

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Efecto de la proteína EWS/FLI1 sobre
la expresión del gen
DICKKOPF-1 y la vía Wnt/ β -catenina
en sarcoma de Ewing**

Diego Navarro Vera

Madrid 2014

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Efecto de la proteína EWS/FLI1 sobre la expresión del gen
DICKKOPF-1 y la vía Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing**

Diego Navarro Vera
Licenciado en Biología y Bioquímica

Director de Tesis:
Dr. José Manuel González Sancho

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid
Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid

José Manuel González Sancho, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que Don **Diego Navarro Vera**, licenciado en Biología y Bioquímica por las
Universidades de Alcalá de Henares y Complutense de Madrid, respectivamente ha realizado
bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

**Efecto de la proteína EWS/FLI1 sobre la expresión del gen *DICKKOPF-1* y la vía Wnt/ β -
catenina en sarcoma de Ewing**

En mi opinión, éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la
originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de
optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.

Madrid, 21 de Mayo de 2014.

Dr. José Manuel González Sancho



Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC) con subvención del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2007-63038 y BFU2010-19659).

A mis padres, Inma y lab231

Parece que ya llega a su fin este largo y difícil camino de la Tesis... Es para mí un verdadero placer el poder expresar la infinita gratitud hacia aquellas personas que, de una manera u otra, me han ayudado durante mi trayectoria estos largos años...

En primer lugar, gracias al Prof. José Manuel González Sancho, por dirigir esta tesis, su inmensa paciencia con un joven ambicioso e inexperto en el mundo de la ciencia, gracias de corazón José por animarme y ayudarme tanto para la consecución de esta tesis, he aprendido mucho trabajando juntos y ha sido una cura de humildad para mí. Ha sido un placer aprender tu manera de trabajar y deleitarme con tu manera de redactar.

Quiero darle las gracias al Prof. Alberto Muñoz por haberme acogido en su laboratorio, ayudarme siempre en todo lo que le he pedido. Especialmente, gracias por tu capacidad de sacrificio y trabajo que hacen posible que las personas de tu laboratorio puedan dedicarse a sus respectivos trabajos de una manera despreocupada de todos los trámites administrativos y necesidades que conlleva el mantenimiento de un laboratorio.

Gracias Eva, fuiste mi primera compañera a pesar de que me querías romper las piernas durante las oposiciones jejeje.. me has enseñado a perfeccionar muchas técnicas, buenos consejos y me hiciste pasar los dos primeros años más agradables de mi estancia en el laboratorio, espero volver a coincidir contigo, sería un placer. Gracias Eva, muchas gracias, te mereces lo mejor.

Gracias a Teresa, no olvidaré nunca la primera vez que me dijiste "¡Diego! ¡Deja esto y ponte a hacer tus cosas de la tesis!" Te deseo de corazón lo mejor y que encuentres el camino de felicidad que todos buscamos.

Durante este período la colaboración con otros grupos nos ha permitido una adecuada realización del trabajo. Tuve la oportunidad de conocer a los Profs. Ángel Pestaña, Javier Alonso, cuya inestimable ayuda es responsable de las maravillosas RT-PCR cuantitativas y técnicas Bioinformáticas, quienes me enseñaron casi todo lo que ahora sé sobre sarcoma de Ewing. Gracias por ser un apoyo, por vuestra amable y fructífera colaboración en la consecución de esta tesis, gracias también a Noelia Agra, mi homóloga en este trabajo, gracias por tu esfuerzo, trabajo duro, simpatía y comprensión, te has portado genial conmigo, gracias Noe, te debo una. Gracias al Dr. Jaime Carrillo, por tu experiencia, trabajo, disposición incondicional y tu grata amistad que espero que dure, eres un tío grande no cambies.

El laboratorio 2.3.1 realmente es 2.3.1.2.5.1. Tengo que agradecer a la Dra. Benilde Jiménez y a José, vuestra ayuda, apoyo y consejo con los experimentos. Gracias Benilde por volcarte conmigo ante cualquier duda e inquietud.. y gracias José porque eres una buenísimaaaaaa y noble persona y haces que todos queramos ser como tú.

Gracias Tamara, Ascen, Lauro, Ángeles, Anabel, os llevaré en mi corazón.....ufffff.. supongo que en la vida cuando te juntas con personas maravillosas dejan huella y cuando las recuerdas te duele mucho no verlas tan a menudo, sólo me alivia pensar que les va bien y que algún día nuestros caminos se juntarán de nuevo.....no cambiéis.

Centrándonos en el 2.3.1., el laboratorio más acogedor del IIB, GRACIAS por ayudar a que los años que he trabajado con vosotros hayan sido los años más felices de mi vida, para mí ha sido como un sueño cumplido, GRACIAS Eva, Silvia, Noelia, Chus, Paloma, Toño, Fabio, Nati, Laura, Yaji, Pepa, Ester. Silvia, has sido una

buena compañera de cursos de doctorado, gracias por ayudarme en todo lo que te he pedido y por los consejos que me has dado, BONICAAA; Noelia, me gustaría tener tu ilusión por la vida y ser tan aventurera como tú, me has ayudado mucho, eres muy noble, gracias Noe por ser alguien en quien confiar y apoyarme, Chus, que voy a decir de Chus, nunca me ha ayudado, nunca me ha apoyado en todo, nunca ha estado a mi lado en momentos difíciles, nunca ha sido partícipe de que termine esta eterna tesis, nunca me ha aconsejado, en todo esto sobra la palabra NUNCA, no existe para ella esa palabra, lo que pueda decir de ti, sólo lo pueden oír los corazones y espero que el mío grite mucho en los años de amistad futuros.

Palomiii, cómo me has alegrado momentos, gracias por ser tan comprensiva conmigo, si no estabas en el labo parecía que faltaba algo, gracias por ayudarme en TODO, la próxima vez que haga una carrera miraré de vez en cuando hacia atrás ya que merece la pena conocer a gente como tú. Toño, siento no haber seguido tus consejos, pero me has dado tablas para las relaciones sociales, no pierdas nunca la ilusión que te caracteriza por la ciencia, trabajo duro, y agradecer a la gente, eres una BUENA PERSONA, te quiero tío. Fabio la alegría de la HUERTA, tu chiquitito está triste porque no te ve, gracias por alegrarme la vida, espero volver a verte, te debo una partida de squash, te deseo lo mejor. Nati, me he reído un montón contigo, ¡pero qué alegre que eres cabrona!, gracias por tu apoyo, comprensión, eres la más currante, nos das mil vueltas a todos, te echamos de menos GUAPAAA.. Laura, eres una amiga especial, gracias por tu apoyo, ha sido muy importante para mí te quiero mucho, espero que seas muy feliz en todo lo que te propongas, me alegro mucho cada vez que te veo, un BESAZOO. Yaji, gracias por toda tu ayuda y apoyo. Pepa, gracias por todos tus consejos técnicos, y por estar siempre disponible llueva, truene, estés ocupada o tengas 40 de fiebre, no cambies. Hola Ester “quintanilla”, pero qué aire fresco vino al labo, fuiste un subidón, un placer conocerte y escucharte, ¡eres la más grande GENTUZAAA!. Gemma la Novata, tu eres la que me espabila, la que me baja de las nubes, no hablas mucho pero cuando lo haces aciertas, he decidido acabar la tesis ya que no quería que me adelantaras, que tú ya casi la tienes, un besazoooo, un consejo ponte ya a escribirla que luego vienen los hijos....

Gracias a todas las personas que integráis los Servicios del IIB, porque nada funciona sin vosotros. Conchi me temo que voy a discutir.. un besazo a las chavalas de Genómica. Lucía “the best”

Gracias mama y papa por apoyarme siempre en mis metas, y os dedico la finalización de ésta, por todo lo que habéis trabajado por mí para que pueda cumplir mis sueños. Gracias hermanitos, espero no defraudaros y que siempre estéis orgullosos de mí. Gracias a mis suegros, cuñados y Ana por cederme parte de vuestro tiempo.

Inma, no tengo palabras, eres la llama que aviva mis esperanzas, mi apoyo incondicional, mi consejera y amiga, la mujer más buena que existe, soy muy afortunado de tenerte, gracias por ayudarme a conseguir mis sueños, gracias por seguir a mi lado, espero que algún día llegues a estar tan orgullosa de mí como yo lo estoy de ti Hijas, sois mi motor y por vosotras yo lucharé hasta el final.....y recordad:

”Todo lo que empecéis en la vida debéis terminarlo”

RESUMEN

Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing son tumores altamente agresivos que afectan principalmente a niños y adolescentes. Se caracterizan por translocaciones cromosómicas que generan proteínas de fusión entre EWS (o muy raramente FUS) y miembros de la familia ETS de factores de transcripción, que son capaces de transformar células. La actividad transformante de EWS/FLI1, la fusión más frecuente, parece residir en su capacidad para activar o reprimir genes diana específicos. Nosotros presentamos evidencias que demuestran que el inhibidor y, a la vez, gen diana de Wnt/ β -catenina, *DICKKOPF-1* (*DKK-1*), es una diana transcripcional de EWS/FLI1, que inhibe tanto su transcripción basal como la inducida por β -catenina y este efecto inhibitorio es independiente de la expresión de la proteína c-Myc. Además, nuestros datos indican que EWS/FLI1 tiene un efecto más general sobre la transcripción mediada por β -catenina/TCF, ya que bloquea la transcripción a partir de un promotor sintético con elementos de respuesta consenso para β -catenina/TCF. En consonancia, distintas líneas de Ewing que expresan diferentes translocaciones EWS/ETS apenas presentan actividad transcripcional β -catenina/TCF, mientras que el silenciamiento de EWS/FLI1 en células A673 y RD-ES de sarcoma de Ewing restaura su capacidad de respuesta a β -catenina. En este mismo sentido, el análisis bioinformático GSEA demostró un enriquecimiento en genes diana de β -catenina/TCF entre los genes reprimidos por EWS/FLI1 en la línea celular A673. Mecánicamente, los efectos inhibitorios de EWS/FLI1 pueden ser rescatados por una forma constitutivamente activa de TCF4 (TCF4-VP16). Además, EWS/FLI1 se une a LEF-1, un miembro de la familia TCF/LEF, e interfiere con su unión a β -catenina, lo que puede explicar su efecto negativo sobre la transcripción mediada por β -catenina/TCF. Nuestros resultados demuestran que EWS/FLI1 inhibe tanto la expresión de *DKK-1*, como la transcripción dependiente de β -catenina/TCF, lo que podría contribuir a la progresión de los tumores de la familia del sarcoma de Ewing.

SUMMARY

Tumours of the Ewing family, which comprise Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumours, are highly aggressive and mostly affect children and adolescents. They are characterized by chromosomal translocations leading to the generation of fusion proteins between EWS (or very rarely FUS) and members of the ETS family of transcription factors that are capable of transforming cells. EWS/FLI1, the most frequent fusion, is thought to cause transformation through activation or repression of specific target genes. We present evidence demonstrating that the Wnt inhibitor and β -catenin/TCF responsive gene *DICKKOPF-1* (*DKK-1*) is a transcriptional target of EWS/FLI1, which can inhibit both basal and β -catenin-induced transactivation of the *DKK-1* promoter and this inhibitory effect is independent of c-Myc protein expression. Moreover, our data indicate that EWS/FLI1 has a more general effect on β -catenin/TCF-mediated transcription, since it can block transactivation of a consensus β -catenin/TCF reporter construct. Consistently, Ewing tumour cells expressing different EWS/ETS translocations cannot engage β -catenin/TCF-dependent transcription, while silencing of EWS/FLI1 restores β -catenin responsiveness in A673 and RD-ES Ewing tumour cells. Accordingly, gene set enrichment analysis shows that β -catenin/TCF target genes were significantly enriched among those genes downregulated by EWS/FLI1 in the Ewing cell line A673. Mechanistically, the inhibitory effect of EWS/FLI1 can be overcome by a constitutively active TCF4 protein (TCF4-VP16). Moreover, EWS/FLI1 binds LEF-1, a TCF family member, and interferes with its binding to β -catenin, which could explain its negative effect on β -catenin/TCF-mediated transcription. Our results show that EWS/FLI1 inhibits both *DKK-1* expression as well as β -catenin/TCF-dependent transcription which could contribute to progression of tumours of the Ewing family.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	23
1. Sarcoma de Ewing.....	25
1.1. Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing.....	25
1.1.1. Histología y epidemiología.....	25
1.1.2. Origen celular de los tumores de la familia del sarcoma de Ewing.....	25
1.1.3. Diagnóstico molecular y estrategias terapéuticas.....	27
1.2. Características moleculares y funcionales de los factores de transcripción quiméricos EWS/ETS.....	29
1.2.1. La proteína EWS.....	30
1.2.2. El factor de transcripción FLI1.....	31
1.2.3. El factor de transcripción quimérico EWS/FLI1.....	32
1.3. Genes diana del factor de transcripción EWS/FLI1.....	34
2. El gen <i>DICKKOPF-1(DKK-1)</i> y la vía Wnt/ β -catenina.....	36
2.1. La vía Wnt/ β -catenina.....	36
2.2. Inhibidores de la vía Wnt/ β -catenina.....	39
2.3. Estructura de la familia Dickkopf.....	40
2.4. Papel de la familia Dickkopf en la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina.....	41
2.5. Regulación de la expresión del gen <i>DICKKOPF-1</i>	41
OBJETIVOS	43
Objetivos concretos.....	45
MATERIALES Y METODOS	47
1. Materiales.....	49
1.1. Cultivos celulares.....	49
1.2. Plásmidos.....	50
1.3. Anticuerpos.....	51
1.4. Oligonucleótidos.....	51
2. Métodos.....	53
2.1. Análisis de perfiles de expresión génica mediante <i>microarrays</i>	53
2.2. Ensayos de transactivación.....	53
2.3. Extracción de ARN total y RT-PCR cuantitativa.....	53
2.4. Co-inmunoprecipitación de proteínas e inmunotransferencia (<i>Western blot</i>).....	54
2.5. Obtención de medios condicionados.....	55
2.6. Mutagénesis dirigida.....	55
2.7. Inmunofluorescencia.....	55

2.8. Análisis estadístico.....	56
RESULTADOS	57
1. Efectos de EWS/FLI1 sobre la vía Wnt/ β -catenina y sus genes diana.....	59
1.1. EWS/FLI1 reprime la expresión del gen <i>DICKKOPF-1</i>	59
1.2. EWS/FLI1 inhibe la transcripción del gen <i>DICKKOPF-1</i> mediada por el complejo β -catenina/TCF.....	64
1.3. EWS/FLI1 inhibe la actividad transcripcional mediada por el complejo β -catenina/TCF.....	66
1.4. La expresión de una forma constitutivamente activa de TCF4 rescata la actividad transcripcional β -catenina/TCF en células de sarcoma de Ewing.....	70
2. Mecanismo de inhibición de la vía Wnt/ β -catenina mediado por EWS/FLI1.....	72
2.1. EWS/FLI1 no interfiere con el transporte de β -catenina al núcleo.....	72
2.2. El proto-oncogén <i>c-MYC</i> inhibe la expresión del gen <i>DICKKOPF-1</i> de forma independiente de EWS/FLI1.....	76
2.3. EWS/FLI1 interfiere con la formación del complejo β -catenina/LEF-1.....	78
DISCUSIÓN	83
1. Efectos de EWS/FLI1 sobre la ruta Wnt/ β -catenina y sus genes diana.....	85
1.1. El gen <i>DICKKOPF-1</i> es una diana transcripcional de EWS/FLI1.....	85
1.2. La vía Wnt/ β -catenina es constitutivamente reprimida por EWS/FLI1 en células de ESFT.....	86
1.3. EWS/FLI1 inhibe la vía Wnt/ β -catenina antes de la unión de los factores TCF/LEF a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes diana	87
2. Mecanismo de inhibición de la vía Wnt/ β -catenina mediado por EWS/FLI1.....	87
2.1. EWS/FLI1 no interfiere con el transporte de β -catenina al núcleo.....	87
2.2. EWS/FLI1 no inhibe la expresión del gen <i>DICKKOPF-1</i> a través de c-Myc.....	88
2.3. EWS/FLI1 interfiere con la formación del complejo β -catenina/LEF-1.....	89
3. El gen <i>DICKKOPF-1</i> y la vía Wnt/ β -catenina en el contexto del sarcoma de Ewing.....	90
3.1. Relevancia de la inhibición del gen <i>DICKKOPF-1</i> en el sarcoma de Ewing.....	90
3.2. Relevancia de la represión de la transcripción dependiente de β -catenina/TCF en el sarcoma de Ewing.....	91
3.2.1. Diferenciación y origen celular del sarcoma de Ewing: EWS/FLI1 y vía Wnt/ β -catenina.....	92
3.3. Papel de LEF-1 en sarcoma de Ewing.....	95
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFIA	101
ANEXOS	129

Abreviaturas

APC:	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATA:	Dominio de activación transcripcional amino-terminal
CK1:	Caseína quinasa 1
CTA:	Dominio de activación transcripcional carboxilo-terminal
DBD:	Dominio de unión al ADN
DHR	Repeticiones de hexapéptidos degenerados
Dkk/DKK:	Dickkopf/DICKKOPF (en mayúsculas y cursiva hace referencia al gen)
DKKL1:	Proteína similar a DKK (<i>dickkopf-like protein</i>) 1, también conocida como <i>soggy</i>
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EAD:	Dominio de transactivación (<i>enhancer activation domain</i> en EWS)
EBS:	Sitio de unión de factores ETS (en el ADN)
ES:	Sarcoma de Ewing
ESFT:	Tumores de la familia del sarcoma de Ewing
EWS/FLI1:	Proteína de fusión entre EWS y FLI1
EWSR1:	Gen que codifica la proteína EWS
FBS:	Suero fetal bovino
FLI1:	<i>Friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
GSEA:	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GSK3β:	Glucógeno sintasa quinasa 3β
HAT:	Acetil transferasa de histonas
HDACs:	Desacetilasa de histonas
HDI:	Inhibidor de la actividad desacetilasa de histonas
HMT:	Metil transferasa de histonas
hTERT:	Transcriptasa inversa de la telomerasa humana
ICAM-1:	molécula de adhesión intercelular -1
ICN:	Fragmento intracelular de Notch

IGF-1 :	Factor de crecimiento similar a la insulina -1
IGFBP-3:	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina -3
IMDM:	Medio Dulbecco modificado por Iscove
JNK:	Quinasa amino-terminal de c-Jun
LEF-1:	Factor de transcripción de células linfoides (<i>Lymphoid enhancer-binding factor -1</i>)
LRP:	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
Luc:	Gen de la luciferasa de luciérnaga
MMP:	Metaloproteasa de matriz extracelular
MSC:	Células troncales mesenquimales
NB:	Neuroblastoma
NGFR:	Receptor del factor de crecimiento nervioso
ORF:	Pauta/Marco de lectura abierta
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC:	Complejo de preiniciación
PNET:	Tumores neuroectodérmicos primitivos
rLDL:	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
RLuc:	Gen de la luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
RMS:	rabdomiosarcoma
RRM:	Motivo de reconocimiento de ARN
SD:	Desviación estándar
SFRP:	Proteína secretada relacionada con Frizzled
TAFII68:	Factor II68 asociado con la proteína de unión a la caja TATA
TBP:	Proteína de unión a la caja TATA
TCF:	Factor de células T
TGFR:	Receptor del factor de crecimiento transformante

TGFβ:	Factor de crecimiento transformante tipo β
TLS/FUS:	<i>Translocated in Liposarcoma/Fusion</i>
TNF:	Factor de necrosis tumoral
UV:	Ultravioleta
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WIF1:	Factor inhibidor de Wnt -1
WRE:	Elemento de respuesta a Wnt (CCTTTGA/TA/T)

Introducción

1. SARCOMA DE EWING

1.1. LOS TUMORES DE LA FAMILIA DEL SARCOMA DE EWING

1.1.1. Histología y epidemiología

Descritos por primera vez por James Ewing en 1921 (Ewing J, 2006) los sarcomas de Ewing (ES: *Ewing's sarcomas*) constituyen junto con los tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) y los tumores de Askin, los tumores de la familia del sarcoma de Ewing (ESFT: *Ewing's sarcoma family tumors*). El sarcoma de Ewing es el segundo tumor óseo maligno más común, después del osteosarcoma, representando un 10-15% de todos los tumores primarios de hueso (Triche TJ, 1988). Estos sarcomas pueden afectar a cualquier hueso, manifestándose como masas destructivas asociadas más frecuentemente a la pelvis, los huesos largos de las extremidades inferiores y los huesos de la pared torácica (Grier HE, 1997). Sólo en el 15 % de los pacientes, el sarcoma de Ewing se encuentra en tejidos blandos sin aparente asociación a tejido óseo (Arvand A *et al.*, 2001; Javery O *et al.*, 2011).

La edad de diagnóstico más frecuente es la segunda década de vida, con una incidencia de 3 casos por millón de individuos menores de 15 años, aunque un 20-30% de los casos son diagnosticados en la primera década (Paulussen M *et al.*, 2001). No es frecuente en menores de 5 años o mayores de 40, y su frecuencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (proporción 3:2) (Khoury JD, 2005), y en la población europea con respecto a la asiática o africana (Stiller CA y Parkin DM, 1996; Zucman-Rossi J *et al.*, 1997). A nivel histológico, los sarcomas de Ewing son tumores malignos caracterizados por la presencia de capas de células pequeñas, redondas, uniformes, agrupadas densamente, con núcleo redondo libre de nucleolo, y muy indiferenciadas (Machado I *et al.*, 2013).

1.1.2. Origen celular de los tumores de la familia del sarcoma de Ewing

En 1983, Aurias y colaboradores descubrieron la presencia de translocaciones cromosómicas características de los ESFT (Turc-Carel C *et al.*, 1983; Aurias A *et al.*, 1984; Delattre O *et al.*, 1994). Estas alteraciones cromosómicas, que veremos en detalle en los apartados siguientes, y que dan lugar a proteínas de fusión con propiedades oncogénicas (EWS/FLI1, EWS/ERG, etc. Ver [Tabla 1](#)), están consideradas el primer evento mutacional que da origen a los ESFT (Teitell MA *et al.*, 1999; Lessnick SL *et al.*, 2002; Rorie CJ *et al.*, 2004; Hu-Lieskovan S *et al.*, 2005a). El tipo de translocación más frecuente, t(11;22)(q24;q12), da lugar a la fusión de los primeros 264 aminoácidos amino terminales de la proteína EWS con los 232 aminoácidos

carboxilo terminales de la proteína FLI1, generándose la proteína quimérica EWS/FLI1 (Figura 1). Varios grupos han demostrado que existe una relación estrecha entre el fenotipo tumoral y esta translocación cromosómica, ya que la expresión de la proteína de fusión EWS/FLI1 en fibroblastos y células tumorales humanas induce un fenotipo que es reminiscente de ESFT, incluyendo la histología, el patrón de tinción inmunohistoquímica y el perfil de expresión génica (May WA *et al.*, 1993a; May WA *et al.*, 1993b; Kovar H *et al.*, 1996).

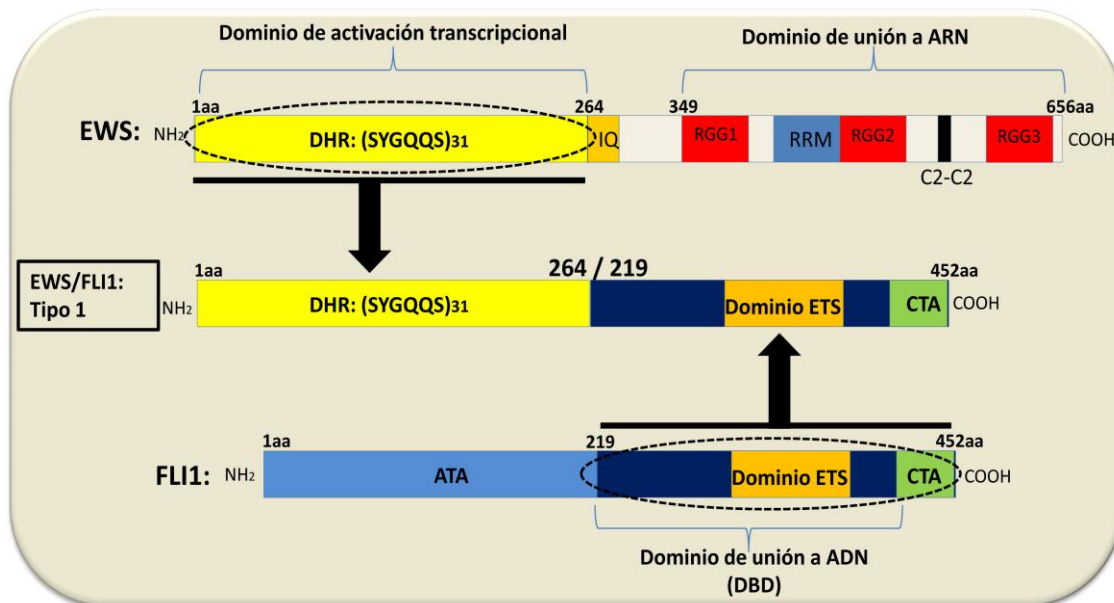


Figura 1: Características estructurales de la proteína quimérica EWS/FLI1 y de las proteínas nativas de las que se origina. EWS: El dominio amino terminal de EWS comprende 264 aminoácidos, con 31 repeticiones de hexapéptidos degenerados (DHR: *degenerate hexapeptide repeats*). Las estructuras secundarias de este dominio (T-L-T/S-T-S) tienen funciones de activación y regulatorias, siendo responsables de interacciones proteína-proteína. El dominio carboxilo terminal de EWS contiene 87 aminoácidos conservados que conforman el motivo de reconocimiento de ARN (RRM: *RNA recognition motif*), característico de las proteínas que se unen al ARN. Además, contiene un número de repeticiones arginina-glicina-glicina (RGG) y un dedo de zinc (C2-C2) que también parecen facilitar la unión a ácidos nucleicos de cadena simple. FLI1: Es un factor transcripcional típico, con la región de transactivación en el extremo amino terminal, (ATA: *amino-terminal transcriptional activation domain*), y un dominio de unión a ADN tipo ETS específico de secuencia en su extremo carboxilo terminal (DBD: *DNA Binding Domain*). También posee un dominio de activación carboxilo terminal rico en prolinas (CTA: *carboxy-terminal transcriptional activation domain*). EWS/FLI1: La translocación cromosómica t(11;22)(q24;q22) en ESTF conlleva la fusión del extremo amino terminal de EWS con el extremo carboxilo terminal de FLI1, generándose la proteína de fusión EWS/FLI1.

La naturaleza de la célula precursora de los ES permanece desconocida (Jedlicka P, 2010). En 1921, el Dr. Ewing sugirió un origen endotelial (Ewing J, 2006), pero desde entonces se han propuesto diferentes orígenes, incluyéndose el hematopoyético, fibroblástico, neuroectodérmico y mesenquimal (Owen LA y Lessnick SL, 2006). La hipótesis más clásica sugiere que los sarcomas de Ewing derivan de células pluripotenciales de la cresta neural ya que presentan características de neuronas colinérgicas parasimpáticas como la expresión de

catecol-acetil-transferasa (implicada en la biosíntesis de neurotransmisores en nervios colinérgicos) o enolasa específica de neuronas (Khoury JD, 2005). Además, ciertas líneas celulares derivadas de los ESFT tienen la capacidad de formar dendritas en respuesta a agentes diferenciadores, y presentan un perfil de expresión génica similar al de las células derivadas de la cresta neural (Cavazzana AO *et al.*, 1987; O'Regan S *et al.*, 1995; Staeger MS *et al.*, 2004). Así pues, la expresión de marcadores neuronales en tumores de Ewing apuntaría a un origen potencialmente neuroectodérmico.

Sin embargo, estudios recientes muestran que los transcriptomas de varias líneas celulares de sarcoma de Ewing que tienen silenciado el gen EWS/FLI1 presentan gran similitud con perfiles de expresión génica propios de células troncales mesenquimales (MSC: *mesenchymal stem cells*), colocando a estas células como las grandes candidatas a ser las precursoras de las células de sarcoma de Ewing (Hancock JD y Lessnick SL, 2008; Monument MJ *et al.*, 2013). Según esta hipótesis, la expresión de EWS/FLI1 bloquearía la capacidad de diferenciación de la MSC abonando el terreno para futuros eventos mutacionales. En este sentido, el silenciamiento de EWS/FLI1 en células de ES conlleva la reexpresión de marcadores de MSC (CD44, CD54, CD59 y CD73) y las capacita para diferenciarse hacia cualquiera de los tres linajes mesenquimales principales (adipocitos, osteoblastos y condrocitos) (Tirode F *et al.*, 2007). Por otro lado, la expresión de EWS/FLI1 en MSC humanas, induce la expresión de genes específicos de células de ESFT (Riggi N *et al.*, 2008). También, la expresión ectópica de EWS/FLI1 o EWS/ERG en MSC derivadas de médula ósea induce la re-expresión de marcadores característicos de células de ESFT, como CD54 (ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule-1*), CD99 (MIC2), CD117 (KIT) y CD271 (NGFR: *Nerve growth factor receptor*), además de mostrar un fenotipo similar al observado en las células de ESFT (Miyagawa Y *et al.*, 2008).

1.1.3. Diagnóstico molecular y estrategias terapéuticas

Debido a la ausencia de características morfológicas diferenciales, el diagnóstico de los tumores de Ewing mediante técnicas histopatológicas presenta ciertas dificultades. Como marcadores inmunohistoquímicos utilizados cabe destacar la glicoproteína transmembrana MIC2/CD99 (Kovar H *et al.*, 1990; Perlman EJ *et al.*, 1994; Parham DM *et al.*, 1999), presente en aproximadamente un 95-100% de los casos (Fellinger EJ *et al.*, 1991; Ramani P *et al.*, 1993; Weidner N y Tjoe J, 1994). Este marcador, sin embargo, se expresa también en elevadas cantidades en otros tumores, incluyendo algunos tumores de células pequeñas, redondeadas y azules, tales como los osteosarcomas de células pequeñas, los sarcomas sinoviales y algunos

rabdomiosarcomas, y por lo tanto no es un marcador específico de los tumores de Ewing (Hibshoosh H y Lattes R, 1997; Folpe AL *et al.*, 2000).

El descubrimiento de la presencia de translocaciones cromosómicas características de los ESFT en 1983, ha permitido desde entonces realizar un diagnóstico definitivo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o RT-PCR (Aurias A *et al.*, 1983; Turc-Carel C *et al.*, 1983; Delattre O *et al.*, 1994; Machado I *et al.*, 2013).

Los ESFT se tratan tradicionalmente con una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia (Meyers PA y Levy AS, 2000; Weber KL, 2002; Rodriguez-Galindo C *et al.*, 2003). Los tratamientos quimioterápicos se basan en la administración de vincristina, ciclofosfamida (ifosfamida) y actinomicina D, combinada en algunos casos con doxorubicina o etopósido (West DC, 2000; Juergens C *et al.*, 2006; Dai X *et al.*, 2011; Potratz J *et al.*, 2012). Además, se están evaluando distintas estrategias como abordajes terapéuticos, entre los que destacan:

- La inhibición de la expresión de la proteína de fusión EWS/FLI1 mediante técnicas de ARN de interferencia o similares (Ouchida M *et al.*, 1995; Kovar H *et al.*, 1996; Tanaka K *et al.*, 1997; Toretsky JA *et al.*, 1997; Yi H *et al.*, 1997; Lambert G *et al.*, 2000; Prieur A *et al.*, 2004; Hu-Lieskovan S *et al.*, 2005a; Siligan C *et al.*, 2005). Esta es una estrategia prometedora, cuya aplicación clínica requiere el desarrollo de tecnologías más seguras y efectivas.
- La rapamicina, una molécula pequeña empleada para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos, bloquea eficientemente la proliferación de las líneas celulares de ESFT, causando una parada del ciclo celular en G1 y una disminución en los niveles de EWS/FLI1, restaurándose los niveles de ARN mensajero del receptor de TGF β tipo 2, inhibido por EWS/FLI1 (Mateo-Lozano S *et al.*, 2003; Mateo-Lozano S *et al.*, 2006).
- Inhibidores de la ruta autocrina del factor de crecimiento IGF-1: anticuerpos dirigidos contra el receptor de IGF-1 (IGF-1R) como IMC-A12, SCH 717454 o figitumumab, que se están analizando en ensayos clínicos (Kolb EA *et al.*, 2008; Olmos D *et al.*, 2010a; Olmos D *et al.*, 2010b) o inhibidores de su actividad tirosina quinasa como NVP-AEW541 o NVP-ADW742 (Benini S *et al.*, 2001).
- Estrategias terapéuticas que inducen la apoptosis como el bloqueo con anticuerpos monoclonales de la proteína de superficie CD99 (que se expresa en cantidades

elevadas en las células de ESFT) (Kovar H *et al.*, 1990; Scotlandi K *et al.*, 2006; Rocchi A *et al.*, 2010), la inhibición de metaloproteinasas de matriz extracelular (induce la apoptosis mediada por FAS) (Mitsiades N *et al.*, 1999) o bien mediante el uso de interferón- β (Sanceau, Hiscott *et al.* 2000) o de antagonistas de los receptores de Colecistoquinina, como el Devazepide (Carrillo J *et al.*, 2009).

- El anticuerpo anti-VEGF humanizado, bevacizumab, y ciertos compuestos que bloquean la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF, podrían usarse en el tratamiento de los ESFT (Ferrara N, 2002; Ahmed SI *et al.*, 2004; Holden SN *et al.*, 2005; Minniti G *et al.*, 2009; Tkaczuk KH, 2009; Bonomi P, 2010). La disminución de la angiogénesis mediante la inhibición de la señalización inducida por VEGF se ha visto que reduce el potencial oncogénico de las líneas celulares de ESFT (Guan H *et al.*, 2005b).

1.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y FUNCIONALES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUIMÉRICOS EWS/ETS

El gen *EWSR1* (*Ewing Sarcoma RNA-binding protein 1*), pertenece a la familia TET, y en los ESFT aparece fusionado a cinco genes diferentes que codifican factores de transcripción de la familia *ETS* (*FLI1*, *ERG*, *FEV*, *E1AF* y *ETV1*), aunque en el 90-95% de los casos interviene *FLI1* (*Friend Leukaemia Integration 1*) (Delattre O *et al.*, 1994; Mackintosh C *et al.*, 2010). También se ha descrito la fusión entre el gen *TLS/FUS* (*Traslocated in Liposarcoma/Fusion*), perteneciente a la misma familia que *EWSR1*, y el gen que codifica el factor de transcripción ERG (Shing DC *et al.*, 2003) (Tabla 1).

En todos estos casos ocurre una fusión entre el extremo amino-terminal de la proteína EWS (o TLS/FUS) y el extremo carboxilo-terminal del factor de transcripción ETS implicado (Zucman J *et al.*, 1993; Zoubek A *et al.*, 1994; Zoubek A *et al.*, 1996). Además de las distintas combinaciones posibles de fusión entre genes, existe una heterogeneidad adicional en relación a los exones que cada gen aporta en la translocación, lo que se traduce en distintas combinaciones de exones entre EWS y FLI1 (o ERG). Además de la más común, la tipo I, que se da entre el exón 7 de EWS y el exón 6 de FLI1 (Figura 1) hay, al menos, 12 tipos distintos más de fusiones EWS/FLI1 y, al menos, 4 EWS/ERG (Zucman J *et al.*, 1993; Zoubek A *et al.*, 1994; Zoubek A *et al.*, 1996). Las características funcionales de estos factores de transcripción quiméricos van a depender de los dominios aportados por cada gen (Figura 1). A continuación se describen brevemente las características moleculares de las proteínas implicadas.

Tabla 1: Tipos de translocaciones y proteínas quiméricas que generan, identificadas en los tumores de la familia del sarcoma de Ewing

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

1.2.1. La proteína EWS

Es una proteína de 656 aminoácidos, que pertenece a la familia TET de proteínas de unión a ARN en la que también se incluyen las proteínas TLS/FUS y TAFII68 (*human TBP (TATA binding protein) Associated Factor II68*). Estas tres proteínas tienen en común la presencia de un dominio de 87 aminoácidos (exones 11 al 13), en el extremo carboxilo terminal, que se une al ARN (RRM: *RNA recognition motif*) (Ohno T *et al.*, 1994; Prasad DD *et al.*, 1994; Lessnick SL *et al.*, 1995; Bertolotti A *et al.*, 1996; Zinszner H *et al.*, 1997) y parece estar implicado en la regulación de la transcripción y/o procesamiento del mismo (Figura 1). Además, presentan tres motivos arginina-glicina-glicina (RGG1, RGG2, RGG3) que también parecen facilitar su unión al ARN (Kim J y Pelletier J, 1999).

En la región amino-terminal, EWS presenta un dominio de activación transcripcional (EAD: *Enhancer activation domain*), que formará parte de las fusiones EWS/ETS, rico en residuos de glutamina, serina y tirosina, agrupados en 31 motivos polipeptídicos degenerados de secuencia SYGQQSX (DHR: *degenerate hexapeptide repeats*) que comparten homología con dominios de la ARN polimerasa II eucariota, con la que EWS puede interactuar, en concreto, con la subunidad hsRBP7 (Petermann R *et al.*, 1998). También a través de este dominio de activación, se han descrito interacciones con el represor transcripcional/factor de *splicing* ZFM1/SF1 (Zhang D *et al.*, 1998). Además, los residuos 258-280 contienen un dominio IQ, un motivo regulador originariamente identificado en la proteína neuromodulina (Alexander KA *et al.*, 1988), que está involucrado en la unión a calmodulina (Deloulme JC *et al.*, 1997). Por todos estos datos, también se le atribuye la función de factor transcripcional (May WA *et al.*, 1993b; Ohno T *et al.*, 1993; Bailly RA *et al.*, 1994; Mao X *et al.*, 1994).

La proteína EWS se localiza en el núcleo, pero existen evidencias bioquímicas de su presencia en el citosol y membrana plasmática (Felsch JS *et al.*, 1999; Belyanskaya LL *et al.*, 2001; Pahlich S *et al.*, 2008; Leemann-Zakaryan RP *et al.*, 2009). Su función biológica precisa se desconoce, aunque algunos autores han sugerido que el gen *EWSR1* es un gen de mantenimiento general (*housekeeping*, Plougastel B *et al.*, 1993) ya que su promotor es rico en GCs y carece de caja TATA; además se expresa de forma ubicua durante todo el ciclo celular y su ARN mensajero tiene una vida media larga. También se le atribuye la participación en el *splicing* del pre-ARN mensajero (Yang L *et al.*, 2000) y en la exportación del ARN mensajero al citoplasma (Hallier M *et al.*, 1998; Zhang D *et al.*, 1998; Knoop LL y Baker SJ, 2000; Yang L *et al.*, 2000; Lerga A *et al.*, 2001).

1.2.2. El factor de transcripción FLI1

La familia de factores de transcripción ETS está formada por un número elevado de proteínas que han sido implicadas en el control de la proliferación celular, la diferenciación, la hematopoyesis, la apoptosis, la metástasis, la angiogénesis y la transformación tumoral (Dittmer J y Nordheim A, 1998; Oikawa T, 2004; Seth A y Watson DK, 2005).

Estos factores de transcripción tienen en común un dominio de unión a ADN (DBD: *DNA Binding Domain*) formado por 85 aminoácidos altamente conservados (Figura 1), que se unen específicamente a la secuencia de ADN, GGAA/T (EBS, *Ets Binding Site*) (Donaldson LW *et al.*, 1994; Truong AH y Ben-David Y, 2000). La secuencia del DBD y los nucleótidos que flanquean el sitio EBS influyen en la afinidad y especificidad de unión de estos factores al ADN (Graves BJ y Petersen JM, 1998) existiendo diferente especificidad de unión entre los distintos miembros de la familia. La proteína FLI1 posee además un dominio de transactivación amino terminal (ATA: *amino-terminal transcriptional activation domain*), y otro carboxilo terminal rico en prolina (CTA: *carboxy-terminal transcriptional activation domain*) (Figura 1). Ambos dominios contribuyen a la actividad transcripcional mediada por la proteína FLI1 (Rao VN *et al.*, 1993).

FLI1 es una proteína de localización nuclear, que durante el desarrollo embrionario temprano se expresa en células de la cresta neural; más tardíamente, se expresa además en el endotelio vascular y en los precursores de las células sanguíneas y, por último, en el adulto, su expresión está restringida principalmente a células hematopoyéticas (Meyer D *et al.*, 1993; Melet F *et al.*, 1996; Mager AM *et al.*, 1998; Brown LA *et al.*, 2000).

1.2.3. El factor de transcripción quimérico EWS/FLI1

La translocación cromosómica t(11;22)(q24;q12) entre los genes *EWSR1* y *FLI1* caracteriza molecularmente la mayoría de los ESFT. Los primeros 264 aminoácidos de la proteína EWS se fusionan con los 232 aminoácidos carboxilo terminales de la proteína FLI1, donde reside su dominio de unión a ADN (Figura 1). Como consecuencia, el dominio de transactivación amino-terminal (ATA) del factor de transcripción FLI1, es reemplazado por la región amino terminal de EWS que, como hemos visto, también contiene un dominio de transactivación (EAD). Este intercambio convierte a EWS/FLI1 en un potente activador transcripcional (May WA *et al.*, 1993b; Ohno T *et al.*, 1993; Bailly RA *et al.*, 1994; Mao X *et al.*, 1994), incluso más potente que FLI1, a pesar de que ambas proteínas muestran la misma afinidad y especificidad de unión al ADN (May WA *et al.*, 1993a; May WA *et al.*, 1993b; Ohno T *et al.*, 1993; Bailly RA *et al.*, 1994; Mao X *et al.*, 1994; Lessnick SL *et al.*, 1995).

La proteína de fusión EWS/FLI1 presenta actividad oncogénica ya que es capaz de transformar fibroblastos de ratón inmortalizados NIH3T3, pudiendo estas células transfectadas formar colonias en medio semisólido, ser capaces de formar tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos y presentar características histológicas similares a las de los ESFT (May WA *et al.*, 1993a; May WA *et al.*, 1993b; Lessnick SL *et al.*, 1995; Ouchida M *et al.*, 1995; Kovar H *et al.*, 1996; Tanaka K *et al.*, 1997; Yi H *et al.*, 1997; Teitell MA *et al.*, 1999; Thompson AD *et al.*, 1999). Sin embargo, EWS y FLI1 por sí solos, no son capaces de transformar estas células (May WA *et al.*, 1993a).

Se ha propuesto que EWS/FLI1 actúa como un factor de transcripción aberrante que induciría/reprimiría la expresión de genes de manera descontrolada, causando así la transformación oncogénica de las células diana (Delattre O *et al.*, 1992; May WA *et al.*, 1993a; May WA *et al.*, 1993b; Lessnick SL *et al.*, 1995; Hancock JD y Lessnick SL, 2008).

Por otro lado, la transfección de una construcción dominante negativa de FLI1 en líneas celulares de ESFT inhibe su crecimiento, y la introducción de vectores de expresión de ARN antisentido de EWS/FLI1 o el tratamiento de líneas de ESFT con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra EWS/FLI1 disminuye su tasa de crecimiento, como consecuencia de una acumulación de las células en fase G1, un incremento de su susceptibilidad a la apoptosis, la inhibición de su capacidad para crecer independientemente de anclaje y la prevención de la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos (Ouchida M *et al.*, 1995; Kovar H *et al.*, 1996; Tanaka K *et al.*, 1997; Toretsky JA *et al.*, 1997; Yi H *et al.*, 1997; Lambert G *et al.*, 2000; Prieur A *et al.*, 2004; Hu-Lieskovan S *et al.*, 2005a; Siligan C *et al.*, 2005).

Las mutaciones que interfieren con la capacidad de unión al ADN de EWS/FLI1 reducen o eliminan su potencial transformante (May WA *et al.*, 1993a; Jaishankar S *et al.*, 1999) y como además, hasta la fecha, no se ha identificado ningún ESFT que presente una proteína EWS/FLI1 con el dominio de unión a ADN defectuoso, se asume que la unión al ADN es esencial para la capacidad oncogénica de EWS/FLI1 en humanos. Igualmente importante para el mantenimiento de sus propiedades oncogénicas es la capacidad de EWS/FLI1 para activar la transcripción a través del dominio amino terminal de EWS (May WA *et al.*, 1993a; Ohno T *et al.*, 1993; Bailly RA *et al.*, 1994; Mao X *et al.*, 1994). De hecho, la delección de este dominio de transactivación reduce drásticamente el potencial oncogénico de EWS/FLI1 (Lessnick SL *et al.*, 1995).

Se han descrito además otras características de EWS/FLI1 que podrían afectar a su potencial oncogénico y que son independientes de su unión al ADN. Por ejemplo, la proteína EWS/FLI1, localizada en el núcleo, interacciona con el factor de splicing U1C y con las subunidades mayor hiperfosforilada y hsRPB7 de la ARN polimerasa II (Petermann R *et al.*, 1998; Yang L *et al.*, 2000). Mediante estas interacciones, la proteína EWS/FLI1 podría afectar al *splicing* acoplado a la elongación de la transcripción (Knoop LL y Baker SJ, 2000; Yang L *et al.*, 2000; Knoop LL y Baker SJ, 2001). Por otro lado, EWS/FLI1 podría favorecer la tumorigénesis mediante su interacción física con la proteína BARD1 (Spahn L *et al.*, 2002) o con el complejo BARD1/BRCA1, que actúa como una ubiquitín ligasa (Irminger-Finger I y Leung WC, 2002), inhibiendo su papel en la reparación del ADN (Narod SA y Foulkes WD, 2004). Además, en los ESFT, el gen EWS está en hemicigosis, ya que uno de los alelos de EWS se inactiva como consecuencia de la translocación, pudiendo la reducción de dosis de este gen contribuir al desarrollo de estos tumores (Aman P *et al.*, 1996; Kovar H *et al.*, 2001). EWS/FLI1 puede también formar complejos con las proteínas EWS (Spahn L *et al.*, 2003) y así potencialmente modular su función. De la misma manera, las proteínas que interaccionan con la región amino terminal de EWS o la región carboxilo terminal de FLI1, pueden también interaccionar con EWS/FLI1 y así ser secuestradas, interfiriendo con su normal funcionamiento (Rossow KL y Janknecht R, 2001; Nakatani F *et al.*, 2003; Ramakrishnan R *et al.*, 2004).

Todos estos datos indican que la expresión constitutiva de EWS/FLI1 es necesaria para el inicio y progresión de los ESFT y que existen tanto mecanismos dependientes como independientes de la unión a ADN responsables de su potencial oncogénico.

1.3. GENES DIANA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN EWS/FLI1

El factor de transcripción quimérico EWS/FLI1 regula la expresión génica a través de la unión a dos tipos de secuencias en el promotor de sus genes diana: los motivos consenso ETS y los microsatélites con varias repeticiones (al menos 4) de la secuencia GGAA (Lessnick SL y Ladanyi M, 2012). En este último caso, la activación de la transcripción es altamente dependiente del número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de los mismos y, aunque se desconoce el mecanismo implicado, se ha propuesto que una unión cooperativa o un aumento en la probabilidad de unión debido a la alta concentración de sitios, pueden explicar esta correlación (Gangwal K *et al.*, 2008; Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008; Guillon N *et al.*, 2009). Algunos de los genes diana más relevantes de EWS/FLI1 son los siguientes:

- El gen *CCND1*/Ciclina D1 está sobreexpresado en muchos ESFT y su promotor presenta sitios de unión a EWS/FLI1 (Khan J *et al.*, 2001; Matsumoto Y *et al.*, 2001; Wai DH *et al.*, 2002; Baer C *et al.*, 2004). La sobreexpresión de ciclina D1 está asociada a una desregulación del ciclo celular (Diehl JA, 2002; Fu M *et al.*, 2004).
- El gen *c-MYC* es también inducido de forma transcripcional directa por EWS/FLI1 y se expresa a niveles elevados en líneas celulares y ESFT (Bailly RA *et al.*, 1994; Dauphinot L *et al.*, 2001; Nishimori H *et al.*, 2002). *c-Myc* es un factor de transcripción con un papel muy relevante en oncogénesis, induciendo, entre otros, *CDK4* y el gen codificante de ciclina D2, y estimulando la proliferación celular (Luscher B, 2001; Pelengaris S *et al.*, 2002).
- La proteína IGFBP-3 (*Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3*) tiene funciones proapoptóticas (Firth SM y Baxter RC, 2002; Grimberg A, 2003; Pollak MN, 2004) y EWS/FLI1 inhibe su expresión tanto *in vivo* como *in vitro* a través de la unión directa al promotor del gen que la codifica (Prieur A *et al.*, 2004).
- EWS/FLI1 actúa de manera directa sobre el promotor del gen *CAVI*/Caveolina-1, estimulando su transcripción. La sobreexpresión de Caveolina-1 contribuye al proceso tumorigénico en células de ES (Tirado OM *et al.*, 2006).
- EWS/FLI1 también reprime de manera directa la expresión del gen supresor de tumores *TGFBR2*, que codifica el receptor tipo II de TGF β , como consecuencia de su unión al promotor de este gen tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de este receptor en ESFT es indetectable por inmunohistoquímica (Hahm KB *et al.*, 1999; Im YH *et al.*, 2000; Fukuma M *et al.*, 2003; Kovar H, 2003).

- Otro ejemplo son los inhibidores de ciclinas dependientes de kinasas, como p21^{WAF1/CIP1} y p57^{KIP2}, que no se expresan en los tumores de Ewing (Nakatani F *et al.*, 2003). Se ha visto que oligonucleótidos antisentido dirigidos contra EWS/FLI1 inducen la expresión de p21^{WAF1/CIP1} en líneas de ESFT (Nakatani F *et al.*, 2003). Además, EWS/FLI1 puede unirse al promotor de p21^{WAF1/CIP1} *in vitro* y reducir su actividad (Nakatani F *et al.*, 2003). EWS/FLI1 también puede unirse indirectamente al promotor de p21^{WAF1/CIP1}, vía interacciones proteína-proteína con el factor de transcripción Brn-3a, inhibiendo la capacidad de activación de dicho promotor (Gascoyne DM *et al.*, 2004). Por otro lado, c-Myc, que es inducido por EWS/FLI1, puede inhibir a su vez la transcripción de p21^{WAF1/CIP1} (Wanzel M *et al.*, 2003).
- *Id2* es otro ejemplo de cómo EWS/FLI1 puede regular un gen de manera directa mediante la unión a su promotor tanto *in vivo* como *in vitro*, y por inmunohistoquímica y *northern blot* se ha observado que *Id2* se expresa a elevados niveles en la mayoría de líneas y ESFT (Nishimori H *et al.*, 2002; Fukuma M *et al.*, 2003). *Id2* puede suprimir la diferenciación de gran variedad de células, impidiendo la unión al ADN de otros factores de transcripción tipo hélice-lazo-hélice como E2A, MyoD o miogenina. De esta manera, *Id2* podría contribuir al mantenimiento del estado indiferenciado característico de las células de ESFT. Además EWS/FLI1 a parte de inducir de manera directa el gen *Id2*, parece que también lo hace de manera indirecta a través de la sobreexpresión de la proteína c-Myc que colabora en la inducción del gen *Id2* (Fukuma M *et al.*, 2003). Por su parte, *Id2* favorece la progresión del ciclo celular suprimiendo la activación de p21^{WAF1/CIP1} dependiente de E2A.
- EWS/FLI1 activa también el promotor de hTERT (*Human Telomerase Reverse Transcriptase*) y su expresión disminuye tras el silenciamiento de EWS/FLI1 con siARNs en las líneas celulares de ESFT (Takahashi A *et al.*, 2003; Fuchs B *et al.*, 2004a). Al parecer, EWS/FLI1 no activa directamente el promotor de hTERT, sino que lo hace a través de CBP/p300, aunque también podría estar implicado en este proceso c-Myc (Luscher B, 2001; Janknecht R, 2004). En la mayoría de las células tumorales, el incremento de la expresión de hTERT permite que éstas escapen la senescencia y, en consecuencia, favorece la inmortalidad y la progresión tumoral (Hiyama E y Hiyama K, 2003; Janknecht R, 2004).
- VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) se expresa a niveles elevados en más de la mitad de los ESFT e incluso se han detectado niveles elevados de VEGF en suero de algunos pacientes con sarcoma de Ewing (Kushlinskii NE *et al.*, 2000; Holzer G *et al.*, 2001; Pavlakovic H *et al.*, 2001). EWS/FLI1 activa la transcripción de *VEGF* (Fuchs B *et*

al., 2004b; Dalal S *et al.*, 2005; Guan H *et al.*, 2005a), aunque parece no unirse directamente a su promotor, sino indirectamente vía Sp1 (factor de transcripción con dedos de zinc de expresión ubicua) (Finkenzeller G *et al.*, 1997; Mukhopadhyay D *et al.*, 1997; Suske G, 1999; Black AR *et al.*, 2001). *VEGF* también es regulado indirectamente por EWS/FLI1 vía IGF-1 y su receptor (Strammiello R *et al.*, 2003).

Estos últimos ejemplos ponen de manifiesto que EWS/FLI1 no sólo regula genes de manera directa, a través de su unión a los promotores de sus genes diana, sino que además existen mecanismos de regulación indirecta.

2. EL GEN *DICKKOPF-1* (*DKK-1*) Y LA VIA WNT/ β -CATENINA

2.1. LA VÍA WNT/ β -CATENINA

Los factores Wnt constituyen una amplia familia de glicoproteínas secretadas (19 miembros en humanos), muy conservadas evolutivamente (Guder C *et al.*, 2006; Hausmann G *et al.*, 2007), que regulan importantes procesos celulares (proliferación, diferenciación, polaridad, migración, supervivencia, especificación de linaje, etc) y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto (Logan CY y Nusse R, 2004; MacDonald BT *et al.*, 2009; van Amerongen R y Nusse R, 2009). Los factores Wnt pueden activar diferentes vías de señalización que tradicionalmente se clasifican en canónica o Wnt/ β -catenina y no canónicas, independientes de β -catenina. (MacDonald BT *et al.*, 2009). En esta Tesis nos centraremos en la ruta Wnt/ β -catenina que es la mejor caracterizada, la más conservada evolutivamente y la más relevante en el contexto tumoral.

La vía Wnt/ β -catenina regula los niveles intracelulares de la proteína β -catenina. En ausencia de factores Wnt, β -catenina está unida al dominio intracelular de la proteína transmembrana E-cadherina, en las uniones adherentes de la membrana plasmática de las células epiteliales (Figura 2 panel izquierdo). La β -catenina citosólica libre es rápidamente reclutada por un complejo multiproteico de destrucción del que forman parte las proteínas estructurales APC (*Adenomatous polyposis coli*) y Axina, y las quinasas caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). En este complejo multiproteico, las quinasas fosforilan β -catenina marcándola para su ubiquitilación por la E3 ubiquitín ligasa β -TrCP. Esta ubiquitilación etiqueta a β -catenina para su degradación en el proteasoma (Figura 2, panel izquierdo) (Giles RH *et al.*, 2003; Nelson WJ y Nusse R, 2004; Gregorieff A y Clevers H, 2005; MacDonald BT *et al.*, 2009).

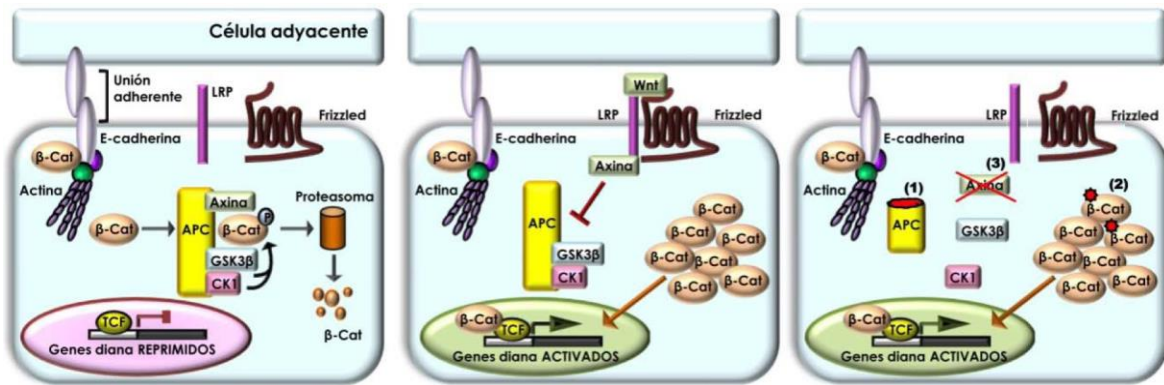


Figura 2. La vía Wnt/β-catenina y sus alteraciones en cáncer. **PANEL IZQUIERDO:** En ausencia de factores Wnt la β-catenina libre en el citoplasma es reclutada por un complejo multiproteico donde se fosforila, lo que la marca para su ubiquitilación y degradación por el proteasoma. **PANEL CENTRAL:** Los factores Wnt inhiben la degradación de β-catenina, por lo que se acumula en el citoplasma y pasa al núcleo, donde, asociándose con proteínas de la familia TCF/LEF, activa la transcripción de sus genes diana. **PANEL DERECHO:** En más del 80% de los tumores de colon, de forma independiente de los factores Wnt, mutaciones en *APC* (1), *CTNNB1/β-catenina* (2) o *AXINA2* (3) (mecanismos mutuamente excluyentes) impiden la fosforilación y degradación de β-catenina, provocando la activación constitutiva de sus genes diana. Además, alteraciones genéticas y epigenéticas en inhibidores extracelulares de la vía Wnt/β-catenina (DKKs, SFRPs y WIF-1) pueden contribuir a su activación aberrante. Una fracción de β-catenina se localiza en las uniones adherentes, sirviendo de nexo de unión entre la E-cadherina y el citoesqueleto de actina. β-Cat, β-catenina.

Los factores Wnt se unen a receptores de membrana heterodiméricos formados por un miembro de la familia Frizzled (10 en humanos) y por LRP5 ó 6, pertenecientes a la familia de proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) (MacDonald BT y He X, 2012; Niehrs C, 2012). La formación de este complejo ternario favorece la fosforilación de LRP5/6 por CK1 y GSK3β creándose sitios de anclaje para Axina (Davidson G *et al.*, 2005; Zeng X *et al.*, 2005). La Axina es reclutada por el receptor LRP5/6 fosforilado, lo que conlleva la inactivación del complejo de destrucción de β-catenina. El resultado es la estabilización y el aumento de los niveles de β-catenina citosólica libre, parte de la cual se transporta al núcleo, donde se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF (*T-Cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor*: TCF1, TCF2/LEF-1, TCF3, TCF4) y regula la expresión génica (Figura 2, panel central) (Giles RH *et al.*, 2003; Nelson WJ y Nusse R, 2004; Gregorieff A y Clevers H, 2005; Shitashige M *et al.*, 2008; Arce L *et al.*, 2009; Cadigan KM y Waterman ML, 2012; Kim W *et al.*, 2013).

Los factores TCF/LEF se unen a secuencias de ADN específicas denominadas elementos de respuesta a Wnt (WRE: *Wnt response elements*, CCTTTGA/TA/T). En ausencia de β-catenina nuclear, las proteínas TCF/LEF frecuentemente reprimen la transcripción de sus genes diana, aunque en algunos casos la activan (Daniels DL y Weis WI, 2005; Cinnamon E y Paroush Z, 2008; Arce L *et al.*, 2009; Ye F *et al.*, 2009). Dicha represión la realizan asociándose con co-represores como Groucho/TLE que promueve la desacetilación de histonas, mediada por

desacetilasas de histonas (HDACs), y la compactación de la cromatina (Daniels DL y Weis WI, 2005; Cinnamon E y Paroush Z, 2008; Arce L *et al.*, 2009; Ye F *et al.*, 2009).

Por el contrario, la activación de la transcripción de los genes diana de TCF/LEF se produce con la unión de β -catenina a estos factores desencadenándose el desplazamiento de co-represores y el reclutamiento de co-activadores como CBP/p300 (Giles RH *et al.*, 2003; Nelson WJ y Nusse R, 2004; Waterman ML, 2004; Daniels DL y Weis WI, 2005; Gregorieff A y Clevers H, 2005). Otros co-activadores que se asocian con β -catenina son: la histona acetiltransferasa (HAT) TRRAP/TIP60, la histona metiltransferasa (HMT) MLL1/2, la familia de ATPasas SWI/SNF que remodelan la cromatina, la telomerasa y el complejo PAF1 que participa en la modificación de histonas y la elongación de la transcripción (Willert K y Jones KA, 2006; Mosimann C *et al.*, 2009; Park JI *et al.*, 2009).

Hasta la fecha han sido identificados numerosos genes diana de Wnt o β -catenina/TCF implicados en los principales procesos biológicos y, en general, muy específicos del contexto celular. Entre ellos podemos destacar genes relacionados con la regulación de quinasas del ciclo celular, la adhesión celular, la señalización hormonal y la regulación de la transcripción, entre otros (Vlad A *et al.*, 2008). En la página web Roel Nusse's Wnt homepage (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>) aparece una extensa recopilación de genes diana de Wnt/ β -catenina.

La activación constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina (de forma independiente de factores Wnt) es frecuente en muchos tumores (Lindvall C *et al.*, 2007; Kikuchi K *et al.*, 2010; Thevenod F y Chakraborty PK, 2010; Wu WK *et al.*, 2010; Zender L *et al.*, 2010). Esta activación constitutiva puede deberse a diversas causas. Por ejemplo, en el caso de los tumores de colon, el 75% presentan mutaciones en el gen *APC* que dan lugar a una proteína truncada con capacidad reducida de unión a β -catenina o a Axina, lo que impide la formación adecuada del complejo de destrucción de β -catenina (Nathke IS, 2004). Menos frecuentemente, y sólo en los tumores que no presentan *APC* mutado, se observan mutaciones en el gen *CTNNB1*/ β -catenina (aproximadamente 7,5%) o, en escasa proporción, en el gen *AXINA2*. Las mutaciones de β -catenina afectan a los residuos fosforilables por CK1 y GSK3 β impidiendo que sea marcada para su degradación (Morin PJ *et al.*, 1997; Rubinfeld B *et al.*, 1997; Liu W *et al.*, 2000), y las de *AXINA2* afectan, como las de *APC*, a la formación del complejo de destrucción (Figura 2, panel izquierdo).

También se ha descrito la inhibición constitutiva de la ruta Wnt/ β -catenina en un tipo de sarcomas (Matushansky I *et al.*, 2007).

2.2. INHIBIDORES DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA

En condiciones fisiológicas, la vía Wnt/ β -catenina está regulada por inhibidores extracelulares e intracelulares. Se distinguen dos tipos de inhibidores extracelulares (Figura 3):

1. Los que se unen directamente a los factores Wnt, disminuyendo su afinidad por el receptor, como las proteínas secretadas relacionadas con el receptor Frizzled (SFRPs) (Jones SE y Jomary C, 2002), el factor inhibitorio de Wnt (WIF)-1 (Hsieh JC *et al.*, 1999) y, en *Xenopus*, Cerberus (Bouwmeester T *et al.*, 1996).

2. Aquellos que interactúan directamente con componentes del complejo receptor, como la familia WISE/SOST (Itasaki N *et al.*, 2003; Semenov M *et al.*, 2005) y las proteínas de la familia Dickkopf (DKK) (Glinka A *et al.*, 1998; Krupnik VE *et al.*, 1999; Niehrs C, 2006).

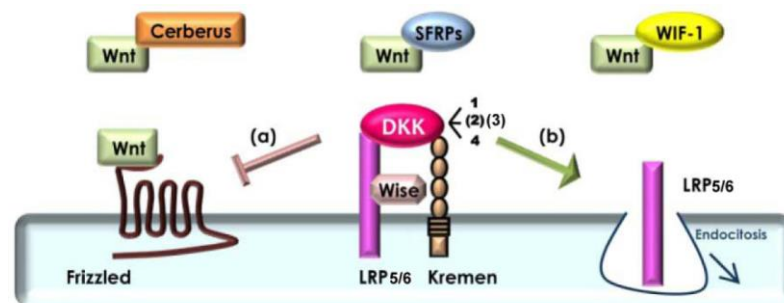


Figura 3. Inhibidores extracelulares de la vía Wnt/ β -catenina. Los antagonistas extracelulares de esta ruta se pueden unir directamente a los factores Wnt (Cerberus, SFRPs y WIF-1) o interactúan con su correceptor LRP5/6 (Wise y DKKs), uno de los componentes del receptor heterodimérico. Se indican los dos mecanismos de inhibición de la vía Wnt/ β -catenina por DKKs: (a) bloquea la unión Wnt-Frizzled-LRP5/6 y (b) provoca la endocitosis de LRP5/6. DKK-1 y -4 actúan siempre como antagonistas de la vía Wnt/ β -catenina. La modulación de la ruta por DKK-2 y DKK-3, en cambio, depende del contexto celular.

Además de estos inhibidores extracelulares, existen diversas isoformas de TCF/LEF, que carecen del dominio de interacción con β -catenina, actuando como dominantes negativos y además, numerosas rutas intracelulares antagonizan la vía Wnt/ β -catenina a distintos niveles en diversos tejidos (Waterman ML, 2004; Arce L *et al.*, 2006; Filipovich A *et al.*, 2011).

Existen también inhibidores intracelulares. Algunos funcionan en el citosol, como Naked o Axina2/Conductina (Behrens J *et al.*, 1998; Zeng W *et al.*, 2000; Wharton KA, Jr. *et al.*, 2001) y otros en el núcleo celular, como Chibby o ICAT (Tago K *et al.*, 2000; Takemaru K *et al.*, 2009).

2.3. ESTRUCTURA DE LA FAMILIA DICKKOPF

La familia de proteínas Dickkopf (DKK) está compuesta por cuatro miembros (DKK-1, -2, -3 y -4) en vertebrados, habiéndose descrito además una proteína relacionada con DKK-3 denominada DKKL1 (*Dickkopf-like protein 1*, también conocida como *soggy*) (Krupnik VE *et al.*, 1999; Kawano Y y Kypta R, 2003; Niehrs C, 2006). Los genes *DKK* codifican proteínas de secreción pequeñas, de unos 255-350 aminoácidos (24-38 kDa). La característica fundamental que confiere la identidad a esta familia es la presencia de dos dominios ricos en cisteína muy conservados (Krupnik VE *et al.*, 1999). Estos dominios contienen un número y posicionamiento de cisteínas muy parecido, ciertos aminoácidos conservados y se encuentran separados por una región de longitud y secuencia variable (50–55 aminoácidos en el caso de *DKK-1*, -2 y -4, y 12 en el de *DKK-3*). El dominio rico en cisteínas situado más próximo al extremo amino, denominado DKK_N (Cys1), es único para esta familia, mientras que el más cercano al extremo carboxilo, el dominio colipasa (Cys2), exhibe un patrón de 10 cisteínas de elevada similitud con el que presentan las proteínas de la familia de las colipasas (Figura 4) (Aravind L y Koonin EV, 1998). Las cuatro proteínas DKK de vertebrados contienen ambos dominios ricos en cisteínas, aunque los análisis estructura-función de los DKKs de vertebrados revelan que el dominio colipasa es suficiente para ejercer su actividad biológica (Brott BK y Sokol SY, 2002; Li L *et al.*, 2002; Mao B y Niehrs C, 2003), además de ser la región más conservada entre los distintos componentes de la familia.

Las proteínas DKK-1, -2 y -3, y *soggy* poseen sitios de N-glicosilación (Fedi P *et al.*, 1999; Krupnik VE *et al.*, 1999; Haniu M *et al.*, 2011), y DKK-2 -3 y -4 exhiben secuencias de corte por furín-proteasas. Sin embargo, se desconoce la implicación funcional de estos procesamientos post-traduccionales.

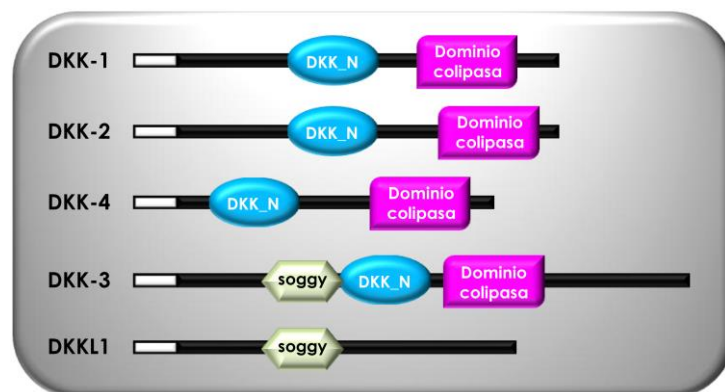


Figura 4. Dominios estructurales de las proteínas de la familia Dickkopf. Esquema de las cuatro proteínas Dickkopf humanas (DKK-1, -2, -3 y -4) y de DKKL1. Las DKKs humanas comparten el dominio colipasa y el dominio DKK_N, aunque DKK-3 posee un dominio adicional, *soggy*, presente también en DKKL1. Modificado de (Niehrs C, 2006)

2.4. PAPEL DE LA FAMILIA DICKKOPF EN LA INHIBICIÓN DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA

La función hoy más conocida de la familia génica *Dickkopf* es la modulación de la vía canónica Wnt/ β -catenina. En términos generales, DKK-1 y -4, denominados “inhibidores puros”, reprimen siempre la vía Wnt/ β -catenina; en el caso de DKK-2 y DKK-3 la regulación es positiva o negativa dependiendo del contexto celular; (Figura 3) (Krupnik VE *et al.*, 1999; Niehrs C, 2006; Wang K *et al.*, 2008; Yue W *et al.*, 2008). Existen dos mecanismos propuestos: Por una parte, la unión de DKK a LRP bloquea directamente la formación del complejo ternario Wnt/Frizzled/LRP (Semenov MV *et al.*, 2001); por otra, en la membrana plasmática se forma, a su vez, un complejo ternario entre DKK, LRP y otro receptor de alta afinidad de DKK llamado Kremen (Krm 1/2), lo cual induce una rápida endocitosis de LRP5/6 (Mao B *et al.*, 2002; Mao B y Niehrs C, 2003). El resultado es una inhibición de la vía Wnt/ β -catenina por una menor disponibilidad de LRP5/6 en la membrana, o bien porque el que está presente se encuentra bloqueado por la unión de DKK (Figura 3). El dominio colipasa de los DKKs es el responsable de su unión con LRP5/6 y Kremen, así como de la inhibición de la vía Wnt (Brott BK y Sokol SY, 2002; Li L *et al.*, 2002; Mao B y Niehrs C, 2003). Estudios genéticos y bioquímicos recientes sugieren que la inhibición del complejo Frizzled-LRP6 mediada por DKK-1 es independiente de la internalización y degradación de LRP6 (Semenov MV *et al.*, 2008), lo que se ve apoyado por el hecho de que Kremen no es universalmente requerido para la función de DKK-1 (Ellwanger K *et al.*, 2008).

2.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *DICKKOPF-1*

DKK-1 tiene efectos variados y complejos sobre la proliferación y la diferenciación celular. En humanos adultos, DKK-1 induce la proliferación de las células troncales de la médula ósea (Gregory CA *et al.*, 2005) e inhibe la diferenciación de los osteoblastos (Morvan F *et al.*, 2006). De hecho, los niveles elevados de DKK-1 en el plasma de pacientes con mieloma múltiple se asocia a lesiones osteolíticas (Tian E *et al.*, 2003). Además, los glucocorticoides, que están asociados con pérdida ósea y osteoporosis (Weinstein RS, 2012), aumentan la expresión de DKK-1 en osteoblastos (Ohnaka K *et al.*, 2004).

Por el contrario, la expresión de DKK-1 favorece la diferenciación de los pre-adipocitos (Christodoulides C *et al.*, 2006) y en el intestino delgado, la actividad transcripcional de β -catenina provoca cambios en la expresión de genes que inducen un fenotipo desdiferenciado (van de Wetering M *et al.*, 2002), mientras la expresión exógena de *Dkk-1* inhibe este fenotipo proliferativo y desdiferenciado e incrementa la generación de células del linaje secretor (Kuhnert F *et al.*, 2004). DKK-1, además de ser un inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina, es

también un gen diana de β -catenina/TCF, controlando, por tanto, su propia expresión mediante un mecanismo de retroinhibición (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005).

Por otro lado, en células humanas, la expresión de DKK-1 es inducida por p53 (Wang J *et al.*, 2000), aunque al mismo tiempo existen estudios que muestran que DKK-1 es inducido por daños en el ADN de forma independiente de p53 (Shou J *et al.*, 2002).

La $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D₃, el metabolito más activo de la vitamina D, induce la expresión de DKK-1 en células de cáncer de colon (Aguilera O *et al.*, 2007).

También se ha descrito que DKK-1 es inhibido por c-Myc en células de cáncer de mama (Cowling VH *et al.*, 2007), donde es frecuente la amplificación génica de este gen, (Liao DJ y Dickson RB, 2000; Jamerson MH *et al.*, 2004) promoviéndose así la oncogénesis ya que DKK-1 se comporta como un supresor tumoral en este tipo celular (Mikheev AM *et al.*, 2008).

Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido el estudio del estado de la vía Wnt/ β -catenina en células de ESFT, incidiendo en la regulación del gen *DICKKOPF-1*, para así contribuir a un mejor conocimiento de la acción de la oncoproteína de fusión EWS/FLI1.

OBJETIVOS CONCRETOS

- I.** Estudiar el estado de la vía Wnt/ β -catenina y la expresión de su inhibidor y gen diana *DICKKOPF-1* en células de ESFT, así como el papel de EWS/FLI1 como responsable de dicho estado.

- II.** Esclarecer el mecanismo a través del cual EWS/FLI1 inhibe la actividad Wnt/ β -catenina y la expresión de *DICKKOPF-1* en células de ESFT.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. CULTIVOS CELULARES

En la realización de esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes líneas celulares de ESFT: RD-ES y TTC-466, mantenidas en medio RPMI 1640; SK-PN-DW, SK-N-MC y TC-71, mantenidas en medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM); SK-ES1, mantenidas en medio McCoy5A y A673, mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). También se han manejado dos líneas celulares humanas derivadas de carcinomas de colon (SW480-ADH, LS174T) y la línea de riñón embrionario humano HEK-293T, mantenidas todas ellas en medio DMEM. Las células SW480-ADH, cedidas por los Dres. F. X. Real (CNIO, Madrid) y A. García de Herreros (Instituto Municipal de Investigación Médica, Barcelona), se obtuvieron a partir de las células SW480 por dilución límite (Palmer HG *et al.*, 2001). En todos los casos, el medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Todos los medios, sueros y suplementos fueron suministrados por Life Technologies.

Las líneas celulares HeLa pTET-E/F, A673/TR/shEF y A673/TR/shGFP, descritas en Carrillo *et al.*, 2007, fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% FBS libre de tetraciclina (Clontech), 2mM L-glutamina, 100 µg/ml zeozina y 3 µg/ml blasticidina. Para inducir la expresión de EWS/FLI1 o de los shARNs correspondientes se adicionó 1 µg/ml de doxiciclina (Clontech).

Tabla 2. Vectores de expresión.

Proteína	Vector	Descripción formas codificantes
β-catenina	pMT23	β-catenina salvaje (β-CATwt)
β-cateninS37Y	pCDNA3	Forma mutada de β-catenina no degradable por el proteasoma. (β-CATS37Y)
EWS/FLI1	pCIneo	Proteína quimérica t(11;22)(q24;q12)
ICN	pCDNA3	Activador de la vía Notch
TCF4-VP16	pCDNA3	Forma constitutivamente activa del factor de transcripción TCF4
LEF-1	pCIneo	Miembro de la familia TCF/LEF
LEF-1-HA	pCIneo	LEF-1 con un epítipo HA en el extremo carboxilo terminal
Mad	CMV	Dominante negativo de c-Myc
c-Myc	pCEFL	Factor de transcripción c-Myc
shEF	pCIneo	shARN específico para EWS/FLI1
shGFP	pCIneo	shARN específico para GFP (control)

1.2. PLÁSMIDOS

En los ensayos de transactivación se emplearon dos tipos de construcciones: los plásmidos reporteros y los vectores de expresión. Los **plásmidos reporteros** contienen el ADNc de un gen testigo bajo el control del fragmento de ADN cuya actividad promotora se pretende estudiar. Los que se han utilizado para este trabajo contienen el gen testigo *Luc* (Luciferasa de luciérnaga) bajo el control de los siguientes fragmentos de ADN: tres copias de la secuencia consenso de unión de TCF/LEF en posición 5' al promotor mínimo del gen *c-FOS* (pTOPFLASH, cedido por el Dr. H. Clevers, Hubrecht Laboratory, Utrecht, Holanda) y su versión mutada (pFOPFLASH) (Korinek V *et al.*, 1997), varios fragmentos del promotor del gen *DKK-1* humano (clonados en nuestro laboratorio) (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005), cuatro copias de la secuencia de unión del efector de la vía Notch CBF1 (4xwtCBF1Luc) y su versión mutada (4xmtCBF1Luc) (Hsieh JJ *et al.*, 1996), fragmentos del promotor de *c-MYC* (p1p2-Luc) (Lee TC y Ziff EB, 1999) y con sitios de unión consenso para la proteína c-Myc (EboxWT) y su versión mutada (EboxMT) (Kiessling A *et al.*, 2006), cedidos por el Dr. Javier León (Universidad de Cantabria, Santander). Como control positivo de la transactivación mediada por EWS/FLI1 se utilizó un plásmido reportero que contiene un fragmento del promotor del gen *DAX1* (gen diana de EWS/FLI1) obtenido de la línea celular de ES A4573 y clonado delante del gen *Luc*, todo ello en el vector pGL3*basic* (pGL3-promDAX1/A4573) (Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008). Este fragmento comprende una secuencia de microsatélite presente en el promotor de *DAX1* que contiene 25 repeticiones GGAA, responsables de la transcripción de *DAX1* mediada por EWS/FLI1.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Especie		Aplicación			Procedencia
	Monoclonal	Policlonal	WB	IP	IF	
Anti-β-catenina	Ratón		1:1000		1:100	BD Transduction Laboratories
Anti-FLI1		Conejo	1:1000		1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-nucleolina	Ratón		1:5000			Santa Cruz Biotechnology
Anti-GSK3β	Ratón		1:1000			BD Transduction Laboratories
Anti-HA	Rata			1:100		Roche
Anti-HA	Ratón		1:1000			Covance
Anti-ratón IgG HRP		Cabra	1:10000			Promega
Anti-conejo IgG HRP		Cabra	1:10000			Jackson ImmunoResearch
Anti-LEF-1	Conejo		1:1000			Cell Signaling Technology

WB: Western blot; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia.

Como control interno de la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido reportero pRL-TK (Promega), que contiene como gen testigo la luciferasa de *Renilla reniformis* (RLuc) bajo el control del promotor del gen de la *timidina kinasa* (*tk*).

Para la **expresión ectópica de proteínas** se usaron vectores de expresión en los cuales un promotor fuerte dirige la transcripción del ADNc u ORF de interés. Los vectores de expresión utilizados en este estudio se describen en la [Tabla 2](#).

1.3. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta Tesis se describen en la [Tabla 3](#).

1.4. OLIGONUCLEÓTIDOS

La secuencia y aplicación de los oligonucleótidos usados se detallan en la [Tabla 4](#).

Tabla 4. Cebadores utilizados para qRT-PCR.

Genes	
<i>DKK-1</i>	DKK-1-D 5'-GGCGGAATAAGTACCAGACC-3' DKK-1-R 5'-TGCAGGCGAGACAGATTGC-3' Sonda Taqman 5'-FAM-ACAACCTACCAGCCGTACCCGTGCG-BHQ1-3'
<i>TBP</i>	TBP-D2 5' GAACATCATGGATCAGAACAACAG 3' TBP-R2 5' ATT GGT GTTCTGAATAGGCTGTG 3' Sonda Taqman 5' FAM-CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG-TAMRA 3'
<i>EWS/FLI1</i>	EWS-D2 5' AGCCAAGCTCCAAGTCAATATAG 3' FLI1-R3 5' TCCTCTTCTGACTGAGTCATAAG 3' Sonda Taqman 5' TET-AAC AGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA-TAMRA 3'

DKK-1: Dickkopf-1; TBP: TATA binding protein; EWS/FLI1: Oncoproteína presente en ESFT; Cebador -D: directo; -R: reverso

2. MÉTODOS

2.1. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS

Los datos de *microarrays* usados en este estudio han sido previamente publicados y están descritos con detalle en (Carrillo J *et al.*, 2007; Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008). Una serie de datos procede de tres tumores pediátricos: neuroblastoma, rhabdomyosarcoma y ESFT; y se usó para identificar perfiles de expresión característicos de estos tumores (Carrillo J *et al.*, 2007). La otra serie de datos procede de ARN aislado de células A673/TR/shEF y A673/TR/shGFP estimuladas con doxiciclina durante 72 horas para inducir la expresión de shARNs contra GFP (control) o EWS/FLI1, y se usó para estudiar genes regulados por EWS/FLI1 en células de ESFT (Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008).

2.2. ENSAYOS DE TRANSACTIVACIÓN

Las células se transfectaron transitoriamente, por triplicado, en placas de 24 pocillos con *jetPEI™ transfection reagent* (Poly Plus Transfection) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando las cantidades indicadas en cada caso de los vectores de expresión, de pRL-TK y de los plásmidos reporteros con *Luc*. En caso necesario, a las 24 h de la transfección se cambiaron las células a medio de cultivo fresco y se trataron con doxiciclina o vehículo.

Dependiendo del experimento, transcurridas 48 h desde la transfección o dos días después del tratamiento con doxiciclina, se lisaron las células y se midieron las actividades Luc y RLuc en los extractos, utilizando el *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega), en un luminómetro GloMax 96 (Promega). La actividad Luc se normalizó por la actividad RLuc (Luc/RLuc) y se calcularon las medias y desviaciones estándar de los triplicados. Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces.

2.3. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y RT-PCR CUANTITATIVA

La extracción de ARN total de células en cultivo, se realizó usando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). El ARN extraído se analizó electroforéticamente en geles al 1% de agarosa con bromuro de etidio o SYBR Safe™ y se cuantificó en el espectrofotómetro.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 1 µg de ARN, dNTPs 1 mM cada uno, DTT 10 mM, cebadores hexaméricos aleatorios 2,5 µM (Promega) y tampón de transcripción reversa 1x. La mezcla se incubó 10 minutos a 70 °C para desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo. Finalmente, se añadieron inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega) y transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen) para que su concentración

final en la reacción fuera 2 U/ μ l y 10 U/ μ l, respectivamente. La reacción se incubó 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, y finalmente 5 minutos a 95 °C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que se omitió el enzima transcriptasa reversa. Para la PCR cuantitativa se utilizaron sondas *Taqman* en dos formatos, uno en tubos convencionales y otro en formato de tarjetas micro-fluídicas.

La PCR cuantitativa en tubos convencionales se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo 80 ng de ADNc, dNTPs 800 μ M, MgCl₂ 4 mM, 1 μ l solución cebadores/sonda Taqman (Applied Biosystems), 0,5 U Taq polimerasa (Biotools) y tampón de reacción 1x. El programa de PCR consistió en: 2 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 50 segundos a 60 °C. En todos los ensayos se amplificó en paralelo el ARNm del gen TBP (*TATA binding protein*), que se utilizó como referencia interna para la normalización de los niveles de expresión del resto de los genes. Las reacciones se llevaron a cabo en un aparato de PCR cuantitativa modelo RotorGene 6000 (Corbett Research). Las secuencias de los cebadores y sondas Taqman se muestran en la [Tabla 4](#).

El nivel de expresión de cada gen se normalizó con respecto al nivel de expresión del gen control TBP. Para cada gen, se extrajeron los datos de Ct (*Cycle Threshold*, ciclo en el que los productos de PCR inician la fase exponencial de la amplificación), usando un software específico (RotorGene versión 4.6). Para comparar los niveles de expresión de un determinado gen en dos muestras diferentes se usó el método de $\Delta\Delta$ Ct (Livak KJ y Schmittgen TD, 2001). En primer lugar se calculó el valor de Δ Ct de la muestra problema y de la muestra control usando la fórmula Δ Ct = Ctgen muestra problema – CtTBP. Posteriormente, se calculó el valor $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ctmuestra problema – Δ Ctmuestra control. El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron con la colaboración con los Dres. Javier Alonso y Noelia Agra.

2.4. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOTRANSFERENCIA (*WESTERN BLOT*)

En los ensayos de co-inmunoprecipitación, las células fueron solubilizadas en tampón de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH7,5; 0,2% Nonidet P-40), y los extractos centrifugados a 12.000 x g durante 30 min a 4 °C para eliminar los restos celulares. 1,5 mg de proteína de cada lisado fueron incubados con un anticuerpo anti-HA de alta afinidad (Roche) durante 16 h a 4 °C y después se incubaron, en rotación, con *Gammabind G Sepharosa* (GE Healthcare) durante 2 h a 4 °C. Las esferas de sepharosa fueron decantadas por centrifugación, lavadas cuatro veces con tampón de lisis, disueltas en tampón Laemmli, y analizadas mediante

Western Blot. Los inmunoprecipitados y los extractos totales se analizaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE y se transfirieron a membranas *Immobilon-P* de PVDF (Millipore). Éstas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (5% BSA en TBS + 0,5% Tween-20) y, posteriormente, toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes, preparados en solución de bloqueo, a las diluciones indicadas en la [Tabla 3](#). Posteriormente, tras dos lavados de 15 minutos, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (*IgG horseradish peroxidase-conjugated*, HRP) y diluidos en solución de bloqueo ([Tabla 3](#)). El revelado se realizó con el sistema ECL (Amersham Biosciences). Las imágenes se adquirieron con el escáner SNAPSCAN e42 (AGFA). En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de al menos tres realizados.

2.5. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Se sembraron células L control y células L que sobreexpresan Wnt3a (Willert K *et al.*, 1999) en placas Petri de 10 cm de diámetro. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se añadieron 6 ml/placa de medio DMEM con 10% FBS y se dejó que el cultivo condicionase el medio durante 72 h. A continuación, se eliminaron los restos celulares por centrifugación y el sobrenadante se congeló a -70 °C para su uso posterior.

2.6. MUTAGENESIS DIRIGIDA

Los experimentos de mutagénesis dirigida de los sitios de unión de TCF/LEF en la construcción -231/+112 del promotor de *DKK-1* se realizaron mediante el uso del *Stratagene QuikChange II XL Site-Directed Mutagénesis Kit* (Stratagene), convirtiendo la secuencia canónica 5'-CTTTG (A / T) (A / T) -3' en 5'-CTTTG**GC**-3'.

2.7. INMUNOFUORESCENCIA

Las células se sembraron en placas de cultivo p60 en las que previamente se habían colocado cristales de 10 mm de diámetro. Los cultivos se adhirieron a dichos cristales y sobre ellos crecieron. A las 24 h, las células se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión EWS/FLI1, utilizando *jetPEI™ transfection reagent* (Poly Plus Transfection) siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 48 h desde la transfección, se realizó un lavado rápido con PBS, y las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 15 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Posteriormente y en las mismas condiciones, se realizó un lavado con 0,5 M de glicina durante 5 min seguido de dos lavados adicionales con PBS. El bloqueo de los epítomos inespecíficos se realizó incubando las células ya fijadas con

1% de suero de cabra (Sigma) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Después, las células se incubaron con la dilución correspondiente del anticuerpo primario disuelto en PBS durante 3 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación, tras cuatro lavados de 5 min con PBS, las células fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con un fluorocromo. Nuevamente, se realizaron cuatro lavados de 5 min con PBS. Por último, los cristales se montaron en medio VectaShield (Vector Laboratories) y las imágenes fueron digitalizadas con un Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP5; el objetivo utilizado fue 63X/1.4-0.6 OIL CORR LAMBDA BLUE. Posteriormente se procesaron utilizando el programa Adobe Photoshop.

Los anticuerpos específicos utilizados se muestran en la [Tabla I](#). Además, se utilizó el compuesto fluorescente 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, 1:1000, Sigma) para el marcaje del ADN.

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó usando los programas Microsoft Excel y GraphPad InStat 3.0. Los datos fueron expresados como las medias \pm desviación estándar. La significación estadística fue comprobada mediante ANOVA. Un asterisco (*) indica $P < 0,05$; dos asteriscos (**), $P < 0,01$; y tres asteriscos (***), $P < 0,001$. Los datos fueron considerados no significativos (ns) cuando $P > 0,05$.

Resultados

1. EFECTOS DE EWS/FLI1 SOBRE LA VIA WNT/ β -CATENINA Y SUS GENES DIANA

1.1. EWS/FLI1 REPRIME LA EXPRESION DEL GEN *DICKKOPF-1*

La mayoría de los estudios de regulación génica mediada por el factor de transcripción aberrante EWS/FLI1 han incidido especialmente en analizar aquellos genes cuya expresión es inducida o estimulada por esta oncoproteína. Sin embargo, está ampliamente aceptado que los genes que se inhiben o se dejan de expresar pueden ser tan relevantes para la fisiopatología celular como aquellos que se expresan de nuevo o aumentan su expresión. En esta convicción, nuestro grupo decidió centrarse en la búsqueda y estudio de genes diana específicamente inhibidos por EWS/FLI1, para posteriormente analizar su relevancia en el proceso de transformación tumoral que ocurre en los ESFT.

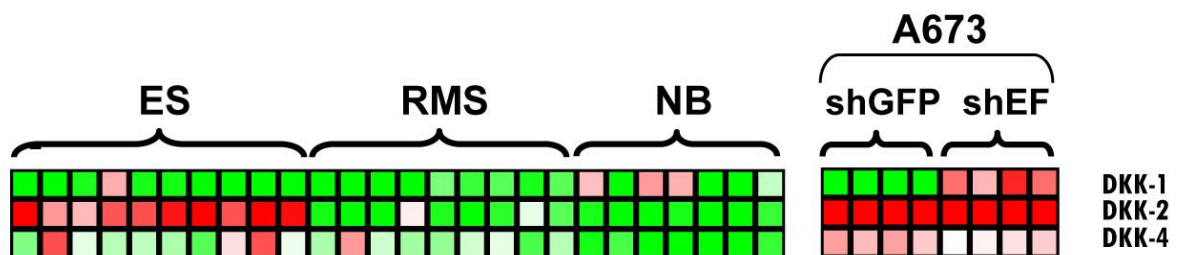


Figura 5. La expresión de *DKK-1* está disminuida en sarcoma de Ewing. Los ARNs procedente de biopsias de sarcoma de Ewing (ES, n=10), rabdomiosarcoma (RMS, n=10) y neuroblastoma (NB, n=7) fueron marcados e hibridados con matrices de oligonucleótidos *CodeLink Human Uniset 20K* (GE Healthcare, Amersham Biosciences). La figura muestra el diagrama de colores (genes con baja expresión en verde y genes sobreexpresados en rojo) de tres miembros de la familia Dickkopf (DKK-1, -2 y -4). En la parte derecha, el diagrama de colores muestra los efectos del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre los niveles de ARNm de DKK-1 en la línea celular de ESFT, A673. En este caso, se extrajo el ARN de las células A673/TR/shGFP (células control) y A673/TR/shEF estimuladas con doxiciclina durante 72 horas, se marcó y se hibridó con matrices de oligonucleótidos *CodeLink Human Uniset 20K*.

Para abordar este objetivo, usamos un modelo celular, ya descrito, en el que los niveles de la proteína EWS/FLI1 se pueden disminuir *ad libitum* mediante la expresión de un shARN inducible por tetraciclina (células A673/TR/shEF) (Carrillo J *et al.*, 2007; Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008). En este modelo, los genes que son inhibidos por EWS/FLI1 aparecerán activados tras la adición de doxiciclina, análogo de la tetraciclina, y la consiguiente expresión del shARN que silencia la expresión de EWS/FLI1.

El análisis del perfil de expresión génica regulado por EWS/FLI1 en nuestro modelo y su comparación con otros estudios transcriptómicos similares (Priour A *et al.*, 2004; Kinsey M *et al.*, 2006) mostró que uno de los genes más consistentemente inhibidos por EWS/FLI1 es *DICKKOPF-1* (*DKK-1*), que codifica un inhibidor extracelular de la señalización por proteínas Wnt (Niehrs C *et al.* 2006, [Figura 5](#)). La reducción de la expresión de EWS/FLI1 en células

A673/TR/shEF tratadas con doxiciclina conlleva un incremento selectivo y específico del ARNm de *DKK-1*, mientras que la expresión de *DKK-2* y *DKK-4*, otros dos miembros de la familia Dickkopf, permanece inalterada (Figura 5).

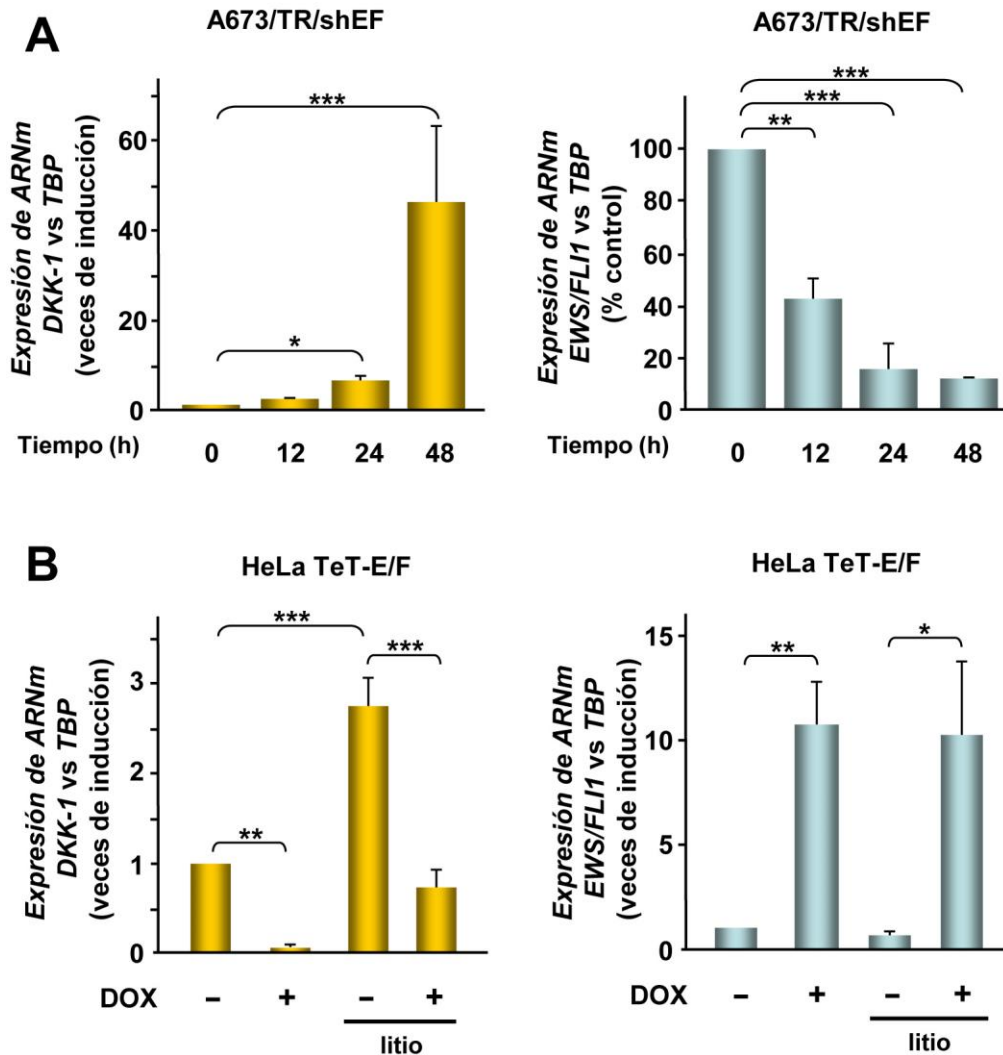


Figura 6. EWS/FLI1 reprime la expresión de *DKK-1*. (A) La expresión de ARNm de *DKK-1*, *EWS/FLI1* y *TBP* (gen control interno) fue analizada mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real a partir de ARN total extraído de células A673/TR/shEF tratadas con doxiciclina durante los tiempos indicados. Se muestra la expresión relativa de ARNm de *DKK-1* y *EWS/FLI1* frente a *TBP* en relación a células no estimuladas (cuyo valor se fijó arbitrariamente en 1 o 100, respectivamente). Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Para la estadística se aplicó ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Células HeLa TeT-E/F fueron pre-tratadas o no con doxiciclina durante 48 h para inducir la expresión de *EWS/FLI1* y entonces se estimularon con litio (LiCl, 40 mM), un inhibidor de GSK3 β , para así activar la ruta Wnt/ β -catenina, o con vehículo durante 4 h. La expresión de ARNm de *DKK-1*, *EWS/FLI1* y *TBP* fue analizada como en (A) a partir de ARN total. Se muestra la expresión relativa de ARNm de *DKK-1* y *EWS/FLI1* frente a *TBP* en relación a células no estimuladas (cuyo valor se fijó arbitrariamente en 1). Las barras de error representan la SD. La estadística se realizó como en (A).

Adicionalmente, comparamos el patrón de expresión génica de los miembros de la familia Dickkopf en la línea A673 con otro análisis transcriptómico, publicado previamente (Carrillo J *et al.*, 2007), diseñado para comparar los patrones de expresión génica de los sarcomas de Ewing (ES) con los de otros dos tumores pediátricos de células azules, redondeadas y

pequeñas, el rhabdomyosarcoma (RMS) y el neuroblastoma (NB). En este estudio comparativo, el patrón de expresión génica de los miembros de la familia Dickkopf en nuestras células control (A673/TR/shGFP) coincidió perfectamente con el de las muestras de sarcoma de Ewing (Figura 5, shGFP, ES), lo que indica que la línea A673 es un buen modelo en lo que respecta a esta familia génica. En concreto, la expresión de *DKK-2* es elevada en

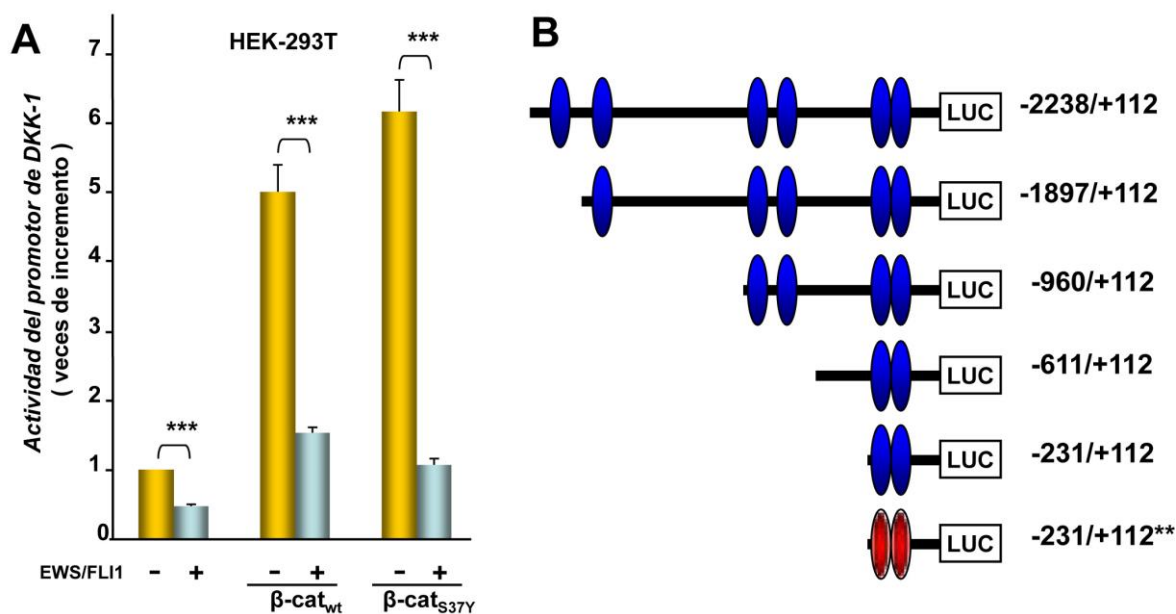


Figura 7. EWS/FLI1 inhibe la transcripción basal y mediada por β-catenina del gen *DKK-1*. (A) En células HEK-293T, el plásmido que contiene un fragmento de 2,2Kb (-2238/+112, B) del promotor de *DKK-1*, clonado delante del gen testigo luciferasa de luciérnaga, fue co-transfectado junto con β-catenina salvaje (β-cat_{wt}) o mutante (β-cat_{S37Y}) en presencia (+) o ausencia (-) de un plásmido de expresión de EWS/FLI1. Como control interno usamos un plásmido que porta la luciferasa de *Renilla reniformis* (pRL-TK). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las dos actividades luciferasa. Se usaron los valores de pRL-TK para normalizar. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada usando ANOVA: *** p<0,001. (B) Diagrama de las construcciones del promotor de *DKK-1* usadas en este estudio mostrando la localización de los sitios TCF/LEF salvajes (5'-CTTTG[A/T][A/T]-3', óvalos azules) o sitios TCF/LEF mutantes (5'-CTTTGGC-3', óvalos rojos).

ESFT, mientras que la de *DKK-4* es variable (Figura 5). Por el contrario, la expresión de *DKK-1* es baja tanto en sarcoma de Ewing, como en las otras dos neoplasias estudiadas (Figura 5). En conjunto, estos resultados sugieren que el gen *DKK-1* está constitutivamente reprimido por EWS/FLI1 en células y ESFT.

Para validar estos datos, realizamos una RT-PCR cuantitativa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), utilizando nuestro modelo celular (A673/TR/shEF). Como esperábamos, el tratamiento con doxiciclina produjo un incremento lento de los niveles de ARNm de *DKK-1* en las células A673/TR/shEF, en paralelo a una disminución de la expresión de EWS/FLI1 (Figura 6A).

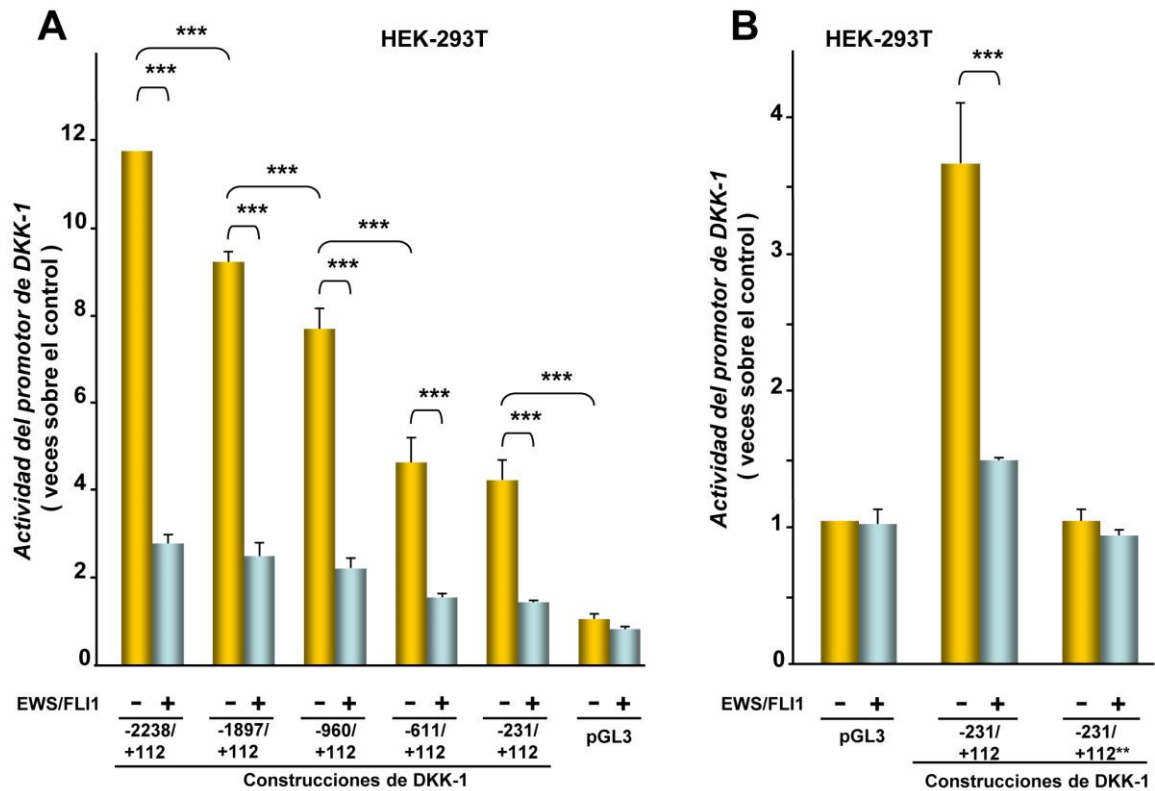


Figura 8. Papel de los sitios de unión TCF/LEF en la inhibición del promotor de *DKK-1* por EWS/FLI1. (A) Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con las construcciones del promotor de *DKK-1* mostradas en la figura 7B, junto con β -cat_{S37Y} (o vector vacío), en presencia o ausencia de un plásmido de expresión de EWS/FLI1. Como control interno usamos el plásmido pRL-TK. Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa. Los resultados representan las veces de inducción por β -cat_{S37Y} (frente al control) en ausencia (-, barras doradas) o en presencia (+, barras grises) de EWS/FLI1. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada usando ANOVA: *** $p < 0,001$. **(B)** Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con el vector vacío pGL3_{basic} o con las construcciones más cortas del promotor de *DKK-1* salvaje (231/+112) o mutada (231/+112**), junto con EWS/FLI1 y/o β -cat_{S37Y} como en (A). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y procesadas como en (A). Las barras de error representan la SD. La estadística se realizó como en (A).

Con el fin de comprobar si EWS/FLI1 era también capaz de regular la expresión de *DKK-1* en un sistema heterólogo, utilizamos células HeLa que expresan una construcción del gen EWS/FLI1 inducible por tetraciclina (Hela TeT-E/F, (Carrillo J *et al.*, 2007)). El tratamiento con doxiciclina produjo una fuerte reducción de los niveles de ARN mensajero de *DKK-1* en paralelo a una subida brusca de los niveles de ARN de EWS/FLI1 (Figura 6B).

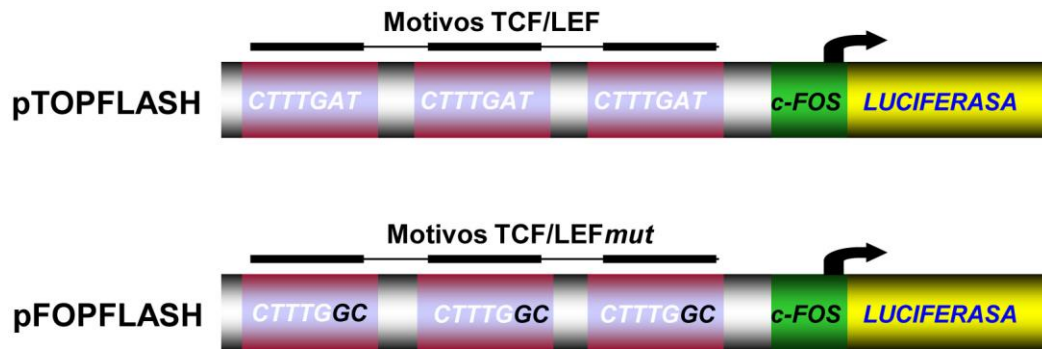


Figura 9. Esquema de los reporteros pTOPFLASH y pFOPFLASH. Plásmidos pTOPFLASH y pFOPFLASH que contienen respectivamente tres copias del motivo consenso de unión de los factores TCF/LEF (CTTTGAT), o tres copias de dicho motivo mutado, TCF/LEF^{mut} (CTTTGGC), clonadas delante de un promotor mínimo del gen *c-FOS* y del gen que codifica el enzima luciferasa de luciérnaga.

El litio, vía inhibición de la quinasa GSK3 β , estimula la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF y nuestro grupo ha publicado previamente que es un activador de la expresión de *DKK-1* en células Hela y HEK-293 (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005). Así pues, analizamos mediante RT-PCR cuantitativa si EWS/FLI1 era capaz de antagonizar el efecto del litio sobre la expresión de *DKK-1* en células Hela TeT-E/F. Como se muestra en la [figura 6B](#), la inducción de EWS/FLI1 inhibió claramente el efecto del litio sobre la activación de *DKK-1*.

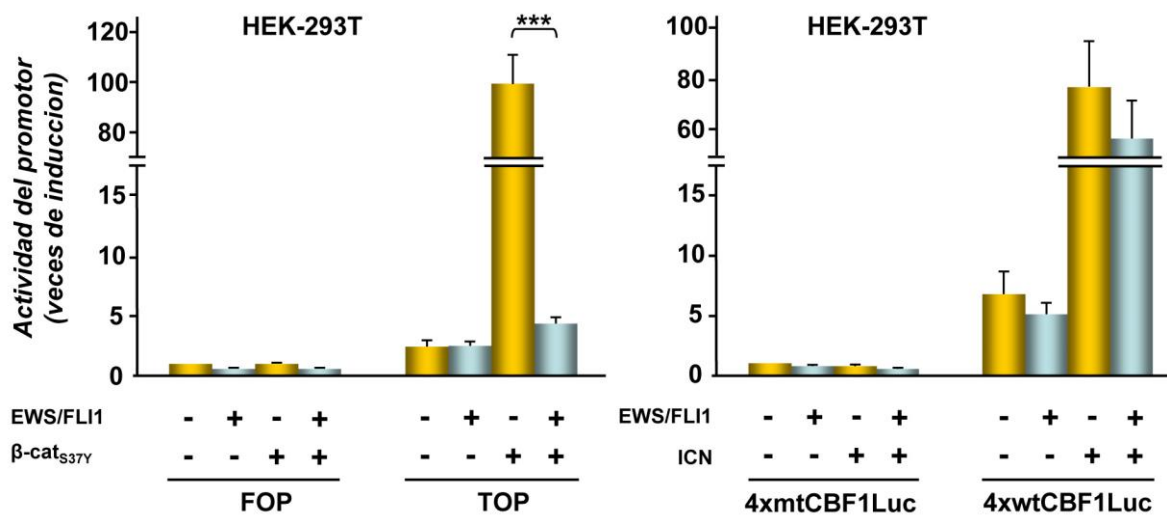


Figura 10. EWS/FLI1 inhibe la actividad transcripcional β -catenina/TCF. Las células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), para evaluar la actividad transcripcional de la ruta Wnt/ β -catenina (panel izquierdo) o con los reporteros de la ruta Notch (4xwtCBF1Luc, 4xmtCBF1Luc, panel derecho), junto con un vector de expresión de β -cat_{S37Y} (+, panel izquierdo) o ICN (+, panel derecho) y en presencia (+) o ausencia (-) de un plásmido de expresión de EWS/FLI1. Como control interno usamos el plásmido pRL-TK. Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada usando ANOVA: ***p<0,001.

En resumen, nuestros resultados indican que EWS/FLI1 reprime tanto la expresión basal de *DKK-1* como la mediada por la activación de los complejos β -catenina/TCF, y que esta propiedad parece ser intrínseca a la proteína EWS/FLI1 e independiente del contexto celular.

1.2. EWS/FLI1 INHIBE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *DICKKOPF-1* MEDIADA POR EL COMPLEJO β -CATENINA/TCF

Usando un fragmento de 2.2 Kb del promotor del gen *DKK-1* humano, clonado delante del gen testigo luciferasa (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005) examinamos si EWS/FLI1 regula la transcripción de *DKK-1*. En línea con los resultados previos, la expresión de EWS/FLI1 en células HEK-293T produjo una inhibición del 56% en la actividad basal del promotor de *DKK-1* (Figura 7A). Sin embargo, tras el análisis de la secuencia de ADN de este fragmento de promotor no conseguimos identificar secuencias fiables de unión de factores ETS que pudieran ser reconocidas por EWS/FLI1, lo que sugiere que la represión de la expresión de *DKK-1* por EWS/FLI1 se lleva a cabo por un mecanismo indirecto.

Estudios previos de nuestro grupo y de otros han demostrado que el promotor de *DKK-1* presenta múltiples sitios de unión para factores TCF/LEF (Niida A *et al.*, 2004; Chamorro MN *et al.*, 2005; Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005), Figura 7B). Por ello, pensamos que sería interesante analizar si EWS/FLI1 podría interferir con la transcripción de *DKK-1* dependiente de los complejos β -catenina/TCF. Como se muestra en la figura 7A, EWS/FLI1 inhibe la activación del promotor de *DKK-1* tanto por β -catenina (70%) como por una forma constitutivamente activa de β -catenina (83%), que no puede ser degradada (β -catenina S37Y, β -cat_{S37Y}).

Con el fin de confirmar si los efectos de EWS/FLI1 sobre la actividad del promotor de *DKK-1* eran mediados a través de los sitios de unión TCF/LEF, utilizamos una serie de deleciones del promotor (Figura 7B) que habían sido previamente descritas por nuestro grupo (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que había una correlación alta entre la activación mediada por β -catenina y el número de sitios de unión TCF/LEF presentes en la construcción; y que EWS/FLI1 inhibía eficientemente todas las construcciones que contenían sitios TCF/LEF (Figura 8A). Adicionalmente, generamos mutaciones puntuales en la construcción más corta del promotor (-231/+112**) que destruyen sus dos sitios TCF/LEF (Figura 7B). En la figura 8B mostramos que la inducción de la construcción corta del promotor de *DKK-1* (-231/+112) por β -catenina es reducida eficientemente por EWS/FLI1, mientras que EWS/FLI1 no tiene efecto inhibitorio sobre la versión mutada (-231/+112**),

lo que indica que EWS/FLI1 interfiere con la actividad de β -catenina sobre los sitios TCF/LEF.

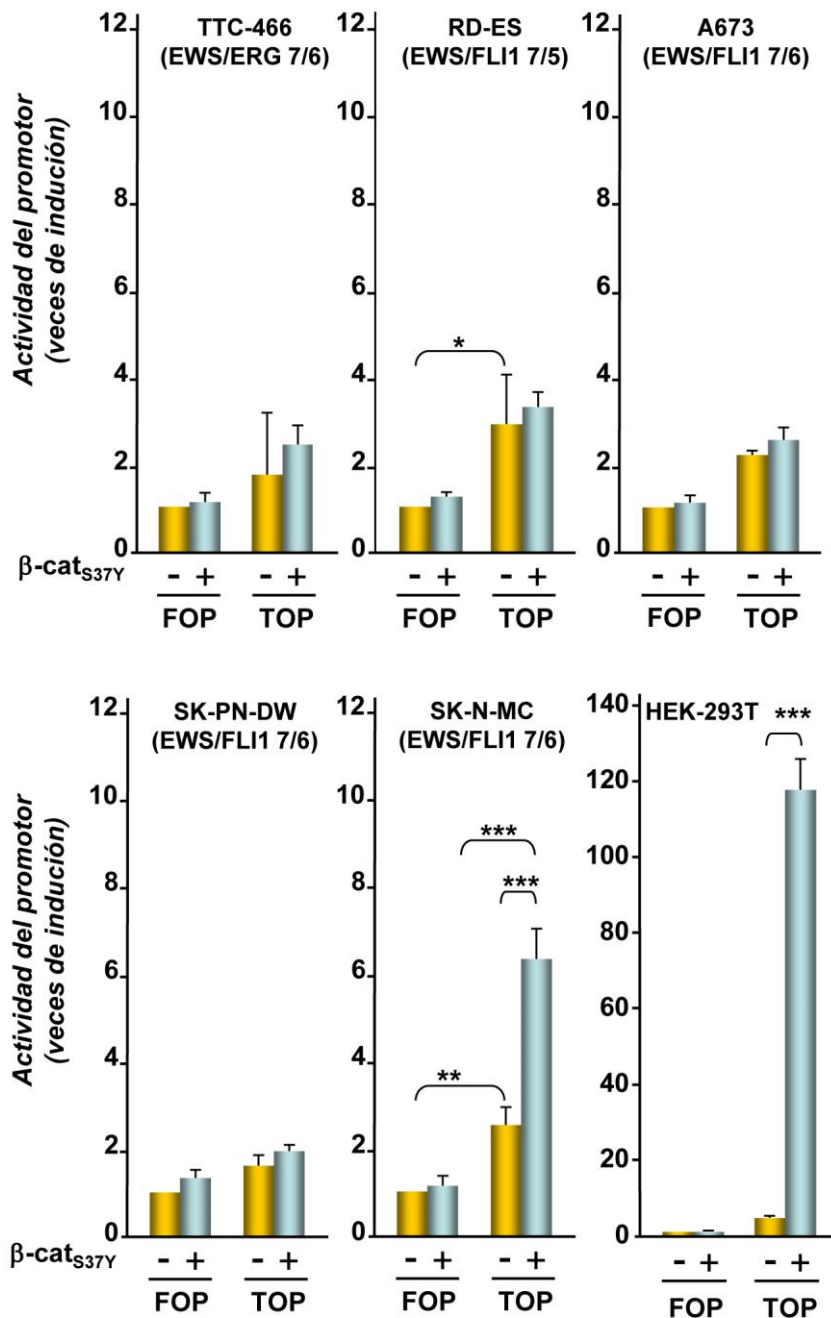


Figura 11. La actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF está inhibida en células de ESFT. Las células de ESFT y HEK-293T fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), y con β -cat_{S37Y} (+) o vector vacío (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada usando ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Se muestra el tipo de translocación EWS/ETS con indicación de los exones involucrados en la fusión de los dos genes.

1.3. EWS/FLI1 INHIBE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR EL COMPLEJO β -CATENINA/TCF

El antagonismo existente entre EWS/FLI1 y los complejos β -catenina/TCF en la regulación del promotor de *DKK-1* nos hizo plantearnos si el efecto era específico para este gen o, por el contrario, derivado de una acción más general de EWS/FLI1 sobre la transcripción mediada por los complejos β -catenina/TCF. Con el fin de abordar experimentalmente este planteamiento utilizamos los plásmidos reporteros pTOPFLASH y pFOPFLASH que contienen respectivamente tres copias del motivo consenso de unión de los factores TCF/LEF (CTTTGAT), o tres copias de dicho motivo mutado (CTTTGGC), clonadas delante del gen que codifica el enzima luciferasa de luciérnaga (Figura 9, (Korinek V *et al.*, 1997)). Ambos plásmidos, muy conocidos en el campo, han sido utilizados en numerosos trabajos para evaluar la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF (Korinek V *et al.*, 1997).

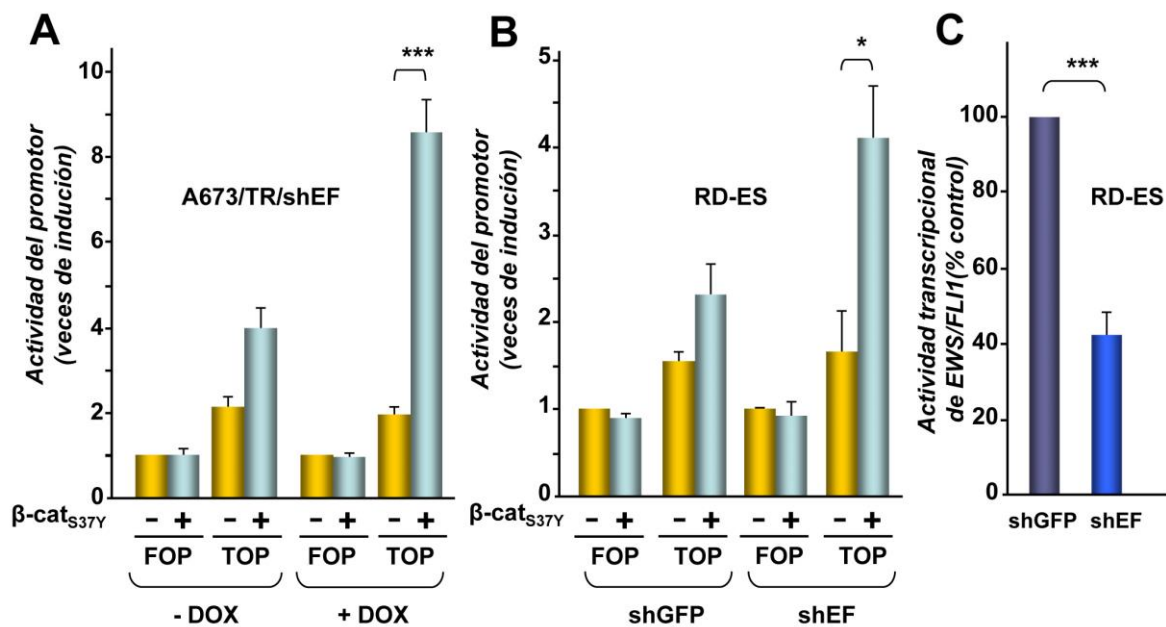


Figura 12. El silenciamiento de EWS/FLI1 en células de ESFT rescata la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF. **(A)** Las células A673/TR/shEF fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), y con β -cat_{37Y} (+) o su vector vacío (-). Se les añadió doxiciclina (1 μ g/ml) o vehículo 24 h después de la transfección y se lisaron 48 h más tarde. En los extractos, se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, usándose esta última como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: ***p<0,001. **(B)** La línea celular de ESFT RD-ES fue co-transfectada con los plásmidos pTOPFLASH o pFOPFLASH, β -cat_{37Y} (+) o su vector vacío (-), y un vector que contiene un shARN control (shGFP) o un shARN específico de EWS/FLI1 (shEF). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada usando ANOVA: ***p<0,05. **(C)** Las células RD-ES fueron co-transfectadas con el plásmido reportero pGL3-promDAX1/A4573 junto con shGFP o shEF. Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y procesadas como en (B) ***p<0,001.

Como se puede ver en el panel izquierdo de la figura 10, la expresión transitoria de EWS/FLI1 en células HEK-293T bloqueó eficientemente la activación del plásmido reportero pTOPFLASH por β -cat_{37Y}. Este efecto es específico, ya que la activación de un plásmido

reportero de la vía Notch (4xwtCBF1Luc, (Hsieh JJ *et al.*, 1996)) por su activador natural, el dominio intracelular del receptor Notch (ICN: *IntraCellular Notch*) no se vió afectada por EWS/FLI1 (Figura 10, panel derecho).

A la vista de los resultados anteriores y dado que las células de ESFT expresan EWS/FLI1 de forma endógena, nos preguntamos si la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF estaría inhibida de forma constitutiva en estas células. Para evaluar esta hipótesis, utilizando los plásmidos pTOPFLASH y pFOPFLASH, analizamos la respuesta transcripcional a β -cat_{S37Y} de varias líneas de ESFT. Lo primero que nos llamó la atención, fue que la actividad basal de los complejos β -catenina/TCF era baja (razón pTOPFLASH/pFOPFLASH \sim 2, Figura 11, columnas amarillas). Además, como habíamos hipotetizado, β -cat_{S37Y} era incapaz de estimular la transcripción dependiente de los sitios β -catenina/TCF del plásmido pTOPFLASH en células de ESFT, algo que sí hacía en las células HEK-293T, que usamos como control positivo (Figura 11).

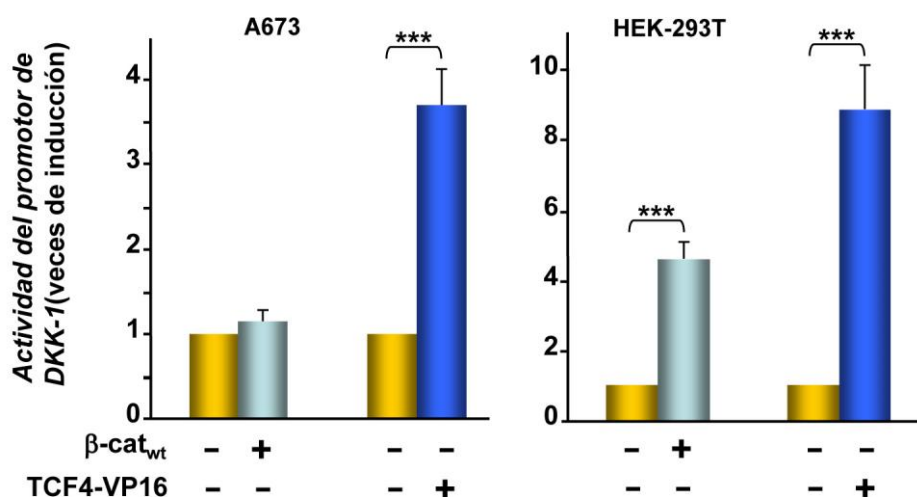


Figura 13. Una versión constitutivamente activa de TCF4 (TCF4-VP16), pero no β -catenina, puede activar la transcripción de *DKK-1* en células A673 de ESFT. Las células A673 y HEK-293T (control positivo) fueron co-transfectadas con el plásmido reportero del promotor de *DKK-1* y el plásmido pRL-TK, junto con β -cat_{wt} (+), TCF4-VP16 (+) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y de *Renilla*. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: ***p<0,001.

Por otro lado, si la activación dependiente de β -catenina/TCF está bloqueada por EWS/FLI1 en células de ESFT, el silenciamiento de EWS/FLI1 debería restaurar la capacidad de β -cat_{S37Y} de estimular el plásmido pTOPFLASH en estas líneas. Efectivamente, el silenciamiento de EWS/FLI1 tras el tratamiento con doxiciclina de la línea celular A673/TR/shEF (Figura 12A), o tras la transfección transitoria de un shARN dirigido contra EWS/FLI1 en la línea celular RD-ES (Figura 12B), produjo un incremento significativo de la actividad transcripcional β -catenina/TCF en respuesta a β -cat_{S37Y}. Para comprobar que la expresión

transitoria del shARN de EWS/FLI1 en células RD-ES inhibía eficientemente la actividad transcripcional de EWS/FLI1 utilizamos un plásmido reportero que contiene un fragmento del promotor del gen *DAX1*, que es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1 (Kinsey M *et al.*, 2006; Garcia-Aragoncillo E *et al.*, 2008); ver Materiales y Métodos). En la [figura 12C](#) podemos ver cómo la expresión transitoria del shARN de EWS/FLI1 inhibió significativamente (58%) la actividad transcripcional de EWS/FLI1, lo que sugiere una reducción en los niveles de proteína. En resumen, todos estos datos apoyan la hipótesis de que EWS/FLI1 inhibe la actividad transcripcional de los complejos β -catenina/TCF en células de ESFT.

Tabla 5. Principales 20 grupos de genes que muestran sitios de unión de factores de transcripción conservados en sus promotores y que ven reprimida su expresión significativamente por EWS/FLI1 en la línea celular de ESFT, A673. El grupo de genes que contienen sitios de unión específicos para LEF-1 en sus promotores aparece resaltado

Grupo de genes	Factor de transcripción (Símbolo del Gen)	Factor de transcripción (Nombre)	Secuencia de sitio de unión(*)	Numero de genes en el grupo	NOM p-val	FDR q-val
V\$PAX4_Q3	PAX4	paired box gene 4	NNNNNYCACCCB	208	<0.01	0.129
V\$LFA1_Q6	LFA1	lymphocyte function-associated antigen 1	GGGSTCWR	202	<0.01	0.130
TGGAAA_V\$NFAT_Q4_Q1	NFAT	nuclear factor of activated T-cells	TGGAAA	1481	<0.01	0.130
TGCCAAR_V\$NF1_Q6	NF1	neurofibromin 1; neurofibromatosis 1	TGCCAAR	546	<0.01	0.130
V\$GATA1_Q4	GATA1	GATA binding protein 1; globin transcription factor 1	NNCWGATARNNNN	175	<0.01	0.130
TGCTGAY_UNKNOWN	UNKNOWN	Unknown	TGCTGAY	414	<0.01	0.130
AAAYRNCTG_UNKNOWN	UNKNOWN	Unknown	AAAYRNCTG	296	<0.01	0.131
V\$CEBP_Q3	CEBP	CCAAT/enhancer binding protein, alpha	NNNTKNNGNAAN	192	<0.01	0.131
CTTTGT_V\$LEF1_Q2	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	CTTTGT	1589	<0.01	0.132
YATGNWAAT_V\$OCT_C	UNKNOWN	Unknown	YATGNWAAT	295	<0.01	0.132
V\$OCT1_Q5	POU2F1	POU domain, class 2, transcription factor 1; Octamer-binding transcription factor-1	MKVATTGTCATATT	198	<0.01	0.133
V\$GR_Q6_Q1	NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; glucocorticoid receptor	NNTGTYCT	222	<0.01	0.133
V\$IK2_Q1	UNKNOWN	Unknown	NNNTGGGAWNNC	214	<0.01	0.133
V\$HNF3ALPHA_Q6	FOXA1	forkhead box A1; Hepatocyte Nuclear Factor 3 alpha (HNF3A)	TRTTTGYTYWN	170	<0.01	0.134
V\$OCT_Q6	UNKNOWN	Unknown	TNATTTGCATN	209	<0.01	0.134
V\$CEBP_Q1	CEBP	CCAAT/enhancer binding protein, alpha	NNTKTGGWNANNN	224	<0.01	0.135
V\$OCT1_Q3	POU2F1	POU domain, class 2, transcription factor 1; Octamer-binding transcription factor-1	NNNRATAATNANNN	187	<0.01	0.135
V\$NF1_Q6_Q1	NF1	NF1(neurofibromin1, neurofibromatosis 1)	NTGGNNNNNGCCAANN	208	<0.01	0.136
V\$CACBINDINGPROTEIN_Q6	UNKNOWN	Unknown	GRGGSTGGG	199	<0.01	0.136
GCTNWTGK_UNKNOWN	UNKNOWN	Unknown	GCTNWTGK	243	<0.01	0.137

(*) Las secuencias de sitios de unión están catalogadas en (Xie X *et al.*, 2005) y representan elementos reguladores conocidos en promotores conservados en genomas de humano, ratón, rata y perro.

Los resultados previos permitían hipotetizar que al menos una serie de genes diana de β -catenina/TCF deberían ser inhibidos por EWS/FLI1. Para intentar confirmar esta hipótesis, realizamos un análisis bio-informático denominado “*Gene Set Enrichment Analysis*” (GSEA) (Subramanian A *et al.*, 2005), que sirve para determinar si una lista de genes (en nuestro caso, genes que comparten un sitio de unión específico para un factor de transcripción concreto) está enriquecida en genes de una segunda lista (en nuestro caso, la lista de genes regulados por EWS/FLI1 en células A673). Para nuestro análisis utilizamos 615 listas con genes que comparten el sitio de unión para un factor de transcripción concreto, según están definidos en la base de datos TRANSFAC (versión 7.4, <http://www.generegulation.com/>), y conservados

en el genoma humano, de rata, ratón y perro (Xie X *et al.*, 2005). Estas listas se enfrentaron contra nuestra segunda lista de genes regulados por EWS/FLI1 en células A673 utilizando el método estadístico de la *t* de Student. En el análisis GSEA, identificamos varias listas de genes que están enriquecidas significativamente en genes regulados negativamente por EWS/FLI1 en células A673. (Tabla 5).

Una de estas listas, en posición 9, contiene genes con el sitio de unión del factor de transcripción LEF-1 (CTTTGT), apoyando nuestra hipótesis y sugiriendo que la represión de genes diana de los factores TCF/LEF es una característica general de la proteína EWS/FLI1. Adicionalmente, comparamos la lista de genes reprimidos por EWS/FLI1 en células A673 con la lista de genes diana de TCF/LEF disponible en "*The Wnt Homepage*" (<http://www.stanford.edu/~musse/pathways/targets.html>). Esta comparación mostró que una proporción significativa de genes activados por los complejos β -catenina/TCF eran reprimidos por EWS/FLI1 en la línea celular A673 (Tabla 6). Además, también observamos

Tabla 6. Lista de genes activados por β -catenina/TCF (<http://www.stanford.edu/~musse/pathways/targets.html>) y reprimidos por EWS/FLI1 en la línea celular de ESFT, A673

Simbolo del gen	Nombre del gen	Referencia(1)	Veces de incremento (2)	P-value (T Test)
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	Wielenga et al. 1999	13.9	0.00086
DKK1	dickkopf homolog 1	Niida et al 2004 Gonzalez-Sancho et al. 2004 Chamorro et al. 2004	7.1	0.00179
FZD7	frizzled homolog 7	Willert et al. 2002	6.4	0.00086
EPHB2	EPH receptor B2	Battle et al. 2002	6.1	0.00017
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	Wu et al. 2007	5.8	0.00021
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Si et al. 2006	5.6	0.00271
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Howe et al. 1999 Haertel-Wiesmann et al. 2000	5.3	0.00449
RUNX2	runt-related transcription factor 2	Dong et al. 2006	4.1	0.00003
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	Blache et al. 2004	3.3	0.00044
FN1	fibronectin 1	Gradi et al. 1999 De Langhe et al. 2005 Ten Berge et al. 2008	3.0	0.00138
NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	Conacci-Sorrell et al. 2002	2.4	0.00669
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	Barker et al. 2007	2.4	0.00008
L1CAM	L1 cell adhesion molecule	Gavert et al. 2005	2.3	0.00894
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	Tan et al. 2005	2.3	0.00026
RARG	retinoic acid receptor, gamma	McGrew et al. 1999	2.2	0.00024
RET	ret proto-oncogene	Zheng et al. 1996	2.1	0.00004
FST	follistatin	Willert et al. 2002 Yao et al. 2005	2.0	0.00058

(1) Referencias donde se describen activaciones dependientes de β -catenin/TCF; (2) Veces de inducción de la expresión de los genes después del silenciamiento de EWS/FLI1 en la línea celular A673/TR/shEF

que los genes de otros componentes de la vía Wnt, que no habían sido previamente identificados como genes diana de β -catenina/TCF, eran reprimidos por EWS/FLI1. Entre ellos podemos citar a *KREMEN1* (un receptor de DKK-1), *CTNNBIP1* (proteína de interacción

con β -catenina) o *DACT1* (Dapper, antagonista de β -catenina). En resumen, estos análisis indican que la represión de genes diana de TCF/LEF podría ser una característica general de la proteína EWS/FLI1 en células de ESFT.

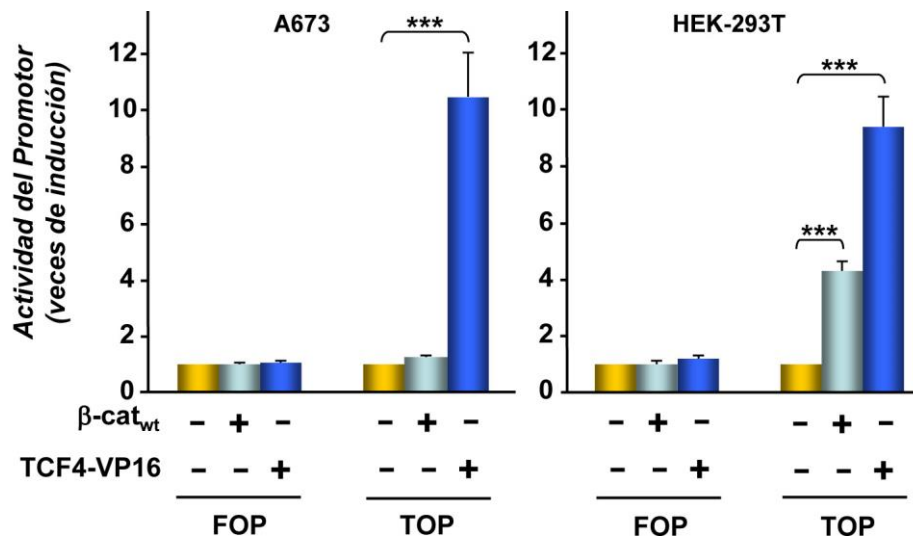


Figura 14. TCF4-VP16, pero no β -catenina, induce la actividad transcripcional β -catenina/TCF en células A673. Las células A673 y HEK-293T (control positivo) fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), junto con β -catenina (+, β -cat_{wt}), TCF4-VP16 (+) o los correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y de *Renilla*. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: ***p<0,001.

1.4. LA EXPRESIÓN DE UNA FORMA CONSTITUTIVAMENTE ACTIVA DE TCF4 RESCATA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL β -CATENINA/TCF EN CÉLULAS DE SARCOMA DE EWING.

Los resultados anteriores indican que las células de ESFT tienen bloqueada la respuesta transcripcional al complejo β -catenina/TCF. Si esto es así, β -catenina debería ser incapaz de activar la transcripción de *DKK-1* en la línea celular A673. Confirmando esta hipótesis, nuestros resultados demostraron que efectivamente β -catenina no era capaz de estimular la transcripción mediada por el promotor de *DKK-1* en estas células, mientras sí indujo un incremento de 4,5 veces en la línea control HEK-293T (Figura 13).

Seguidamente, nos preguntamos si EWS/FLI1 estaría bloqueando la acción del complejo β -catenina/TCF interfiriendo con la unión de éste a los elementos de respuesta a Wnt presentes en los promotores de los genes diana. Para intentar responder a esta pregunta utilizamos una construcción constitutivamente activa del factor de transcripción TCF4 (TCF4-VP16) generada mediante su fusión a un co-activador viral, VP16 (Gonzalez-Sancho JM *et al.*, 2005). TCF4-VP16 está activo de forma constitutiva y su actividad transcripcional es independiente de la unión a β -catenina. En claro contraste con la respuesta a β -catenina, TCF4-VP16 activó

la transcripción de *DKK-1* en células A673 de forma comparable a como lo hizo en células HEK-293T (Figura 13).

En la misma línea, el plásmido pTOPFLASH, que no es estimulado por β -catenina en células A673, fue activado aproximadamente 10 veces por TCF4-VP16 (Figura 14). Además, a diferencia de lo que ocurre con β -catenina, la activación de pTOPFLASH por TCF4-VP16 no pudo ser inhibida por EWS/FLI1 en células HEK-293T (Figura 15). Así pues, nuestros datos indican que una forma constitutivamente activa de TCF4 (TCF4-VP16), es capaz de unirse a los elementos de respuesta β -catenina/TCF en los promotores de sus genes diana, estimulando la transcripción de los mismos, y EWS/FLI1 es incapaz de interferir con esta unión.

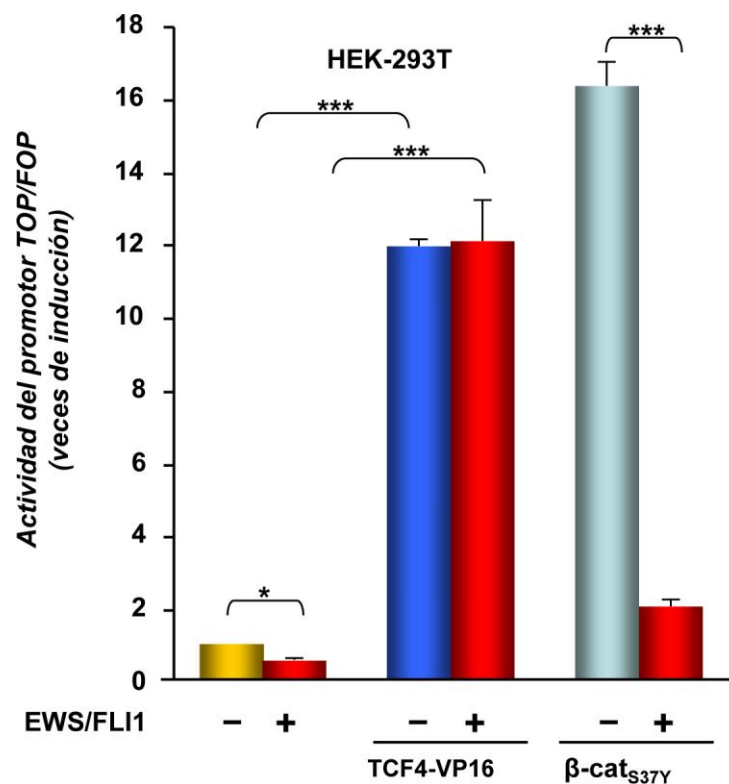


Figura 15. El efecto inhibitorio de EWS/FLI1 sobre la transcripción mediada por los complejos β -catenina/TCF no se debe a una inhibición de la unión de los factores TCF/LEF al ADN. Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), junto con β -cat_{S37Y} (+), TCF4-VP16 (+), EWS/FLI1 (+) o los correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y de *Renilla*. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: *p<0,05; ***p<0,001.

2. MECANISMO DE INHIBICION DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA MEDIADO POR EWS/FLI1

2.1. EWS/FLI1 NO INTERFIERE CON EL TRANSPORTE de β -CATENINA AL NÚCLEO

La proteína β -catenina tiene la propiedad de movilizarse desde la membrana o el citoplasma al núcleo, donde ejerce su papel como co-activador de los factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Stadeli R *et al.*, 2006; Willert K y Jones KA, 2006; Mosimann C *et al.*, 2009; Takemaru K *et al.*, 2009; Jamieson C *et al.*, 2012). Así, la acumulación de β -catenina en el citoplasma, al inhibirse su degradación en respuesta a factores Wnt (Mosimann C *et al.*, 2009), conlleva su transporte al núcleo y la consiguiente activación de la transcripción mediada por los complejos β -catenina/TCF. Por el contrario, la actividad transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina disminuye si el transporte de β -catenina al núcleo es bloqueado por diversos factores (Mosimann C *et al.*, 2009). A la vista de nuestros resultados, nos planteamos la posibilidad de que la proteína EWS/FLI1 pudiera disminuir la actividad transcripcional β -catenina/TCF y consecuentemente la expresión de *DKK-1* mediante el bloqueo del transporte de β -catenina al núcleo. Para confirmar o refutar esta hipótesis, realizamos ensayos de fraccionamiento subcelular y *western blot* en células A673 de ESFT tratadas con medio condicionado por Wnt3a. Estos experimentos demostraron que β -catenina se acumula en el citosol y en el núcleo de estas células en respuesta a Wnt3a (Figura 16), lo que descarta un efecto de EWS/FLI1 sobre el transporte de β -catenina al núcleo.

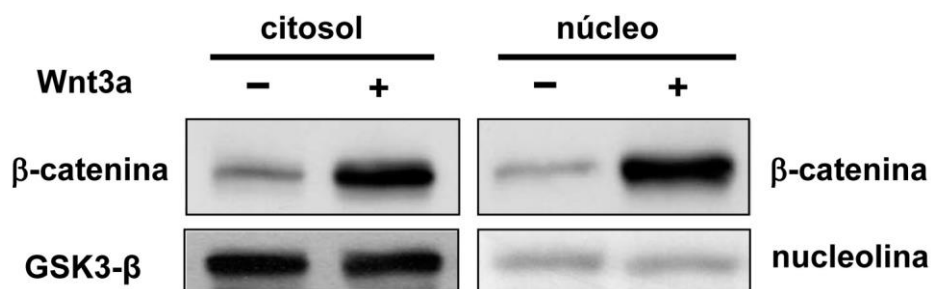


Figura 16. β -catenina se acumula en el citosol de las células A673 y entra en el núcleo en respuesta a Wnt3a. Las células A673 fueron tratadas con medio condicionado control (-) o con Wnt3a (+) durante 3 h. Las muestras de proteína fueron obtenidas como se describe en *Materiales y métodos*. En los *western blots* de las fracciones citosólicas (izquierda) y nucleares (derecha) se usó el anticuerpo anti- β -catenina. Como controles de carga citosólico y nuclear se usaron GSK3 β y nucleolina, respectivamente.

Además, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de células de cáncer de colon SW480-ADH, transfectadas con EWS/FLI1, con el fin de determinar si la localización nuclear de β -catenina en estas células se ve alterada por la oncoproteína (Figura 17). Las

imágenes muestran claramente que EWS/FLI1 no afecta a la localización nuclear de β -catenina, aunque no podemos descartar un ligero efecto sobre sus niveles.

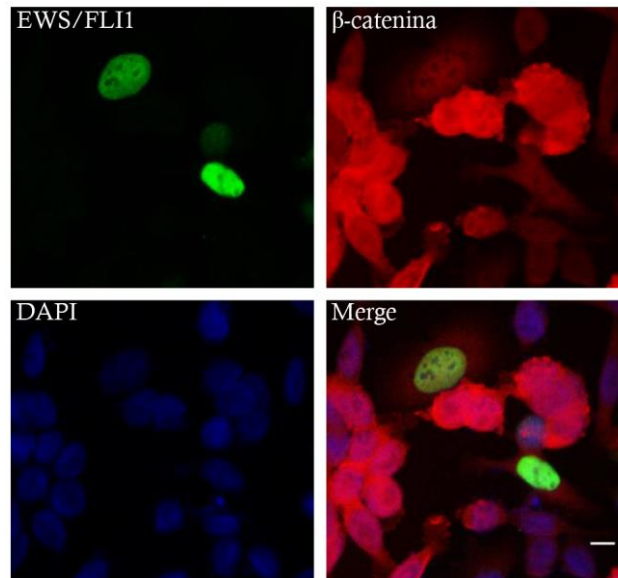


Figura 17. La proteína EWS/FLI1 no afecta al patrón de expresión de β -catenina en células SW480-ADH. Imágenes de microscopía confocal de un plano ecuatorial de células SW480-ADH transfectadas con EWS/FLI1. La expresión de β -catenina (rojo) y EWS/FLI1 (verde) se analizó mediante inmunofluorescencia; los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala, 10 μ m.

Por otro lado, se sabe que, en células epiteliales, β -catenina forma parte de las uniones adherentes de la membrana plasmática donde forma complejos con otras proteínas entre las que destaca la E-cadherina (Heuberger J y Birchmeier W, 2010). En este sentido, nuestro grupo ha descrito anteriormente en células de cáncer de colon que la inducción de E-cadherina hace que β -catenina se relocalice en la membrana plasmática disminuyendo su transporte al núcleo y por consiguiente, la actividad transcripcional β -catenina/TCF (Palmer HG *et al.*, 2001). Aunque E-cadherina es un marcador epitelial y no se considera marcador de sarcomas, algunos autores han demostrado la expresión de E-cadherina en tumores de Ewing, al menos en determinados contextos o líneas celulares (Sanceau J *et al.*, 2003; Tirado OM *et al.*, 2006; Kang HG *et al.*, 2007). Otros, sin embargo, siguen negando su expresión generalizada en este tipo de tumores (Schuetz AN *et al.*, 2005). A pesar de estas discrepancias, para descartar un posible papel de E-cadherina en el efecto que EWS/FLI1 tiene sobre la actividad β -catenina/TCF, se realizaron ensayos con el plásmido reportero pTOPFLASH en células de cáncer de colon LS174T que no expresan E-cadherina debido a una mutación en su gen (*CDH1*/E-cadherina) que impide la traducción de la proteína (Efsthathiou JA *et al.*, 1999).

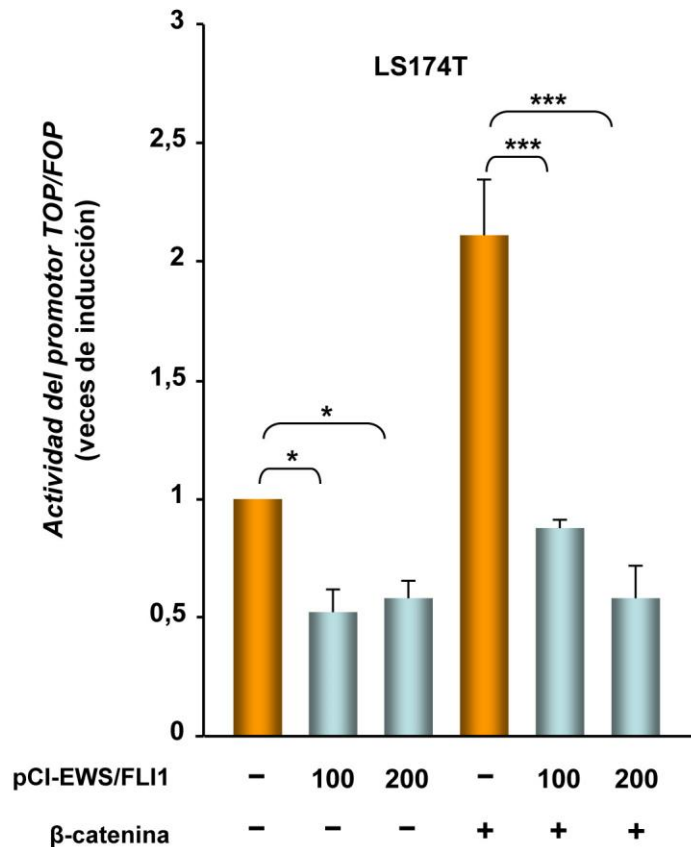


Figura 18. La proteína EWS/FLI1 inhibe la actividad Wnt/ β -catenina en células que carecen de E-cadherina (LS174T). Las células LS174T fueron co-transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFLASH o pFOPFLASH (representados en la figura 9), y β -catenina (+) o su correspondiente vector vacío (-) en presencia o ausencia (-) de las cantidades indicadas de EWS/FLI1 (en ng). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, respectivamente. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Como se puede ver en la [figura 18](#), EWS/FLI1 inhibió la actividad transcripcional β -catenina/TCF en las células LS174T, descartándose así que el mecanismo de acción de EWS/FLI1 implique el secuestro en membrana de β -catenina unida a E-cadherina.

Por otro lado, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de células HEK-293T, transfectadas con EWS/FLI1, con el fin de determinar si se ve alterada la localización en membrana de la proteína β -catenina en presencia de la oncoproteína ([Figura 19](#)). Las imágenes muestran claramente que EWS/FLI1 no afecta a la localización de β -catenina en la membrana plasmática.

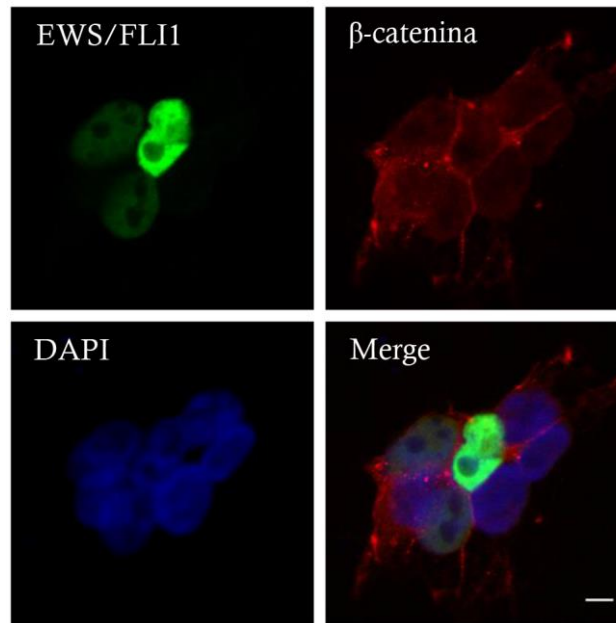


Figura 19. La proteína EWS/FLI1 no afecta al patrón de expresión de β -catenina en células HEK-293T. Imágenes de microscopía confocal de un plano ecuatorial de células HEK-293T transfectadas con EWS/FLI1. La expresión de β -catenina (rojo) y EWS/FLI1 (verde) se analizó mediante inmunofluorescencia; los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala, 10 μ m.

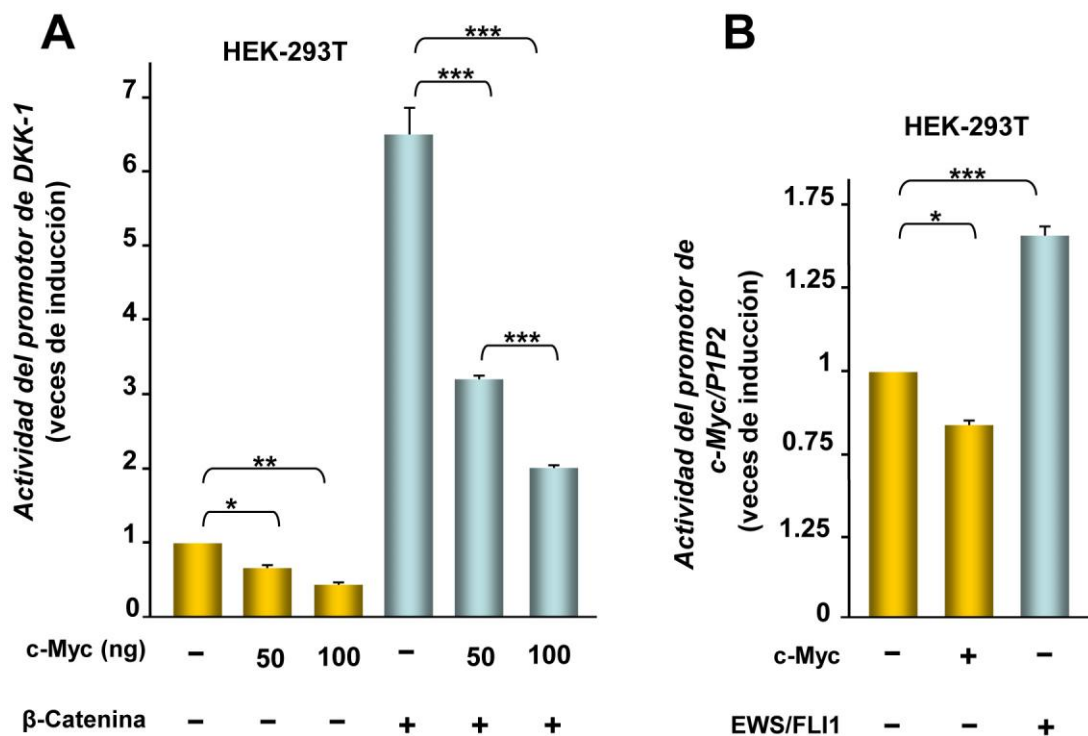


Figura 20. (A) Represión del promotor de *DKK-1* por la proteína *c-Myc* en células HEK-293T. Las células HEK-293T fueron co-trasfectadas con el plásmido reportero del promotor de *DKK-1* (-2238/+112) junto con vectores de expresión de β -catenina (+), *c-Myc* (50 o 100 ng) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, respectivamente. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Activación del promotor de *c-MYC* por la proteína EWS/FLI1 en células HEK-293T. Las células HEK-293T fueron co-trasfectadas con el plásmido reportero del promotor de *c-MYC* (*c-Myc/P1P2*) junto con vectores de expresión de EWS/FLI1 (+), *c-Myc* (+) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y fueron procesadas como en (A). Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada igual que en (A).

2.2. EL PROTO-ONCOGÉN *c-MYC* INHIBE LA EXPRESIÓN DEL GEN *DICKKOPF-1* DE FORMA INDEPENDIENTE DE EWS/FLI1

Estudios realizados por varios grupos han demostrado que el proto-oncogén *c-MYC* está expresado a niveles muy elevados en la mayoría de líneas celulares de ESFT (Bailly RA *et al.*, 1994; Dauphinot L *et al.*, 2001; Nishimori H *et al.*, 2002).

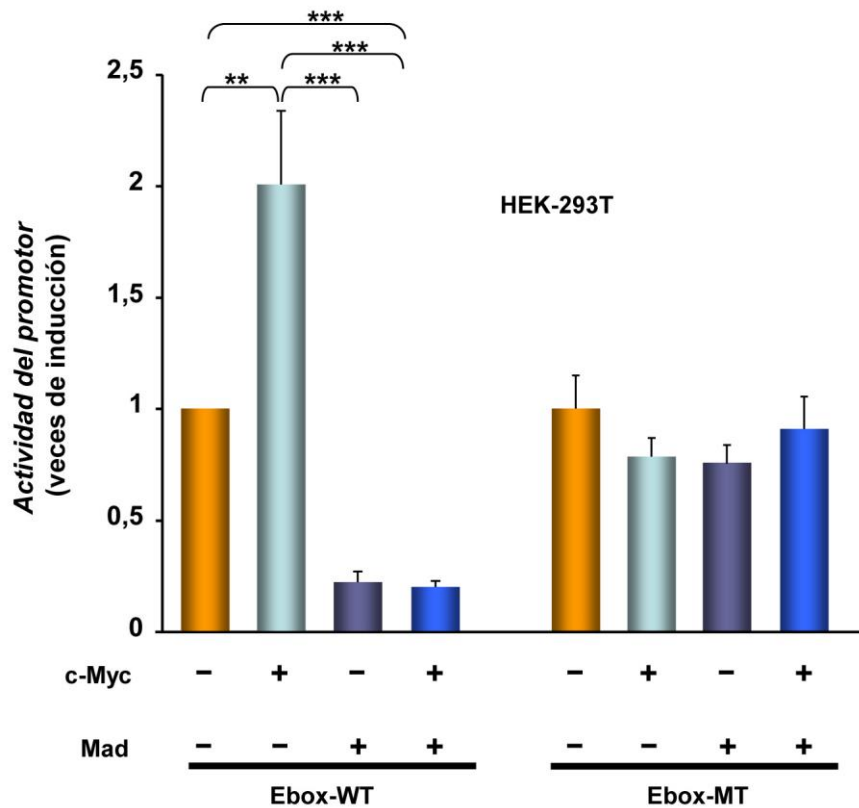


Figura 21. Mad bloquea la actividad transcripcional de *c-Myc* en células HEK-293T. Las células HEK-293T fueron co-trasfectadas con los plásmidos reporteros Ebox-WT o Ebox-MT y pRL-TK, junto con los vectores de expresión de Mad (+), *c-Myc* (+) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, respectivamente. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ebox-WT= elemento de respuesta a *c-Myc*; Ebox-MT= elemento de respuesta a *c-Myc* con los sitios de unión mutados.

La proteína *c-Myc* es un factor de transcripción implicado en numerosos procesos celulares, entre los que se encuentran el desarrollo embrionario, la organogénesis, el ciclo celular, la apoptosis (Meyer N y Penn LZ, 2008; Luscher B y Vervoorts J, 2012) y la oncogénesis (Albihn A *et al.*, 2010; Myant K y Sansom OJ, 2011; Wang C *et al.*, 2011; Dang CV, 2012). Además, es una diana transcripcional de EWS/FLI1, lo que podría explicar su elevada expresión en tumores de Ewing (Noguera R *et al.*, 1992; Bailly RA *et al.*, 1994; Dauphinot L *et al.*, 2001; Nishimori H *et al.*, 2002). Como ya se ha comentado en la *Introducción*, se ha publicado que los genes *Id2* y *hTERT* están regulados por EWS/FLI1, y que esta regulación

podría ocurrir, en parte, a través de la proteína c-Myc (Luscher B, 2001; Fukuma M *et al.*, 2003; Janknecht R, 2004), por lo que nos planteamos la posibilidad de que la regulación de *DKK-1* por EWS/FLI1 estuviese mediada a través de c-Myc. No existían, sin embargo, evidencias publicadas que demostrasen una posible regulación de la expresión de *DKK-1* por c-Myc. Por ello, realizamos ensayos de transfección transitoria y transactivación de gen reportero con el fin de estudiar si el promotor de *DKK-1* era inhibido por la proteína c-Myc en células HEK-293T. En efecto, como se puede ver en la [figura 20A](#), la actividad basal del promotor de *DKK-1* es inhibida por c-Myc de forma dependiente de dosis. Igualmente, la activación del promotor de *DKK-1* por β -catenina es inhibida por c-Myc ([Figura 20A](#)).

Por otro lado, la expresión exógena de EWS/FLI1 en estas células era capaz de inducir de forma significativa la actividad del promotor de *c-MYC* ([Figura 20B](#)), lo que en principio se ajustaba a nuestra hipótesis en la que EWS/FLI1 inhibiría la expresión de *DKK-1* a través de la inducción de c-Myc.

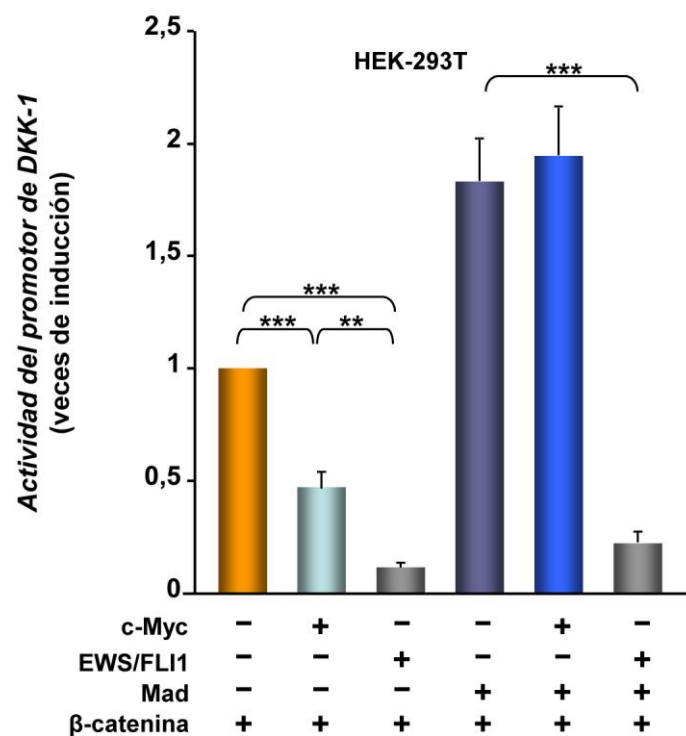


Figura 22. La inhibición del promotor de *DKK-1* mediada por EWS/FLI1 no es rescatada por el dominante negativo de c-Myc (Mad) en células HEK-293T. Las células HEK-293T fueron co-trasfectadas con el plásmido reportero del promotor de *DKK-1* (-2238/+112) y con el plásmido pRL-TK, junto con los vectores de expresión de Mad (+), c-Myc (+), β -catenina (+), EWS/FLI1 (+) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, respectivamente. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Sin embargo, una vez demostramos que la proteína c-Myc inhibe la actividad del promotor de *DKK-1* y que EWS/FLI1 es capaz de activar el promotor del gen *c-MYC* en células HEK-293T, quisimos comprobar si un inhibidor de c-Myc, la proteína Mad, era capaz de revertir la inhibición de *DKK-1* mediada por EWS/FLI1. Antes de eso, confirmamos la funcionalidad de nuestra construcción de Mad, utilizando un plásmido que contiene 4 elementos de respuesta a la proteína c-Myc (Ebox-WT) clonados delante del gen que codifica la proteína luciferasa de luciérnaga y su correspondiente control, que contiene dichos elementos mutados (Ebox-MT). Como se observa en la [figura 21](#), la proteína Mad, interfiere eficientemente la activación transcripcional mediada por c-Myc a través de las cajas E. Sin embargo, cuando estudiamos el efecto de Mad sobre la activación del promotor de *DKK-1* por β -catenina nos encontramos que, aunque Mad es capaz de revertir la inhibición inducida por c-Myc, no puede hacer lo mismo con la inhibición dependiente de EWS/FLI1 ([Figura 22](#)). Este resultado sugiere que ambos eventos son independientes, y por lo tanto EWS/FLI1 no parece inhibir el promotor de *DKK-1* a través de la proteína c-Myc.

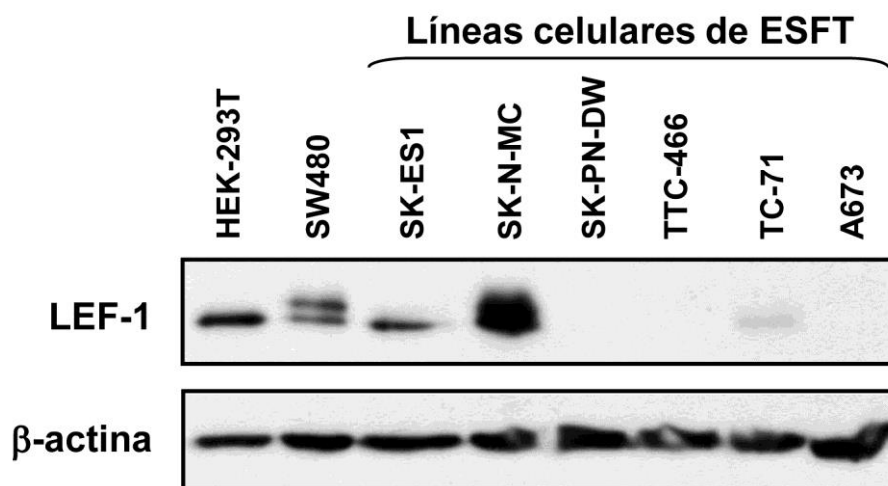


Figura 23. Expresión endógena de LEF-1 en distintas líneas de ESFT. Análisis por *western blot* de la expresión de LEF-1 en células HEK-293T, SW480 (de cáncer de colon) y una serie de líneas celulares de ESFT. Se usó β -actina como control de carga.

2.3. EWS/FLI1 INTERFIERE CON LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO β -CATENINA/LEF-1

La transcripción de los genes diana de la vía Wnt/ β -catenina es dependiente de la interacción entre β -catenina y los factores TCF/LEF (Stadeli R *et al.*, 2006; Willert K y Jones KA, 2006; Mosimann C *et al.*, 2009; Takemaru K *et al.*, 2009; Jamieson C *et al.*, 2012). De todos los miembros de la familia TCF/LEF, el factor LEF-1 es el más estudiado y está implicado en múltiples procesos como el desarrollo embrionario, la transición epitelio mesénquima, la diferenciación de melanocitos y la hematopoyesis (Oosterwegel M *et al.*, 1993; Takeda K *et al.*,

2000; Skromne I y Stern CD, 2001; Nawshad A y Hay ED, 2003; Schmidt M *et al.*, 2004; Skokowa J y Welte K, 2007).

Al analizar los niveles de LEF-1 en distintas líneas celulares de ESFT (Figura 23), nos dimos cuenta que la línea celular que mostraba los niveles más elevados de LEF-1, la línea celular SK-N-MC, era precisamente, la línea celular que presentaba más actividad transcripcional β -catenina/TCF (Figura 11). Por este motivo, investigamos si EWS/FLI1 podía interferir con la capacidad de β -catenina para interactuar con LEF-1. Para ello, en primer lugar, realizamos un ensayo de transfección transitoria con la construcción de 2,2 kb del promotor de *DKK-1* en células HEK-293T (Figura 24). En este experimento evaluamos la capacidad de LEF-1, de rescatar la inhibición producida por la proteína EWS/FLI1 sobre el promotor de *DKK-1*.

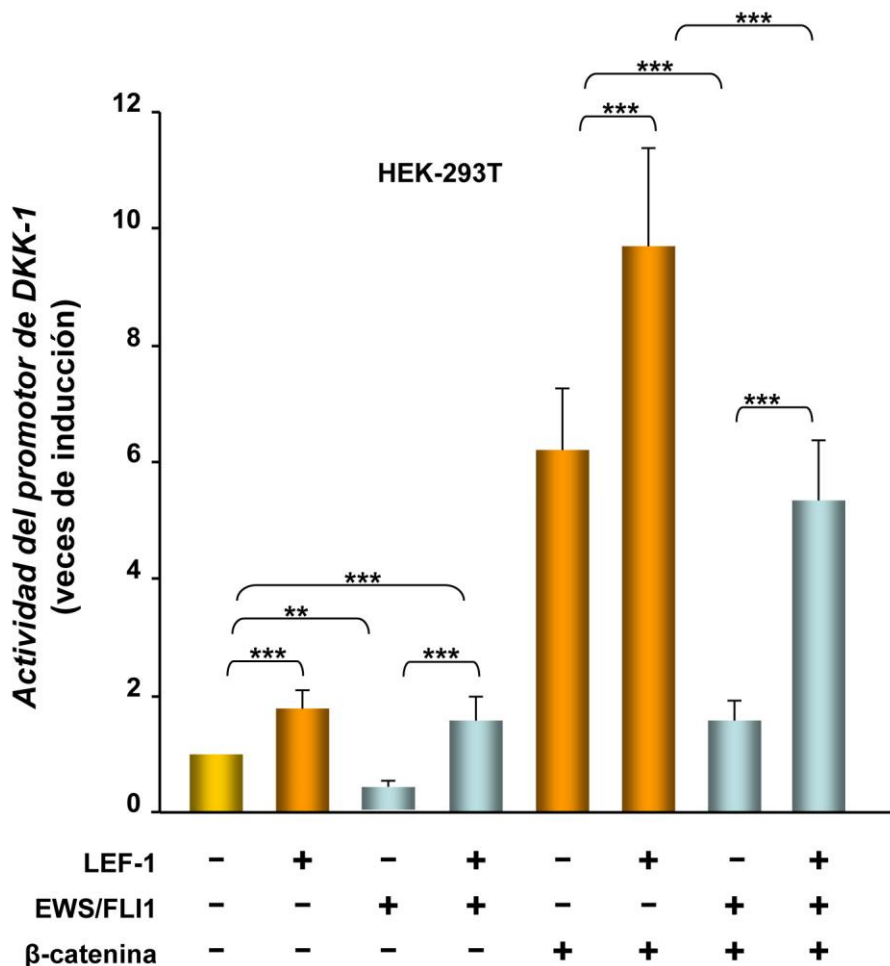


Figura 24. LEF-1 revierte parcialmente la inhibición por parte de la proteína EWS/FLI1 de la activación del promotor de *DKK-1*. Las células HEK-293T fueron co-trasfectadas con el plásmido reportero del promotor de *DKK-1* (-2238/+112) y con pRL-TK, junto con β -catenina (+), EWS/FLI1 (+), LEF-1 (+) o sus correspondientes vectores vacíos (-). Las células fueron lisadas 48 h después de la transfección y se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, respectivamente. Esta última se usó como control interno. Las barras de error representan la SD. La estadística fue generada mediante ANOVA: **p<0,01; ***p<0,001.

Como se puede apreciar en la [figura 24](#), la expresión de LEF-1 produjo una estimulación del promotor de *DKK-1* en condiciones basales. Además, potenció el efecto activador de β -catenina sobre dicho promotor. La expresión de EWS/FLI1 produjo una reducción de aproximadamente el 80% en la estimulación del promotor de *DKK-1* inducida por β -catenina. Este efecto fue revertido en gran medida por la sobreexpresión de LEF-1. Teniendo en cuenta los datos de la [tabla 5](#), que indican que es común la presencia de sitios de unión para el factor LEF-1 en los promotores de genes reprimidos por EWS/FLI1 y sumando las evidencias de la [figura 24](#), que sugieren que EWS/FLI1 posiblemente interfiere con la interacción entre β -catenina y LEF-1, diseñamos experimentos de inmunoprecipitación para investigar la posibilidad de que EWS/FLI1 interfiriese con la capacidad de β -catenina para interaccionar con LEF-1. Para ello, co-transfectamos células HEK-293T con vectores de expresión para β -cat_{S37Y} y LEF-1-HA (LEF-1 unido a una etiqueta HA), en presencia o ausencia de EWS/FLI1 e inmunoprecipitamos con un anticuerpo contra la etiqueta HA. Los datos mostraron que la cantidad de β -catenina co-inmunoprecipitada con LEF-1 era claramente inferior en presencia de EWS/FLI1 ([Figura 25A](#)), lo que indica que este factor de transcripción aberrante inhibe la formación del complejo entre β -catenina y LEF-1. Además, EWS/FLI1 era específicamente inmunoprecipitado junto con LEF-1 ([Figura 25A](#)). Por otro lado, en una inmunoprecipitación paralela, utilizando anticuerpos contra β -catenina, EWS/FLI1 fue detectado con muy baja intensidad después de una larga exposición (datos no mostrados), sugiriendo que EWS/FLI1 podría unirse preferentemente a LEF-1, compitiendo así con β -catenina por su unión a LEF-1.

En algunas réplicas de inmunoprecipitaciones similares a las de la [figura 25A](#) observamos un ligero descenso de la cantidad total de β -catenina en los extractos celulares tras la expresión de EWS/FLI1, que era variable dependiendo del experimento. Para descartar que estas pequeñas variaciones en los niveles de β -catenina fueran las responsables de los efectos que EWS/FLI1 tiene sobre la formación del complejo β -catenina/LEF-1, diseñamos un nuevo experimento en el cual las células HEK-293T fueron co-transfectadas con β -cat_{S37Y}, LEF-1-HA y concentraciones variables del plásmido de expresión de EWS/FLI1 ([Figura 25B](#)). El resultado mostrado en el panel inferior de la [figura 25B](#), confirmó que los niveles de β -catenina en el extracto total permanecieron razonablemente constantes a tres dosis diferentes de EWS/FLI1, mientras que se observa una progresiva disminución de las cantidades de β -catenina unidas a LEF-1 a medida que incrementamos la dosis de EWS/FLI1 ([Figure 25B, panel superior](#)), reforzando así la idea de que EWS/FLI1 inhibe la formación del complejo β -catenina/LEF-1 independientemente de posibles efectos pequeños que pudieran existir sobre los niveles de β -catenina.

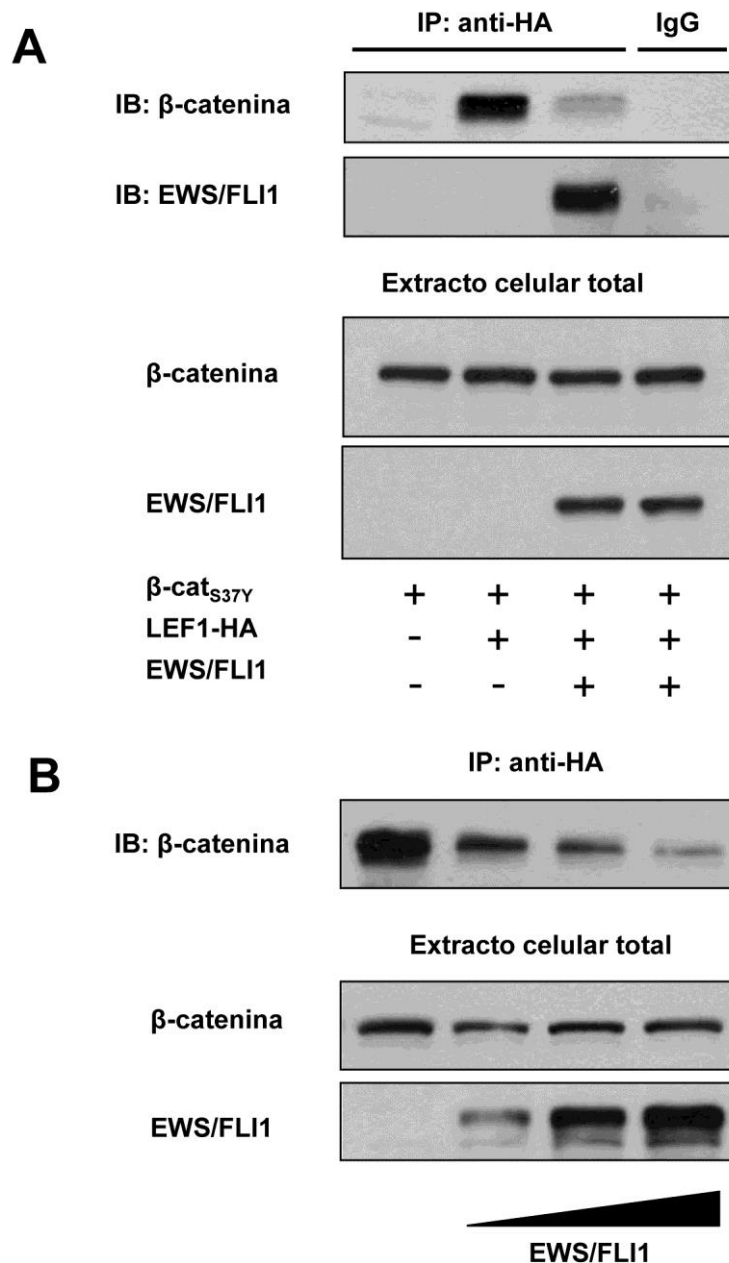


Figura 25. EWS/FLI1 se une a LEF-1 e interfiere con la formación del complejo β -catenina/LEF-1. (A) Células HEK-293T, cultivadas en placas Petri de 10 cm fueron co-transfectadas con β -cat_{S37Y} (2 μ g) y LEF-1-HA (2 μ g), en presencia (+) o ausencia (-) de EWS/FLI1 (6 μ g). 1,5 mg de extracto proteico total fue inmunoprecipitado con anticuerpos anti-HA o IgG (control) como se indica, y se analizó por *western blotting* usando anticuerpos anti- β -catenina y anti-FLI1 (paneles superiores). Los extractos totales (*inputs*) también se analizaron con estos mismos anticuerpos (paneles inferiores). IP, inmunoprecipitación; IB, *immunoblot*. (B) Células HEK-293T fueron co-transfectadas con β -cat_{S37Y} (2 μ g), LEF-1-HA (2 μ g), y diferentes dosis (0,5; 1 o 2 μ g) de EWS/FLI1. 1,5 mg del extracto total fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-HA y analizados como en (A).

Discusión

1. EFECTOS DE EWS/FLI1 SOBRE LA VÍA WNT/ β -CATENINA Y SUS GENES DIANA

Los datos experimentales disponibles hasta la fecha indican que las proteínas de fusión EWS/ETS son responsables de la tumorigénesis en los tumores de la familia del sarcoma de Ewing, principalmente actuando como factores de transcripción anómalos. Por ello, la identificación de genes regulados por estas proteínas oncogénicas representa un aspecto clave en el entendimiento de la patología molecular de estos tumores de altísima malignidad.

1.1. EL GEN *DICKKOPF-1* ES UNA DIANA TRANSCRIPCIONAL DE EWS/FLI1

En esta Tesis Doctoral demostramos que el inhibidor de la ruta Wnt/ β -catenina, *DKK-1*, es una diana transcripcional de EWS/FLI1. La expresión de *DKK-1* es inhibida por la proteína EWS/FLI1 independientemente del contexto celular y su represión en células de ESFT es revertida en presencia de shARN de EWS/FLI1. Esto concuerda con los resultados de varios análisis transcriptómicos (Prieur A *et al.*, 2004; Kinsey M *et al.*, 2006) que sugieren que *DKK-1* es un gen diana de EWS/FLI1 y está constitutivamente reprimido tanto en células como en tumores de la familia del sarcoma de Ewing.

Aunque se han descrito elementos de respuesta negativos en la región promotora de algunos genes, lo más frecuente es que la represión transcripcional mediada por un determinado factor de transcripción se deba a su interferencia con la actividad de otro factor de transcripción o con una vía de señalización. En tales casos, el factor de transcripción puede competir con otros factores de transcripción por su unión a sitios específicos en el ADN, alterar su dinámica de unión y/o su actividad de transactivación vía interacciones proteína-proteína (Pascual G y Glass CK, 2006; Kato S *et al.*, 2007).

Como la transcripción basal del promotor de *DKK-1* es inhibida por EWS/FLI1 y las células de ESFT expresan proteínas Wnt endógenas (Uren A *et al.*, 2004), una explicación posible es que EWS/FLI1 antagonice el efecto de estos factores sobre la transcripción de *DKK-1*. En este sentido, el hecho de que la paulatina eliminación de los distintos sitios de unión a β -catenina/TCF del promotor de *DKK-1* disminuya la eficiencia con la que EWS/FLI1 inhibe la activación del mismo por β -catenina, nos induce a pensar lo que hemos mostrado en este trabajo, que EWS/FLI1 antagoniza la transcripción del gen *DKK-1* mediada por β -catenina/TCF, sugiriendo que la interferencia con los complejos β -catenina/TCF es un nuevo mecanismo de represión transcripcional mediada por EWS/FLI1.

Por supuesto, no podemos descartar otras posibilidades como la unión directa de EWS/FLI1 al promotor de *DKK-1*. Esta hipótesis, sin embargo, parece improbable, pues aunque Miyagawa y colaboradores han mostrado que EWS/FLI1 es capaz de unirse al promotor de *DKK-2*, no son capaces de detectar su unión al promotor de *DKK-1* en ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (Miyagawa Y *et al.*, 2009).

1.2. LA VÍA WNT/ β -CATENINA ES CONSTITUTIVAMENTE REPRIMIDA POR EWS/FLI1 EN CÉLULAS DE ESFT

Una conclusión muy importante de nuestro estudio es que la ruta canónica Wnt/ β -catenina es constitutivamente reprimida por EWS/FLI1 en células de ESFT, sugiriendo que la inhibición de esta ruta es un paso esencial en la oncogénesis mediada por EWS/FLI1.

La actividad Wnt/ β -catenina no sólo es inhibida por EWS/FLI1 en sistemas de expresión transitorios, utilizando promotores sintéticos, en células no relacionadas con el sarcoma de Ewing. También hemos visto que la actividad basal β -catenina/TCF es baja en distintas líneas celulares de ESFT y que la activación de la ruta Wnt/ β -catenina por β -catenina en estas células se ve reprimida por la presencia de la proteína EWS/FLI1, ya que cuando se silencia la expresión de EWS/FLI1 aumenta tanto la actividad basal β -catenina/TCF como su activación por β -catenina exógena. Cabe resaltar que las células TTC-466, que portan la segunda translocación más frecuente en sarcoma de Ewing (EWS/ERG), también mostraron actividad basal β -catenina/TCF baja y resistencia a la activación con β -catenina exógena.

Dada la relación inversamente proporcional entre la expresión de EWS/FLI1 y la actividad de la ruta canónica Wnt/ β -catenina, era lógico pensar que un cierto número de genes diana de β -catenina/TCF podrían ser inhibidos por EWS/FLI1. El análisis bioinformático GSEA confirmó esta hipótesis, dejando como corolario que la represión de genes diana de TCF/LEF podría ser una característica general de la proteína EWS/FLI1 en células de ESFT.

Es interesante destacar que el antagonismo de EWS/FLI1 sobre la señalización por factores Wnt se circunscribe específicamente a la ruta canónica, ya que la señalización a través de un mecanismo no-canónico, dependiente de la quinasa amino-terminal de c-Jun (JNK), es activado por Wnt3a en células de ESFT (Endo Y *et al.*, 2008).

1.3. EWS/FLI1 INHIBE LA VÍA WNT/ β -CATENINA ANTES DE LA UNIÓN DE LOS FACTORES TCF/LEF A SUS ELEMENTOS DE RESPUESTA EN LOS PROMOTORES DE SUS GENES DIANA

El uso de la proteína de fusión TCF4-VP16 para activar de forma constitutiva e independiente de β -catenina promotores con sitios β -catenina/TCF nos permitió demostrar que EWS/FLI1 antagoniza la vía Wnt/ β -catenina *upstream* de la interacción TCF/LEF-ADN, ya que no logró bloquear la activación transcripcional mediada por TCF4-VP16. Esto indica que EWS/FLI1 no puede bloquear la unión de los factores TCF/LEF a los promotores de sus genes diana.

El activador transcripcional VP16 actúa en etapas posteriores a la formación del complejo de pre-iniciación (PIC: *preinitiation complex*), favoreciendo la elongación de la transcripción (Lis J y Wu C, 1993; Yankulov K *et al.*, 1994; Blair WS *et al.*, 1996; Blau J *et al.*, 1996). Así pues, dado que EWS/FLI1 no bloquea la activación mediada por TCF4-VP16 de promotores con sitios de unión β -catenina/TCF, no es descabellado pensar que EWS/FLI1 no interfiere con la formación del PIC, sino con la elongación de la transcripción y dicha supresión se ve rescatada por un estimulador de la elongación como VP16.

2. MECANISMO DE INHIBICION DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA MEDIADO POR EWS/FLI1

Conocer el mecanismo mediante el cual EWS/FLI1 bloquea la vía de señalización Wnt/ β -catenina tiene gran interés científico y quizá también, un importante potencial terapéutico, ya que nos daría la posibilidad de interferir dicha inhibición y determinar el efecto que tiene sobre las células tumorales de sarcoma de Ewing.

2.1. EWS/FLI1 NO INTERFIERE CON EL TRANSPORTE DE β -CATENINA AL NÚCLEO

Nuestros experimentos, en células A673, donde la proteína β -catenina se acumula en el citosol y en el núcleo en respuesta a Wnt3a, demuestran que la proteína EWS/FLI1 disminuye la actividad transcripcional β -catenina/TCF y consecuentemente la expresión de *DKK-1*, sin afectar el transporte de β -catenina al núcleo. Esto concuerda con trabajos de otros grupos en los que se demuestra que la acumulación citoplasmática de β -catenina en respuesta a factores Wnt y su transporte al núcleo no están alterados en células de ESFT (Uren A *et al.*, 2004; Endo Y *et al.*, 2008). Además, EWS/FLI1 inhibe la actividad transcripcional β -catenina/TCF independientemente de la presencia de E-cadherina, que podría secuestrarla en la membrana

plasmática, disminuyendo sus niveles en el núcleo. Es importante haber descartado este tipo de regulación, ya que se ha publicado que la expresión de E-cadherina está aumentada en ESFT (Tirado OM *et al.*, 2006) y en nuestro laboratorio se había demostrado cómo en células de cáncer colorrectal, la expresión de E-cadherina conlleva la relocalización de β -catenina en las uniones adherentes intercelulares, su salida del núcleo y la disminución de la actividad transcripcional β -catenina/TCF (Palmer HG *et al.*, 2001).

Como se puede ver en la figura 5, *DKK-2* se expresa a altos niveles en la línea celular A673 y en los ESFT. Dependiendo del contexto celular, *DKK-2* puede funcionar como un inhibidor de la ruta Wnt/ β -catenina evitando la acumulación de β -catenina en el citosol y, por lo tanto, en el núcleo (Niehrs C, 2006). Esto podría contribuir, potencialmente, a la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina en sarcomas de Ewing, aunque nuestros datos demuestran que no es ese el caso. A pesar de los elevados niveles de *DKK-2* en ESFT, éste es incapaz de suprimir la señalización mediada por factores Wnt, ya que el tratamiento de células A673 con Wnt3a conlleva la acumulación citosólica y nuclear de β -catenina, una señal de que los niveles superiores (*upstream*) de la vía Wnt/ β -catenina están activos.

2.2. EWS/FLI1 NO INHIBE LA EXPRESIÓN DEL GEN *DICKKOPF-1* A TRAVÉS DE c-MYC

Nuestros datos muestran que la expresión de la proteína c-Myc produce una inhibición de la actividad basal del promotor de *DKK-1* y de la inducida por β -catenina. En un principio, esto nos llevó a pensar en la posibilidad de que c-Myc, que es un gen diana de EWS/FLI1 (Bailly RA *et al.*, 1994; Dauphinot L *et al.*, 2001; Fukuma M *et al.*, 2003), fuese el mediador del efecto de EWS/FLI1 sobre el promotor de *DKK-1*. No parece ser el caso. Por un lado, la inhibición producida por c-Myc es menor a la ejercida por EWS/FLI1. Pero además, cuando antagonizamos la actividad transcripcional de c-Myc, co-expresando la proteína Mad, se rescata el efecto inhibitorio de c-Myc sobre el promotor de *DKK-1*, pero no se afecta en absoluto el efecto de EWS/FLI1 sobre dicho promotor. En conjunto, nuestros datos sugieren que las acciones inhibitorias de EWS/FLI1 y c-Myc sobre la expresión de *DKK-1* son, en gran medida, independientes.

2.3. EWS/FLI1 INTERFIERE CON LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO β -CATENINA/LEF-1

A lo largo de este trabajo, se ha descartado que la inhibición de EWS/FLI1 sobre la actividad transcripcional β -catenina/TCF se deba al bloqueo de la acumulación de β -catenina en el citosol y su paso al núcleo, o a una represión indirecta a través de la inducción de c-Myc. Por otro lado, nuestros datos usando TCF4-VP16 indican que EWS/FLI1 no puede bloquear la unión de TCF4 al ADN sobre los promotores de sus genes diana, y también sugieren que

EWS/FLI1 debe interferir en un nivel anterior a la unión TCF-ADN. Dado que β -catenina entra en el núcleo, todo apuntaba que EWS/FLI1 actuaba inhibiendo la unión entre β -catenina y los factores TCF/LEF.

En este sentido, al sobreexpresar el factor LEF-1, el promotor de *DKK-1* mostró más resistencia a su inhibición por parte de la proteína EWS/FLI1 tanto en condiciones basales, como en presencia de β -catenina. Este resultado nos adelantaba que la proteína LEF-1 debía tener un papel importante en la encrucijada entre EWS/FLI1 y la ruta Wnt/ β -catenina. Efectivamente, los experimentos de inmunoprecipitación demostraron que EWS/FLI1 bloquea la formación del complejo β -catenina-LEF-1 favoreciendo la formación del complejo EWS/FLI1-LEF-1. Es decir, existe una competencia entre β -catenina y EWS/FLI1 por unirse a LEF-1. Este mecanismo podría explicar perfectamente el efecto general de EWS/FLI1 sobre la transcripción mediada por β -catenina/TCF en células de sarcoma de Ewing. Desafortunadamente, nosotros no hemos sido capaces de detectar la unión endógena entre EWS/FLI1 y LEF-1 en células de ESFT, probablemente debido a que los anticuerpos disponibles son inadecuados.

En este sentido, serán necesarios trabajos futuros no sólo para confirmar el mecanismo molecular responsable de esta inhibición, sino también para mapear los dominios involucrados en la interacción entre EWS/FLI1 y LEF-1 (y posiblemente con otros miembros de la familia de factores de transcripción TCF/LEF). Dichos datos deberían ser de ayuda para diseñar moléculas con la habilidad de bloquear específicamente esta unión, que permitirían estudiar su efecto sobre la génesis y evolución de los sarcomas de Ewing.

3. EL GEN *DICKKOPF-1* Y LA VÍA WNT/ β -CATENINA EN EL CONTEXTO DEL SARCOMA DE EWING

3.1. RELEVANCIA DE LA INHIBICIÓN DEL GEN *DICKKOPF-1* EN EL SARCOMA DE EWING

La inhibición de DKK-1 parece ser relevante para la tumorigénesis mediada por EWS/FLI1 ya que la expresión ectópica de DKK-1, pero no de DKK-2, en la línea celular de sarcoma de Ewing SK-ES1, resultó en la supresión del crecimiento de tumores xenotransplantados en ratones inmunodeprimidos (Miyagawa Y *et al.*, 2009). Esto está de acuerdo con resultados publicados por nuestro grupo donde la expresión de DKK-1 en células de cáncer de colon DLD-1 disminuyó el crecimiento celular *in vitro* y la formación de tumores en ratones inmunodeficientes (Aguilera O *et al.*, 2006). Las células DLD-1 presentan mutaciones en el gen *APC*, teniendo la ruta Wnt/ β -catenina constitutivamente activa; así pues, parece que DKK-1 tiene efectos antitumorales independientes de su papel como antagonista de la actividad transcripcional β -catenina/TCF. Estos efectos independientes de β -catenina también han sido descritos en las células H28 y MS-1 de mesothelioma, en las células Hela, de cáncer de cuello de útero, y en las células JAR y JEG3 de coriocarcinoma de placenta humana (Lee TC y Ziff EB, 1999; Mikheev AM *et al.*, 2004; Peng S *et al.*, 2006). En este sentido, se cree que la activación de la ruta de señalización de la quinasa JNK podría estar involucrada en alguno de estos efectos de DKK-1 como supresor tumoral (Lee AY *et al.*, 2004; Mikheev AM *et al.*, 2004; Peng S *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la inhibición de DKK-1 por EWS/FLI1 podría tener gran relevancia para la progresión del sarcoma de Ewing, no tanto por su papel como inhibidor de la actividad β -catenina/TCF, ya que dicha actividad ya estaría inhibida en los ESFT, sino por su posible rol como gen supresor tumoral de forma independiente de β -catenina. En cualquier caso, para apoyar esta hipótesis, serán necesarios nuevos estudios que determinen si DKK-1 es realmente un supresor tumoral en sarcoma de Ewing y, dado el caso, qué mecanismos son responsables de su actividad supresora en células de ESFT, con el fin de determinar si la administración de DKK-1 exógeno podría ser una estrategia terapéutica contra esta neoplasia.

Por otra parte, se sabe que las líneas celulares de sarcoma de Ewing son sensibles a inhibidores de desacetilasas de histonas (HDI, *Histone deacetylase inhibitor*) (Jaboin J *et al.*, 2002; Sakimura R *et al.*, 2005; Sonnemann J *et al.*, 2007) que por otro lado activan la expresión de DKK-1 en algunos contextos celulares (Cui J *et al.*, 2012; Wang H *et al.*, 2012) induciéndonos a hipotetizar que DKK-1 pudiera tener algún papel en la sensibilidad del sarcoma de Ewing a HDI, siempre y cuando la expresión de DKK-1 se viese aumentada en el contexto celular del

sarcoma de Ewing por el tratamiento con estos inhibidores, cosa que todavía está por determinar.

3.2. RELEVANCIA DE LA REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE β -CATENINA/TCF EN EL SARCOMA DE EWING

La activación constitutiva, de manera aberrante, de la vía de señalización Wnt/ β -catenina es un evento frecuente en carcinomas (Clevers H, 2006). La acumulación de β -catenina nuclear como indicador de activación de la vía canónica está bien documentada en diversos carcinomas: colorectal (Rubinfeld B *et al.*, 1993), de próstata (Voeller HJ *et al.*, 1998), de mama (Colter DC *et al.*, 2000), y de ovario (Kobayashi K *et al.*, 1999), entre otros. Además, numerosas mutaciones activadoras de la propia β -catenina (Ilyas M *et al.*, 1997) así como mutaciones que inactivan componentes del complejo de destrucción de β -catenina, en concreto APC y Axina (Kinzler KW *et al.*, 1991), han sido bien caracterizadas en carcinoma colorrectal y otros. Adicionalmente, existen evidencias funcionales que demuestran que la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina en carcinomas juega un papel esencial en la progresión tumoral y en el caso del cáncer de colon, paradigma de activación de esta ruta, está considerada el evento iniciador del proceso neoplásico (Albuquerque C *et al.*, 2002; MacDonald BT *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la señalización a través de la vía Wnt/ β -catenina podría tener un papel muy diferente en sarcomagénesis si lo comparamos con lo que ocurre en la carcinogénesis. La represión constitutiva de esta vía en sarcoma de Ewing sugiere que este evento podría jugar un papel relevante en la oncogénesis mediada por EWS/FLI1. Aunque esta hipótesis supone asignar a la vía Wnt/ β -catenina un rol opuesto al demostrado en carcinomas, ya hay antecedentes de que la inhibición de esta ruta es un paso necesario para el desarrollo de sarcomas pleomórficos desdiferenciados de alto grado (Matushansky I *et al.*, 2007). De hecho, estos autores sugieren que la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina es un evento pro-oncogénico en células troncales mesenquimales, mientras que su activación tendría propiedades supresoras de tumores mesenquimales (Matushansky I *et al.*, 2007). Además, en contraste con los carcinomas, la actividad nuclear β -catenina/TCF en sarcomas no es significativa (Arango NA *et al.*, 2005), con excepción de algunos sarcomas (Saito T *et al.*, 2002; Bhattacharya B *et al.*, 2005).

En resumen, estos estudios apuntan a que mantener inactiva la vía Wnt/ β -catenina es necesario para, al menos, algunos tipos de sarcoma y el sarcoma de Ewing podría ser uno de ellos, como avalarían nuestros resultados.

La inhibición por parte de EWS/FLI1 de la señalización mediada por Wnt/ β -catenina en células de sarcoma de Ewing afecta a múltiples genes diana de β -catenina/TCF, haciendo difícil la identificación de genes específicos que pudieran estar involucrados en el proceso tumorigénico. Uno de estos genes podría ser *DKK-1* (como comentamos anteriormente). Sin embargo, nosotros pensamos que puesto que la transcripción dependiente de β -catenina/TCF parece estar globalmente reprimida en sarcomas de Ewing, el estudio de la importancia funcional de la vía Wnt/ β -catenina en el proceso tumorigénico, debería ser también abordado de forma global.

3.2.1. Diferenciación y origen celular del Sarcoma de Ewing: EWS/FLI1 y vía Wnt/ β -catenina

Los sarcomas de Ewing se caracterizan por ser tumores indiferenciados, con cierto carácter neural, compuestos por células primitivas indiferenciadas (Ushigome S *et al.*, 1992; Rorie CJ *et al.*, 2004; Shu CH *et al.*, 2002) En este sentido, existen evidencias experimentales que sugieren que EWS/FLI1 inhibe la diferenciación asociada a tejido, ya que su expresión ectópica en células mesenquimales pluripotentes bloquea su diferenciación en etapas tempranas (Torchia EC *et al.*, 2003; Lin PP *et al.*, 2008). Así, el motivo por el cuál el sarcoma de Ewing está compuesto por células primitivas indiferenciadas podría ser que EWS/FLI1 mantiene las células originarias del tumor en un estadio temprano de diferenciación o completamente indiferenciadas (Lin PP *et al.*, 2008). Es tentador pensar en la existencia de alguna relación entre el papel de EWS/FLI1 en el bloqueo de la diferenciación asociada a tejido y el hecho de que EWS/FLI1 bloquee la ruta Wnt/ β -catenina, la cual tiene un papel clave en diferenciación y en la determinación de distintos linajes celulares (Boland GM *et al.*, 2004; de Boer J *et al.*, 2004a; De Boer J *et al.*, 2004b; Etheridge SL *et al.*, 2004). Dicho de otra forma, la inhibición de la actividad Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing podría ser la responsable del carácter indiferenciado de estos tumores. Se sabe, por ejemplo, que EWS/FLI1 bloquea procesos de diferenciación concretos como son la osteoblastogénesis y la miogénesis (Eliazer S *et al.*, 2003; Torchia EC *et al.*, 2003) y es posible que, en parte, ese bloqueo se explique a través de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina cuya importancia en la ejecución de estos dos procesos es bien conocida (Church VL y Francis-West P, 2002; Bain G *et al.*, 2003; Poleskaya A *et al.*, 2003; Arango NA *et al.*, 2005; Gaur T *et al.*, 2005; Garcia-Gras E *et al.*, 2006; Shang Y *et al.*, 2007).

Como se ha comentado en la *Introducción* de esta Tesis Doctoral una cuestión que permanece todavía en discusión es la identidad de las células a partir de las cuales se originan los tumores

de la familia del sarcoma de Ewing, que muestran permisividad para la transformación mediada por EWS/FLI1 (Kovar H, 2005). Estos tumores, a pesar de presentar un fenotipo indiferenciado, muestran características neuroectodérmicas, es decir, histológicamente, el sarcoma de Ewing parece un tumor de células neuroectodérmicas primitivas y, de hecho, hace tiempo que se hipotetizó que estos sarcomas se originaban a partir de tales células (Cavazzana AO *et al.*, 1987; Rettig WJ *et al.*, 1992; O'Regan S *et al.*, 1995; Arvand A *et al.*, 2001; Suh CH *et al.*, 2002; Staeger MS *et al.*, 2004; Khoury JD, 2005). Apoyando esta hipótesis, marcadores neuronales tempranos tales como la enolasa específica de neuronas (NSE: *neuron-specific enolase*) y la proteína S-100, están presentes en algunos sarcomas de Ewing (Rettig WJ *et al.*, 1992; Franchi A *et al.*, 2001). Además, mediante microscopía electrónica, pueden observarse gránulos neurosecretores, en algunos de estos tumores (Suh CH *et al.*, 2002). En este mismo sentido, experimentos de laboratorio han demostrado que las células de sarcoma de Ewing pueden ser inducidas a diferenciar hacia linajes neuronales *in vitro* y adquirir procesos neuríticos tras una estimulación apropiada (Navarro S *et al.*, 1990).

Sin embargo, cada vez cobra más fuerza la posibilidad de que las características neuroectodérmicas del sarcoma de Ewing sean un resultado directo de la expresión de EWS/FLI1 y no necesariamente del origen celular (Lin PP *et al.*, 2011). Existen varias evidencias que apoyan esta hipótesis. Por un lado, células humanas que no son de origen neuroectodérmico pero que expresan EWS/FLI1 de forma ectópica muestran una morfología redondeada y expresan algunos de los marcadores neuroectodérmicos presentes en sarcoma de Ewing (Miyagawa Y *et al.*, 2008; Riggi N *et al.*, 2008). Por otro, los tumores formados a partir de la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3 transformada mediante la expresión exógena de EWS/FLI1 adquieren ciertas características neurales, con una morfología de células redondas y pequeñas típicas del sarcoma de Ewing, pero muy distintas de las de los fibrosarcomas (Teitell MA *et al.*, 1999). Además, un grupo de sarcomas bi-fenotípicos de tejidos blandos que contienen EWS/FLI1 o EWS/ERG, presentan un menor grado de diferenciación miogénica que los rhabdomiosarcomas sin translocaciones, mientras que manifiestan algunas características neurales (Sorensen PH *et al.*, 1995; Thorner P *et al.*, 1996; Tan SY *et al.*, 2001). De hecho, en las células de rhabdomiosarcoma que expresan EWS/FLI1 de forma exógena la diferenciación terminal a músculo esquelético está casi completamente perdida, siendo sustituida por una diferenciación de marcado carácter neural, con aparición de neuritas, gránulos de núcleo denso y expresión de varios genes asociados a neuronas (Teitell MA *et al.*, 1999; Hu-Lieskovan S *et al.*, 2005b), entre los que se encuentran *Krox20*, *MSX1* (Streit A y Stern CD, 1999) y *c-MYC*, marcadores de cresta neural durante el desarrollo. En otros estudios, células progenitoras mesenquimales transformadas con EWS/FLI1 adquieren

el marcador neuronal de superficie celular NSE (Riggi N *et al.*, 2005), presente también en células de sarcoma de Ewing (Amann G *et al.*, 1999).

En resumen, EWS/FLI1 puede inducir un fenotipo neural típico de sarcoma de Ewing en múltiples contextos celulares mientras bloquea el programa de diferenciación existente en cada caso, lo que sugiere que esta proteína de fusión específica del tumor actúa como un determinante del linaje celular, más que como un oncogén puro; es decir, EWS/FLI1 inhibiría la diferenciación asociada a tejido pero promovería en estos tumores un programa de diferenciación neuroectodérmico específico de sarcoma de Ewing (Teitell MA *et al.*, 1999; Hu-Lieskovan S *et al.*, 2005b).

Nosotros hemos demostrado que EWS/FLI1 inhibe la actividad Wnt/ β -catenina. En este sentido, sería interesante comprobar si esta inhibición podría contribuir a inducir un fenotipo neural típico de sarcoma de Ewing, ya que existen evidencias de que el bloqueo de la actividad Wnt/ β -catenina impide la diferenciación hacia determinados linajes, pero parece inducir programas de diferenciación neuronal en múltiples sistemas y contextos celulares (Dorsky RI *et al.*, 1998; Kong XB y Zhang C, 2009; O'Connell MP y Weeraratna AT, 2009). De hecho, la inhibición de la ruta Wnt/ β -catenina incrementa la expresión del marcador neuroectodérmico temprano Sox1 (Watanabe K *et al.*, 2005) y de los marcadores neuronales Nestina y Dlx-2 (Verani R *et al.*, 2007). Por el contrario, la activación sostenida de esta vía inhibe la diferenciación neuronal al tiempo que induce la diferenciación hacia linajes meso/endodérmicos en células troncales embrionarias humanas y de ratón (Aubert J *et al.*, 2002; Bakre MM *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la activación de la ruta Wnt/ β -catenina con Wnt3a (Yoshikawa Y *et al.*, 1997), Wnt1 (Aubert J *et al.*, 2002), cloruro de litio (un inhibidor de GSK3 β) (Aubert J *et al.*, 2002), o mediante la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa de β -catenina (Haegeler L *et al.*, 2003) inhibe la diferenciación neural. Así, por ejemplo, en el pez cebra, la activación de la ruta Wnt/ β -catenina por sobre-expresión de β -catenina exógena en las células pigmentarias de la cresta neural bloquea la diferenciación neural (Dorsky RI *et al.*, 1998).

Si aceptamos, entonces, que el sarcoma de Ewing no tiene un origen neuroectodérmico propiamente dicho, sino que tales características son consecuencia de la expresión de EWS/FLI1 y quizá, de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina, cobra fuerza la hipótesis que afirma que su origen celular es mesenquimal (Amann G *et al.*, 1999; Dejana E, 2004) y en concreto que deriva de MSC (Watanabe K *et al.*, 2005; Lin PP *et al.*, 2011). En este sentido y apoyando un papel relevante de la vía Wnt/ β -catenina, existen publicaciones donde, de distintas formas, se demuestra que la actividad de esta ruta está relacionada de manera inversa con la adquisición de características fenotípicas neurales por parte de células mesenquimales

(Yoshikawa Y *et al.*, 1997; Aubert J *et al.*, 2002; Haegele L *et al.*, 2003; Bakre MM *et al.*, 2007; Kong XB y Zhang C, 2009).

Así pues, todas estas evidencias apuntarían a un escenario hipotético en el que EWS/FLI1 bloquearía la actividad Wnt/ β -catenina en células stem mesenquimales inhibiendo así su diferenciación hacia linajes mesenquimales, promoviendo la formación de sarcomas y la diferenciación hacia linajes neurales, lo que explicaría las características neuroectodérmicas de las células de sarcoma de Ewing. Esta hipótesis, por supuesto, requiere la necesidad de experimentos futuros que permitan confirmar una posible relación entre el bloqueo de la vía Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing y su fenotipo indiferenciado con carácter neural.

3.3. PAPEL DE LEF-1 EN SARCOMA DE EWING

Los resultados que presentamos en esta Tesis Doctoral indican que EWS/FLI1 puede unirse a la proteína LEF-1 e impedir su unión con β -catenina. En el futuro, sería interesante mapear el dominio de unión de LEF-1 con EWS/FLI1 y determinar si EWS/FLI1 y β -catenina compiten por el mismo sitio de unión con LEF-1.

El factor LEF-1 actúa como represor transcripcional en ausencia de β -catenina (Bienz M, 1998) y existen distintos estudios en la bibliografía que describen regulaciones del complejo β -catenina-LEF-1 (Huber O *et al.*, 1996; Brannon M *et al.*, 1997; Cadigan KM y Nusse R, 1997; Cavallo R *et al.*, 1997; van de Wetering M *et al.*, 1997; Behrens J *et al.*, 1998; Hsu SC *et al.*, 1998; Roose J *et al.*, 1998; Billin AN *et al.*, 2000; Ravindranath A *et al.*, 2008; Sun J y Weis WI, 2011). En uno de ellos, el mecanismo de regulación del complejo β -catenina-LEF-1 implica la participación del complejo de la histona desacetilasa 1 (HDAC1) como nuevo protagonista en la modulación de esta interacción (Billin AN *et al.*, 2000). Según este modelo, la asociación HDAC1-LEF-1 reprime la actividad transcripcional β -catenina/LEF, y la acumulación paulatina de β -catenina inhibiría la actividad de HDAC1 y la unión física entre HDAC1 y LEF-1. De la misma forma, inhibidores de la actividad desacetilasa de histonas (HDI) bloquearían el efecto represor del complejo HDAC1-LEF-1 sobre la actividad transcripcional β -catenina/LEF.

Se sabe que un número elevado de líneas celulares de ESFT son sensibles a HDI (Jaboin J *et al.*, 2002; Furchert SE *et al.*, 2007; Sonnemann J *et al.*, 2007; Fouladi M *et al.*, 2010). Sería, pues, interesante estudiar si la proteína EWS/FLI1 al interactuar con la proteína LEF-1 e impedir su asociación con β -catenina, favorecería de algún modo la formación del complejo HDAC1-LEF-1 reprimiendo así la actividad β -catenina/LEF. En este sentido, el hecho de que

la proteína EWS/FLI1 forme un complejo con HDAC1 a través de su región amino terminal (Li Y *et al.*, 2012) deja abierta la posibilidad de un complejo HDAC1-EWS/FLI1-LEF-1 que impida la asociación de LEF-1 con β -catenina.

Finalmente, como proyección de futuro, sería interesante estudiar cómo el bloqueo de la expresión de DKK-1 y de la actividad Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing podría contribuir a la tumorigénesis y profundizar en cómo la inactivación de la vía Wnt/ β -catenina en sarcoma de Ewing puede desenmascarar su origen celular; así como resolver si el fenotipo indiferenciado y con carácter neural del sarcoma de Ewing se debe en parte a la inactivación de esta ruta que participa en la determinación de linajes celulares. Por otro lado, la interacción física y funcional entre LEF-1 y EWS/FLI1 debería ser estudiada más a fondo, con el fin de determinar su posible uso terapéutico.

Conclusiones

I. EFECTOS DE EWS/FLI1 SOBRE LA VÍA WNT/ β -CATENINA Y SUS GENES DIANA

1. La expresión del gen *DICKKOPF-1* está disminuida en líneas celulares de sarcoma de Ewing, siendo la proteína EWS/FLI1 la responsable de ello.
2. La activación transcripcional del gen *DICKKOPF-1* por β -catenina/TCF está bloqueada en líneas celulares de sarcoma de Ewing y en células que expresan la proteína EWS/FLI1 de forma heteróloga.
3. La activación de la vía Wnt/ β -catenina está reducida en líneas celulares de sarcoma de Ewing y en células que expresan la proteína EWS/FLI1 de forma heteróloga.
4. EWS/FLI1 antagoniza la actividad transcripcional mediada por los complejos β -catenina/TCF, independientemente del contexto celular y sin afectar a la unión TCF-ADN.

II. MECANISMO DE INHIBICION DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA POR EWS/FLI1

5. EWS/FLI1 no interfiere con el transporte de β -catenina al núcleo.
6. EWS/FLI1 bloquea la actividad transcripcional mediada por los complejos β -catenina/TCF independientemente de la expresión de E-cadherina y sin inducir la localización de β -catenina en membrana plasmática.
7. EWS/FLI1 inhibe la transcripción del gen *DICKKOPF-1* por β -catenina/TCF de forma independiente de c-Myc.
8. La proteína EWS/FLI1 interacciona con la proteína LEF-1 e interfiere con la formación de los complejos β -catenina/LEF-1.

Bibliografía

Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, y Gonzalez-Sancho JM (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116-4121.

Aguilera O, Pena C, Garcia JM, Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Navarro D, Barbachano A, Lopez de Silanes I, Ballestar E, Fraga MF, Esteller M, Gamallo C, Bonilla F, Gonzalez-Sancho JM, y Munoz A (2007). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 1877-1884.

Ahmed SI, Thomas AL, y Steward WP (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition by small molecules. *J Chemother* 16 Suppl 4, 59-63.

Albihn A, Johnsen JI, y Henriksson MA (2010). MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res* 107, 163-224.

Albuquerque C, Breukel C, van der Luijt R, Fidalgo P, Lage P, Slors FJ, Leitao CN, Fodde R, y Smits R (2002). The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum Mol Genet* 11, 1549-1560.

Alexander KA, Wakim BT, Doyle GS, Walsh KA, y Storm DR (1988). Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* 263, 7544-7549.

Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, Hoglund M, Forster A, Rabbitts TH, Ron D, Mandahl N, y Mitelman F (1996). Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics* 37, 1-8.

Amann G, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M, Windhager R, y Kovar H (1999). Relation of neurological marker expression and EWS gene fusion types in MIC2/CD99-positive tumors of the Ewing family. *Hum Pathol* 30, 1058-1064.

Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, y Teixeira J (2005). Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 288, 276-283.

Aravind L, y Koonin EV (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23, 469-472.

Arce L, Pate KT, y Waterman ML (2009). Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer* 9, 159.

Arce L, Yokoyama NN, y Waterman ML (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 25, 7492-7504.

Arvand A, Welford SM, Teitell MA, y 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.

Aubert J, Dunstan H, Chambers I, y Smith A (2002). Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol* 20, 1240-1245.

Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubouset J, y Mazabraud A (1983). [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 296, 1105-1107.

Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, y Mazabraud A (1984). Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 12, 21-25.

Baer C, Nees M, Breit S, Selle B, Kulozik AE, Schaefer KL, Braun Y, Wai D, y Poremba C (2004). Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 110, 687-694.

Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, y 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.

Bain G, Muller T, Wang X, y Papkoff J (2003). Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 84-91.

Bakre MM, Hoi A, Mong JC, Koh YY, Wong KY, y Stanton LW (2007). Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *J Biol Chem* 282, 31703-31712.

Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegbarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ y Clevers H (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-7.

Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T y Clevers H (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-63.

Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, y Birchmeier W (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280, 596-599.

Belyanskaya LL, Gehrigh PM, y Gehring H (2001). Exposure on cell surface and extensive arginine methylation of ewing sarcoma (EWS) protein. *J Biol Chem* 276, 18681-18687.

Benini S, Manara MC, Baldini N, Cerisano V, Massimo S, Mercuri M, Lollini PL, Nanni P, Picci P, y Scotlandi K (2001). Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res* 7, 1790-1797.

Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, y 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.

Bhattacharya B, Dilworth HP, Iacobuzio-Donahue C, Ricci F, Weber K, Furlong MA, Fisher C, y Montgomery E (2005). Nuclear beta-catenin expression distinguishes deep fibromatosis from other benign and malignant fibroblastic and myofibroblastic lesions. *Am J Surg Pathol* 29, 653-659.

Bienz M (1998). TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr Opin Cell Biol* 10, 366-372.

- Billin AN, Thirlwell H, y Ayer DE** (2000). Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol Cell Biol* 20, 6882-6890.
- Black AR, Black JD, y Azizkhan-Clifford J** (2001). Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188, 143-160.
- Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H y Jay P** (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 166, 37-47.
- Blair WS, Fridell RA, y Cullen BR** (1996). Synergistic enhancement of both initiation and elongation by acidic transcription activation domains. *EMBO J* 15, 1658-1665.
- Blau J, Xiao H, McCracken S, O'Hare P, Greenblatt J, y Bentley D** (1996). Three functional classes of transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 16, 2044-2055.
- Boland GM, Perkins G, Hall DJ, y Tuan RS** (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93, 1210-1230.
- Bonomi P** (2010). Epidermal growth factor receptor pathway. *J Thorac Oncol* 5, S470-471.
- Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, y De Robertis EM** (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382, 595-601.
- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, y Kimelman D** (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* 11, 2359-2370.
- Brott BK, y Sokol SY** (2002). Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol* 22, 6100-6110.
- Brown LA, Rodaway AR, Schilling TF, Jowett T, Ingham PW, Patient RK, y 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.
- Cadigan KM, y Nusse R** (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-3305.
- Cadigan KM, y Waterman ML** (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Carrillo J, Agra N, Fernandez N, Pestana A, y Alonso J** (2009). Devazepide, a nonpeptide antagonist of CCK receptors, induces apoptosis and inhibits Ewing tumor growth. *Anticancer Drugs* 20, 527-533.
- Carrillo J, Garcia-Aragoncillo E, Azorin D, Agra N, Sastre A, Gonzalez-Mediero I, Garcia-Miguel P, Pestana A, Gallego S, Segura D, y Alonso J** (2007). Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. *Clin Cancer Res* 13, 2429-2440.
- Cavallo R, Rubenstein D, y Peifer M** (1997). Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus. *Curr Opin Genet Dev* 7, 459-466.

Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, y Triche TJ (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127, 507-518.

Cinnamon E, y Paroush Z (2008). Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression. *Curr Opin Genet Dev* 18, 435-440.

Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, y Prockop DJ (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-3218.

Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P y Ben-Ze'ev A (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2058-72

Cowling VH, D'Cruz CM, Chodosh LA, y Cole MD (2007). c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Mol Cell Biol* 27, 5135-5146.

Cui J, Jiang W, Wang S, Wang L, y Xie K (2012). Role of Wnt/beta-catenin signaling in drug resistance of pancreatic cancer. *Curr Pharm Des* 18, 2464-2471.

Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, y Varmus HE (2005). FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 24, 73-84.

Christodoulides C, Laudes M, Cawthorn WP, Schinner S, Soos M, O'Rahilly S, Sethi JK, y Vidal-Puig A (2006). The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci* 119, 2613-2620.

Church VL, y Francis-West P (2002). Wnt signalling during limb development. *Int J Dev Biol* 46, 927-936.

Dai X, Ma W, He X, y Jha RK (2011). Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. *Med Sci Monit* 17, RA177-190.

Dalal S, Berry AM, Cullinane CJ, Mangham DC, Grimer R, Lewis IJ, Johnston C, Laurence V, y Burchill SA (2005). Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family. *Clin Cancer Res* 11, 2364-2378.

Dang CV (2012). MYC on the path to cancer. *Cell* 149, 22-35.

Daniels DL, y Weis WI (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 12, 364-371.

Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, y Delattre O (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 20, 3258-3265.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stanek P, Glinka A, y Niehrs C (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867-872.

- de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, y van Blitterswijk C** (2004a). Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 34, 818-826.
- De Boer J, Wang HJ, y Van Blitterswijk C** (2004b). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 393-401.
- De Langhe SP, Sala FG, Del Moral PM, Fairbanks TJ, Yamada KM, Warburton D, Burns RC y Bellusci S** (2005). Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung. *Dev Biol* 277, 316-31.
- Dejana E** (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 261-270.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, y et al.** (1994). The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 331, 294-299.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, y et al.** (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359, 162-165.
- Deloulme JC, Prichard L, Delattre O, y Storm DR** (1997). The proto-oncoprotein EWS binds calmodulin and is phosphorylated by protein kinase C through an IQ domain. *J Biol Chem* 272, 27369-27377.
- Diehl JA** (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 1, 226-231.
- Dittmer J, y Nordheim A** (1998). Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1377, F1-11.
- Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, y McIntosh LP** (1994). Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry* 33, 13509-13516.
- Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O'Keefe RJ y Drissi H** (2006). Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 208, 77-86.
- Dorsky RI, Moon RT, y Raible DW** (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396, 370-373.
- Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, Mortensen NJ, Kmiot W, Playford RJ, Pignatelli M, y Bodmer WF** (1999). Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2316-2321.
- Eliazer S, Spencer J, Ye D, Olson E, y 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.
- Ellwanger K, Saito H, Clement-Lacroix P, Maltry N, Niedermeyer J, Lee WK, Baron R, Rawadi G, Westphal H, y Niehrs C** (2008). Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol* 28, 4875-4882.

- Endo Y, Beauchamp E, Woods D, Taylor WG, Toretsky JA, Uren A, y Rubin JS** (2008). Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 28, 2368-2379.
- Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, y Genever PG** (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22, 849-860.
- Ewing J** (2006). The Classic: Diffuse endothelioma of bone. Proceedings of the New York Pathological Society. 1921;12:17. *Clin Orthop Relat Res* 450, 25-27.
- Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, Kraus MH, y Aaronson SA** (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem* 274, 19465-19472.
- Felsch JS, Lane WS, y 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.
- Fellinger EJ, Garin-Chesa P, Su SL, DeAngelis P, Lane JM, y Rettig WJ** (1991). Biochemical and genetic characterization of the HBA71 Ewing's sarcoma cell surface antigen. *Cancer Res* 51, 336-340.
- Ferrara N** (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29, 10-14.
- Filipovich A, Gehrke I, Poll-Wolbeck SJ, y Kreuzer KA** (2011). Physiological inhibitors of Wnt signaling. *Eur J Haematol* 86, 453-465.
- Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, y Siemeister G** (1997). Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15, 669-676.
- Firth SM, y Baxter RC** (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23, 824-854.
- Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, y Weiss SW** (2000). Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 24, 1657-1662.
- Fouladi M, Park JR, Stewart CF, Gilbertson RJ, Schaiquevich P, Sun J, Reid JM, Ames MM, Speights R, Ingle AM, Zwiebel J, Blaney SM, y Adamson PC** (2010). Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of vorinostat: a Children's Oncology Group phase I consortium report. *J Clin Oncol* 28, 3623-3629.
- Franchi A, Pasquinelli G, Cenacchi G, Della Rocca C, Gambini C, Bisceglia M, Martinelli GN, y Santucci M** (2001). Immunohistochemical and ultrastructural investigation of neural differentiation in Ewing sarcoma/PNET of bone and soft tissues. *Ultrastruct Pathol* 25, 219-225.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, y Pestell RG** (2004). Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145, 5439-5447.
- Fuchs B, Inwards C, Scully SP, y Janknecht R** (2004a). hTERT Is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop Relat Res*, 64-68.

- Fuchs B, Inwards CY, y Janknecht R** (2004b). Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 10, 1344-1353.
- Fukuma M, Okita H, Hata J, y 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.
- Furchert SE, Lanvers-Kaminsky C, Juurgens H, Jung M, Loidl A, y Fruhwald MC** (2007). Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *Int J Cancer* 120, 1787-1794.
- Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, Boucher KM, Watkins WS, Jorde LB, Graves BJ, y Lessnick SL** (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10149-10154.
- Garcia-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gomez-Lopez G, Pestana A, y Alonso J** (2008). DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene* 27, 6034-6043.
- Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, y Marian AJ** (2006). Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 116, 2012-2021.
- Gascoyne DM, Thomas GR, y Latchman DS** (2004). The effects of Brn-3a on neuronal differentiation and apoptosis are differentially modulated by EWS and its oncogenic derivative EWS/Fli-1. *Oncogene* 23, 3830-3840.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, y Lian JB** (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280, 33132-33140.
- Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T y Ben-Ze'ev A** (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168, 633-642.
- Giles RH, van Es JH, y Clevers H** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653, 1-24.
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, y Niehrs C** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362.
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, y Munoz A** (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098-1103.
- Gradl D, Kühl M y Wedlich D** (1999). The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* 19, 5576-87.
- Graves BJ, y Petersen JM** (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 75, 1-55.

Gregorieff A, y Clevers H (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19, 877-890.

Gregory CA, Perry AS, Reyes E, Conley A, Gunn WG, y Prockop DJ (2005). Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 280, 2309-2323.

Grier HE (1997). The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am* 44, 991-1004.

Grimberg A (2003). Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. *Cancer Biol Ther* 2, 630-635.

Guan H, Jia SF, Zhou Z, Stewart J, y Kleinerman ES (2005a). Herceptin down-regulates HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression and enhances taxol-induced cytotoxicity of human Ewing's sarcoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11, 2008-2017.

Guan H, Zhou Z, Wang H, Jia SF, Liu W, y Kleinerman ES (2005b). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 11, 2662-2669.

Guder C, Philipp I, Lengfeld T, Watanabe H, Hobmayer B, y Holstein TW (2006). The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25, 7450-7460.

Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, y Delattre O (2009). The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* 4, e4932.

Haegele L, Ingold B, Naumann H, Tabatabai G, Ledermann B, y Brandner S (2003). Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci* 24, 696-708.

Haertel-Wiesmann M, Liang Y, Fantl WJ y Williams LT (2000). Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 32046-51.

Hahn KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PH, Thiele CJ, y Kim SJ (1999). Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 23, 222-227.

Hallier M, Lerga A, Barnache S, Tavitian A, y Moreau-Gachelin F (1998). The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* 273, 4838-4842.

Hancock JD, y Lessnick SL (2008). A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle* 7, 250-256.

Haniu M, Horan T, Spahr C, Hui J, Fan W, Chen C, Richards WG, y Lu HS (2011). Human Dickkopf-1 (huDKK1) protein: characterization of glycosylation and determination of disulfide linkages in the two cysteine-rich domains. *Protein Sci* 20, 1802-1813.

Hausmann G, Banziger C, y Basler K (2007). Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 331-336.

- Heuberger J, y Birchmeier W** (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002915.
- Hibshoosh H, y Lattes R** (1997). Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. *Semin Oncol* 24, 515-525.
- Hiyama E, y Hiyama K** (2003). Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 194, 221-233.
- Holden SN, Eckhardt SG, Basser R, de Boer R, Rischin D, Green M, Rosenthal MA, Wheeler C, Barge A, y Hurwitz HI** (2005). Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and EGF receptor signaling, in patients with solid, malignant tumors. *Ann Oncol* 16, 1391-1397.
- Holzer G, Obermair A, Koschat M, Preyer O, Kotz R, y Trieb K** (2001). Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. *Med Pediatr Oncol* 36, 601-604.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ, Dannenberg AJ y Brown AM** (1999). Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 59, 1572-7.
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, y Nathans J** (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431-436.
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, y Hayward SD** (1996). Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 16, 952-959.
- Hsu SC, Galceran J, y Grosschedl R** (1998). Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 18, 4807-4818.
- Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, y Triche TJ** (2005a). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65, 8984-8992.
- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, y Triche TJ** (2005b). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res* 65, 4633-4644.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, y Kemler R** (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, y Bodmer WF** (1997). Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10330-10334.
- Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, y 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, 1536-1540.

Irminger-Finger I, y Leung WC (2002). BRCA1-dependent and independent functions of BARD1. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 582-587.

Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, Rowe A, Domingos PM, Smith JC, y Krumlauf R (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 130, 4295-4305.

Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, Bates SE, y 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, 6108-6115.

Jaishankar S, Zhang J, Roussel MF, y Baker SJ (1999). Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. *Oncogene* 18, 5592-5597.

Jamerson MH, Johnson MD, y Dickson RB (2004). Of mice and Myc: c-Myc and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 27-37.

Jamieson C, Sharma M, y Henderson BR (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 847-850.

Janknecht R (2004). On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 564, 9-13.

Javery O, Krajewski K, O'Regan K, Kis B, Giardino A, Jagannathan J, y Ramaiya NH (2011). A to Z of extraskeletal Ewing sarcoma family of tumors in adults: imaging features of primary disease, metastatic patterns, and treatment responses. *AJR Am J Roentgenol* 197, W1015-1022.

Jedlicka P (2010). Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 3, 338-347.

Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT y Shapiro DN (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10, 1229-34.

Jones SE, y Jomary C (2002). Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24, 811-820.

Juergens C, Weston C, Lewis I, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, Michon J, Zoubek A, Juergens H, y 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, 22-29.

Kaneko Y, Kobayashi H, Handa M, Satake N y Maseki N (1996). EWS-ERG fusion transcript produced by chromosomal insertion in a Ewing sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 228-31.

Kang HG, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, Ng T, Reynolds CP, Triche TJ, y Sorensen PH (2007). E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res* 67, 3094-3105.

Kato S, Kim MS, Yamaoka K, y Fujiki R (2007). Mechanisms of transcriptional repression by 1,25(OH)₂ vitamin D. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16, 297-304.

- Kawano Y, y Kypta R** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-2634.
- Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, y Meltzer PS** (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7, 673-679.
- Khoury JD** (2005). Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol* 12, 212-220.
- Kiessling A, Sperl B, Hollis A, Eick D, y Berg T** (2006) Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chem Biol* 13, 745-751.
- Kikuchi K, Niikura Y, Kitagawa K, y Kikuchi A** (2010). Dishevelled, a Wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. *EMBO J* 29, 3470-3483.
- Kim J, y Pelletier J** (1999). Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. *Physiol Genomics* 1, 127-138.
- Kim W, Kim M, y Jho EH** (2013). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* 450, 9-21.
- Kinsey M, Smith R, y Lessnick SL** (2006). NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Res* 4, 851-859.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, y et al.** (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366-1370.
- Knoop LL, y Baker SJ** (2000). The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. *J Biol Chem* 275, 24865-24871.
- Knoop LL, y Baker SJ** (2001). EWS/FLI alters 5'-splice site selection. *J Biol Chem* 276, 22317-22322.
- Kobayashi K, Sagae S, Nishioka Y, Tokino T, y Kudo R** (1999). Mutations of the beta-catenin gene in endometrial carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 90, 55-59.
- Kolb EA, Gorlick R, Houghton PJ, Morton CL, Lock R, Carol H, Reynolds CP, Maris JM, Keir ST, Billups CA, y Smith MA** (2008). Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 50, 1190-1197.
- Kong XB, y Zhang C** (2009). Dickkopf (Dkk) 1 promotes the differentiation of mouse embryonic stem cells toward neuroectoderm. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45, 185-193.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, y Clevers H** (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.
- Kovar H** (2003). Ewing tumor biology: perspectives for innovative treatment approaches. *Adv Exp Med Biol* 532, 27-37.
- Kovar H** (2005). Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin Cancer Biol* 15, 189-196.

- Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, y Gadner H** (1996). EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 7, 429-437.
- Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF, y Gadner H** (1990). Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 5, 1067-1070.
- Kovar H, Jug G, Hattinger C, Spahn L, Aryee DN, Ambros PF, Zoubek A, y Gadner H** (2001). The EWS protein is dispensable for Ewing tumor growth. *Cancer Res* 61, 5992-5997.
- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, y McCarthy SA** (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301-313.
- Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, Nusse R, y Kuo CJ** (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 266-271.
- Kushlinskii NE, Babkina IV, Solov'ev YN, y Trapeznikov NN** (2000). Vascular endothelium growth factor and angiogenin in the serum of patients with osteosarcoma and Ewing's tumor. *Bull Exp Biol Med* 130, 691-693.
- Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, y Couvreur P** (2000). EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 401-406.
- Lee AY, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, y Jablons DM** (2004). Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1246-1250.
- Lee TC, y Ziff EB** (1999). Mxi1 is a repressor of the c-Myc promoter and reverses activation by USF. *J Biol Chem* 274, 595-606.
- Leemann-Zakaryan RP, Pahlich S, Sedda MJ, Quero L, Grossenbacher D, y Gehring H** (2009). Dynamic subcellular localization of the Ewing sarcoma proto-oncoprotein and its association with and stabilization of microtubules. *J Mol Biol* 386, 1-13.
- Lerga A, Hallier M, Delva L, Orvain C, Gallais I, Marie J, y Moreau-Gachelin F** (2001). Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* 276, 6807-6816.
- Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, y May WA** (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10, 423-431.
- Lessnick SL, Dacwag CS, y 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.
- Lessnick SL, y Ladanyi M** (2012). Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol* 7, 145-159.
- Li L, Mao J, Sun L, Liu W, y Wu D** (2002). Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* 277, 5977-5981.

- Li Y, Li X, Fan G, Fukushi J, Matsumoto Y, Iwamoto Y, y Zhu Y** (2012). Impairment of p53 acetylation by EWS-Fli1 chimeric protein in Ewing family tumors. *Cancer Lett* 320, 14-22.
- Liao DJ, y Dickson RB** (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 143-164.
- Lin PP, Pandey MK, Jin F, Xiong S, Deavers M, Parant JM, y Lozano G** (2008). EWS-FLI1 induces developmental abnormalities and accelerates sarcoma formation in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 68, 8968-8975.
- Lin PP, Wang Y, y Lozano G** (2011). Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma* 2011.
- Lindvall C, Bu W, Williams BO, y Li Y** (2007). Wnt signaling, stem cells, and the cellular origin of breast cancer. *Stem Cell Rev* 3, 157-168.
- Lis J, y Wu C** (1993). Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* 74, 1-4.
- Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, y Thibodeau SN** (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 26, 146-147.
- Livak KJ, y Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Logan CY, y Nusse R** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Luscher B** (2001). Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277, 1-14.
- Luscher B, y Vervoorts J** (2012). Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene* 494, 145-160.
- MacDonald BT, y He X** (2012). Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- MacDonald BT, Tamai K, y He X** (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.
- McGrew LL, Takemaru K, Bates R y Moon RT** (1999). Direct regulation of the *Xenopus* engrailed-2 promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech Dev* 87, 21-32.
- Mackintosh C, Madoz-Gurpide J, Ordonez JL, Osuna D, y Herrero-Martin D** (2010). The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther* 9, 655-667.
- Machado I, Traves V, Cruz J, Llombart B, Navarro S, y Llombart-Bosch A** (2013). Superficial small round-cell tumors with special reference to the Ewing's sarcoma family of tumors and the spectrum of differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 30, 85-94.

Mager AM, Grapin-Botton A, Ladjali K, Meyer D, Wolff CM, Stiegler P, Bonnin MA, y Remy P (1998). The avian fli gene is specifically expressed during embryogenesis in a subset of neural crest cells giving rise to mesenchyme. *Int J Dev Biol* 42, 561-572.

Mao B, y Niehrs C (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302, 179-183.

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, y Niehrs C (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-667.

Mao X, Miesfeldt S, Yang H, Leiden JM, y Thompson CB (1994). The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem* 269, 18216-18222.

Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, y Notario V (2006). Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 12, 6781-6790.

Mateo-Lozano S, Tirado OM, y Notario V (2003). Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 22, 9282-9287.

Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, y Iwamoto Y (2001). Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes. *Br J Cancer* 84, 768-775.

Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, Singer S, Maki RG, y Cordon-Cardo C (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 117, 3248-3257.

May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, y Denny CT (1993a). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5752-5756.

May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, y Denny CT (1993b). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13, 7393-7398.

Melet F, Motro B, Rossi DJ, Zhang L, y 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.

Meyer D, Wolff CM, Stiegler P, Senan F, Befort N, Befort JJ, y Remy P (1993). Xl-fli, the Xenopus homologue of the fli-1 gene, is expressed during embryogenesis in a restricted pattern evocative of neural crest cell distribution. *Mech Dev* 44, 109-121.

Meyer N, y Penn LZ (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8, 976-990.

Meyers PA, y Levy AS (2000). Ewing's sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 1, 247-257.

- Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, y Zarbl H** (2004). A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* 25, 47-59.
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Maxwell JP, Rivo JV, Rostomily R, Swisshelm K, y Zarbl H** (2008). Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 112, 263-273.
- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, y Enrici RM** (2009). Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res* 29, 5171-5184.
- Mitsiades N, Poulaki V, Leone A, y Tsokos M** (1999). Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 91, 1678-1684.
- Miyagawa Y, Okita H, Itagaki M, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, y Kiyokawa N** (2009). EWS/ETS regulates the expression of the Dickkopf family in Ewing family tumor cells. *PLoS One* 4, e4634.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, y Kiyokawa N** (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* 28, 2125-2137.
- Monument MJ, Bernthal NM, y Randall RL** (2013). Salient features of mesenchymal stem cells-implications for Ewing sarcoma modeling. *Front Oncol* 3, 24.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, y Kinzler KW** (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.
- Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, y Rawadi G** (2006). Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 21, 934-945.
- Mosimann C, Hausmann G, y Basler K** (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 276-286.
- Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, y Sukhatme VP** (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol* 17, 5629-5639.
- Myant K, y Sansom OJ** (2011). Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: partners in crime. *Exp Cell Res* 317, 2725-2731.
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, y Iwamoto Y** (2003). Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Flil oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 278, 15105-15115.
- Narod SA, y Foulkes WD** (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 4, 665-676.
- Nathke IS** (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 337-366.

- Navarro S, Gonzalez-Devesa M, Ferrandez-Izquierdo A, Triche TJ, y Llombart-Bosch A** (1990). Scanning electron microscopic evidence for neural differentiation in Ewing's sarcoma cell lines. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416, 383-391.
- Nawshad A, y Hay ED** (2003). TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. *J Cell Biol* 163, 1291-1301.
- Nelson WJ, y Nusse R** (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Niehrs C** (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469-7481.
- Niehrs C** (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 767-779.
- Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, y Akiyama T** (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23, 8520-8526.
- 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, y Tokino T** (2002). The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 21, 8302-8309.
- Noguera R, Triche TJ, Navarro S, Tsokos M, y Llombart-Bosch A** (1992). Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphologic, immunocytochemical, and oncogene expression parameters. *Lab Invest* 66, 143-151.
- O'Connell MP, y Weeraratna AT** (2009). Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 724-739.
- O'Regan S, Diebler MF, Meunier FM, y Vyas S** (1995). A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. *J Neurochem* 64, 69-76.
- Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, y Takayanagi R** (2004). Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 259-264.
- Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, y 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.
- Ohno T, Rao VN, y Reddy ES** (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 53, 5859-5863.
- Oikawa T** (2004). ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95, 626-633.
- Olmos D, Postel-Vinay S, Molife LR, Okuno SH, Schuetze SM, Paccagnella ML, Batzel GN, Yin D, Pritchard-Jones K, Judson I, Worden FP, Gualberto A, Scurr M, de Bono JS, y Haluska P** (2010a). Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R

antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 11, 129-135.

Olmos D, Tan DS, Jones RL, y Judson IR (2010b). Biological rationale and current clinical experience with anti-insulin-like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J* 16, 183-194.

Oosterwegel M, van de Wetering M, Timmerman J, Kruisbeek A, Destree O, Meijlink F, y Clevers H (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* 118, 439-448.

Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, y Reddy ES (1995). Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11, 1049-1054.

Owen LA, y 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.

Pahlich S, Zakaryan RP, y 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, 1125-1137.

Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, y Munoz A (2001). Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 154, 369-387.

Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, Meyer WH, Horowitz M, Tzen CY, Wexler LH, y Tsokos M (1999). Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol* 30, 911-918.

Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, Chang W, Meng Z, Cheung P, Ji H, McLaughlin M, Veenstra TD, Nusse R, McCrea PD, y Artandi SE (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66-72.

Pascual G, y Glass CK (2006). Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab* 17, 321-327.

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

Pavlakovic H, Von Schutz V, Rossler J, Koscielniak E, Havers W, y Schweigerer L (2001). Quantification of angiogenesis stimulators in children with solid malignancies. *Int J Cancer* 92, 756-760.

Pelengaris S, Khan M, y Evan G (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.

Peng S, Miao C, Li J, Fan X, Cao Y, y Duan E (2006). Dickkopf-1 induced apoptosis in human placental choriocarcinoma is independent of canonical Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 641-647.

- Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, y Link MP** (1994). Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol* 25, 304-307.
- Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H y Delattre O** (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 14, 1159-64.
- Petermann R, Mossier BM, Aryee DN, Khazak V, Golemis EA, y Kovar H** (1998). Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hsRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene* 17, 603-610.
- Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, y Delattre O** (1993). Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomics* 18, 609-615.
- Polesskaya A, Seale P, y Rudnicki MA** (2003). Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113, 841-852.
- Pollak MN** (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* 262, 84-98; discussion 98-107, 265-108.
- Potratz J, Jurgens H, Craft A, y Dirksen U** (2012). Ewing sarcoma: biology-based therapeutic perspectives. *Pediatr Hematol Oncol* 29, 12-27.
- Prasad DD, Ouchida M, Lee L, Rao VN, y Reddy ES** (1994). TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. *Oncogene* 9, 3717-3729.
- Prieur A, Tirode F, Cohen P, y Delattre O** (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24, 7275-7283.
- Ramakrishnan R, Fujimura Y, Zou JP, Liu F, Lee L, Rao VN, y Reddy ES** (2004). Role of protein-protein interactions in the antiapoptotic function of EWS-Fli-1. *Oncogene* 23, 7087-7094.
- Ramani P, Rampling D, y Link M** (1993). Immunocytochemical study of 12E7 in small round-cell tumours of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity. *Histopathology* 23, 557-561.
- Rao VN, Ohno T, Prasad DD, Bhattacharya G, y Reddy ES** (1993). Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* 8, 2167-2173.
- Ravindranath A, O'Connell A, Johnston PG, y El-Tanani MK** (2008). The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation. *Curr Mol Med* 8, 38-50.
- Rettig WJ, Garin-Chesa P, y Huvos AG** (1992). Ewing's sarcoma: new approaches to histogenesis and molecular plasticity. *Lab Invest* 66, 133-137.

- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, Hoffmann F, Trumpp A, y Stamenkovic I** (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65, 11459-11468.
- Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, y Stamenkovic I** (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68, 2176-2185.
- Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, y Scotlandi K** (2010). CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 120, 668-680.
- Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, y Pappo AS** (2003). Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol* 40, 276-287.
- Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, y Clevers H** (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-612.
- Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, y 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, 1266-1277.
- Rossow KL, y Janknecht R** (2001). The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. *Cancer Res* 61, 2690-2695.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, y Polakis P** (1997). Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 57, 4624-4630.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, y Polakis P** (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.
- Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Kawaguchi K, Tanaka K, Matsuda S, Tamiya S, Iwamoto Y, y Tsuneyoshi M** (2002). APC mutations in synovial sarcoma. *J Pathol* 196, 445-449.
- Sakimura R, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Nakamura T, Matsumoto Y, y Iwamoto Y** (2005). Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors. *Int J Cancer* 116, 784-792.
- Sanceau J, Truchet S, y Bauvois B** (2003). Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 278, 36537-36546.
- Scotlandi K, Perdichizzi S, Bernard G, Nicoletti G, Nanni P, Lollini PL, Curti A, Manara MC, Benini S, Bernard A, y Picci P** (2006). Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 42, 91-96.
- Schmidt M, Patterson M, Farrell E, y Munsterberg A** (2004). Dynamic expression of Lef/Tcf family members and beta-catenin during chick gastrulation, neurulation, and early limb development. *Dev Dyn* 229, 703-707.

Schuetz AN, Rubin BP, Goldblum JR, Shehata B, Weiss SW, Liu W, Wick MR, y Folpe AL (2005). Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol* 18, 1403-1410.

Semenov M, Tamai K, y He X (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 280, 26770-26775.

Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, y He X (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11, 951-961.

Semenov MV, Zhang X, y He X (2008). DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem* 283, 21427-21432.

Seth A, y Watson DK (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41, 2462-2478.

Shang Y, Zhang C, Wang S, Xiong F, Zhao C, Peng F, Feng S, Yu M, Li M, y Zhang Y (2007). Activated beta-catenin induces myogenesis and inhibits adipogenesis in BM-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 9, 667-681.

Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, y Coleman N (2003). FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63, 4568-4576.

Shitashige M, Hirohashi S, y Yamada T (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci* 99, 631-637.

Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, y Srivenugopal KS (2002). Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 21, 878-889.

Suh CH, Ordóñez NG, Hicks J y Mackay B (2002). Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastruct Pathol* 26, 67-76.

Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC y He TC (2006). CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biol* 26, 2955-64.

Siligan C, Ban J, Bachmaier R, Spahn L, Kreppel M, Schaefer KL, Poremba C, Aryee DN, y Kovar H (2005). EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 24, 2512-2524.

Skokowa J, y Welte K (2007). LEF-1 is a decisive transcription factor in neutrophil granulopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 143-151.

Skromne I, y Stern CD (2001). Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development* 128, 2915-2927.

Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, Palani CD, Hong le TT, Klier U, Broker B, Volker U, y 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, 847-858.

- Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ y Denny CT** (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 6, 146-51.
- Sorensen PH, Shimada H, Liu XF, Lim JF, Thomas G, y Triche TJ** (1995). Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Cancer Res* 55, 1385-1392.
- Spahn L, Petermann R, Siligan C, Schmid JA, Aryee DN, y Kovar H** (2002). Interaction of the EWS NH2 terminus with BARD1 links the Ewing's sarcoma gene to a common tumor suppressor pathway. *Cancer Res* 62, 4583-4587.
- Spahn L, Siligan C, Bachmaier R, Schmid JA, Aryee DN, y Kovar H** (2003). Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein. *Oncogene* 22, 6819-6829.
- Stadeli R, Hoffmans R, y Basler K** (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol* 16, R378-385.
- Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, y 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.
- Stiller CA, y Parkin DM** (1996). Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull* 52, 682-703.
- Strammiello R, Benini S, Manara MC, Perdichizzi S, Serra M, Spisni E, Picci P, y Scotlandi K** (2003). Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* 35, 675-684.
- Streit A, y Stern CD** (1999). Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech Dev* 82, 51-66.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, y Mesirov JP** (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550.
- Suh CH, Ordonez NG, Hicks J, y Mackay B** (2002). Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastruct Pathol* 26, 67-76.
- Sun J, y Weis WI** (2011). Biochemical and structural characterization of beta-catenin interactions with nonphosphorylated and CK2-phosphorylated Lef-1. *J Mol Biol* 405, 519-530.
- Suske G** (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.
- Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, y Akiyama T** (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 14, 1741-1749.
- 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, y Shindoh M** (2003). EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63, 8338-8344.

Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Usono T, Saito H, Takahashi K, y Shibahara S (2000). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem* 275, 14013-14016.

Takemaru K, Fischer V, y Li FQ (2009). Fine-tuning of nuclear-catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell Cycle* 8, 210-213.

Tan SY, Burchill S, Brownhill SC, Gerrard MP, Watmore A, Wagner BE, y Variend S (2001). Small round cell tumor with biphenotypic differentiation and variant of t(21;22)(q22;q12). *Pediatr Dev Pathol* 4, 391-396.

Tan X, Apte U, Micsenyi A, Kotsagrelis E, Luo JH, Ranganathan S, Monga DK, Bell A, Michalopoulos GK y Monga SP (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 129, 285-302.

Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, y Iwamoto Y (1997). EWS-Flil antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99, 239-247.

Teitell MA, Thompson AD, Sorensen PH, Shimada H, Triche TJ, y Denny CT (1999). EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab Invest* 79, 1535-1543.

Ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E y Nusse R (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell stem cells* 3, 208-18.

Thevenod F, y Chakraborty PK (2010). The role of Wnt/beta-catenin signaling in renal carcinogenesis: lessons from cadmium toxicity studies. *Curr Mol Med* 10, 387-404.

Thompson AD, Teitell MA, Arvand A, y Denny CT (1999). Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 18, 5506-5513.

Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S, Marrano P, Bayani J, Malkin D, Greenberg M, Lorenzana A, y 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, 1125-1138.

Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, y Shaughnessy JD, Jr. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349, 2483-2494.

Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llort A, Gallego S, Ban J, Kovar H, y Notario V (2006). Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 66, 9937-9947.

Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, y Delattre O (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11, 421-429.

Tkaczuk KH (2009). Review of the contemporary cytotoxic and biologic combinations available for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 31 Pt 2, 2273-2289.

Torchia EC, Jaishankar S, y Baker SJ (2003). Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 63, 3464-3468.

- Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, y Bhat NK** (1997). Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31, 9-16.
- Triche TJ** (1988). Diagnosis of small round cell tumors of childhood. *Bull Cancer* 75, 297-310.
- Truong AH, y Ben-David Y** (2000). The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 19, 6482-6489.
- Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, y Lenoir G** (1983). [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 296, 1101-1103.
- Urano F, Umezawa A, Yabe H, Hong W, Yoshida K, Fujinaga K y Hata J** (1996). Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. *Jpn J Cancer Res* 89, 703-11.
- Uren A, Wolf V, Sun YF, Azari A, Rubin JS, y Toretsky JA** (2004). Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 43, 243-249.
- Ushigome S, Shimoda T, Nikaido T, Nakamori K, Miyazawa Y, Shishikura A, Takakuwa T, Ubayama Y, y Spjut HJ** (1992). Primitive neuroectodermal tumors of bone and soft tissue. With reference to histologic differentiation in primary or metastatic foci. *Acta Pathol Jpn* 42, 483-493.
- van Amerongen R, y Nusse R** (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-3214.
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, y Clevers H** (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, y Clevers H** (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- Verani R, Cappuccio I, Spinsanti P, Gradini R, Caruso A, Magnotti MC, Motolese M, Nicoletti F, y Melchiorri D** (2007). Expression of the Wnt inhibitor Dickkopf-1 is required for the induction of neural markers in mouse embryonic stem cells differentiating in response to retinoic acid. *J Neurochem* 100, 242-250.
- Vlad A, Rohrs S, Klein-Hitpass L, y Muller O** (2008). The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* 20, 795-802.
- Voeller HJ, Truica CI, y Gelmann EP** (1998). Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 58, 2520-2523.
- Wai DH, Schaefer KL, Schramm A, Korsching E, Van Valen F, Ozaki T, Boecker W, Schweigerer L, Dockhorn-Dworniczak B, y Poremba C** (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 20, 441-451.
- Wang C, Tai Y, Lisanti MP, y Liao DJ** (2011). c-Myc induction of programmed cell death may contribute to carcinogenesis: a perspective inspired by several concepts of chemical carcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 11, 615-626.

Wang H, Li Q, y Chen H (2012). Genistein affects histone modifications on Dickkopf-related protein 1 (DKK1) gene in SW480 human colon cancer cell line. *PLoS One* 7, e40955.

Wang J, Shou J, y Chen X (2000). Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 19, 1843-1848.

Wang K, Zhang Y, Li X, Chen L, Wang H, Wu J, Zheng J, y Wu D (2008). Characterization of the Kremen-binding site on Dkk1 and elucidation of the role of Kremen in Dkk-mediated Wnt antagonism. *J Biol Chem* 283, 23371-23375.

Wanzel M, Herold S, y Eilers M (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 13, 146-150.

Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, y Sasai Y (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* 8, 288-296.

Waterman ML (2004). Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 41-52.

Weber KL (2002). Current concepts in the treatment of Ewing's sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2, 687-694.

Weidner N, y Tjoe J (1994). Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13: antibody that recognizes glycoprotein p30/32MIC2 and is useful in diagnosing Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *Am J Surg Pathol* 18, 486-494.

Weinstein RS (2012). Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41, 595-611.

West DC (2000). Ewing sarcoma family of tumors. *Curr Opin Oncol* 12, 323-329.

Wharton KA, Jr., Zimmermann G, Rousset R, y Scott MP (2001). Vertebrate proteins related to *Drosophila* Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling. *Dev Biol* 234, 93-106.

Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H y Pals ST (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154, 515-23.

Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO y Nusse R (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biology* 2, 8

Willert K, y Jones KA (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.

Wu B, Crampton SP y Hughes CC (2010). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26, 227-39.

Wu WK, Cho CH, Lee CW, Fan D, Wu K, Yu J, y Sung JJ (2010). Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Lett* 295, 144-153.

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, y Kellis M (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434, 338-345.

- Yang L, Chansky HA, y 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.
- Yankulov K, Blau J, Purton T, Roberts S, y Bentley DL** (1994). Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell* 77, 749-759.
- Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC, Swain A y Capel B** (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230, 210-5.
- Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, y Lu QR** (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 12, 829-838.
- Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, y Reddy ES** (1997). Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 14, 1259-1268.
- Yoshikawa Y, Fujimori T, McMahan AP, y Takada S** (1997). Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. *Dev Biol* 183, 234-242.
- Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, y Zhang L** (2008). Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* 29, 84-92.
- Zender L, Villanueva A, Tovar V, Sia D, Chiang DY, y Llovet JM** (2010). Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52, 921-929.
- Zeng W, Wharton KA, Jr., Mack JA, Wang K, Gadbow M, Suyama K, Klein PS, y Scott MP** (2000). naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature* 403, 789-795.
- Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, y He X** (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877.
- Zhang D, Paley AJ, y Childs G** (1998). The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *J Biol Chem* 273, 18086-18091.
- Zheng S, Ramachandran B, Haigh JR, Palos TP, Steger K y Howard BD** (1996). The induction of ret by Wnt-1 in PC12 cells is atypically dependent on continual Wnt-1 expression. *Oncogene* 12, 555-62.
- Zinszner H, Immanuel D, Yin Y, Liang FX, y Ron D** (1997). A topogenic role for the oncogenic N-terminus of TLS: nucleolar localization when transcription is inhibited. *Oncogene* 14, 451-461.
- Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gadner H, y Kovar H** (1996). Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14, 1245-1251.

Zoubek A, Pfeiderer C, Salzer-Kuntschik M, Amann G, Windhager R, Fink FM, Koscielniak E, Delattre O, Strehl S, Ambros PF, y et al. (1994). Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br J Cancer* 70, 908-913.

Zucman-Rossi J, Batzer MA, Stoneking M, Delattre O, y Thomas G (1997). Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet* 99, 357-363.

Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, y et al. (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12, 4481-4487.

En este apartado se adjunta una publicación, cuyos resultados se muestran en esta Tesis:

- **Diego Navarro**, Noelia Agra, Ángel Pestaña, Javier Alonso and José Manuel González-Sancho. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor *DICKKOPF-1* gene and antagonizes β -catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis*. 2010 Mar; 31(3):394-401.

Además, a continuación se detalla la referencia de otra publicación científica en la cual el doctorando ha participado durante el período predoctoral:

- Oscar Aguilera, Cristina Peña, José María García, María Jesús Larriba, Paloma Ordóñez-Morán, **Diego Navarro**, Antonio Barbáchano, Isabel López de Silanes, Esteban Ballestar, Mario F. Fraga, Manel Esteller, Carlos Gamallo, Félix Bonilla, José Manuel González-Sancho and Alberto Muñoz. The Wnt antagonist *DICKKOPF-1* gene is induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007 Sep; 28(9):1877-1884.

