



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

EL PAPEL DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES EN EL CÁNCER: TERAPIA INDIVIDUALIZADA

Trabajo de fin de grado presentado por

ALBA VÁZQUEZ ARIAS

Dirigido por

Dra. Ana M^a Rodríguez Torres

Curso académico 2014/2015

ÍNDICE

Resumen - Abstract	1
Introducción	2
1. Factores transcripcionales	2
1.1. La familia ETS.....	2
1.2. El factor transcripcional Ets-2	4
2. Terapia génica individualizada.....	5
Objetivos.....	8
Materiales y métodos.....	9
1. Líneas celulares	9
2. Plásmidos	9
3. Purificación proteica	10
4. Diseño del oligonucleótido señuelo	11
5. Ensayos de EMSA.....	11
6. Ensayo de viabilidad celular (MTT assay).. ..	11
7. Inmunofluorescencia	12
8. Modelos animales.....	12
Resultados y discusión.....	13
Diseño de oligos-señuelo para Ets-2	13
Construcción <i>in silico</i> de un plásmido de expresión de la proteína hEts2-GST y su posterior purificación	14
Ensayos de movilidad electroforética: EMSA.....	15
Localización y expresión proteica de Ets-2 en las distintas líneas celulares mediante análisis de inmunofluorescencia	16
Efecto del señuelo para Ets-2 sobre el crecimiento celular <i>in vitro</i>	17
Efecto de los oligos-señuelo sobre la diseminación de células de cáncer de mama en ratones <i>nude</i>	18
Toxicidad de los oligos-señuelo en el modelo animal	18
Ensayos clínicos	19
Conclusiones - Conclusions.....	20
Índice de abreviaturas	22
Bibliografía.....	23

RESUMEN

Las terapias génicas actuales muestran resultados prometedores en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas, el cáncer. Después de los avances logrados en los últimos años en el estudio de la maquinaria transcripcional, son muchas las evidencias que implican a los factores transcripcionales en la oncogénesis. Así, en el presente trabajo, se plantea una propuesta de investigación para una nueva terapia génica contra el cáncer de mama, que se fundamenta en el diseño de oligonucleótidos-señuelo que presentan alta afinidad por los factores transcripcionales, en este caso por Ets-2. Se sabe que este factor transcripcional se une a los promotores de varios genes, promoviendo junto con otros cofactores, la proliferación celular en el cáncer de mama. De esta manera el oligonucleótido-señuelo diseñado se unirá al factor transcripcional Ets-2, impidiendo que dicho factor pueda unirse al promotor del gen diana, como es el gen *hTERT*, y en definitiva, impidiendo que este se exprese. De este modo, el resultado que cabe esperar, es la regresión completa del tumor. Para el planteamiento de esta propuesta, se ha seguido el protocolo aplicado para el desarrollo de este mismo tipo de terapia, con otros factores transcripcionales y en otros tipos de cáncer, encontrándose uno de ellos, en fase clínica 0.

ABSTRACT

The new gene therapies show promising results in the treatment of various diseases, including cancer. After the progress achieved in the last years in the study of the transcriptional machinery, there are many evidences that implicate the transcriptional factors in oncogenesis. Thus, in this paper, a research proposal of a new gene therapy against breast cancer is proposed, which is based on the design of oligonucleotide decoys that show high affinity for target transcription factors, in this case Ets-2. It is known that this transcriptional factor binds to the promoters of several genes, promoting with other cofactors, cell proliferation in breast cancer. In this way the designed oligonucleotide decoy, will bind to the Ets-2 transcription factor, blocking the binding of this factor to the promoter of the target gene, as the *hTERT* gene, and ultimately, blocking the gene expression. Thus, the expected result is the complete tumor regression. For the approach of this proposal, it has followed the protocol applied to the development of this same type of therapy, with other transcription factors and other cancers, finding one of them in clinical phase 0.

INTRODUCCIÓN

1.- Los factores transcripcionales en el cáncer

La regulación de la transcripción, constituye el primer nivel de regulación de la expresión génica, y está controlada por la acción combinada de múltiples factores transcripcionales, que activan o reprimen la transcripción al unirse a elementos reguladores *cis*, presentes en los genes diana. La identificación de los promotores funcionales de estos genes, regulados por factores transcripcionales específicos, es un punto crítico para entender los mecanismos moleculares que controlan la transcripción (Sementchenko *et al.*, 2000). Considerados de no ser susceptibles a fármacos, no fue hasta los últimos años cuando los factores transcripcionales empezaron a presentarse como buenas dianas terapéuticas, debido a sus papeles críticos en la regulación de la expresión de genes asociados con el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades, incluido el cáncer (Yan *et al.*, 2013).

La actividad de los factores transcripcionales, a menudo se ve alterada en los cánceres humanos debido a mutaciones, señalización anormal y/o modificaciones postraduccionales. Las células cancerosas, requieren mayores tasas de transcripción que las células normales, para la proliferación y la supervivencia. De hecho, ciertos oncogenes, genes ribosomales y componentes de la maquinaria transcripcional, se sobreexpresan en las células tumorales para mantener la proliferación (Villicaña *et al.*, 2014). En un estudio realizado por Mees *et al.* (2009), de 63 factores transcripcionales que analizaron, 19 mostraron modular exclusiva o diferencialmente la expresión de genes relacionados directamente con el desarrollo de cáncer. Los avances en los estudios de la maquinaria transcripcional basal, y el descubrimiento de fármacos que interfieren con múltiples componentes de la transcripción, están siendo utilizados actualmente para combatir el cáncer (Villicaña *et al.*, 2014).

1.1.- La familia ETS

La familia ETS (E26-Transformation Specific/E26-Transformación Específica) es una de las mayores familias de factores transcripcionales. Está formada por 28 genes homólogos a *ETS-1* en humanos (Cooper *et al.*, 2014), el primero de los homólogos celulares del oncogén viral v-ets, descubierto por primera vez, como parte de una proteína de fusión expresada por el retrovirus aviar transformante E26. (Wasylyk *et al.*, 1993). Se divide estructuralmente en 11 subfamilias (ETS, ERG, ELG, ELF, ESE, ERF, TEL, PEA3, SPI, TCF y PDEF), basándose en la homología del dominio ETS presente en su estructura (Kar *et al.*, 2013), pudiendo encontrarse este dominio tanto en el extremo C-terminal como en el N-terminal (Cooper *et al.*, 2014).

Los factores transcripcionales ETS, son proteínas modulares que presentan una secuencia conservada de 85 aminoácidos, denominada dominio ETS, que adopta una estructura de hélice-giro-hélice de unión al ADN, de alta afinidad por una secuencia consenso rica en purinas GGA(A/T) denominada EBS (Ets Binding Site/Sitio de unión de Ets) (Cooper *et al.*, 2014).

Pero además, presentan también otros dominios estructurales, tales como el AD (Activation Domain), y el PNT (Pointed Domain) (Figura 1), así como varias regiones adicionales. El Dominio PNT, de 65 a 85 aminoácidos, se ha encontrado en 11 de los 28 genes *ETS* humanos, y su función se relaciona con interacciones proteína-proteína (Kar *et al.*, 2013).



Figura 1. Estructura de los factores transcripcionales de la subfamilia ETS. Modificado de Kar *et al.* (2013).

Se ha observado, que la especificidad de unión de estos factores ETS a los promotores de los genes diana, también depende de las secuencias de ADN adyacentes o colindantes a EBS, elementos *cis* próximos, a las que se unen otros cofactores de la transcripción (Sementchenko *et al.*, 2000). De hecho, dependen de la interacción con otros factores para una regulación transcripcional precisa, y dicha interacción entre proteínas es sinérgica sobre los elementos del ADN. Basándose en la presencia del sitio EBS en sus promotores, se han encontrado más de 400 genes diana de ETS, como pueden ser, genes de factores transcripcionales, reguladores del ciclo celular, receptores extracelulares y factores de crecimiento, entre otros (Seth *et al.*, 2005).

Los factores transcripcionales ETS, son generalmente objetivos de las cascadas de transducción de señales, y en cooperación con otras familias de factores transcripcionales y cofactores, actúan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes que están involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo, la proliferación celular, la diferenciación, la hematopoyesis, la apoptosis, la metástasis, la remodelación tisular, la angiogénesis y la transformación (Seth *et al.*, 2005), de ahí el creciente interés en su estudio como posibles dianas terapéuticas contra el cáncer (Figura 2). El hecho de que algunos factores transcripcionales ETS, contribuyan a la inhibición de la apoptosis, se relaciona con que la resistencia a la terapia del cáncer sea en parte debida a los altos niveles de estos factores en las células tumorales (Oikawa, 2004).

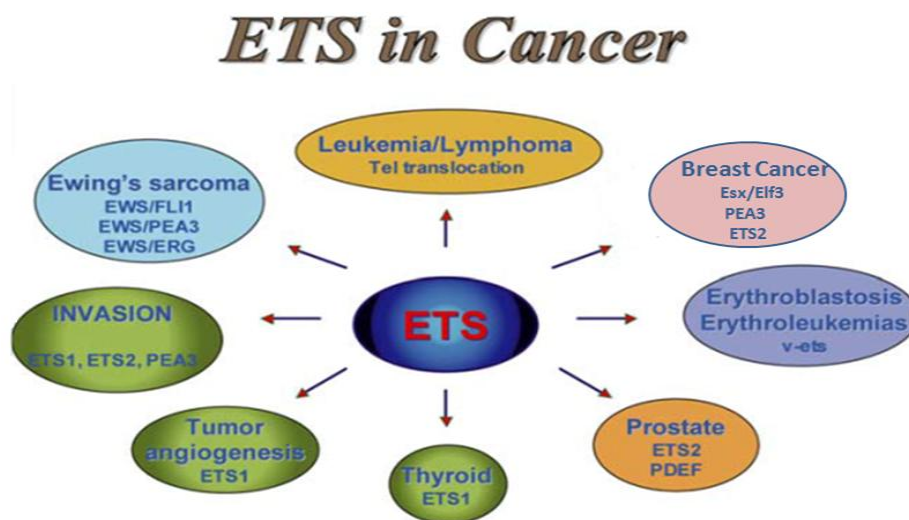


Figura 2. Implicación de los factores ETS en el cáncer. Modificado de Seth *et al.* (2005).

Se sabe que algunos factores ETS son activadores transcripcionales como otras oncoproteínas nucleares y anti-oncoproteínas (Jun, Fos, Myb, Myc, Rel, p53, etc.), pero aunque muchas proteínas Ets son factores activadores de la transcripción, algunos funcionan como represores, y otros muestran ser tanto activadores como represores. Vías de señalización intracelular específicas y modificaciones postraduccionales, afectan directamente a la actividad de varias proteínas Ets por regulación de la compartimentalización subcelular, actividad de unión a ADN, transactivación potencial o estabilidad.

Además, son factores transcripcionales MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases) dependientes (Al-azawi *et al.*, 2008), o como indica Oikawa (2004), son dianas de rutas de señalización Ras/MAPK que conducen a la activación oncogénica en muchos tipos de cáncer, ya que la función de algunos de ellos, incluyendo Ets-1

y Ets-2, es activada por vías de señalización Ras-MAPK y desempeñan papeles importantes en la regulación de la expresión de genes relacionados con el crecimiento y el ciclo celular, tales como *c-myc*, *junB*, *cdc2* y *ciclina D1*. Por lo tanto, algunos factores ETS funcionan como factores transcripcionales críticos para convertir las señales Ras en la expresión de un conjunto de genes relacionados con diversas funciones celulares (Figura 3).

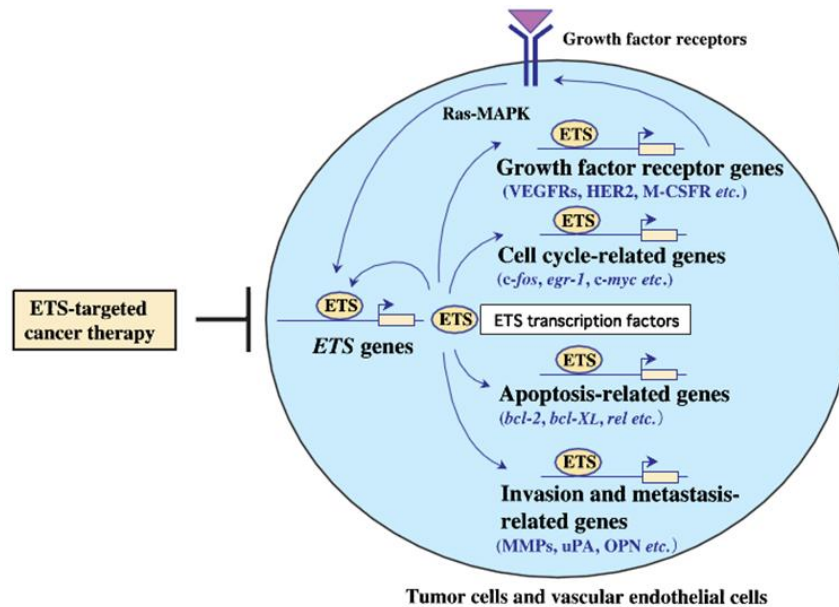


Figura 3. Los factores ETS en la terapia contra el cáncer. Tomado de Oikawa (2004).

Las consecuencias transcripcionales de la desregulación de las proteínas Ets, por la sobreexpresión, la fusión de genes, y la modulación por Ras/MAPK, están relacionadas con alteraciones en las funciones celulares normales, y conducen a un aumento ilimitado de la proliferación celular, la angiogénesis sostenida, la invasión y la metástasis (Kar *et al.*, 2013).

1.2. El factor transcripcional Ets-2

El factor transcripcional Ets-2 (Virus de la eritroblastosis V-ets E26 homólogo de oncogén 2) es una proteína de 469 aminoácidos que pertenece a la familia ETS de factores transcripcionales. Varios estudios señalan que, Ets-2 contribuye a la transformación neoplásica y al mantenimiento del fenotipo maligno en varios tipos de cáncer, incluidos el de próstata, pulmón, tiroides y mama. Los efectos oncogénicos de Ets-2 están relacionados con su capacidad para activar la expresión de múltiples genes que, o bien promueven la proliferación y la invasión, o previenen la muerte celular apoptótica (Sementchenko *et al.*, 2000). Se ha demostrado que las proteínas Ets-2, se expresan tanto en cánceres de mama humanos primarios como en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, y su expresión se ha asociado con la progresión de la enfermedad y la metástasis. Genes diana de Ets-2 incluyen, proteasas extracelulares, el activador de plasminógeno tipo uroquinasa, metaloproteinasas de la matriz, el receptor del factor de crecimiento HER2 y *myc* (Myers *et al.*, 2005).

Según explica Al-azawi *et al.* (2008), en el cáncer de mama, la terapia endocrina usual presenta características sustancialmente beneficiosas en términos de reducción del riesgo de recurrencia del tumor y muerte en mujeres con tumores de mama del tipo ER (Oestrogen Receptor/Receptor de estrógeno) positivo. Pero un 30% - 40% de las mujeres que inicialmente responden favorablemente al tratamiento endocrino, adquieren resistencia a dicho tratamiento en un lapso de 5 años. Esto puede ser una muestra de que las vías de señalización por factores de crecimiento, sus efectores diana y reguladores, son clave en el

desarrollo de la resistencia endocrina (Cui *et al.*, 2006). Como decíamos anteriormente, las proteínas Ets son factores transcripcionales MAP quinasa dependientes, y algunos estudios han determinado que las células con un elevado nivel de MAP kinasas, están asociadas con la resistencia endocrina (Hutcheson *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 2004). Se sabe que Ets-2 es fosforilado por las quinasas ERK1/2 en la Treonina 72, y la forma fosforilada se acumula en el núcleo celular. La estimulación de los factores VEGFR2, ErbB2, o ER, da lugar a la activación de estas quinasas y a la fosforilación de Ets-2 en las células cancerígenas de mama (Xu *et al.*, 2008). El factor transcripcional Ets-2 en colaboración con el coactivador SRC-1 (proteína p160), regulan *c-myc* para promover la resistencia endocrina en el cáncer de mama ER positivo (McNeil *et al.*, 2006). El factor c-Myc es además en sí mismo, un regulador transcripcional que juega un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular, crecimiento y apoptosis (Grandori *et al.*, 2000).

También se sabe que el gen *hTERT* (Telomerasa Transcriptasa Inversa humana) conduce a la inmortalidad de las células cancerígenas de mama, que su expresión está regulada estrictamente a nivel transcripcional, y más recientemente, que es un gen diana de los factores transcripcionales ETS (Xu *et al.*, 2008). La activación de *hTERT*, favorece el mantenimiento de los telómeros, que en las células cancerígenas conduce a una proliferación celular continua. En estudios previos se ha encontrado que c-Myc es un factor transcripcional primario del gen *hTERT*, el cual se une al promotor de dicho gen, en la llamada Caja-E (5' CACGTG3') activando su transcripción. El factor transcripcional Ets-2, es necesario para la expresión génica de *hTERT* y la proliferación de las células cancerígenas de mama, al unirse al promotor del gen y activar su transcripción formando un complejo con c-Myc. Así, la expresión del gen *hTERT* se mantiene por un mecanismo que implica interacciones entre el factor Ets-2, el cofactor c-Myc y el promotor del gen *hTERT* (Xu *et al.*, 2008).

2. Terapia génica individualizada

Como destaca Yan *et al.* (2013), la terapia génica a nivel transcripcional, es una estrategia emergente que tiene la intención de rectificar la expresión génica aberrante en las células cancerosas, a través de la intervención directa en el proceso de transcripción. Si bien siempre se han designado estas estrategias terapéuticas como imposibles, hoy existen muchos ejemplos que demuestran lo contrario.

La transcripción se regula a distintos niveles debido a la participación de diversos elementos y mecanismos (Figura 4) (A), lo que permite utilizar diferentes estrategias para el silenciamiento, como: (B) Pequeñas moléculas o poliamidas que compiten con factores transcripcionales para unirse a elementos reguladores *cis*, mientras que los señuelos se unen a factores transcripcionales impidiendo la unión a los promotores; (C) Péptidos o moléculas pequeñas que interrumpen la dimerización de los factores transcripcionales, o las interacciones entre los factores y sus co-reguladores; (D) La inhibición de las enzimas modificadoras del ADN o de las histonas con los consiguientes efectos sobre la expresión génica; (E) Los factores transcripcionales artificiales, fusionados con dominios de activación o represión de la transcripción, se unen a los promotores modulando los resultados de la transcripción.

El primer nivel de control de la transcripción, implica la unión de factores transcripcionales a regiones promotoras/potenciadoras con el consiguiente reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal (Figura 4). Mientras que los agentes terapéuticos pueden competir con factores de transcripción por la unión al ADN, pueden también imitar elementos *cis*-reguladores que funcionen como proteínas "trampa". El segundo nivel de regulación, se logra a través de interacciones proteína-proteína que se producen entre los factores transcripcionales y sus proteínas reguladoras (a menudo referidos como co-reguladores transcripcionales). Los agentes terapéuticos, se pueden desarrollar para interrumpir interacciones proteína-proteína, lo que conduce a la expresión alterada de genes. Esta estrategia, se dirige principalmente a las interacciones entre los factores de transcripción y sus co-reguladores, pero también puede interferir con la dimerización de la proteína. Esto último, es a menudo necesario para la unión al ADN de muchos factores transcripcionales oncogénicos (por ejemplo Myc). El tercer nivel de regulación está relacionado con el panorama epigenético, incluyendo la metilación del promotor y las modificaciones de las histonas

centrales. Estas estrategias dirigidas, generalmente requieren pre-caracterización del mecanismo o mecanismos responsables de la expresión aberrante de genes relacionados con el cáncer (Yan *et al.*, 2013).

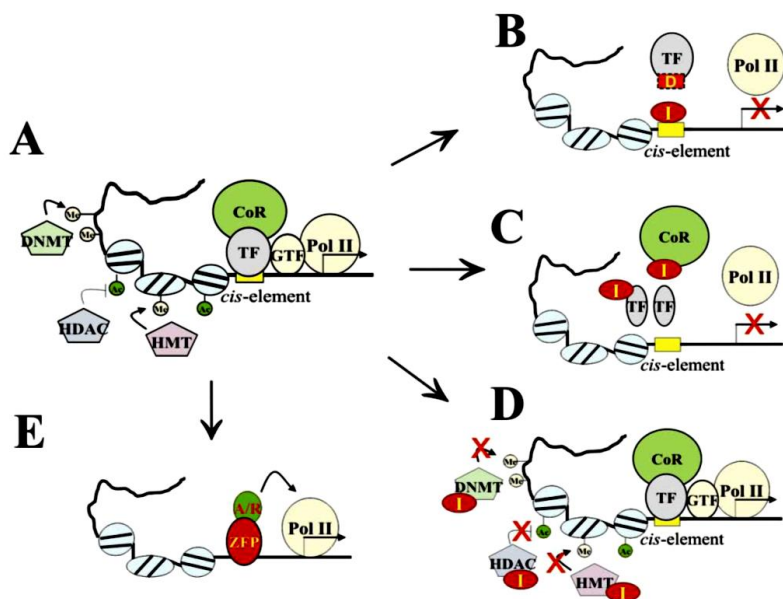


Figura 4. Estrategias de silenciamiento. TF: Factor transcripcional; GTF: Factor transcripcional general; Pol II: RNA Polimerasa II; CoR: Co-regulador de la transcripción; DNMT: ADN Metiltransferasa; HDAC: Histona Desacetilasa; HMT: Histona Metiltransferasa; I, agentes de transcripción diana; D: Factor transcripcional señuelo; Me: Grupo Metilo; Ac: Grupo Acetilo; ZFP: Proteína dedo de Zinc; A/R: Dominio de Activación o Represión de la transcripción. Tomado de Yan *et al.* (2013).

Oikawa (2004), resume algunas de las terapias actuales relacionadas con factores transcripcionales ETS en:

1.-Pequeñas moléculas de unión al ADN: Muchos agentes anticancerígenos de uso común en la práctica clínica (por ejemplo, el cisplatino) se unen al ADN y, regulan la expresión génica al interferir con las interacciones proteína-ADN.

2.-Las Poliamidas: Contienen N-metilpirrol (Py) y N-metilimidazol (Im) y están diseñadas para unir surcos pequeños de ADN de doble cadena de genes específicos, en base a un conjunto de reglas de apareamiento (Py / Py une A · T o T · A, mientras Im / Py y Py / Im reconoce GC y GC, respectivamente) bloqueando el sitio de unión de factores transcripcionales.

3.-Factores ETS como represores: TEL, es un ejemplo de factor transcripcional ETS que se ha sugerido que funciona como una proteína supresora de tumores, ya que se vio que la introducción de un vector de expresión para TEL en células transformadas causó la inhibición del crecimiento celular.

4.-Oligonucleótidos antisentido: Desarrollados como un método para inhibir específicamente el proceso de traducción para transcritos de genes, a través de la hibridación con una sola cadena de ADN de alrededor de 20 nucleótidos. El tratamiento de gliomas con oligonucleótidos antisentido para Ets-1, inhiben la migración celular y la invasión.

5.-RNA interferente: El bloqueo de ARNm de genes específicos, se realiza utilizando el método del RNA interferente. La introducción en las células de un siARN de 20-25 nucleótidos, contra las secuencias de ADN específicas de un gen diana, inhibe con eficacia la traducción del gen diana mediante la reducción del ARNm. El uso de siRNA, es aplicable a diversos tipos de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Al menos *in vitro*, la eficacia de esta estrategia ha sido probada en leucemia mielógena crónica.

6.-Señuelos: Se denominan "Señuelos" o "Decoys" o también oligonucleótidos-señuelo, a oligonucleótidos artificiales de doble hebra que presentan alta afinidad por un factor transcripcional, y que compiten por la

unión de la proteína con los elementos *cis* específicos presentes en la región promotora de los genes diana, inhibiéndose de esta manera, la expresión del gen (Figura 5).

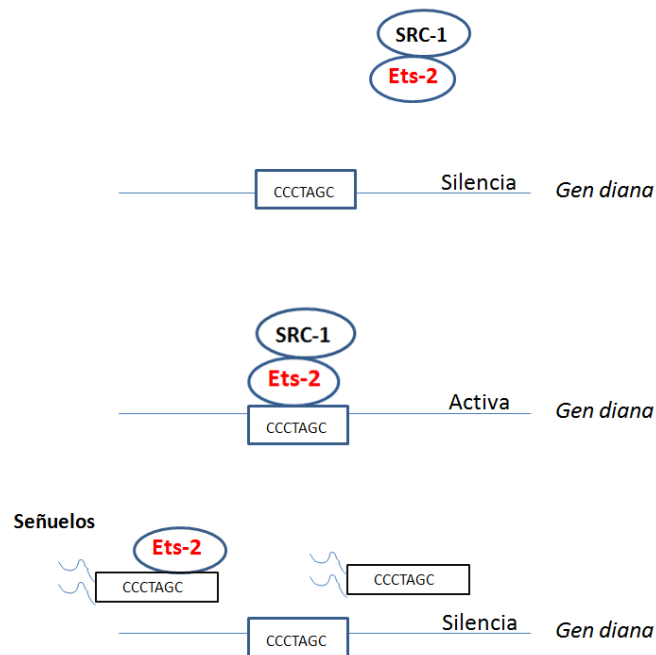


Figura 5. Modelo de acción de los oligonucleótidos-señuelo para Ets-2. Ets-2 en colaboración con SRC-1 (proteína p160), regula c-Myc para promover resistencia endocrina.

Las líneas actuales de investigación basadas en la regulación transcripcional, proponen el diseño de “decoys” o señuelos de factores transcripcionales. Este tipo de estrategia, se ha ensayado con éxito en modelos animales para el factor transcripcional Ets-1 y la diseminación peritoneal de cáncer gástrico (Taniguchi *et al.*, 2007). Pero además, también se han ensayado en tumores de cabeza y cuello, empleando un señuelo del factor transcripcional STAT3. Este señuelo STAT3, demostró una unión selectiva a la proteína STAT3, e inhibió la proliferación del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) *in vitro*. La administración intratumoral del señuelo STAT3 inhibió el crecimiento de tumores de xenoinjertos HNSCC *in vivo*. Otras investigaciones posteriores, demostraron que este señuelo de STAT3 exhibe actividad anti-tumoral en una variedad de modelos preclínicos incluyendo cánceres de pulmón y piel. Los estudios preclínicos del señuelo STAT3 en modelos animales, han demostrado que es bien tolerado y carece de toxicidad (Fase clínica 0) (Sen *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

En este trabajo, se presenta una propuesta de terapia individualizada para el cáncer de mama, la cual consistirá en el diseño de un oligonucleótido-señuelo específico del factor transcripcional Ets-2. Este señuelo será de aplicación intratumoral, de modo que su unión específica al factor transcripcional Ets-2, impedirá la expresión del gen diana, como es el gen *hTERT*, esperándose así, la regresión completa del tumor.

Para evaluar la eficacia de la terapia propuesta, y previamente a la fase clínica, debemos de realizar los siguientes ensayos:

- 1.- Diseñar los oligonucleótidos-señuelo para el factor transcripcional humano hEts-2.
- 2.- Verificar la unión entre los oligos-señuelo diseñados y la proteína hEts-2. Para ello se realizarán los siguientes ensayos:
 - a.- Clonación del gen humano *hETS-2* en un vector de expresión proteico y posterior purificación de la proteína recombinante hEts2-GST mediante cromatografía de afinidad.
 - b.- Ensayo de movilidad electroforética para la confirmación de la unión entre el oligo-señuelo y la proteína hEts-2, tanto de la proteína recombinante purificada, como la presente en los extractos proteicos nucleares de las líneas celulares escogidas.
- 3.- Determinar la expresión y localización del factor Ets-2 en líneas celulares de cáncer de mama, mediante un análisis de inmunofluorescencia.
- 4.- Evaluar el efecto de los oligos-señuelo de Ets-2 sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama, mediante el ensayo MTT.
- 5.- Evaluar el efecto de los oligos-señuelo de Ets-2 sobre la diseminación de las células tumorales en el modelo animal.
- 6.- Determinar posibles efectos tóxicos de los oligos-señuelo de Ets-2 sobre el modelo animal.
- 7.- Ensayos Clínicos: Se propone un protocolo tipo que ya se ha realizado con STAT3 como terapia génica y el cual está en fase clínica 0.

estas se centrifugarán durante 5 min a 450g. Posteriormente, serán resuspendidas con 1 mL de tampón de lisis (10 mM de Acido N-2-hydroxyetyl piperazine-NO-etanosulfónico [HEPES], pH 7,9 , 1,5 mM MgCl₂, KCl 10 mM), 10 µL de 0,1 M Ditiotreitól [DTT]) y 10 µL de la mezcla de antiproteasas (que contiene bencenosulfonilo 4-2-aminoetil fluoruro, pepstatina A, bestain, leupeptina, aprotinina y transepoxy succinyl-L-leucil-amido-butano), se incubarán durante 15 minutos y luego se centrifugarán. Los sedimentos celulares se resuspenden en 400 µL de tampón de lisis y se homogeneizan con una jeringa de aguja estrecha. La suspensión se centrifugará durante 20 min a 10.000 g, y los pellets que contienen los núcleos se mezclarán con 140 µL de tampón de extracción que contiene 0,1 M DTT y un inhibidor de proteasas. Después de agitación suave durante 30 min y centrifugación durante 5 min a 20.000 g, los sobrenadantes se recogen como extractos nucleares, y se preparan alícuotas que se almacenan a -70°C hasta el momento de su uso.

La concentración proteica, de los dos tipos de extractos, se determinará usando el Método Bradford, donde se mide la absorbancia a 595 nm de distintas concentraciones de una solución patrón de BSA (Seroalbúmina bovina). Y finalmente se comprueba el estado de las proteínas en los dos procesos de purificación mediante una electroforesis en gel de SDS_PAGE (gel desnaturizante de acrilamida).

4. Diseño del oligonucleótido – señuelo

Los oligonucleótidos señuelo se diseñan utilizando el programa MatInspector de Genomatix, <http://www.genomatix.de>, en la búsqueda de la secuencia consenso EBS (Ets Binding Site) de unión del factor Ets-2, en los promotores de los genes diana que regula transcripcionalmente dicho factor. La secuencia consenso EBS aparece subrayada en la secuencia lineal del oligonucleótido-señuelo patrón: 5' – GGGAGGGATCGCGC – 3'; 3' – CCCTCCCTAGCGCG – 5', a partir de la cual se diseñarán otros oligos que serán utilizados como señuelos para el factor Ets2, con el objetivo de encontrar el modelo más eficiente.

Los oligonucleótidos-señuelo son cadenas dobles de ADN, de modo que para anillar ambas cadenas, estos se someten a una temperatura de 80 °C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento gradual, antes de proceder a su uso.

5. Ensayos de EMSA

Se realizan ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay/ Ensayo de cambio en la movilidad electroforética) tanto con la proteína recombinante hEts2-GST como con los extractos proteicos nucleares.

En ambos casos, los extractos proteicos se incuban con 10.000 cpm de un oligonucleótido de ADN de 14-pb, diseñado como el señuelo específico, y que contiene la secuencia consenso de Ets-2, previamente marcada con [γ -³²P] dATP (Amersham Biosciences). Las incubaciones se realizan a temperatura ambiente durante 30 min en tampón 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, que contiene 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Ditiotreitól, Glicerol al 4%, y 100 µg/mL de BSA libre de nucleasas. Para los estudios de competición, se añaden a la mezcla de reacción, oligonucleótidos Ets-2 patrón y mutados sin marcar, unos 30 min antes de añadir la sonda marcada. Un anticuerpo específico para Ets-2 (c-20 Ets-2, Santa Cruz sc-351, 0,5µL) se incuba con extractos proteicos nucleares 20 min en hielo antes de la reacción de unión con el señuelo. Todas las mezclas de incubación se someten a electroforesis en geles nativos de acrilamida al 5% (w/v), que posteriormente se secarán y se someterán a autorradiografía. Para el EMSA con extractos proteicos nucleares, se añadiría además, 2 µg de poly (dl-dC), un polímero sintético como competidor no específico, para evitar uniones de proteínas no específicas en el ensayo.

6. Ensayo de viabilidad celular MTT

Para el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), cada línea celular se incuba en microplacas de 96 pocillos (5x10³ células / pocillo) con 100µL de medio PBS durante 24 horas. Pasado ese tiempo, el medio se cambia por un medio fresco que contenga el señuelo Ets-2 a una concentración de 0;

0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 ó 10 μ M. Después se incuban durante 96 horas, pasadas las cuales se añade MTT (10 μ L / pocillo, 5 mg / mL en PBS) y las placas se incuban durante 4 horas. Posteriormente se añaden a cada pocillo 100 μ L de isopropanol / 0,04 N solución de ácido clorhídrico. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 540 nm, utilizando un lector de microplacas para el cálculo del crecimiento celular.

7. Inmunofluorescencia

Secciones de tejidos de cáncer de mama se bloquean en suero de cabra y posteriormente se incuban con anti-humanEts-2 de conejo (10 μ g/mL en 10% de suero humano; sc-351, Santa Cruz) seguido de un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con TRITC (Isotiocianato de tetrametilrodamina) (1:100) (Sigma-Aldrich). Las secciones se co-incuban con anti-human-c-Myc de ratón (10 μ g/mL en un 10% de suero humano) seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón de oveja conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (1:100) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los portaobjetos se montan usando medios de montaje fluorescentes (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Como marcador nuclear fluorescente se utiliza DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol).

8. Modelos animales

Ratones *nude* (*nu/nu*, ratones desnudos inmunológicamente deprimidos) de cuatro semanas se tratan con una concentración de 5mg/Kg del señuelo diariamente para comprobar los efectos sobre el desarrollo tumoral y el avance de la enfermedad. Un total de 10 grupos, cada uno compuesto por 10 ratones: 5 grupos del total de 10 se tratan con cada uno de los distintos señuelos (patrón, mutado, semicíclico y cíclico) por vía intravenosa, además del grupo control y los otros 5 grupos restantes, se tratan igualmente con los 4 señuelos distintos, pero por vía intratumoral, contando también con un grupo control. De este modo, se podrá observar el efecto de los distintos señuelos en relación a un control y con diferentes vías de administración.

En este punto también se evalúa el posible efecto tóxico del señuelo. Se determina diariamente el cambio de peso y la ingesta de alimento así como observaciones patológicas en distintos órganos: corazón, pulmón, hígado y riñón. El protocolo experimental deberá ser aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del organismo correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La terapia génica basada en el suministro intratumoral de señuelos, ha sido desarrollada como un nuevo tipo de tratamiento con aplicación clínica contra el cáncer (Sen *et al.*, 2012). La inactivación del factor de transcripción por el señuelo, modifica la regulación de los genes diana sobre los que actúa dicho factor. Esto se ha visto en numerosos ensayos *in vitro* con diferentes factores transcripcionales y para diversos tipos de cáncer, pero además, también se ha observado en ensayos *in vivo*, encontrándose alguno de ellos ya en fase clínica 0.

Un estudio con otro factor transcripcional, Ets-1, de la misma familia que el que se propone en este trabajo, confirma que la inyección intraperitoneal del señuelo diseñado para Ets-1 inhibe la diseminación peritoneal de cáncer gástrico mediante la supresión de la angiogénesis en un ratón modelo *nude*. Este estudio proporciona la primera evidencia de la aplicación de señuelos como estrategia terapéutica para la diseminación peritoneal *in vivo* (Taniguchi *et al.*, 2007).

Sen *et al.* (2012) proporcionan el primer ensayo clínico con señuelos, cuyo desarrollo se encuentra además en fase clínica 0. Este se ha realizado con el factor transcripcional STAT3, para el tratamiento de cáncer escamoso de cabeza y cuello. En este caso los señuelos son estructuralmente diferentes a los usados en Ets-1. Se crearon varios modelos de oligos-señuelo, uno con una estructura unimolecular circularizada con un bucle de horquilla que contiene 4 nucleótidos de cadena sencilla y otros con un espaciador de hexa-etilenglicol, obteniéndose un oligonucleótido semi cíclico y otro cíclico, los cuales resultan más resistentes a las nucleasas del suero, al tiempo que conservan la eficacia y la especificidad, en contraste con el señuelo patrón lineal, que es altamente susceptible a la degradación y desnaturalización térmica. Ensayos *in vivo* con 10 ratones, tras administración intravenosa de 5mg/kg/día del señuelo, mostraron una disminución en el tamaño del tumor a los 19 días del tratamiento, de los cuales dos de los 10 ratones tratados con el señuelo cíclico experimentaron una regresión completa del tumor. Y además, se constató que los señuelos STAT3 modificados inhiben la proliferación celular y reducen la expresión de genes diana STAT3 *in vitro* e *in vivo*, e inhiben el crecimiento de xenoinjertos tumorales, vía administración intratumoral.

Diseño de Oligos-señuelo para Ets-2

Los sitios de unión consenso para varios factores ETS han sido determinados por el enriquecimiento de oligonucleótidos de alta afinidad de un conjunto de oligos con secuencias aleatorias. Dichos análisis han demostrado que miembros de la familia ETS a menudo difieren en su preferencia del sitio de unión exacto, fuera de la secuencia consenso GGAA / T, con un reconocimiento específico del factor que abarca de nueve a quince pares de bases (Ghysdael y Boureux, 1997; Graves y Petersen, 1998).

La especificidad y la afinidad de los factores ETS a los sitios EBS de los genes diana, está controlada en última instancia por la secuencia precisa del contexto/geometría del sitio EBS en relación con otros elementos *cis*. La importancia de los elementos vecinos para maximizar el funcionamiento a través de EBS, se explica en parte por la capacidad de los factores ETS para formar complejos y actuar sinérgicamente con los miembros de otras familias de factores transcripcionales (Sementchenko *et al.*, 2000).

Las secuencias de los dominios de activación de Ets-1 y Ets-2 son diferentes, y han evolucionado mucho más rápido desde organismos procariontes hasta humanos que el resto de las proteínas. Uno de los significados de esta divergencia, es que estos dominios pueden interactuar con diferentes factores accesorios o componentes de la maquinaria transcripcional, lo que daría lugar a una diversidad de funciones y regulaciones. Las secuencias de acompañamiento son variables y hay cada vez más pruebas que indican que ayudan a determinar que proteína Ets se unirá (Wasylyk *et al.*, 1993).

El oligonucleótido-señuelo, es una doble cadena de ADN que contiene la secuencia consenso de unión del factor al promotor del gen diana. Para el factor Ets-2, se propone el diseño de varios oligos-señuelo (Figura 8) que contienen la secuencia EBS y la secuencia colindante a dicho dominio, específica del promotor del gen diana *hTERT*. Se propone el diseño de un oligo con la secuencia mutada para posteriores ensayos, y a

B. Reacción de PCR para la amplificación del gen, y posterior digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I, tanto del fragmento obtenido de PCR como del vector de clonación pGEX-4T-1.

C. Purificación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en un gel de Agarosa al 0,7%, y posteriormente se procede a la reacción de ligamiento donde ambos ADNs se unen en presencia de la enzima T4 ADN Ligasa. El último paso consiste en transformar las células competentes de bacterias BL21-DE3 y seleccionar los candidatos al sembrarlas en placas selectivas LBA (Medio Luria-Bertani con ampicilina).

D. Obtención del extracto celular y posterior carga en una columna cromatográfica con la resina de afinidad Glutathione Sepharose™ 4B, diseñada para la purificación de proteínas recombinantes derivadas de la Glutathione-S-transferase, incluyendo las proteínas de fusión a GST obtenidas usando los plásmidos de expresión de la serie pGEX. Las proteínas se eluyen bajo condiciones suaves y no desnaturizantes que mantienen su funcionalidad.

Ensayos de movilidad electroforética

Se parte de la premisa de que, el tratamiento de las células con el señuelo de Ets-2, interferirá con la unión del factor a la secuencia específica EBS presente en el promotor del gen diana. Para confirmar esta afirmación, se propone realizar 2 tipos de ensayo EMSA o de movilidad electroforética:

1.- Una comprobación previa, de la afinidad de los distintos señuelos diseñados con la proteína humana recombinante hEts2-GST previamente purificada, que servirá también para ajustar la concentración más adecuada de dichos oligos-señuelo.

2.- Empleando los extractos proteicos nucleares, se observará la eficacia de unión de los mismos con los señuelos diseñados.

Como se explicaba en la introducción, uno de los genes diana sobre el que actúa el factor Ets-2 es el gen *hTERT* (Xu *et al.*, 2008), el cual presenta dos sitios específicos de unión en el promotor: “Ets site” donde se une el factor Ets-2 y “E-box” donde se une el cofactor c-Myc (Figura 10).

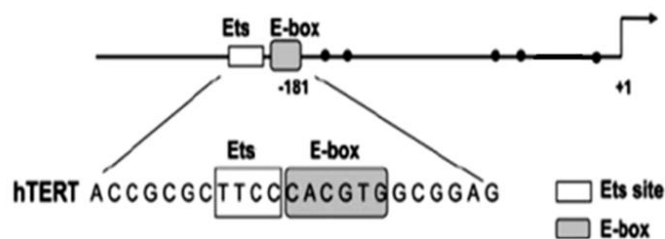


Figura10. Promotor del gen *hTERT*. Caja Ets: secuencia de unión del factor Ets-2; Caja-E: secuencia de unión del cofactor c-Myc. Tomado de Xu *et al.* (2008).

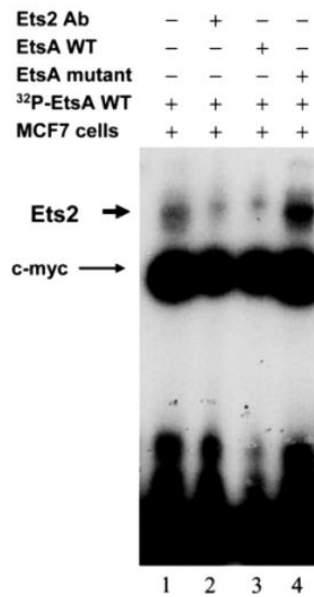


Figura 11. Ensayo de EMSA. **Ets2 Ab:** anticuerpo específico de Ets-2; **EtsA WT:** oligo sin marcaje con la secuencia de unión de Ets-2; **EtsA mutant:** oligo sin marcaje con la secuencia mutada; **³²P-EtsA WT:** oligo marcado radioactivamente con la secuencia de unión de Ets-2. Tomado de Xu *et al.* (2008)

La Figura 11 muestra un EMSA realizado usando extractos proteicos nucleares de las células MCF-7 con cáncer de mama. La especificidad de unión de Ets-2 a un oligo con su secuencia EBS marcado radioactivamente (³²P-EtsA WT, pocillo 1), se comprueba con la aparición de una banda específica (señalada como Ets2). La adición de un anticuerpo específico del factor Ets-2 (Ets2 Ab) o la adición del mismo oligo sin marcar (EtsA WT, ADN competidor) (pocillos 2 y 3 respectivamente), provoca la disminución en la intensidad de dicha banda, mientras que un oligo con esa secuencia mutada (EtsA mutant, pocillo 4) hace aparecer de nuevo esa señal. Esto nos permitiría confirmar, la unión específica de los oligos diseñados, conteniendo la secuencia EBS específica, con el factor Ets-2. También se puede observar la presencia de otra banda específica (señalada como c-myc), debido a que se trata de un cofactor de la proteína Ets-2, cuya secuencia de unión al ADN se encuentra en el oligo utilizado en este ensayo, con el nombre de E-box, tal y como se muestra en la Figura 10 (Xu *et al.*, 2008).

Localización y expresión proteica de Ets-2 en las distintas líneas celulares mediante análisis de inmunofluorescencia

Empleando anticuerpos específicos conjugados con compuestos fluorescentes, tal y como se describe en materiales y métodos, se observa la expresión y co-localización de los factores Ets-2 y c-Myc en el núcleo de células epiteliales de cáncer de mama, y con menor expresión en el citoplasma (Figura 12). Estas células se extrajeron de un pequeño grupo de pacientes con cáncer de mama y con la enfermedad localmente avanzada, y que además recibieron previamente terapias neoadyuvantes, tales como quimioterapia o tratamientos endocrinos (Al-Azawi *et al.*, 2008).

En este ensayo, se observa la co-localización de ambos factores. Posiblemente esto sea otra evidencia de lo observado en el EMSA, en relación a los sitios de unión colindantes del factor Ets-2 y del co-factor c-Myc sobre el promotor del gen diana sobre el que actúan.

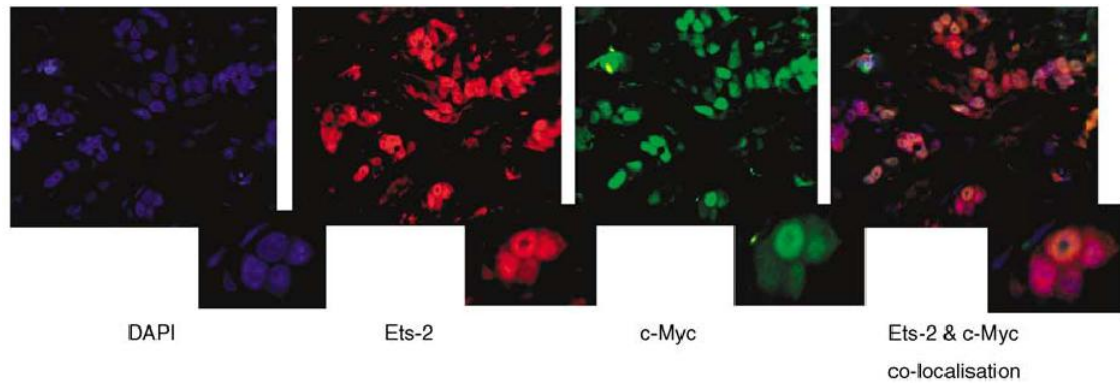


Figura 12. Co-localización inmunofluorescente de Ets-2 con c-Myc. (200x, recuadro pequeño a 600x) en células epiteliales de cáncer de mama. Tomado de Al-Azawi *et al.* (2008).

Efecto del señuelo de Ets-2 sobre el crecimiento celular *in vitro*

Con el fin de evaluar el efecto directo, de los señuelos diseñados para Ets-2 sobre la viabilidad celular, se realizará el ensayo MTT utilizando las líneas celulares de cáncer de mama escogidas para este proyecto. Se medirá el crecimiento celular fluorimétricamente, permitiendo relacionar el efecto dosis-dependiente que produce el señuelo sobre dichas células.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

En la Figura 13 se muestra como ejemplo el resultado de los oligos-señuelo de Ets-1 utilizados (señuelo patrón y señuelo mutado) en células de cáncer gástrico y en células control. De esta figura se puede confirmar que el señuelo mutado no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular, igual que ocurre en las células control con los dos tipos de señuelo, pero sin embargo en las células de cáncer gástrico y con un señuelo específico de Ets-1 se observa una inhibición del crecimiento celular y que además es dosis-dependiente del señuelo utilizado (Taniguchi *et al.*, 2007). Estos son los resultados que cabría esperar para Ets-2.

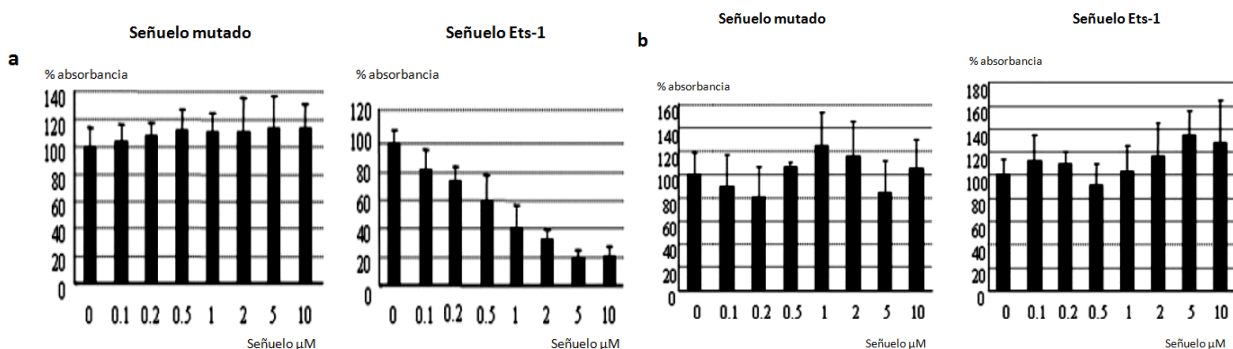


Figura 13. Efecto de los señuelos de Ets-1 sobre el crecimiento celular, determinado mediante el ensayo MTT realizado sobre células de cáncer gástrico (a) y células control (b). Modificado de Taniguchi *et al.* (2007).

Efecto de los oligos-señuelo de Ets-2 sobre la diseminación de células cancerígenas de mama en ratones *nude*

Se ensayará el efecto terapéutico de los oligos-señuelo de Ets-2, en la diseminación de células de cáncer de mama en ratones *nude*. Para ello, se usarán las células MCF7-GFP, células de cáncer de mama MCF7 transfectadas con el plásmido de expresión de GFP (pCMV6-AC-GFP), las cuales debido a la etiqueta de fluorescencia verde, permiten evaluar nódulos micrometastásicos con un alto nivel de sensibilidad en la detección, y que no sería detectable con microscopía convencional. Siguiendo este mismo protocolo, se confirmó la formación de diseminación peritoneal de cáncer gástrico, el día posterior a la inyección de células MKN45-GFP (con cáncer gástrico) en ratones *nude* (Taniguchi *et al.*, 2007).

Por todo ello, estas células MCF7-GFP se inyectarán el Día 0 en las glándulas mamarias de cada ratón *nude* (n=10). Posteriormente, se inyectarán en la misma zona, y en días alternos desde el día 1 al 13, los oligos-señuelo diseñados de Ets-2 (40 nmol) ó para el grupo control, sólo PBS.

El día 14, después de la inyección del señuelo, se evalúan los nódulos fluorescentes, que representan las formaciones tumorales, observados bajo estereomicroscopía de fluorescencia, donde se espera observar una imagen similar a la plasmada en la Figura 14b, donde se muestra el efecto de los oligos-señuelo de Ets1 en el modelo de diseminación peritoneal en ratón *nude* (Taniguchi *et al.*, 2007). Se puede observar tanto en las fotografías, como en el peso total de los nódulos fluorescentes (Figura 14a), las diferencias de los distintos señuelos ensayados (señuelo patrón, mutado o el grupo control). Respecto a la diseminación del tumor, los ratones tratados con el señuelo patrón se espera que presenten un mejor pronóstico que los control.

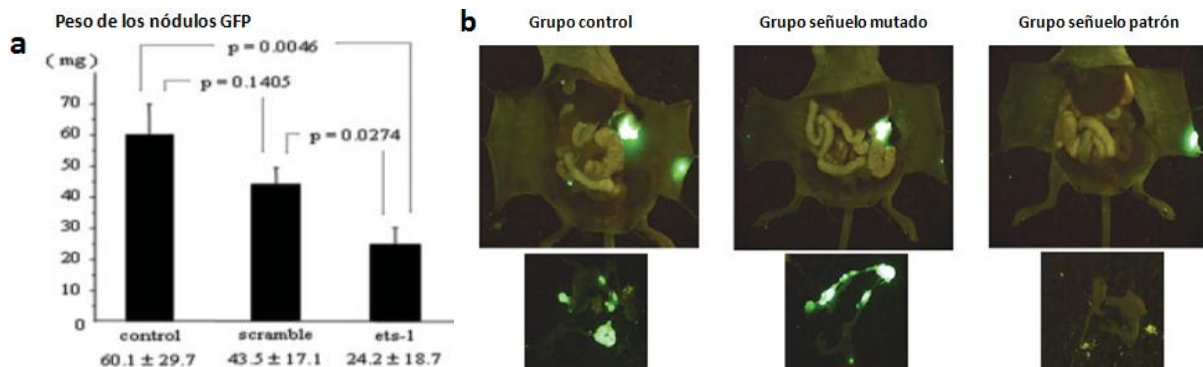


Figura 14. Efecto de los oligo-señuelos de Ets1 en el modelo de diseminación peritoneal en ratón *nude*. (a) Peso total de los nódulos fluorescentes. (b) Manifestación de la diseminación peritoneal en el ratón. Los nódulos fluorescentes verdes indican diseminación del tumor. Tomado de Taniguchi *et al.* (2007).

Toxicidad de los oligos-señuelo en el modelo animal

Para evaluar el posible efecto tóxico del señuelo, este se administra siguiendo el protocolo indicado en materiales y métodos para cada uno de los grupos, por administración intravenosa e intratumoral, y para cada uno de los señuelos diseñados. Posteriormente, se determina diariamente el cambio de peso y la ingesta de alimento así como posibles complicaciones orgánicas en el corazón, pulmón, hígado y riñón. Los ensayos de viabilidad celular y toxicidad se espera que no sean significativos para los oligos-señuelo de Ets-2, al igual que ocurrió para Ets-1, donde el señuelo se inyectó 7 veces en la cavidad peritoneal y no se mostraron resultados significativos en el peso corporal y en la ingesta de alimentos, ni afectación alguna en órganos principales (Taniguchi *et al.*, 2007). El protocolo experimental deberá ser aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del organismo correspondiente.

Ensayos Clínicos

La obtención previa de los resultados óptimos *in vitro* e *in vivo* permitirá continuar con la fase clínica. Para ello se seguirá el protocolo tipo que se ha realizado con STAT-3 como terapia génica, el cual está en fase clínica 0 (Sen *et al.*, 2012), de modo que los efectos a largo plazo en seres humanos todavía se desconocen.

Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico histológicamente confirmado de cáncer de mama y susceptibles de resección quirúrgica representan el perfil adecuado para los ensayos clínicos pertinentes. Se incluyen pacientes tratados con quimioterapia, radioterapia u otros agentes terapéuticos. Se excluyen pacientes embarazadas, con tumores demasiado pequeños para reservar una parte para fines de investigación, o que hayan recibido en un plazo previo de cuatro semanas, radioterapia y/o quimioterapia neoadyuvante.

Los pacientes se reclutarán de manera secuencial para uno de los tres niveles de dosis establecidos (250 mg oligo-señuelo en 250 μ L de solución salina, 500 mg en 500 μ L, y 1000 mg en 1 mL), que se basan en la extrapolación del tamaño relativo de un xenotrasplante en un ratón para el volumen promedio de un tumor de mama humano. Después de la administración de la anestesia general para la resección del tumor, se obtendrá la biopsia del tumor pre-tratamiento. A continuación, el señuelo Ets-2 se administrará por inoculación directa en el tumor (administración intratumoral). Después de la resección del tumor, una biopsia post-tratamiento se obtendrá de esa zona del tumor en la que se hubo inyectado el señuelo. Contamos con un control, formado por los pacientes que fueron inyectados con solución salina en lugar del señuelo, para determinar la especificidad del señuelo Ets-2 y para distinguir entre los efectos del señuelo y los efectos de la cirugía. Los pacientes serán monitorizados y controlados utilizando los criterios comunes para la evaluación de las reacciones adversas en la terapia del cáncer, y hasta 2 años después de la fecha de la cirugía.

CONCLUSIONES

Este trabajo consiste en una propuesta de un proyecto de investigación, sobre una terapia individualizada para el cáncer de mama, basada en el diseño de un oligonucleótido-señuelo específico del factor transcripcional Ets-2. Aunque no hay resultados propios, se plantean las siguientes conclusiones en función de los objetivos planteados y de los resultados publicados en estudios con otros factores transcripcionales para este mismo tipo de terapia.

- 1.- El diseño de oligonucleótidos-señuelo, que interfieran en la unión de un factor transcripcional con el promotor del gen diana, constituye una terapia génica actual, demostrando ser eficaces en estudios *in vivo* e *in vitro* con otros factores transcripcionales y para varios tipos de cáncer. De los oligonucleótidos diseñados, los más efectivos son los cíclicos, ya que resisten a la acción de las nucleasas y a la desnaturalización térmica.
- 2.- Los ensayos de EMSA permiten confirmar la unión específica de los oligos-señuelo diseñados tanto con la proteína recombinante hEts-2, como con la presente en los extractos proteicos nucleares de las líneas celulares ensayadas, y nos proporcionan información sobre la dosis más adecuada para la terapia génica.
- 3.- Los ensayos de inmunofluorescencia en los tejidos con cáncer, antes y después de la terapia génica, dan información sobre la expresión y localización subcelular de los factores Ets-2 y c-Myc, permitiendo el seguimiento del desarrollo del tumor.
- 4.- Los efectos de los oligos-señuelo sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama se evalúan mediante el ensayo MTT, esperando ver reducida tanto la viabilidad como la proliferación celular tras la terapia génica. Este ensayo también aporta información acerca del modelo de oligo-señuelo más efectivo para esta terapia.
- 5.- La células de cáncer de mama transfectadas con un plásmido de alta expresión de GFP (MCF7-GFP), las cuales emiten una fluorescencia fácilmente detectable, inducirán el desarrollo del tumor en el modelo animal. Posteriormente, con la inyección de los oligo señuelos intratumoralmente, se podrá observar una disminución de la diseminación tumoral.
- 6.- La posible toxicidad de los oligos-señuelo *in vivo*, se determina observando parámetros como el peso, la ingesta de alimento o los fallos multi orgánicos.
- 7.- Los ensayos clínicos serán la última etapa de este proyecto, y se realizarán después de la obtención de resultados óptimos en todos los ensayos anteriormente mencionados. Estos desarrollarán siguiendo los protocolos establecidos para el factor transcripcional STAT3, el cual se encuentra en fase clínica 0.

CONCLUSIONS

This work consists in a proposal for a research project on an individualized therapy for breast cancer, consisting of designing a specific oligonucleotide decoy for the transcriptional factor Ets-2. Although the showed results are not real, the following conclusions arise depending on the proposed objectives and the published results from studies with other transcriptional factors for this same therapy.

- 1.- The designing oligonucleotide decoys, which will block the binding of a transcriptional factor with the promoter of the target gene, is a current gene therapy, showing to be effective *in vivo* and *in vitro* studies with other transcriptional factors and for several types of cancer. The most effective designed oligonucleotides are the cyclic one because are resistant to nucleases action and the thermal denaturation.
- 2.- The EMSA assays allow to confirm the specific binding of the designed oligo decoys for the hEts-2 recombinant protein as well as that present in the protein nuclear extracts from the cell lines tested, and give us the information about the most appropriate dose for gene therapy.

3.- The immunofluorescence assays with the cancer tissues, before and after the gene therapy, provide information on the expression and the subcellular localization of the Ets-2 and c-Myc factors, allowing to monitor the development of the tumor.

4.- The effects of the oligo decoys on the viability of the breast cancer cell lines are assessed by the MTT assay, expecting to be reduced both the feasibility and cell proliferation after the gene therapy. This assay also give us the information about the best structure for the most effective oligo decoy for this therapy.

5.- The transfected breast cancer cells with a plasmid containing a high expression GFP (MCF7-GFP), which fluorescence is easily detectable, will induce tumor growth in the animal model. Lately, with the injection of the oligo-decoys intratumorally, it wouldl be observed a decrease in the tumor spread.

6.- The potential toxicity of the oligo decoys *in vivo*, will be determined by observing parameters such the weight, the food intake or the multi organ failure.

7.- The clinical trials will be the last stage of this project, after obtaining optimal results in all the above assays. These will be performed according to the established protocols for the transcriptional factor STAT3, which is in clinical phase 0.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS**AD:** Activation Domain**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico**ARN:** Ácido Ribonucleico**BSA:** Seroalbúmina Bovina**cDNA:** ADN complementario**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol**dATP:** Desoxiadenosina Trifosfato**dl-dC:** Dimetiltiazol-Difeniltetrazol**DO:** Densidad Óptica**DTT:** Ditioneitol**EBS:** Sitio de unión ETS**EDTA:** Ácido Etildiaminotetraacético**ER:** Receptor de Estrógeno**ETS:** E26-Transformación Específica**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína**GFP:** Proteína fluorescente verde**GSH:** Glutación reducido**GST:** Glutathion-s-transferasa**hc-Myc:** Factor transcripcional c-Myc humano**hEts2:** Factor transcripcional Ets-2 humano**HMEC:** Células epiteliales mamarias humanas**HNSCC:** Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello**hTERT:** Telomerasa transcriptasa inversa humana**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína**IPTG:** Isopropyl β -D tiogalactósido**LBA:** Medio Luria-Bertani con ampicilina**MAPK:** Protein-quinasa activado por mitogeno**MTT:** Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol**PBS:** Tampón fosfato salino**PNT:** Pointed Domain**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa**SDS:** Dodecil sulfato sódico**siARN:** ARN interferente**STAT3:** Activador transcripcional y transductor de señal 3**TRITC:** Isotiocianato de tetrametilrodamina

BIBLIOGRAFÍA

- Al-azawi, D., Mc Ilroy, M., Kelly, G., Redmond, A.M., Bane, F.T., Cocchiglia, S., Hill, A.D.K. & Young, L.S. (2008). Ets-2 and p160 proteins collaborate to regulate c-Myc in endocrine resistant breast cancer. *Oncogene*, **27**: 3021-3031.
- Aususbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (2000). Current protocols in molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Volumen 1-2-3.
- Cooper, C.D.O., Newman, J.A. & Gileadi, O. (2014). Recent advances in the structural molecular biology of Ets transcription factors: interactions, interfaces and inhibition. *Biochem Soc Trans*, **42**: 130–138.
- Crinelli, R., Bianchi, M., Gentilini, L., Palma, L., Sorensen, M.D., Bryld, T., Babu, B.R., Arar, K., Wengel, J. & Magnani, M. (2004). Transcription factor decoy oligonucleotides modified with locked nucleic acids: an in vitro study to reconcile biostability with binding affinity. *Nucleic Acids Res*, **32**: 1874-1885.
- Dimri, G., Band, H. & Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res*, **7**: 171-179.
- Kar, A. & Gutierrez-Hartmann, A. (2013). Molecular mechanisms of ETS transcription factor mediated Tumorigenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **48 (6)**: 522-543.
- Libermann, T.A. & Zerbini, L.F. (2006). Targeting transcription factors for cancer gene therapy. *Current gene therapy*, **6**: 17-33.
- Mann, J.M. (2005). Transcription Factor Decoys. A New Model for Disease Intervention. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, **1058**: 128-139
- Miller, M.D., Thomas, D.S., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. (2012). c-Myc and Cancer Metabolism. *Clin Cancer Res*, **18 (20)**: 5546-5553.
- Myers, E., Hill, D.K.A., Kelly, G., McDermott, W.E., O'Higgins, J.N., Buggy, Y. & Young, S.L. (2005). Associations and Interactions between Ets-1 and Ets 2 and Coregulatory Proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, **11**: 2111-2122.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information (2015). ETS-2 Gene [online]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2114>. [Consultado 20 Noviembre 2014].
- Nebert, D.W. (2002). Transcription factors and cancer: an overview. *Toxicology*, **181-182**: 131-141.
- Oikawa, T. (2004). ETS transcription factors: Possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci*, **95**: 626-633.
- Oikawa, T. & Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, **303**: 11-34.
- Pandolfi, P.P. (2001). Transcription therapy for cancer. *Oncogene*, **20**: 3116-3127.
- Sementchenko, V.I. & Watson, D.K. (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene*, **19**: 6533-6548.
- Sen, M., Thomas, S.M., Kim, S., Yeh, J.I., Ferris, R.L., Johnson, T.J., Duvvuri, U., Lee, J., Sahu, N., Joyce, S., Freilino, L.M., Shi, H., Li, C., Ly, D., Papireddy, S., Etter, P.J., Li, P., Wan, L., Chiosea, S., Seethala, R.R., Gooding, E.W., Chen, X., Kaminski, N., Pandit, K., Jonhson, E.D. & Grandis, R.J. (2012). First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov*, **2(8)**: 694-705.
- Seth, A. & Watson, D.K. (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J. Cancer*, **41**: 2462-2478.
- Shepherd, T. & Hassell, J.A. (2001). Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **6**: 129-140.

- Stellrecht, M.S. & Chen, S.L. (2011). Transcription Inhibition as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancers*, **3**: 4170-4190.
- Taniguchi, H., Fujiwara, Y., Doki, Y., Sugita, Y., Sohma, I., Miyata, H., Takiguchi, S., Yasuda, T., Tomita, N., Morishita, R & Monden, M. (2007). Gene therapy using ets-1 transcription factor decoy for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int. J. Cancer*, **121**: 1609-1617.
- Villicaña, C., Cruz, G. & Zurita, M. (2014). The basal transcription machinery as a target for cancer therapy. *Cancer Cell International*, **14**:18.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L. & Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem*, **211**: 7-18.
- Wu, W., Zhang S., Li X., Xue M., Cao S. & Chen W. (2013). Ets-2 Regulates Cell Apoptosis via the Akt Pathway,through the Regulation of Urothelial Cancer Associated1, a Long Non-Coding RNA, in Bladder Cancer Cells. *Plos One*, **8(9)**: e73920.
- Xu, D., Dwyer, J., Li, H., Duan, W. & Liu, J.P. (2008). Ets2 Maintains hTERT Gene Expression and Breast Cancer Cell Proliferation by Interacting with c-Myc. *J Biol Chem*, **283**: 23567-23580.
- Yan, C. & Higgins, P.J. (2013). Drugging the Undruggable: Transcription Therapy for Cancer. *Biochem Biophys Acta*, **1835(1)**: 76-85.
- Zhao,Y., Cheng, D., Wang, S. & Zhu, J. (2014). Dual roles of c-Myc in the regulation of hTERT gene. *Nucleic Acids Research*, **42(16)**: 0385–10398.