando con PBS1X tras aspirar el medio de cultivo de la placa. Posteriormente con la ayuda de un raspador (Sarstedt) se levantaron las células de la placa y se pasaron a un tubo eppendorf de 15ml. Centrifugación a 1500rpm, 5 minutos a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y de nuevo se lavó con PBS1X y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones aspirando tras ello el sobrenadante. Se añadió entonces al pellet celular el tampón de lisis CHAPS (aproximadamente 10 veces el volumen del pellet celular) para solubilizar el pellet, dejando que se lisaran las células durante 30 minutos a 4°C. Centrifugación durante 30 minutos a 12,000g a 4°C para recoger el sobrenadante que contenía la telomerasa y almacenarlo a -20°C. Todos los pasos se llevaron a cabo con los tubos en hielo. Se determinó la concentración del extracto proteico mediante el uso de Coomassie (Bradford) *Protein Assay Reagent* (Pierce) leyendo en un lector ELISA a 570 nm (TECAN). Extractos proteicos guardados a -80°C.

Segunda parte.

Una vez están listos y medidos los extractos proteicos. Generación de la matriz con el kit *Fluorescent Amidite matrix Standards* (Applied Biosystems). Análisis en un secuenciador *ABI Prism 310 HD Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Los estandar fueron usados para dar lugar a una matriz de multicomponentes que nos permitiera una *4 color fluorescent fragment detection*. El set de las 4 *matrix standard* se corrió una vez para generar un archivo matriz que se aplicó luego a todas aquellas muestras que se corrieron bajo unas mismas condiciones. Las *matrix standard* venían ya listas en el kit y premezcladas con azul dextran para ser corridas en un gel. Comprenden 28 fragmentos de ADN desde 37 a 14079 pb.

Los 4 colores usados, *Filter set D*, fueron:

G-Fam azul

Ned amarillo

Hex verde

Rox rojo

Para la matriz se preparó en un tubo especial ABI Prism la siguiente mezcla para cada estandar: 15µl formamida (Merck) + 2µl estandar.

2 minutos de desnaturalización a 90°C y luego en hielo hasta cargar en el secuenciador.

Se cargó el polímero Pop4, se limpió con agua para cromatografía líquida y etanol (Merck). Temperatura de 60°C durante 40 minutos. Test CCD4 Color en primer lugar, luego los 4 colores y por último *sequence fill capillary*.

Muestras que se incluyeron en el análisis:

3 controles positivos (K+) líneas STAET-1, KAN y SKNSH

1 control negativo (K-)

un control inactivado por calor (HI): 7µl del control positivo calentando 10 minutos a 85°C.

Se ajustaron las concentraciones proteicas a 10ng/µl con tampón CHAPS.

Condiciones de la PCR TRAP – ASSAY :

Mezcla: 23µl de la *master mix* + 2µl lisado proteico. Todos los pasos en hielo.

Master mix:

2,5µl de Tampón TRAP 10X del kit

2,5µl de dNTP's (2mM) (Eppendorf)

0,25µl de FAM *primer mix* (111-01) (15µM) preparado en fresco del 100µM stock protegido de la luz

0,5µl de TRAP-*Primer Mix*

17,05µl de H₂O (DEPC) (Ambion)

0,2µl de la enzima Taq polimerasa (Promega)

Programa de temperaturas de la PCR (TRAP – 90):

- 1) 3 minutos 37°C,
 - 2) 30 minutos 30°C
 - 3) 5 minutos 94°C
 - 4) 30s 94°C
 - 5) 45s 55°C
 - 6) 45s 72°C
 - 7) 90 minutos 72°C.
- | 35 repeticiones

Preparación de las muestras para el análisis de fragmentos en el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems). Mezcla: 10,2µl formamida + 0,8µl standard 1000 Rox + 4µl producto de la PCR en un tubo especial ABI. 2 minutos de desnaturalización a 90°C.

12. Técnicas de inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica.

En el caso de las líneas celulares, se emplearon dos métodos diferentes en función del soporte de crecimiento de las células, bien en placas para luego dar lugar a un pellet celular en bloques de parafina o sobre porta-objetos.

Pellets celulares.

Las líneas celulares se sembraron en placas de 10cm y se dejaron llegar a un nivel alto de confluencia (80-90%). Se despegaron de las mismas usando un raspador (Sarstedt), se recogieron en un falcon con medio de cultivo y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se añadieron 10ml de PBS 1X al pellet celular y se volvieron a centrifugar las muestras en las mismas condiciones dos veces. Tras la última centrifugación se añadieron 10ml de formaldehído 40% (Surgipath, Richmond, IL, EEUU), dejándolo actuar una hora para fijar las células a TA. Seguidamente se centrifugaron las células a 3000rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante pasando el pellet celular con una pipeta Pasteur a un trozo de papel de filtro previamente cortado al tamaño adecuado de un casete histológico y mojado en formol (Surgipath). Con una hoja de bisturí se agruparon las células en el centro del papel y sobre ellas se colocó otro papel humedecido en formol (Surgipath). Se identificó el casete, se montó el *cassette* con dos esponjas humedecidas en formol y se llevó al procesador de tejidos (Thermo), procesando el pellet con un protocolo de inclusión rápida. Terminado el proceso, se secó el casete y se le introdujo en parafina (Histoplast, Thermo, Waltham, MA, EEUU) del aparato dispensador (SakuraTissue-Teck, Torrance, CA, EEUU) realizando el bloque de parafina (Histoplast). Finalmente se realizaron cortes de 2-3µm en el microtomo HM 310 (Microm, Walldorf, Alemania), fijándolos a los portaobjetos Superfrost Plus (Menzel, Bielefeld, Alemania) y guardando las preparaciones a TA.

Células crecidas sobre porta-objetos.

Las líneas celulares fueron sembradas sobre porta-objetos (Menzel) dentro de las placas de cultivo, de manera que las células crecieran directamente adheridas al porta (los portaobjetos

utilizados no necesitaron ningún tratamiento específico para facilitar la adherencia celular). Una vez crecidas las células se retiró el medio de cultivo y se fijaron con metanol-acetona (Merck): se introdujeron los portas en *coplin-jar* (Afora) que contenían PBS 1X frío (4°C), durante 10 minutos y a continuación se pasaron a otros *coplin jar* con metanol (-20°C) (Merck) durante 10 minutos. Seguidamente se pasaron los portas a *coplin jar* con acetona fría (Merck) (-20°C) durante 1 minuto y finalmente se sacaron del *coplin jar* y se dejaron secar a TA durante el tiempo necesario. Los portas se guardaron a -20°C hasta que fueron usados.

Desparafinación.

Inicialmente se empezó por desparafinar los cortes calentándolos en una estufa (Memmert) a 60°C, ON e introduciéndolos posteriormente en xilol (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona), durante 8 minutos, repitiendo este paso 3 veces. A continuación se colocaron los cortes en una solución de xilol/etanol 1:1, durante 5 minutos y seguidamente se empezó la hidratación.

Hidratación.

En este paso se sumergieron las preparaciones sucesivamente en alcoholes de gradación decreciente (100, 96 y 80%) (Panreac) durante 4 minutos cada uno, sumergiéndolas al final en agua destilada, durante 3 minutos o más (en el caso de las células crecidas sobre portas estos dos pasos no fueron necesarios).

Desenmascaramiento.

Dependiendo de la proteína que se quisiera visualizar, se han utilizados diferentes tipos de desenmascaramiento.

a) Tratamiento con calor y químico.

Microondas.

El desenmascaramiento por calor usando el microondas se hizo sumergiendo las muestras en tampón citrato pH6 (Roche-Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EEUU), irradiándolas en el microondas durante 10 minutos.

Baño.

Se ha utilizado el aparato *Discovery* (Roche-Ventana Medical Systems) que tiene estos pasos automatizados, en el cual se incubaron las preparaciones durante 56 minutos, entre 95°C-100°C.

Se utilizó el tampón Tris-EDTA pH 8 (Roche-Ventana Medical Systems) o el tampón citrato pH 6.

Tratamiento químico y bloqueo inespecífico de proteínas.

Posteriormente, se hizo el bloqueo inespecífico de las proteínas de las preparaciones referidas en el punto anterior con un kit propio del sistema *Discovery*, el Kit *Omnimap* (Roche-Ventana Medical Systems).

Inhibición de la peroxidasa endógena.

Se incubaron las preparaciones con H₂O₂ (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 10 minutos.

Incubación con el anticuerpo primario.

Tras el desenmascaramiento se pasó a incubar las preparaciones con el anticuerpo primario específico, diluido en la solución diluyente correspondiente cada aparato, en el caso del *Discovery* fue la solución del Kit *Omnimap* (Roche-Ventana Medical Systems) y en el caso del *Autostainer* fue DAKO *Antibody Diluent* (Dako, Glostrup, Dinamarca), durante 1 hora a 37°C, haciendo posteriormente tres lavados con PBS 1X, durante 5 minutos.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en IHQ. AC: anticuerpo.

AC	Clon	Dilución	Tipo	Casa Comercial
Ki-67	MIB-1	1:75	Monoclonal	DAKO
DAX1	2F4	1:1000	Monoclonal	no comercial

Incubación con el anticuerpo secundario.

A continuación se incubaron las preparaciones con el anticuerpo secundario (conejo-HRP (Roche-Ventana Medical Systems) ó ratón-HRP (Roche-Ventana Medical Systems), diluyéndolos en la misma solución que los anticuerpos primarios, durante 30-40 minutos y posteriormente se lavaron las muestras con PBS 1X 3 veces durante 5 minutos.

Revelado.

Se utilizó el método de visualización Envisión-DAB (Dako) o el de *Omnimap* (Roche-Ventana Medical Systems)

Deshidratación.

Una vez terminada la reacción de revelado las muestras se sumergieron en una batería de soluciones de etanol de gradación creciente (80, 96 y 100%) y xilol (etanol 100% 1:1 y xilol 100%) (Panreac), durante 4 minutos en las soluciones de etanol y 5 minutos en las de xilol, repitiendo el último paso dos veces más.

Montaje de las preparaciones.

Finalmente se montaron las preparaciones con DEPEX (Merck) y se guardaron para posterior análisis al microscopio.

Tinción de Oil-Red.

Método de tinción para adipocitos. Una vez transcurrido el tiempo necesario para la diferenciación adipogénica se eliminó el medio de cultivo de las placas de cultivo que contenían los portas (Menzel) con las células crecidas sobre los mismos. Los portas se fijaron con paraformaldehído al 4% (Merck) durante 10-15 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron dos veces con isopropanol al 60% (Merck). Se tiñeron entonces con la solución de *oil red* durante 90 minutos a TA. Tras ese tiempo se retiró el *oil red* y se diferenció con isopropanol. Se realizó una contra-tinción con hematoxilina/eosina durante 5 minutos. Por último se lavó con agua destilada y se montó con glicerina (Sigma).

Solución stock de *oil red*:

Oil red 0,5g (Sigma)

Isopropanol 99% 100ml (Merck)

Solución de trabajo:

Solución stock de *oil red* 30ml

Agua milliQ 20ml

Se dejó reposar 15 minutos y se filtró (solución estable durante 1-2horas).

Tinción de Von Kossa.

Método de tinción para los depósitos de calcio de los osteoblastos. Una vez transcurrido el tiempo necesario para la diferenciación osteogénica se eliminó el medio de cultivo de las placas de cultivo que contenían los portas (Menzel) con las células crecidas sobre los mismos. Los portas se fijaron con paraformaldehído al 4% (Merck) durante 10-15 minutos a 4°C. Una vez fijados se añadió sobre cada porta la solución de nitrato de plata (Sigma) al 1% dejando que actuara durante 60 minutos con luz ultravioleta a TA. Se lavó luego con agua destilada y se añadió la solución de tiosulfato sódico (Sigma) al 5% 5 minutos a TA. Nuevo lavado con agua destilada y contraste con la solución de *fast red* (Fluka, Sigma) durante 3 minutos a TA. Deshidratación, aclarado y montaje con Depex (Merck).

Solución *fast red*:

Nuclear fast red 0,1g (Fluka, Sigma)

Sulfato amónico 5g (Sigma)

Agua milliQ 100ml

En primer lugar se disolvió el sulfato amónico (Sigma) en agua y posteriormente se añadió el *fast red* (Fluka, Sigma) lentamente calentando hasta hervir para que se disolviera. Luego se enfrió y filtró.

13. Modelo animal para el estudio in vivo.

Para estudiar la capacidad oncogénica del clon shARNi y su evolución temporal se llevaron a cabo estudios *in vivo* con ratones inmunodeprimidos. Este estudio fue revisado y autorizado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y se realizó bajo las Normativas Española y de la Unión Europea (RD 1201/05 y 86/609/CEE, respectivamente).

En conjunto, en ambos experimentos se utilizaron 60 ratones jóvenes NOD/SCID (*Non-Obese-Diabetic/Severe-Compromised-ImmunoSystem*) de una edad de 4-5 semanas (NOD/CrCrI- Prkdc^{scid} Charles River, Charles River, Shrewsbury, MA, EEUU). La elección de ratones tan jóvenes responde al hecho de tener un modelo más aproximado y real a la edad de aparición del SE en los pacientes.

Para inducir los tumores, se inyectaron subcutáneamente, en el flanco derecho de los ratones, 5×10^6 células en fase de crecimiento exponencial, en una suspensión celular de Matrigel de 200 μ l con un ratio 1:1 *Matrigel Matrix* (BD), con agujas de 27G (BD). Los animales se anestesiaron con Isofurano (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EEUU) para ser inyectados.

Cuando los tumores empezaron a ser visibles y medibles se empezaron a medir usando un calibre. Se hizo un seguimiento de la evolución de los tumores y del efecto de los tratamientos durante 4 semanas, valorando diariamente el estado de los animales. Al final del estudio los ratones fueron sacrificados por sobreexposición a Isofurano (Abbott Laboratorios) y los tumores extraídos para su posterior análisis histopatológico. Todos los experimentos se realizaron bajo campana de extracción (Telstar) y en ambiente estéril.

Los volúmenes tumorales fueron calculados según la siguiente fórmula: $\left(a^2 b \pi / 6\right)$, donde a es el diámetro más pequeño y b el más grande.

14. Técnicas de trabajo con células madre mesenquimales humanas adultas.

Generación de un sistema de expresión génica inducible Tet-Off[®] combi tTA.

Como vector inducible se usó el *Tet-Off[®] Combi-tTA Gene Expression System* (BD Clontech) (492). Este vector combina las unidades de transactivación y expresión génica en un mismo plásmido Combi-tTA. El transactivador controlado por tetraciclina (tTA o *tetracycline-controlled transactivator*) es una proteína de fusión de 37kDa compuesta por los dominios de activación TetR y VP16 que se une específicamente a TRE y activa la transcripción en ausencia de tetraciclina o doxociclina.

Se clonaron las fusiones EWS-FLI1 de tipo I, II y III en el vector plasmídico pcDNA3.1 (Invitrogen) y se amplificaron por PCR. Decidimos incluir un epítipo V5 para con posterioridad poder inmunoprecipitar las proteínas de fusión con un anticuerpo antiV5. Para poder incluir un epítipo V5 antes del codón de parada se realizaron dos rondas de PCR. La primera ronda de PCR (cebador sentido *_EWS-FLI_ScaI* y cebador antisentido primer_V5) constó de 5 ciclos de amplificaciones de 15s a 98°C, 20s a 57°C y 30s a 72°C. Paso previo de desnaturalización de 1 minuto a 95°C y uno de extensión final de 1 minuto. La segunda ronda de PCR (cebador sentido *_EWS-FLI_ScaI* y antisentido V5_ScaI_EWS-FLI) constó de 30 ciclos de amplificación de 15s a 98°C, 30s a 50°C y 30s a 72°C también con un paso previo de desnaturalización de 1 minuto a 95°C y uno de extensión final de 1 minuto. La enzima empleada fue la KOD HIFI ADN polimerasa (Novagen, EMD Chemicals, San Diego, CA, EEUU).

Cebadorsentido *_EWS-FLI_ScaI*:

AAAAGTACTGCCACCAATGGCGTCCACGGATTACAGTAC

Cebador antisentido V5_ScaI_EWS-FLI (codón de parada incluido):

AAAAGTACTTACCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC

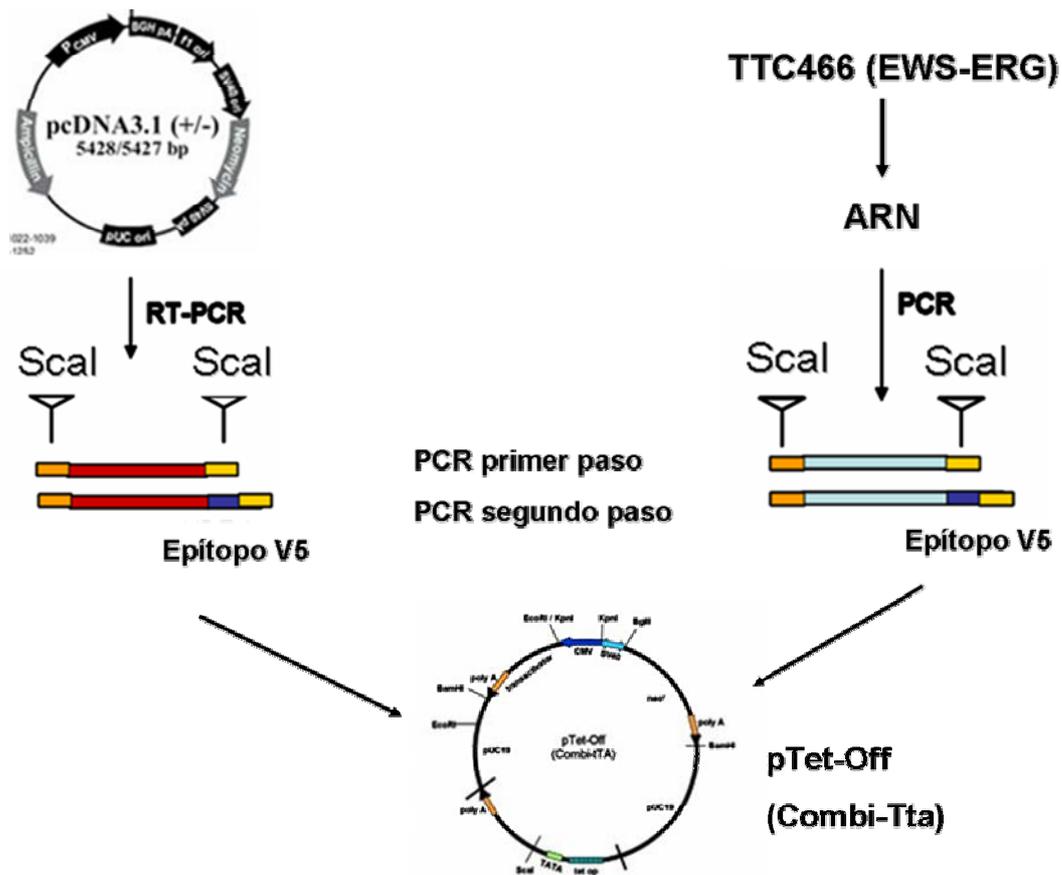
Cebadores para la detección por anticuerpos del epítipo V5:

Cebador sentido V5 (sin codón de parada):

AGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGCGGGCC

GTAGTAGCTGCCTAAGTGTGAAGGC

Figura 11. Esquema de trabajo para la generación del sistema inducible *Tet-Off combi TTA*.



La fusión EWS-ERG fue clonada por PCR a partir de la línea celular de SE TTC466. Con el fin de incluir un epítipo V5 antes del codón de parada se llevaron a cabo dos rondas de PCR. La primera ronda (cebador sentido_ERG_ScaI y cebador antisentido_V5_ERG) constó de 10 ciclos de amplificación de 15s a 98°C, 20s a 57°C y 30s a 72°C. Paso previo de desnaturalización de 1 minuto a 95°C y uno de extensión final de 1 minuto. La segunda ronda de PCR (cebador sentido_ERG_ScaI y cebador antisentido V5_ScaI_ERG) constó de 40 ciclos de amplificación de 15s a 98°C, 30s a 50°C y 30s a 72°C. Paso previo de desnaturalización de 1 minuto a 95°C y uno de extensión final de 1 minuto. La enzima empleada fue la KOD HIFI ADN polimerasa (Novagen).

Cebadorsentido_ERG_ScaI:

AAAAGTACTGCCACCAATGGCGTCCACGGATTACAGTACCTATAGC

Cebadores para la detección por anticuerpos del epítipo V5:

Cebador antisentido_V5_ERG (sin codón de parada):

AGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGCGGGCC
GTAGTAAGTGCCAGATGAGAAGGCATA

Cebador antisentido V5_ScaI_ERG (incluye el codón de parada):

AAAAGTACTTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC

Los fragmentos de PCR digeridos con la enzima de restricción ScaI (Fermentas) cargados en un gel de agarosa 1% del que fueron extraídos y purificados mediante el kit *Jet Quick DNA gel extraction* (Qiagen). El vector inducible fue así mismo digerido por la enzima ScaI (sitio único de restricción en el vector) (Fermentas), purificado por columna (Qiagen), defosforilado con la enzima CIP (Promega), purificado por columna de nuevo y ligado con la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Una vez obtenidas las ligaciones se transformaron bacterias competentes DH5 α con las diferentes fusiones EWS-ETS de acuerdo al protocolo descrito, se crecieron cultivos de LB líquido, se obtuvieron las construcciones plasmídicas mediante *miniprep* y por último se secuenciaron.

Cultivo de las células madre mesenquimales humanas hMSCs.

Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) con las que en primera instancia se trabajó fueron adquiridas a Cambrex (East Rutherford, NJ, EEUU). Posteriormente se pasaron a usar células madre mesenquimales humanas adultas obtenidas de pacientes de SE así como de individuos sanos proporcionadas por el Dr.A.C.Lankester, del Departamento de Pediatría del Centro Médico de la Universidad de Leiden, Leiden, Holanda. Dichas hMSCs fueron obtenidas con el debido consentimiento informado y la aprobación de la Comisión de Ética de la Universidad de Leiden.

Las células madre mesenquimales humanas adultas se crecieron con el medio específico bajo en suero MesenPRO (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 1% de glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomina (Invitrogen/Life Technologies) en un incubador (Heraeus, Thermo) a 37°C y 5%CO₂. La pureza de estas células se testó mediante citometría de flujo con los marcadores CD105, CD166, CD29, CD44, CD14, CD34 y CD45.

Ensayo de diferenciación de las hMSCs.

Se comprobó la capacidad de diferenciación de estas células hacia los linajes celulares osteogénico, condrogénico y adipogénico. Las hMSCs se crecieron hasta llegar a confluencia para levantarlas de la placa de cultivo por medio de tripsina/EDTA (Invitrogen/Life Technologies) para sembrarlas ya en medio de diferenciación.

Para la diferenciación osteogénica y adipogénica se tuvieron en cuenta las condiciones descritas por *Tsai et al* (493). Para la diferenciación condrogénica las hMSCs se crecieron sin suero y en presencia de TGFβ₃ (494). Los cebadores usados para la PCR fueron los descritos por *Pittenger et al* (495).

Las células madre mesenquimales fueron cultivadas hasta llegar a confluencia y cambiadas a los diferentes medio de diferenciación. Las soluciones stock fueron preparadas disolviendo todos los reactivos en medio α-MEM (Gibco, Invitrogen) hasta las respectivas concentraciones finales y filtrando posteriormente (filtro de 0.22 μm, Millipore) para un total de 250ml de volumen final para cada medio de diferenciación. Los reactivos dexametasona, isobutilmetilxantina e indometacina (Sigma) se disolvieron en agua milliQ y los restantes en agua.

Todos los medios de diferenciación contaron como suplemento antibiótico con un 5% de penicilina/estreptomina o fungizona (Gibco, Invitrogen).

Los medios de diferenciación fueron cambiados cada 3 días.

Medio osteogénico.

Medio α-MEM suplementado con 10% FBS (Invitrogen/Life Technologies), 0.1μmol/l de dexametasona (Sigma), 10mmol/l de β-glicerol fosfato (Sigma) y 50 μmol/l de ascorbato (Sigma). La diferenciación se alcanzó entre 7-15 días. El potencial de diferenciación para la

osteogénesis se comprobó por medio de la acumulación de calcio mediante la tinción de von Kossa (tiosulfato sódico, Sigma) así como por una elevada expresión de los marcadores:

fosfatasa alcalina (presente a menor nivel en los otros cultivos)

sialoproteína (LF-100)

osteonectina (BON-1)

osteopontina (LF-7) (también encontrada en los cultivos condrogénicos)

Medio adipogénico.

Medio α -MEM suplementado con 10% FBS (Invitrogen/Life Technologies), 1 μ mol/l de dexametasona (Sigma), 5 μ g/ml de insulina humana (Sigma), 0.5mmol/l de isobutilmetilxantina (Sigma) y 60 μ mol/l de indometacina (Sigma). La diferenciación se alcanzó a los 21 días. Para confirmar la diferenciación adipogénica se observaron al microscopio óptico (Zeiss, Jena, Alemania) las gotas de lípido intracelular y realizó la tinción de *Oil Red* (Sigma). Cuando tiene lugar la diferenciación adipogénica se produce un aumento en la expresión de marcadores como la lipoproteína-lipasa (LPL), aP2 (proteína de unión a ácidos grasos) o la PPAR γ 2 (receptor 2 peroxisoma proliferador-activado).

Medio condrogénico.

Medio α -MEM sin suero (Invitrogen/Life Technologies), dexametasona 100nM (Sigma) y 10 ng/ml de *transforming growth factor-beta* 3 (RayBiotech, Norcross, GA, EEUU) La diferenciación se alcanzó a los 10-14 días. Incremento de la matriz extracelular rica en proteoglicano detectado mediante uso de un anticuerpo monoclonal anti-colágeno de tipo II (Clone II-4C11, Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) típico de cartílago articular (alta expresión de colágeno tipo II y tipo IX). Se realizó además una tinción paralela con azul de toluidina (Sigma).

Medio de diferenciación neural.

El medio de diferenciación neural (NIM), constaba de medio Ham's DMEM/F12 (Invitrogen), 2% de suero de ternera fetal (FCS, Invitrogen), suplemento B27, RA 20 μ M y 12.5 ng/ml de bFGF (Invitrogen). La solución stock de RA (se diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) hasta una concentración de 20mM. La inducción con FCS (Invitrogen) es permisiva con la

diferenciación a los distintos linajes celulares en contraposición a la retención de la capacidad pluripotente. No se cambió el medio de diferenciación durante los 12 días del período de inducción (estudios con reemplazo del 50% del NIM tras 4 días de inducción dieron resultados similares). El experimento se llevó a cabo con una confluencia celular máxima del 70% para evitar llegar a confluencia y que pudiera haber inhibición por contacto entre las células.

Transfección de las células madre mesenquimales humanas.

Transfección de células mesenquimales humanas mediante jetPEI (Polyplus).

Es el método de transfección de ADN más eficiente en células madre mesenquimales humanas (496).

Una vez que las células alcanzaron una confluencia cercana al 90% en el tercer pase de expansión se levantaron las mismas usando tripsina-EDTA (Invitrogen/Life Technologies). Se sembraron las células en una placa de 6-12 pocillos y se transfectaron una vez que llegaron a un grado de confluencia medio-alto en torno al 50-60% mediante jetPEI (Polyplus). Se usó este reactivo de transfección basado en polímeros catiónicos ya que está probado como método más efectivo de transfección de las hMSCs junto a la fibronectina (Biosource, Sunnyvale, CA, EEUU). 14µg de fibronectina para cada placa de 12 pocillos. Para transfectar se usaron 2µg de vector por pocillo con un ratio N/P=5 para un volumen final de 2ml por pocillo. Se usó medio de cultivo sin antibióticos ni FBS (Invitrogen/Life Technologies). Se diluyó en 100µl de NaCl150mM de 2 a 4µg de la construcción plasmídica o siARN que se deseaba transfectar mezclando mediante vórtex y dando un pulso de centrifuga. De 4 a 8µl de jetPEI (Polyplus) se disolvieron en 100µl de NaCl150mM con vórtex y pulso de centrifuga. Se añadió la solución de jetPEI (Polyplus) a la de ADN/siARN mezclando bien mediante vórtex y dando un pulso de centrifuga. 25 minutos de incubación de la mezcla a TA para finalmente añadir los 200µl de la mezcla por pocillo.

Se mantuvieron las células 24 horas con la mezcla transfectiva a 37°C y 5%CO₂. Una vez transcurrido ese tiempo se reemplazó por nuevo medio con heparina (4µl de un stock 5000

IU/ml para cada 10ml de medio) (Biochrom AG, Berlín, Alemania), concentrado plaquetario (5% de volumen) y antibióticos (1% penicilina, 1% estreptomycin) (Gibco, Invitrogen) durante 2 días, y posteriormente se sustituyó por el medio de selección con 100µg/ml de G418 (Invitrogen) como antibiótico de selección y 1µg/ml de doxiciclina (BD Clontech) (represión de la proteína de fusión) durante 3 días tras los cuales se redujo la concentración de G418 (Invitrogen) a 20µg/ml para mantenimiento.

Para obtener un fenotipo visible se llevó a cabo una segunda transfección de las MSCs usando siARN contra CDKN2A/p16 (ID #: 119508 *silencer validated siRNA*; Ambion). Como control negativo se usó el *silencer negative control siRNA #1* (Ambion). La transfección tuvo lugar en una placa de 6 pocillos (volumen final de 4ml) y la cantidad usada de siARN fue de 120pmol (24µl de una solución siARN 5µM para una concentración final 30nM de siARN). Se utilizó como reactivo de transfección JetPEI (Polyplus), 6µl con un N/P = 5 para un volumen de NaCl estéril 150mM tanto para siARN como para el JetPEI (Polyplus) de 100µl y un volumen total de la mezcla transfectiva de 200µl por pocillo. Se empleó medio de cultivo para la transfección sin antibióticos ni suero (Invitrogen/Life Technologies). La mezcla se mantuvo durante 24 horas a 37°C a 5%CO₂. Tras esas 24 horas el medio se reemplazó por nuevo medio suplementado con heparina (4µl de un stock 5000 IU/ml para cada 10ml de medio) (Biochrom), concentrado plaquetario (5% volumen) y antibióticos (1% penicilina, 1% estreptomycin) (Gibco, Invitrogen) durante 2 días y luego se cambió al medio de selección con 100 µg/ml de G418 (Invitrogen) como antibiótico de selección y 1µg/ml de doxiciclina (represión de la proteína de fusión) (BD Clontech) durante 3 días reduciendo el G418 (Invitrogen) a una de concentración a 20µg/ml para mantenimiento.

PCR en tiempo real (qRT-PCR).

El ARN total fue aislado a partir de células en cultivo en confluencia de hMSCs transfectadas establemente usando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (tratamiento con ADNasa I). Una vez extraído el ARN y medido se usaron 2 µg del mismo para la retrotranscripción usando la enzima superscript II transcriptasa reversa (Invitrogen) y cebadores oligodT según el protocolo ya descrito. Una vez sintetizado el ADNc se procedió a hacer la PCR en tiempo real de acuerdo al protocolo establecido.

Cebadores de qRT-PCR:

RT-p14ARF sentido: GAGAACATGGTGCGCAGGT
RT-p14ARF antisentido: GATGTGAACCACGAAAACCCCTC
RT-p16INK4A sentido: GGGAGAACAGACAACGGGC
RT-p16INK4A antisentido: ACCTCCTCTACCCGACCCC
RT-p21 sentido: ATCCCGTGTTCTCCTTT
RT-p21 antisentido: GCTGGCATGAAGCC
RT-p53 sentido: GCTTCGAGATGTTCCGAGAG
RT-p53 antisentido: CTCAGGTGGCTGGAGTGAG
RT-Rb1 sentido: TGCATGGCTCTCAGATTCAC
RT-Rb1antisentido: AGTTGGTCCTTCTCGGTCCT
RT-fusión tipo 1 sentido: GATCCTACAGCCAAGCTCCA
RT-fusión tipo 1 antisentido: ATTGCCCAAGCTCCTCTTC;
RT-fusión tipo 2 sentido: GATCCTACAGCCAAGCTCCAAGTCA
RT-fusión tipo 2 antisentido: GATTGGTCGGTGTGGGAGGTTGTAT
RT-fusión tipo 3 sentido: GAGAGCGAGGTGGCTTCAAT
RT-fusión tipo 3 antisentido: CCCAAGCTCCTCTTCTGACTG
RT-EWS-ERG sentido: CCTACAGCCAAGCTCCAAGTC
RT-EWS-ERG antisentido: GGAAGGAGATGGTTGAGCAG

PCR para detección fusión EWS-FLI1 7-6.

Cebadores específicos (Metabion) de la fusión dan banda en torno a 100pb, cebadores genéricos (Metabion) de la fusión dan banda de unos 600pb.

Condiciones del programa de PCR:

95°C 10'
58°C 1' 30 ciclos
95°C 15'' idem
72°C 5'
4°C infinito

94°C 2'
94°C 45'' idem
58°C 45'' 27 ciclos
72°C 45'' idem
72°C 3'
4°C infinito

Agua milliQ	18µl
Tampón 10X	2.5µl
dNTP's (Eppendorf)	0.5µl
MgCl ₂	2µl
Cebador sentido	0.4µl
Cebador antisentido	0.4µl
Enzima Taq (Promega)	0.2µl
cDNA	1µl

Western blot.

Western Blot de acuerdo a las condiciones descritas.

Anticuerpos usados:

p21 waf1/Cip1 monoclonal de ratón (Cell Signaling).

p53 monoclonal de ratón (Cell Signaling).

Rb monoclonal de ratón (Cell Signaling).

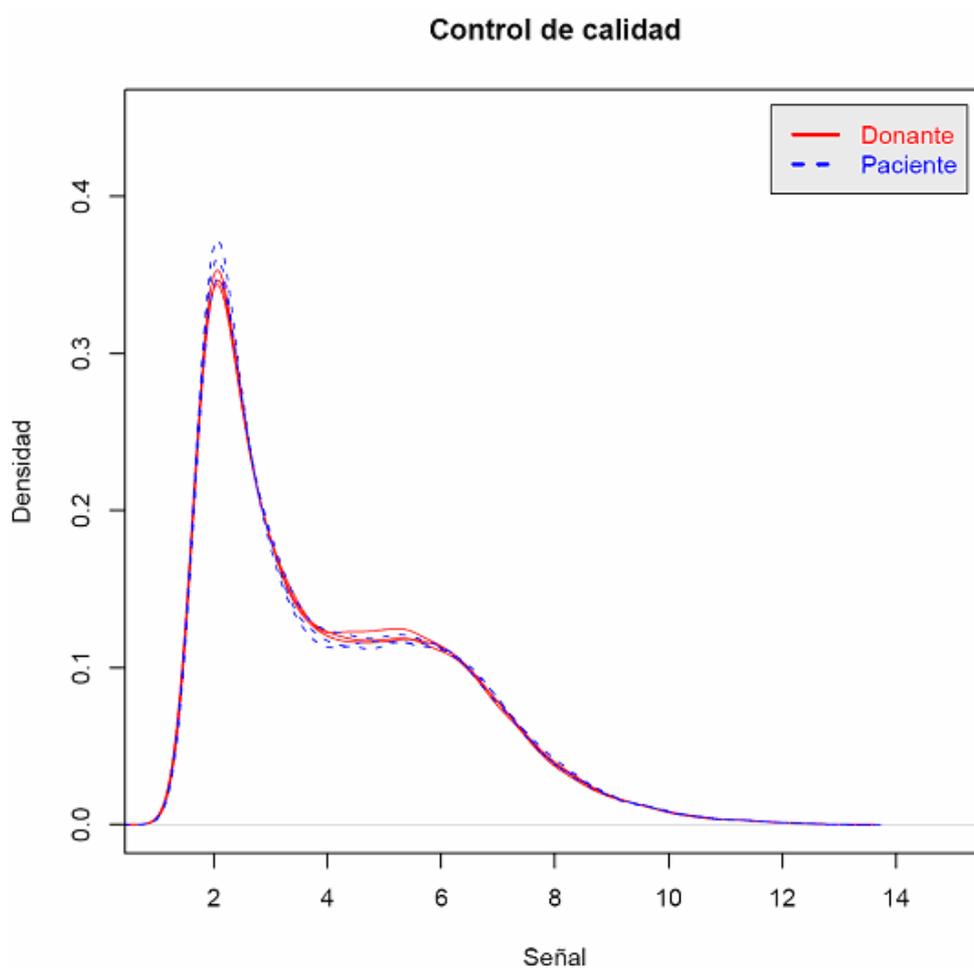
p16-INK4a monoclonal de ratón (Santa Cruz BT)

p14ARF monoclonal de ratón (Abcam)

Electroforesis bidimensional de proteínas.

Mismas condiciones que las usadas en la electroforesis 2-D del clon shARNi.

Figura 12. Control de calidad de los geles proteicos.



15. Tratamiento Estadístico.

Para estudiar la significación estadística de todos los resultados obtenidos, se hizo un análisis *ANOVA One-Way* de la Variancia para Muestras Independientes, usando el sitio web *VassarStats for Statistical Computation*.

El Laboratorio de Patología Molecular de Sarcomas y otros Tumores ha obtenido, con fecha 30 de marzo de 2007, la certificación de su sistema de gestión de calidad según la Norma ISO9001:2000, habiendo pasado con distinción el primer control anual a fecha de 9 de abril de 2008, por tanto todos los Protocolos de Trabajo (PNTs) descritos anteriormente están así mismo certificados.

RESULTADOS

Figura 2. Esquema de la clonación de las construcciones shARNi (pSUPER neo GFP).

a) Maxiprep de los distintos tipos de vectores utilizados. M: marcador de peso molecular de 1 Kb; 1: pSUPER retro 7000 pb, 2: pSUPER 3176 pb, 3: pSUPER neo GFP 5429 pb. b) Digestión del vector pSUPER neo gfp con Hind III/Bgl II para linearizar. M: marcador de peso molecular de 1Kb, V: vector. c) Corte de banda del vector pSUPER neo GFP para purificar. M: marcador de peso molecular de 1Kb, V: vector. d) Digestión tras el anillamiento y digestión con HindIII y EcoRI. M: marcador de peso molecular de 1Kb. C1, C2 y C3: clones. C1:227 pb C2 y C3: 287pb. C2 y C3 presentan el tamaño correcto, han integrado en el plásmido la construcción shARNi e) Secuencia nucleotídica (Programa Chromas).

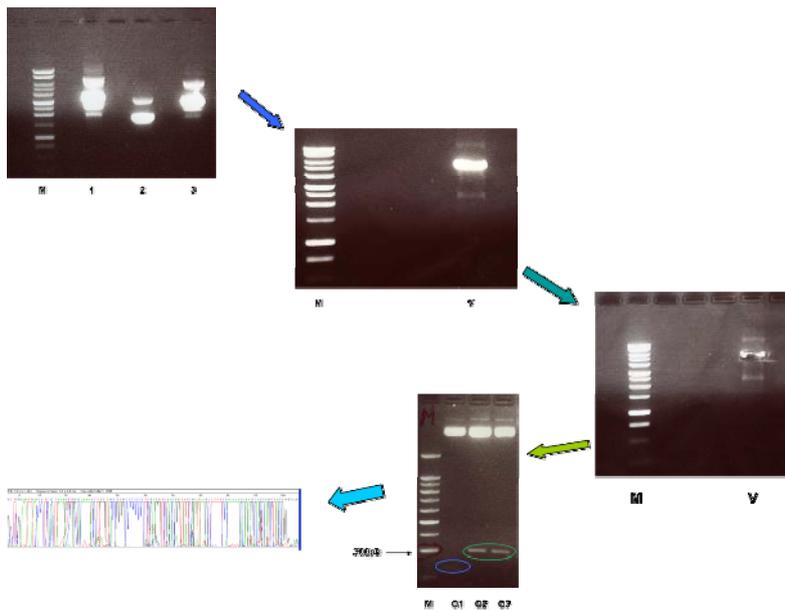
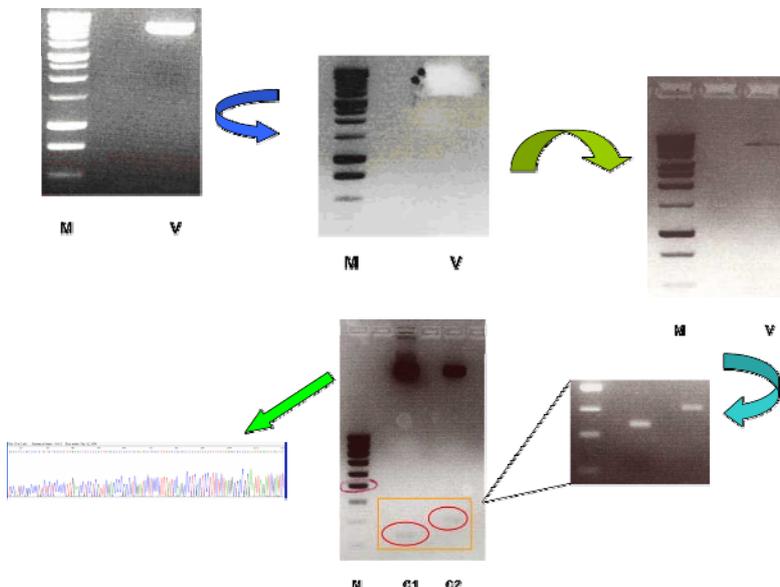


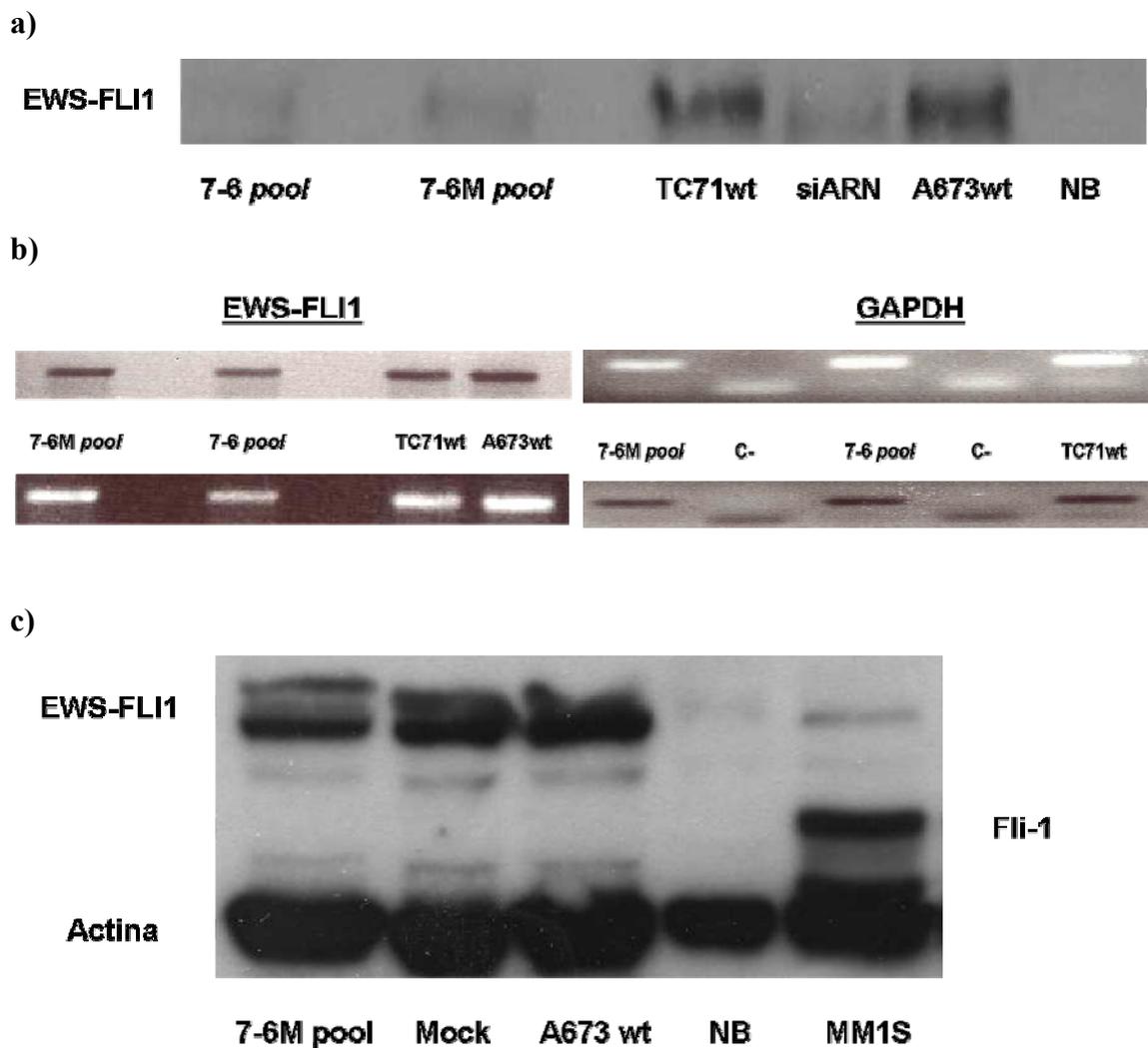
Figura 3. Esquema de la clonación de los construcciones retrovirales shARNi.

Mismo esquema que en el caso de las construcciones pSUPER neo GFP salvo el hecho de que en este caso se usa el plásmido pSUPER retro.



Una vez electroporadas las líneas celulares se procedió a realizar la selección clonal con neomicina (G418) como agente selectivo eucariota. Los primeros clones obtenidos se crecieron conjuntamente en forma de *pool* y se comprobó el efecto de la interferencia mediante Western Blot y RT-PCR.

Figura 4. Inhibición de la expresión de EWS-FLI1 en las líneas TC71 y A673. a) Reducción en los niveles de expresión de EWS-FLI1 en TC71 a nivel de proteína (Western Blot) b) Reducción en los niveles de expresión de EWS-FLI1 a nivel de ARNm (RT-PCR) c) Inhibición de EWS-FLI1 en A673 (Western Blot). siARN como control positivo de la interferencia de EWS-FLI1. NB: línea celular de neuroblastoma usada como control negativo de la expresión de EWS-FLI1. MM1S: línea celular de mieloma múltiple usada como control positivo de la expresión de Fli-1.



Sin embargo a pesar de lograr un buen efecto de inhibición de expresión de la fusión quimérica EWS-FLI1 en el *pool* de clones salvo en el caso de la línea A673 decidimos refinar el experimento y obtener clones individuales por lo que se realizó una nueva ronda transfectiva de las construcciones shARNi en las 4 líneas de SE con la subsiguiente selección clonal con neomicina. Se picaron y expandieron en torno a 40 clones por línea y diseño de shARNi. Se extrajo de cada uno ARN y proteínas para verificar el grado de reducción de la expresión de EWS-FLI1 por Western Blot y RT-PCR en tiempo real (La técnica de RT-PCR no se mostró fiable del todo y no fue capaz de proporcionarnos una información cuantitativa exacta de los niveles de ARNm de la fusión por lo que al no poder extraer conclusiones precisas con esta técnica pasamos a utilizar la técnica de RT-PCR en tiempo real).

De las 4 líneas celulares de SE se obtuvieron clones interferidos de 3 de ellas; sólo en la línea A673 fuimos incapaces de lograr obtener un clon shARNi viable.

Se comprobó la eficacia de la interferencia de la fusión EWS-FLI1 mediante Western Blot y RT-PCR en tiempo real tanto en un estadio inicial como en uno tardío, esto es, se crecieron los distintos clones interferidos obtenidos durante 8 pases más para comprobar si los efectos de la interferencia se mantenían con el transcurso de los pases celulares y por tanto se podría afirmar que contábamos con un modelo estable de interferencia.

Usando un anticuerpo contra la proteína Fli-1 pudimos comprobar que la expresión de EWS-FLI1 se encontraba disminuida en los distintos clones obtenidos de las líneas TC71, A4573 y SK-ES-1 en el estadio inicial. En un estadio tardío se produce una recuperación de los niveles de expresión de la proteína EWS-FLI1 en la gran mayoría de los clones salvo en alguno de ellos en los que se mantiene a pesar de disminuir el grado de interferencia. El control de carga fue realizado con un anticuerpo contra un epítipo de la actina. Así mismo se verificó que la inhibición de EWS-FLI1 fuese específica y sólo afectara a la fusión y no a los genes *wild type* mediante el uso de un anticuerpo para EWS, cuyos niveles se mantuvieron constantes en los distintos clones interferidos en relación a la línea celular *wild type* y el control interno transfectivo (mock). Fli-1 solamente se expresa en líneas celulares de linaje hematopoyético, como por ejemplo la línea de mieloma múltiple MM1S usada en este caso como control positivo por lo que no se ve afectada por la interferencia de EWS-FLI1 en las líneas de SE. En todos los casos se usó una línea de neuroblastoma (NB) como control negativo de la expresión de EWS-FLI1.

Figura 5. Nivel de expresión de la proteína de fusión EWS-FLI1 en la línea TC71 mediante Western Blot en los dos estadios temporales, pase T0 y pase T8. Nivel de expresión de EWS.

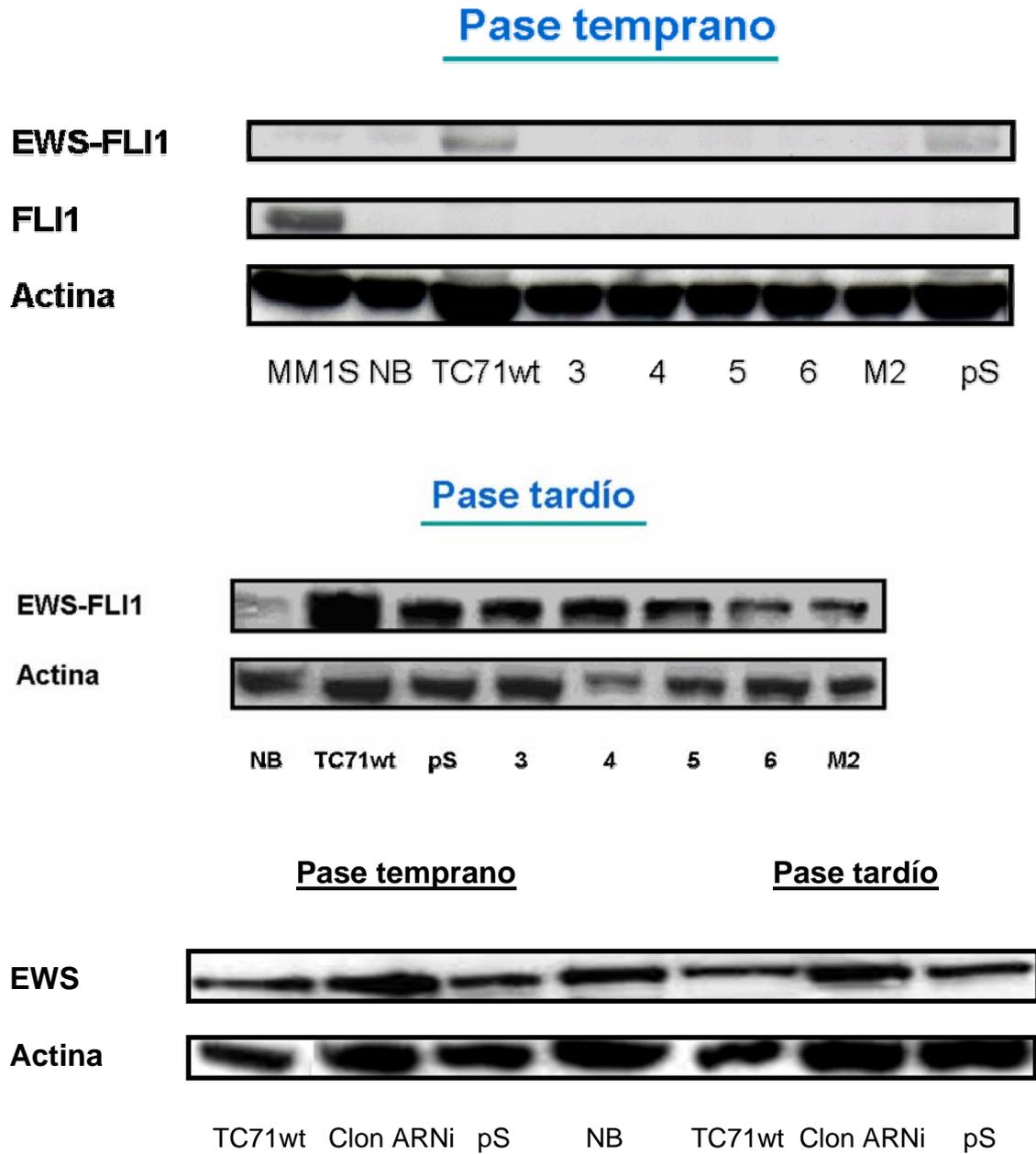
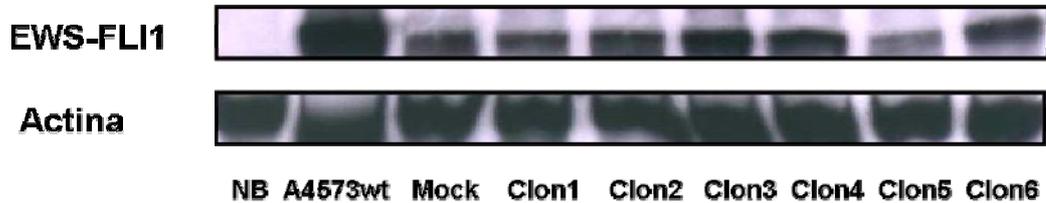
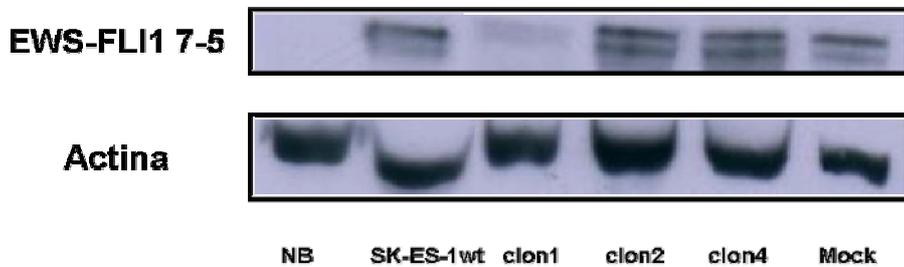


Figura 6. Nivel de expresión de la fusión EWS-FLI1 en los clones shARNi de la línea A4573 y SK-ES-1 (Western Blot). NB: línea de NB usada como control negativo de la expresión de EWS-FLI1.

a)



b)



Igualmente se comprobó el efecto de la interferencia de ARN en los niveles de ARN mensajero de los distintos clones obtenidos mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Se produjo una reducción de los niveles de la fusión EWS-FLI1 tanto en el estadio inicial como en el tardío. El grado de inhibición de la fusión génica osciló entre un 42 y un 54%.

Figura 7. Reducción del nivel de ARNm de la fusión en un clon shARNi de TC71 en ambos estadios temporales. Media \pm SD(triplicados). Se muestra el clon con mayor inhibición de EWS-FLI1.

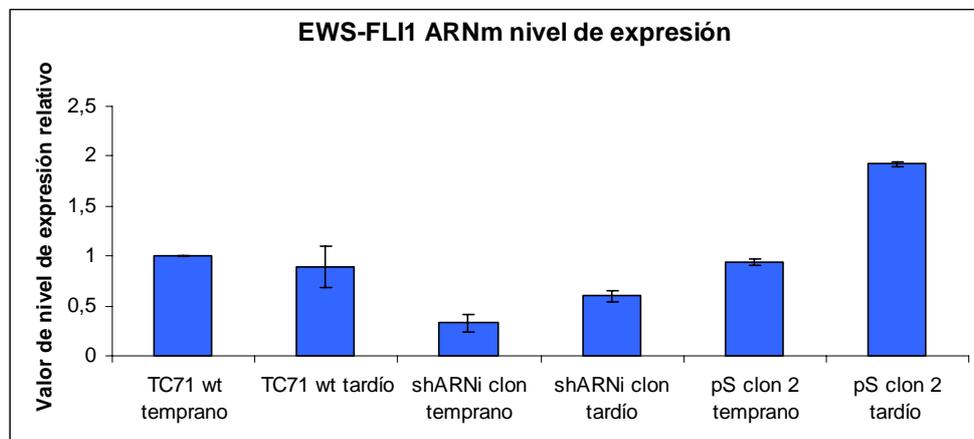
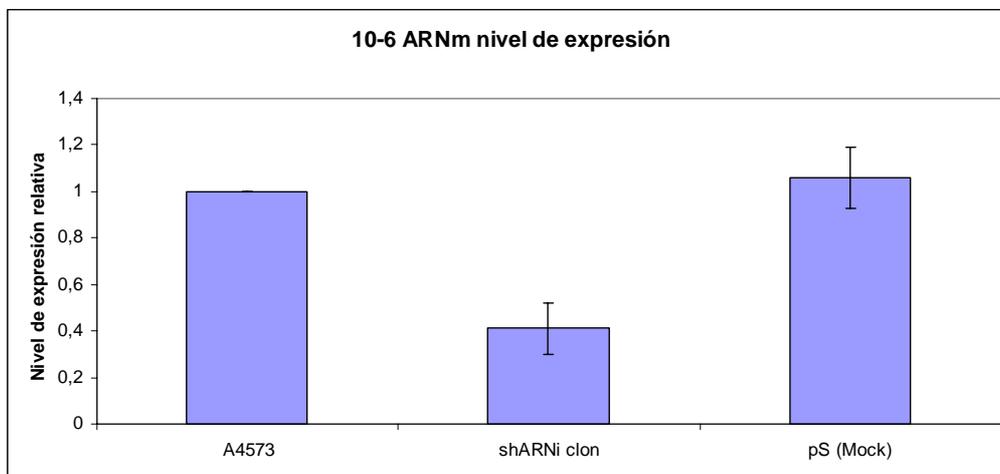
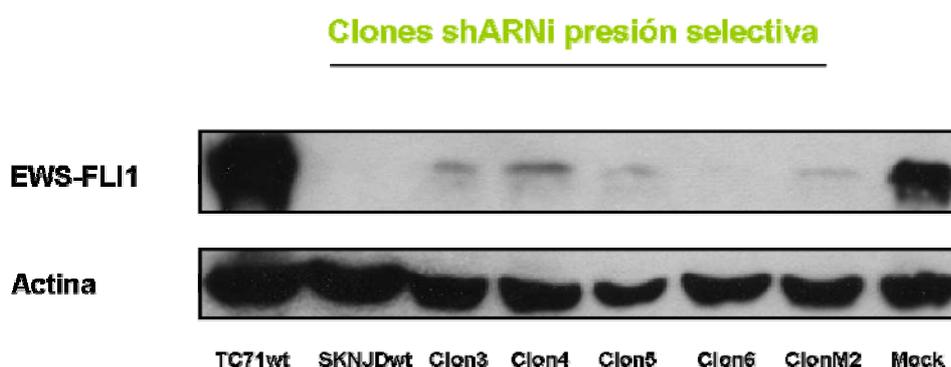


Figura 8. Reducción del nivel de ARNm de la fusión en un clon de A4573 en ambos estadios temporales. Media \pm SD (triplicados). Se muestra el clon con un mayor grado de inhibición de la fusión.



Para comprobar si la presión selectiva clonal afectaba de alguna forma a los clones interferidos y a la inhibición de EWS-FLI1 se crecieron por espacio de 2 semanas los clones ARNi de la línea TC71 aumentando progresivamente la concentración de neomicina hasta doblarla. No se observó efecto alguno adicional, los clones mantuvieron los niveles de inhibición de la fusión quimérica con los que ya contaban.

Figura 9. Nivel de expresión de la fusión EWS-FLI1 en los clones shARNi sometidos a un régimen de presión selectiva.



2. Efectos de la inhibición de EWS-FLI1 en la línea de SE, TC71. Caracterización del modelo shARNi.

Una vez obtenidos clones interferentes en las líneas TC71 y A4573 pasamos a caracterizar los mismos tratando de descubrir los efectos motivados por la inhibición de la expresión de EWS-FLI1. Si bien también obtuvimos clones interferentes en la línea SK-ES-1 dichos clones resultaron afectados por una contaminación en cultivo por lo que no se pudo profundizar en su estudio.

De las dos líneas celulares tan sólo los clones de la línea TC71 (fusión tipo 1, 7-6) mostraron efectos significativos como consecuencia de la inhibición de la expresión de la fusión. En la línea A4573 la reducción de los niveles de la fusión (fusión tipo 3, 10-6) no llevó aparejada consecuencia fenotípica alguna.

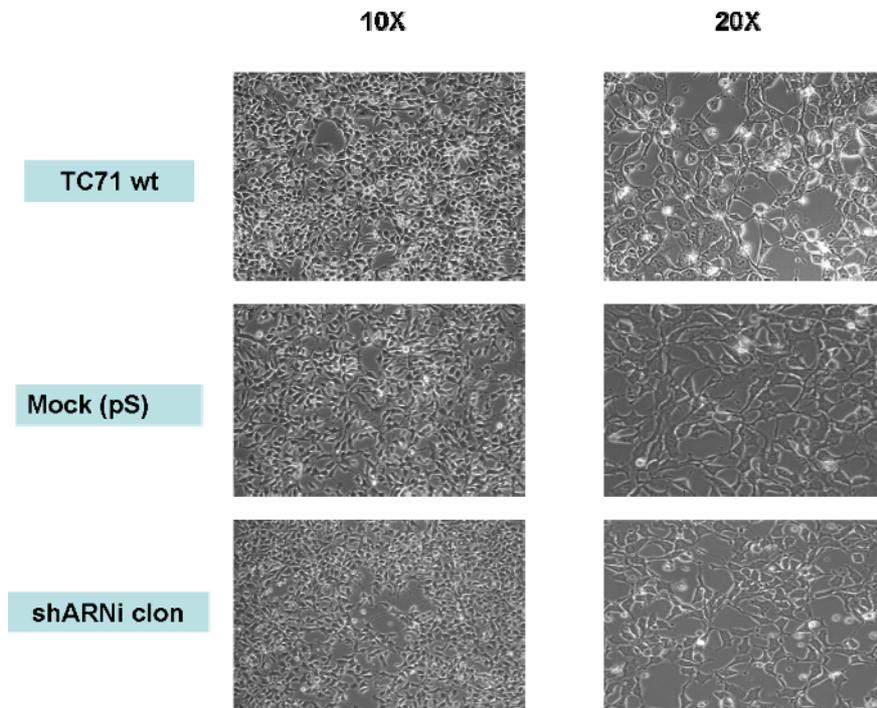
Estudios in vitro.

Del conjunto de clones shARNi de la línea celular TC71 se seleccionó aquel con el mayor grado de inhibición y que mantenía el efecto de la interferencia con el transcurso de los pases celulares, el clon 6, con el fin de evaluar las consecuencias de la inhibición de la expresión de la fusión quimérica a nivel celular y molecular.

a) Morfología celular.

Apenas si se apreciaron diferencias en cuanto a la morfología entre el clon interferido, el control interno transfectivo/mock (pSUPER) y la línea TC71wt. Existen pocas diferencias en cuanto a morfología salvo que las células del clon interferido tienden a crecer más juntas, algo más apelotonadas, con forma romboidea y con pocas prolongaciones tipo neurita. Tampoco apreciamos diferencias con el transcurso de los pases celulares.

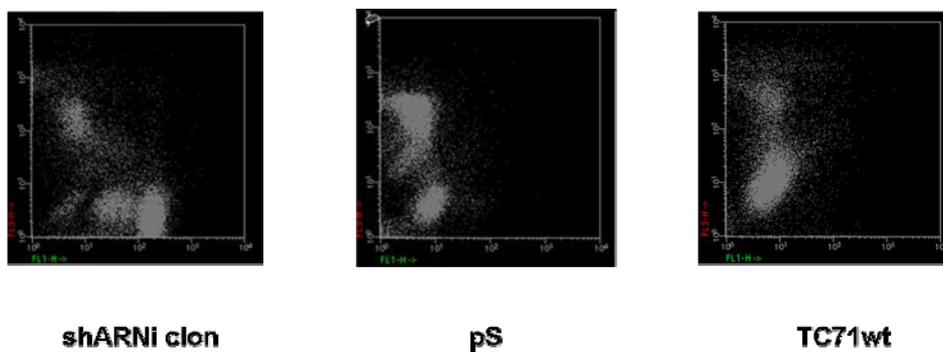
Figura 10. Morfología del clon shARNi. Fotos tomadas con un microscopio Nikon a 10X y 20X.

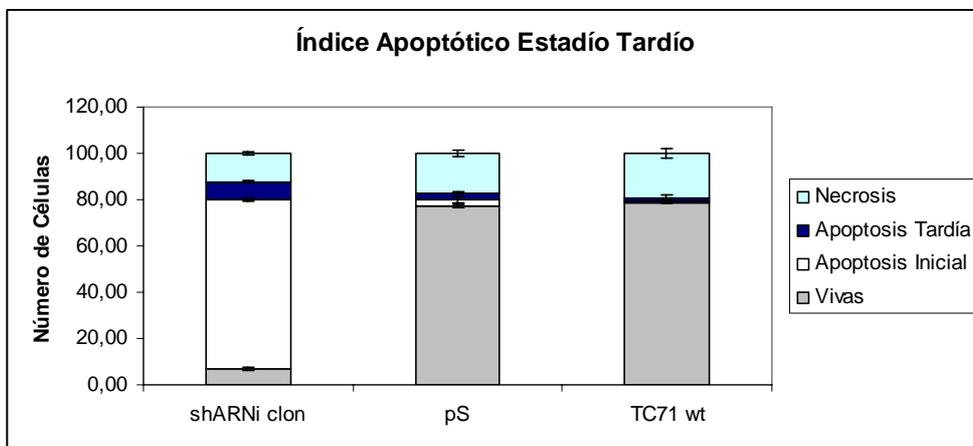
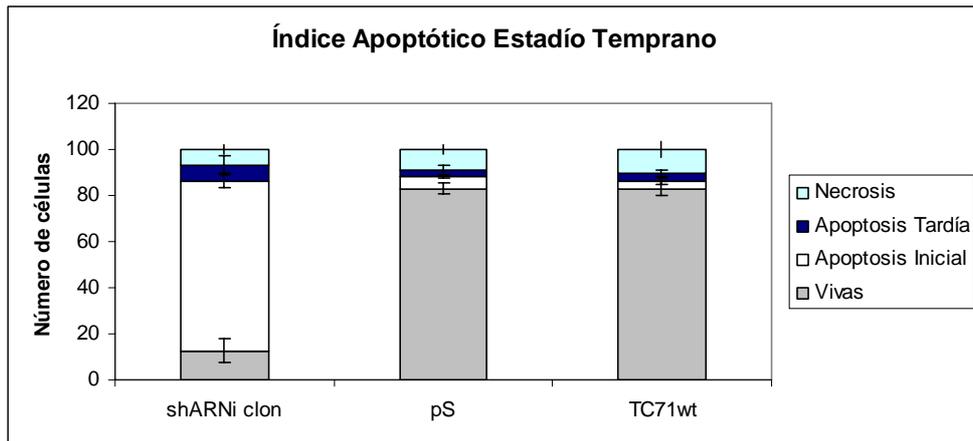


b) Índice apoptótico.

Quisimos comprobar si la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 provocaba una activación apoptótica. El clon TC-71 shARNi mostró un marcado incremento en el índice apoptótico cercano al 70% tanto en el estadio inicial como en el tardío como se pudo verificar mediante los estudios de anexina V por citometría de flujo.

Figura 11. Análisis del perfil apoptótico del clon shARNi en los dos estadios temporales. pS = Mock.

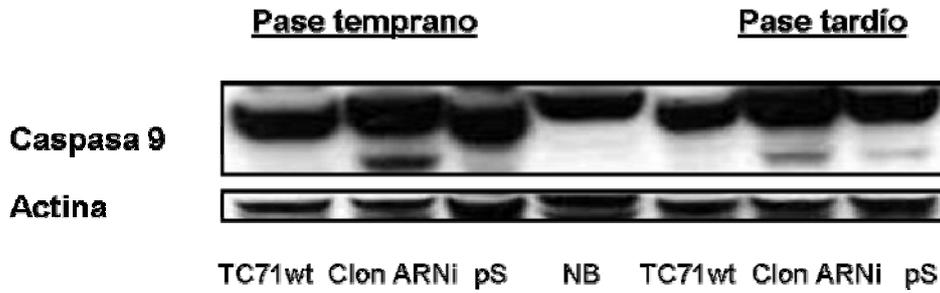




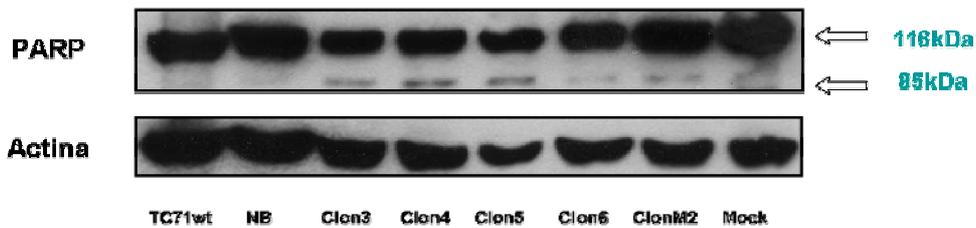
Por Western Blot pudimos comprobar el procesamiento en el clon shARNi de la forma inactiva de la caspasa 9 dando lugar a la forma activa en ambos estadios. Aunque una ligera activación también pudo ser detectada en el mock resultó insuficiente de cara a desencadenar una respuesta apoptótica. Pudimos verificar por tanto que la apoptosis inducida como consecuencia de la inhibición de EWS-FLI1 tenía lugar vía activación de caspasa 9, caspasa iniciadora que activa a su vez a las caspasas efectoras, 3 y 7 como se confirma por el procesamiento del sustrato de la caspasa 3, PARP. Así pues la cascada de las caspasas está activada en el clon interferente.

Figura 12. Activación de la cascada apoptótica. A) Análisis de la expresión de caspasa 9 por Western Blot. B) Procesamiento de PARP detectado por Western Blot en un estadio temprano. pS = Mock.

a)



b)

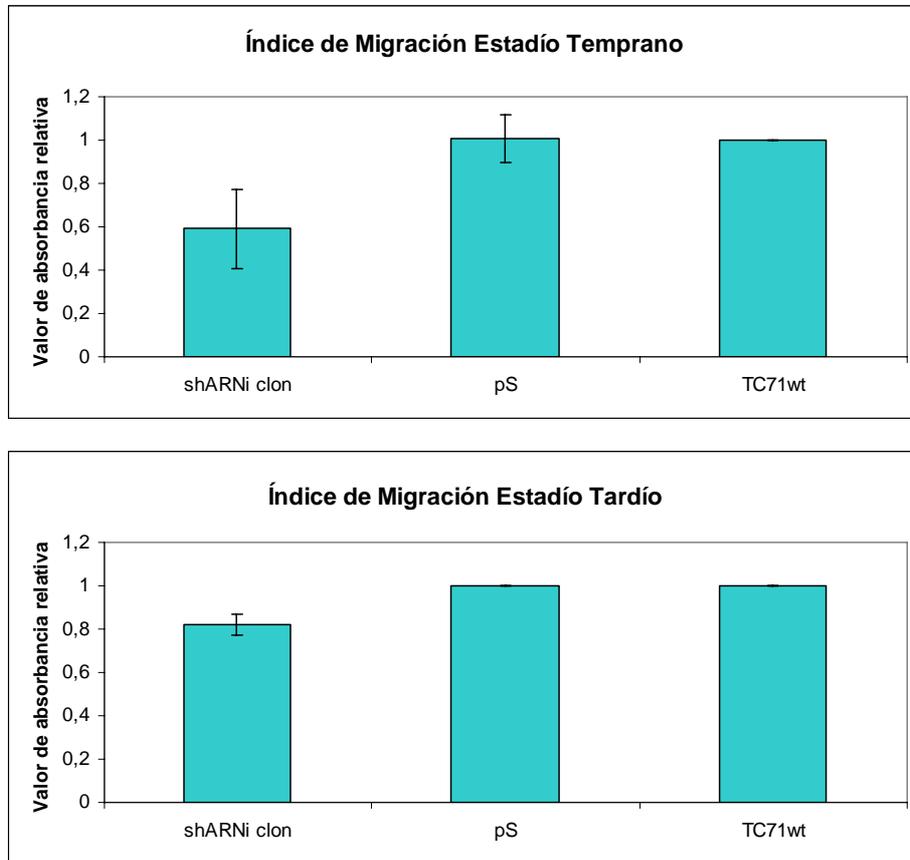


c) Migración.

Para determinar si la reducción de los niveles de EWS-FLI1 afectaba a la capacidad de las células del clon shARNi para migrar se llevó a cabo un ensayo de migración mediante el uso de *Transwell*. La capacidad migratoria de estas células con la fusión reducida estaba claramente disminuida en ambos estadios temporales con un descenso del 45% en el estadio temprano y del 20% en el estadio tardío.

Figura 13. a) Índice migratorio en ambos estadios temporales. Ensayo Transwell. Medición del valor relativo de absorbancia a 570nm **b) Células migradas a la parte inferior del *Transwell* estadio temprano.** Fotos con microscopio óptico Nikon y un objetivo 10X.

a)



b)

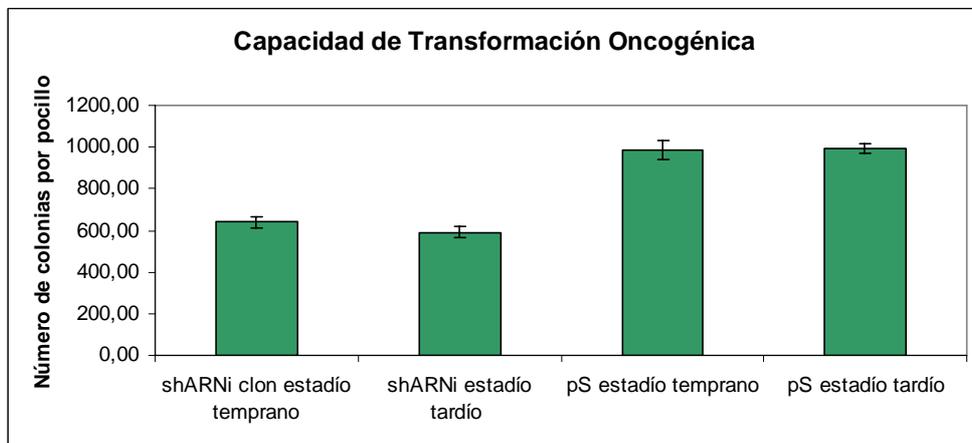


d) Capacidad de transformación.

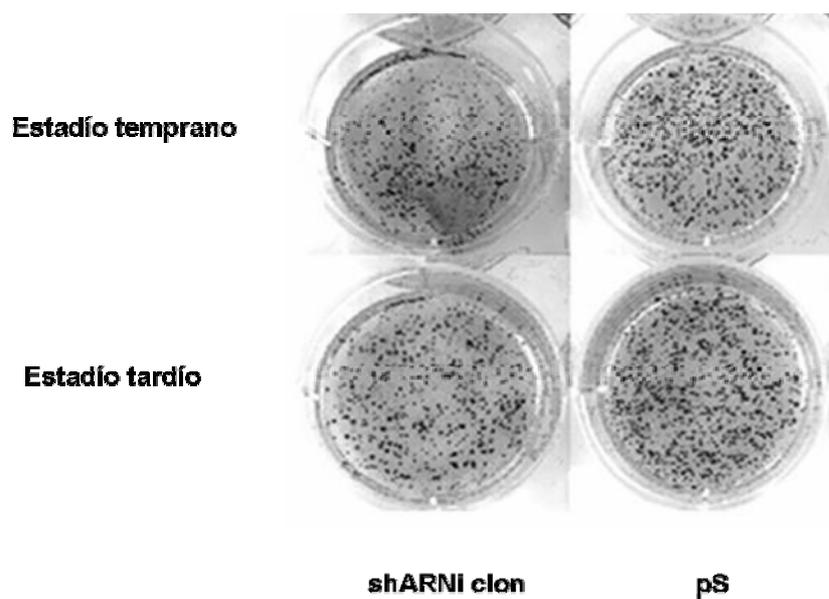
Por medio del ensayo de crecimiento en agar blando se midió la capacidad de transformación oncogénica/crecimiento independiente de anclaje del clon shARNi. El clon shRNAi mostró una menor capacidad de transformación que se manifestó dando lugar a un menor número de colonias y de menor tamaño con una reducción del 35-40% en comparación con el mock, reducción que además se mantuvo con el transcurso de los pases celulares.

Figura 14. a) Medida de la capacidad de transformación oncogénica. b) Fotografía del aspecto de las colonias de un pocillo del clon shARNi y del mock (pS).

a)



b)

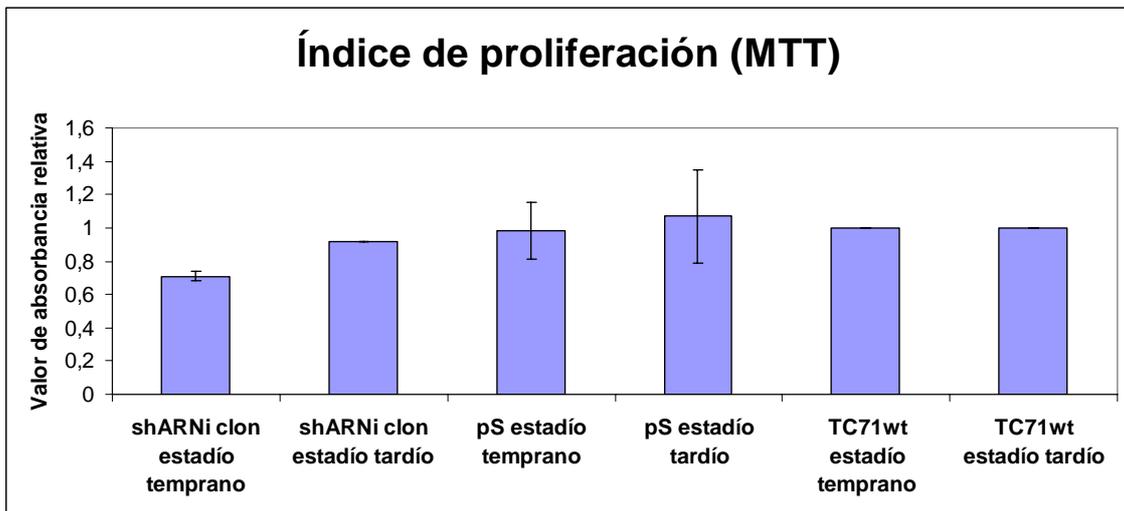


e) Proliferación.

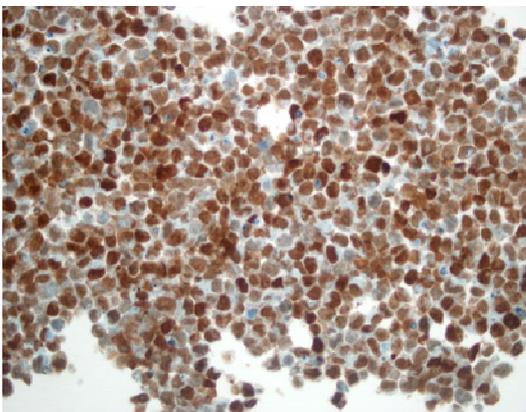
La tasa de proliferación de las células interferidas se redujo un 30% en comparación con el mock y la línea celular *wild type* aunque tan solo en el estadio temprano ya que este efecto inhibitorio se perdió en el estadio tardío. La medición se hizo mediante ensayos MTT. Así mismo se realizó en el estadio inicial una tinción inmunohistoquímica sobre pellet celular del marcador de proliferación Ki-67 mostrando en el clon shARNi tanto una disminución de la intensidad de la señal de Ki-67 como del número de células teñidas.

Figura 15. a) Índice de proliferación medido por MTT. b) Inmunohistoquímica para Ki-67 sobre pellets celulares. Estadio temprano.

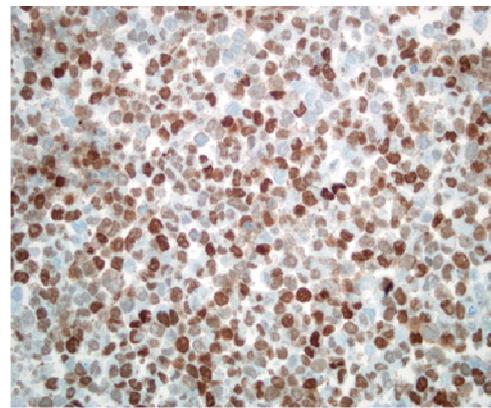
a)



b)



Mock (PS)

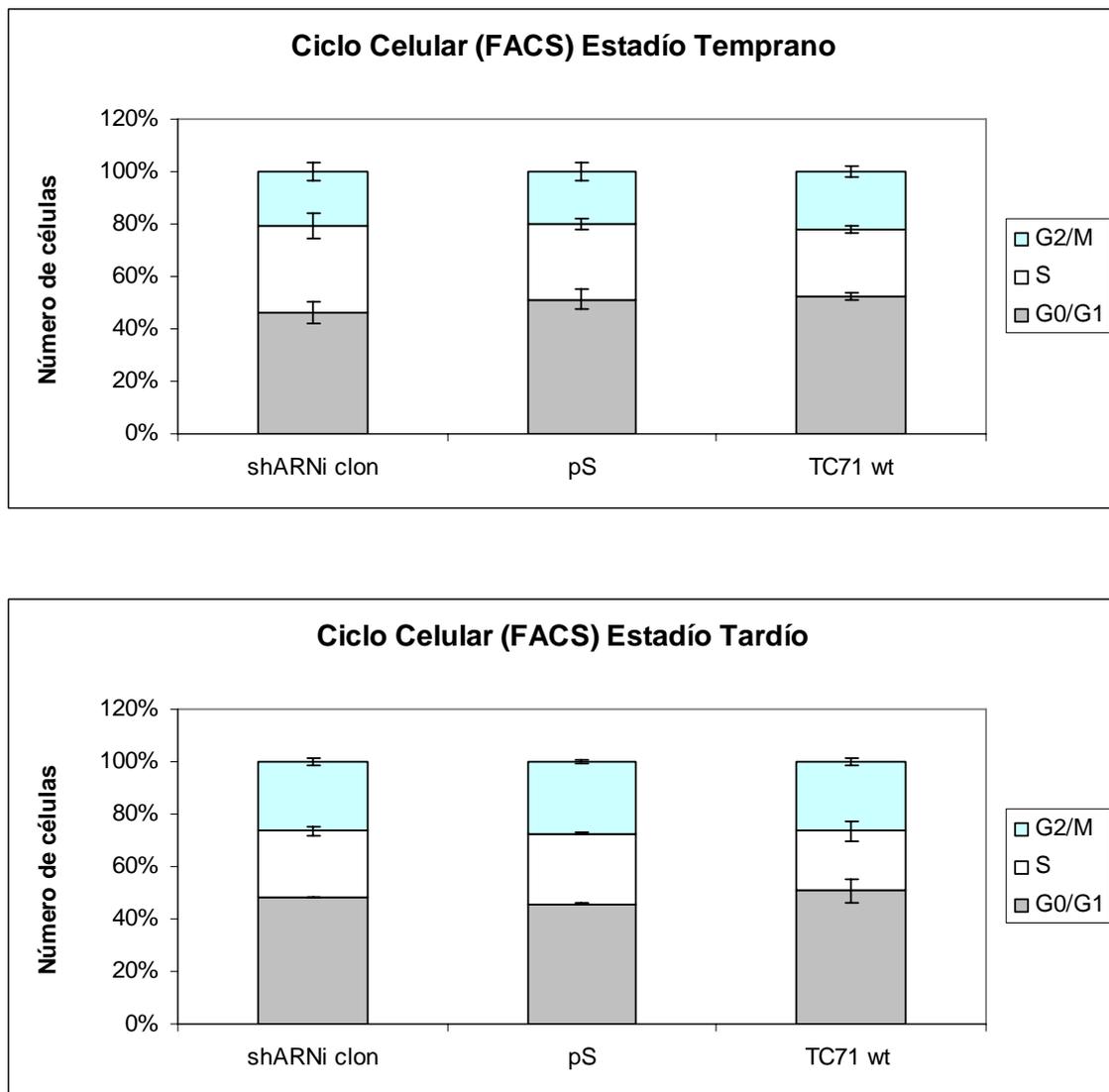


Clon shARNi

Ciclo celular.

El estado del ciclo celular del clon shARNi se comprobó mediante marcaje con yoduro de propidio por citometría de flujo. No se encontraron diferencias en cuanto a la distribución de las células al inhibir EWS-FLI1 en ambos estadios temporales.

Figura 16. Ciclo celular (FACS). Pases celulares T0 (estadio temprano) y T8 (tardío).

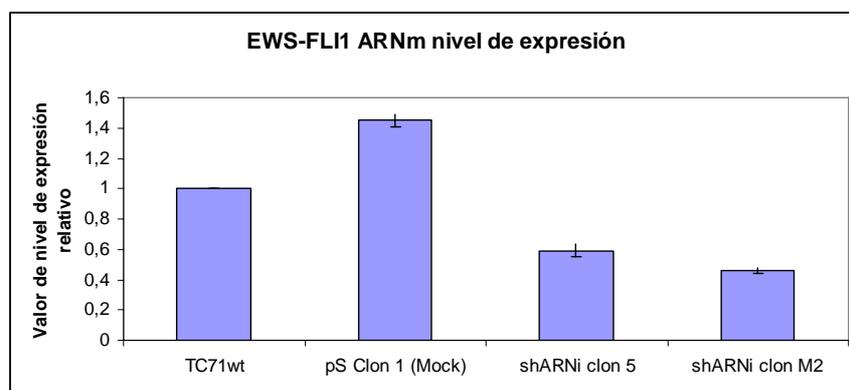


3. Efectos de la inhibición de EWS-FLI1 en otros clones shARNi de TC71. Especificidad de la interferencia.

Con los restantes clones shARNi de la línea de ES, TC71 se obtuvieron resultados similares en cuanto a la tasa de proliferación, la distribución del ciclo celular y el índice apoptótico en el estadio temprano. Decidimos emplear dos clones distintos al clon con mayor grado de inhibición, los clones 5 y M2 así como un nuevo control interno transfectivo (pS1). Estos clones poseen un menor grado de interferencia de la fusión en el estadio tardío. Quisimos averiguar si los efectos observados en el estadio temprano desaparecían o se mantenían en estos clones en el estadio tardío.

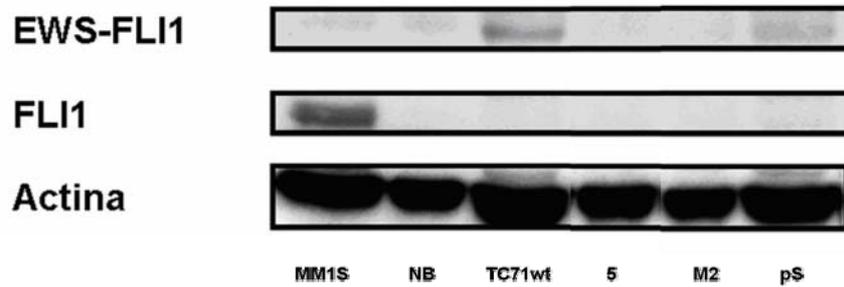
Figura 17. Análisis del nivel de inhibición de EWS-FLI1 en los clones shARNi seleccionados. a) Análisis por RT-PCR en tiempo real del nivel de expresión del ARNm de EWS-FLI1 en el estadio temprano b) Análisis por Western Blot del nivel proteico de la fusión en ambos estadios temporales.

a)

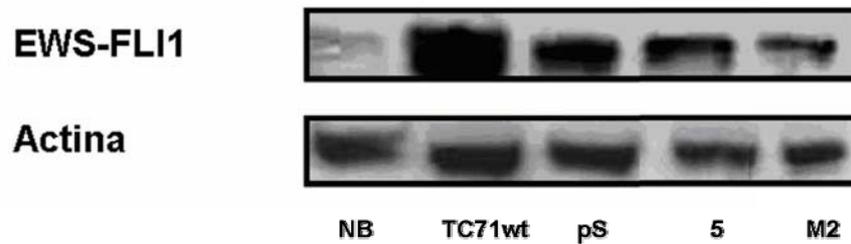


b)

Estadio temprano



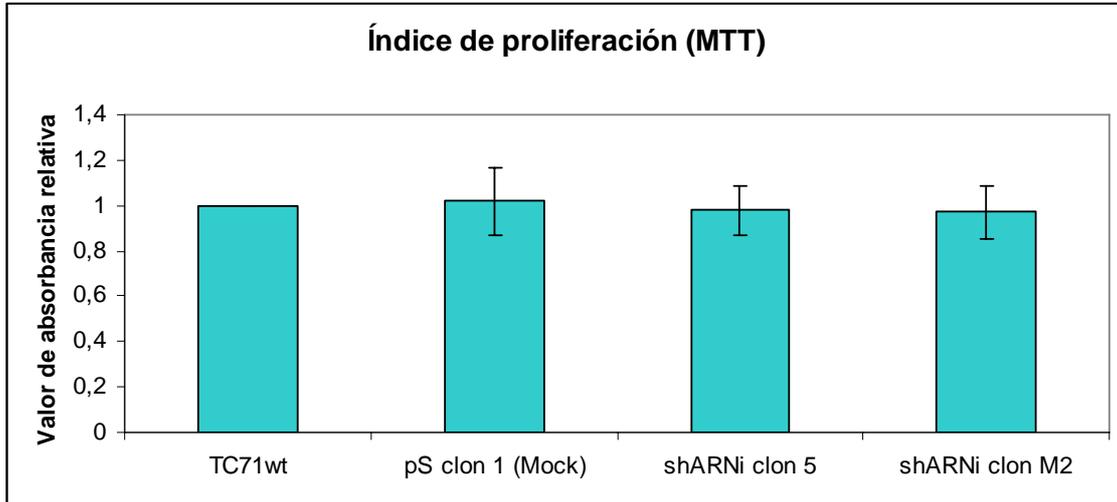
Estadio tardío



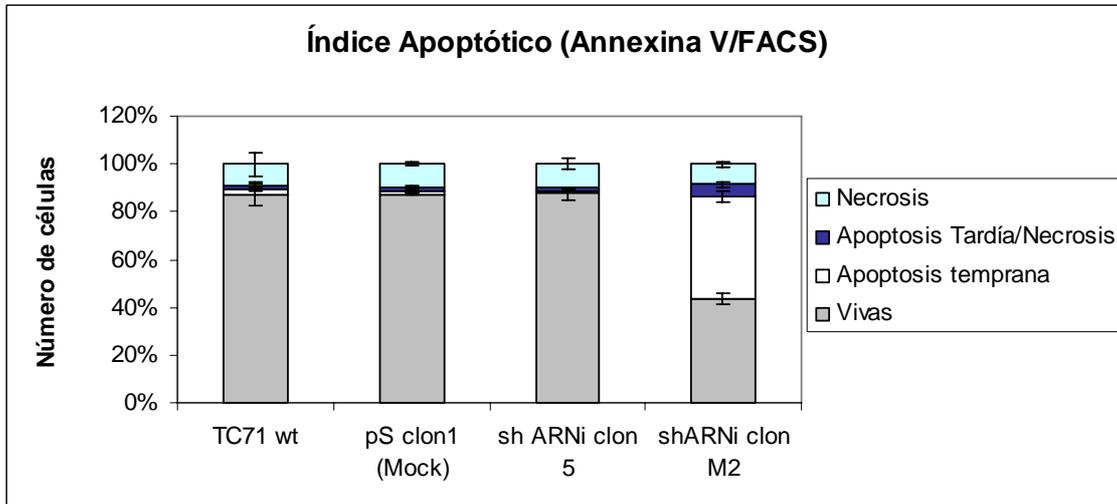
De acuerdo a los efectos observados pudimos establecer en el estadio tardío, ya que en el temprano el grado de reducción de la fusión es prácticamente el mismo, una correlación directa entre el grado de inhibición de la fusión y la extensión de los cambios debidos a la misma confirmando de esta forma que los efectos observados al reducir la expresión de EWS-FLI1 fueron específicos y no efectos clonales inespecíficos.

Figura 18. Análisis de los efectos debidos a la inhibición de EWS-FLI1 en los clones shARNi seleccionados. a) Estudio del nivel de proliferación mediante el ensayo MTT. b) Medición del índice apoptótico mediante marcaje con IP y FACS. c) Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS).

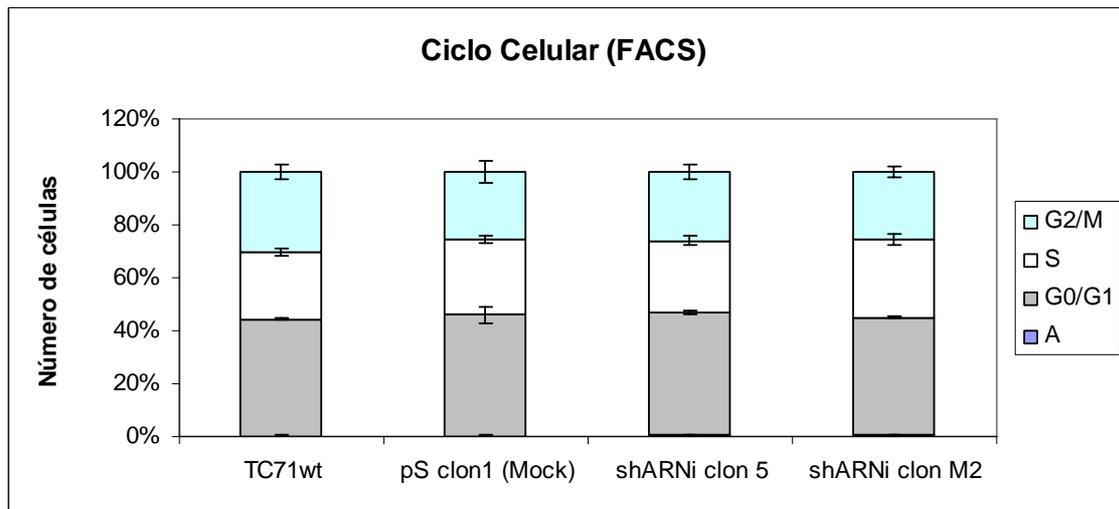
a)



b)



c)

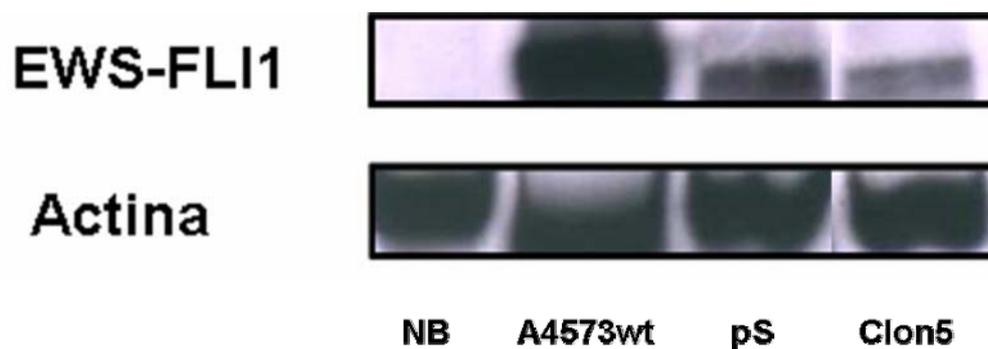


4. Estudio de los efectos de la interferencia de la fusión EWS-FLI1 tipo 3 (10-6) en la línea celular de SE, A4573.

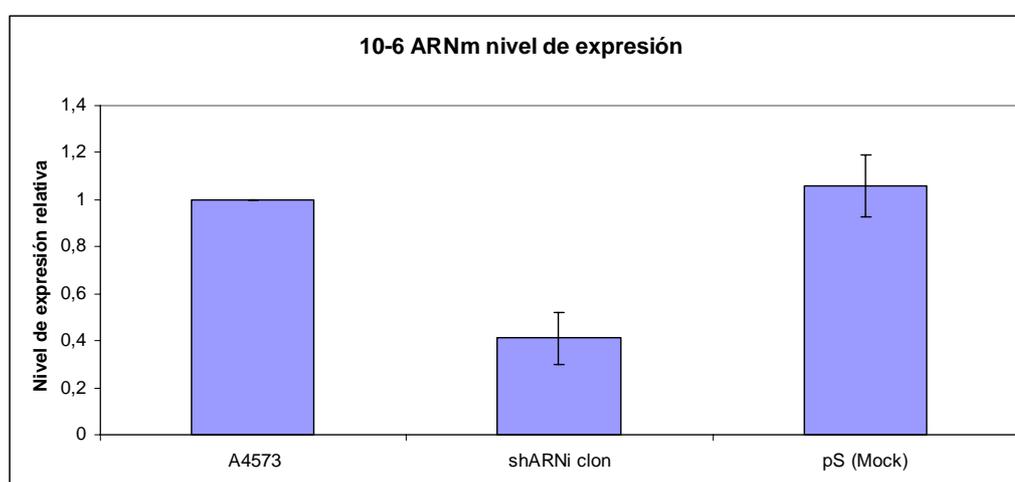
Del conjunto de clones interferentes de la línea celular A4573 se seleccionó aquel con el mayor grado de inhibición, clon 5, con el fin de evaluar las consecuencias de la inhibición de la expresión de la fusión quimérica a nivel celular y molecular.

Figura 19. a) Análisis de los niveles de expresión de EWS-FLI1 del clon shARNi de A4573 a nivel proteico y b) de ARNm mediante Western Blot y RT-PCR en tiempo real. (Media \pm SD. Triplicados).

a)

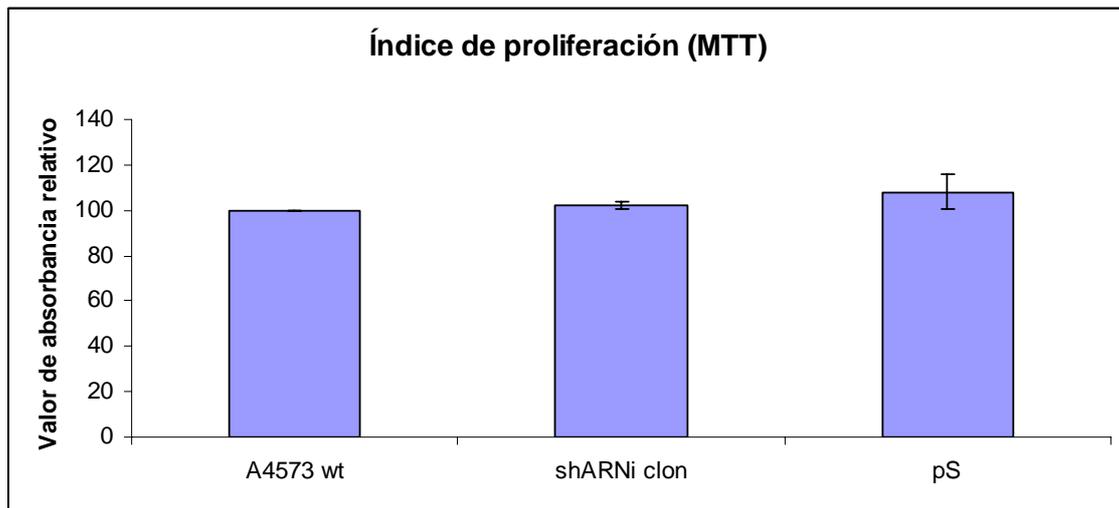


b)



La inhibición de la expresión de la fusión EWS-FLI1 en el clon shARNi de A4573 no supuso una disminución de la tasa de proliferación como se pudo comprobar por medio de un ensayo MTT.

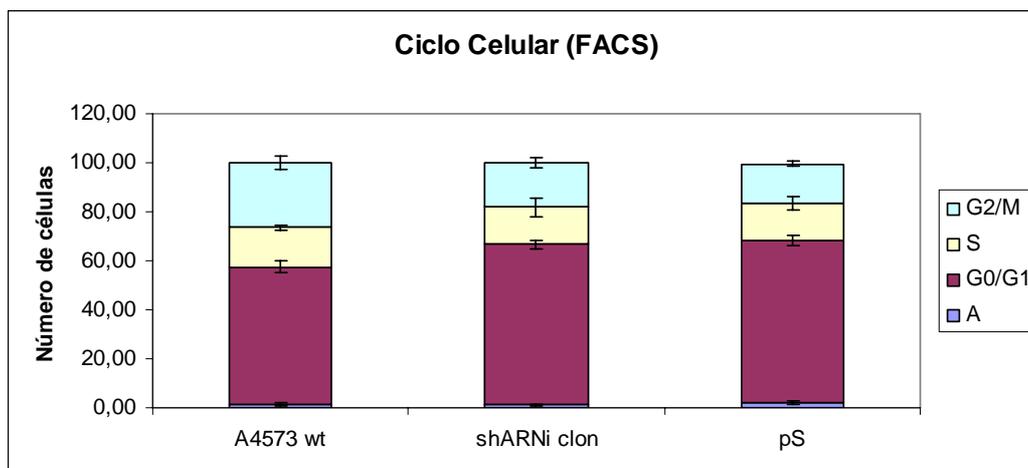
Figura 20. Índice de proliferación (MTT).



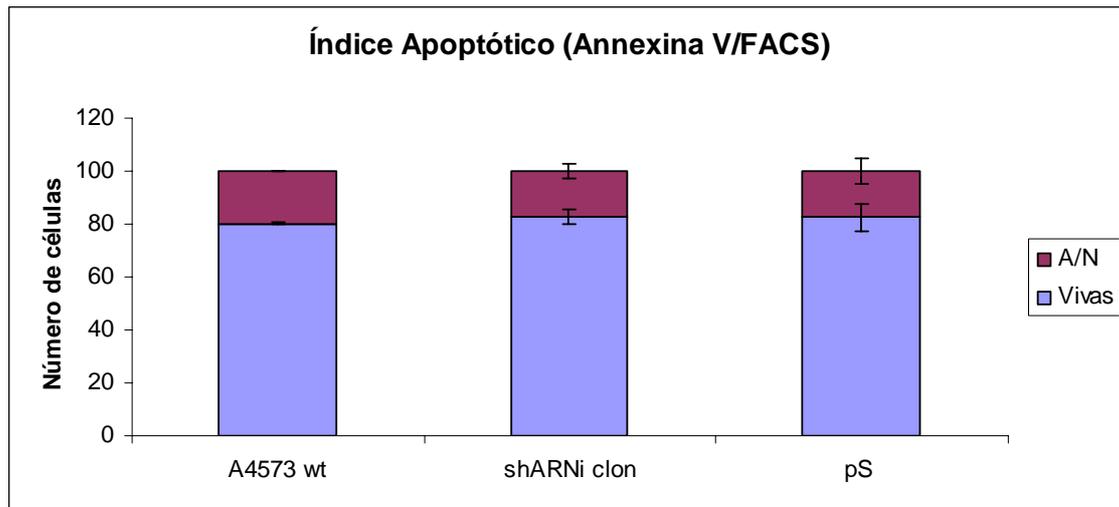
Tampoco se produjeron cambios en el clon interferido en el patrón de distribución celular en las distintas fases del ciclo celular ni el clon interferente mostró diferencia alguna en cuanto al grado de inducción apoptótica con relación a la línea celular A4573wt y al mock (pS).

Figura 21. a) Ciclo celular. b) Índice apoptótico.

a)



b)



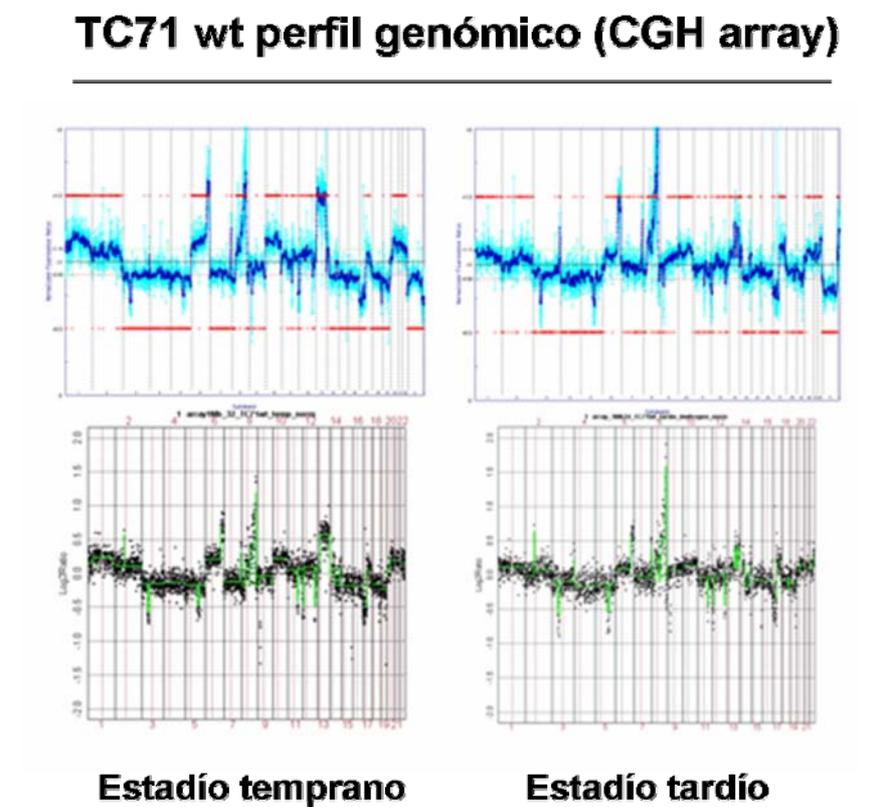
5. Análisis del estatus genómico del clon

shARNi.

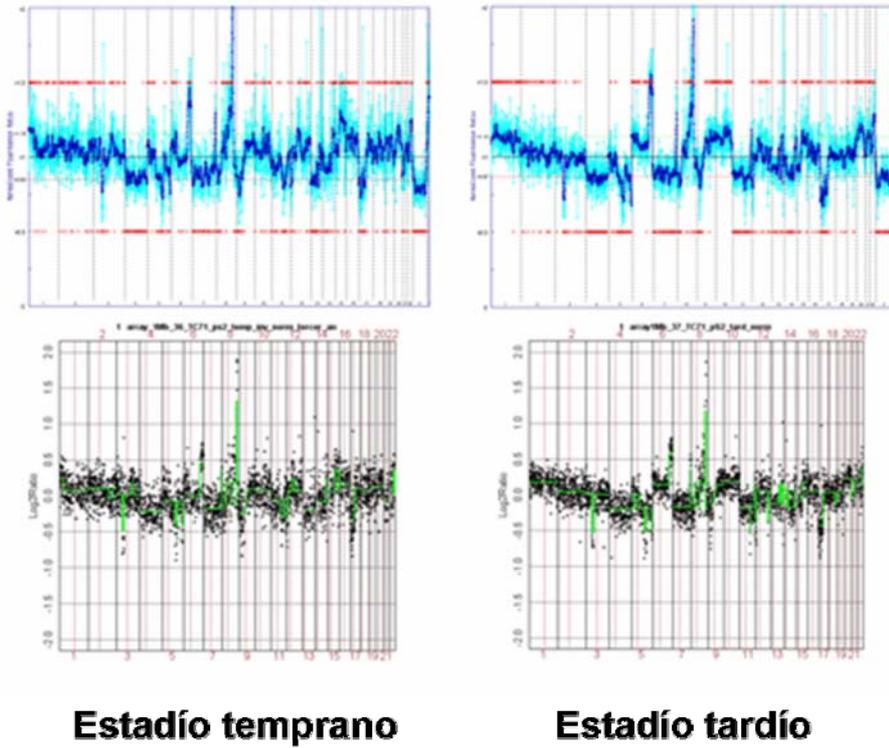
Con el fin de determinar si los cambios observados en la inhibición de la fusión EWS-FLI1 pudieran estar condicionados total o parcialmente por posibles alteraciones del estatus genómico del clon shARNi se llevó a cabo un análisis del estatus genómico del mismo mediante el uso de matrices de hibridación genómica comparada (CGH array). Se analizaron así mismo el mock y la línea celular TC71 y en el estadio temprano y en el tardío para todos los casos.

No se detectaron modificaciones en forma de alteraciones cromosómicas adicionales a lo largo de los pases celulares confirmando que los cambios en el comportamiento molecular del clon shARNi se debieron exclusivamente a la supresión de la expresión de la fusión quimérica EWS-FLI1 mediada por shARNi y no a ningún tipo de mutación o alteración genética secundaria.

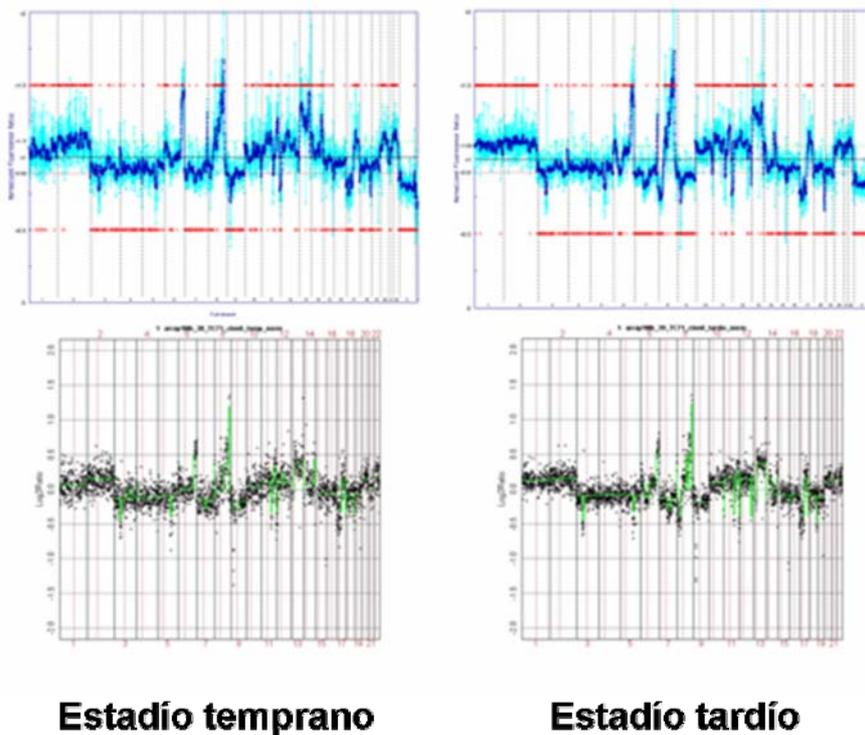
Figura 22. Perfil genómico analizado por CGH array.



pS wt perfil genómico (CGH array)



shARNi wt perfil genómico (CGH array)



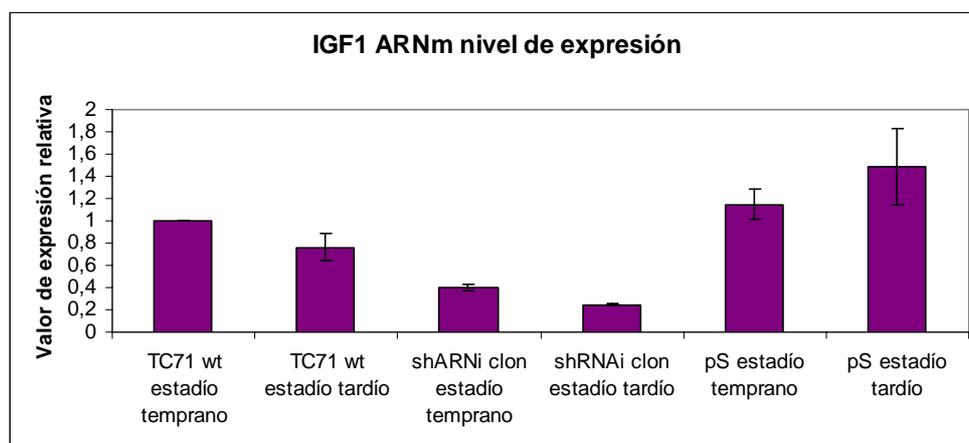
6. Estudio de la vía de IGF1/IGF1R.

Una de las vías de transducción de señales de mayor importancia en la biología molecular del SE es la de IGF1/IGF1R. Los análisis de expresión génica del clon shARNi (*microarrays*) mostraron una reducción en los niveles de expresión de IGF1 por lo que y dada la importancia de esta vía de señalización decidimos comprobar el estado de la misma en el clon interferido y las consecuencias que sobre dicha vía pudiera tener la inhibición de la fusión.

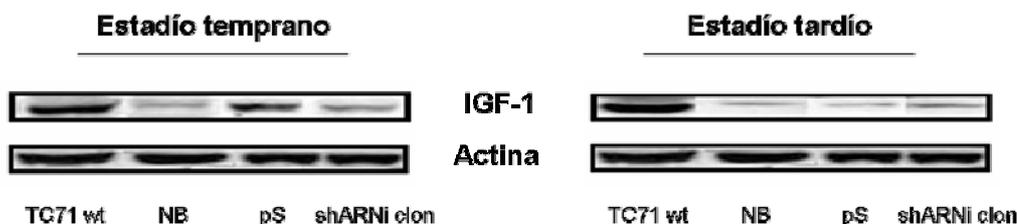
En primer lugar decidimos confirmar mediante análisis de WB y de RT-PCR en tiempo real la disminución en los niveles de IGF1 en el clon interferido. Efectivamente se produce una reducción de la expresión de IGF1 en el clon shARNi mediante el uso de ambas técnicas.

Figura 23. Análisis de los niveles de IGF1 a nivel de ARNm y WB en el clon shARNi.

a)

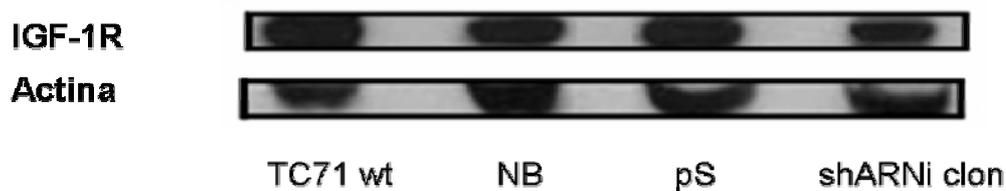


b)



Se comprobó el estado del receptor de IGF-1, IGF1R y se corroboró la ausencia de cambios a nivel de expresión proteica así como a nivel de IHQ en pellets celulares. Así pues los cambios observados se deben a la reducción de los niveles del ligando IGF-1 y no del receptor IGF1R.

Figura 24. Análisis del nivel de IGF1R a nivel proteico mediante Western Blot.



Pudimos confirmar la hipótesis de que el clon shARNi pudiera ser más sensible a los efectos de distintos inhibidores de la vía de transducción de señales de IGF1/IGF1R. Se emplearon los inhibidores NVP-AEW541, PD98059 y LY294002. NVP-AEW541 es un inhibidor de bajo peso molecular de las quinasas de la vía IGF1 derivado de la pirrol[2,3-d] pirimidina, mientras que PD98059 y LY294002 bloquean a MEK y PI3-K respectivamente, que son genes clave en esta vía de señales.

NVP-AEW541 induce una parada del ciclo celular en G1. Las células del SE son más sensibles a los efectos de esta droga comparadas con las de rhabdomiosarcoma u osteosarcoma. NVP-AEW571 interacciona positivamente con vincristina, actinomicina D e ifosfamida y muestra efectos subaditivos con doxorubicina y cisplatino. Inhibe junto a vincristina el crecimiento de los tumores en los ratones desnudos. PD-98059 (2'-Amino-3'-metoxiflavona), $C_{16}H_{13}NO_3$, es un potente y específico inhibidor de MAP quinasa quinasa (MEK). Bloquea selectivamente la activación de MEK inhibiendo la fosforilación de la misma y actúa como inductor apoptótico en numerosos tipos celulares al bloquear la vía antiapoptótica de PI3-K/Akt. LY-294002 (2-(4-Morfolinyl)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-1), $C_{19}H_{17}NO_3$, es un inhibidor potente y específico permeable de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI 3 quinasa).

Estudiamos la influencia de la administración de NVP-AEW541, PD98059 y LY294002 en los niveles de expresión de genes clave en esta vía como AKT, p-AKT, MAPK42/44 y p-MAPK 42/44 mediante Western Blot y evaluamos la inducción de apoptosis y la represión de la proliferación de estos inhibidores anti-proliferativos y pro-apoptóticos mediante citometría de flujo y MTT.

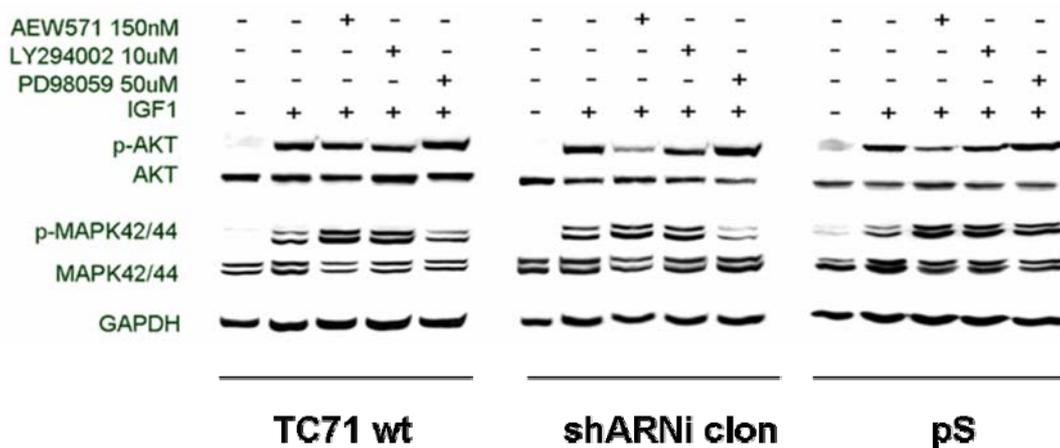
La disminución de los niveles de EWS-FLI1 provocó que el clon shRNAi fuera más sensible a las acciones de los inhibidores NVP-AEW541, PD98059 y LY294002 dando lugar a un IC50 menor en todos los casos.

Figura 25. IC50 de proliferación.

		Tipo de Droga/Inhibidor		
		AEW571 150nM	LY294002 10µM	PD98059 50µM
TC71 wt		135,51 +/- 8,67	7,27 +/- 0,604	15,93 +/- 1,43
pS		141,19 +/- 10,54	9,96 +/- 1,28	27,09 +/- 3,03
shARNi clon		112,04 +/- 8,75	6,35 +/- 0,70	11,79 +/- 0,63

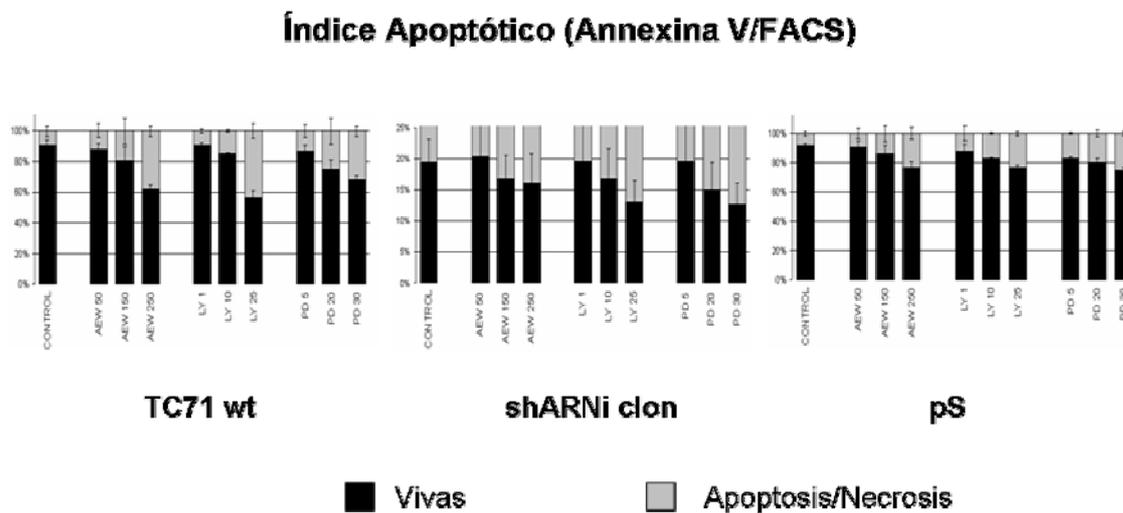
Los niveles proteicos de p-AKT y p-MAPK42/44 disminuyeron en el clon shARNi con la estimulación mediante la administración a las células del ligando IGF1 mientras que por el contrario en la línea celular TC71 wt y en el mock se mantuvo sin cambios el estado de fosforilación de ambas quinasas. Los niveles absolutos de ambas quinasas no se vieron afectados en ningún caso.

Figura 26. Niveles proteicos de AKT, MAPK42/44 y sus niveles de fosforilación tras la administración de IGF1 y el tratamiento con NVP-AEW571, PD98059 y LY294002.



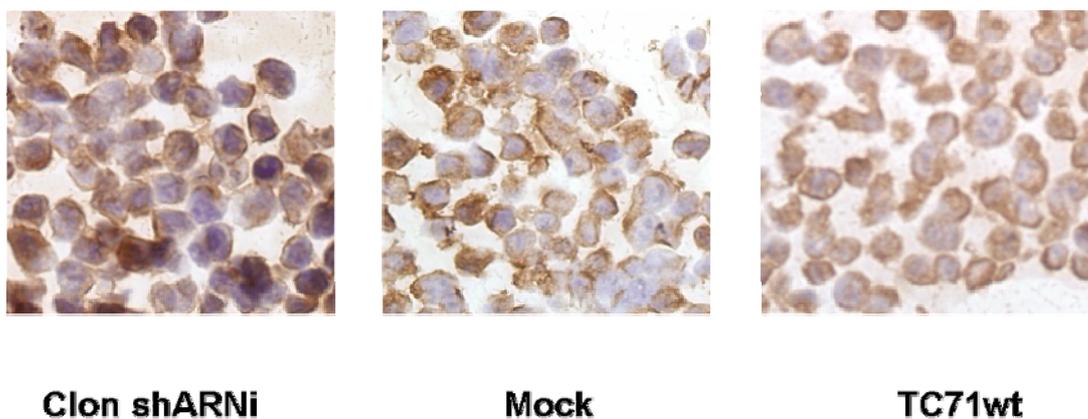
Aún cuando el clon shARNi exhibía de *per se* unos niveles elevados de inducción apoptótica antes del tratamiento con los distintos inhibidores de la vía de IGF1/IGF1R se pudo incrementar en toda y cada una de las condiciones usando los distintos inhibidores.

Figura 27. Medición de la actividad apoptótica mediante citometría de flujo (FACS).



Por último quisimos comprobar el estado de **IGFBP3**, una proteína que se ha descrito se une e inactiva a IGF1 en diversos artículos previos que usan el SE como modelo. No apreciamos cambio alguno en el clon shARNi.

Figura 28. Inmunohistoquímica de IGFBP3 en pellets celulares.



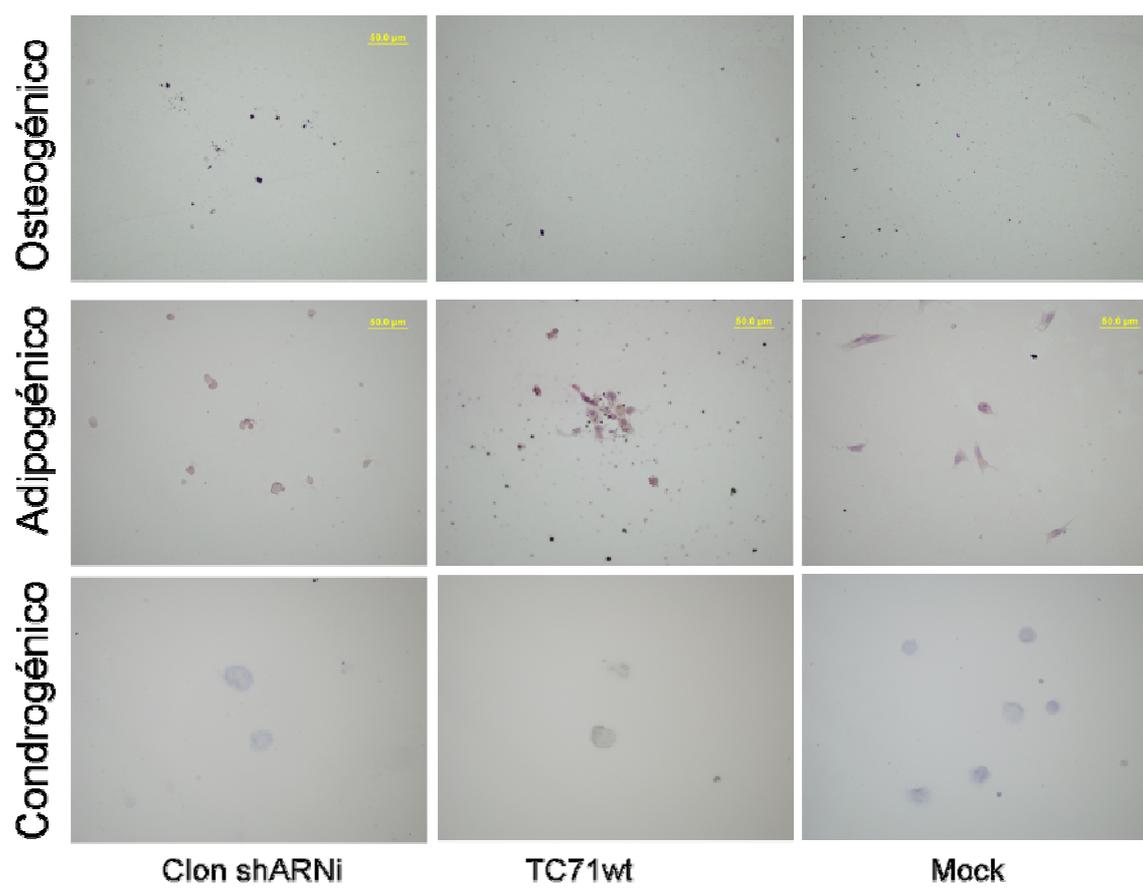
Así pues la interferencia de EWS-FLI1 propició una reducción de los niveles del ligando IGF1 y sensibilizó a las células del clon shARNi a la acción de distintos inhibidores de la vía de proliferación y supervivencia IGF1/IGF1R.

7. Análisis de la capacidad de diferenciación del clon shARNi.

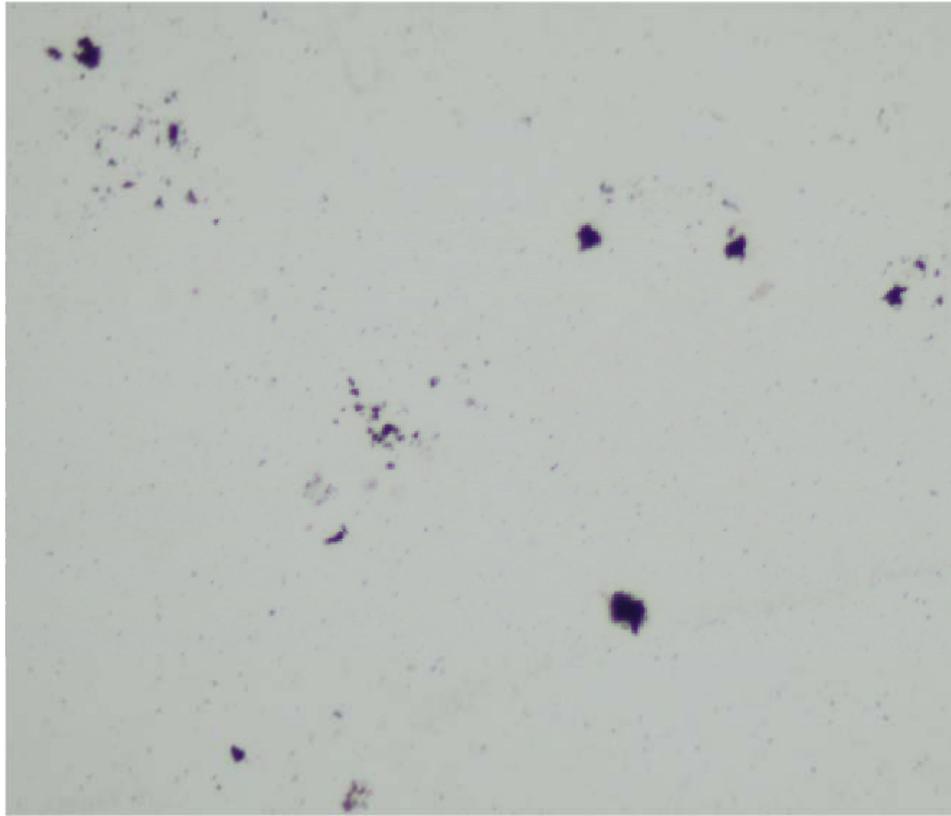
Con el fin de determinar si la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 hacía que las células del clon interferido pudieran retornar a un estado primigenio desde el cual poder diferenciarse de nuevo dando lugar a nuevos y distintos linajes mesenquimales.

Las células del clon interferido se crecieron en los distintos medios correspondientes y se las dejó crecer por espacio de 2 a 3 semanas. El clon shARNi fue capaz de diferenciarse a un fenotipo osteogénico como se puso de manifiesto con una tinción de Von Kossa.

Figura 29. Inmunohistoquímica de las células del clon shARNi crecidas en los distintos medios de diferenciación. Fotos tomadas con un microscopio Nikon con un objetivo 40X.



Osteogénico



Clon shARNi

8. Análisis de la expresión génica del clon shARNi.

Para conocer el efecto de la inhibición de EWS-FLI1 en la denominada firma molecular del clon interferido llevamos a cabo estudios de expresión génica mediante el uso de matrices o *microarrays*. Utilizamos para ello el modelo de Affymetrix HG-133A.

Se analizaron muestras por duplicado del clon shARNi, del mock y de la línea TC71wt tanto en el estadio inicial (T0) como en el tardío (T8).

El análisis bioinformático se llevó a cabo con dos programas diferentes, uno basado en el método MAS5 denominado *GeneData Refiner* y otro conocido como *Genetrix* que emplea un algoritmo diferente llamado *Probe Profiler* con un análisis del tipo *Gene Screen* basado en la regresión de Cox.

Se obtuvieron listas de los 300 genes asociados con una mayor intensidad al clon shARNi y de otros 300 no asociados al clon shARNi para combinarlos en una única lista que fue la que se usó para un análisis de agrupamiento jerárquico que claramente nos permitió diferenciar al clon shARNi del mock y de la línea celular TC71wt. De acuerdo al programa de software bioinformática *GeneData Refiner* el agrupamiento se llevó a cabo mediante la medida de la distancia euclídea y el método *Single Linkage / Complete Linkage*. Mediante tests del tipo *two-sided* se identificaron genes diferencialmente expresados en el clon shARNi con respecto al mock y al TC71wt en ambas fases temporales.

Tabla 1. Genes sobreexpresados en el clon shARNi con respecto a TC71wt. Te: estadio temprano. Ta: estadio tardío. Análisis de *Gene Data Refiner*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Fold change Te	Fold change Ta
208211_s_at	ALK	anaplastic lymphoma kinase (K1)	2p23	3,37	1,55
208796_s_at	CCNG1	cyclin G1	5q32-q34	2,9	1,99
202769_at	CCNG2	cyclin G2	4q21.22	2,18	1,95
216894_x_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	11p15.5	5,55	5,75
55065_at	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	19q13.3	2,05	1,66
221523_s_at	RRAGD	Ras-related GTP binding D	6q15-q16	2,36	2,72
202565_s_at	SVIL	supervillin	10p11.2	2,11	2,1
204916_at	RAMP1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	2q36-q37.1	2,12	1,97
208410_x_at	AMELX	amelogenin (amelogenesis imperfecta 1, X-linked)	Xp22.31-p22.1	2,18	2,29
220784_s_at	UTS2	urotensin 2	1p36	2,44	1,92
204249_s_at	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	11p13	2,59	2,56

Tabla 2. Genes infraexpresados en el clon shARNi con respecto a TC71 wt. Te: estadio temprano. Ta: estadio tardío. Análisis de *Gene Data Refiner*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Fold change Te	Fold change Ta
204971_at	CSTA	cystatin A (stefin A)	3q21	0,23	0,1
204409_s_at	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Yq11.222	0,03	0,03
201435_s_at	EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	4q21-q25	0,44	0,57
207826_s_at	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	1p36.13-p36.12	0,56	0,6
208690_s_at	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	10q22-q26.3	0,43	0,55
204460_s_at	RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	5p13.2	0,42	0,5
206039_at	RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	Xq26.1	0,19	0,3
213791_at	PENK	proenkephalin	8q23-q24	0,31	0,53
210457_x_at	HMGA1	high mobility group AT-hook 1	6p21	0,33	0,4
209507_at	RPA3	replication protein A3, 14kDa	7p22	0,33	0,49
208645_s_at	NR0B1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Xp21.3-p21.2	0,34	0,24
202957_at	HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	3q13	0,39	0,27
210240_s_at	CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	18p13	0,4	0,29
209542_x_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	12q22-q23	0,43	0,24

Tabla 3. Genes sobreexpresados en el clon shARNi respecto al mock. Te: estadio temprano. Ta: estadio tardío. Análisis de *Gene Data Refiner*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Fold change Te	Fold change Ta
204918_s_at	MLLT3	myeloidlymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	9p22	2.02	2.43
217007_s_at	ADAM15	a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)	1q21.3	2.04	2.6
212899_at	CDK11	cyclin-dependent kinase (CDC-2 like) 11	6q22.1	2.22	1.53
206106_at	MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	22q13.33	2.31	1.65
217226_s_at	PRRX1	paired related homeobox 1	1q24	3.08	1.42
218718_at	PDGFC	platelet derived growth factor C	4q32	3.25	1.45
208211_s_at	ALK	anaplastic lymphoma kinase (K1)	2p23	3.05	2.04
208796_s_at	CCNG1	cyclin G1	5q32-q34	3.92	2.94
202769_at	CCNG2	cyclin G2	4q21.22	2.51	2.66
216894_x_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	11p15.5	3.78	3.17
55085_at	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	19q13.3	2.54	1.84
221523_s_at	RREGD	Ras-related GTP binding D	6q15-q16	1.95	1.84
202565_s_at	SVIL	supervillin	10p11.2	2.45	1.87
204916_at	RAMP1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	2q36-q37.1	2.70	1.65
208410_x_at	AMELX	amelogenin (amelogenesis imperfecta 1, X-linked)	Xp22.31-p22.1	2.09	1.98
220784_s_at	UTS2	urotensin 2	1p36	2.39	2.67
204249_s_at	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	11p13	3.48	2.87

Tabla 4. Genes infraexpresados en el clon shARNi respecto al mock. Te: estadio temprano. Ta: estadio tardío. Análisis de *Gene Data Refiner*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Fold change Te	Fold change Ta
204971_at	CSTA	cystatin A (stefin A)	3q21	0.17	0.08
204409_s_at	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Yq11.222	0.04	0.04
201435_s_at	EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	4q21-q25	0.30	0.66
207826_s_at	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	1p36.13-p36.12	0.61	0.6
208890_s_at	PDLIM1	POZ and LIM domain 1 (elfin)	10q22-q26.3	0.48	0.36
204460_s_at	RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	5p13.2	0.38	0.49
206039_at	RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	Xq26.1	0.18	0.34
212724_at	ARHE	Ras homolog gene family, member E	2q23.3	0.16	0.42
210457_x_at	HMGAI	high mobility group AT-hook 1	6p21	0.32	0.20
205110_s_at	FGF13	fibroblast growth factor 13	Xq26.3	0.16	0.55
206645_s_at	NR0B1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Xp21.3-p21.2	0.13	0.34
202957_at	HCLS1	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	3q13	0.62	0.27
210240_s_at	CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	19p13	0.41	0.29
216937_at	RS1	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1	Xp22.2-p22.1	0.36	0.34
219824_at	BAG4	BCL-2 associated athanogene 4	8p11.23	0.48	0.63
219831_at	ST7	suppression of tumorigenicity	8q22.2-q23.1	0.38	0.31
202705_at	CCNB2	cyclin B2	15q21.3	0.36	0.42
206542_x_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	12q22-q23	0.45	0.23

Tabla 5. Genes cuya expresión se induce al inhibir EWS-FLI1. Análisis de *Genetrix*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Magnitud de asociación
215706_x_at	ZYX	Zyxin	7q32	9,94
208211_s_at	ALK	anaplastic lymphoma kinase (K-1)	2p23	7,98
205467_at	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	2q33-q34	6,88
203984_s_at	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	1p36.3-p36.1	6,88
208796_s_at	CCNG1	Cyclin G1	5q32-q34	10,47
202770_s_at	CCNG2	Cyclin G2	4q21.22	8,36
216894_x_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	11p15.5	33,16
204249_s_at	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	11p13	9,43
55065_at	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	19q13.3	11,16
200714_x_at	OS-9	Amplified in osteosarcoma	12q13	9,26
221523_s_at	RRAGD	Ras-related GTP binding D	6q15-q16	7,4
1729_at	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	16q22	7,33
204121_at	GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	9q22.1-q22.2	7,82

Tabla 6. Genes cuya expresión se reduce al interferir EWS-FLI1. Análisis de *Genetrix*.

Probe set	Símbolo	Nombre del gen	Localización	Magnitud de asociación
204971_at	CSTA	cystatin A (stefin A)	3q21	-7,26
201017_at	EIF1A	Eukaryotic translation initiation factor 1A	Xp22.13	-8,11
204409_s_at	EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	Yq11.222	-11,32
201435_s_at	EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E	4q21-q25	-6,51
205110_s_at	FGF13	Fibroblast growth factor 13	Xq26.3	-15,12
214412_at	H2AFB	H2A histone family, member B	Xq28	-10,91
207826_s_at	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	1p36.13-p36.12	-7,17
207121_s_at	MAPK6	Mitogen-activated protein kinase 6	15q21	-6,94
214321_at	NOV	Nephroblastoma overexpressed gene	8q24.1	-19,87
208890_s_at	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	10q22-q26.3	-8,39
213791_at	PENK	proenkephalin	8q23-q24	-10,79
218009_s_at	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	15q26.1	-6,78
205880_at	PRKCM	Protein kinase C, mu	14q11	-8,32
206039_at	RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	Xq26.1	-9,81
209371_s_at	SH3BP2	SH3-domain binding protein 2	4p16.3	-6,62
40420_at	STK10	Serine/threonine kinase 10	5q35.1	-11,45
202338_at	TK1	Thymidine kinase 1, soluble	17q23.2-q25.3	-6,79

Mediante el programa bioinformático FatiGO que lleva a cabo un análisis de enriquecimiento funcional por medio de un test de Fisher al comparar dos listas de genes llevamos a cabo una comparativa tomando como base el análisis de *Genetrix* con el fin de hallar diferencias entre los genes sobre e infraexpresados tras la interferencia de EWS-FLI1. FatiGO usa para clasificar los genes y de acuerdo a distintas bases de datos públicas diferentes criterios ya sean funcionales (GO, KEGG, Biocarta, etc.), de regulación (dianas de factores de transcripción, miARN, etc.) o de localización cromosómica. FatiGO es un programa desarrollado de acceso libre desarrollado por el Departamento de Bioinformática del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (<http://bioinfo.cipf.es/>). Nos limitamos en nuestro caso a las categorías de la base de datos *Gene Ontology* (www.geneontology.org). *Gene Ontology* es un método de enriquecimiento funcional basado en 3 criterios de clasificación: el componente celular, el proceso biológico y la función molecular; un gene está asociado y/o localizado a uno o más componentes celulares, es activo en uno o más procesos biológicos en los que lleva a cabo una o más funciones moleculares. En las 3 categorías pudimos constatar la existencia de diferencias entre el conjunto de genes activados y reprimidos por la inhibición de EWS-FLI1 en el clon shARNi con respecto al mock y a TC71wt.

Tabla 7. Análisis de los procesos biológicos en *Gene Ontology* – Nivel 3.

desarrollo multicelular (GO:0007275)	#1: ENPEP ALK SE... #2: ADAMTS9 CYLC...	 24.39%  13.14%
desarrollo de las estructuras anatómicas (GO:0048856)	#1: HPS4 PEX7 F2... #2: EFNB2 FEZ2 B...	 23.17%  11.43%
regulación de la calidad biológica (GO:0065008)	#1: POU3F1 STAT5... #2: ENO1 BARD1 R...	 1.83%  8%
adhesión celular (GO:0007155)	#1: COL6A1 CTNNA... #2: CD84 NME1 MY...	 7.32%  1.71%
división celular (GO:0051301)	#1: CCNG2 CCNG1 #2: CDC6 CDC20 C...	 1.22%  6.29%
ciclo celular (GO:0007049)	#1: GADD45G PDGF... #2: PA2G4 UBE2C ...	 8.54%  16.57%
localización del ARN (GO:0006403)	#1: - #2: NCBP1 HRB	 0%  1.14%
respuesta al estrés (GO:0006950)	#1: NDST1 ERCC5 ... #2: RAD1 UBE2A G...	 9.76%  13.71%
comunicación celular (GO:0007154)	#1: GADD45G LDB1... #2: STC1 CALCB P...	 34.15%  26.86%
comportamiento (GO:0007610)	#1: MCOLN3 HCRTR... #2: CHRNB2 CCL7 ...	 3.66%  1.71%
ritmo circadiano (GO:0007623)	#1: - #2: PER1 AANAT	 0%  1.14%
circulación (GO:0008015)	#1: SERPING1 PTG...	 1.83%

	#2: COL3A1	0.57%
localización proteica (GO:0008104)	#1: MYO6 HPS4 CO...	6.1%
	#2: FLJ11506 RAB...	8%
proliferación celular (GO:0008283)	#1: CDKN1C PTENP...	8.54%
	#2: CASP3 CKS1B ...	5.14%
procesos catabólicos (GO:0009056)	#1: SUOX PLA2G6 ...	7.32%
	#2: GCH1 PNLIPRP...	11.43%

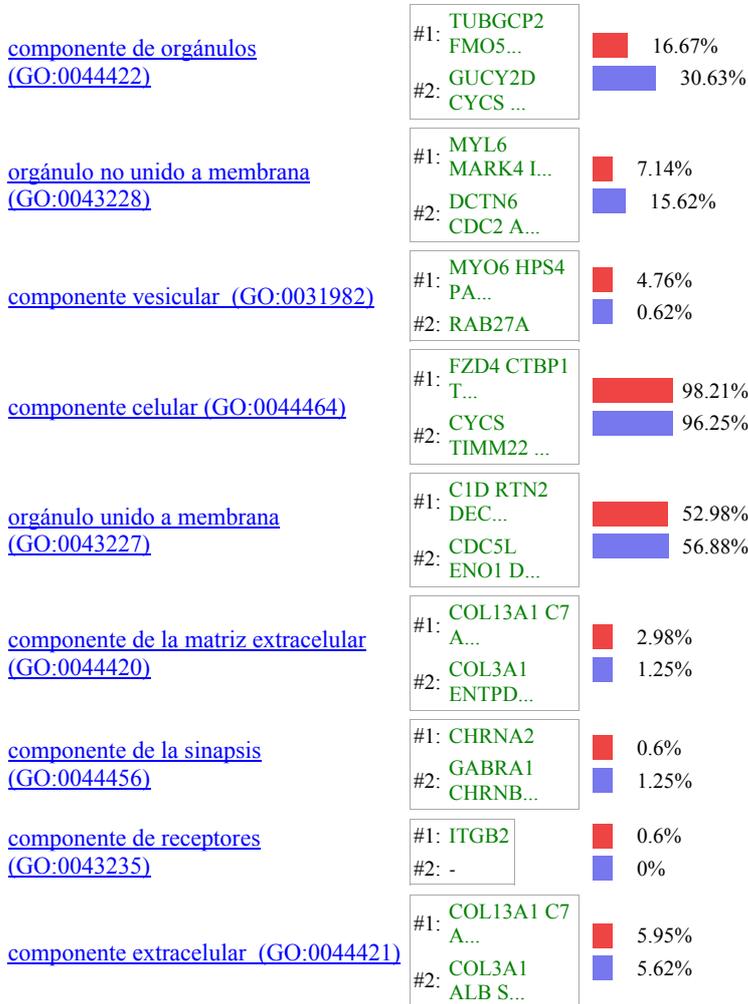
Tabla 8. Análisis de la función molecular en Gene Ontology – Nivel 3.

unión a ácidos nucleicos (GO:0003676)	#1: ZNF80 SMARCA...	12.64%
	#2: MRE11A OSR1 ...	22.94%
actividad del factor de transcripción ARN polimerasa II (GO:0003702)	#1: TIAL1	0.55%
	#2: POLR3K TAF1C...	4.12%
unión a proteínas (GO:0005515)	#1: KRT5 PCDH8 V...	48.35%
	#2: CALCB BARD1 ...	60%
actividad oxidoreductasa (GO:0016491)	#1: PAM PH-4 DEC...	8.79%
	#2: NDUFB8 COX11...	3.53%
unión a iones (GO:0043167)	#1: KCNE4 BHMT2 ...	29.12%
	#2: ZNF430 S100A...	20.59%
actividad motora de microfilamentos (GO:0000146)	#1: MYO6	0.55%
	#2: -	0%
actividad recombinasa (GO:0000150)	#1: -	0%
	#2: RAD51	0.59%
unión a nucleótidos (GO:0000166)	#1: TIAL1 RBM16 ...	13.19%
	#2: CDC6 RAB33A ...	17.06%
patrón de unión (GO:0001871)	#1: -	0%
	#2: CCL7 HMMR	1.18%
unión a cromatina (GO:0003682)	#1: -	0%
	#2: CDC6 CBX5	1.18%
actividad del factor de transcripción ARN polimerasa I (GO:0003701)	#1: -	0%
	#2: TAF1C	0.59%
componente estructural del ribosoma (GO:0003735)	#1: MLC1	0.55%
	#2: -	0%
actividad motora de microtúbulos (GO:0003777)	#1: -	0%
	#2: KIF22 KIF1C	1.18%
unión a antígenos (GO:0003823)	#1: -	0%
	#2: IGHG3 ALB	1.18%
actividad helicasa	#1: SUPV3L1	1.1%

[\(GO:0004386\)](#)



Tabla 9. Análisis del componente celular en Gene Ontology – Nivel 3.



9. Validación del análisis de la expresión del clon shARNi.

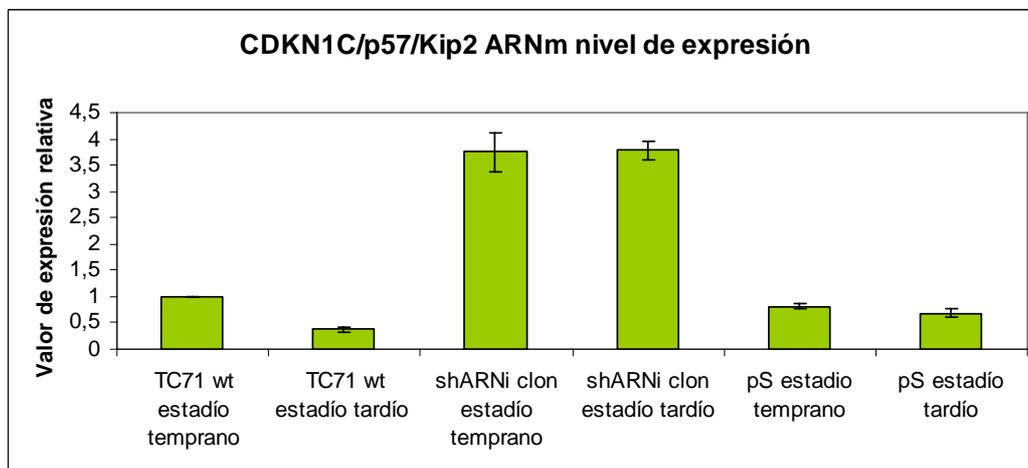
Tras el análisis bioinformático de los *microarrays* de expresión génica se validaron los cambios en los niveles de expresión de las distintas dianas identificadas bien ya descritas o bien putativas de la fusión génica mediante las técnicas de RT-PCR en tiempo real, Western Blot e inmunohistoquímica en pellets celulares.

Genes diana inducidos.

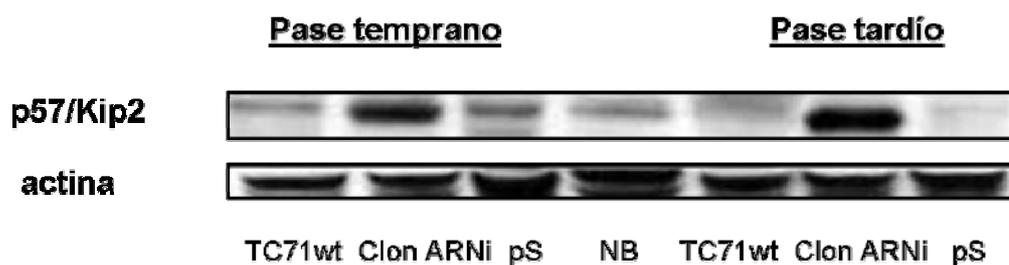
Los niveles de CDKN1C/p57/Kip2 se incrementaron tras la inhibición de la fusión como pudimos demostrar tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de proteína en ambos estadios temporales, temprano y tardío.

Figura 30. a) Nivel de expresión de ARNm de p57. RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados). **b) Nivel de expresión proteico de p57.** Western Blot.

a)



b)

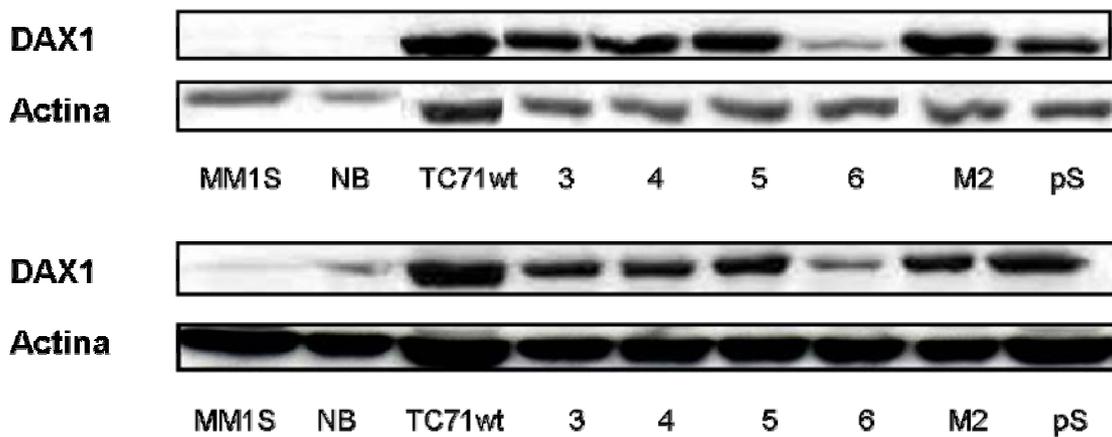


Genes diana reprimidos.

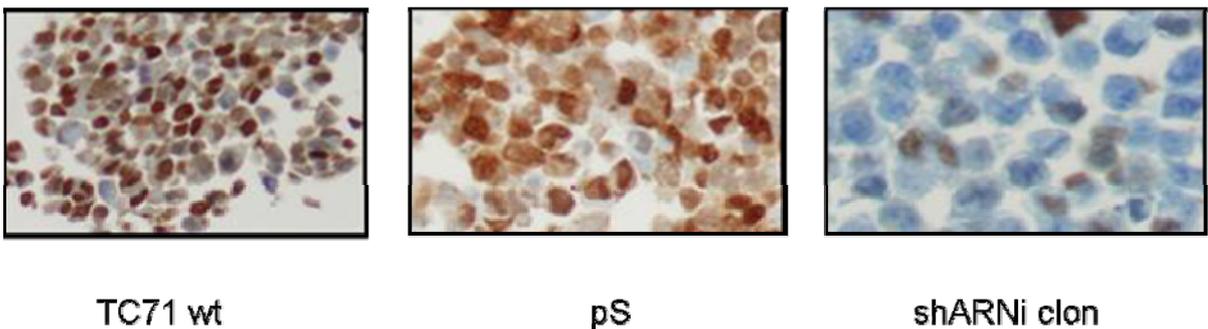
Los niveles de DAX1 (NR0B1) en cambio disminuyeron como consecuencia de la reducción en la expresión de la fusión quimérica. Mediante Western Blot pudimos apreciar esa disminución a nivel de proteína que no varió con el transcurso de los pases celulares. La inmunohistoquímica sobre los pellets celulares confirmó esa disminución de los niveles proteicos de DAX1.

Figura 31. a) Nivel de expresión de proteína de DAX1/NR0B. Western Blot b) Nivel de expresión proteica de DAX1/NR0B en pellets celulares. Inmunohistoquímica.

a)

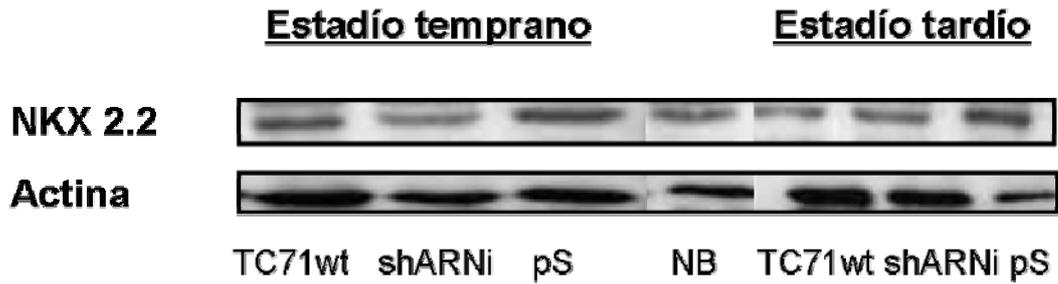


b)



La recientemente identificada diana de EWS-FLI1, NKX 2.2, también se ve afectada como consecuencia de la inhibición de EWS-FLI1. Se produjo una reducción en sus niveles de proteína tanto en un estadio inicial como en uno tardío.

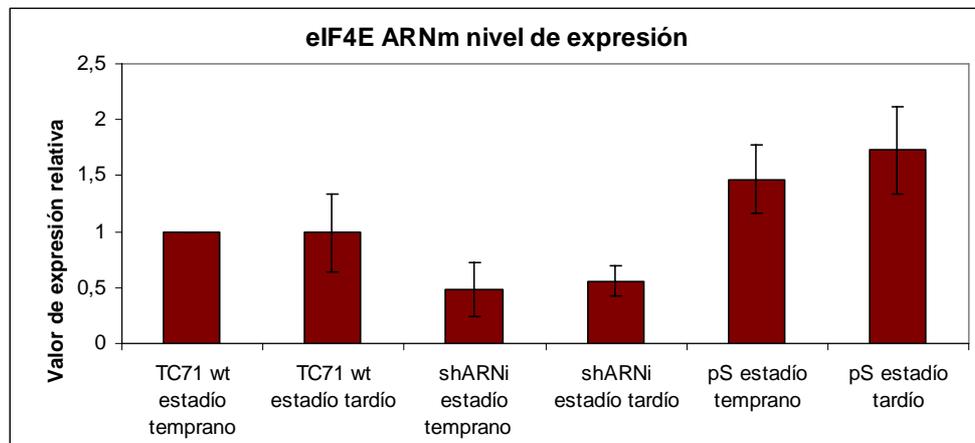
Figura 32. Nivel de expresión de proteína de NKX 2.2. Western Blot.



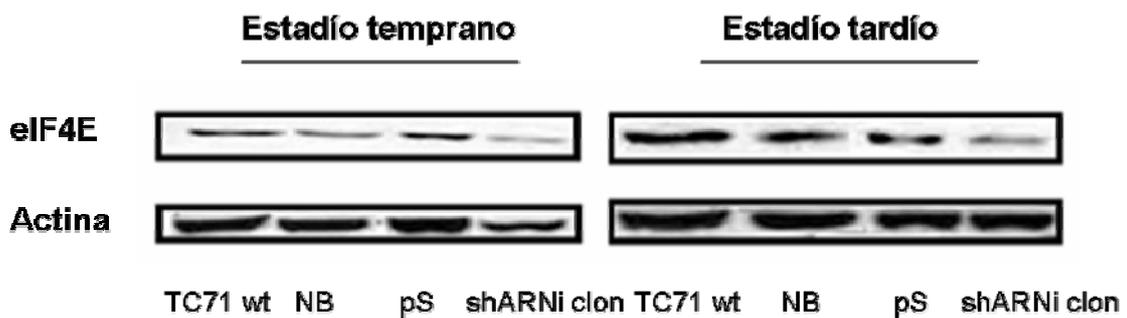
eIF4E es otro gen diana que se reprime tras inteferir EWS-FLI1 tanto a nivel proteico como de ARNm.

Figura 33. a) Nivel de expresión de ARNm de eIF4E. RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados). b) Nivel de expresión proteico de eIF4E. Western Blot.

a)



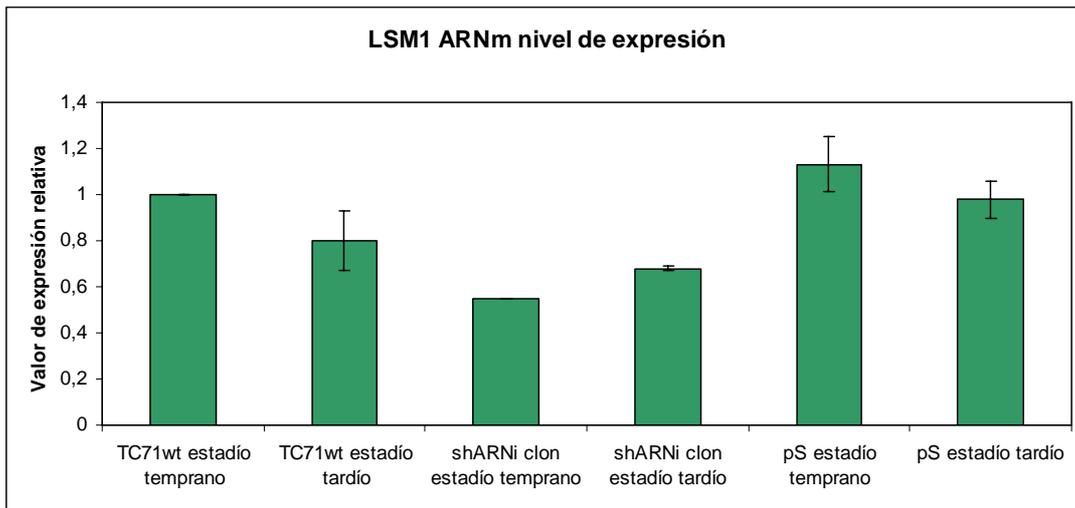
b)



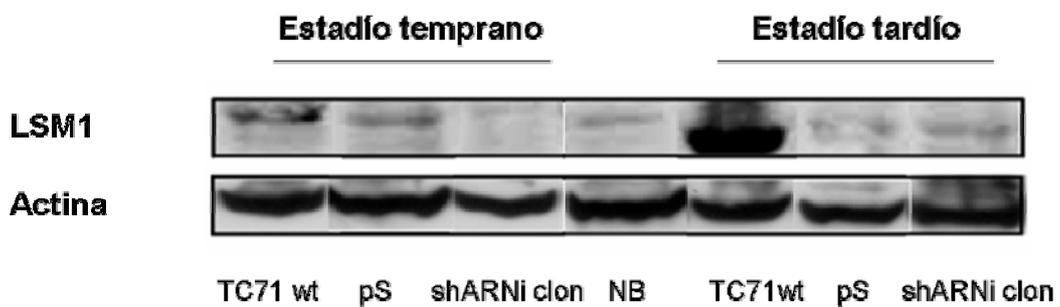
Los niveles de LSM1 también disminuyen como consecuencia de la inhibición de la fusión a nivel de proteína y de ARNm.

Figura 34. a) Nivel de expresión de ARNm de LSM1. RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados) **b) Nivel de expresión proteico de LSM1.** Western Blot.

a)

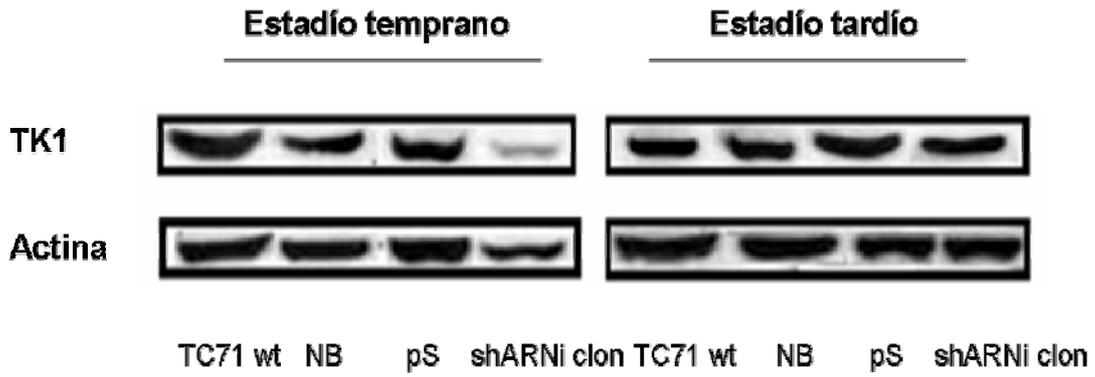


b)



Lo mismo sucede con TK1 aunque en este caso tan solo en el estadio temprano, posteriormente los niveles de TK1 se recuperan.

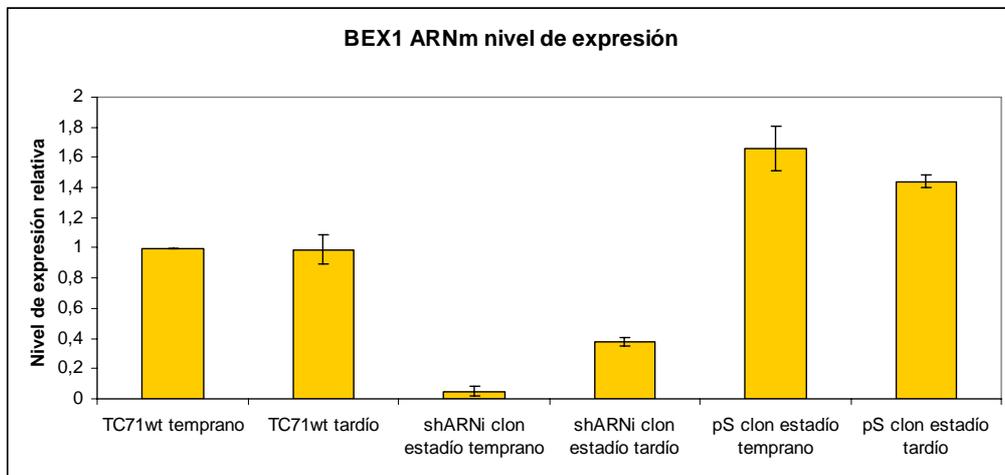
Figura 35. Nivel de expresión de proteína de TK1. Western Blot.



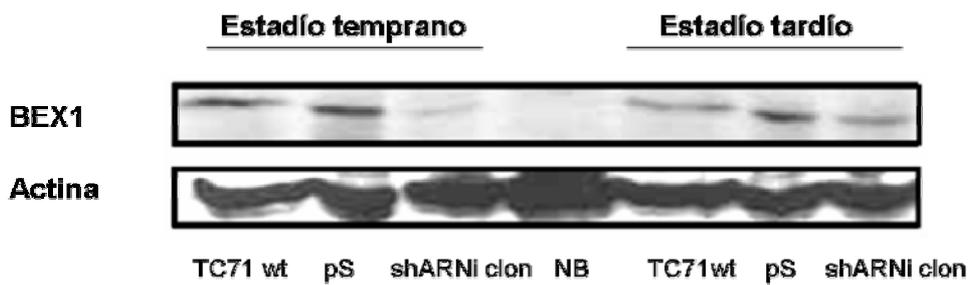
BEX1-2 es otro gen afectado especialmente a nivel de ARNm.

Figura 36. a) Nivel de expresión de ARNm de BEX1. RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados) b) Nivel de expresión proteico de BEX1. Western Blot.

a)



b)



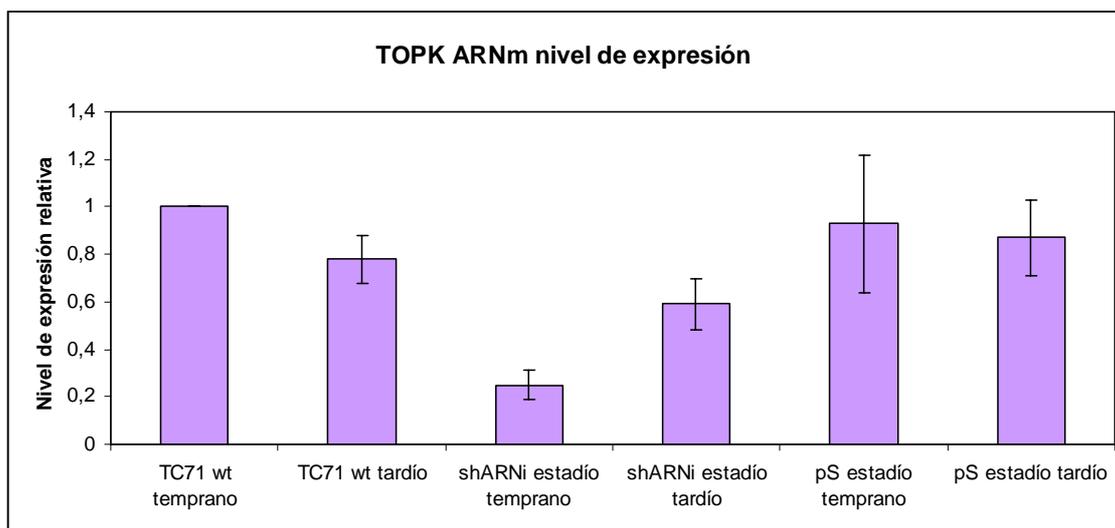
10. TOPK es una nueva diana directa de EWS-FLI1 implicada en proliferación.

Del conjunto de nuevas dianas putativas de la fusión decidimos prestar especial atención al gen TOPK/PBK (*T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase*). El análisis de los *microarrays* de expresión nos permitió observar que la expresión de TOPK se ve reducida como consecuencia de la inhibición de la fusión (valor de -6.78 en el análisis de *Genetrix*).

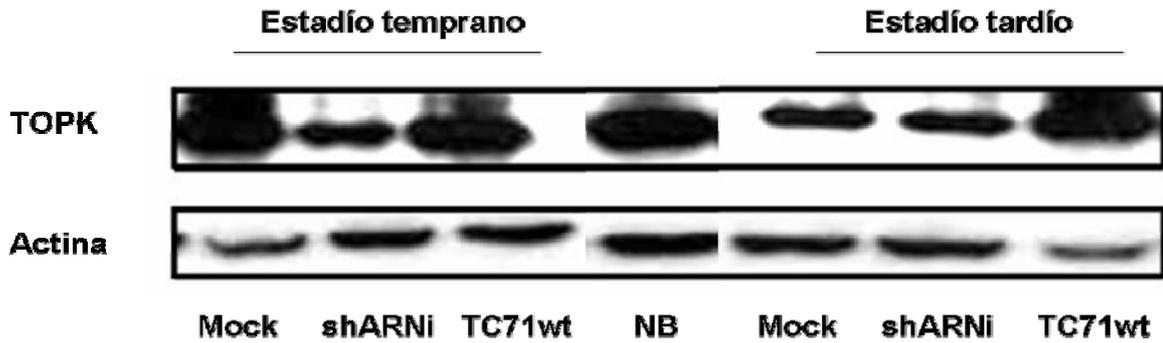
En primer lugar se validó el resultado obtenido en los análisis de expresión génica del clon interferido midiendo mediante RT-PCR en tiempo real y Western Blot el nivel de expresión de esta quinasa. Efectivamente se corroboró lo observado en los *microarrays* ya que en ambos estadios temporales, especialmente en el temprano el nivel de expresión de este gen se encontraba reducido tanto a nivel proteico como de ARNm.

Figura 37. a) Nivel de expresión del ARNm de TOPK medido por RT-PCR en tiempo real. b) Nivel de expresión proteico de TOPK analizado por Western Blot.

a)



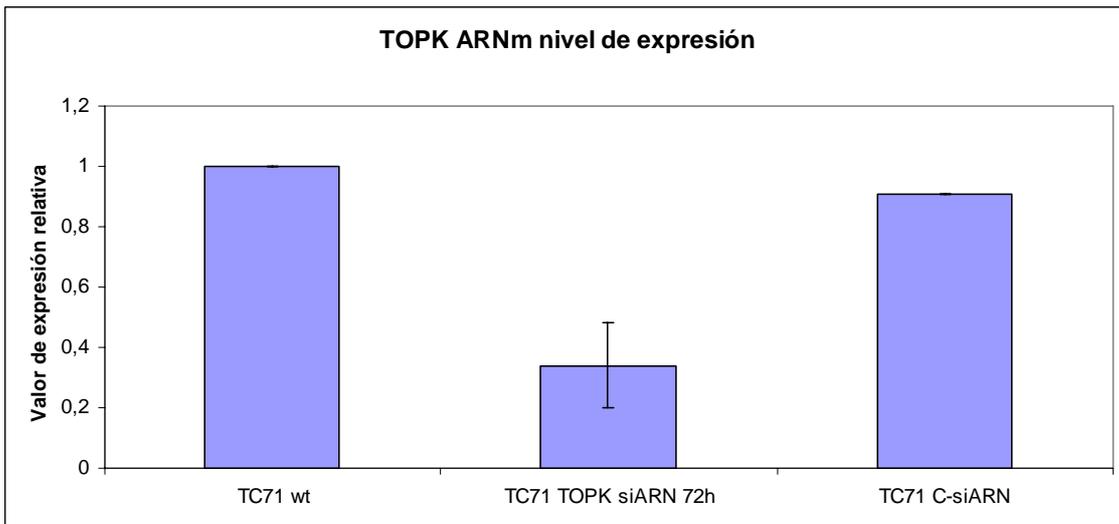
b)



Decidimos estudiar los efectos que causaría la inhibición de la expresión de TOPK para lo que se llevó a cabo una interferencia transitoria de su expresión mediante el uso de oligos siARN contra dicho gen en la línea de SE, TC71. 72 horas después de la transfección con los oligos siARN se extrajo tanto ARN como proteína. Se verificó la eficacia de la inhibición de la expresión mediante RT-PCR en tiempo real. Se consiguió una reducción en los niveles de ARNm de TOPK de un 60% a las 72h post-transfección. Igualmente se comprobó mediante Western Blot la reducción del nivel proteico de TOPK.

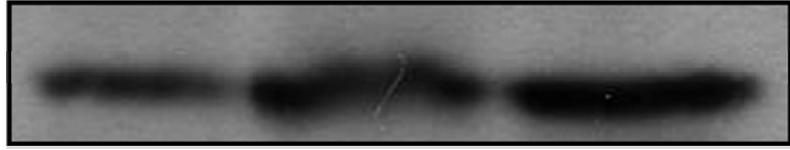
Figura 38. Inhibición de la expresión de TOPK mediante siARN. a) Nivel de expresión de TOPK interferido medido por RT-PCR en tiempo real. b) Nivel proteico de TOPK medido por Western Blot.

a)



b)

TOPK

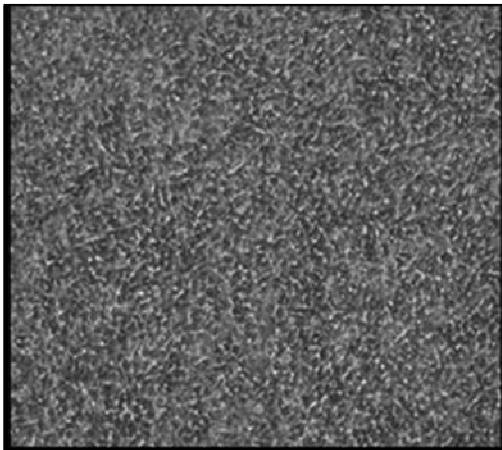


Actina

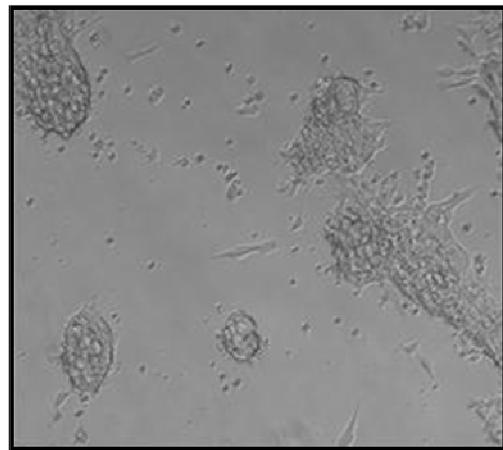


Una vez que se comprobó que la expresión de TOPK estaba interferida sustancialmente se pasó a analizar el efecto de dicha inhibición. El primer efecto observado fue un cambio morfológico significativo cuando tuvo lugar la inhibición de TOPK. Las células interferidas parecían perder la capacidad de llegar a confluencia y crecían formando grumos en un aspecto bastante alejado del patrón de crecimiento habitual de la línea de SE, TC71.

Figura 39. Morfología de las células con la expresión de TOPK interferida. Fotografías tomadas con un microscopio Nikon y un objetivo 20X.



TC71wt



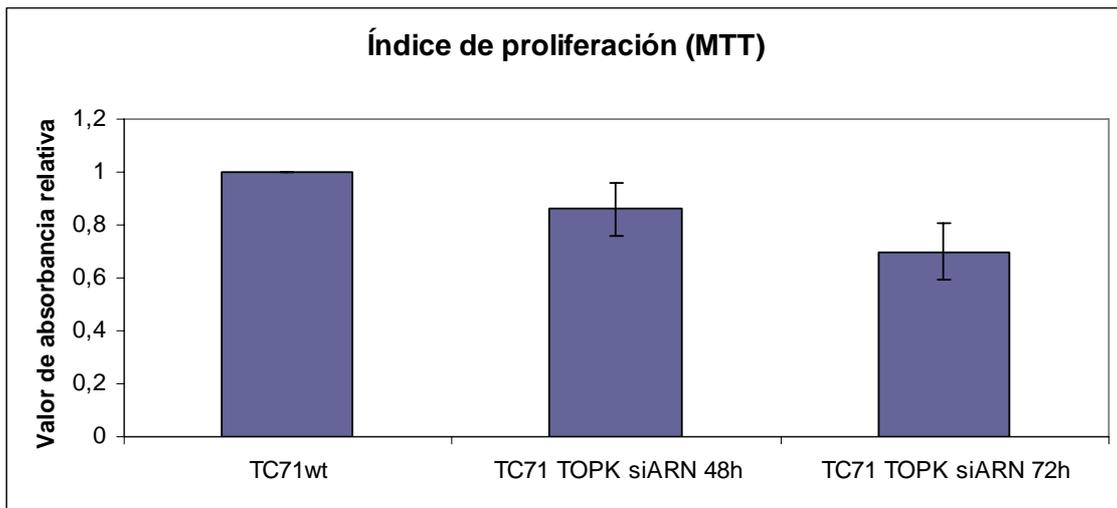
TC71 TOPK siARN 72h

Se midió el grado de proliferación celular mediante un ensayo MTT observando que se producía una reducción de un 15% del grado proliferativo a las 48h de inhibir TOPK y que éste era proporcional al grado de inhibición del gen ya que es a las 72h cuando la reducción era mayor, reducción del 30%, coincidiendo con los niveles más bajos de TOPK. Por el contrario

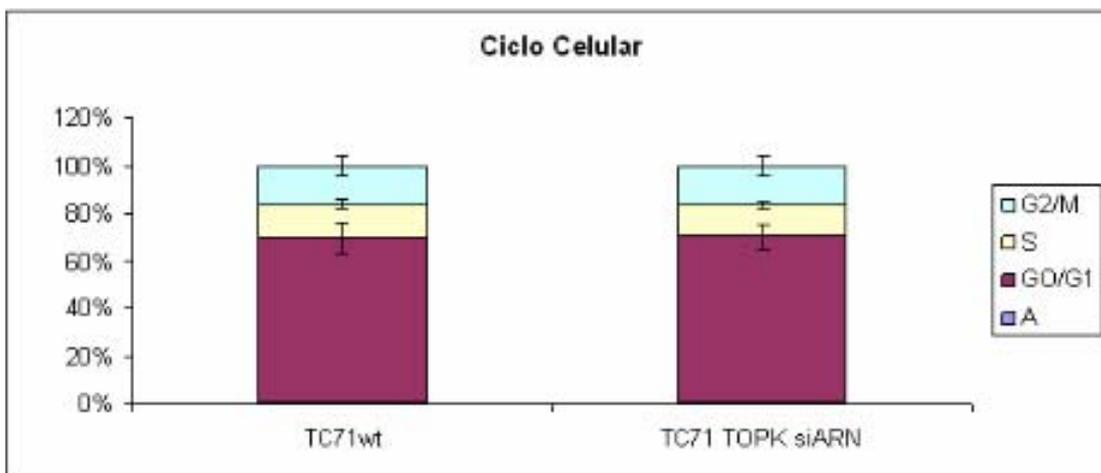
no se apreció cambio alguno en lo relativo a la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular así como en el índice de apoptosis.

Figura 40. Efectos de la interferencia de TOPK. a) Índice de proliferación determinado por MTT. b) Distribución de ciclo celular por FACS. c) Índice apoptótico medido por Anexina V. Media \pm SD (triplicados).

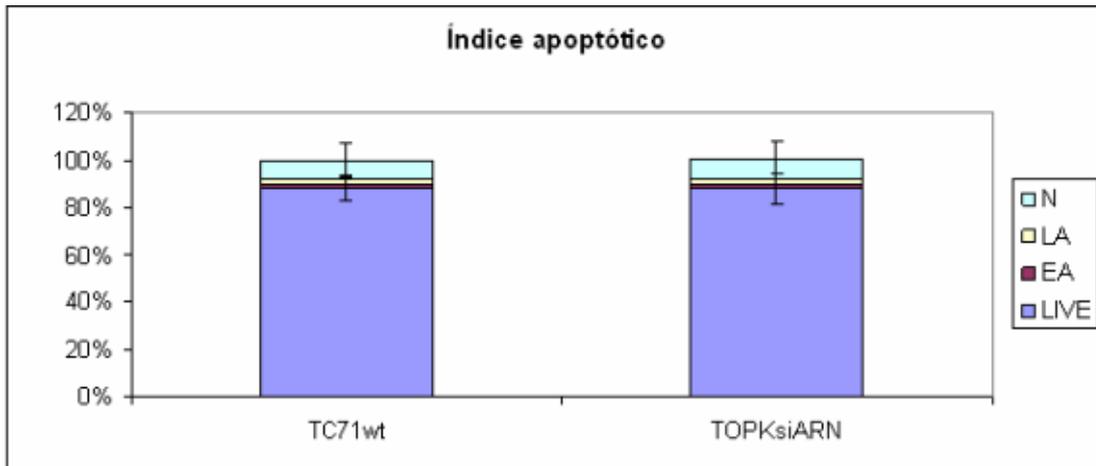
a)



b)



c)



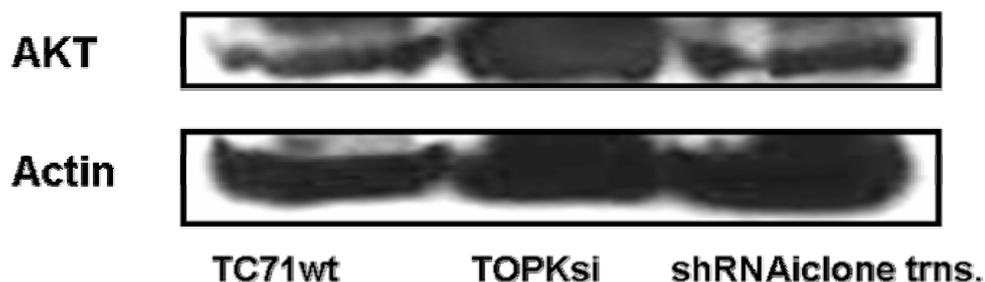
La transfección de la fusión tipo 1, EWS-FLI1 en el clon shARNi restauró los niveles de la fusión así como los de TOPK lo que puso de manifiesto nuevamente la relación existente entre la fusión y esta quinasa.

Figura 41. Recuperación de los niveles de TOPK al transfectar el clon shARNi con EWS-FLI1. Western Blot.



Además, los niveles de AKT aumentaron, lo que parece indicar una posible conexión entre AKT y TOPK.

Figura 42. Incremento en los niveles de AKT en las células TOPKsi. Western Blot.



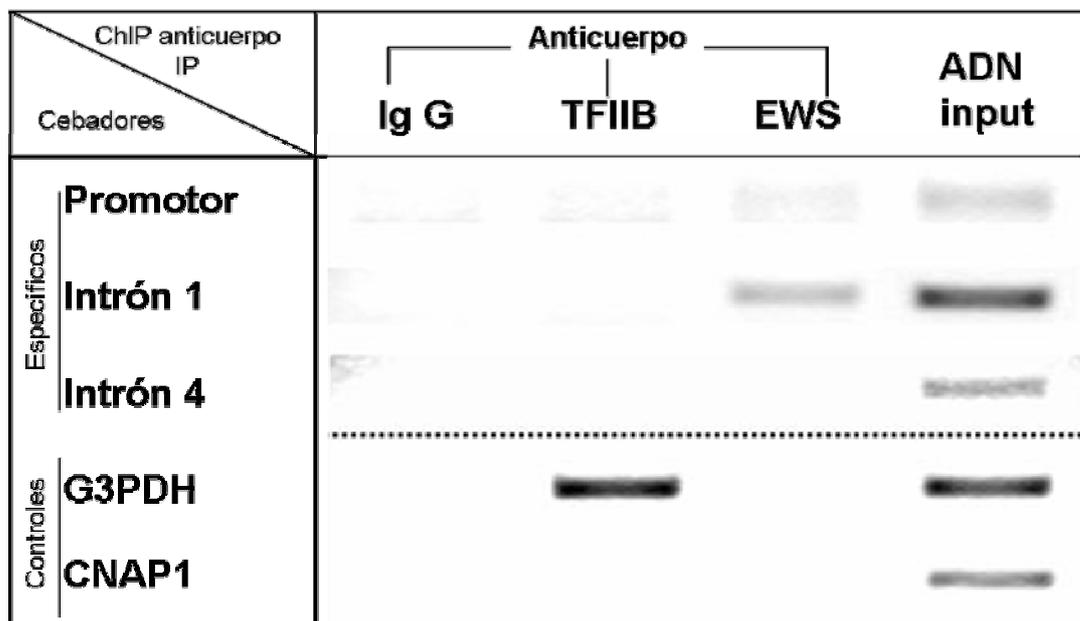
De acuerdo a los resultados obtenidos que apuntaban la posibilidad de que EWS-FLI1 pudiese estar regulando de alguna forma a TOPK se llevó a cabo un estudio *in silico* del promotor y de los intrones de TOPK con el objeto de determinar si TOPK era efectivamente una diana directa de la fusión génica EWS-FLI1.

En primer lugar analizamos el promotor de TOPK mediante el programa de análisis bioinformático *TFM-explorer* (<http://bioinfo.lifl.fr/TFME/>). Se pudieron localizar varios sitios putativos de unión de EWS-FLI1 en la región proximal del promotor de TOPK así como en algún intrón.

- región proximal del promotor de TOPK, localización [-37: -248], valor de $p=2.20e-02$
- TOPK intrón 1, localización [-2197:-2740], valor de $p=7.23e-03$.

Así pues se confirmó que TOPK podía ser una diana directa de la fusión. Para verificarlo se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). La inmunoprecipitación de cromatina tuvo lugar usando el anticuerpo anti-EWS. Tanto en el caso del mock como del clon shARNi se produjo amplificación de la zona mencionada del intrón 1 de TOPK siendo algo menor en el clon shARNi respecto al mock dada la inhibición de EWS-FLI1 en el mismo.

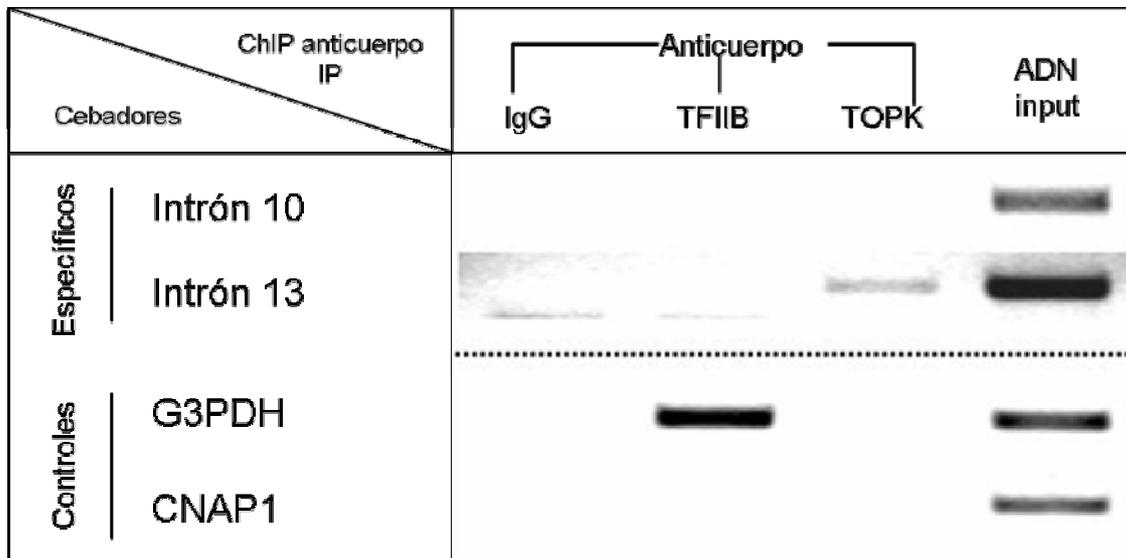
Figura 43. EWS-FLI1 se une al intrón 1 de TOPK. Inmunoprecipitación de cromatina.



La inmunoprecipitación con el anticuerpo IgG o con el anti-ARN polimerasa II no dio lugar a amplificación alguna de la región proximal del promotor de TOPK ni de los intrones 1 y 4 (controles internos negativos). Como control positivo la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-ARN polimerasa II propició la amplificación del promotor de G3PDH, sin diferencias entre el mock y el clon shARNi. Podemos concluir por tanto que TOPK es una diana directa de EWS-FLI1 ya que ésta se une al intrón 1 de TOPK en la región seleccionada [-2197:-2740].

Una vez establecida la conexión entre EWS-FLI1 y TOPK llevamos a cabo una nueva inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo monoclonal de TOPK. Los productos ChIP se amplificaron por una PCR de cebador único y posteriormente se clonaron en el vector *pGEM[®]-T Easy* para a continuación secuenciar los productos de PCR clonados. Los resultados obtenidos tras la secuenciación nos permitieron identificar un nuevo gen: LRRC48 (*Leucine-rich repeat-containing protein 48*) como una diana directa de TOPK al unirse al intrón 13 de LRRC48. La validación tuvo lugar por medio de amplificación de PCR de los productos de ChIP con cebadores del intrón 13 del gen LRRC48.

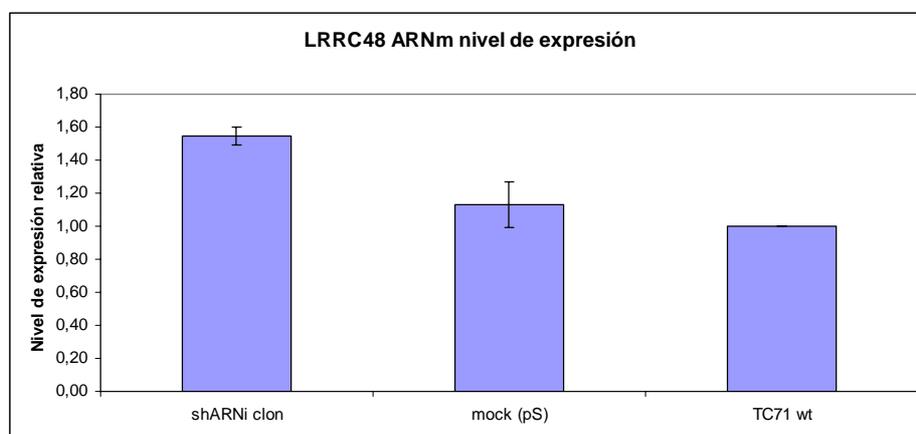
Figura 44. TOPK es capaz de unirse al intrón 10 de LRRC48. Inmunoprecipitación de cromatina.



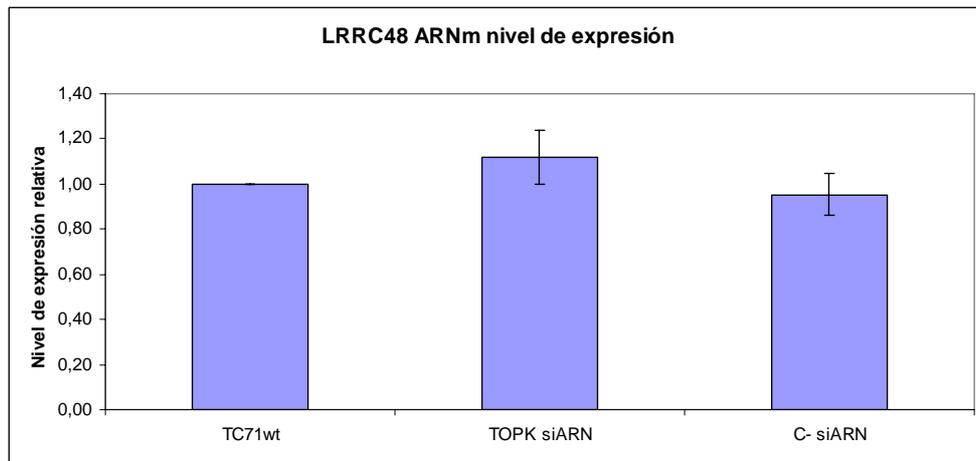
Para analizar a fondo la regulación ejercida por TOPK sobre LRRC48 estudiamos los niveles de dicho gen en el clon EWS-FLI1 shARNi así como en la línea inhibida para TOPK. Comprobamos que el nivel de expresión del ARNm de LRRC48 aumentaba significativamente en el clon EWS-FLI1 shARNi pero por el contrario no se veía afectado en el clon TOPKsi.

Figura 45. Nivel de expresión de LRRC48 a nivel de ARNm. A) Aumento de la expresión en el clon EWS-FLI1 shARNi b) Incremento de los niveles en las células TOPKsi. Análisis de los niveles mediante RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados).

a)

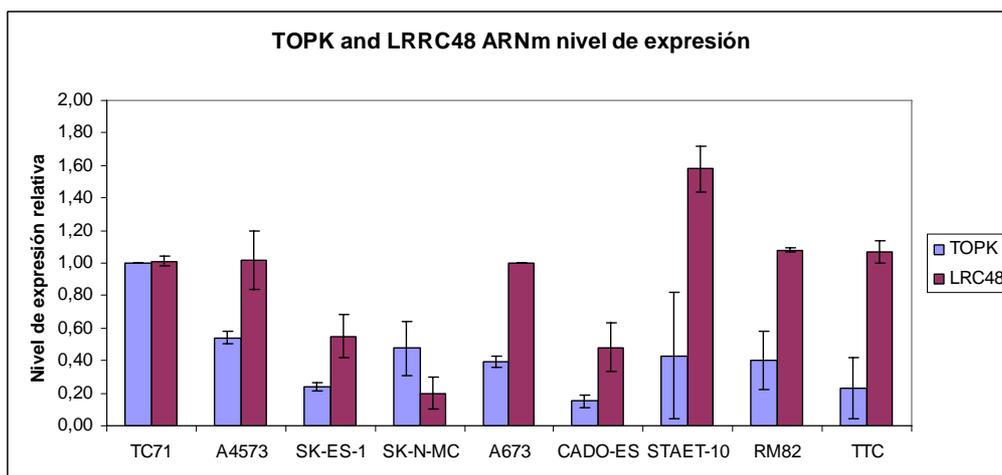


b)



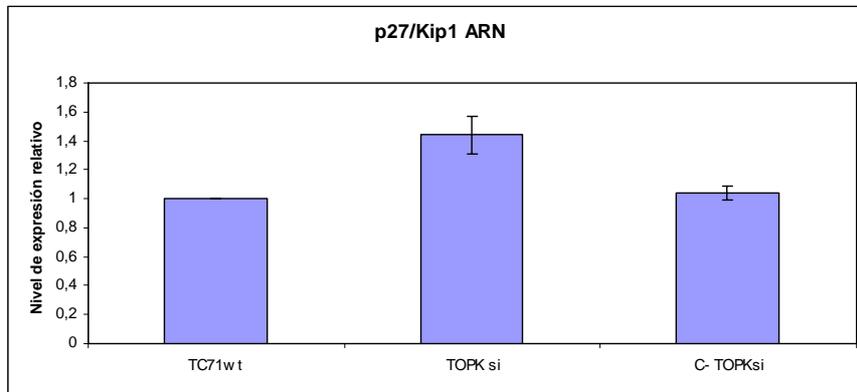
Para establecer una posible relación entre TOPK y LRRC48 analizamos mediante RT-PCR en tiempo real de los niveles de expresión de TOPK y LRRC48 en distintas líneas celulares de SE lo que nos permitió observar la existencia de una correlación inversa entre ambos genes. La expresión del transcrito de LRRC48 era elevada en todas las líneas de SE analizadas con la salvedad de SK-N-MC.

Figura 46. Niveles de TOPK y LRRC48 en distintas líneas de SE. Análisis de los niveles mediante RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados).



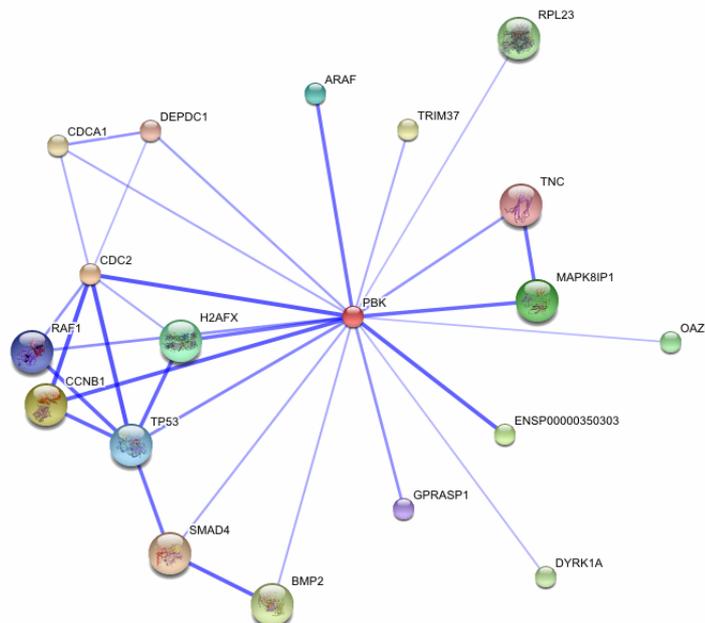
Por tanto EWS-FLI1 es capaz de unirse a TOPK en su intrón 1 y TOPK a su vez puede hacer lo mismo con el intrón 13 de LRRC48. TOPK reprime de alguna manera la expresión del inhibidor del ciclo celular p27/Kip 1 dado que el silenciamiento de la misma provoca un aumento en los niveles de p27/Kip1.

Figura 47. Nivel de p27/Kip1 al inhibir TOPK. Análisis de los niveles mediante RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD (triplicados).



Mediante el programa bioinformático STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Protein*) (EMBL, Heidelberg, Alemania) se pudo establecer la red proteica de asociación de TOPK/PBK basada en las anotaciones funcionales.

Figura 48. Conectividad de TOPK/PBK. Análisis mediante el programa String. (<http://string.embl.de/>).

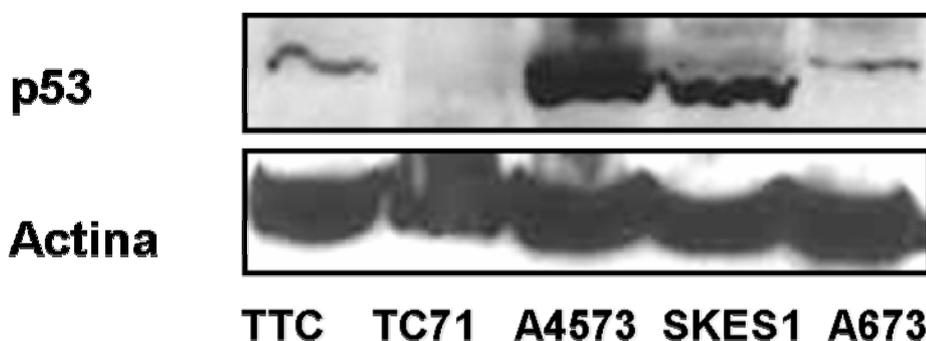


11. Estatus de genes sensores y reparadores de daño en el ADN al inhibir TOPK y el clon shARNi.

Comprobamos en primer lugar el estatus de p53 en la línea celular de SE, TC71 así como en otras líneas de SE.

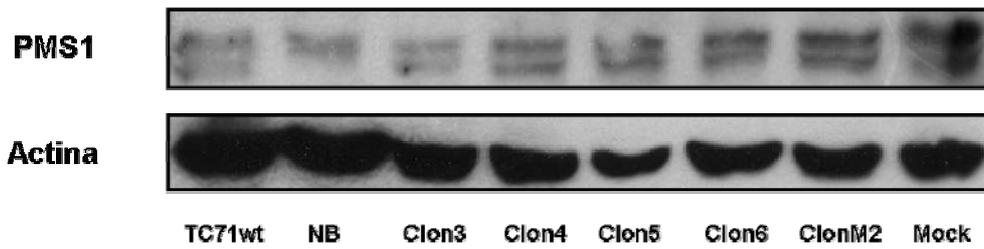
La expresión de p53 es prácticamente inexistente en TC71 así como en la línea A673. Ambas líneas poseen una fusión EWS-FLI1 del tipo 1 (7-6). Por el contrario el nivel es elevado en la línea SK-ES-1 que porta una fusión del tipo 2 (7-5) y la línea A4573 con una fusión del tipo 3 (10-6).

Figura 49. Estatus de p53 en las líneas celulares de SE. Western Blot.



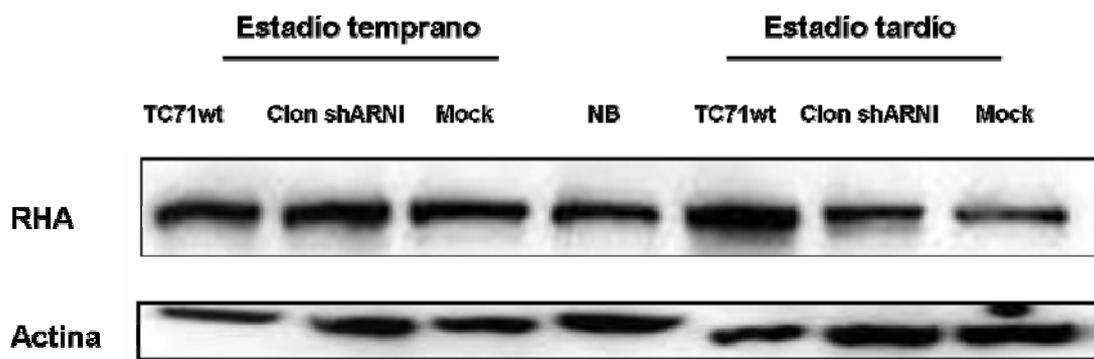
El nivel de LSM1 como se pudo comprobar por Western Blot no varía significativamente entre los clones shARNi y el mock y la línea TC71wt.

Figura 50. Nivel de LSM1. Western Blot.



RHA es una helicasa cuyo papel ya ha sido descrito como relevante en la biología molecular del SE por lo que decidimos verificar su nivel de expresión en el clon shARNi. Los niveles de RHA se mantuvieron constantes y no parecen por tanto afectados por la inhibición de la fusión.

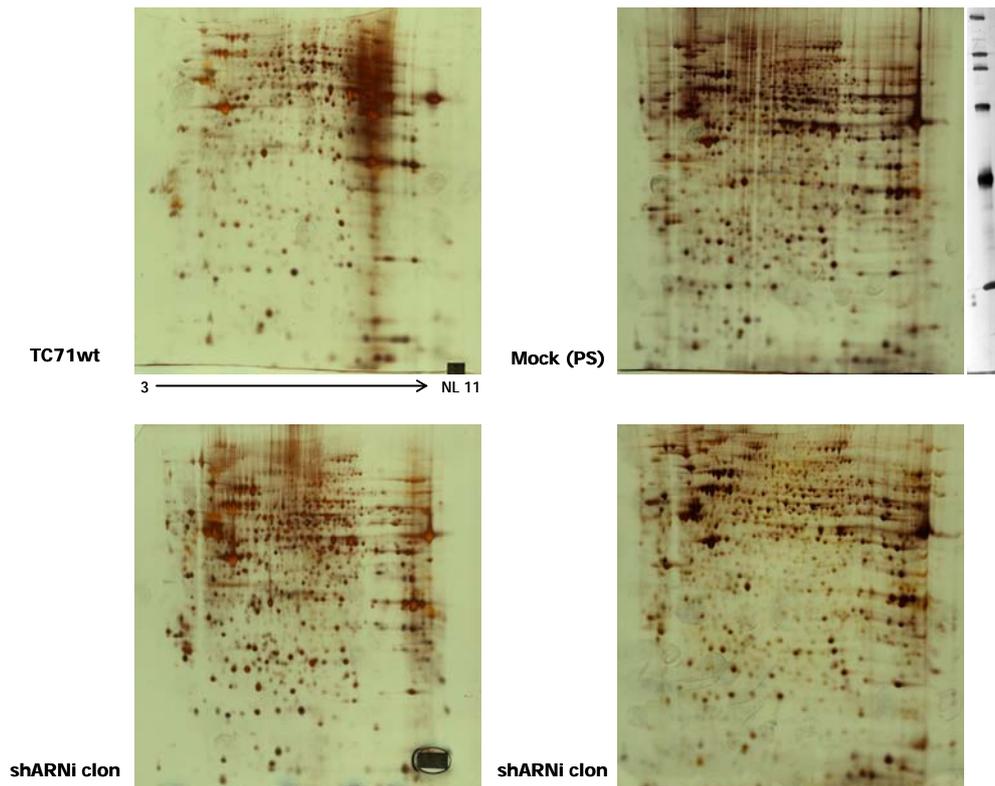
Figura 51. Estado de RHA en el clon shARNi. Western Blot.



12. Estudio proteómico del clon shARNi.

Analizamos el patrón de expresión proteico global del clon shARNi mediante electroforesis bidimensional.

Figura 52. Geles 2-D teñidos con plata.



Tras la separación de las proteínas por peso molecular y punto isoeléctrico se tiñeron los geles con plata y se identificaron una serie de proteínas de referencia para comprobar que las muestras se habían procesado correctamente. Posteriormente se procedió a recortar aquellos “spots” proteicos que mostraban diferencias de intensidad al comparar el clon shARNi con el mock y la línea TC71wt.

Figura 53. Identificación de proteínas de referencia. Clon shARNi.

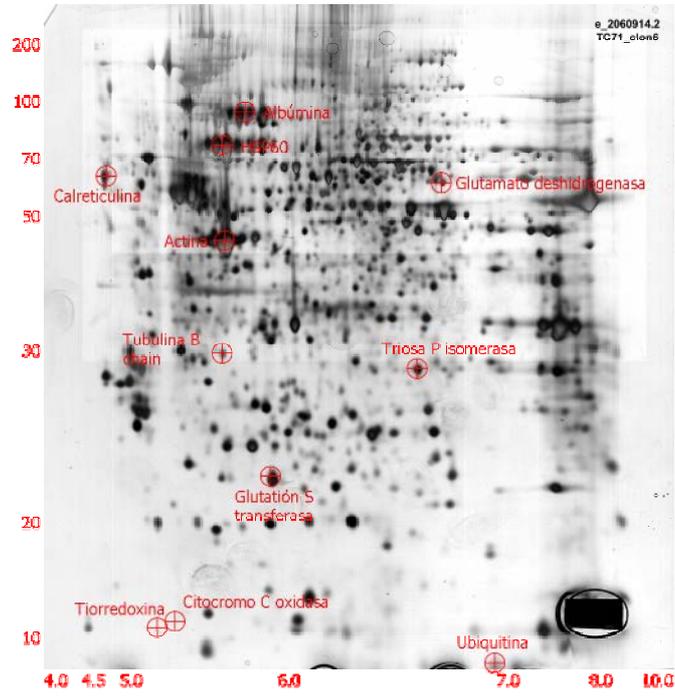
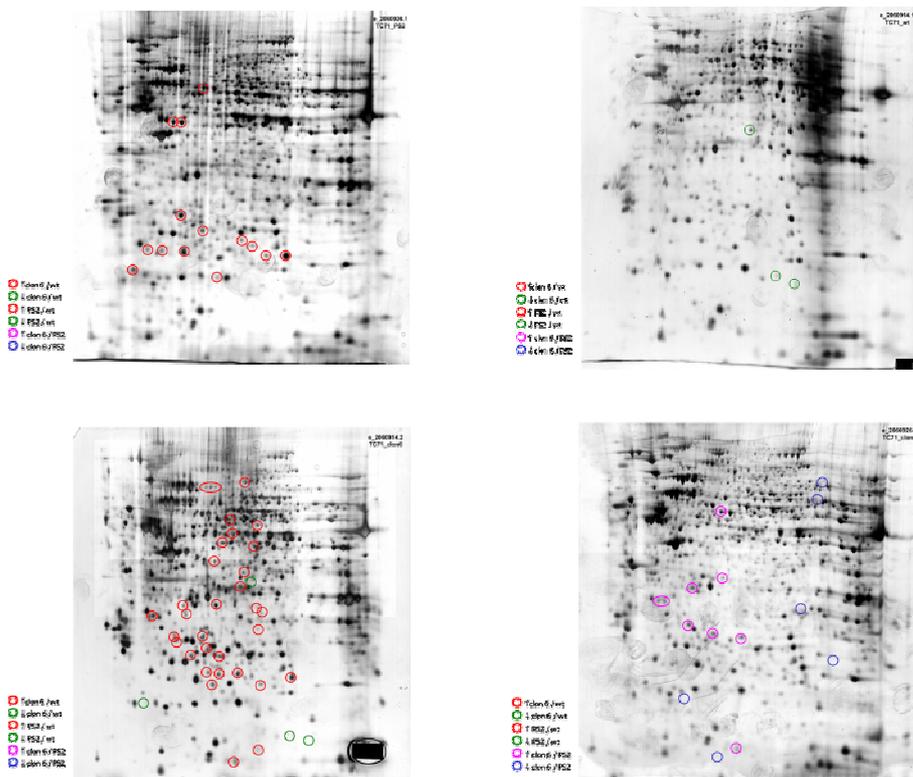
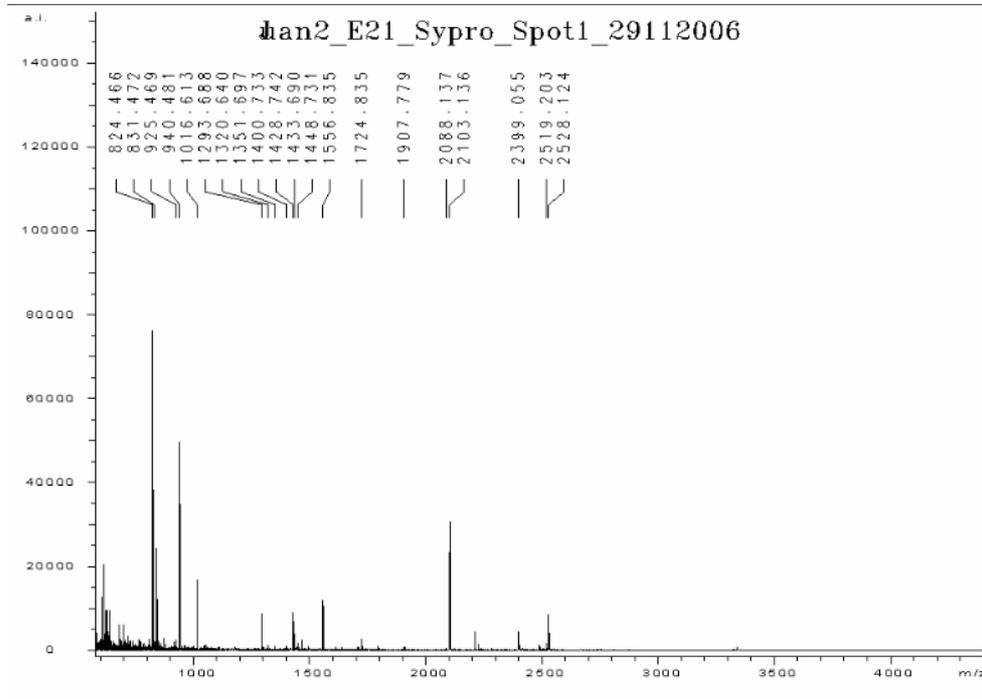


Figura 54. Selección de los spots proteicos de interés.



Los *spots* proteicos una vez seleccionados y extraídos del gel se procesaron por MALDI-TOFF.

Figura 55. Análisis de un *spot* proteico por MALDI-TOFF.



La identificación de los *spots* se llevó a cabo mediante el software bioinformático *MELANIE*. De acuerdo a los siguientes criterios de búsqueda se identificaron un conjunto de proteínas de expresión diferencial entre el clon shARNi y el mock y TC71 wt.

Figura 56. a) Criterios de búsqueda. b) Captura del programa de análisis *MELANIE*.

a)

- **CRITERIOS DE BÚSQUEDA**
- **Database: Sprot 20061011 (234112 sequences; 85963701 residues) Taxonomy: Homo sapiens (human) (14780 sequences) Modifications: carbamidomethyl (C), Oxidation (M)**
- El valor **Score** es $-10 \cdot \log(P)$, siendo P la probabilidad de que el resultado obtenido sea al azar. Un resultado es significativo ($p < 0.05$) cuando el valor del **Score** supera **54**.

b)

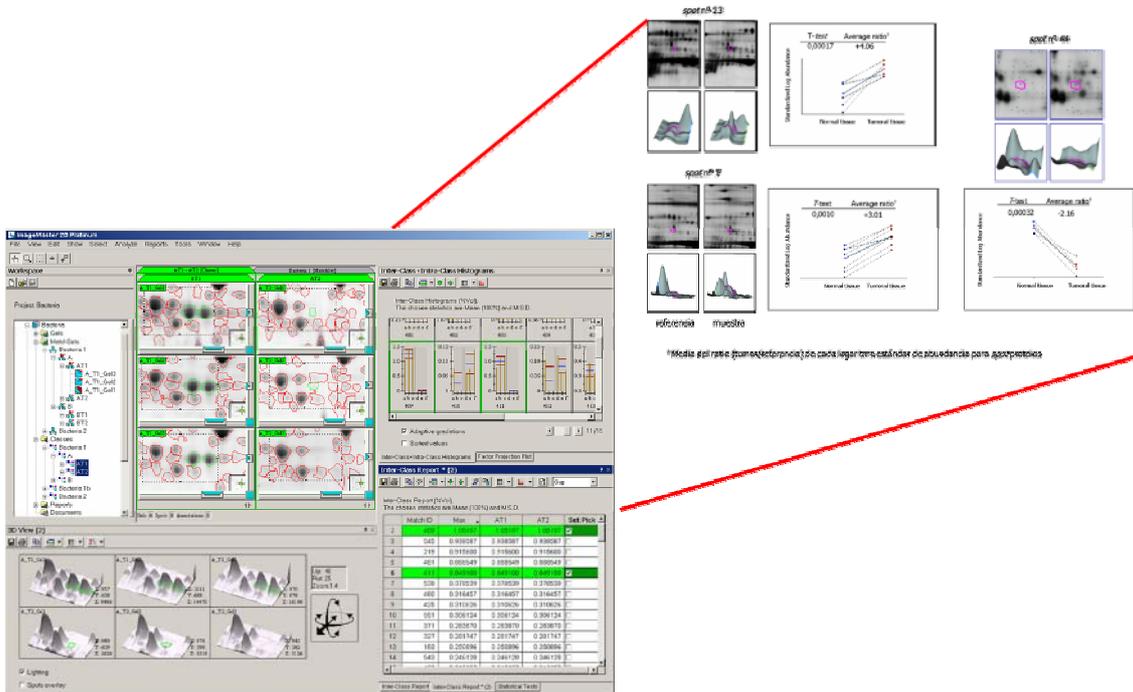


Tabla 10. Proteínas identificadas con expresión diferencial.

- Histona H2B tipo 2-F
- Citrato sintasa, precursor mitocondrial
- Proteína 2 rica en cisteína (CRP2) (Protein ESP1)
- Rab GDP disociación inhibidor beta (Rab GDI beta)
- Proteína *FSDI-like*
- Proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) (p23)
- PCI domain-containing protein 2 (CSN12-like protein)
- Subunidad 6 del factor de inicio de la transcripción TFIIID

- ❑ Precursor Peptidil-profil *cis-trans* isomerasa B (PPIasa)
- ❑ 60S proteína ácida ribosomal P0
- ❑ Triptofanil-tRNA sintetasa (Triptófano-tRNA ligasa)
- ❑ Subunidad del proteasoma alfa tipo 1 (Componente del proteasoma C2)
- ❑ Delta 3,5-delta2,4-dienoil-CoA isomerasa, precursor mitocondrial
- ❑ Peroxiredoxina 6 (Proteína antioxidante 2)
- ❑ Proteína RuvB-like 2 (48 kDa TATA box-binding protein-interacting)
- ❑ Fructosa-bifosfato aldolasa A (aldolasa de tipo muscular)
- ❑ Histona H2B tipo 1-B (H2B.f)
- ❑ Espliceosoma RNA helicasa BAT1 (DEAD box protein UAP56)
- ❑ Precursor Proteína -disulfide-isomerasa A3 (Disulfide isomeraseER-60) (ERp60)
- ❑ Pirofosfatasa inorgánica (Pirofosfato fosfo hidrolasa)
- ❑ Histona H2B tipo 1-C/E/F/G/I (H2B.a/g/h/k/l)
- ❑ Creatín quinasa tipo B (B-CK)
- ❑ Subunidad zeta de la *T-complex protein 1* (TCP-1-zeta)
- ❑ Probable ATP-dependiente ARN helicasa DDX5 (DEAD box protein 5)
- ❑ Histona H3.3

Así mismo se llevó a cabo un análisis proteómico adicional mediante la técnica de DiGE con el fin de corroborar las proteínas identificadas mediante 2-D y descubrir nuevas proteínas cuya expresión se viera modificada debido a la inhibición de EWS-FLI1.

Figura 57. Mapas proteicos DiGE. La primera imagen corresponde a las muestras marcadas mientras que la segunda es la imagen tradicional 2-D de la misma.

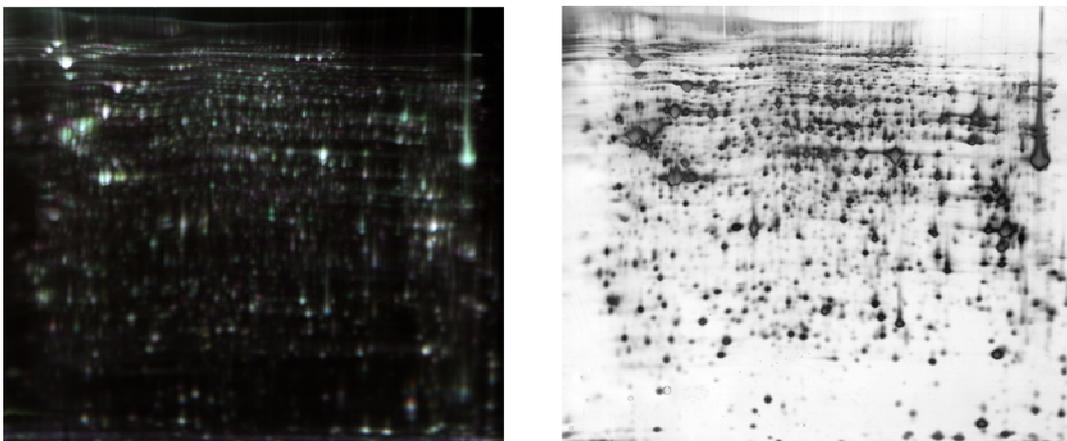


Tabla 11. Proteínas seleccionadas de expresión diferencial por DiGE.

#	Acceso	Muestra	DIGE	Proteína	Símbolo Gen
	número UniProtKB / Swiss-Prot	nombre	shRNAi/mock	definición 55 proteínas distintas	
1	O00571	JM 20, JM 41, JM 55	variable	DEAD/H box polipéptido 3 / ATP-dependiente RNA helicasa DDX3X	DDX3X
2	O14979	JM 64	-1,66	Ribonucleoproteína heterogenea nuclear <i>D-like</i> / CARG factor de unión	HNRPDL
3	O43175	JM 51	1,62	Dehidrogenasa fosfoglicerato	PHGDH
4	O43776	JM 47	-1,95	asparaginil-tRNA sintetasa, isoforma CRA_b	NARS
5	O75534	JM 39	-1,63	<i>cold shock domain containing</i> E1, unión a ARN, isoforma CRA_e	CSDE1
6	O75608	JM 53	1,59	lisofosfolipasa / Acyl-protein thioesterase 1	LYPLA1
7	P00352	JM 60	-1,71	aldehido dehidrogenasa 1A1	ALDH1A1
8	P04083	JM 19, JM 23, JM 29, JM 60, JM 62	variable	anexina I	ANXA1
9	P33316	JM 8	2,13	deoxiuridina trifosfatasa isoforma 3	KRT1
10	P04264	JM 3, JM 10, JM 24, JM 26, JM 30, JM 34, JM 58, JM 63	NA	Queratina, tipo II citoesqueleto 1 (CK-1)	P4HB
11	P07237	JM 32	1,62	prolil 4-hidroxilasa, subunidad beta precursor	HNRPC
12	P07910	JM 16, JM 33, JM 70	variable	ribonucleoproteína C heterogenea nuclear (C1/C2), isoforma CRA_c	HSPA1B
13	P08107	JM 35, JM 43	variable	<i>Heat shock 70 kDa protein 1</i>	HSPA1A
14	P09211	JM 38	1,74	Glutation S-transferasa P	GSTP1
15	P09651	JM 72	-1,9	Ribonucleoproteína A1 heterogeneo nuclear, isoform CRA_g [Homo sapiens]	HNRPA1
16	P10768	JM 66	2,1	esterasa D/formilglutation hidrolasa, isoforma CRA_a	ESD
17	P12004	JM 2	1,91	antígeno proliferativo celular nuclear	PCNA
18	P14618	JM 74	-1,6	Cadena A, Estructura de la Humana de Músculo Piruvato Quinasa (Pkm2)	PKM2

19	P14866	JM 65, JM 67	variable	ribonucleoproteína L heterogénea nuclear, isoforma CRA_a	HNRPL
20	P15121	JM 27	-2,04	Aldosa Reductasa	AKR1B1
21	P17858	JM 59	1,61	fosfofructoquinasa de hígado isoforma b	PFKL
22	P18669	JM 17	1,89	fosfoglicerato mutasa 1 (cerebro)	PGAM1
23	P20042	JM 37	1,62	proteína EIF2S2	EIF2S2
24	P20700	JM 1	3,81	lamina B1	LMNB1
25	P22626	JM 31	2,34	ribonucleoproteína A2/B1 heterogénea nuclear isoforma A2	HNRPA2B1
26	P23381	JM 5, JM 45	variable	Cadena A, Estructura de crystal del fragmento catalítico de aminoacilación de la triptofanil-tRNA sintetasa humana	WARS
27	P25705	JM 73	-1,53	ATP5A1 proteína	ATP5A1
28	P30040	JM 13	1,97	proteína 29 endoplásmico retículo isoforma 1 precursor	ERP29
29	P30043	JM 69	2,36	biliverdina reductasa B (NADPH)	BLVRB
30	P31942	JM 19	-2,26	ribonucleoproteína H3 heterogénea nuclear isoforma b	HNRPH3
31	P34897	JM 28	-2,49	serina hidroximetiltransferasa 2 (mitocondrial)	SHMT2
32	P35241	JM 50	1,78	radixina, isoforma CRA_c	RDX
33	P35527	JM 14	1,82	queratina 9	KRT9
34	P38919	JM 48	1,66	Cadena B, estructura de crystal del complejo Eif4a-III-Barentsz a una resolución 3.0 Å	DDX48
35	P40121	JM 6, JM 42	variable	<i>Macrophage-capping protein</i>	CAPG
36	P40937	JM 29	-2,45	RFC5	RFC5
37	P41250	JM 44	1,82	Glicil-tRNA sintetasa (GlyRS)	GARS
38	P48739	JM 15	2,12	Fosfatidilinositol proteína de transferencia, beta	PITPNB
39	P49591	JM 11	-2,27	seril-tRNA sintetasa, isoforma CRA_g	SARS
40	P52272	JM 75	-1,81	ribonucleoproteína heterogénea nuclear M isoforma b	HNRPM
41	P54577	JM 56	1,62	tirosil-tRNA sintetasa	YARS
42	P62834	JM 7	3,57	Raichu404X / RAP1A, miembro de la familia oncogénica de RAS	RAP1A
43	Q13283	JM 67	-2,38	Ras-GTPasa-proteína de activación - proteína de unión con dominio SH3	G3BP

44	Q14103	JM 18, JM 57, JM 68	variable	ribonucleoproteína heterogénea nuclear D isoforma CRA_f	HNRPD
45	Q15019	JM 46	3,43	Cadena A, Septina humana 2 en Complejo con Gdp	SEPT2
46	Q15181	JM 4	-1,82	pirofosfatasa (inorgánica) 1	PPA1
47	Q16555	JM 9, JM 36, JM 47	variable	<i>dihidropirimidinas-like 2</i>	DPYSL2
48	Q8NC51	JM 25	2,42	CGI-55	SERBP1
49	Q96C23	JM 52	3,16	galactosa mutarotasa (aldosa 1-epimerase)	GALM
50	Q96C36	JM 71	1,71	pirrolina-5-carboxilato reductasa familia, miembro2	PYCR2
51	Q96KP4	JM 40	1,92	CNDP dipeptidasa 2	CNDP2
52	Q99729	JM 21, JM 49	variable	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear AB isoforma b	HNRPAB
53	Q9BWD1	JM 54	1,81	proteína ACAT2	ACAT2
54	Q9NXH9	JM 22	-2,35	TRM1 tRNA metiltransferasa 1 homólogo (S. cerevisiae), isoforma CRA_a	TRMT1
55	Q9NZL9	JM 23, JM 60	variable	metionina adenosiltransferasa II, isoforma beta 2	MAT2B

13. La inhibición de EWS-FLI1 frena el desarrollo tumoral en un modelo murino de xenotransplante.

Después de comprobar *in vitro* los efectos de la inhibición de EWS-FLI1 decidimos analizar por medio de un modelo murino de xenotransplante el comportamiento *in vivo* de las células del clon interferido. Se implantaron las células del clon shARNi, el mock y la línea TC71 wt en ratones inmunodeprimidos *NOD/scid*.

Los animales en los que se inyectaron las células del clon interferido desarrollaron tumores de menor tamaño en comparación con aquellos en los que se implantaron las células del mock o de la línea TC71wt. Los tumores aparecen prácticamente al mismo tiempo en todas las condiciones y durante alrededor de 8-10 días presentan un volumen muy semejante pero sin embargo a partir de entonces hay un crecimiento exponencial tanto en el mock como en la línea TC71 wt mientras que por el contrario el crecimiento tumoral se ralentiza notablemente en el clon interferido tanto en el estadio temprano como en el tardío.

Los tumores se examinaron morfológicamente mediante una tinción hematoxilina-eosina la cual puso de relieve la ausencia de diferencias significativas entre el clon shARNi, el mock y la línea TC71wt. En todos los casos se apreciaron amplias zonas de necrosis ante la falta de vasculogénesis, zonas con numerosas células en fase apoptótica y otras con células viables en proliferación muchas de ellas en mitosis.

Figura 58. Estudios histopatológicos de los tumores en los dos estadios, temprano (T0) y tardío (T8). Aspecto macroscópico de los tumores y tinción hematoxilina-eosina de los mismos.

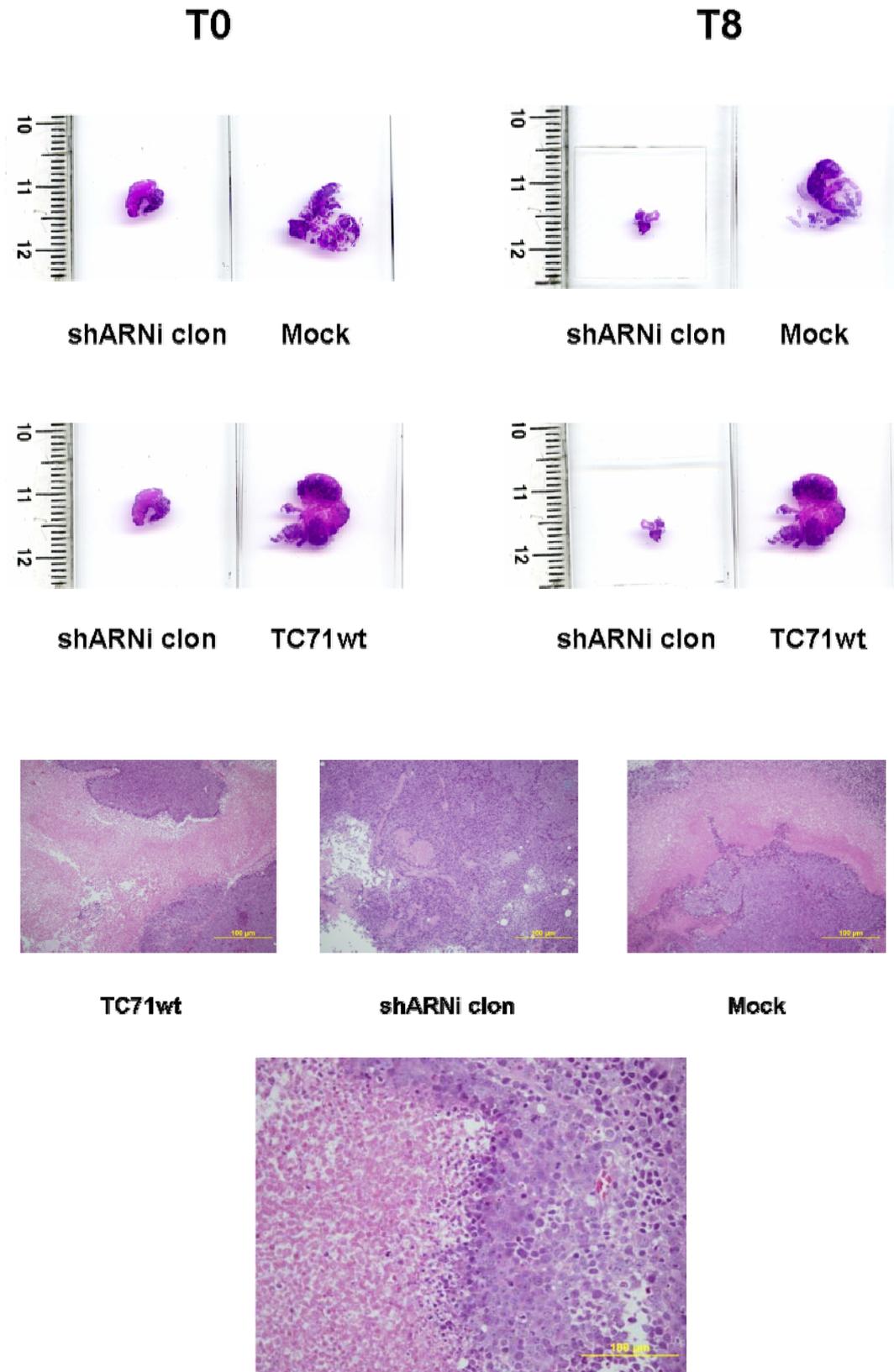
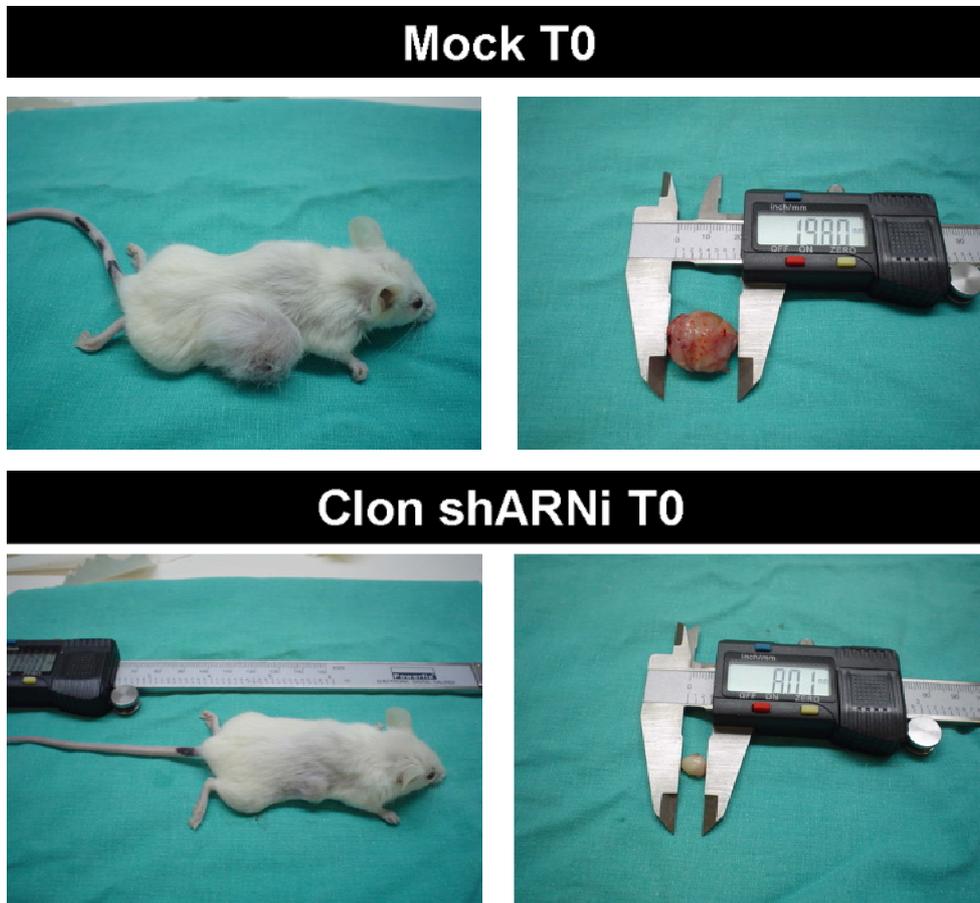


Figura 59. Fotografías de los tumores. a) Comparativa clon shARNi y mock en el estadio temprano (T0). b) Comparativa clon shARNi y mock en el estadio tardío (T8). c) TC71 wt.

a)



b)

Mock T8



Clon shARNi T8



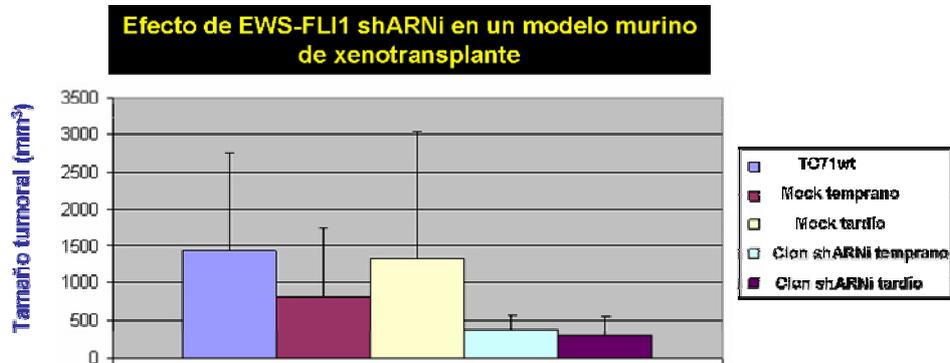
c)

TC71wt

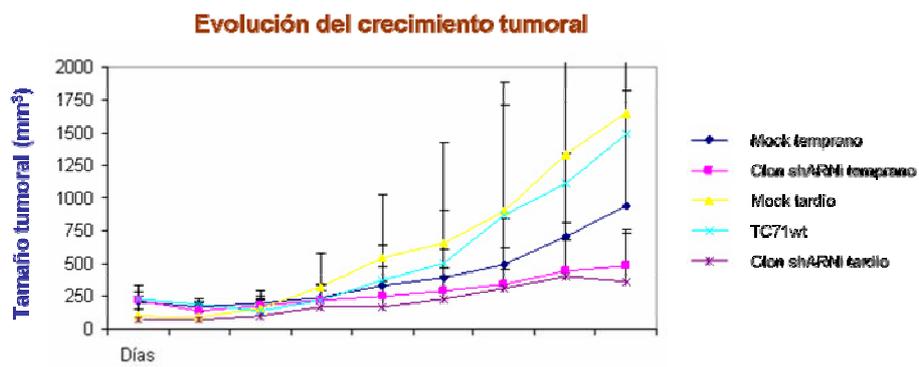


Figura 60. Modelo murino de xenotransplante a) Tamaño tumoral b) Evolución del crecimiento tumoral. Media \pm SD.

a)



b)



14. Génesis del SE. Inducción de la fusión

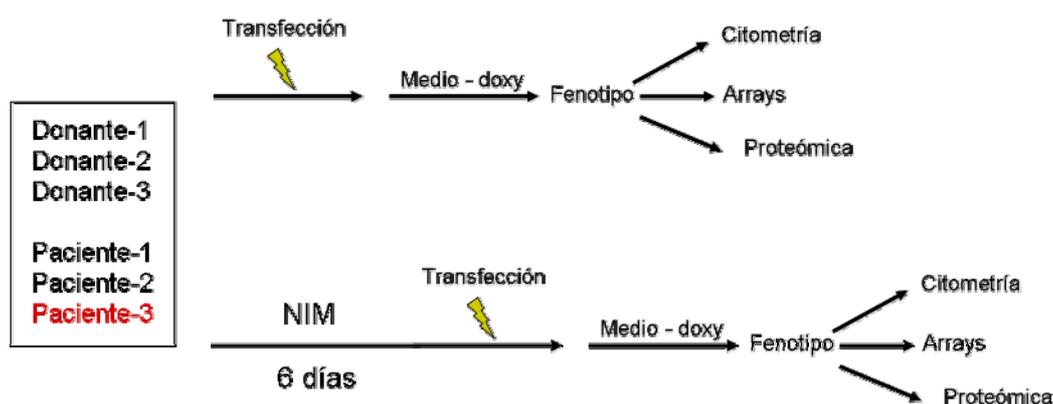
EWS-FLI1 en hMSCs.

A) Caracterización de las hMSCs. Comparativa hMSCs de pacientes de SE y donantes.

Pretendimos generar un fenotipo de SE mediante la inducción de la expresión de las proteínas de fusión, EWS-FLI1 en sus 3 tipos principales (7-6, 7-5 y 10-6) y EWS-ERG, en células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs) obtenidas de 3 pacientes de SE estableciendo como controles células madre del mismo tipo extraídas de 3 donantes sanos.

Se trataba de analizar el fenotipo resultante tras la expresión inducible de las fusiones EWS-Ets mediante distintas técnicas de biología molecular y celular. Así mismo se crecerían las hMSCs en medio de inducción neural para ver si la acción de la proteína de fusión prevalece sobre la diferenciación inducida por el medio de cultivo.

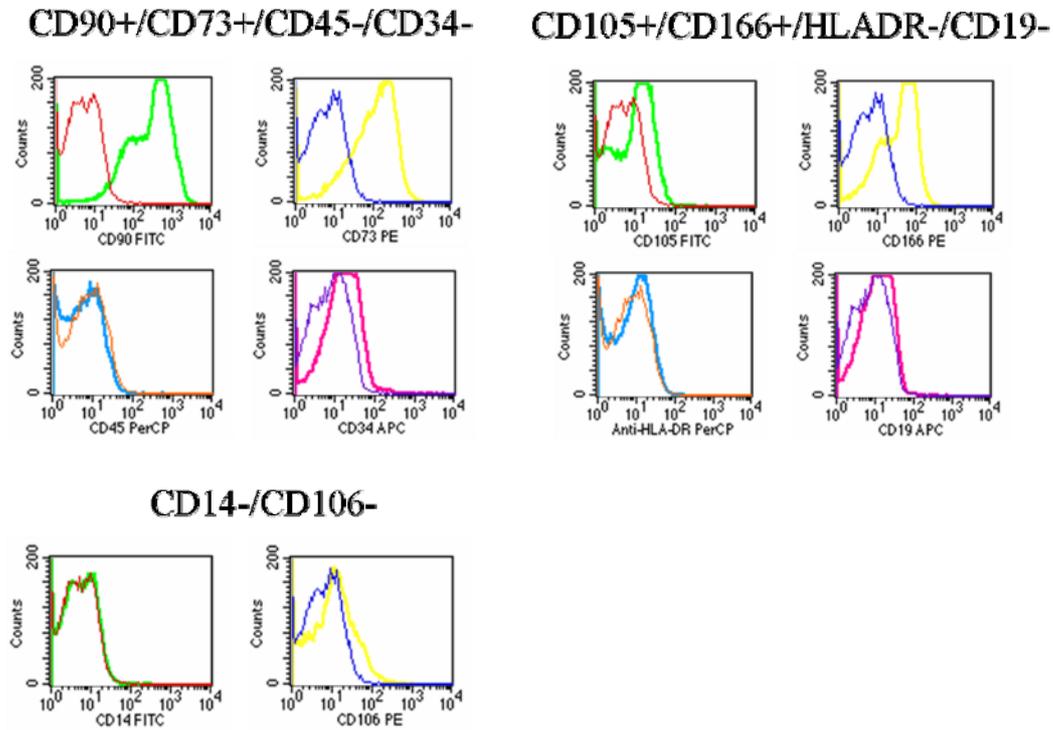
Figura 61. Esquema de trabajo con las hMSCs de donantes y pacientes. NIM: medio de inducción neural.



En primer lugar se caracterizaron las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) procedentes de pacientes diagnosticados de SE. Las células se obtuvieron de la cresta ilíaca. En primer lugar se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo usando diferentes marcadores característicos de las células madre mesenquimales como CD73, CD90, CD105 y

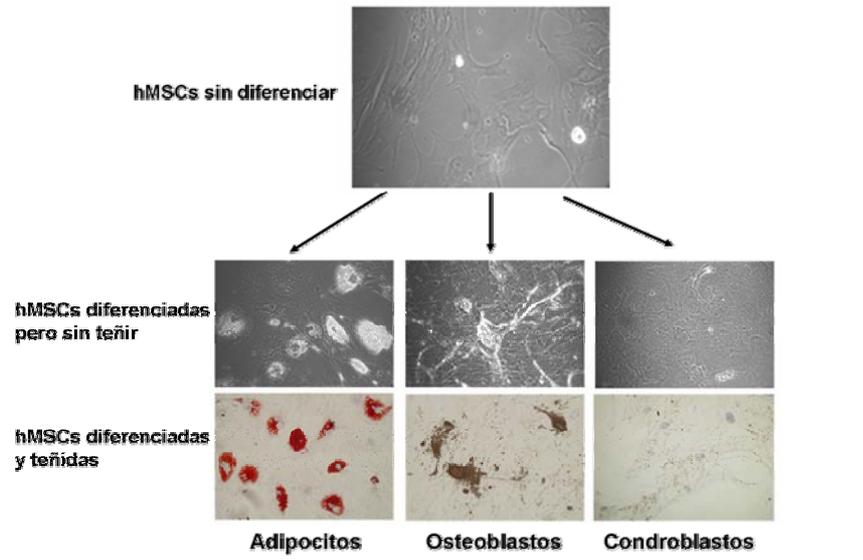
CD166 y con otros marcadores de células madre no mesenquimales como los marcadores hematopoyéticos CD14, CD19, CD34, CD45, CD106 y HLADR. Las células efectivamente expresaron los marcadores mesenquimales y fueron negativas para los restantes.

Figura 62. Inmunofenotipado de las hMSCs por citometría de flujo.



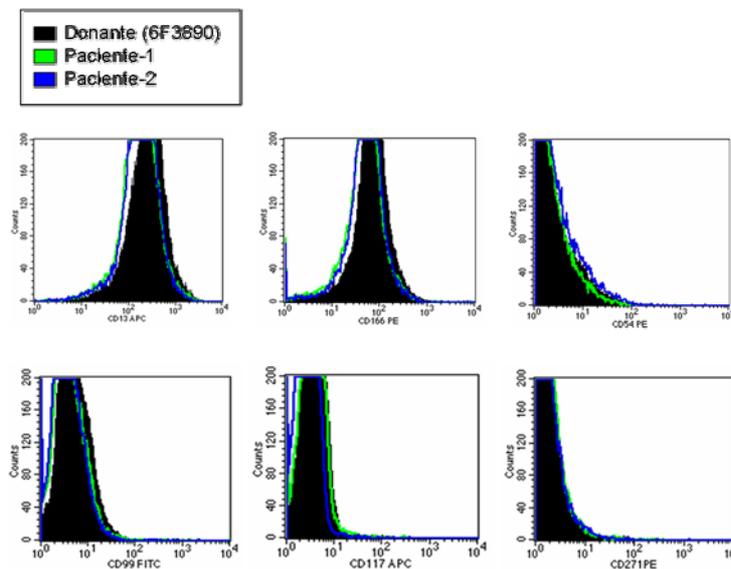
Posteriormente y una vez crecidas las células se caracterizaron comprobando en primer si mantenían el potencial de diferenciación. Se crecieron las hMSCs en distintos medios de diferenciación durante el tiempo necesario para que se pudieran diferenciar. Los medios de diferenciación fueron los siguientes: osteogénico, adipogénico y condrogénico. Las hMSCs crecieron sin problemas en los distintos medios y dieron lugar al linaje típico y esperado en cada uno de los medios. Las tinciones para adipocitos (Von Kossa), para osteoblastos (depósitos de calcio) así como la inmunohistoquímica para los condroblastos (colágeno II) resultaron positivas confirmando que efectivamente estas células son células madre mesenquimales con todo su potencial de diferenciación intacto y el punto de partida deseado para nuestros estudios.

Figura 63. Diferenciación de las hMSCs.



Así mismo mediante citometría de flujo se examinó el estado de marcadores característicos de SE en las hMSCs de paciente para determinar si existía ya un fenotipo de SE en las mismas en comparación con las hMSCs obtenidas a partir de un donante sano. Los marcadores de superficie usados fueron CD13, CD166, CD54, CD99, CD117 y CD 271 siendo el marcaje negativo en todos los casos y sin diferencia alguna entre las hMSCs de los dos pacientes de SE y el donante. Por tanto dichas hMSCs de los dos pacientes no contaban con ningún marcador característico de SE ni fenotipo alguno.

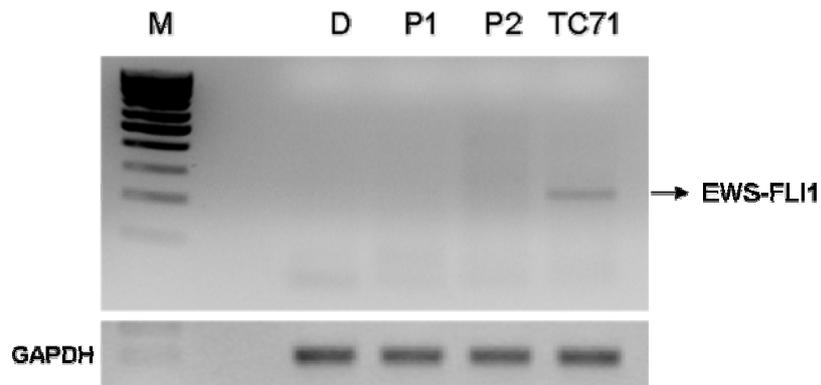
Figura 64. Análisis por citometría de flujo de marcadores característicos de SE. Marcadores usados: CD13, CD166, CD54, CD99, CD117 y CD 271.



Se miró en primer lugar si la fusión EWS-FLI1 ya estaba presente en las hMSCs. Tomando como referencia la línea de SE, TC71, corroboramos la ausencia de la fusión en las hMSCs tanto de paciente como de donante mediante RT-PCR y RT-PCR en tiempo real. Así mismo se corroboró mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) la ausencia de la fusión tomando como referencia la línea celular de SE, TC71.

Figura 65. Detección de la fusión EWS-FLI1 por a) RT-PCR y b) FISH. D: donante 6F3890; P1: paciente 1; P2: paciente 2.

a)



b)

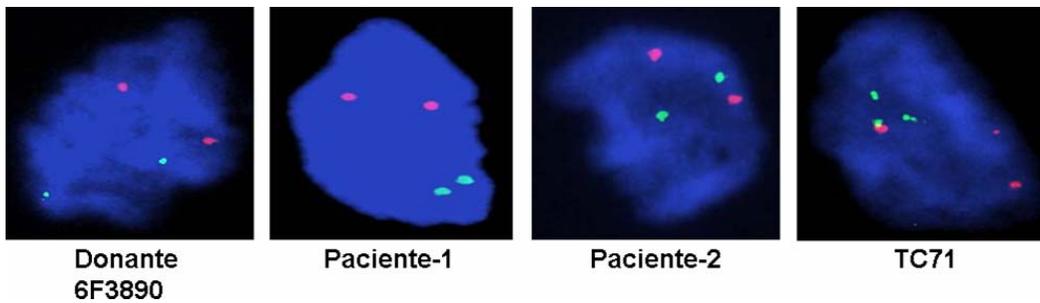
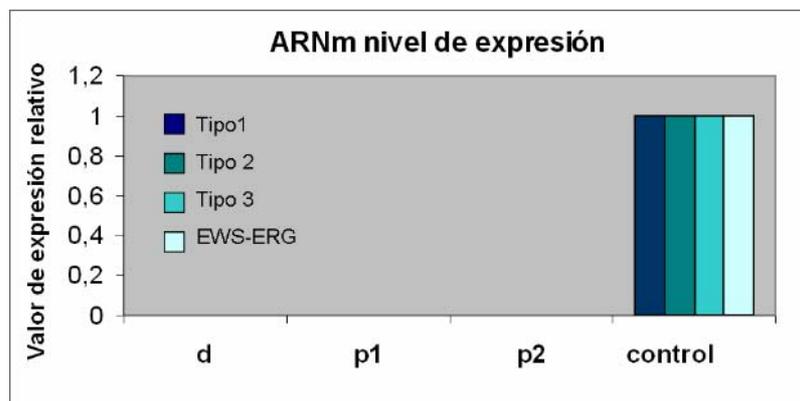


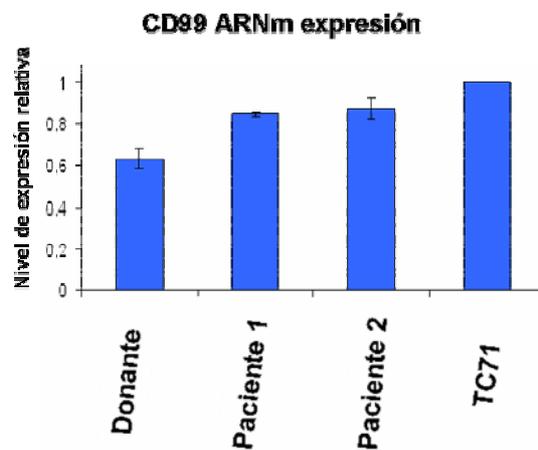
Figura 66. Niveles de la fusiones por RT-PCR en tiempo real. Control: TC71wt.



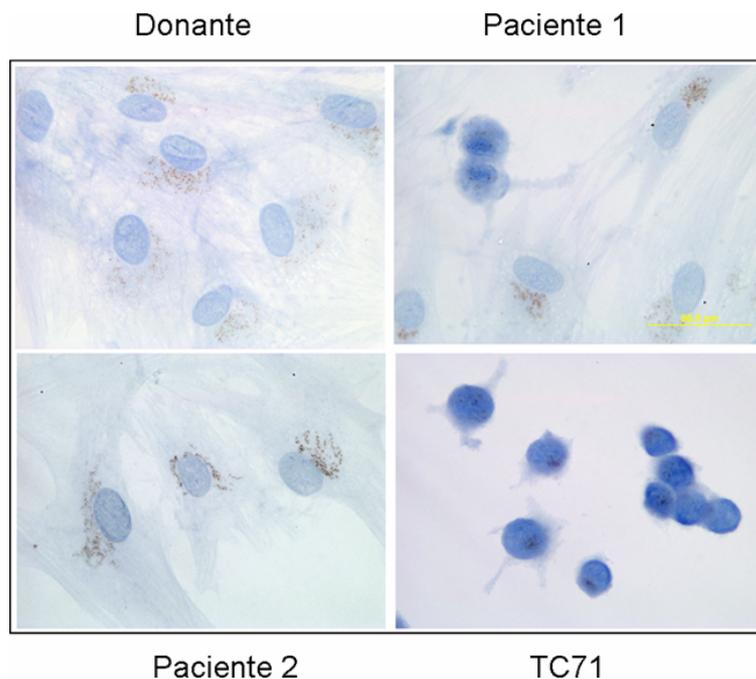
Se midió el nivel de ARNm del marcador característico de SE, CD99, en las hMSCs de paciente y donante por medio de RT-PCR en tiempo real tomando la línea de SE, TC71 como referencia. Los niveles de CD99 en los pacientes fueron superiores a los del donante aunque no alcanzaron el grado de expresión de CD99 en la línea TC71. También se analizó el nivel proteico de CD99 en células crecidas en cubreobjetos mediante inmunohistoquímica. Los resultados corroboraron lo observado ya a nivel de ARNm.

Figura 67. Análisis de la expresión de CD99. a) Nivel de ARNm medido mediante RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD. b) Inmunohistoquímica sobre células crecidas en cubre.

a)

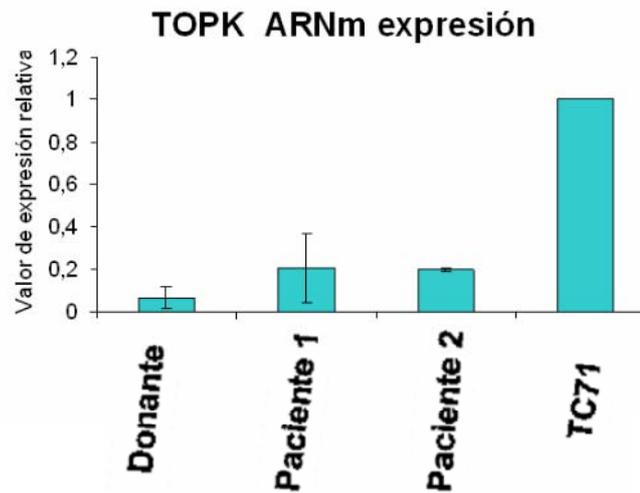


b)



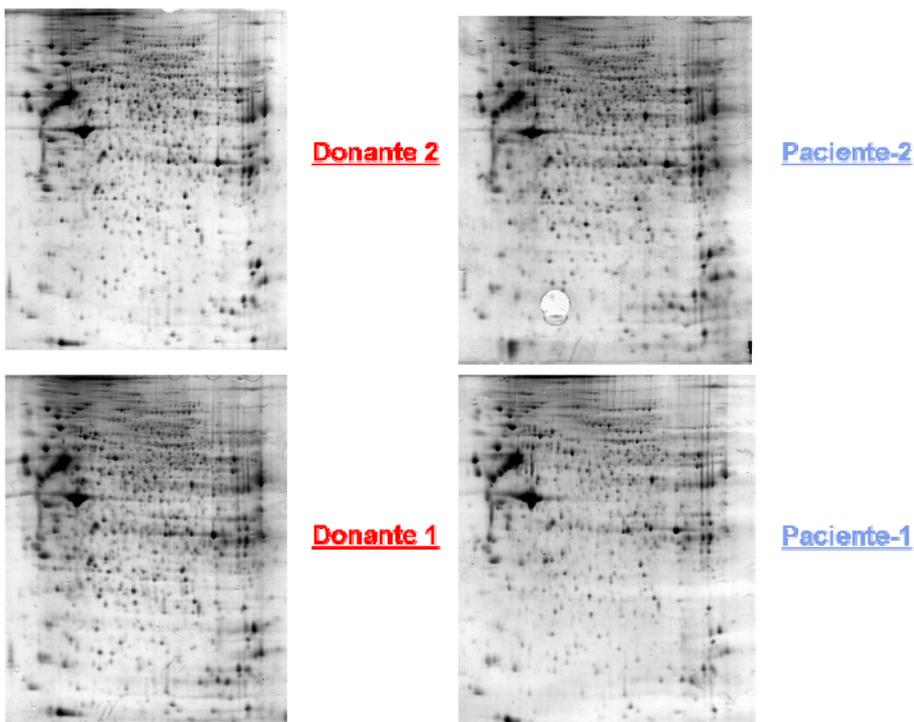
Se midió el nivel de expresión de TOPK mediante RT-PCR en tiempo real. Los niveles en los dos pacientes son superiores a los del donante pero no alcanzan ni mucho menos el de la línea de SE, TC71.

Figura 68. Nivel de expresión de TOPK. RT-PCR en tiempo real. Media \pm SD.



Analizamos así mismo el perfil proteómico de las hMSCs de los pacientes y el donante.

Figura 69. Análisis proteómico. Electroforesis 2-D.



Seleccionamos los *spots* proteicos de interés para su digestión y análisis vía Maldi-Toff.

Así mismo se analizaron las diferencias de expresión génica entre las HMSCs de pacientes y donantes mediante microarrays de expresión génica.

Tabla 12. Genes seleccionados.

<u>Número</u>	<u>Probeset ID</u>	<u>d.value</u>	<u>p.value</u>	<u>q value</u>	<u>Cambio (p vs d)</u>	<u>Descripción</u>
1	ENSG00000133048	5,381628381	0,00000778	0,188873334	9,501354907	Chitinase-3-like protein 1 precursor
2	ENSG00000144681	-4,55676104	0,0000427	0,519401687	0,604320533	SRC homology 3 and cysteine-rich domain protein
3	ENSG00000204443	-4,22505351	0,0000776	0,590229167	0,630425557	-
4	ENSG00000131773	-4,160054093	0,000097	0,590229167	0,675965139	SLM2
5	ENSG00000208836	-3,836383106	0,000163024	0,632725668	0,551254503	-
6	ENSG00000183691	-3,812058258	0,000186314	0,632725668	0,705251098	Precursor Noggin
7	ENSG00000182687	-3,641332207	0,000232892	0,632725668	0,691581149	Precursor de neurotrimina
8	ENSG00000208824	-3,567380122	0,000260063	0,632725668	0,637599599	-
9	ENSG00000210508	-3,372399796	0,000399796	0,755493334	0,677873606	-
10	ENSG00000199200	-3,334627823	0,000434732	0,755493334	0,488670959	-

b) Expresión inducible de EWS-ets en las hMSCs.

Las hMSCs fueron transfectadas con las diferentes fusiones EWS-FLI1 y la fusión EWS-ERG una vez clonadas en el sistema *Tet-Off*. Se utilizó para ello JetPei, reactivo lineal derivado de la polietilenimina. Las hMSCs se transfectaron en el tercer pase. Una vez transfectadas y a las 24h se añadió el G418 para la seleccionar los clones así como la doxiciclina. Posteriormente se comprobó por medio de WB y RT-PCR en tiempo real la efectividad de las transfecciones.

Figura 70. Esquema de trabajo con las hMSCs.

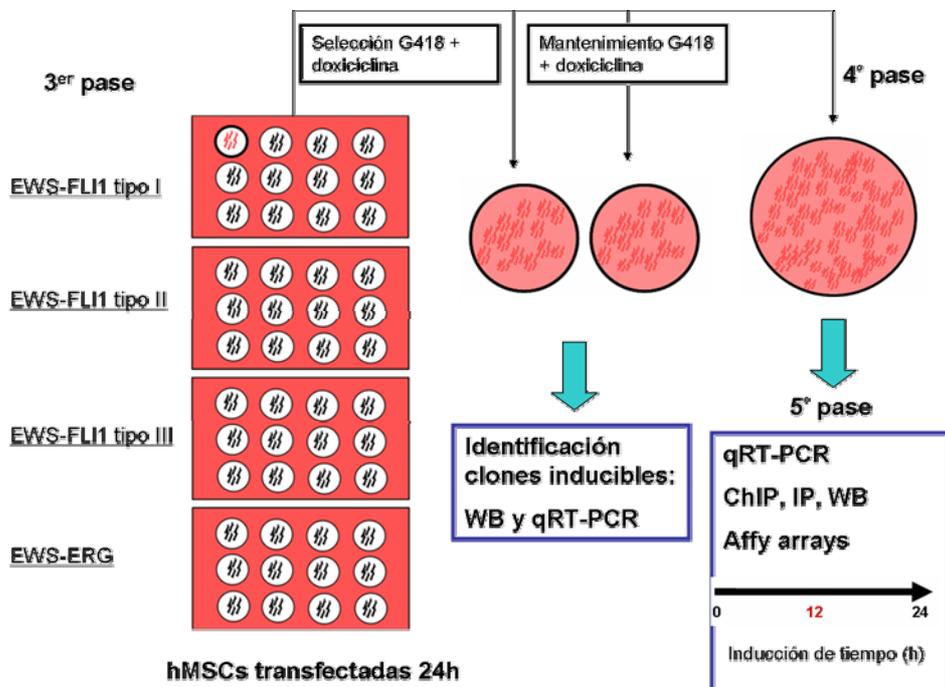
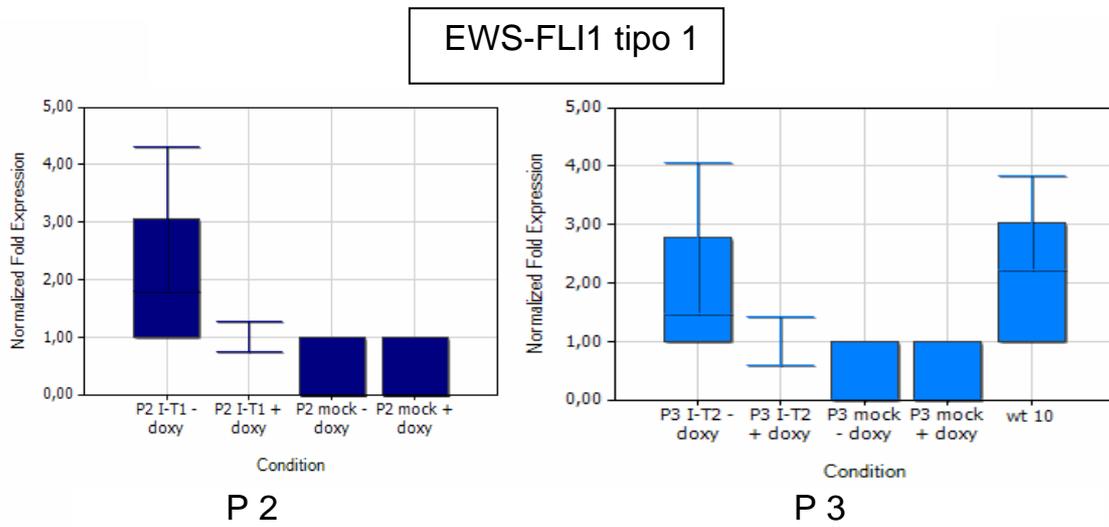


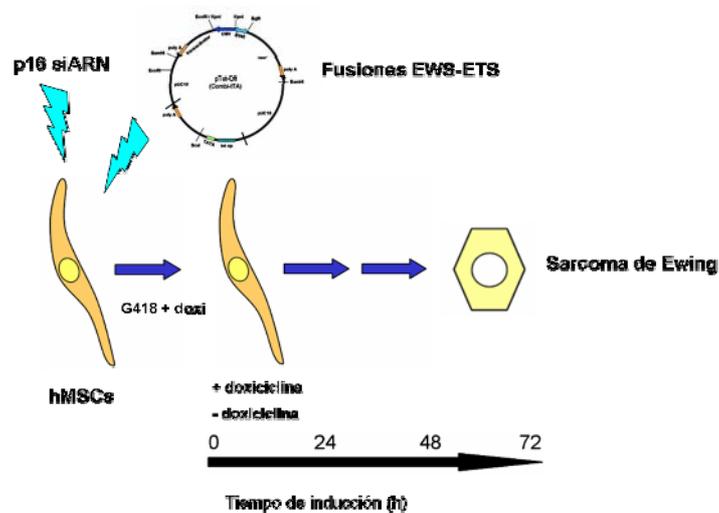
Figura 71. Inducción de las diferentes fusiones EWS-ETS en las hMSCs. Niveles medidos por RT-PCR en tiempo real. EWS-FLI1 tipo 1 (7-6). P: paciente.



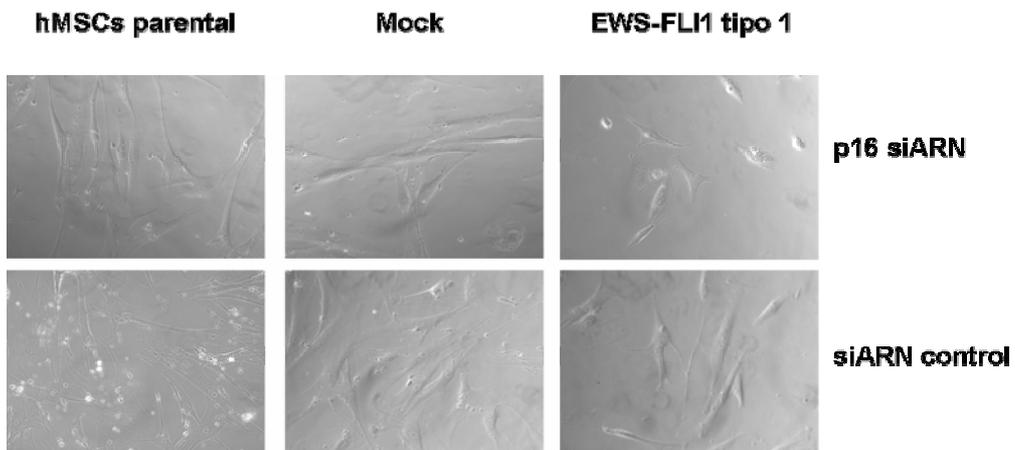
Se trataron las hMSCs transfectadas con las fusiones con oligos siARN contra el gen p16 para posteriormente activar el sistema *Tet-Off* durante un período máximo de 72 horas con el fin de acelerar el desarrollo de un fenotipo de SE. Sin embargo no se observó cambio alguno respecto al mock o a las células hMSCs.

Figura 72. a) Esquema de trabajo. b) Morfología de las hMSCs transfectadas.

a)

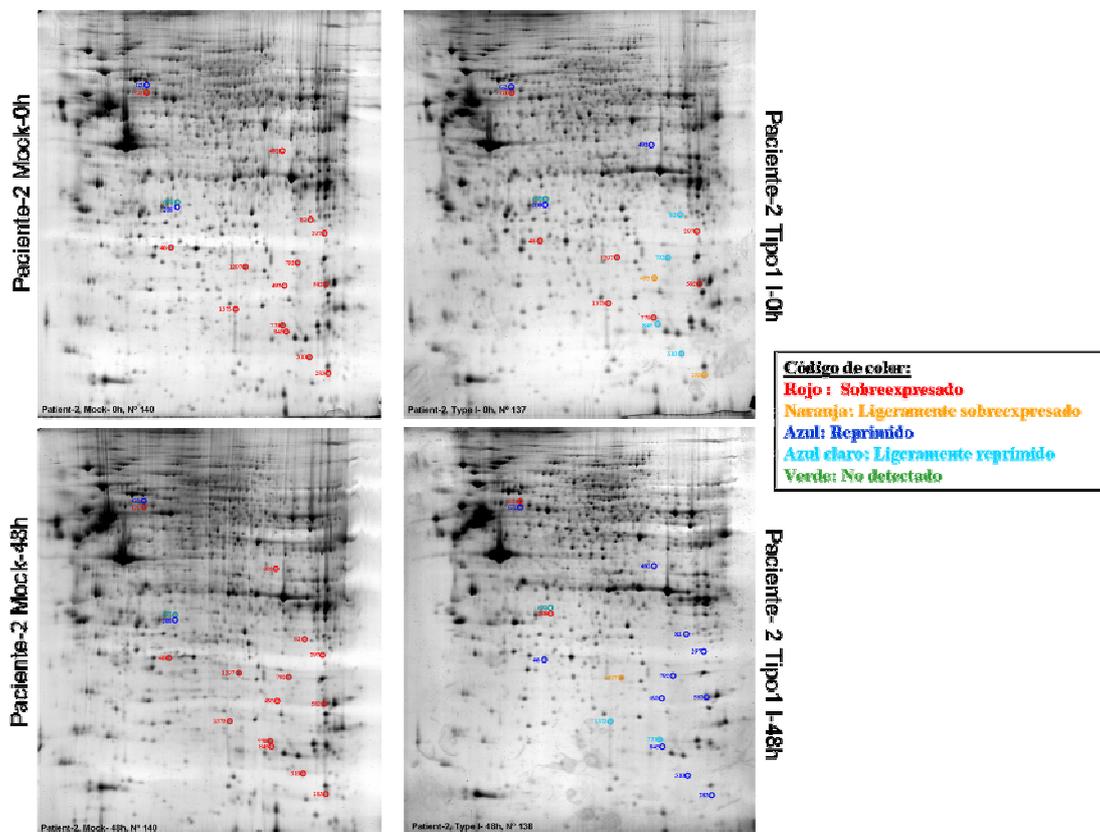


b)



Se analizaron las diferencias inducidas por la expresión de la fusión de tipo 1 en el perfil proteómico mediante electroforesis bidimensional. Los *spots* proteicos seleccionados están siendo actualmente identificados mediante *Maldi-Toff*.

Figura 73. Mapas proteicos 2-D.



DISCUSIÓN

Cerca de un siglo después de la definición del sarcoma de Ewing como un endotelioma difuso de hueso por parte del propio James Ewing (105) se sigue sin conocer a ciencia cierta la célula de origen de esta neoplasia. Si bien se ha avanzado notablemente en el conocimiento del principal agente responsable del desarrollo de este tipo de tumores, las fusiones génicas EWS-ets, y se han descubierto numerosos genes diana de las mismas, no se conoce aún con precisión el mecanismo de acción de dichas fusiones.

Por todas las razones anteriormente expuestas el propósito de esta tesis doctoral ha sido el de profundizar en el conocimiento del comportamiento molecular del sarcoma de Ewing para poder lograr identificar nuevas dianas de la fusión alguna de las cuales pudiera dar lugar al desarrollo de terapias más eficaces en su tratamiento, en especial en aquellos casos metastáticos o recidivantes. Igualmente hemos pretendido conocer mejor la posible histogénesis de esta neoplasia. Para ello nos hemos servido como herramienta principal del ARN de interferencia analizando posteriormente los efectos de la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 mediante distintas técnicas de biología celular y molecular *in vitro* e *in vivo*.

1. Impacto de las fusiones EWS-ets en la biología del sarcoma de Ewing.

Dada la importancia de la acción ejercida por EWS-FLI1 en la biología molecular del SE (44, 49, 74, 115) el primer objetivo que nos planteamos fue el de tratar de inhibir la expresión de la misma en distintas líneas de SE de cara a poder analizar posteriormente los cambios fenotípicos y genotípicos derivados de dicha inhibición.

Decidimos utilizar como herramienta para lograr la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 la técnica de ARN de interferencia dada su gran utilidad para el análisis de los fenotipos asociados a la inhibición de la expresión del gen escogido como diana. El uso del ARN de interferencia en líneas celulares en cultivo y en modelos animales se ha generalizado convirtiéndose en una alternativa al uso del *knock-out* y en pieza fundamental en los análisis de función génica (127, 128, 129, 130).

Los primeros estudios como tales de ARNi en el SE emplearon oligos siARN con un análisis de los efectos a las 48-72h post-transfección (205, 206, 207, 208, 209). Sin embargo la utilización de oligos siARN posee una gran limitación dado que sólo se pueden observar efectos durante un espacio temporal reducido debido a su limitada vida media. Por esa razón nos

propusimos inhibir la expresión de la fusión EWS-FLI1 mediante el uso de shARNi para lograr una inhibición duradera con el transcurso de los pases celulares.

Los modelos de expresión ectópica poseen una importante desventaja dado que no representan el verdadero contexto celular en el que las fusiones génicas actúan. Por ejemplo en el caso concreto del SE en función del sistema celular heterólogo usado los efectos debidos a la introducción de EWS-FLI1 son bastantes diferentes (119, 497). Por esa razón utilizamos utilizamos 4 líneas celulares de SE con la que cubrimos las 3 variantes mayoritarias de la fusión de EWS-FLI1, tipo 1(7-6), tipo 2(7-5) y tipo 3 (10-6), presente en un 85% de los SE (225).

Usando como base el vector plasmídico pSUPER que dirige la síntesis intracelular de transcritos siRNA se diseñaron tomando como referencia el punto de unión de cada una de las fusiones. Se analizó el fenotipo de pérdida de función en distintos clones seleccionados tras 8 pases celulares para confirmar el mantenimiento de la inhibición de EWS-FLI1. En 3 de las 4 líneas de ES usadas se obtuvieron clones interferidos si bien como consecuencia de la supresión de la expresión de EWS-FLI1 sólo se pudo apreciar efectos en una de las líneas de ES, TC71. A4573 cuenta con la fusión tipo 3 (10-6) y SK-ES-1 con la fusión tipo 2 (7-5) mientras que TC71 posee una fusión tipo 1 (7-6) la cual se ha asociado a una tasa proliferativa inferior a la de las fusiones tipo 2 y 3 (375); quizá esto puede explicar que con un grado de interferencia similar tan solo tenga consecuencias la inhibición de aquella variante de la fusión con menor potencial oncogénico y puede que sea necesario un mayor grado de inhibición de la fusión quimérica en las líneas A4573 y SK-ES-1 para poder observar algún efecto.

En la línea TC71 se produjo una reducción de hasta un 65% de los niveles de ARNm de EWS-FLI1 y así mismo del nivel proteico de la fusión. Se pudo verificar que la interferencia de EWS-FLI1 se mantuvo con el paso del tiempo aunque se redujo ligeramente con el transcurso de los pases celulares. Los efectos de la inhibición de EWS-FLI1 se pudieron observar en varios clones de cada línea celular y estuvieron relacionados proporcionalmente al grado de interferencia de la fusión indicando una relación directa y específica entre dicha inhibición y los efectos observados. No fue posible lograr una inhibición total y absoluta de EWS-FLI1 y creemos que es debido a que las líneas tumorales necesitan un cierto nivel de EWS-FLI1 para seguir activas y mantener su estatus de malignidad.

La inhibición fue específica dado que los niveles del gen EWS, de expresión ubicua, no se vieron afectados.

Los distintos estudios de ARN de interferencia del tipo *short hairpin RNA* (shRNA) llevados a cabo para lograr una inhibición duradera con el transcurso de los pases celulares en el SE aparecidos en el transcurso de esta tesis han presentado el análisis de los efectos de la interferencia de ARN tras la infección y selección con antibiótico. Se han usado distintos vectores ya sean del tipo pSUPER retroviral (212) en la línea STA-ET-7.2, pSRP retroviral con promotor H1 dirigido contra el UTR 3' de la fusión en la línea A673 (213, 214, 216) o las líneas TC71 y EWS502 (215) o inducibles lentivirales con doxiciclina en las líneas A673 y SK-PN-DW (217). Si bien en todos y cada uno de estos estudios se obtuvieron clones interferentes teóricamente estables con el transcurso de los pases celulares tan solo en uno de los estudios, línea A673 transfectada con un sistema shARNi retroviral, se hace referencia al estudio de los efectos de la interferencia de la fusión en un estadio tardío mencionando que el efecto de la interferencia de la fusión EWS-FLI1 se va diluyendo con el transcurso del tiempo y los pases celulares (213).

Nuestro estudio no es pionero al inhibir la expresión de EWS-FLI1 en una línea de SE pero sí lo es al analizar y mostrar los efectos de la inhibición en un estadio inicial y uno más avanzado transcurridos 8 pases celulares demostrando que efectivamente se trata de un modelo de interferencia estable de EWS-FLI1 en el SE.

2. La reducción de forma estable de los niveles de EWS-FLI1 provoca un incremento en la fracción apoptótica, una reducción de la capacidad migratoria y de transformación oncogénica.

Del total de 30 clones obtenidos en la línea de SE, TC71, seleccionamos aquel que mostró la inhibición más marcada de la expresión de EWS-FLI1, el clon TC71 shARNi 6, de cara a caracterizar y evaluar su fenotipo molecular y celular.

El principal efecto que observamos en nuestro modelo debido al silenciamiento de la fusión fue una fuerte inducción apoptótica, hasta del 70% en comparación con la línea TC71wt y el mock, relacionada con la inducción de la caspasa 9 uno de los principales actores implicados en el fenómeno de la apoptosis. Se ha descrito que un alto número de líneas celulares de SE, entre ellas TC71, son sensibles a la acción apoptótica desencadenada por TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) que provoca la activación de caspasa 9 entre otras caspasas (498). Inhibidores de la histona deacetilasa también son capaces de promover la apoptosis vía TRAIL-caspasa 9 en líneas ES (499). Distintos agentes como el flavopiridol, un pan-inhibidor de CDKs (500) o el 2-Metoxiestradiol, un metabolito fisiológico del 17 β -estradiol (501) son también capaces de inducir en líneas de ES el procesamiento de la pro-caspasa 9 con la consiguiente activación de la caspasa 9. En todos los casos se puede bloquear el proceso con el pan-inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. También pudimos comprobar en nuestro modelo interferente el procesamiento de PARP. El procesamiento de PARP tiene lugar en líneas de ES como TC71 al tratarlas con fármacos como bortezomib (502) o con flavopiridol. Así pues la inhibición de la fusión EWS-FLI1 propicia una mayor sensibilidad apoptótica del clon interferido mediante el procesamiento de la forma inactiva de la caspasa 9 y la activación de la misma que inicia toda la cascada de caspasas que además es mantenida con el transcurso de los pases celulares. El ligero procesamiento de caspasa 9 que se pudo detectar en el mock se reveló insuficiente para desencadenar la apoptosis. Estudios previos de ARNi (205, 208) obtuvieron el mismo resultado de inducción apoptótica al inhibir EWS-FLI1.

Otro notable efecto observado en el clon interferido fue una notable reducción de su capacidad de crecimiento independiente de anclaje, esto es, de su potencial de transformación

oncogénica. La bajada de los niveles de la fusión tuvo como consecuencia la aparición de menos colonias (35-40% de reducción) y de un menor tamaño en el clon interferido especialmente en el estadio inicial. Un efecto semejante ha sido descrito en otros modelos de silenciamiento de EWS-FLI1 (212, 213, 215).

La inhibición de EWS-FLI1 redujo la capacidad migratoria de las células de SE en torno a un 30% en ambos estadios temporales. El gen CCN3 (NOV) se ha descrito como un importante mediador de migración e invasión en el SE (503) y su expresión se encuentra reducida en nuestro modelo lo que puede explicar la pérdida de esta función en las células interferidas.

La tasa de crecimiento del clon shARNi se redujo en un 30% pero solamente en el estadio inicial ya que dicho efecto inhibitorio se acabó perdiendo con el transcurso de los pases celulares. En otros modelos de silenciamiento de la fusión bien del tipo oligonucleótidos o ARN antisentido (201, 202, 203, 204), oligos siARN (205, 206, 208) o del tipo shARNi (212, 215) si se ha logrado frenar en mayor medida la proliferación celular. Sin embargo en otros estudios llevados a cabo en la línea de SE, A673, no se observó cambio alguno en la tasa de crecimiento de las células interferidas (213, 214). Parece que la reducción de los niveles de EWS-FLI1 logrados en nuestro modelo interferente de TC71 si bien en un estadio inicial ralentiza el crecimiento al final al perder parte del efecto no es suficiente *per se* para limitar el crecimiento *in vitro* de las células. El crecimiento de las distintas líneas de SE está sometido a una compleja y a la par precisa regulación ya que por ejemplo si se reintroduce la fusión EWS-FLI1 en un clon interferido hasta llegar a niveles suprafisiológicos de la misma el crecimiento celular se resiente (213). La existencia de diferencias por ahora desconocidas en el *background* celular de las distintas líneas de SE y de las distintas variantes de las fusiones EWS-ETS podría explicar este fenómeno poniendo de manifiesto una vez la vital importancia del contexto celular a la hora de la actuación de las fusiones génicas (119). Otra explicación plausible es la avanzada por Matsunobu *et al* que han demostrado que los shARNi diseñados contra el punto de ruptura de las fusiones son menos efectivos a la hora de inhibir el crecimiento celular que aquellos diseños enfocados a la secuencia dentro de la mitad 5' de EWS-FLI1 (504). Nuestros diseños shARNi se hicieron contra el punto de fusión de EWS-FLI1 con el fin de evitar afectar a los genes *wild type* EWS y FLI1 si bien Fli-1 sólo se expresa en el linaje hematopoyético (242, 244), con una pequeña diferencia de posición de 8 nucleótidos por lo que efectivamente pudieran ser menos eficientes que un diseño contra el extremo 5' de la fusión.

No se detectó cambio alguno en el clon shARNi en cuanto al patrón de distribución del ciclo celular tras el análisis por citometría de flujo. La expresión inducible de EWS-FLI1 en el

modelo heterólogo de la línea celular HeLa activa c-MYC y reprime al inhibidor de CDKs, p57^{Kip2} (120). Curiosamente los niveles de este importante regulador del ciclo celular sí que se vieron afectados como consecuencia de la inhibición de EWS-FLI1, cuya expresión se vio incrementada en el clon interferido. Otros miembros de la familia Cip/Kip CKI como p21-Cip1 o p27-Kip1 pueden estar contrarrestando el incremento de p57-Kip2 manteniendo el ciclo celular en las mismas condiciones.

No apreciamos cambio alguno significativo en cuanto a la morfología del clon shARNi con respecto a la línea TC71wt o al control interno transfectivo (mock-pSUPER), aunque las células del modelo interferido tienden a crecer más juntas, algo más apelotonadas, con forma romboidea y con pocas prolongaciones tipo neurita.

El análisis de la longitud de los telómeros no arrojó resultado significativo alguno.

Se obtuvieron resultados semejantes en cuanto al patrón del ciclo celular y el índice apoptótico para los restantes clones shARNi. En dichos clones la interferencia de EWS-FLI1 no fue tan pronunciada. Pudimos establecer una correlación directa entre el grado de inhibición de la fusión y el alcance de los cambios observados, confirmando de esta forma que los cambios observados son una consecuencia directa y específica de la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 y no eran debidos a efectos clonales inespecíficos. En este sentido llevamos además a cabo un análisis del estatus genómico del clon interferido comparándolo con el del mock y la línea celular TC71wt. Pudimos verificar mediante la técnica de *CGH arrays* que los efectos observados en el clon interferido no fueron debidos a inestabilidad genómica alguna. El estatus genómico de la línea de SE TC71 wt, el mock y el clon shARNi no se alteró con el transcurso de los pases celulares, por lo que los cambios en el comportamiento molecular del clon shARNi fueron debidos exclusivamente a la supresión de la expresión de EWS-FLI1 y no a ningún tipo de cambio genético secundario detectable.

3. Análisis de la expresión génica del clon shARNi.

Llegar a comprender el mecanismo de acción de la fusión EWS-FLI1 requiere la identificación de sus genes diana. El objetivo del análisis de la expresión génica tras la interferencia de EWS-FLI1 fue el de descubrir dianas putativas cuyos niveles variaran como consecuencia de la inhibición de la fusión. Mediante el uso de *microarrays* de expresión se pudieron analizar los cambios inducidos por la interferencia de la fusión EWS-FLI1 en la denominada firma molecular. Se pudieron confirmar de esta forma dianas ya establecidas de la fusión, descubrir otras nuevas dianas putativas y confirmar la validez de nuestro modelo estable de interferencia.

Analizamos los perfiles del clon shARNi, el mock y la línea TC71 wt en las dos fases temporales con la plataforma de expresión Affymetrix HG-U133A. El número de genes activados o reprimidos por la fusión fue similar (en torno a los 200 genes), habiendo establecido como parámetros selectivos un cambio de dos órdenes de magnitud y un valor p inferior a 0,05. Del análisis bioinformático de los datos con dos programas de *software* diferentes pudimos corroborar dianas de EWS-FLI1 ya descritas en la literatura. La mayor parte de los genes cambiados aparecía en ambos análisis. Algunos de estos genes habían sido ya descritos como dianas inducidas o reprimidas por EWS-FLI1, como por ejemplo p57-Kip2, DAX1-NR0B1, IGF-1 o zixina (120, 206, 351, 505). Los resultados obtenidos en los *arrays* se validaron a nivel transcripcional (qRT-PCR) o traduccional (WB/IHQ) y se corroboraron todos ellos.

A pesar de que el SE no pertenece al grupo de sarcomas en los que se producen mutaciones de genes involucrados en el control y/o la progresión del ciclo (20) sí son relativamente frecuentes ciertos acontecimientos tales como las pérdidas de p16 o Rb, lo que implica progresión en el ciclo celular y entrada en fase S del mismo (24) o mutaciones en p53 y amplificación de MDM2 (25, 26). EWS-FLI1 ejerce distintas acciones sobre el ciclo celular en función del contexto celular en el que actúe así por ejemplo la introducción de la fusión en la línea de fibroblastos murina MEF provoca parada del ciclo celular (117) mientras que en fibroblastos humanos embrionarios inmortalizados con telomerasa los efectos causados por la transfección de EWS-FLI1 son similares provocando una parada del crecimiento celular vía p53 e inducción de apoptosis (110). Fli-1 interviene en procesos de transformación tumoral ya que puede unirse al promotor del gen Rb inhibiendo su expresión y favoreciendo la progresión del ciclo celular con la transición G1/S en el ciclo y la inducción de p21 y del factor de supervivencia anti-apoptótico Bcl-2 (252, 253). EWS-FLI1 afecta a la proliferación celular alterando la expresión de reguladores clave del ciclo celular como CDKN1A o p21, diana directa de la misma (344). La expresión de EWS-FLI1 en células Hela aumenta los niveles de

ciclina D1 así como los de Myc y disminuye los de p57, inhibidor del complejo ciclina-CDK. La sobreexpresión de ciclina D1 en muestras de SE está comprobada. Si se transfecta una línea de rhabdomyosarcoma con EWS-FLI1 la expresión de ciclina D1 sube y la de D3 baja lo que confirma que la regulación de las ciclinas al menos por parte de la fusión depende del contexto celular (345). El gen Id2 es otra diana de la fusión; Id2 promueve la proliferación celular inactivando Rb y promoviendo la transición de la fase G1 (346). Id2 es además diana de c-myc así como antagonista del inhibidor del ciclo celular p21 (348). C-myc a su vez está relacionado con p57, que es una diana reprimida por EWS-FLI1 (120).

En nuestro modelo interferente pudimos ratificar una fuerte inducción de p57-Kip2 correlacionada con la inhibición de EWS-FLI1, tanto a nivel de ARNm como proteico. La evaluación del patrón de ciclo celular no permitió apreciar cambio alguno. Aunque la expresión de p57-Kip2 aumentó no se tradujo en alteración alguna del ciclo. Quizás otros miembros de la familia Cip/Kip CKI como p21-Cip1 o p27-Kip1 pueden contrarrestar el aumento de los niveles de p57-Kip2 (506) evitando de esta forma una parada del ciclo celular. Además p53 no se expresa en la línea TC71 (507). Muy recientemente se ha vinculado a Notch con la activación de p53 en líneas de SE (508).

NKX2.2 ha sido descrito recientemente como diana directa de EWS-FLI1 (213) y un estudio posterior del mismo grupo ha ratificado su papel como mediador de la actividad de represión transcripcional ejercida por EWS-FLI1 (509). La expresión proteica de NKX2.2 se vió reducida en ambos estadios. NKX2.2 es un gen *Homeobox* que desempeña un importante papel en el desarrollo neural (510) del que se ha comprobado su utilidad en el SE junto a los genes STEAP1 y CCND1 como marcador de supervivencia y de ausencia de metástasis (511).

La expresión del gen DAX1-NR0B1 también se ha relacionado con el ES (206, 215). DAX1-NR0B1, como se pudo comprobar por WB e IHQ sobre pellets celulares también sufrió una drástica reducción tras la represión de la fusión. Nuestros resultados verifican el importante papel que puede estar desempeñando DAX1-NR0B1 en el SE y su interés como posible diana terapéutica en el SE.

4. La interferencia de EWS-FLI1 reprime los niveles de IGF1 y sensibiliza a la acción de los inhibidores de la vía de transducción de señales de IGF1-IGF1R.

Los datos obtenidos del análisis de expresión génica señalan a IGF1 como uno de los genes reprimidos más importantes cuando se inhibe la fusión por lo que y dada la gran importancia de la vía de proliferación y supervivencia IGF1/IGF1R en los sarcomas en general y en el SE (27, 117, 118, 350, 351) se decidió explorar el estado de la misma en el clon interferido.

Efectivamente IGF1 está infraexpresado en el clon shARNi como pudimos ratificar mediante Western Blot y PCR en tiempo real. Sin embargo no hubo cambio alguno en los niveles de expresión del receptor de IGF1, IGF1R. La evaluación del efecto de distintos inhibidores de la vía de IGF1/IGF1R como NVP-AEW541, PD98059 y LY294002 en los niveles y en la activación de las proteínas AKT y MAPK42/44 se llevó a cabo mediante Western Blot. Así mismo estudiamos el efecto sobre la apoptosis y la proliferación. NVP-AEW541 es un derivado de la pirrol[2,3-d] pirimidina capaz de inhibir las quinasas de bajo peso molecular de la vía de IGF1/IGF1R (512). PD98059 y LY294002 son dos inhibidores de MEK y de PI3-K respectivamente, los cuales son genes clave en la vía estudiada (513, 514).

El IC50 para todos ellos fue inferior en el clon shARNi con respecto al mock y a la línea celular TC71wt. Bajo estimulación con IGF1 los niveles de las formas fosforiladas de AKT y MAPK42/44 se redujeron. Aún cuando el clon interferido ya mostraba antes de la adición de los inhibidores unos niveles elevados de inducción apoptótica el tratamiento con los mismos indujo aún más apoptosis. Pudimos comprobar por tanto que el clon shARNi era más sensible a los efectos de distintos inhibidores de la vía de IGF1/IGF1R.

La mayor sensibilidad del clon shARNi a la acción de los inhibidores de la vía de IGF1-IGF1R se debe a la reducción de los niveles del ligando IGF1 ya que los de su receptor, IGF1R no se vieron alterados. La vía de IGF1-IGF1R no sólo es importante *per se* en el SE (350) sino que se ha demostrado que es necesaria para la transformación inducida por EWS-FLI1 en fibroblastos murinos (117). Las células del SE requieren IGF1 para crecer (383) y muestran una alta sensibilidad a la inhibición de esta vía de transducción de señales (384).

El bloqueo de esta vía usando distintas estrategias como el ARN de interferencia, ARN u oligos antisentido o inhibidores específicos de tirosín-quinazas se ha demostrado eficaz logrando disminuir el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (118, 350, 384, 512, 515, 516). La represión de IGF1 como consecuencia de la inhibición de la fusión puede también contribuir no solamente a hacer al clon shARNi más sensible a la acción de agentes antiproliferativos y proapoptóticos sino que puede mediar también en la reducción del potencial oncogénico del clon interferido. La activación de Akt mediante IGF1/IGF1R se ha demostrado necesaria para el crecimiento independiente de anclaje en células MEF transformadas con la fusión ETV6-NTRK3 (517). ETV6-NTRK3 es una fusión característica del fibrosarcoma congénito (31, 274). Un mecanismo similar pudiera estar teniendo lugar en nuestro modelo shARNi ya que tanto IGF-1 como fosfo-AKT tienen sus niveles reducidos tras la inhibición de EWS-FLI1 y precisamente las células interferidas poseen una menor capacidad de transformación oncogénica, crecen en menor número sobre el agar blando y dando lugar a colonias de menor tamaño. Todas estas observaciones no hacen sino recalcar la gran importancia de la vía de señalización de IGF1/IGF1R en la biología del SE conjuntamente con la acción de EWS-FLI1 y la necesidad de conseguir bloquear ambas para mejorar el manejo terapéutico del SE.

5. Análisis proteómico del clon shARNi.

Decidimos analizar el perfil proteómico del clon interferido para estudiar los posibles cambios debidos a la inhibición de la expresión de EWS-FLI1.

La primera aproximación se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional. Tras separar las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico y peso molecular se seleccionaron aquellos spots de interés para ser analizados por *Maldi-Toff* y posteriormente con el programa de *software* bioinformático *Melanie*.

Obtuvimos una lista de proteínas con expresión diferencial entre el clon shARNi y el mock y el TC71wt con un valor de p inferior a 0,05 y un *score* de al menos 54.

De entre dicho grupo de proteínas destacan:

- histona H2B tipo 2-F, histona H2B tipo 1-C/E/F/G/I, histona H3.3. Está probado que el tratamiento de líneas de SE con inhibidores de la histona deacetilasa restaura los niveles de distintas histonas así como posee un efecto antiproliferativo y proapoptótico vía TRAIL-caspasa 9 (499, 518). En nuestro modelo interferente la apoptosis se encuentra notablemente incrementada y tiene lugar vía caspasa 9 igualmente lo que establece una posible conexión entre ambos eventos.

- RuvB-like 2. Posee actividad ATPasa y ADN helicasa 5' to 3' que forma parte del complejo NuA4 histona acetiltransferasa implicado en la activación transcripcional génica mediante la acetilación de distintas histonas (519).

- DDX5 (p68). Proteína caracterizada como todas las de su familia *DEAD box* por la presencia de un dominio conservado Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) y que se considera como una ARN helicasa. p68 junto a p72 se asocian con la proteína represora transcripcional histona deacetilasa 1 (HDAC1) si bien en función del contexto en el que se exprese puede actuar también como coactivador (520).

Posteriormente usamos un análisis del tipo DiGE para obtener más información acerca del perfil de expresión proteica del clon interferente. La técnica DiGE es una modificación del método de electroforesis bidimensional de proteínas 2-D *PAGE* que va a permitir un análisis

preciso y detallado de las diferencias en la abundancia de las proteínas entre las distintas muestras analizadas (521).

Nuevamente obtuvimos una lista amplia de proteínas cuya expresión cambiaba tras la interferencia de EWS-FLI1. Sin embargo comparando las dos listas de proteínas obtenidas tras los análisis de 2-D *PAGE* y DiGE sólo 3 proteínas coincidieron:

- la pirofosfatasa inorgánica, enzima citoplasmática que participa en la fosforilación oxidativa. Identificada también mediante análisis proteómico en muestras de cáncer de próstata (522).
- ARN helicasa DDX3X. Descrita como supresor tumoral (523) pero también como oncogen (524).
- Triptofanil ARNt sintetasa humana. Identificada por 2D-*PAGE* como una de las proteínas que responden al tratamiento de líneas de melanoma con interferón alfa (525).

Otras proteínas interesantes identificadas por DiGE y relacionadas con el SE son:

- GSTP1, Glutation S-transferasa P. Gen estudiado en cuanto a su estado de metilación en distintas líneas de sarcomas (526). Altos niveles de esta enzima se han asociado a resistencia a fármacos como el cisplatino en osteosarcoma (527).
- ESD, esterasa D/formilglutation hidrolasa, isoforma CRA_a. Gen muy próximo a Rb con frecuentes pérdidas, deleciones o amplificaciones en distintos sarcomas incluido el SE (528).
- PCNA, antígeno proliferativo celular nuclear. Los niveles de PCNA disminuyen cuando se induce muerte celular mediante bFGF en un proceso en el que se sobreexpresan p21 y p53, se reduce la expresión de ciclina A y de pRb1 y las células se paran en G1 (529).

Así mismo se han tomado en consideración otras proteínas no descritas hasta el momento en el SE pero que consideramos pueden ser de interés su estudio las cuales pueden agruparse de acuerdo a ciertas características funcionales:

- ❖ Proteínas estructurales relacionadas con el citoesqueleto: queratina tipo 2, lamina B1, radixina, queratina 9, queratina tipo 1
- ❖ Proteínas relación con la unión a ARN, procesamiento alternativo, actividad helicasa: TRM1 ARNt metiltransferasa 1, proteína de unión a ARNm serpina 1, ribonucleoproteínas nuclear heterogénea AB isoforma b, D, M isoforma b, H3,

isoforma b, A2/B1 isoforma A2, L, C, y A1, septina 2, tirosil-ARNt sintetasa, seril-tARN sintetasa, Glicil-tARN sintetasa, helicasa DDX48, EIF2S2.

- ❖ Proteínas relacionadas con el sistema de diferenciación y el sistema nervioso: proteína de unión a ARNm serpina 1, DPYSL2,
- ❖ Proteínas ligadas a reparación de daño al ADN, replicación del ADN, control de ciclo: Ras-GTPasa-proteína activadora con dominio de unión proteico SH3, RAPIA, RFC5.
- ❖ Proteínas activadores de Ras: aldehído dehidrogenasa 1A1, Ras-GTPasa-proteína activadora con dominio de unión proteico SH3.
- ❖ Proteínas relacionadas con inflamación y la transducción de señales desde la membrana: anexina 1.
- ❖ Proteín-quinasa: piruvato quinasa.

El análisis proteómico del clon shARNi nos ha permitido identificar una amplia lista de proteínas cuya expresión se ve modificada tras la inhibición de EWS-FLI1. Dentro de dicho conjunto de proteínas las hay con numerosas funciones distintas entre sí, desde proteínas implicadas en procesos de diferenciación en el sistema nervioso a proteínas estructurales pero destaca la abundancia de proteínas relacionadas con la activación transcripcional génica (unión a ARN, procesamiento alternativo, actividad helicasa, acetilación/deacetilación de histonas, etc...).

Este hecho refuerza precisamente el importante papel que en el SE parecen tener lugar fenómenos como el del procesamiento alternativo (227, 340, 365) o la actividad helicasa (530). Si bien la expresión de la única helicasa descrita hasta el momento en el SE la ARN helicasa A, RHA, (530) no se ve alterada en nuestro modelo interferente si se ve en cambio afectada la de otras helicasas miembros de la familia *DEAD box* (DDX) como DDX5, DDX3X, DDX48. Recientemente se ha identificado a EWS junto a varias ARN helicasas DDX como factores cooperantes de la proteína arginina metiltransferasa tipo 1 (PRMT) en procesos transcripcionales o de procesamiento alternativo (531). Sería deseable por tanto un estudio en profundidad del posible papel de las ARN helicasas en el SE y su importancia en fenómenos como el control transcripcional o el procesamiento alternativo.

6. La inhibición de EWS-FLI1 frena el desarrollo tumoral en un modelo murino de xenotransplante.

Los efectos de la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 fueron estudiados también *in vivo* por medio de un modelo animal murino en el que fueron xenotransplantadas las células del clon shARNi. Evaluamos el desarrollo tumoral en los animales durante 4 semanas, tiempo suficiente para permitir el desarrollo del tumor, y pudimos comprobar que efectivamente las células del clon interferido dan lugar a tumores de menor tamaño que las células del mock y de la línea TC71 wt. El análisis histológico de los distintos tipos tumorales mostró el mismo perfil con presencia de una zona necrótica amplia, una zona de transición con las células en apoptosis y una región con las células proliferando.

Curiosamente mientras que la inhibición del crecimiento celular *in vitro* fue mucho más modesto y limitado tan solo al estadio temprano del clon shARNi en este estudio *in vivo* los efectos son mucho más marcados y en ambos estadios temporales. Los tumores aparecen en las distintas condiciones al mismo tiempo y crecen de forma parecida durante cierto tiempo (8-10 días) pero a partir de ese momento evolucionan de forma muy diferente con un crecimiento significativamente menor en el clon shARNi.

Distintos estudios con modelos animales han obtenido resultados semejantes a los que hemos mostrado mediante xenotrasplantes en ratones desnudos de células de SE con la expresión de EWS-FLI1 interferida de forma estable (213) o con oligos siARN encapsulados como nanopartículas (210, 211). Así mismo se ha logrado inhibir la formación de tumores en ratones inhibiendo distintas dianas de la fusión como NKX 2.2 (213), DAX1/ NR0B1 (215), la colecistoquinina (217), VEGF (532), IGF1/IGF1R (533) o activando otras como la citosina arabinósido (216). Al contrario que en los estudios citados en los que se usa un modelo murino desnudo (*nude*) elegimos llevar a cabo el modelo murino de xenotransplante del clon shARNi en un ratón del tipo NOD/SCID los cuales poseen la ventaja de facilitar en mayor medida el desarrollo del tumor al contar con un grado de inmunodeficiencia más severo (534). La elección de ratones tan jóvenes, 4-5 semanas, responde al hecho de tener un modelo más aproximado y real a la edad de aparición del SE en los pacientes.

Los resultados obtenidos mediante nuestro modelo animal además de suponer una verificación de nuestro modelo interferente en un contexto celular más real nos permitió

confirmar los resultados observados *in vitro* y verificar que la inhibición de la expresión de EWS-FLI1 posee un efecto más marcado en el crecimiento tumoral *in vivo*. La reducción del volumen tumoral se podría explicar no solamente por la reducción proliferativa del clon interferente sino por la menor capacidad migratoria y de transformación oncogénica de las células con la fusión inhibida.

7. TOPK es una nueva diana directa de EWS-FLI1 involucrada en proliferación y motilidad.

De acuerdo a los datos obtenidos tras los análisis de expresión génica del clon shARNi seleccionamos un conjunto de genes como dianas potenciales de EWS-FLI1 y cuya expresión se modificó al verse inhibida la fusión. Dentro de dicho grupo de posibles nuevas dianas que elegimos prestamos especial atención a TOPK.

TOPK, *T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase*, es una proteína de 36kDa localizada en 8p21.2. TOPK pertenece a la familia de las Ser/Thr proteín-quinasas. TOPK fue clonada como una nueva MAPKK-like proteín-quinasa específicamente expresada en los testículos, la placenta y las células linfoides (535). TOPK es un gen altamente conservado entre los vertebrados.

Tras su descubrimiento se ha ido conociendo paulatinamente las funciones que desempeña. Se ha descrito la presencia de TOPK en varias neoplasias hematológicas (536) así en distintos linajes neurales (537). Estudios recientes han involucrado a TOPK en cáncer de mama (538), como agente anti-apoptótico en una línea celular de melanoma (539), como inductor de la proliferación en relación a la respuesta al daño al ADN a través de la señalización vía p38 MAPK, c-Jun-NH2-quinasa1 y H-Ras (540, 541) y por último como inductor de la fosforilación de PRC1 dependiente de Cdk1/ciclina B1 y promotor de la citoquinesis (542).

TOPK se encuentra infraexpresado en el clon interferido como consecuencia de la inhibición de EWS-FLI1 (valor de -6.78 en el análisis de *Genetrix*). El valor obtenido de los microarrays se confirmó analizando los niveles de ARNm y de proteína de TOPK con un marcado descenso en ambos casos y en ambos estadios temporales. La transfección de la fusión EWS-FLI1 en el clon shRNAi^{EWS-FLI1} aparte de lógicamente restaurar los niveles de la fusión lo hizo también con los de TOPK. Así pues cabía la posibilidad de que TOPK fuese por tanto una diana directa de la fusión.

Con el fin de encontrar sitios de unión de EWS-FLI1 analizamos la región proximal del promotor así como los intrones de TOPK usando en primera instancia el programa bioinformático *TFM-explorer*. Pudimos encontrar algunos sitios consenso de unión de la fusión en TOPK tanto en la región proximal del promotor [-37: -248], valor de $p=2.20e-02$ como en el intrón 1 [-2197:-2740], valor de $p=7.23e-03$. La inmunoprecipitación de cromatina con un

anticuerpo anti-EWS confirmó dicha interacción con esa secuencia del intrón 1 de TOPK. Igualmente en el promotor de TOPK aunque no hubo amplificación como tal, sí que pudimos encontrar secuencias del tipo *E-box*, (CACATG en -574 y -3098), que son sitios de alta afinidad para la unión de c-Myc lo que podría sugerir una posible actuación de c-Myc, que es una diana de EWS-FLI1 (120), en la activación transcripcional del promotor de TOPK. Las secuencias *E-box* también se pudieron encontrar en los promotores de otras dos dianas putativas de EWS-FLI1 como son BEX1-2 (CACATG en -585 y -1346) y LSM1 (CACGTG en -194), por lo que c-Myc podría actuar sobre dichos promotores igualmente.

c-Myc se expresa en varias líneas de SE, como por ejemplo A673 y SK-ES-1 entre otras. La importancia de c-Myc en el SE y en el conjunto de sarcomas en general ha sido demostrada por numerosos trabajos (317, 346). c-Myc está estrechamente relacionado con EWS-FLI1, así la mediante el uso de la técnica de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha permitido confirmar la unión directa al promotor de c-Myc (317); así mismo la fusión génica es capaz de cambiar el programa de diferenciación de una línea celular de neuroblastoma a uno típico de SE induciendo c-Myc (121) o si se transfecta en la línea NIH3T3 se activa igualmente junto a genes como ME2-C, cdc42 o v-ABL (357). La expresión inducible de EWS-FLI-1 activa c-Myc y reprime p57/KIP2, que lógicamente se incrementa en nuestro modelo interferido; altos niveles de c-Myc y muy bajos de p57/KIP2 también se han descrito en la línea NGP de neuroblastoma, transfectada con EWS-FLI-1 lo que pone de manifiesto una vez más la importancia de c-Myc en los tumores de origen mesenquimal (120). La expresión de EWS-FLI1 en células Hela aumenta los niveles de ciclina D1 así como los de c-Myc y disminuye los de p57, inhibidor del complejo ciclina-CDK (344). c-Myc a su vez está conectado con otras dianas de la fusión como Id2 que es antagonista de myod, miogenina y del inhibidor del ciclo celular p21 (348), p57 que es reprimida por EWS-FLI1 (120) o Gli1 cuya activación tiene lugar de forma independiente de la del gen Hedgehog y necesita la cooperación de c-Myc (363). La introducción por transducción retroviral de una fusión EWS-ETS en una línea de fibrosarcoma activa Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*) por medio de una transactivación en una región mínima de su promotor pudiendo cooperar c-Myc en el total de la secuencia reguladora.

La vía de c-Myc/Id2 pathway desempeña una importante labor en el proceso tumoral iniciado por las fusiones EWS/ets (317). Junto a c-Myc pueden actuar otros cofactores como mCRD-BP, (*mouse coding region determinant-binding protein*), que es una proteína ortóloga de unión a ARNm que reconoce y regula la expresión post-transcripcional de c-Myc. Esta proteína cooperadora de c-Myc se expresa de forma significativa en muestras clínicas de SE y ya anteriormente se ha descrito su labor junto a c-Myc en la proliferación celular anormal en tumores mesenquimales (543). c-Myc participa en la fusión del linfoma de Burkitt en la cual el

gen MYC queda yuxtapuesto a los elementos regulatorios del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH) (270, 271, 272, 273); en ese caso la translocación t(8;14)(q24;q32) provoca la sobreexpresión de uno de los genes implicados al quedar bajo el control de un potente promotor del otro gen involucrado. Si se induce EWS-FLI1 en células progenitoras primarias mesenquimales (MPCs) derivadas de médula ósea (112), al ser inyectadas en ratones forman tumores que expresan marcadores típicos del SE con activación de c-Myc al igual que sucede en el SE. Cuando las células de leucemia mieloide HL-60 se diferencian con éster de forbol (TPA), tanto la expresión de c-Myc fosforilado como la de PBK/TOPK se reducen. En dicho trabajo 4 de 5 muestras clínicas expresaban conjuntamente PBK/TOPK y c-Myc fosforilado (544).

Nuestros resultados parecen involucrar a TOPK en el mecanismo de acción de c-Myc cuya importancia en la biología del SE está suficientemente contrastada. Un dato que corrobora esta suposición es que fuimos capaces de detectar por RT-PCR en tiempo real la expresión de PBK/TOPK en las 9 líneas de SE que analizamos.

La inhibición transitoria de TOPK en la línea de SE, TC71 mediante el uso de oligosARNi redujo efectivamente los niveles de TOPK. Un primer efecto de la inhibición transitoria de TOPK fue un descenso si bien no muy acusado, 35%, de la tasa proliferativa con relación al mock y a la línea TC71wt.

La inhibición proliferativa no se vio acompañada de cambios en el ciclo celular. De hecho no se produjo cambio alguno en cuanto al patrón de ciclo celular ni se indujo apoptosis. Esta observación se corresponde perfectamente por lo descrito por Ayllon *et al* (540). Sin embargo pese a no producirse cambios en el patrón de ciclo celular de las células cuando tiene lugar la inhibición de TOPK, pudimos comprobar que aumentan los niveles de la proteína reguladora G1/S p27/Kip1. Diversos estudios han estudiado el papel de p27/Kip1 en el SE como por ejemplo el incremento en sus niveles junto a los de p57/Kip2 cuando se inhibe EWS-FLI1 tal y como sucede en nuestro modelo interferente (504, 545, 546). EWS-FLI1 inhibe p21(waf1/cip1) y p27(kip1) que son degradadas vía ubiquitín-proteasoma. Por ejemplo fármacos inhibidores del proteasoma como el Bortezomib aplicados a líneas de SE incrementan los niveles de p21(waf1/cip1) and p27/kip1 e inducen vía caspasa 8 (547).

El efecto más llamativo de la inhibición de TOPK fue el cambio morfológico observado en las células que no fueron capaces de alcanzar la confluencia, creciendo en una especie de cúmulos en contraposición a las células de la línea TC71wt que sí fueron capaces de llegar a confluencia. Una posible explicación de este fenómeno observado al inhibir TOPK puede ser

debido al hecho de que TOPK parece desempeñar un papel importante en la citoquinesis en el SE tal como sucede en diferentes modelos tumorales (542, 548). En nuestro clon shARNi también se encuentra infraexpresado PRC1, *protein regulator of cytokinesis 1*, uno de los principales agentes de dicho proceso de citoquinesis (549). Otra posible hipótesis es el hecho de que las células con expresión reducida de TOPK también tienen afectados los niveles de p38 lo que está relacionado con un menor grado de motilidad (540), parecido a lo que ocurre en nuestro modelo interferido.

Pudimos observar que los niveles de AKT se elevaron cuando tuvo lugar la inhibición de TOPK. La participación de AKT en el SE junto a PI3K en la vía de señalización de IGF1/IGF1R está suficientemente documentada (550). Si bien no se ha descrito hasta ahora conexión alguna entre TOPK y AKT sería conveniente un estudio más profundo de la relación existente entre ambos genes ya que si el beneficio terapéutico de la inhibición de AKT en el SE es claro (515, 516) el bloqueo conjunto de la actividad de AKT y TOPK podría dar aún mejores resultados.

8. LRRC48, una diana directa de TOPK.

Llevamos a cabo una inmunoprecipitación con cromatina con el anticuerpo monoclonal anti-TOPK con el mock. Los productos de CHIP fueron amplificados por una PCR de cebador único y clonados posteriormente para ser secuenciados. Los resultados obtenidos de la secuenciación nos permitieron identificar al gen LRRC48 como una diana directa de TOPK mediante el reconocimiento del intrón 13 de LRRC48. LRRC48 situada en el cromosoma 17 (número de acceso primario Q9H069), es una proteína citoplasmática de función desconocida.

LRRC48, *leucine-rich repeat-containing protein 48*, es un gen que se encuentra localizado en el cromosoma 17p11.2. El gen cuenta con 2.008 nucleótidos y 14 exones. Existen 23 transcritos de ARNm de LRRC48, 19 de las cuales son variantes de procesamiento alternativo y parece contar con una posible regulación de la expresión conjunta con el gen ATPAF2. La proteína posee 523 aminoácidos y un peso molecular de 61kDa. Se localiza en el citoplasma y contiene 5 repeticiones LRR (*leucine-rich repeat*).

El gen fue identificado y clonado por primera vez en el año 2000 (551). LRRC48 se expresa en numerosos tejidos y órganos como los testículos, ojo, cerebro, pulmón, nervio óptico, retina, tráquea... Se ha descrito una función de unión a ADN para la proteína LRRC48 así como se ha asociado al síndrome de Smith-Magenis (SMS) que es un síndrome múltiple congénito de retraso mental asociado a trastornos del comportamiento y del sueño. La mayoría de pacientes afectados por el SMS presentan una delección genómica de aproximadamente 4 Mb dentro de la región 17p11.2 (552, 553) que es la que se encuentra LRRC48.

Los motivos LRR son secuencias de 20 a 29 residuos y con un número de repeticiones de 2–45. Los motivos LRRC constan estructuralmente de una lámina beta y una hélice alfa (LxxLxLxxN/CxL). La estructura 3D es curva con láminas beta paralelas en la parte cóncava y hélices en el lado convexo. Esta disposición del tipo *finger-like* facilita las interacciones proteína-proteína. Los motivos LRR están presentes en un gran número de proteínas (en torno a 2000) en distintas localizaciones celulares y en organismos desde virus a eucariotas. La función primaria de estos motivos está relacionada con las interacciones proteína-proteína pero intervienen en actividades biológicas tan diversas como la inhibición enzimática, crecimiento celular, adhesión celular, unión a los receptores hormonales, transducción de señales, regulación de la expresión génica, apoptosis, tráfico celular o desarrollo neural (554). Se han identificado distintas subfamilias LRR con numerosas proteínas como inhibidores de la ribonucleasa,

proteoglicanos, receptores tirosín-quinasas y receptores del tipo Toll, estos últimos de gran importancia en el sistema inmune (555).

Algún miembro de la familia LRRC como es el caso de LRRC4 ya ha sido implicado en tumores. Por ejemplo LRRC4 inhibe la proliferación, angiogénesis e invasión de las células de glioblastoma interfiriendo con las vías de señalización de Akt y ERK1/2 y con la expresión de distintas citoquinas por otra parte (556, 557).

El análisis del nivel de expresión del ARNm de LRRC48 mostró una elevada expresión en todas las líneas de SE estudiadas con la excepción de SK-N-MC. Este hecho junto con el dato de que los niveles de ARNm de LRRC48 se elevaran en el clon shRNAi nos permiten sugerir que el nivel de expresión de TOPK a nivel de transcrito está inversamente relacionado con el de LRRC48, al menos en las líneas de SE analizadas. Dado que en el clon shARNi EWS-FLI1 pero no en las células TOPK siARN el nivel de ARNm de LRRC48 estaba elevado puede que la activación intrónica de LRRC48 esté fuertemente regulada por un complejo represor proteico al cual pertenecería TOPK, cuya inhibición *per se* no sería suficiente para inducir la transcripción de LRRC48. En cambio la inhibición de la fusión sería capaz de activar el promotor de LRRC48, tal y como sucede en el clon EWS-FLI1 shARNi. EWS-FLI1 puede unirse directamente al promotor de LRRC48 de acuerdo al programa *TFM Explorer* que localiza un sitio putativo de unión en [-890: -778], $p\text{-value}=2.21\text{e-}04$. Esta suposición implicaría que la fusión se encargaría de compensar la inhibición de TOPK en las células TOPK silenciadas manteniendo los niveles de ARNm de LRRC48 bajos. La falta de un anticuerpo comercial contra LRRC48 nos ha impedido avanzar en el conocimiento del estatus proteico de este gen.

LRRC48 pudiera tener que ver con la reducción de la capacidad proliferativa que se detecta cuando tiene lugar la interferencia de TOPK. EWS-FLI1 es capaz de unirse al intrón 1 de TOPK el cual a su vez se puede unir al intrón 13 de LRRC48. Podemos definir por tanto una nueva vía de señalización conformada por TOPK/LRRC48 e iniciada por EWS-FLI1. La regulación de los niveles de expresión de LRRC48 es un mecanismo que ha de ser aún elucidado.

9. Otras dianas putativas de EWS-FLI1.

Prestamos así mismo atención a las siguientes dianas putativas de la fusión: TK1, LSM1, BEX2 y eIF4E.

TK1, *thymidine kinase 1*, es una enzima citosólica con un papel en el metabolismo dCTP/dUTP y que se expresa sobretodo en la fase G1/S del ciclo celular (558). Esta timidín-quinasa puede ser usada como factor pronóstico en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas así como en el de próstata (559, 560).

Los niveles de TK1 se redujeron en el clon shARNi tanto a nivel de ARNm como de proteína especialmente en el estadio temprano aunque sin embargo en el estadio tardío los niveles proteicos de TK1 se recuperaron casi por completo mientras que los de ARNm seguían manteniéndose reducidos.

LSM1, *small nuclear ribonuclear CaSm*, pertenece a la familia de proteínas Sm snRNP y se localiza en 8p11.2. LSM1 es una proteína de 15kDa nuclear involucrada en el procesamiento alternativo del ARN por medio del cual puede inducir un fenotipo de transformación tumoral independiente de IGF-1 (561). LSM1 ha sido descrito como un oncogen en tumores de mama y páncreas (562, 563). El papel que desempeña EWS y las fusiones en el procesamiento alternativo es de sobra conocido (226, 340) por lo que puede haber una cooperación entre la fusión y LSM1 alterando los mecanismos de procesamiento alternativo en las células del SE. La disminución de los niveles de LSM1 en su nivel proteico y de ARNm se mantuvo constante con el transcurso de los pases celulares en el clon interferido.

BEX2, *Brain-expressed X-linked protein 2*, se localiza en Xq22.1. Este gen se ha descrito como un mediador de la acción antiapoptótica de NGF/NFκB en el tumor de mama (564) pero también como supresor tumoral en el glioma maligno (565). Se expresa en el sistema nervioso central peq cerebelo, lóbulo temporal, pituitaria (566). BEX1-2 está infraexpresado tanto a nivel de ARNm como de proteína en el clon shARNi.

La expresión de eIF4E se ve disminuida como consecuencia de la inhibición de EWS-FLI1 en ambos estados temporales. eIF4E, *eukaryotic translation initiation factor 4E*, originalmente clonado y secuenciado a partir de eritrocitos, está relacionado con vías de transducción de señales como la de IGF-1/IGF-1R, la de Akt a través de mTOR o colaborando con c-Myc promoviendo resistencia a fármacos así como a la apoptosis (567, 568). En un

modelo murino de linfoma se ha puesto de manifiesto una señalización de Akt y PI3K a través de mTOR y eIF4E dando lugar a una inducción oncogénica y resistencia a fármacos *in vivo* impidiendo apoptosis; así pues eIF4E actuando por debajo de Akt y mTOR recapitula sus efectos (567). eIF4E forma junto a otros miembros como EIF4A y EIF4G1/EIF4G3 un complejo multiproteico implicado en la transcripción que desempeña un importante papel en la regulación del crecimiento, con actividad ARNasa y ATPasa. Este gen participa en procesos como el procesamiento alternativo, la estabilidad de los ARNs, la exportación nuclear de ARNs o traducción ya que como componente importante del *cap binding protein* reconoce y se une al *7-methylguanosine-containing mRNA cap* durante la fase inicial en el inicio de la síntesis proteica facilitando la unión al ribosoma induciendo de este modo que se desenrollen las estructuras secundarias de los ARNm (569).

La importancia de este gen en distintas neoplasias bien carcinomas como los de mama, ovario, próstata o sarcomas como el liposarcoma ha sido puesta de manifiesto en numerosos artículos (570, 571, 572, 573). eIF4E actuaría como una especie de gen embudo en el que convergerían diversas rutas de activación proliferativas como las de Her1, Her2, PI3K/Akt o RAS-RAF-MAPK (574) confirmándose como un importante marcador de progresión maligna y de mal prognosis. Este gen está íntimamente ligado a mTOR por lo que el uso de inhibidores de la vía mTOR como la rapamicina bloquea así mismo la expresión de eIF4E (575, 576). Sería muy interesante bloquear en líneas celulares de SE bien mediante inhibidores de la vía de mTOR bien directamente mediante ARNi (577) la expresión de eIF4E y comprobar los efectos de la misma.

Se analizaron otras posibles dianas como MARK4 o GADD45G pero no se obtuvieron resultados concluyentes al respecto.

10. Origen del SE. Células madre mesenquimales.

En el SE subsisten a día de hoy dos grandes incógnitas sin despejar:

- la identidad de las células de origen del tumor que son permisivas para la transformación mediada por la fusión EWS-Ets. Posiblemente haya una jerarquía de células todas ellas posibles dianas, en tiempos y localizaciones determinadas.
- determinar si la fusión quimérica es el único evento iniciador en el desarrollo del SE.

Existe una opinión más o menos compartida que sitúa el origen del SE a partir de un progenitor mesenquimal no identificado de momento. Esta hipótesis se apoya en las características histológicas del SE, que es un tumor pobremente diferenciado con características mesenquimales aunque también las presenta neuroectodérmicas (115, 380).

Durante bastante tiempo se defendió el origen del SE a partir de células de la cresta neural. Dicha teoría estaba fundada en la presencia en el SE de marcadores como la colecistoquinina (CCK), relacionada con el sistema endocrino difuso (381), y el hecho de que algunas líneas celulares de SE pudieran ser inducidas *in vitro* hacia un fenotipo marcadamente neural bajo la acción de diferentes agentes de diferenciación (107, 382). Sin embargo el fenotipo parcialmente neural de los SE se debe probablemente a la acción de la fusión y no sólo a la célula de origen. Así por ejemplo la transfección de la fusión EWS-FLI1 en una línea de neuroblastoma es capaz de revertir el fenotipo de la misma hacia uno más propio de SE aumentando los niveles de marcadores característicos del SE como c-Myc y CD99 (121) o por citar otro estudio, la inducción por medio de un sistema Tet de la fusión EWS-FLI1 en una línea celular de rhabdomyosarcoma provoca un cambio en la morfología celular de la misma pasando a asemejarse a la de una línea de SE al igual que sucede en los xenotransplantes en ratones desnudos y dicho cambio va acompañado de la inhibición de varios marcadores miogénicos presentes en la línea de rhabdomyosarcoma. Sin embargo hallazgos recientes han vuelto a poner sobre la mesa el debate acerca de la célula de origen del SE (578).

Tratando de esclarecer el origen del tumor se han usado numerosos modelos celulares muy distintos. En MEFs la introducción de EWS-FLI1 provoca parada de ciclo celular y muerte celular, los que sobreviven logran eliminar la expresión de la fusión que les resulta tóxica y sólo transformando con el antígeno SV40-T se logra inducir la formación de tumores parecidos al SE (14). En fibroblastos humanos primarios inmortalizados con hTERT, EWS-FLI1 induce una

parada proliferativa e inducción apoptótica mediada por p53 (116). Dichos estudios dejaron claro que los fibroblastos no son el punto de partida del SE.

La hipótesis del origen mesenquimal del SE se basa lógicamente en diferentes evidencias. La fusión quimérica EWS-FLI1 ha sido introducida en distintos tipos celulares primarios como en células madre embrionarias murinas (ES), fibroblastos embrionarios o células progenitoras primarias mesenquimales (MPCs) pero sin embargo tan solo las MPCs derivadas de médula ósea son capaces de retener la expresión de la fusión durante largo tiempo (meses) mientras en cambio los otros dos tipos celulares la pierden al cabo de dos semanas (112). Estas MPCs transfectadas sobreexpresan marcadores característicos del SE como los miembros de la vía de señalización de IGF1/IGF1R, IGF1, IGFBP3 e IGFBP5. Al ser inyectadas en ratones forman tumores que expresan marcadores típicos del SE como CD99 o NSE y muestran una elevada sensibilidad a la inhibición de la vía de IGF1/IGF1R tal y como sucede en los SE. El análisis de los perfiles de expresión génica de dichos tumores desvela la activación de dianas de EWS-FLI1 tales como Id2 y c-Myc y la represión de otras como TGFBR2 y de p21 al igual que sucede en el SE. Estas MPCs no se immortalizaron previamente a la transfección con EWS-FLI1 y retienen p53, p16 y p19 funcionales. Si las células son murinas sin clasificar derivadas de médula ósea se originan tumores con fenotipos varios, uno de los cuales se asemeja al SE. La pérdida de p53 aumenta la agresividad del tumor en ese caso (113). En MPCs defectivas en p19 la fusión bloquea la diferenciación hacia los linajes adipo y osteocítico (114). Estas MPCs transfectadas con la fusión sobreexpresan IGF1 y dependen de la señalización de la vía de IGF1/IGF1R para su supervivencia en concordancia con el requerimiento de IGF1 por parte de las células del SE para crecer (383) y su alta sensibilidad a la inhibición de esta vía de transducción de señales (384). Un trabajo con MSCs humanas ha puesto de manifiesto de nuevo la importancia de la vía de señalización de IGF1/IGF1R ya que se produce un incremento de la expresión de IGF1 y una activación de esta vía proliferativa y antiapoptótica al introducir la fusión EWS-FLI1 en dichas células madre mesenquimales (385). La funcionalidad de esta vía parece ser un requisito necesario para la transformación mediada por la fusión lo que pone de relieve la gran importancia de esta vía en los pasos iniciales de generación neoplásica (117). Parece por tanto que este tipo celular, las hMSC, es susceptible a la transformación de EWS-FLI1 y pudiera ser el nicho celular adecuado para el surgimiento del tumor. Además su capacidad para migrar desde la médula ósea a la mayoría de órganos pudiera explicar las localizaciones extraóseas del SE.

Esa fue la razón que nos impulsó a tratar de generar un SE a partir de células madre mesenquimales adultas humanas transfectando las mismas con la fusión EWS-FLI1 en sus distintas variantes principales y la fusión EWS-ERG por medio de un sistema inducible de

expresión *Tet-Off*. Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) se obtuvieron de la cresta ilíaca de pacientes diagnosticados de SE y lógicamente se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo usando diferentes marcadores característicos de las células madre mesenquimales. Los medios de diferenciación fueron los siguientes: osteogénico, adipogénico y condrogénico. Estas hMSCs crecieron y se diferenciaron adecuadamente dando lugar a cada linaje celular correspondiente en su respectivo medio de diferenciación confirmando que efectivamente estas células son células madre mesenquimales con todo su potencial de diferenciación intacto y el punto de partida deseado para nuestros estudios.

Lógicamente antes de pasar a transfectar la fusión comprobamos que la fusión EWS-FLI1 no estaba presente en las hMSCs de los pacientes de SE. Se midió el nivel del marcador CD99 en las hMSCs de paciente y donante. Los niveles de CD99 en las hMSCs de pacientes fueron superiores a las del donante aunque no alcanzaron el grado de expresión de CD99 en la línea de SE, TC71. CD99 es una proteína de membrana con un papel destacado en la migración de los leucocitos en el endotelio, que se manifiesta en la mayoría de los casos de SE y que resulta útil en el diagnóstico de estos tumores a pesar de expresarse también en las células linfoides y en tumores linfoblásticos (61). Algún estudio sin embargo ha citado la presencia de CD99 en hMSCs de médula ósea aunque inmortalizadas con telomerasa (579) mientras que en cambio otro tan sólo detecta la expresión de CD99 cuando se induce la expresión de la fusión en células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea infectadas con los transgenes HTERT y E7 (370). También en células madre progenitoras de médula ósea de ratón cuando se transfecta EWS-FLI1 se induce a CD99 (112) pero por el contrario otro artículo pone en duda dicho resultado y defiende la existencia de una célula premaligna positiva para CD99 (580). Nuestro resultado parece apoyar la idea de que la célula primigenia de origen del SE carece de CD99 y que sólo la expresión de la fusión induce CD99.

Las hMSCs fueron transfectadas en un pase temprano (3^{er} pase). Un importante problema en cuanto al uso de las hMSCs es que no expresan hTERT *in vitro* y tienen una capacidad proliferativa finita que disminuye de acuerdo con los pases celulares, lo que limita su utilización (455, 456), de ahí que nosotros hayamos transfectado las células en un pase lo más temprano posible. La expresión de hTERT en las MSCs extiende la vida media de las mismas manteniendo el potencial de diferenciación (457) aunque muestran pérdida de la inhibición por contacto y se produce la delección del locus INK4a/ARF. También con el transcurso de los pases se produce en algunos casos una mutación activadora de K-ras y el silenciamiento del gen asociado al ciclo celular DBCCR1 por hipermetilación del promotor en un proceso de evolución espontánea (458) que encaja con el hecho de que las fusiones del SE activen la telomerasa y de que la mutación de INK4A/ARF que aparece en un porcentaje de sarcomas tales como el SE u

osteosarcoma estabiliza la expresión de las fusiones y representa un factor pronóstico adverso (15, 19, 58, 352, 463). El cuidado a la hora de trabajar con pases bajos es fundamental dado que por ejemplo en hMSCs extraídas de tejido adiposo se ha descrito que evolucionan de forma espontánea con el transcurso de los pases celulares produciéndose una serie de mutaciones y teniendo lugar una transformación tumoral (460, 461).

Los estudios realizados con MSCs murinas de médula ósea se han basado en abordajes más artificiales, bien mediante la sobreexpresión de oncogenes, o mediante la inactivación de supresores tumorales. Ejemplos de ello son el uso de mutaciones condicionales en p53 y K-ras mediante Cre recombinasa (466) o ratones en los que se induce la expresión de EWS-FLI1 mediante Cre y bajo un promotor ubicuo como Rosa26. En este último estudio lo que se obtiene tras cruzar dichos ratones con una estirpe *Mxl-cre* no es un sarcoma sino una leucemia mieloide/eritroide (467). Otros grupos se han basado solamente en la transfección de las fusiones EWS-ets dando lugar a un modelo de SE (112) o bien a uno de liposarcoma mixoide con la fusión FUS-CHOP (306).

Hemos conseguido inducir la expresión de la fusión EWS-FLI1 en sus tipos 1 y 2 en las hMSCs transfectadas con el sistema *Tet-Off*. Dos trabajos recientes han logrado así mismo obtener un fenotipo de SE a partir de estas células. El estudio del grupo de Kiyokawa usa en realidad una variante de las MSC como es la línea celular UET-13. Estas células se obtienen prolongando la vida media de células estromales de médula ósea mediante la transfección de vectores retrovirales con los genes hTERT y E7. La expresión inducible controlada por tetraciclina de las fusiones EWS-FLI1 y EWS/ERG en dichas células da lugar a un tumor de características morfológicas, inmunofenotípicas y de expresión génica muy semejantes a las de un SE (468). El segundo estudio del grupo de Stamenkovic ya usa células madre mesenquimales humanas extraídas de la médula ósea de la cabeza del fémur (385). Otros tipos de sarcomas se han generado a partir hMSCs como por ejemplo un histiocitoma maligno fibroso (MFH), que es un sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grado (464, 465) en un proceso en el que desempeña un papel clave el gen DKK1, inhibidor de la vía de Wnt y necesario para que las hMSCs proliferen al impedir la diferenciación de estos progenitores mesenquimales vía Wnt2/ β -catenina. En nuestro caso al igual que en el trabajo del grupo de Stamenkovic (385) hemos logrado generar un fenotipo característico del SE tan solo mediante la inducción de la expresión de EWS-FLI1 sin necesidad de cambio genético adicional alguno. Este hecho pone de manifiesto que la fusión *per se* en el contexto celular propicio es capaz sola de dar lugar a un SE si bien lógicamente no se puede descartar la existencia de genes alterados en la célula de origen que faciliten dicha transformación tumoral mediada por la fusión.

Ante la duda de si la fusión *per se* es capaz de transformar líneas celulares primarias murinas o humanas induciendo bien parada del ciclo celular o muerte celular. ¿Se hace necesaria la colaboración de otros eventos tales como mutaciones o sobreexpresiones de genes? Precisamente con el objetivo de comprobar si se lograba acelerar el desarrollo del fenotipo tumoral del SE con una mayor facilidad inhibimos en las hMSCs transfectadas la expresión del supresor tumoral p16 por medio oligos siARN. Una vez inhibida la expresión de p16 se indujo la fusión durante un período máximo de 72 horas pero sin embargo no se observó cambio alguno adicional. El locus *INK4A* que codifica para el inhibidor de CDKs p16 y el regulador positivo de la vía de p53, p14ARF está perdido en algunos SE (58, 321). La pérdida de p16 facilita la progresión en el ciclo celular y la entrada en fase S (24). La introducción de la fusión en fibroblastos embrionarios murinos (MEF) defectivos en p16 hace que los efectos de la fusión se atenúen en relación con las mismas células *wild type* por ejemplo con un rescate parcial de muerte celular y lo mismo sucede en MEF con p53 o ARF mutados. Sin embargo estas células transformadas tienen un potencial tumorigénico muy limitado en ratones. Sin embargo se han transformado con la fusión EWS-FLI1 las llamadas células progenitoras mesenquimales primarias (MPC) que conservan intacta la vía de p16INK4A/p19ARF (112). Al menos en nuestros estudios la translocación no sólo es necesaria sino suficiente por sí sola como generar el fenotipo tumoral.

Examinamos el nivel de TOPK en las hMSCs de pacientes y donantes con relación a la línea de SE TC71wt y pudimos comprobar que los niveles de las hMSCs de los pacientes son superiores a las de los donantes, aún así bastante alejados del de la línea celular TC71wt.

El perfil de expresión génica de las hMSCs ha sido examinado en varios estudios por ejemplo comparando los perfiles de 27 SE y 3 líneas tumorales con la fusión silenciada respecto a los de varios tejidos normales, hMSCs y células del estroma de la médula ósea. El silenciamiento de EWS-FLI1 hace que el perfil se aproxime al de las hMSCs y que estas líneas silenciadas puedan diferenciarse hacia un fenotipo osteo y adipogénico en presencia de los agentes de diferenciación adecuados. Este estudio identifica además genes modulados por la fusión y diferencialmente expresados entre las líneas de SE y las hMSCs (469). La comparativa de los perfiles de expresión de las MPCs transformadas con dos fusiones distintas, EWS-FLI1 y FUS-CHOP, permite diferenciar un conjunto de genes comunes los cuales estarían implicados en la transformación de las células primarias mesenquimales y un segundo grupo ya distinto y específico de cada fusión (470). Nuestro estudio nos ha permitido identificar un gen con expresión diferencial, la *chitinase-3-like protein 1 precursor* (CHI3L1). También conocido como YKL-40 se ha descrito su presencia en el condrosarcoma mixoide extraesquelético (581). Relacionado con las vías de AKT y Ras se ha definido como un factor pronóstico adverso en

glioblastoma (582). En numerosas otras neoplasias también se ha identificado como un factor de malignidad (583, 584, 585). El papel de este gen en el SE está actualmente en estudio.

Podemos concluir que por un lado la fusión es imprescindible pero al mismo tiempo no es capaz por sí sola de generar el SE y que por tanto necesita la cooperación de uno o varios eventos genéticos adicionales. Por otro lado es fundamental el contexto celular adecuado para poder inducir el fenotipo tumoral. Las células madre mesenquimales pueden ser perfectamente el punto de origen del SE pero no se puede descartar a otros tipos celulares y lo que parece fundamental es el momento preciso de actuación de la fusión tumoral.

CONCLUSIONES

- 1) Es posible inhibir de forma estable la expresión de la fusión génica EWS-FLI1 en la línea de SE, TC71 mediante el uso de la técnica de ARN de interferencia la aún cuando parte de la inhibición se pierde con el transcurso de los pases celulares.
- 2) La interferencia de EWS-FLI1 provoca un incremento en la apoptosis, la reducción de la capacidad de migración así como del potencial de transformación oncogénica en ambos estadios temporales. No se produjo cambio alguno respecto al ciclo celular y la reducción proliferativa observada en el estadio inicial se perdió con el transcurso de los pases celulares.
- 3) En el modelo murino de xenotransplante se produce una reducción del volumen tumoral en aquellos ratones inyectados con las células del clon shARNi. Los tumores de dichos animales son significativamente de menor tamaño.
- 4) El análisis del perfil de expresión génica del clon shARNi nos permite confirmar la validez de nuestro modelo interferente, ya que varias dianas conocidas de EWS-FLI1 ven alterados sus niveles de expresión como consecuencia de la inhibición de la fusión. Dicho análisis nos permite además descubrir nuevas posibles dianas de EWS-FLI1.
- 5) TOPK es una diana directa de EWS-FLI1 y a su vez LRRC48 es diana de TOPK.
- 6) La inhibición transitoria de la expresión de TOPK provoca una disminución de la tasa proliferativa así como un cambio drástico en la morfología celular posiblemente relacionado con la motilidad de dichas células.
- 7) Existen diferencias entre las células madre mesenquimales humanas de médula ósea de pacientes de SE respecto a las de los donantes normales estudiados. Sin embargo las células madre mesenquimales de pacientes de SE carecen de la expresión de EWS-FLI1.
- 8) La inducción de la fusión EWS-FLI1 en las células madre mesenquimales de médula ósea no logra desarrollar *per se* un fenotipo de sarcoma de Ewing lo que parece indicar la necesidad de eventos oncogénicos adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anuario cáncer España 2006. Ministerio de Sanidad y Consumo. Adaptado de Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. (2005). International Classification of Childhood Cancer 3rd edn. *Cancer* 103: 1457–67.
2. US Cancer Statistics Working Group, Department of Health and Human Services *United States Cancer Statistics: 1999 Incidence* (Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute, Atlanta, 2002).
3. Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, and Tung G. (1984). Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology* 91: 1351–1355.
4. Li FP, and Fraumeni JF Jr. (1969). Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 43: 1365–1373.
5. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233–1238.
6. King AA, Debaun MR, Riccardi VM, and Gutmann DH. (2000). Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet* 93: 388–392.
7. Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H, and Kitamura Y. (1998). Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 19: 323–324.
8. Wong FL, Boice JD Jr, Abramson DH, Tarone RE, Kleinerman RA, Stovall M, Goldman MB, Seddon JM, Tarbell N, Fraumeni JF Jr, Li FP. (1997). Cancer incidence after retinoblastoma. Radiation dose and sarcoma risk. *JAMA* 278: 1262–1267.
9. Elliott P, and Kleinschmidt I. (1997). Angiosarcoma of the liver in Great Britain in proximity to vinyl chloride sites. *Occup Environ Med* 54: 14–18.
10. Rubin BP, Chen CJ, Morgan TW, Xiao S, Grier HE, Kozakewich HP, Perez-Atayde AR, Fletcher JA. (1998). Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol* 153: 1451–8.
11. de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M. (1998). EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16: 1248–55.

12. Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, Woodruff JM, Kawai A, Healey JH, Brennan MF, Bridge JA, Neff JR, Barr FG, Goldsmith JD, Brooks JS, Goldblum JR, Ali SZ, Shipley J, Cooper CS, Fisher C, Skytting B, Larsson O. (2002). Impact of SYT–SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res* 62: 135–140.
13. Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. (1999). Differential transactivation by alternative EWS–FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing’s sarcoma. *Cancer Res* 59: 1428–1432.
14. Khan J, Bittner ML, Saal LH, Teichmann U, Azorsa DO, Gooden GC, Pavan WJ, Trent JM, and Meltzer PS. (1999). cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13264–13269.
15. Deneen B, and Denny CT. Loss of p16 pathways stabilizes EWS/ FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. (2001). *Oncogene* 20: 6731–6741.
16. Dash AB, Williams IR, Kutok JL, Tomasson MH, Anastasiadou E, Lindahl K, Li S, Van Etten RA, Borrow J, Housman D, Druker B, Gilliland DG. (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7622–7627.
17. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, Ley TJ, and Gilliland DG. (2002). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8283–8288.
18. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, Ladanyi M. (2000). Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 89: 783-92.
19. Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, Healey JH, Ladanyi M. (2000). Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer* 89: 793-799.
20. Stratton MR, Moss S, Warren W, Patterson H, Clark J, Fisher C, Fletcher CD, Ball A, Thomas M, Gusterson BA, *et al.* (1990). Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* 5: 1297–1301.
21. Dei Tos AP, Maestro R, Doglioni C, Piccinin S, Libera DD, Boiocchi M, Fletcher CD. (1996). Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *Am J Pathol* 148: 1037–1045.
22. Sharp R, Recio JA, Jhappan C, Otsuka T, Liu S, Yu Y, Liu W, Anver M, Navid F, Helman LJ, DePinho RA, Merlino G. (2002). Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nature Med* 8: 1276–1280.

23. Meza-Zepeda LA, Forus A, Lygren B, Dahlberg AB, Godager LH, South AP, Marenholz I, Lioumi M, Flørenes VA, Maelandsmo GM, Serra M, Mischke D, Nizetic D, Ragoussis J, Tarkkanen M, Nesland JM, Knuutila S, Myklebost O. (2002). Positional cloning identifies a novel cyclophilin as a candidate amplified oncogene in 1q21. *Oncogene* 21: 2261–2269.
24. Cohen JA, Geradts J. Loss of RB and MTS1/CDKN2 (p16) expression in human sarcomas. (1997). *Hum Pathol* 28: 893–898.
25. Creager A J, Cohen JA, Geradts J. (2001). Aberrant expression of cell-cycle regulatory proteins in human mesenchymal neoplasia. *Cancer Detect Prev* 25: 123–131.
26. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. (1993). p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 53: 2231–2234.
27. Roholl PJ, Skottner A, Prinsen I, Lips CJ, Den Otter W, Van Unnik JA. (1990). Expression of insulin-like growth factor 1 in sarcomas. *Histopathology* 16: 455–460.
28. McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, Fidler IJ, Bar-Eli M. (2002). Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* 8: 3584–3591.
29. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. (2001). KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 61: 8118–8121.
30. Ferracini R, Olivero M, Di Renzo MF, Martano M, De Giovanni C, Nanni P, Basso G, Scotlandi K, Lollini PL, Comoglio PM. (1996). Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene* 12: 1697–1705.
31. Knezevich SR, Garnett MJ, Pysher TJ, Beckwith JB, Grundy PE, Sorensen PH. (1998). ETV6–NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res* 58: 5046–5048.
32. Upadhyaya M, Kluwe L, Spurlock G, Monem B, Majounie E, Mantripragada K, Ruggieri M, Chuzhanova N, Evans DG, Ferner R, Thomas N, Guha A, Mautner V. (2008). Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Hum Mutat* 29: 74–82.

33. Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, and Van de Ven WJ. (1995). Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10: 436–444.
34. Pérez-Losada J, Sánchez-Martín M, Rodríguez-García MA, Pérez-Mancera PA, Pintado B, Flores T, Battaner E, Sánchez-García I. (2000). Liposarcoma initiated by FUS/TLSCOP: the FUS/TLS domain plays a critical role in the pathogenesis of liposarcoma. *Oncogene* 19: 6015–6022.
35. Lagutina I, Conway SJ, Sublett J, Grosveld GC. (2002). Pax3–FKHR knock-in mice show developmental aberrations but do not develop tumors. *Mol Cell Biol* 22: 7204–7216.
36. Haldar M, Hancock JD, Coffin CM, Lessnick SL, Capecchi MR (2007). A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer Cell* 11: 375-88.
37. Arndt CA, Crist WM. (1999). Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med* 341: 342–352.
38. Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, Zhu S, Fero M, Sherlock G, Pollack JR, Brown PO, Botstein D, van de Rijn M. (2002). Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 359: 1301–1307.
39. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, Glatfelter AA, Duray PH, Meltzer PS. (2005). Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 65: 9226–9235.
40. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. (2001). Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 358: 1421–1423.
41. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299: 708–710.
42. Dancey J, Sausville EA. (2003). Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nature Rev Drug Discov* 2: 296–313.
43. Horowitz ME, and Woo SY. (1997). Ewing's sarcoma family of tumors: Ewing's sarcoma of bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumors. Ed.P.D.Pizzo PA., Philadelphia, 831-863.

44. Triche TJ. (1995). Molecular biological aspects of soft tissue tumors. *Curr Top Pathol* 89: 47-72. Review.
45. Dejana E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 261-270.
46. Schmidt D, Herrmann C, Jürgens H, Harms D. (1991). Malignant peripheral neuroectodermal tumor and its necessary distinction from Ewing's sarcoma. A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry. *Cancer* 68: 2251-9.
47. Banerjee SS, Agbamu DA, Eyden BP, Harris M. (1997). Clinicopathological characteristics of peripheral primitive neuroectodermal tumour of skin and subcutaneous tissue. *Histopathology* 31: 355-66.
48. Ehrig T, Billings SD, Fanburg-Smith JC. (2007). Superficial primitive neuroectodermal tumor/Ewing sarcoma (PN/ES): same tumor as deep PN/ES or new entity? *Ann Diagn Pathol* 11:153-9.
49. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al. (1994). The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 331: 294-9.
50. Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, Coleman N. (2003). FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63: 4568-76.
51. Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Böhling T, Asko-Seljavaara S, Blomqvist C, Elomaa I, Karaharju E, Kivioja AH, Siimes MA, Tukiainen E, Caballín MR, Myklebost O, Knuutila S. (1997). Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 75: 1403-9.
52. Douglass EC, Rowe ST, Valentine M, Parham D, Meyer WH, Thompson EI. (1990). A second nonrandom translocation, der(16)t(1;16)(q21;q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Cytogenet Cell Genet* 53: 87-90.
53. Hattinger CM, Rumpler S, Strehl S, Ambros IM, Zoubek A, Pötschger U, Gadner H, Ambros PF. (1999). Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 24: 243-54.
54. Tarkkanen M, Kiuru-Kuhlefelt S, Blomqvist C, Armengol G, Böhling T, Ekfors T, Virolainen M, Lindholm P, Monge O, Picci P, Knuutila S, Elomaa I. (1999). Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 114: 35-41.

55. Kullendorff CM, Mertens F, Donnér M, Wiebe T, Akerman M, Mandahl N. (1999). Cytogenetic aberrations in Ewing sarcoma: are secondary changes associated with clinical outcome? *Med Pediatr Oncol* 32: 79-83.
56. Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, Marrano P, Bayani J, Ramirez OC, Sorensen P, Thorner P, Greenberg M, Squire JA. (2001). Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* 91: 2156-64.
57. López-Guerrero JA, Pellín A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. (2001). Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 81: 803-14.
58. Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H. (1997). Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15: 2225-32.
59. Raney RB, Asmar L, Newton WA Jr, Bagwell C, Breneman JC, Crist W, Gehan EA, Webber B, Wharam M, Wiener ES, Anderson JR, Maurer HM. (1997). Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991. *J Clin Oncol* 15: 574-82.
60. Ushigome S, Machinami R, Sorensen PH. Ewing sarcoma/ primitive neuroectodermal tumor, in: C.D.M. Fletcher, K.K. Unni, F. Mertens, (Eds.), WHO Classification of Tumors, Pathology and Genetics, Tumors of Soft Tissue and Bone, 2003.
61. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, Meyer WH, Horowitz M, Tzen CY, Wexler LH, Tsokos M. (1999). Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol* 30: 911-8.
62. Meier VS, Kühne T, Jundt G, Gudat F. (1998). Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations. *Diagn Mol Pathol* 7: 29-35.
63. Dagher R, Pham TA, Sorbara L, Kumar S, Long L, Bernstein D, Mackall C, Raffeld M, Tsokos M, Helman L. (2001). Molecular confirmation of Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 23: 221-4.
64. Panicek DM, Gatsonis C, Rosenthal DI, Seeger LL, Huvos AG, Moore SG, Caudry DJ, Palmer WE, McNeil BJ. (1997). CT and MR imaging in the local staging of primary malignant musculoskeletal neoplasms: Report of the Radiology Diagnostic Oncology Group. *Radiology* 202: 237-46.
65. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jürgens HF, Voûte PA, Gadner H, Craft AW. (2000). Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 18: 3108-14.

66. Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Mercuri M, Versari M, Bertoni F. (2006). Prognostic factors in non-metastatic Ewing's sarcoma tumor of bone: an analysis of 579 patients treated at a single institution with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1998. *Acta Oncol* 45: 469-75.
67. Burchill SA. (2003). Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol* 56: 96-102. Review.
68. Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, Braun-Munzinger G, Paulussen M, Dunst J, Rube C, Winkelmann W, Heinecke A, Göbel U, Winkler K, Harms D, Treuner J, Jürgens H. (1999). Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. Cooperative Ewing Sarcoma Study. *Med Pediatr Oncol* 32: 186-95.
69. Fizazi K, Culine S, Droz JP, Kramar A, Theodore C, Ruffie P, Le Chevalier T (1998). Primary mediastinal nonseminomatous germ cell tumors: results of modern therapy including cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 16: 725-32.
70. Kushner BH, Meyers PA. (2001). How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* 19: 870-80. Review.
71. Miser JS, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Grier HE. (2004). Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide--a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 22: 2873-6.
72. Luksch R, Sampietro G, Collini P, Boracchi P, Massimino M, Lombardi F, Gandola L, Giardini R, Fossati-Bellani F, Migliorini L, Pilotti S, Scopsi L. (1999). Prognostic value of clinicopathologic characteristics including neuroectodermal differentiation in osseous Ewing's sarcoma family of tumors in children. *Tumori* 85: 101-7.
73. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gadner H, Kovar H. (1996). Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 1245-51.
74. de Alava E, Gerald WL. (2000). Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 18: 204-13. Review.

75. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, Sommelet-Olive D, Landman-Parker J, Bours D, Michon J, Delattre O; Société Française d'Oncologie Pédiatrique. (2003). Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor. *J Clin Oncol* 21: 85-91.
76. Abudu A, Mangham DC, Reynolds GM, Pynsent PB, Tillman RM, Carter SR, Grimer RJ. (1999). Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *Br J Cancer* 79: 1185-9.
77. Ozaki T, Paulussen M, Poremba C, Brinkschmidt C, Rerim J, Ahrens S, Hoffmann C, Hillmann A, Wai D, Schaefer KL, Boecker W, Juergens H, Winkelmann W, Dockhorn-Dworniczak B. (2001). Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 32: 164-71.
78. Ohali A, Avigad S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Gelernter I, Goshen Y, Yaniv I, Zaizov R (2003). Association between telomerase activity and outcome in patients with nonmetastatic Ewing family of tumors. *J Clin Oncol* 21: 3836-43.
79. Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn-Dworniczak B, Harms D, Müller-Weihrich S, Welte K, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Göbel U, Treuner J, Voûte PA, Zoubek A, Gadner H, Jürgens H. (2001). Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 19: 1818-29.
80. Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. (1998). The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 80: 1020-33.
81. Oberlin O, Deley MC, Bui BN, Gentet JC, Philip T, Terrier P, Carrie C, Mechinaud F, Schmitt C, Babin-Boilletot A, Michon J; French Society of Paediatric Oncology. (2001). Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Br J Cancer* 85: 1646-54.
82. Hawkins DS, Schuetze SM, Butrynski JE, Rajendran JG, Vernon CB, Conrad EU 3rd, Eary JF. (2005). [18F] Fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts outcome for Ewing sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol* 23: 8828-34.
83. Ludwig JA. (2008). Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol* 20: 412-8.

84. Craft A, Cotterill S, Malcolm A, Spooner D, Grimer R, Souhami R, Imeson J, Lewis I. (1998). Ifosfamide-containing chemotherapy in Ewing's sarcoma: The Second United Kingdom Children's Cancer Study Group and the Medical Research Council Ewing's Tumor Study. *J Clin Oncol* 16: 3628-33.
85. Shankar AG, Pinkerton CR, Atra A, Ashley S, Lewis I, Spooner D, Cannon S, Grimer R, Cotterill SJ, Craft AW(1999). Local therapy and other factors influencing site of relapse in patients with localised Ewing's sarcoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG). *Eur J Cancer* 35: 1698-704.
86. Nilbert M, Saeter G, Elomaa I, Monge OR, Wiebe T, Alvegård TA. (1998). Ewing's sarcoma treatment in Scandinavia 1984-1990--ten-year results of the Scandinavian Sarcoma Group Protocol SSGIV. *Acta Oncol* 37: 375-8.
87. Ferrari S, Mercuri M, Rosito P, Mancini A, Barbieri E, Longhi A, Rimondini S, Cesari M, Ruggieri P, Di Liddo M, Bacci G. (1998). Ifosfamide and actinomycin-D, added in the induction phase to vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin, improve histologic response and prognosis in patients with non metastatic Ewing's sarcoma of the extremity. *J Chemother* 10: 484-91.
88. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS. (2003). Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 348: 694-701.
89. Thacker MM, Temple HT, Scully SP. (2005). Current treatment for Ewing's sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 319-31.
90. Juergens C, Weston C, Lewis I, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, Michon J, Zoubek A, Juergens H, Craft A. (2006). Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer* 47 : 22-9.
91. Dunst J, Schuck A (2004). Role of radiotherapy in Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer* 42: 465-70.
92. Donaldson SS. (2004). Ewing sarcoma: radiation dose and target volume. *Pediatr Blood Cancer* 42: 471-6.
93. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Donati D, Barbieri E, Forni C, Bertoni F, Manfrini M, Giacomini S, Bacchini P. (2004). Role of surgery in local treatment of Ewing's sarcoma of the extremities in patients undergoing adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Rep* 11: 111-20.

94. Krasin MJ, Rodriguez-Galindo C, Davidoff AM, Billups CA, Fuller CE, Neel MD, Kun LE, Merchant TE. (2004). Efficacy of combined surgery and irradiation for localized Ewing's sarcoma family of tumors. *Pediatr Blood Cancer* 43: 229-36.
95. Bacci G, Longhi A, Briccoli A, Bertoni F, Versari M, Picci P. (2006). The role of surgical margins in treatment of Ewing's sarcoma family tumors: experience of a single institution with 512 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65: 766-72.
96. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, et al (1998). Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 9: 275-81.
97. Pinkerton CR, Bataillard A, Guillo S, Oberlin O, Fervers B, Philip T. (2001). Treatment strategies for metastatic Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 37: 1338-44. Review.
98. Miser JS, Krailo M, Meyers P, et al. (1996). Metastatic Ewing's sarcoma(es) and primitive neuroectodermal tumor (PNET) of bone: failure of new regimens to improve outcome. [Abstract] *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 15: A-1472, 467.
99. Bernstein ML, Devidas M, Lafreniere D, Souid AK, Meyers PA, Gebhardt M, Stine K, Nicholas R, Perlman EJ, Dubowy R, Wainer IW, Dickman PS, Link MP, Goorin A, Grier HE; Pediatric Oncology Group; Children's Cancer Group Phase II Study 9457; Children's Oncology Group. (2006). Intensive therapy with growth factor support for patients with Ewing tumor metastatic at diagnosis: Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Phase II Study 9457--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 24: 152-9.
100. Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A, Dunst J, Harms D, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Göbel U, Kremens B, Fölsch UR, Aulitzky WE, Voûte PA, Zoubek A, Jürgens H. (2001). Second malignancies after Ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study. *Ann Oncol* 12: 1619-30.
101. Fuchs B, Valenzuela RG, Petersen IA, Arndt CA, Sim FH. (2003). Ewing's sarcoma and the development of secondary malignancies. *Clin Orthop* 415: 82-9.
102. Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, Burden L, Askin FB, Dickman PS, Grier HE, Link MP, Meyers PA, Perlman EJ, Rausen AR, Robison LL, Vietti TJ, Miser JS. (2007). Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: A report from the Children's Oncology Group. *Blood* 109: 46-51.
103. Kuttesch JF Jr, Wexler LH, Marcus RB, Fairclough D, Weaver-McClure L, White M, Mao L, Delaney TF, Pratt CB, Horowitz ME, Kun LE. (1996). Second malignancies after Ewing's sarcoma: radiation dose-dependency of secondary sarcomas. *J Clin Oncol* 14: 2818-25.

104. Hawkins MM, Wilson LM, Burton HS, Potok MH, Winter DL, Marsden HB, Stovall MA. (1996). Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer. *J Natl Cancer Inst* 88: 270-8.
105. Ewing J. (1921). Diffuse endotelioma of bone. *Proc Nat Pathol Soc* 21: 17-24.
106. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. (1984). Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 12: 1-19.
107. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127: 507-18.
108. Eliazar S, Spencer J, Ye D, Olson E, Ilaria RL Jr. (2003). Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol Cell Biol* 23: 482-492.
109. Mackall CL, Meltzer PS, Helman LJ. (2002). Focus on sarcomas. *Cancer Cell* 2: 175-178.
110. Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. (2002). The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1: 393-401.
111. Kovar H, Pospisilova S, Jug G, Printz D, Gardner H. (2003). Response of Ewing tumor cells to forced and activated p53 expression. *Oncogene* 22: 3193-204.
112. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, Stamenkovic I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65: 11459-11468.
113. Castellero-Trejo Y, Eliazar S, Xiang L, Richardson JA, Ilaria RL 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: 8698-8705.
114. Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ. (2003). Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 63: 3464-3468.
115. Arvand A, and Denny CT. (2001). Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20: 5747-54.

116. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT. (1993). 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 USA* 90: 5752–6.
117. Toretsky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ. (1997). The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 30822–7.
118. Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, Serra M, Manara MC, Picci P, Baldini N. (1998). Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 58: 4127–31.
119. Braunreiter CL, Hancock JD, Coffin CM, Boucher KM, Lessnick SL. (2006). Expressions of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's Sarcoma. *Cell Cycle* 23: 2753–2759.
120. Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O. (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57/KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 20: 3258–65.
121. Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 64: 1266–77.
122. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
123. Fulci V, Macino G. (2007). Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Curr Opin Microbiol* 10: 199–203.
124. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811.
125. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498.
126. Salgado PS, Koivunen MR, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI, Grimes JM. (2006). The structure of an RNAi polymerase links RNA silencing and transcription. *PLoS Biol* 4: e434.
127. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38–39.

128. Dillon CP, Sandy P, Nencioni A, Kissler S, Rubinson DA, Van Parijs L. (2005). RNAi as an experimental and therapeutic tool to study and regulate physiological and disease processes. *Annu Rev Physiol* 67:147–173.
129. Czauderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, Leenders F, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. (2003). Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res* 31:e127.
130. Kim DH, Rossi JJ. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8: 173–184.
131. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. (2000). RNAi: doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21–23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25–33.
132. Almeida R, Allshire RC. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* 15: 251–258.
133. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-41.
134. Subramanian S, Lui WO, Lee CH, Espinosa I, Nielsen TO, Heinrich MC, Corless CL, Fire AZ, van de Rijn M. (2008). MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* 27: 2015-26.
135. Hammond SM. (2006). MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids. *Trends Mol Med* 12: 99–101.
136. Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo, *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1000–1004.
137. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563–574.
138. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22: 326–330.
139. Wang L, Mu FY. (2004). A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics* 20: 1818–1820.

140. Prakash TP, Allerson CR, Dande P, Vickers TA, Sioufi N, Jarres R, Baker BF, Swayze EE, Griffey RH, Bhat B. (2005). Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J Med Chem* 48: 4247–4253.
141. Spagnou S, Miller AD, Keller M. (2004). Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 43: 13348–13356.
142. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327: 761–766.
143. Sioud M, Sorensen DR. (2003). Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1220–1225.
144. Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N, Shankar P. (2003). Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 77: 7174–7181.
145. Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. (2004). Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* 558: 89–95.
146. Bartlett DW, Davis ME. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34: 322–333.
147. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173–178.
148. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. (2005). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65: 8984–8992.
149. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550–553.
150. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16: 948–958.

151. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5515–5520.
152. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23: 222–226.
153. Wang S, El-Deiry WS. (2004). Inducible silencing of KILLER/DR5 in vivo promotes bioluminescent colon tumor xenograft growth and confers resistance to chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Cancer Res* 64: 6666–6672.
154. Wu MT, Wu RH, Hung CF, Cheng TL, Tsai WH, Chang WT. (2005). Simple and efficient DNA vector-based RNAi systems in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 53–59.
155. Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. (2004). Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1927–1932.
156. Xia XG, Zhou H, Xu Z. (2006). Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes. *Biotechniques* 41: 64–68.
157. Chang HS, Lin CH, Chen YC, Yu WC. (2004). Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatio-temporal and conditional gene knockdown. *Am J Pathol* 165: 1535–1541.
158. Fritsch L, Martinez LA, Sekhri R, Naguibneva I, Gérard M, Vandromme M, Schaeffer L, Harel-Bellan A. (2004). Conditional gene knock-down by CRE-dependent short interfering RNAs. *EMBO Rep* 5: 178–182.
159. Tiscornia G, Tergaonkar V, Galimi F, Verma IM. (2004). CRE recombinase- inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7347–7351.
160. Chen W, Liu M, Jiao Y, Yan W, Wei X, Chen J, Fei L, Liu Y, Zuo X, Yang F, Lu Y, Zheng Z. (2006). Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol* 80: 3559–3566.
161. Teusner JT, Lewin AS, Hauswirth WW. (2006). Down-regulation of rhodopsin gene expression by AAV-vectored short interfering RNA. *Adv Exp Med Biol* 572 : 233–238.
162. Barton GM, Medzhitov R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14943–14945.

163. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401–406.
164. Wiznerowicz M, Trono D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77: 8957–8961.
165. Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310: 1817–1821.
166. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441: 537–541.
167. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35: 215–217.
168. Marques JT, Williams BR. (2005). Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol* 23: 1399–1405.
169. Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, Fedorov Y, Robinson K, Leake D, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. (2006) Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* 12: 988–993.
170. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635–637.
171. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A. (2006). Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 12: 1188–1196.
172. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “offtarget” transcript silencing. *RNA* 12: 1197–1205.
173. Huesken D, Lange J, Mickanin C, Weiler J, Asselbergs F, Warner J, Meloon B, Engel S, Rosenberg A, Cohen D, Labow M, Reinhardt M, Natt F, Hall J. (2005). Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat Biotechnol* 23: 995–1001.

174. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, Piqani B, Eisenhaure TM, Luo B, Grenier JK, Carpenter AE, Foo SY, Stewart SA, Stockwell BR, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM, Root DE. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124:1283–1298.
175. Matsumoto S, Miyagishi M, Taira K. (2007). Genome-wide screening by using small-interfering RNA expression libraries. *Methods Mol Biol* 360: 131–142.
176. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111–114.
177. Lackner MR, Kindt RM, Carroll PM, Brown K, Cancilla MR, Chen C, de Silva H, Franke Y, Guan B, Heuer T, Hung T, Keegan K, Lee JM, Manne V, O'Brien C, Parry D, Perez-Villar JJ, Reddy RK, Xiao H, Zhan H, Cockett M, Plowman G, Fitzgerald K, Costa M, Ross-Macdonald P. (2005). Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors. *Cancer Cell* 7: 325–336.
178. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7:591–600.
179. Brummelkamp TR, Fabius AW, Mullenders J, Madiredjo M, Velds A, Kerkhoven RM, Bernards R, Beijersbergen RL. (2006). An shRNA barcode screen provides insight into cancer cell vulnerability to MDM2 inhibitors. *Nat Chem Biol* 2: 202–206.
180. Morgan-Lappe S, Woods KW, Li Q, Anderson MG, Schurdak ME, Luo Y, Giranda VL, Fesik SW, Levenson JD. (2006). RNAi-based screening of the human kinome identifies Akt-cooperating kinases: a new approach to designing efficacious multitargeted kinase inhibitors. *Oncogene* 25: 1340–1348.
181. Mukhopadhyay UK, Senderowicz AM, Ferbeyre G. (2005). RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res* 65: 2872–2881.
182. Aza-Blanc P, Cooper CL, Wagner K, Batalov S, Deveraux QL, Cooke MP. (2003). Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell* 12: 627–637.

183. Kolfshoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. (2005). A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* 1:849–858.
184. Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, Aza-Blanc P. (2004). RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene* 23: 8392–8400.
185. Lippman Z, Martienssen R. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431: 364–370.
186. Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar el B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z. (2003). Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. *Aging Cell* 2: 209–217.
187. Davidson BL, Paulson HL. (2004). Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 3: 145–149.
188. Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 183–188.
189. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21: 639–644.
190. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2: 243–247.
191. Lage H. (2005). Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. *Future Oncol* 1:103–113.
192. Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, Rubin SC, Coukos G. (2003). Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and antiangiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1169–1178.
193. Futami T, Miyagishi M, Seki M, Taira K. (2002). Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucleic Acids Res* 2: 251–252.
194. Takeshita F, Ochiya T. (2006). Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci* 97: 689–696.

195. Gurzov EN, Izquierdo M. (2006). RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo. *Gene Ther* 13: 1–7.
196. Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. (2004). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 64: 3365–3370.
197. Nieth C, Priebisch A, Stege A, Lage H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett* 545: 144–150.
198. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. (2003). Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res* 63: 1550–1554.
199. Kovar H, Ban J, Pospisilova S. (2003). Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 13: 275–281.
200. Piersanti S, Sacchetti B, Funari A, Di Cesare S, Bonci D, Cherubini G, Peschle C, Riminucci M, Bianco P, Saggio I. (2006). Lentiviral transduction of human postnatal skeletal (stromal, mesenchymal) stem cells: in vivo transplantation and gene silencing. *Calcif Tissue Int* 78: 372–384.
201. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. (1997). EWS–Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99: 239–47.
202. Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. (1997). Inhibition of EWS–FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31: 9–16.
203. Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. (1995). Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS fusion transcripts. *Oncogene* 11: 1049–54.
204. Dohjima T, Ohno T, Banno Y, Nozawa Y, Wen-yi Y, Shimizu K (2000). Preferential down-regulation of phospholipase C-beta in Ewing's sarcoma cells transfected with antisense EWS–Fli-1. *Br J Cancer* 82: 16–9.
205. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24: 7275–83.

206. Mendiola M, Carrillo J, García E, Lalli E, Hernández T, de Alava E, Tirode F, Delattre O, García-Miguel P, López-Barea F, Pestaña A, Alonso J. (2006). The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer* 118: 1381-9.
207. Sancéau J, Truchet S, Bauvois B. (2003). Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 278: 36537-46.
208. Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, Kahn-Farooqi W, Zielinska-Kwiatkowska A, Blackburn M, Chansky K, Conrad EU 3rd, Bruckner JD, Greenlee TK, Yang L. (2004). Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 22: 910-7.
209. Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. (2005). 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: 4633-44.
210. Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P. (2000). EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 401-6.
211. Toub N, Bertrand JR, Tamaddon A, Elhamesh H, Hillaireau H, Maksimenko A, Maccario J, Malvy C, Fattal E, Couvreur P. (2006). Efficacy of siRNA Nanocapsules Targeted Against the EWS-FlI1 Oncogene in Ewing Sarcoma. *Pharmaceutical Research* 23: 892-900.
212. Siligan C, Ban J, Bachmaier R, Spahn L, Kreppel M, Schaefer KL, Poremba C, Aryee DN, Kovar H. (2005). EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 24: 2512-24.
213. Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, Lessnick SL. (2006). Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9: 405-16.
214. Owen LA, Lessnick SL. (2006). Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/ FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* 5: 2049-2053.
215. Kinsey M, Smith R, Lessnick SL. (2006). NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Res* 4: 851-9.
216. Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D, Wright RD, Lessnick SL, Kung AL, Golub TR. (2007). Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS Med* 4: e122.

217. Carrillo J, García-Aragoncillo E, Azorín D, Agra N, Sastre A, González-Mediero I, García-Miguel P, Pestaña A, Gallego S, Segura D, Alonso J. (2007). Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. *Clin Cancer Res* 13: 2429-40.
218. Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. (1993). Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomics* 18: 609-15.
219. Plougastel B, Mattei MG, Thomas G, Delattre O. (1994). Cloning and chromosome localization of the mouse Ews gene. *Genomics* 23: 278-81.
220. Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. (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: 5022–5031.
221. Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. (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: 3087–3097.
222. Feng L, Lee KA. (2001). A repetitive element containing a critical tyrosine residue is required for transcriptional activation by the EWS/ATF1 oncogene. *Oncogene* 20: 4161–8.
223. Chan D, Wilson TJ, Xu D, Cowdery HE, Sanij E, Hertzog PJ, Kola I. (2003). Transformation induced by Ewing's sarcoma associated EWS/FLI-1 is suppressed by KRAB/FLI-1. *Br J Cancer* 88: 137–45.
224. Araya N, Hirota K, Shimamoto Y, Miyagishi M, Yoshida E, Ishida J, Kaneko S, Kaneko M, Nakajima T, Fukamizu A. (2003). Cooperative interaction of EWS with CREB-binding protein selectively activates hepatocyte nuclear factor 4-mediated transcription. *J Biol Chem* 278: 5427–32.
225. Helman LJ, Meltzer P. (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3: 685–694.
226. Knoop LL, Baker SJ. (2001). EWS/FLI alters 5'-splice site selection. *J Biol Chem* 276: 22317–22322.
227. Yang L, Chansky HA, Hickstein DD. (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: 37612–37618.

228. Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, Höglund M, Forster A, Rabbitts TH, Ron D, Mandahl N, Mitelman F. (1996). Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 37: 1-8.
229. Felsch JS, Lane WS, Peralta EG. (1999). Tyrosine kinase Pyk2 mediates G-protein-coupled receptor regulation of the Ewing sarcoma RNA-binding protein EWS. *Curr Biol* 9: 485–488.
230. Perrotti D, Iervolino A, Cesi V, Cirinna M, Lombardini S, Grassilli E, Bonatti S, Claudio PP, Calabretta B (2000). BCR/ABL prevents c-jun-mediated and proteasome-dependent FUS (TLS) proteolysis through a protein kinase C betaII dependent pathway. *Mol Cell Biol* 20: 6159–6169.
231. Belyanskaya LL, Delattre O, Gehring H. (2003). Expression and subcellular localization of Ewing sarcoma (EWS) protein is affected by the methylation process. *Exp Cell Research* 288: 374-81.
232. Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L, Ruley HE. (2000). Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* 24: 175–179.
233. Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D. (2000). Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(–/–) mice. *EMBO J* 19: 453–462.
234. Shimizu K, Ichikawa H, Tojo A, Kaneko Y, Maseki N, Hayashi Y, Ohira M, Asano S, Ohki M. (1993). An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10280–10284.
235. Baud V, Lipinski M, Rassart E, Poliquin L, Bergeron D. (1991). The human homolog of the mouse common viral integration region, FLI1, maps to 11q23-q24. *Genomics* 11: 223-4.
236. Bergeron D, Poliquin L, Kozak CA, Rassart E. (1991). Identification of a common viral integration region in Cas-Br-E murine leukemia virus-induced non-T, non-B-cell lymphomas. *J Virol* 65: 7-15.
237. Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, Bernstein A. (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: 908–918.
238. Blair DG, Athanasiou M. (2000). Ets and retroviruses - transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis. *Oncogene* 19: 6472–6481.

239. Kim CA, Phillips ML, Kim W, Gingery M, Tran HH, Robinson MA, Faham S, Bowie JU. (2001). Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J* 20: 4173-82.
240. Rao VN, Ohno T, Prasad DD, Bhattacharya G, Reddy ES (1993). Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* 8: 2167–2173.
241. Truong AH, Ben-David Y. (2000). The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 19: 6482–6489.
242. Melet F, Motro B, Rossi DJ, Zhang L, Bernstein A. (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: 2708–2718.
243. Brown LA, Rodaway AR, Schilling TF, Jowett T, Ingham PW, Patient RK, Sharrocks AD. (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: 237–252.
244. Maroulakou IG, Bowe DB. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 19: 6432-42.
245. Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, Watson DK. (2000). Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 20: 5643–5652.
246. Zhang L, Eddy A, Teng YT, Fritzler M, Kluppel M, Melet F, Bernstein A. (1995). An immunological renal disease in transgenic mice that overexpress Fli-1, a member of the ets family of transcription factor genes. *Mol Cell Biol* 15: 6961–6970.
247. Deveaux S, Filipe A, Lemarchandel V, Ghysdael J, Romeo PH, Mignotte V. (1996). Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood* 87: 4678–4685.
248. Bastian LS, Kwiatkowski BA, Breininger J, Danner S, Roth G. (1999). Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood* 93: 2637–2644.
249. Athanasiou M, Clausen PA, Mavrothalassitis GJ, Zhang XK, Watson DK, Blair DG. Increased expression of the ETS-related transcription factor FLI-1/ERGB correlates with and can induce the megakaryocytic phenotype. *Cell Growth Differ* 1996 7: 1525-34.

250. Howard JC, Yousefi S, Cheong G, Bernstein A, Ben-David Y. (1993). Temporal order and functional analysis of mutations within the Fli-1 and p53 genes during the erythroleukemias induced by F-MuLV. *Oncogene* 8: 2721–2729.
251. Pereira R, Quang CT, Lesault I, Dolznig H, Beug H, Ghysdael J. (1999). FLI-1 inhibits differentiation and induces proliferation of primary erythroblasts. *Oncogene* 18: 1597–1608.
252. Tamir A, Howard J, Higgins RR, Li YJ, Berger L, Zacksenhaus E, Reis M, Ben-David Y. (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: 4452–4464.
253. Lesault I, Quang CT, Frampton J, Ghysdael J. (2002). Direct regulation of BCL-2 by FLI-1 is involved in the survival of FLI-1-transformed erythroblasts. *Embo J.* 21: 694-703.
254. Deramautd BM, Remy P, Abraham NG. (1999). Upregulation of human heme oxygenase gene expression by Ets-family proteins. *J Cell Biochem* 72: 311-21.
255. Boveri T. (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Gustav Fisher Verlag, Jena.
256. Nowell P C, Hungerford DA. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.
257. Rowley JD. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290–293.
258. Rabbitts TH. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372: 143–149
259. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet* 20: 207–211.
260. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. (2006). Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer [online], <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
261. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. (2001). Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 97: 3581–3588.

262. Xia SJ, Barr FG. (2005). Chromosome translocations in sarcomas and the emergence of oncogenic transcription factors. *Eur J Cancer* 41: 2513–2527.
263. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105: 2640–2653.
264. Thomas M, Greil J, Heidenreich O. (2006). Targeting leukemic fusion proteins with small interfering RNAs: recent advances and therapeutic potentials. *Acta Pharmacol Sin* 27: 273–281.
265. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247: 824–830.
266. Rego EM, Ruggero D, Tribioli C, Cattoretti G, Kogan S, Redner RL, Pandolfi PP. (2006). Leukemia with distinct phenotypes in transgenic mice expressing PML/RAR α , PLZF/RAR α or NPM/RAR α . *Oncogene* 25: 1974–1979.
267. Wai DH, Knezevich SR, Lucas T, Jansen B, Kay RJ, Sorensen PH. (2000). The ETV6-NTRK3 gene fusion encodes a chimeric protein tyrosine kinase that transforms NIH3T3 cells. *Oncogene* 19: 906-15.
268. Simon MP, Navarro M, Roux D, Pouyssegur J. (2001). Structural and functional analysis of a chimeric protein COL1A1-PDGFB generated by the translocation t(17;22)(q22;q13.1) in Dermatofibrosarcoma protuberans (DP) *Oncogene* 20: 2965-75.
269. Han M, Rivera MN, Batten JM, Haber DA, Dal Cin P, Iafrate AJ. (2007). Wilms' tumor with an apparently balanced translocation t(X;18) resulting in deletion of the WTX gene. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 909-13.
270. Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343–3356.
271. Kas K, Voz ML, Røijer E, Aström AK, Meyen E, Stenman G, Van de Ven WJ. (1997). Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nature Genet* 15: 170–174.
272. Berger R, Busson M, Baranger L, Hélias C, Lessard M, Dastugue N, Speleman F. (2006). Loss of the NPM1 gene in myeloid disorders with chromosome 5 rearrangements. *Leukemia* 20: 319–321.
273. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. (2005). *Nature Rev Cancer* 5: 251–262.

274. Lannon CL, Sorensen PHB. (2005). ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin Cancer Biol* 15: 215–223.
275. Sirvent N, Maire G, Pedeutour F. (2003). Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors: from ring chromosomes to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 1–19.
276. Ladanyi M, Lui MY, Antonescu CR, Krause-Boehm A, Meindl A, Argani P, Healey JH, Ueda T, Yoshikawa H, Meloni-Ehrig A, Sorensen PH, Mertens F, Mandahl N, van den Berghe H, Sciot R, Cin PD, Bridge J. (2001). The der(17)t(X;17)(p11;q25) of human alveolar soft part sarcoma fuses the TFE3 transcription factor gene to ASPL, a novel gene at 17q25. *Oncogene* 20: 48–57.
277. Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, Vermeesch JR, Stul M, Dutta B, Boeckx N, Bosly A, Heimann P, Uyttebroeck A, Mentens N, Somers R, MacLeod RA, Drexler HG, Look AT, Gilliland DG, Michaux L, Vandenberghe P, Wlodarska I, Marynen P, Hagemeijer A. (2004). Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genet* 36: 1084–1089.
278. Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, Sciot R, Tan X, Xiao S, Fletcher JA. (2000). PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer Res.* 60: 4869–4872.
279. Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, Housman D. (2003). Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 37: 58–71.
280. Yoshimoto M, Joshua AM, Chilton-Macneill S, Bayani J, Selvarajah S, Evans AJ, Zielenska M, Squire JA. (2006). Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement. *Neoplasia* 8: 465–469.
281. Sanderson RN, Johnson PR, Moorman AV, Roman E, Willett E, Taylor PR, Proctor SJ, Bown N, Ogston S, Bowen DT. (2006). Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20: 444–450.
- 282 Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B. (1998). Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 81–99.
283. Novo FJ, Vizmanos JL. (2006). Chromosome translocations in cancer: computational evidence for the random generation of double-strand breaks. *Trends Genet* 22: 193–196.

284. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. (2002). *Mutat Res* 504: 17–36.
285. Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, Parry A, Walz C, Wiemels JL, Segal MR, Adès L, Blair IA, Osheroff N, Peniket AJ, Lafage-Pochitaloff M, Cross NC, Chomienne C, Solomon E, Fenaux P, Grimwade D. (2005). DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 352: 1529–1538.
286. Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, Greco A, Astakhova L, Butti MG, Demidchik EP, et al. (1995). Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 55: 5617–5620.
287. Taylor AM. (2001). Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 631–644.
288. Elliott B, Richardson C, Jasin M. (2005). Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell* 17: 885–94.
289. Richardson C, Jasin M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405: 697–700.
290. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. (2006). Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18: 307–316.
291. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93: 1197–1207.
292. Raghavan SC, Lieber MR. (2006). DNA structures at chromosomal translocation sites. *BioEssays* 28: 480–494.
293. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
294. Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, and Squire JA. (2002). The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 97–112.
295. Hess JL. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 10: 500–507.

296. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, and Caligiuri MA. (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2390–2395.
297. Onno M, Nakamura T, Hillova J, Hill M. (1992). Rearrangement of the human *trc* oncogene by homologous recombination between Alu repeats of nucleotide sequences from two different chromosomes. *Oncogene* 7: 2519–2523.
298. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature Rev Cancer* 3: 639–649 (2003).
299. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature Rev Cancer* 5: 311–321 (2005).
300. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121: 823–835.
301. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111–115.
302. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundström I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, Strömbeck B, Garwicz S, Békássy AN, Schmiegelow K, Lausen B, Hokland P, Lehmann S, Juliusson G, Johansson B, Jacobsen SE. (2005). Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nature Med* 11: 630–637.
303. Janz S, Potter M, Rabkin CS. (2003). Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 211–223.
304. Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. (1993). Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 82: 712–715.
305. Kelly LM, Gilliland DG. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Gene* 3: 179–198.
306. Riggi N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Stehle JC, Baumer K, Guillou L, Stamenkovic I. (2006). Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res* 66: 7016–7023.

307. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268–274.
308. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7: 233–45.
309. Scheidler S, Fredericks WJ, Rauscher FJ 3rd, Barr FG, Vogt PK. (1996). The hybrid PAX3–FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9805–9809.
310. Nagai M, Tanaka S, Tsuda M, Endo S, Kato H, Sonobe H, Minami A, Hiraga H, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K. (2001). Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT–SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/ hSNF2 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3843–3848.
311. Schwarzbach MH, Koesters R, Germann A, Mechttersheimer G, Geisbill J, Winkler S, Niedergethmann M, Ridder R, Buechler MW, von Knebel Doeberitz M, Willeke F. (2004). Comparable transforming capacities and differential gene expression patterns of variant FUS/CHOP fusion transcripts derived from soft tissue liposarcomas. *Oncogene* 23: 6798–6805.
312. Arvand A, Welford SM, Teitell MA, Denny CT. (2001). The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1. *Cancer Res* 61: 5311–5317.
313. Pérez-Mancera PA, Pérez-Losada J, Sánchez-Martín M, Rodríguez-García MA, Flores T, Battaner E, Gutiérrez-Adán A, Pintado B, Sánchez-García I. (2002). Expression of the FUS domain restores liposarcoma development in CHOP transgenic mice. *Oncogene* 21:1679–1684.
314. Keller C, Arenkiel BR, Coffin CM, El-Bardeesy N, DePinho RA, Capecchi MR. (2004). Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3: Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ ARF and Trp53 loss of function. *Genes Dev* 18: 2614–2626.
315. Fujimura Y, Siddique H, Lee L, Rao VN, Reddy ES. (2001). EWS–ATF-1 chimeric protein in soft tissue clear cell sarcoma associates with CREB binding protein and interferes with p53-mediated trans-activation function. *Oncogene* 20: 6653–6659.

316. Knoop LL, Baker SJ. (2000). The splicing factor U1C represses EWS/ FLI-mediated transactivation. *J Biol Chem* 275: 24865–24871.
317. Fukuma M, Okita H, Hata J, Umezawa A. (2003). Upregulation of Id2, an oncogenic helix–loop–helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 22: 1–9.
318. Thompson AD, Teitell MA, Arvand A, Denny CT. (1999). Divergent Ewing’s sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumourigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 18: 5506–5513.
319. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. (2004). Species- and cell type specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 6: 171–183.
320. Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Heighway J, Kumar S. (1990). N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int J Cancer* 45: 593–596.
321. Maitra A, Roberts H, Weinberg AG, Geradts J. (2001). Aberrant expression of tumour suppressor proteins in the Ewing family of tumours. *Arch Pathol Lab Med* 125: 1207–1212.
322. Kim J, Pelletier J. (1999). Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. *Physiol Genom* 1: 127–138.
323. Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, et al. (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12 : 4481–4487.
324. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN. (1995). A variant Ewing’s sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10: 1229–1234.
325. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F, Fujinaga K. Fusion of an ETSfamily gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15:115–121.
326. Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O. (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumours. *Oncogene* 14: 1159–1164.
327. Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, Coleman N. (2003). FUS/ERG gene fusions in Ewing’s tumours. *Cancer Res* 63: 4568–4576.

328. Sorensen PH, Shimada H, Liu XF, Lim JF, Thomas G, Triche TJ. (1995). Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Cancer Res* 55: 1385-92.
329. Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S, Marrano P, Bayani J, Malkin D, Greenberg M, Lorenzana A, Zielenska M. (1996). Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. *Am J Pathol* 148: 1125-38.
330. Burchill SA, Wheeldon J, Cullinane C, Lewis IJ. (1997). EWS-FLI1 fusion transcripts identified in patients with typical neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33: 239-43.
331. Scotlandi K, Chano T, Benini S, Serra M, Manara MC, Cerisano V, Picci P, Baldini N (2000). Identification of EWS/FLI-1 transcripts in giant-cell tumor of bone. *Int J Cancer* 87: 328-35.
332. Mao X, Miesfeldt S, Yang H, Leiden JM, Thompson CB. (1994). The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem* 269: 18216-18222.
333. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, Ghysdael J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 14: 3230-3241.
334. Ohno T, Rao VN, Reddy ES. (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 53: 5859-63.
335. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. (1993). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13: 7393-8.
336. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, et al. (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359: 162-5.
337. May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT. (1997). EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 17: 495-7.
338. Teitell MA, Thompson AD, Sorensen PH, Shimada H, Triche TJ, Denny CT. (1999). EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab Invest* 79: 1535-43.

339. Jaishankar S, Zhang J, Roussel MF, Baker SJ. (1999). Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. *Oncogene* 18: 5592-7.
340. Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. (2001). Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 61: 3586-90.
341. Spahn L, Siligan C, Bachmaier R, Schmid JA, Aryee DN, Kovar H. (2003). Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein. *Oncogene* 22: 6819-29.
342. Carrère S, Verger A, Flourens A, Stehelin D, Dutertre-Coquillaud M. (1998). Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 16: 3261-8.
343. Hahm KB. (1999). Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 23: 481.
344. Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y. (2003). Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 278: 15105-15115.
345. Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PH, Triche TJ. (2004). Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumours and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 64: 6026-6034.
346. Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, Irifune H, Zembutsu H, Tanaka T, Aoyama T, Hosaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Toguchida J, Nakamura Y, Tokino T. (2002). The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumours. *Oncogene* 21: 8302-8309.
347. Martinsen BJ, Bronner-Fraser M. (1998). Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 281: 988-91.
348. Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407: 592-8.
349. Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, Bates SE, Thiele CJ. (2002). MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res* 62: 6108-15.

350. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, Picci P, Manara MC, Baldini N. (1996). Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res* 56: 4570-4.
351. Strammiello R, Benini S, Manara MC, Perdichizzi S, Serra M, Spisni E, Picci P, Scotlandi K. (2003). Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* 35: 675-84.
352. Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kyo S, Ohno T, Taira T, Ariga H, Nakajima K, Hatta M, Kobayashi M, Sano H, Kohgo T, Shindoh M. (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumours. *Cancer Res* 63: 8338-8344.
353. Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R. (2004). hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop Relat Res* 426: 64-68.
354. Zwerner JP, May WA. (2001). PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 20: 626-33.
355. Zwerner JP, May WA. (2002). Dominant negative PDGF-C inhibits growth of Ewing family tumor cell lines. *Oncogene* 21: 3847-54.
356. Thompson AD, Braun BS, Arvand A, Stewart SD, May WA, Chen E, Korenberg J, Denny C. (1996). EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 13: 2649-2658.
357. Arvand A, Bastians H, Welford SM, Thompson AD, Ruderman JV, Denny CT (1998). EWS/FLI1 up regulates mE2-C, a cyclin-selective ubiquitin conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* 17: 2039-2045.
358. Rorie CJ, Weissman BE. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumour cell lines. *Cancer Res* 64: 7288-7295.
359. Abaan OD, Levenson A, Khan O, Furth PA, Uren A, Toretsky JA. (2005). PTPL1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 and modulates Ewing's Sarcoma tumorigenesis. *Oncogene* 24: 2715-2722.
360. Kikuchi R, Murakami M, Sobue S, Iwasaki T, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Asano H, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. (2007). Ewing's sarcoma fusion protein, EWS/Fli-1 and Fli-1 protein induce PLD2 but not PLD1 gene expression by binding to an ETS domain of 5' promoter. *Oncogene* 26: 1802-10.

361. Ramakrishnan R, Fujimura Y, Zou JP, Liu F, Lee L, Rao VN, Reddy ES. (2004). Role of protein–protein interactions in the antiapoptotic function of EWS-Fli-1. *Oncogene* 23: 7087–94.
362. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. (2004). Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS–ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing’s sarcoma. *Clin Cancer Res* 10: 1344–1353.
363. Zwerner JP, Joo J, Warner KL, Christensen L, Hu-Lieskovan S, Triche TJ, May WA. (2008). The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene* 27: 3282-91.
364. Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing’s sarcoma *EWS/FLI-1* fusion gene. *Oncogene* 10: 423-31.
365. Janknecht R. (2005). EWS-ETS oncoproteins: The linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363: 1–14.
366. Sorensen PHB, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 6: 146–151.
367. Ichikawa H, Shimizu K, Hayashi Y, Ohki M. (1994). An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res* 1994 54: 2865-8.
368. Codrington R, Pannell R, Forster A, Drynan LF, Daser A, Lobato N, Metzler M, Rabbitts TH. (2005). The Ews-ERG fusion protein can initiate neoplasia from lineage-committed haematopoietic cells. *PLoS Biol* 3: e242.
369. Forster A, Pannell R, Drynan LF, Codrington R, Daser A, Metzler M, Lobato MN, Rabbitts TH. (2005). The invertor knock-in conditional chromosomal translocation mimic. *Nat Methods* 2: 27-30.
370. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata JI, Umezawa A, Kiyokawa N. (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* 28: 2125-37.
371. Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. (1997). Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 14:1259-68.

372. Matsui Y, Chansky HA, Barahmand-Pour F, Zielinska-Kwiatkowska A, Tsumaki N, Myoui A, Yoshikawa H, Yang L, Eyre DR. (2003). COL11A2 collagen gene transcription is differentially regulated by EWS/ERG sarcoma fusion protein and wild-type ERG. *J Biol Chem* 278: 11369-75.
373. Yabe H, Fukuma M, Urano F, Yoshida K, Kato S, Toyama Y, Hata J, Umezawa A. (2002). Lack of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 61-71.
374. Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. (2000). EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res* 60:1536-40.
375. de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Barr FG, Ladanyi M. (2000). Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am J Pathol* 156: 849-55.
376. Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Juergens H, Wunder JS, Andrulis IL, Malik R, Sorensen PH, Womer RB, Barr FG. (1999). EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 17: 1809-14.
377. Zoubek A, Pfliegerer C, Salzer-Kuntschik M, Amann G, Windhager R, Fink FM, Koscielniak E, Delattre O, Strehl S, Ambros PF, et al. (1994). Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br J Cancer* 70: 908-13.
378. Minoletti F, Sozzi G, Tornielli S, Pilotti S, Azzarelli A, Pierotti MA, Radice P. (1998). A novel EWS-ERG rearrangement generating two hybrid mRNAs in a peripheral primitive neuroectodermal tumour (pPNET) with a t(15;22) translocation. *J Pathol* 186: 434-7.
379. de Alava E, Lozano MD, Patiño A, Sierrasesúmaga L, Pardo-Mindán FJ. (1998). Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagn Mol Pathol* 7:152-7.
380. Riggi N, Stamenkovic I. (2007). The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 254: 1-10.
381. Friedman JM, Vitale M, Maimon J, Israel MA, Horowitz ME, Schneider BS. (1992). Expression of the cholecystokinin gene in pediatric tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5819-23.

382. Noguera R, Triche TJ, Navarro S, Tsokos M, Llombart- Bosch A.(1992). Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphologic, immunocytochemical, and oncogene expression parameters. *Lab Invest* 66: 143–51.
383. Yee D, Favoni RE, Lebovic GS, Lombana F, Powell DR, Reynolds CP, Rosen N. (1990). Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 86: 1806–1814.
384. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL. (2004). Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5: 221–230.
385. Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 2176-85.
386. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. (2008). Stem Cells: Promises Versus Limitations. *Tissue Eng* 14: 53-60.
387. Beddington RS, Robertson EJ (1989). An assessment of the development potential of embryonic stem cells in midgestation mouse embryo. *Development* 105: 733-7.
388. Evans MJ, Kauffman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6.
389. Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-8.
390. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7.
391. Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. (2004). The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 22: 51-64.
392. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. (2005). The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 726–737.

393. Spivakov M, Fisher AG. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 8: 263–271.
394. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105–11.
395. Marx J. (2003). Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 301: 1308–10.
396. Pardo R, Clarke MF, Morrison SJ. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 895–902.
397. Perez-Losada J, Balmain A. (2003). Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 434–443.
398. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE and Weissman IL. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11842–11849.
399. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983–3988.
400. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821–5828.
401. Owens DM, Watt FM. (2003). Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer* 3: 444–451.
402. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ, Bjerkvig R. (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 5: 899–904.
403. Lessard J, Sauvageau G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423: 255–260.
404. Smith AG. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 435–62. Review.
405. Dimitriou H, Matsouka C, Perdikoyanni C, Stiakaki E, Bolonaki I, Lydaki E, Koumantakis E, and Kalmanti M. (1998). Phenotypic characteristics of cord blood hemopoietic cells. *Leuk Res* 22: 755–8.

406. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396–2402.
407. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279–4295.
408. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306: 330–335.
409. Mimeault M, Batra SK. (2006). Concise review, recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24: 2319–45.
410. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41–9.
411. Kørbling M, Estrov Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349: 570–82. Review.
412. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, and Fahn S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *New Engl J Med* 344: 710–9.
413. Goss JA, Schock AP, Brunnicardi FC, Goodpastor SE, Garber AJ, Soltes G, Barth M, Froud T, Alejandro R, and Ricordi C. (2001). Achievement of insulin independence in three consecutive type-1 diabetic patients via pancreatic islet transplantation using islets isolated at a remote islet isolation center. *Transplantation* 74: 1761–6.
414. Prockop DJ. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71–74.
415. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4: 267–274.
416. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 151: 294 – 307.

417. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. (1986). Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* 84: 139–151.
418. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56: 289–301.
419. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
420. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3213–3218.
421. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548–1549.
422. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. (1991). In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195: 492–503.
423. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. (1998). Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clinical Science* 94: 549–555.
424. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1115–1122.
425. Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. (2000). Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum* 43: 2046–2055.
426. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890–896.
427. Gindraux F, Selmani Z, Obert L, Davani S, Tiberghien P, Hervé P, Deschaseaux F. (2007). Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule. *Cell Tissue Res* 327: 471–483.

428. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 89: 1235–1249.
429. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2: 477–488.
430. Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. (2004). Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 190: 239–245.
431. Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, Leboy PS. (2003). BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res* 44: 305–311.
432. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4: 415–428.
433. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18: 1417–1426.
434. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61: 364–370.
435. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2199–2204.
436. Aggarwal S, Pittenger MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.
437. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367–372.
438. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439–1441.
439. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106:1755–1761.

440. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony C, Sany J, Jorgensen C, Noël D. (2005). Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 1595–1603.
441. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701–705.
442. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A. (2003). In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288: 51–59.
443. Yang J, Zhou W, Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T, Liu J, Yu J, Zhou X, Hu J. (2007). Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 107: 17–29.
444. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6: 1282–1286.
445. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10711–10716.
446. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005–1011.
447. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U SA* 99: 8932–8937.
448. Zhang XS, Linkhart TA, Chen ST, Peng H, Wergedal JE, Gutierrez GG, Sheng MH, Lau KH, Baylink DJ. (2004). Local ex vivo gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *J Gene Med* 6: 4–15.
449. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62: 3603–3608.

450. Ponte AL, Marais E, Gally N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, Charbord P, Domenech J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737–1745.
451. Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinköthe T, Klinz FJ, Schwinger RH, Mehlhorn U, Bloch W. (2006). Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol* 85: 1179–1188.
452. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39: 678 – 683.
453. Ramírez M, Lucia A, Gómez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Pérez-Martínez A, Foster C, Andreu AL, Martín MA, Madero L, Arenas J, García-Castro J. (2006). Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med* 40: 719 –722.
454. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, Eder V, Domenech J. (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 24: 2202–2208.
455. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20: 592–6.
456. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33: 919–26.
457. Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, Kassem M. (2005). Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 527-538.
458. Serakinci N, Guldborg P, Burns JS, Abdallah B, Schrödter H, Jensen T, Kassem M. (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23: 5095-8.
459. Xu W, Qian H, Zhu W, Chen Y, Shao Q, Sun X, Hu J, Han C, Zhang X. (2004). A novel tumor cell line cloned from mutated human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells. *Oncol Rep* 12: 501-508.

460. Rubio D, Garcia S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, Garcia-Castro J, Bernad A. (2008). Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE* 3: e1398.
461. Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, Paz MF, Lloyd AC, Bernad A, Garcia-Castro J. (2008). Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res* 314: 691-8.
462. Martin JA, Forest E, Block JA, Klingelutz AJ, Whited B, Gitelis S, Wilkey A, Buckwalter JA. (2002). Malignant transformation in human chondrosarcoma cells supported by telomerase activation and tumor suppressor inactivation. *Cell Growth Differ* 13: 397-407.
463. Park YB, Park MJ, Kimura K, Shimizu K, Lee SH, Yokota J. (2002). Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 133: 105-11.
464. Gregory CA, Singh H, Perry AS, and Prockop DJ. (2003). The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *JBiol Chem* 278: 28067-28078.
465. Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, Singer S, Maki RG, Cordon-Cardo C. (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 117: 3248-57.
466. Kirsch DG, Dinulescu DM, Santiago PM, Jacks T. (2005). A mouse model for soft tissue sarcoma. In *2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. J Clin Oncol* 23: 9014.
467. Torchia EC, Boyd K, Rehg JE, Qu C, Baker SJ. (2007). EWS/FLI-1 induces rapid onset of myeloid/erythroid leukemia in mice. *Mol Cell Biol* 27: 7918-34.
468. Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE. (2005). Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: Alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 16: 1131-1141.
469. Perez-Mancera PA, Sanchez-Garcia I. (2005). Understanding mesenchymal cancer: the liposarcoma-associated FUS-DDIT3 fusion gene as a model. *Semin Cancer Biol* 15: 206-14.
470. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. (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: 8213-8221.

471. Bolontrade MF, Zhou RR, Kleinerman ES. (2002). Vasculogenesis Plays a Role in the Growth of Ewing's Sarcoma in Vivo. *Clin Cancer Res* 8: 3622-3627.
472. Lee TH, Bolontrade MF, Worth LL, Guan H, Ellis LM, Kleinerman ES. (2006). Production of VEGF165 by Ewing's sarcoma cells induces vasculogenesis and the incorporation of CD34+ stem cells into the expanding tumor vasculature. *Int J Cancer* 119: 839-846.
473. van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, Tran MG, Sciot R, Hauben E, Hogendoorn PC, Delattre O, Maxwell PH, Hendrix MJ, Griffioen AW. (2005). Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 65: 11520–11528.
474. Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schroder HD, Kassem M. (2005). Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 65: 3126-3135.
475. Zhou Z, Zhou RR, Guan H, Bucana CD, Kleinerman ES. (2003). E1A gene therapy inhibits angiogenesis in a Ewing's sarcoma animal model. *Mol Cancer Ther* 2: 1313-9.
476. Bloom ET. (1972). Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture. *Cancer Res* 32: 960-967.
477. Aryee DN, Sommergruber W, Muehlbacher K, Dockhorn-Dworniczak B, Zoubek A, Kovar H. (2000). Variability in gene expression patterns of Ewing tumor cell lines differing in EWS-FLI1 fusion type. *Lab Invest* 80: 1833-44.
478. Martínez-Ramírez A, Rodríguez-Perales S, Meléndez B, Martínez-Delgado B, Urioste M, Cigudosa JC, Benítez J. (2003). Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 141: 138-42.
479. Pagani A, Fischer-Colbrie R, Eder U, Pellin A, Llombart-Bosch A, Bussolati G. (1995). Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines. Morphological, immunophenotypic, molecular biological and cytogenetic evidence. *Int J Cancer* Nov 63: 738-43.
480. Szuhai K, Ijszenga M, Tanke HJ, Rosenberg C, Hogendoorn PC. (2006). Molecular cytogenetic characterization of four previously established and two newly established Ewing sarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 166: 173-9.
481. van Valen F. (1999). Ewing's sarcoma family of tumors. In: J.R.W. Masters and B. Palsson, Editors, *Human cell culture* Vol. 1, Kluwer Academic Publishers, Great Britain pp. 55–85.

482. Schaefer KL, Brachwitz K, Wai DH, Braun Y, Diallo R, Korsching E, Eisenacher M, Voss R, Van Valen F, Baer C, Selle B, Spahn L, Liao SK, Lee KA, Hogendoorn PC, Reifenberger G, Gabbert HE, Poremba C. (2004). Expression profiling of t(12;22) positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic up-regulation of potential new marker genes including ERBB3. *Cancer Res* 64: 3395-405.
483. Van Valen F, Jurgens H, Winkelmann W, Keck E. (1987). Beta-adrenergic agonist- and prostaglandin-mediated regulation of cAMP levels in Ewing's sarcoma cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 685-91.
484. Ramirez JM, Ocio EM, San Miguel JF, Pandiella A. (2007). Pemetrexed acts as an antimyeloma agent by provoking cell cycle blockade and apoptosis. *Leukemia* 21: 797-804.
485. Seeger RC, Rayner SA, Banerjee A, Chung H, Laug WE, Neustein HB, Benedict WF. (1977). Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res* 37: 1364-71.
486. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA. (2004). Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 6: 838-45.
487. Shevchenko A, Tomas H, Vorm O, Havlis J, Olsen JV, Mann M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856-60.
488. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376: 952-965.
489. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM and Cottrell JS. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
490. Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
491. Zupanska A, Adach A, Dziembowska M, Kaminska B. (2007). Alternative pathway of transcriptional induction of p21WAF1/Cip1 by cyclosporine A in p53-deficient human glioblastoma cells. *Cell Signal* 19: 1268-78.
492. Schultze N, Burki Y, Lang Y, Certa U, Bluethmann H. (1996). Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nature Biotechnology* 14: 499-503.

493. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage protocol. *Hum Reprod* 19: 1450-1456.
494. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4: 415-428.
495. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
496. Yoshikawa T, Uchimura E, Kishi M, Funeriu DP, Miyake M, Miyake J. (2004). Transfection microarray of human mesenchymal stem cells and on-chip siRNA gene knockdown. *Journal of Controlled Release* 96: 227-232.
497. Kovar H. (2005). Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 15: 189-96. Review.
498. Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades C, Tsokos M. (2001). Ewing's sarcoma family tumors are sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and express death receptor 4 and death receptor 5. *Cancer Res* 61: 2704-12.
499. Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, Palani CD, Hong le TT, Klier U, Bröker B, Völker U, Beck JF. (2007). Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 133: 847-58.
500. Li Y, Tanaka K, Li X, Okada T, Nakamura T, Takasaki M, Yamamoto S, Oda Y, Tsuneyoshi M, Iwamoto Y. (2007). Cyclin-dependent kinase inhibitor, flavopiridol, induces apoptosis and inhibits tumor growth in drug-resistant osteosarcoma and Ewing's family tumor cells. *Int J Cancer* 121: 1212-8.
501. Djavaheri-Mergny M, Wietzerbin J, Besançon F. (2003). 2-Methoxyestradiol induces apoptosis in Ewing sarcoma cells through mitochondrial hydrogen peroxide production. *Oncogene* 22: 2558-67.
502. Lu G, Punj V, Chaudhary PM. (2008). Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell-cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biol Ther* 11; 7(4).
503. Benini S, Perbal B, Zambelli D, Colombo MP, Manara MC, Serra M, Parenza M, Martinez V, Picci P, Scotlandi K. (2005). In Ewing's sarcoma CCN3 (NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. *Oncogene* 24: 4349-61.

504. Matsunobu T, Tanaka K, Nakamura T, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, Li X, Okada T, Oda Y, Tsuneyoshi M, Iwamoto Y. (2006). The possible role of EWS-Fli1 in evasion of senescence in Ewing family tumors. *Cancer Res* 66: 803-11.
505. Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M, Subra F, Athman R, Leh H, Brachet-Ducos C, Auclair C. (2005). The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells. *Exp Cell Res* 304: 443-56.
506. Vidal A, Koff A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15.
507. Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, Brachwitz K, Wai DH, Dirksen U, Lanvers-Kaminsky C, Juergens H, Herrero D, Stegmaier S, Koscielniak E, Eggert A, Nathrath M, Gosheger G, Schneider DT, Bury C, Diallo-Danebrock R, Ottaviano L, Gabbert HE, Poremba C. (2008). Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer* 44: 699-709.
508. Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, Schwentner R, Smrzka O, Muehlbacher K, Aryee DN, Kovar H. (2008). EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 68: 7100-9.
509. Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. (2008). EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS ONE* 3:e1965.
510. Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J. (1999). Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling. *Nature* 398: 622-627.
511. Cheung IY, Feng Y, Danis K, Shukla N, Meyers P, Ladanyi M, Cheung NK. (2007). Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 13: 6978-83.
512. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S, Hofmann F. (2004). In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5: 231-9.
513. Pang L, Sawada T, Decker SJ, Saltiel AR. (1995). Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem* 270:13585-8.

514. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241-8.
515. Martins AS, Mackintosh C, Martin DH, Campos M, Hernandez T, Ordonez JL, de Alava E. (2006). Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 12: 3532-40.
516. Martins AS, Ordoñez JL, García-Sánchez A, Herrero D, Sevillano V, Osuna D, Mackintosh C, Caballero G, Pastora Otero A, Poremba C, Madoz-Gúrpide J, de Alava E. (2008). A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing Sarcoma resistance to anti-IGF1R treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer Res* 68: 6260-70.
517. Martin MJ, Melnyk N, Pollard M, Bowden M, Leong H, Podor TJ, Gleave M, Sorensen PH. (2006). The insulin-like growth factor I receptor is required for Akt activation and suppression of anoikis in cells transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 26: 1754-69.
518. Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, Bates SE, Thiele CJ. (2002). MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res* 62: 6108-15.
519. Huber O, Ménard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, Rosenbaum J. (2008). Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res* 68: 6873-6. Review.
520. Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, Gregory DJ, Perkins ND, Fuller-Pace FV. (2004). The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol Biol* 5:11.
521. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-7.
522. Lexander H, Palmberg C, Auer G, Hellström M, Franzén B, Jörnvall H, Egevad L. (2005). Proteomic analysis of protein expression in prostate cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 27:263-72.
523. Chao CH, Chen CM, Cheng PL, Shih JW, Tsou AP, Lee YH. (2006). DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 66:6579-88.

524. Botlagunta M, Vesuna F, Mironchik Y, Raman A, Lisok A, Winnard P Jr, Mukadam S, Van Diest P, Chen JH, Farabaugh P, Patel AH, Raman V. (2008). Oncogenic role of DDX3 in breast cancer biogenesis. *Oncogene* 27:3912-22.
525. Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, Totty N, Jackson DP, Popescu R, Taylor A, Frey J, Selby PJ, Patel PM, Banks RE. (2004). Identification of proteins regulated by interferon-alpha in resistant and sensitive malignant melanoma cell lines. *Proteomics* 4: 3998-4009.
526. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Minna JD, Gazdar AF. (2002). Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 21: 4345-9.
527. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi K, Picci P, Serra M. (2008). Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 68: 6661-8.
528. Mao X. (1994). [Molecular cytogenetic studies of soft tissue tumors]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 16: 84-92.
529. Westwood G, Dibling BC, Cuthbert-Heavens D, Burchill SA. (2002). Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* 21:809-24.
530. Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, Abaan OD, Parvin JD, Cripe TP, Rice AM, Lee SB, Uren A. (2006). Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 66: 5574-81.
531. Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. (2008). Identification of proteins interacting with protein arginine methyltransferase 8: the Ewing sarcoma (EWS) protein binds independent of its methylation state. *Proteins* 72: 1125-37.
532. Guan H, Zhou Z, Wang H, Jia SF, Liu W, Kleinerman ES. (2005). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 11: 2662-9.
533. Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M, Cerisano V, Strammiello R, Baldini N, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Picci P. (2002). Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther* 9: 296-307.
534. Hendrickson EA. The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 1511-22.

535. Abe Y, Matsumoto S, Kito K, Ueda N. (2000). Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells. *J Biol Chem* 275: 21525-31.
536. Simons-Evelyn M, Bailey-Dell K, Toretsky JA, Ross DD, Fenton R, Kalvakolanu D, Rapoport AP. (2001). PBK/TOPK is a novel mitotic kinase which is upregulated in Burkitt's lymphoma and other highly proliferative malignant cells. *Blood Cells Mol Dis* 27: 825-9.
537. Dougherty JD, Garcia AD, Nakano I, Livingstone M, Norris B, Polakiewicz R, Wexler EM, Sofroniew MV, Kornblum HI, Geschwind DH. (2005). PBK/TOPK, a proliferating neural progenitor-specific mitogen-activated protein kinase kinase. *J Neurosci* 25: 10773-85.
538. Park JH, Lin ML, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. (2006). PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer. *Cancer Res* 66: 9186-95.
539. Zykova TA, Zhu F, Lu C, Higgins L, Tatsumi Y, Abe Y, Bode AM, Dong Z. (2006). Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase phosphorylation of histone H2AX prevents arsenite-induced apoptosis in RPMI7951 melanoma cells. *Clin Cancer Res* 12: 6884-93.
540. Ayllon V, O'Connor R. (2007). PBK/TOPK promotes tumour cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage response. *Oncogene* 26: 3451-61.
541. Oh SM, Zhu F, Cho YY, Lee KW, Kang BS, Kim HG, Zykova T, Bode AM, Dong Z. 2007. T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase functions as a positive regulator of c-Jun-NH2-kinase 1 signaling and H-Ras-induced cell transformation. *Cancer Res* 67: 5186-94.
542. Abe Y, Takeuchi T, Kagawa-Miki L, Ueda N, Shigemoto K, Yasukawa M, Kito K. 2007. A mitotic kinase TOPK enhances Cdk1/cyclin B1-dependent phosphorylation of PRC1 and promotes cytokinesis. *J Mol Biol* 370: 231-45.
543. Ioannidis P, Trangas T, Dimitriadis E, Samiotaki M, Ioannis Kyriazoglou, Tsiapalis CM, Kittas C, Agnantis N, Nielsen FC, Nielsen J, Christiansen J, Pandis N. (2001). c-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 94: 480-484.
544. Nandi A, Tidwell M, Karp J, Rapoport AP. (2004). Protein expression of PDZ-binding kinase is up-regulated in hematologic malignancies and strongly down-regulated during terminal differentiation of HL-60 leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 32: 240-5.

545. Hu HM, Zielinska-Kwiatkowska A, Munro K, Wilcox J, Wu DY, Yang L, Chansky HA. (2008). EWS/FLI1 suppresses retinoblastoma protein function and senescence in Ewing's sarcoma cells. *J Orthop Res* 26: 886-93.
546. Matsunobu T, Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, Li X, Oda Y, Naruse I, Hoshino H, Tsuneyoshi M, Miura H, Iwamoto Y.(2004). The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. *Clin Cancer Res* 10:1003-12.
547. Nakamura T, Tanaka K, Matsunobu T, Okada T, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, Iwamoto Y. (2007). The mechanism of cross-resistance to proteasome inhibitor bortezomib and overcoming resistance in Ewing's family tumor cells. *Int J Oncol* 31: 803-11.
548. Matsumoto S, Abe Y, Fujibuchi T, Takeuchi T, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Gyo K. (2004). Characterization of a MAPKK-like protein kinase TOPK. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 997-1004.
549. Zhu C, Lau E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzell E, Jiang W. (2006). Spatio-temporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6196-201.
550. Toretsky JA, Thakar M, Eskenazi AE, Frantz CN. (1999). Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Cancer Res* 59: 5745-50.
551. Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* 1: 287-92.
552. Lucas RE, Vlangos CN, Das P, Patel PI, Elsea SH. (2001). Genomic organisation of the approximately 1.5 Mb Smith-Magenis syndrome critical interval: transcription map, genomic contig, and candidate gene analysis. *Eur J Hum Genet* 9: 892-902.
553. Bi W, Yan J, Stankiewicz P, Park SS, Walz K, Boerkoel CF, Potocki L, Shaffer LG, Devriendt K, Nowaczyk MJ, Inoue K, Lupski JR. (2002). Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Res* 12: 713-28.
554. Kobe B, Kajava AV. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11: 725-32. Review.
555. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. (2008). NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 372-9. Review.

556. Wu M, Chen Q, Li D, Li X, Li X, Huang C, Tang Y, Zhou Y, Wang D, Tang K, Cao L, Shen S, Li G. (2008). LRRC4 inhibits human glioblastoma cells proliferation, invasion, and proMMP-2 activation by reducing SDF-1 alpha/CXCR4-mediated ERK1/2 and Akt signaling pathways. *J Cell Biochem* 103: 245-55.
557. Wu M, Huang C, Li X, Li X, Gan K, Chen Q, Tang Y, Tang K, Shen S, Li G. (2008). LRRC4 inhibits glioblastoma cell proliferation, migration, and angiogenesis by downregulating pleiotropic cytokine expression and responses. *J Cell Physiol* 214: 65-74.
558. Sauve GJ, Lipson KE, Chen ST, Baserga R. (1990). Sequence analysis of the human thymidine kinase gene promoter: comparison with the human PCNA promoter. *DNA Sequence* 1: 13-23.
559. Li HX, Lei DS, Wang XQ, Skog S, He Q. (2005). Serum thymidine kinase 1 is a prognostic and monitoring factor in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 13: 145-9.
560. Zhang J, Jia Q, Zou S, Zhang P, Zhang X, Skog S, Luo P, Zhang W, He Q. (2006). Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients. *Oncol Rep* 15: 455-61.
561. Fraser MM, Watson PM, Fraig MM, Kelley JR, Nelson PS, Boylan AM, Cole DJ, Watson DK. (2005). CaSm-mediated cellular transformation is associated with altered gene expression and messenger RNA stability. *Cancer Res* 65: 6228-36.
562. Streicher KL, Yang ZQ, Draghici S, Ethier SP. (2007). Transforming function of the LSM1 oncogene in human breast cancers with the 8p11-12 amplicon. *Oncogene* 26: 2104-14.
563. Yang ZQ, Streicher KL, Ray ME, Abrams J, Ethier SP. (2006). Multiple Interacting Oncogenes on the 8p11-p12 Amplicon in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 66: 11632-43.
564. Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, Caldas C. (2007). BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 67: 6725-36.
565. Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, Lee H, Field L, Zander K, Sibenaller Z, Ryken TC, Vibhakar R, Hood L, Madan A. (2006). Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. *Cancer Res* 66: 6665-74.
566. Alvarez E, Zhou W, Witta SE, Freed CR. (2005). Characterization of the Bex gene family in humans, mice, and rats. *Gene* 357: 18-28.

567. Ruggiero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 10: 484-6.
568. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428: 332-7.
569. Hernandez G, Vazquez-Pianzola P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* 122: 865-76.
570. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jiménez J, Guzmán M, Sabadell MD, Baselga J, Ramon y Cajal S.(2007). 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* 13: 81-9.
571. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramon y Cajal S. (2006). Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 107: 1801-11.
572. Bianchini A, Loiarro M, Bielli P, Busà R, Paronetto MP, Loreni F, Geremia R, Sette C. (2008). Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* Sep 22.
573. Pérez-Mancera PA, Bermejo-Rodríguez C, Sánchez-Martín M, Abollo-Jiménez F, Pintado B, Sánchez-García I. (2008). FUS-DDIT3 prevents the development of adipocytic precursors in liposarcoma by repressing PPARgamma and C/EBPalpha and activating eIF4E. *PLoS ONE* 3: e2569.
574. Armengol G, Rojo F, Castellví J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J, Ramón y Cajal S. (2007). 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 67: 7551-5. Review.
575. Wan X, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ.(2005). Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* 65: 2406-11.
576. Taberero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. (2008). Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 26: 1603-10.

577. Soni A, Akcakanat A, Singh G, Luyimbazi D, Zheng Y, Kim D, Gonzalez-Angulo A, Meric-Bernstam F. (2008). eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Mol Cancer Ther* 7: 1782-8.
578. Coles EG, Lawlor ER, Bronner-Fraser M. (2008). EWS-FLI1 causes neuroepithelial defects and abrogates emigration of neural crest stem cells. *Stem Cells* 26: 2237-44.
579. Burns JS, Abdallah BM, Shröder HD, Kassem M. (2008). The histopathology of a human mesenchymal stem cell experimental tumor model: support for an hMSC origin for Ewing's sarcoma? *Histol Histopathol* 23: 1229-40.
580. Kovar H, Bernard A. (2006). CD99-positive "Ewing's sarcoma" from mouse-bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells? *Cancer Res* 66: 9786.
581. Sjögren H, Meis-Kindblom JM, Orndal C, Bergh P, Ptaszynski K, Aman P, Kindblom LG, Stenman G. (2003). Studies on the molecular pathogenesis of extraskeletal myxoid chondrosarcoma-cytogenetic, molecular genetic, and cDNA microarray analyses. *Am J Pathol* 62:781-92.
582. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, Bhat K, McDonald JM, Yung WK, Colman H, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados MD, Chang SM, Barker FG 2nd, Buckner JC, James CD, Aldape K. (2007). Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol* 25: 2288-94.
583. Qin W, Zhu W, Schlatter L, Miick R, Loy TS, Atasoy U, Hewett JE, Sauter ER.(2007). Increased expression of the inflammatory protein YKL-40 in precancers of the breast. *Int J Cancer* 121: 1536-42.
584. Roslind A, Johansen JS, Christensen IJ, Kiss K, Balslev E, Nielsen DL, Bentzen J, Price PA, Andersen E. (2008). High serum levels of YKL-40 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck are associated with short survival. *Int J Cancer* 122:857-63.
585. Mylin AK, Abildgaard N, Johansen JS, Andersen NF, Heickendorff L, Standal T, Gimsing P, Knudsen LM. High serum YKL-40 concentration is associated with severe bone disease in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Eur J Haematol* 80: 310-7.

ABREVIATURAS

AAV- virus adeno asociados
A/N - apoptosis/necrosis
ADN - ácido desoxirribonucleico
ANT - transferencia nuclear alterada
APS- amonio persulfato
ARN - ácido ribonucleico
ARNi- ARN de interferencia
ARNm – ARN mensajero
ATCC- colección americana de cultivos celulares
ATP - adenosina trifosfato
AV - anexina V
BMPs - proteínas formadoras de hueso,
BMPC - células precursoras mesenquimales de la sangre
BSA - albúmina bovina sérica
CIP- fosfatasa alcalina intestinal de ternera
CGH- hibridación genómica comparada
ChIP - inmunoprecipitación de cromatina
DHL - enzima deshidrogenasa láctica
DMSO – dimetilsulfóxido
dsARN- ARN de doble cadena
DSB- ruptura de la doble hebra de ADN
ECACC - colección europea de cultivos tipo
EFST - Familia de los Sarcomas de Ewing
ESC- célula madre embrionaria (*embryonic stem cell*).
FACS- análisis por citometría de flujo
FBS- suero bovino fetal
FCS - suero de ternera fetal
FISH - hibridación fluorescente *in situ*
GIST- sarcoma del estroma gastrointestinal
HLH - hélice-giro-hélice
hMSC- célula madre mesenquimal humana
HR - recombinación homóloga
hTERT- subunidad de la telomerasa humana
IC - índice de combinación

IC50 - valor de la concentración de un determinado fármaco que induce una inhibición del 50% de la proliferación, apoptosis, fosforilación, etc.

IDA- Iodoacetamida

IHQ - inmunohistoquímica

IGF1 - factor de crecimiento similar a insulina

IGF1R - receptor del factor de crecimiento similar a insulina

IGFBP3 – proteína 3 de unión a IGF1

IPs – inhibidores de proteasas

IP – yoduro de propidio

IVT- transcripción *in vitro*

LMA - leucemia mieloide aguda

MAPK - proteína quinasa activada por mitógeno

MEF- fibroblastos embrionarios murinos

MFH - histiocitoma maligno fibroso

MHC – complejo mayor de histocompatibilidad

MPC- células progenitoras mesenquimales primarias

MPNST- tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos

MTT- análisis de proliferación celular

mTOR - proteína diana de la rapamicina de mamíferos

NB – neuroblastoma

NHEJ - unión de los extremos no homólogos

NIM- medio de inducción neural

NSE- enolasa específica neural

OMS- Organización Mundial de la Salud

ON - durante la noche (*over-night*)

PAAF - punción aspiración con aguja fina

PAS- ácido peryódico de Schiff

pb – pares de bases

PDGF- factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR - receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PET - tomografía por emisión de positrones

pI- punto isoeléctrico

PNET - tumor neuroectodérmico primitivo

PTGS - silenciamiento genético post-transcripcional

p/v – peso/volumen

PVDF- fluoruro de polivinilideno

RB - retinoblastoma

RFLP - análisis de los fragmentos de restricción de los productos de la PCR
RISC - complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RNA-induced silencing complex*)
RMN - resonancia magnética nuclear
rpm- revoluciones por minuto
RT-PCR - retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR- RT-PCR cuantitativa (en tiempo real)
SC-célula madre (*stem cell*)
SCF - factor de células madre
SCNT - transferencia nuclear somática celular
SD – desviación estandar
SDS-PAGE - dodecil sulfato sódico-poliacrilamida
SE - sarcoma de Ewing
SEE- sarcoma extraóseo de Ewing
shARNi- ARN de interferencia del tipo *short hairpin*
siARN - ARN de interferencia del tipo *small*
SKY- análisis espectral de los cariotipos
SMD - síndrome mielodisplásico
SSA- anillamiento de cadena sencilla
TA - temperatura ambiente
TAC - tomografía computarizada
TEMED- N,N,N,N'-tetrametilnediamina
T-EQ – tampón de equilibrado
TGF- β – factor de crecimiento transformante beta
TK - tirosina quinasa
VEGF - factor de crecimiento vascular endotelial
VIH- virus de la inmunodeficiencia humana
WB - western blotting