

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**SARCOMA DE EWING :
NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS Y
BÚSQUEDA DE DIANAS BIOLÓGICAS DEL
ONCOGÉN EWS/FLI-1**

**SILVIA MATEO LOZANO
GEORGETOWN UNIVERSITY MEDICAL CENTER**

2007

TESIS DOCTORAL

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

SARCOMA DE EWING :
NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS Y
BÚSQUEDA DE DIANAS BIOLÓGICAS DEL
ONCOGÉN EWS/FLI-1

Memoria presentada por Silvia Mateo Lozano para optar al grado de Doctor en
Bioquímica y Biología Molecular

Tesis Doctoral realizada en *Radiation Medicine Department, Lombardi Comprehensive
Cancer Center, Georgetown University Medical Center*, bajo la dirección del
Dr. Vicente Notario Ruiz y el Dr. Óscar Martínez Tirado

La interesada :

Los Co-Directores de la Tesis :

Silvia Mateo Lozano

Dr. Vicente Notario

Dr. Óscar Martínez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a los directores de la tesis su labor de supervisión durante estos años. Gracias al Dr. Vicente Notario por brindarme la oportunidad de participar en sus proyectos, por su asesoramiento científico y la confianza depositada en mí. Gracias al Dr. Óscar M Tirado por su ayuda inestimable y por su predisposición permanente para aclarar mis constantes dudas.

A la Dra. Inma Ponte le agradezco su ayuda desinteresada en los momentos críticos de esta tesis. Gracias también a los doctores Carlos Suarez-Quian y Francina Munell por su sincera amistad y por su apoyo incondicional sobre todo en los primeros años de esta tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros de Georgetown University, en especial a los argentinos Luis E Dettin y Guillermo Palchik, que además de ayudarme con la microscopía, amenizaron con sus chistes y simpatía los almuerzos compartidos durante 5 años. También a Jenny Miller, Humair Quadri, Jackie Vernarelli y Caitlin Maccarthy por hacer que mi estancia en Washington fuera menos difícil. Gracias por aportar a mi vida algo más que conocimientos científicos. Sin olvidar a los que estuvieron muy poquito tiempo en el laboratorio, pero mucho tiempo en mi corazón. Marga, esta última dedicatoria va para ti.

A Jokin Villar y a Bob Newman les quiero agradecer su enorme ayuda en los momentos más difíciles, tanto a nivel personal como laboral, por no saber decir no, por su simpatía y amistad.

Finalmente, a quien más debo agradecer es a mi familia. A mis hermanas por ser el mejor regalo que me ha dado la vida. A mis padres que me han apoyado en cada decisión que he tomado, siempre sin hacer preguntas y siempre con una confianza ciega en mí. Por su esfuerzo para poner a mi alcance todo lo que he necesitado para poder elegir libremente mi futuro. Y en último lugar, pero no por ello el menos importante, a mi compañero de fatigas, por su apoyo incondicional, por darme ese empujoncito necesario para seguir adelante en los malos tiempos, por haber creído en mí, por su amistad y por su amor. A ellos va dedicada esta tesis.

ÍNDICE

Resumen	11
1. Introducción	15
1.1 Aspectos históricos	17
1.2 Epidemiología	18
1.3 Histopatología	19
1.4 Célula de origen	21
1.5 Diagnóstico	22
1.6 Tratamiento	23
1.7 Genética molecular	25
1.7.1 Translocaciones cromosómicas en ESFT	25
1.7.2 El protooncogén <i>EWS</i>	26
1.7.3 La familia de factores de transcripción ETS	29
1.7.4 Las proteínas de fusión EWS/ETS	30
1.7.5 Genes regulados directa o indirectamente por las proteínas EWS/ETS	33
1.8 Vía de señalización de mTOR: inhibición mediante el uso de la rapamicina	34
1.9 Terapia antisentido en oncología	39
1.9.1 Futuro de la terapia antisentido. Combinación con tratamientos anticáncer	45
1.10 Inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas: roscovitina	46
2. Resultados y discusión	51
2.1 La rapamicina induce una disminución de los niveles de expresión de las proteínas EWS/FLI-1 e inhibe la proliferación de células del sarcoma de Ewing	53
2.1.1 Identificación de los distintos tipos de fusión EWS/FLI-1 en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing	55
2.1.2 Estudio de los niveles de expresión de la proteína mTOR en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing	57
2.1.3 La rapamicina inhibe la proliferación de diferentes líneas	

	celulares del sarcoma de Ewing independientemente del tipo de fusión EWS/FLI-1 que expresen	58
2.1.4	La rapamicina induce la inhibición de la fosforilación de la proteína quinasa p70s6K	61
2.1.5	Disminución de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con rapamicina .	62
2.1.6	Inhibición de los niveles de expresión de la proteína EWS como consecuencia del tratamiento con rapamicina	64
2.1.7	La inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 induce la restauración de los niveles del RNA mensajero del receptor tipo II del TGF β	65
2.2	La inhibición simultánea de EWS/FLI-1 a nivel transcripcional y post-transcripcional induce apoptosis en células del sarcoma de Ewing <i>in vitro</i> y prolonga la inhibición del crecimiento de tumores <i>in vivo</i>	69
2.2.1	Inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con diferentes oligonucleótidos antisentido	71
2.2.2	El tratamiento simultáneo con rapamicina y AS-12 induce un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de células del sarcoma de Ewing	73
2.2.3	La rapamicina induce un incremento en los niveles de expresión de la proteína IRS-1 y en los niveles de fosforilación de AKT	76
2.2.4	El tratamiento con AS-12 induce apoptosis en células del sarcoma de Ewing	77
2.2.5	El tratamiento combinado induce una inhibición prolongada del crecimiento de tumores <i>in vivo</i> que se corresponde con la inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 y de fosforilación de la proteína quinasa p70s6K	81
2.2.6	El tratamiento combinado con AS-12 y rapamicina induce <i>in vivo</i> un incremento en los niveles de apoptosis dependiente de caspasa-3/7	85
2.2.7	Implicación del TGF β -1 en la inducción de apoptosis en células de ESFT como consecuencia del tratamiento con AS-12	88
2.2.8	El tratamiento con AS-12 es también efectivo en células del	

	sarcoma de Ewing que presentan el tipo 1 de fusión EWS/FLI-1.	92
2.3	La roscovitina es un inductor efectivo de apoptosis en células de sarcoma de Ewing <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	95
2.3.1	La roscovitina induce muerte celular en células del sarcoma de Ewing pero no de neuroblastoma	97
2.3.2	Efectos de la roscovitina en el ciclo celular en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing y neuroblastoma	98
2.3.3	La roscovitina induce apoptosis mediante un mecanismo que causa el aumento de expresión de la proteína Bax y la activación de la caspasa-3 simultáneamente	100
2.3.4	El tratamiento con roscovitina <i>in vivo</i> induce un retraso en el crecimiento de los tumores mediado por activación de la caspasa-3	105
2.4	La caveolina-1 es una diana transcripcional de EWS/FLI-1 y juega un papel determinante en la expresión del fenotipo oncogénico y la tumorigénesis en células del sarcoma de Ewing	110
2.4.1	Caveolas y caveolinas	111
2.4.2	Identificación de la caveolina-1 como diana transcripcional directa de EWS/FLI-1	113
2.4.3	Expresión de la caveolina-1 en líneas celulares y tumores sólidos de ESFT	122
2.4.4	La inhibición de la expresión de caveolina-1 reduce el crecimiento independiente del anclaje y la tumorigénesis de las células de ESFT <i>in vivo</i>	125
2.4.5	La inhibición de la caveolina-1 reduce la tumorigénesis de las células de ESFT <i>in vivo</i>	129
2.4.6	La reducción de la tumorigénesis debida a la inhibición de la expresión de caveolina-1 se corresponde con una regulación positiva de Snail y la pérdida de E-Cadherina	131
3.	Conclusiones	138
4.	Bibliografía	143

5.	Anexos	181
5.1	Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. <i>Oncogene</i> 2003; 22(58):9282-7.	
5.2	Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, Notario V. Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. <i>Clin Cancer Res</i> 2006; 12(22):6781-90.	
5.3	Tirado OM*, Mateo-Lozano S*, Notario V. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo. <i>Cancer Res</i> 2005; 65(20):9320-7. *Contributed equally to this work.	
5.4	Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. 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. <i>Cancer Res</i> 2006; 66(20):9937-47.	

Resumen

La familia de tumores del sarcoma de Ewing (ESFT), cuyo nombre deriva de la descripción de un endotelioma de hueso por James Ewing en 1921, incluye un grupo heterogéneo de neoplasias formadas por células redondas de pequeño tamaño con mínima evidencia morfológica de diferenciación, o por células más grandes con diferentes grados de diferenciación neuroectodérmica. El sarcoma de Ewing es el segundo tumor óseo más frecuente, afectando fundamentalmente a niños y adolescentes. Aunque aparece preferentemente en hueso, aproximadamente un 15 % de los pacientes presentan tumores primarios en tejidos blandos.

El tratamiento actual combina dosis elevadas de agentes quimioterapéuticos para el control sistémico de la enfermedad, con cirugía y/o radiación para el control local. A pesar del uso de terapias multimodales y medidas agresivas de control local, la supervivencia de pacientes con metástasis es menor de un 30 %, mientras que en ausencia de enfermedad metastásica, la supervivencia es aproximadamente de 50-70 %. Desafortunadamente, la respuesta clínica no ha variado en la última década, incluso después de incrementar las dosis de quimioterapéuticos o tras el trasplante de médula ósea. Debido a esto, son necesarias nuevas aproximaciones terapéuticas dirigidas a reducir la morbilidad relacionada con el tratamiento y a mejorar el índice de supervivencia.

Afortunadamente, los ESFT presentan una diana molecular perfecta que resulta de la translocación cromosómica que define a este tipo de tumores, e involucra al gen *EWS* localizado en el cromosoma 22 y a un miembro de la familia de factores de transcripción ETS (*Erythroblastic Transforming Sequence*), fundamentalmente *FLI-1* o *ERG*, localizados en el cromosoma 11 y 21, respectivamente. La translocación más común, t(11;22)(q24;q12), genera la formación de una nueva oncoproteína de fusión EWS/FLI-1, específica de las células tumorales. Estas oncoproteínas actúan como factores de transcripción que regulan de forma aberrante la expresión de genes diana, favoreciendo de esta forma el proceso tumorigénico.

De esta forma la inactivación de la proteína de fusión EWS/FLI-1 se convierte en una estrategia atractiva, no sólo debido a su especificidad en células transformadas, sino

también por su función fundamental en la tumorigénesis de ESFT. En el presente estudio se evaluaron diferentes estrategias, con el objetivo de intentar reducir los niveles expresión de EWS/FLI-1 *in vitro* e *in vivo*.

La primera estrategia utilizada para inhibir los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 se basó en el uso de la rapamicina, un antifúngico macrólido e inmunosupresor con propiedades anticancerígenas, resultando en la inhibición de la vía de señalización de mTOR/p70s6K. El rapamicina inhibió la proliferación de células de ESFT sin causar apoptosis, sugiriendo el uso de esta droga como agente citostático en el tratamiento de este tipo de tumores.

La segunda aproximación terapéutica se basó en la inhibición simultánea de EWS/FLI-1 a nivel transcripcional y post-transcripcional mediante el tratamiento combinado de oligonucleótidos antisentido y rapamicina. Los resultados mostraron un incremento en la muerte de células de ESFT, a través de un proceso que involucra la restauración de la vía de señalización pro-apoptótica del TGF β 1/TGF β -RII. Además, los ensayos *in vivo* en ratones inmunodeprimidos mostraron un retraso en el crecimiento de los tumores. Estos datos aportan la base para una mayor exploración del potencial del tratamiento combinado como una nueva estrategia en el tratamiento de este tipo de tumores.

Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing, igual que ocurre en otros tipos de tumores, presentan alteraciones en proteínas reguladoras del ciclo celular, incluyendo la sobreexpresión de proteínas quinasas ciclina-dependientes (CDK) y la pérdida o baja expresión de sus inhibidores, tales como p16, p21 o p27. Basándonos en esto, la tercera estrategia se basó en la reversión de alguna de estas alteraciones, mediante el uso de la roscovitina, un potente inhibidor de la actividad quinasa de las CDKs. Los resultados mostraron que la roscovitina induce apoptosis en células de ESFT *in vitro* e *in vivo*, por un mecanismo dependiente de la activación de caspasas.

Numerosos estudios han identificado genes cuya expresión se encuentra regulada positiva o negativamente por la expresión de EWS/FLI-1, ya sea mediante una interacción directa o como efecto secundario, favoreciendo de esta forma el proceso tumorigénico. Con el objetivo de identificar y evaluar nuevas proteínas que interactúan con EWS/FLI-1 y

contribuir de esta forma a la comprensión de los mecanismos de transformación, identificamos como una diana directa de EWS/FLI-1 a la caveolina-1, proteína involucrada en gran variedad de procesos celulares, tales como endocitosis, homeostasis del colesterol, transducción de señales y tumorigénesis. Los resultados de este trabajo mostraron que la caveolina-1 juega un papel determinante en el fenotipo oncogénico y la tumorigénesis de células de ESFT y su inhibición podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas moleculares dirigidas a mejorar el tratamiento de los pacientes de ESFT.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos históricos

El sarcoma de Ewing y los tumores neuroectodérmicos primitivos fueron descritos a principios del s.XX como entidades clinico-patológicas distintas. En 1918, el Dr. Stout describió un tumor en el nervio ulnar con características de sarcoma pero compuesto por células pequeñas, redondas y dispuestas en rosetas, que posteriormente denominó tumor neuroectodérmico primitivo (Stout, 1918). En los años 20, el Dr. Ewing describió varios casos de tumores indiferenciados en la diáfisis de huesos largos con alta incidencia de metástasis que a pesar de ser radiosensibles tenían tendencia a recurrir (Ewing, 1921). En años posteriores fueron evidentes las manifestaciones comunes en ambas patologías, por lo que comenzó a hablarse de una entidad única con expresión fenotípica variable.

La familia del sarcoma de Ewing y tumores neuroectodérmicos primitivos incluye otras neoplasias, como los tumores malignos de células pequeñas de la región toracopulmonar (Askin y cols., 1979), tumores paravertebrales de células pequeñas (Tefftg y cols., 1969), sarcoma de Ewing atípico (Llombart-Bosch y cols., 1987), tumores neuroectodérmicos primitivos de hueso (Jaffe y cols., 1984) y sarcoma de Ewing extraóseo (Angervall y Enzinger, 1975).

En 1983, Aurias y colaboradores detectaron la translocación cromosómica t(11:22) (q24;q12) presente en la mayoría de los tumores de sarcoma de Ewing y PNET (Aurias y cols., 1983). Posteriormente, Delattre y colaboradores demostraron que la translocación estaba asociada a una fusión génica aberrante entre el gen *EWS*, localizado en el cromosoma 22, y el gen *FLI-1*, perteneciente a una familia conocida como ETS (*Erythroblastic Transforming Sequence*), situado en el cromosoma 11 (Delattre y cols., 1992; Zucman y cols., 1992). Otros genes de la familia de factores de transcripción ETS también están implicados en este grupo de neoplasias (Kovar, 1998).

1.2 Epidemiología

El sarcoma de Ewing es el segundo tumor óseo maligno más común, después del osteosarcoma, representando un 10-15% de todos los tumores de hueso primarios. La incidencia anual de esta enfermedad en el total de la población es de 0,6/millón (Burchill, 2003), y en los Estados Unidos es de aproximadamente 225 casos nuevos por año en pacientes con edades inferiores a 20 años (Bernstein y cols., 2006). La edad de diagnóstico más común es la segunda década de vida, aunque un 20-30 % de los casos son diagnosticados en la primera década y no es frecuente en menores de 5 años o en mayores de 40 años. En lo que hace referencia al sexo, es ligeramente más frecuente en varones que en mujeres (ratio 1,5:1) (Khoury, 2005).

Aunque es poco frecuente, el sarcoma de Ewing ha sido descrito en algunos hermanos. La causa es desconocida, pero parece no estar relacionado con exposición a radiación o con enfermedades genéticas que incrementan la predisposición al cáncer en la infancia (West, 2000). La única diferencia significativa tiene carácter racial. Comparando poblaciones equiparables en EEUU, la incidencia de estos sarcomas en la población asiática y afroamericana es significativamente menor que en la raza blanca. La razón de esta distribución étnica es desconocida, aunque existen diferencias interétnicas en la frecuencia de aparición de ciertos alelos de uno de los genes alterados en sarcoma de Ewing y PNET (Zucman-Rossi y cols., 1997).

El sarcoma de Ewing puede afectar a cualquier hueso siendo más frecuente en la pelvis, los huesos largos de las extremidades inferiores y huesos de la pared torácica (Tabla 1). En aproximadamente un 25 % de los pacientes aparecen metástasis primarias en pulmones, sistema esquelético, médula ósea o combinaciones de los mismos. Las metástasis en nódulos linfáticos y otros órganos como el hígado o el sistema nervioso central son raras (Bernstein y cols., 2006).

Tabla 1. Localización de tumores primarios de sarcoma de Ewing en el sistema esquelético en una cohorte de 1426 pacientes

Localización	Incidencia (%)
Pelvis	26
Fémur	20
Tibia	10
Costillas	10
Peroné	8
Vértebras	6
Húmero	6
Escápula	4
Pie	3
Cráneo	2
Clavícula	1,5
Cúbito	1
Radio	1
Mano	1
Esternón	0,5

Bernstein y cols. 2006

1.3 Histopatología

Los sarcomas de Ewing son tumores malignos caracterizados histológicamente por la presencia de células pequeñas redondas, uniformes, agrupadas densamente, con núcleo redondo libre de nucleolo. Teniendo en cuenta que no se trata de un solo tipo de tumor, sino de una familia de neoplasias con diferente grado de diferenciación y expresión fenotípica variable, pero todas ellas con una alteración genética que afecta al gen *EWS*, podemos distinguir los siguientes subtipos o variedades histológicas (Llombart-Bosch, 2001):

- Sarcoma de Ewing clásico (convencional).
- Sarcoma de Ewing atípico.
- Sarcoma de Ewing con diferenciación vascular (endotelial).
- Neuroepitelioma periférico (tumor neuroectodérmico primitivo PNET).

a. Sarcoma de Ewing clásico

Se caracteriza por una masa densa, difusa, desestructurada y con aspecto homogéneo compuesta por células uniformes de pequeño tamaño, con citoplasma claro y núcleos redondos e hipercromáticos, de localización central, que al teñirse con hematoxilina le dan un aspecto azulado, del que deriva el nombre de "sarcomas de células pequeñas redondas y azules" con el que se conoce este grupo de tumores. Lo básico de este tumor es la

ausencia de arquitectura definida, por tanto no se ven las rosetas o pseudorosetas de los tumores de tipo neuroectodérmico. El citoplasma posee poca cantidad de organelas, sus límites son imprecisos y tiene aspecto vacuolado debido al contenido en glucógeno. Mediante el uso de microscopía electrónica se observan dos tipos de células, que aparecen entremezcladas en los mismos campos y que no adoptan una arquitectura definida:

- "Células principales": son células poligonales, con citoplasma de límites imprecisos, aspecto vacuolado por su contenido en glucógeno, con pocas organelas, y frecuentemente, un aparato de Golgi prominente. No todas las células contienen glucógeno, y en su ausencia el citoplasma adopta un aspecto transparente, por lo que se las conoce como "células claras". Los núcleos son redondos, pequeños, hipercromáticos y de localización central. Poseen, generalmente, un único nucleolo prominente.

- "Células secundarias oscuras" (por su citoplasma más oscuro): son células del mismo tamaño que las anteriores, que se distribuyen irregularmente con respecto a las principales, y en los que se pueden observar procesos apoptóticos y de condensación cromática.

b. Sarcoma de Ewing atípico

Sarcoma de Ewing de células grandes. En ellos las células no son tan homogéneas, variando tanto en el tamaño como en la forma. Las células son en ocasiones binucleadas y con mayor cantidad de organelas. El citoplasma es menos acidófilo y con menor contenido en glucógeno. Algunas células son fusiformes con núcleos ovales. Esta variante atípica se puede encontrar también en sarcomas de Ewing clásicos ya tratados con quimioterapia y/o radioterapia, o en recidivas tumorales.

Sarcoma de Ewing de células claras. Sus células poseen una gran plasticidad y pueden formar nidos de células epiteloideas relativamente grandes con citoplasma vacuolado y núcleos desplazados y retraídos. Su contenido en glucógeno es elevado.

Sarcoma de Ewing con diferenciación neuroectodérmica. En este tipo destaca la presencia de una arquitectura definida en forma de pseudorosetas o empalizada, pero con una elaboración más pobre que la encontrada en el neuroblastoma o el

neuroepitelioma periférico. También destaca la presencia de unas prolongaciones de citoplasma con aspecto fusiforme.

c. Sarcoma de Ewing con diferenciación vascular (endotelial)

Es característico de esta variante la presencia de una rica red vascular y de frecuentes necrosis que le confieren una falsa apariencia pseudovasular. También es típica la presencia de lagunas vasculares bordeadas por células tumorales, que presentan un citoplasma más amplio.

d. Tumor neuroectodérmico primitivo (PNET)

El tumor neuroectodérmico primitivo es el último eslabón en la cadena de maduración del sarcoma de Ewing convencional. La apariencia histológica del PNET difiere en cierta forma del sarcoma de Ewing óseo y extraóseo. Estos tumores se componen típicamente de células hipercromáticas redondeadas u ovaladas con un citoplasma mínimo. Las células tumorales típicamente se agrupan formando rosetas compuestas por grupos de 6 a 8 células tumorales alrededor de un espacio vacío central. Estas células también contienen glucógeno, una red reticular y depósitos de colágeno. Ocasionalmente grupos de células redondas citológicamente uniformes, con cromatina dispersa que se parecen a las células clásicas de Ewing aparecen intercaladas en lo que de otra forma sería un típico PNET. Esta superposición de características fortalece el concepto de que estos tumores son en realidad el mismo tumor con un espectro de diferenciación. Los PNETs también muestran variedad de tinción con algunos marcadores neurales incluyendo la enolasa neuroespecífica, Leu-7, sinaptofisina y S100. La confirmación de la presencia de gránulos neurosecretorios mediante microscopía electrónica ayuda al patólogo en el diagnóstico de PNET. Estos tumores pueden confundirse con el neuroblastoma del adulto, pero en éste hay ausencia del marcador CD99, y además la alteración del 1p16 no ocurre en los tumores de la familia de Ewing.

1.4 Célula de origen

A pesar de los avances en el entendimiento de las bases genéticas de ESFT, la naturaleza de la célula precursora permanece desconocida. En 1921 el Dr. Ewing sugirió un origen endotelial (Ewing. 1921), pero hasta la fecha se han propuesto diferentes orígenes,

incluyendo el hematopoyético, fibroblástico, mesenquimal y de la cresta neural (Owen y Lessnick, 2006).

La hipótesis más aceptada en el presente es que los ESFT derivan de células pluripotenciales de la cresta neural que presentan características de neuronas colinérgicas parasimpáticas (Koury, 2005).

Una hipótesis alternativa sugiere que el fenotipo tumoral no es consecuencia de la célula de origen, sino que es mediado por la translocación cromosómica t(11;22)(q24;q12). Ensayos en fibroblastos y células tumorales humanas muestran que la expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 codificada por t(11;22)(q24;q12) puede inducir un fenotipo que es reminiscente de ESFT, incluyendo la histología, el patrón de tinción inmunohistoquímica y el perfil de expresión génica (Rorie y cols., 2004; Teitell y cols., 1999; Hu-Lieskovan y cols., 2005b; Lessnick y cols. 2002).

1.5 Diagnóstico

Un diagnóstico preciso del sarcoma de Ewing es crucial para el tratamiento clínico apropiado del paciente. Una información clínica adecuada y un reconocimiento de las características morfológicas, inmunocitoquímicas y estructurales son necesarios para diferenciarlo de otros tumores de células pequeñas y redondas. En niños, éstos incluyen neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, linfoma y otros tumores neuroectodérmicos primitivos. En adultos, debe ser diferenciado de casos de linfoma, mieloma múltiple y cáncer de células pequeñas del pulmón (Kennedy y cols., 2003).

Muchos pacientes con sarcoma de Ewing presentan dolor localizado y una masa visible o palpable (Widhe y Widhe, 2000). Síntomas sistémicos, especialmente fiebre y pérdida de peso, son comunes también sobre todo en pacientes que presentan la enfermedad en estado avanzado. En aproximadamente un 15 % de los pacientes con ESFT en huesos largos, aparecen fracturas (Wagner y cols., 2001).

Igual que en otras enfermedades malignas, el test diagnóstico definitivo es la biopsia. Como marcadores inmunohistoquímicos utilizados en el diagnóstico de sarcomas de Ewing se incluyen la glicoproteína de superficie celular p30/32^{MIC2} (CD99) presente en

aproximadamente un 95-100 % de los casos (Fellinger y cols., 1991; Ramani y cols., 1993; Weidner y Tjoe, 1994) y otros marcadores como la vimentina (Navarro y cols., 1994; Lizard-Nacol y cols., 1989; Dierick y cols., 1993). En los sarcomas de Ewing más diferenciados (PNET) también se detecta evidencia inmunohistoquímica de diferenciación neural mediante la tinción de NSE (enolasa específica neuronal), proteína S-100, Leu-7 y/o PgP9.5 (Shanfield, 1997). Además aproximadamente un 20 % de los casos son inmunoreactivos a citoqueratinas (Gu y cols., 2000).

Debido a que los sarcomas de Ewing presentan características histológicas e inmunofenotípicas comunes a otros tipos de tumores de células pequeñas y redondas frecuentes en la infancia, se necesitan otras técnicas de diagnóstico para poder diferenciarlos, con lo cual la evaluación genética es esencial. Para ello se utilizan técnicas como RT-PCR (transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa) y/o hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que permiten la identificación de la fusión causante de este tipo de tumores fundamentalmente en casos con características inmunológicas y/o histología indeterminada (Ladanyi y Bridge, 2000; Hill y cols., 2002).

El diagnóstico por imágenes incluye el estudio mediante rayos X, tomografía computerizada (CT) del pecho para evaluar posibles metástasis intratorácicas, *99m-technetium whole-body radionuclide bone scans* para metástasis esqueléticas, *fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography* (FDG-PET) o resonancia magnética por imágenes (MRI) para detectar metástasis en huesos (Daldrup-Link, 2001).

Previo al tratamiento, debe estudiarse en qué fase de desarrollo se encuentra el tumor. Este estudio del estadio está basado en la valoración de los márgenes de la anatomía del tumor y en la presencia o ausencia de metástasis locales y distantes (Enneking, 1985).

1.6 Tratamiento

La mayoría de pacientes con sarcoma de Ewing presentan enfermedad localizada en el momento del diagnóstico, aunque una proporción importante presenta micrometástasis en la médula ósea (West y cols., 1997). Los pacientes tratados con medidas de control local

suelen recaer y sucumbir a la enfermedad metastásica, por lo que se utilizan tratamientos agresivos desde el diagnóstico de la enfermedad.

Los protocolos actuales para el tratamiento del sarcoma de Ewing incluyen el uso de la radiación, cirugía o una combinación de ambos para el control local de la enfermedad, acompañado de quimioterapia para el control sistémico (Rodríguez-Galindo, 2004).

A pesar del progreso en el tratamiento, la esperanza de vida a los 5 años para los pacientes que presentan un pronóstico mejor (tumor localizado de tamaño pequeño), es de aproximadamente un 80 %. El pronóstico para pacientes de riesgo elevado (aquellos con tumores de tamaño superior a 200 mm³, con metástasis o niveles elevados de lactato deshidrogenasa) continúa siendo pobre, sólo un 20-30 % sobreviven los 5 años (Tabla 2) (Thacker y cols., 2005).

Tabla 2. Factores que afectan al pronóstico en sarcoma de Ewing

Factor	Pronóstico
Localización	Los sitios más favorables son las extremidades distales. Las extremidades proximales y la pelvis presentan peor pronóstico
Volumen del tumor	<200 mm ³ indica un mejor pronóstico
Edad	Los niños más jóvenes presentan una supervivencia sin complicaciones mucho mejor que los adolescentes mayores o adultos
Sexo	La niñas con ESFT tienen mejor pronóstico
Metástasis distante	Pacientes con metástasis pulmonar aislada presentan mejor pronóstico que en hueso/médula ósea
Lactato deshidrogenasa (LDH)	El pronóstico es peor en pacientes con niveles elevados de LDH en suero
Respuesta a quimioterapia	El pronóstico es mejor en pacientes que responden a quimioterapia
Expresión de p53 en células tumorales	<20% células proporciona mejor pronóstico
Tiempo de recaída	>24 meses tiene un mejor pronóstico

Tabla modificada de Thacker y cols., 2005

El tratamiento actual estandar para pacientes con ESFT incluye un régimen de cinco drogas administradas aproximadamente durante nueve meses que consiste en ciclos que

alternan el tratamiento con doxorubicina/vincristina/ciclofosfamida y con etopósido/ifosfamida. Como efectos secundarios, los pacientes sufren citopenias hematológicas severas, náuseas, vómitos y a menudo desarrollan infecciones graves (Uren y Toretsky, 2005).

1.7 Genética molecular

1.7.1 Translocaciones cromosómicas en ESFT

Las translocaciones cromosómicas (intercambio de material genético entre dos cromosomas no homólogos, sin pérdida de material genético) han sido descritas en aproximadamente una tercera parte de todos los sarcomas (Borden y cols., 2003). Estudios genéticos identificaron que los genes que están con frecuencia involucrados en uno o en ambos puntos de ruptura en estas translocaciones cromosómicas, son genes que codifican factores de transcripción. Como resultado de la translocación cromosómica se fusionan dos regiones codificantes de proteínas, o porciones de estas regiones, manteniendo un cuadro de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) y dando lugar a la formación de una proteína quimérica. La proteína de fusión resultante actúa como factor de transcripción aberrante modificando diversas propiedades celulares que contribuyen al proceso tumorigénico, tales como el incremento de la proliferación celular, la promoción del crecimiento independiente del anclaje, la supresión de la inhibición del crecimiento por contacto, la inhibición de la apoptosis, el aumento de la invasión y la supresión de la diferenciación terminal.

La característica principal que define a los ESFT es la presencia de una translocación cromosómica entre el extremo 5' del gen *EWS*, y el extremo 3' de un miembro de la familia de factores de transcripción *ETS*, en la mayoría de casos el gen *FLI-1* (Fig. 1).

Fig. 1. Representación esquemática de la translocación cromosómica entre los genes *EWS* y *FLI-1*

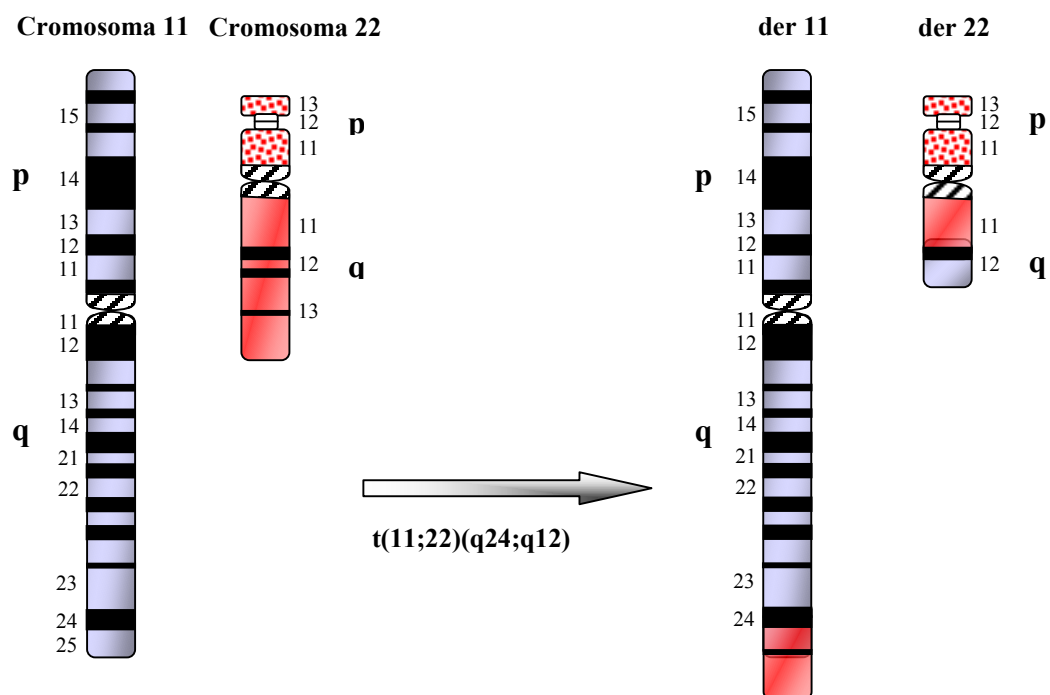


Figura modificada de Sandberg y Bridge, 2000

1.7.2 El protooncogén *EWS*

El gen *EWS* localizado en el cromosoma 22 ha sido identificado como integrante de translocaciones cromosómicas específicas en un amplio rango de sarcomas y leucemias, incluyendo ESFT (Delattre y cols., 1992), sarcoma de células claras (Zucman y cols., 1993a), tumor desmoplástico de células redondas y pequeñas (Ladanyi y Gerald, 1994), chondrosarcoma mixoide (Labelle y cols., 1995) y liposarcoma mixoide (Panagopoulos y cols., 1996) (Tabla 3).

La proteína humana *EWS* es un miembro del subgrupo TET que pertenece a la familia de proteínas de unión a RNA, que incluye ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, proteínas de unión a las colas de poli-adenosina de RNAs mensajeros (RNAm), y factores de *splicing* alternativos (Varani y Nagai, 1998).

Tabla 3. Neoplasmas que presentan translocaciones cromosómicas que involucran al gen *EWS*

Neoplasma	Translocación	Proteína de fusión
ESFT	t(11;22)(q24;q12) *	EWS/FLI-1
Sarcoma de células claras	t(12;22)(q13;q12) t(12;16)(q13;p11)	EWS/ATF-1 TLS/CHOP
Liposarcoma mixoide	t(12;22)(q13;p11)	EWS/CHOP
Chondrosarcoma mixoide	t(9;17)(q22;q11) t(9;22)(q22;q12)	RBP56/TEC EWS/TEC
Tumor desmoplástico de células redondas y pequeñas	t(11;22)(q13;p12)	EWS/WT1

* Tipo de translocación más frecuente

El gen *EWS* contiene un cuadro de lectura abierto de 1968 pb (pares de bases) y codifica una proteína de 656 aminoácidos. El gen *EWS*, que tiene una longitud de 40 kb (kilobases), está compuesto por 17 exones interrumpidos por 16 intrones, y está orientado del centrómero al telómero en el cromosoma 22q12 (Kim y Pelletier, 1999). Existe un *splicing* alternativo que da lugar a un nuevo transcrito (*EWS-b*). *EWS* y *EWS-b* difieren por la presencia o ausencia de los exones 8 y 9 (Ohno y cols., 1994).

La proteína *EWS* contiene un dominio aminoterminal de activación transcripcional (EAD) y un dominio carboxiterminal de unión a RNA (RBD). El dominio de activación transcripcional es rico en residuos de glutamina, serina y tirosina, tal como aparece comunmente en dominios de activación transcripcional, y comprende 31 motivos polipeptídicos degenerados repetidos de secuencia SYGQQSX, compartiendo homología con la RNA polimerasa II eucariota. Los residuos 1-82 (R7BS) interactúan con la subunidad hsRBP7 (Petermann y cols., 1998) de la RNA polimerasa II, los residuos 228-264 (ZFM1) con *transcriptional repressor/splicing protein* ZFM1/SF1 (Zhang y cols., 1998), y los residuos 258-280 contienen un dominio IQ que está involucrado en la unión a la calmodulina, la cual puede ser inhibida por la fosforilación de la proteína quinasa C (Deloulme y cols., 1997). El dominio carboxiterminal contiene un motivo de reconocimiento de RNA (RRM) (Bertolotti y cols., 1996) constituido por 100 residuos aproximadamente. Además contiene tres regiones arginina-glicina-glicina (RGG1, RGG2, RGG3), que están dimetiladas asimétricamente por proteínas arginin-metiltransferasas

(Belyanskaya y cols., 2001; Pahlich y cols., 2005; Araya y cols., 2005). Los residuos 524-543 del RBD presentan un *C2-C2 zinc finger motif* (Hackl y Luhrmann, 1996).

Fig. 2. Representación esquemática de la oncoproteína EWS.

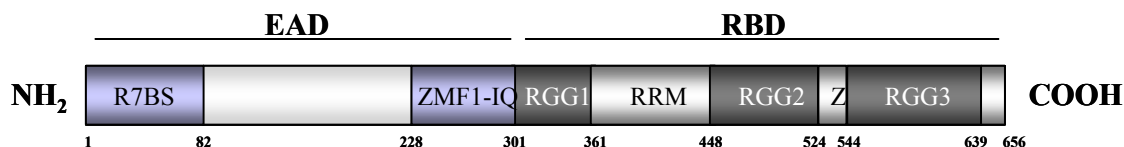


Figura modificada de Zakaryan y Gehring, 2006

Mientras que las proteínas quiméricas EWS derivadas de tumores funcionan como factores de transcripción, la función biológica de la proteína EWS normal se desconoce. Debido a que su promotor es rico en GC y carece de la secuencia TATA, y que se expresa abundantemente en todos los tipos celulares, se asume que el gen *EWS* es un gen de mantenimiento general (*housekeeping*, Plougastel y cols., 1993). La proteína EWS, localizada fundamentalmente en el núcleo, está asociada a componentes de la maquinaria transcripcional basal, participa en el *splicing* del pre-RNAm y en la exportación del RNAm al citoplasma. Además las interacciones de la proteína EWS con diferentes tirosina-quinazas, sugieren que EWS pueda ser diana y/o parte de diferentes vías de señalización (Zakaryan y Gehring, 2006).

En ESFT la fusión aberrante del gen *EWS* con un miembro de la familia de factores de transcripción *ETS* es fundamental en la tumorigénesis y mantenimiento de las propiedades malignas de este tipo de tumores. Todos los reordenamientos génicos resultan en la producción de oncoproteínas quiméricas que conservan el dominio de unión a DNA, de forma que todas las proteínas de fusión pueden regular la transcripción de genes y transformar células, aunque con diferente intensidad en función del compañero de fusión de EWS. Además del gen “reordenado”, el alelo normal de *EWS* se encuentra constitutivamente activo en las células tumorales (Aman y cols., 1996) pero se ha demostrado que no es necesario para el crecimiento tumoral (Kovar, 2001).

1.7.3 La familia de factores de transcripción ETS

La familia de factores de transcripción ETS está formada por un número elevado de proteínas conservadas en la evolución, que han sido involucradas en varios procesos biológicos, incluyendo aquellos que controlan la proliferación celular, la diferenciación, la hematopoyesis, la apoptosis, la metástasis, la angiogénesis y la transformación (Seth y Watson, 2005). El primer miembro de esta familia, el oncogén *v-ets* (*E26 transformation-specific sequence*), fue identificado originalmente como un oncogén de fusión presente en el retrovirus transformante E26, que induce leucemias eritroblásticas y mieloblásticas en pollos (Leprince y cols., 1983). Desde entonces han sido identificados varios homólogos celulares en diferentes especies desde *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster* hasta humanos (Hart y cols., 2000; Hsu y Schulz, 2000). Hasta la fecha se han identificado 27 miembros de esta familia en mamíferos y todos ellos codifican para factores de transcripción que regulan la expresión génica.

La familia ETS está definida por un motivo de 85 aminoácidos altamente conservado, denominado dominio ETS, que se une específicamente a la secuencia (o *core*) de DNA GGAA/T (EBS, Ets Binding Site) (Donaldson y cols., 1994). Sin embargo, diferentes miembros de esta familia de proteínas muestran diferente especificidad de unión al DNA. Los dominos ETS y los nucleótidos que flanquean el *core* central influyen en la afinidad de la unión (Graves y Petersen, 1998), y la alteración de un solo aminoácido en el dominio ETS puede cambiar la especificidad de unión al DNA (Mo y cols., 2000).

Además de la importancia de las proteínas de esta familia en el control celular normal, alteraciones en su expresión pueden contribuir al desarrollo y progresión de tumores malignos. Por ejemplo, los genes ETS humanos, *TEL*, *FLI-1* y *ERG* han sido localizados en los puntos de translocación en diferentes leucemias y tumores sólidos (Golub y cols., 1994; Delattre y cols., 1992; Zucman y cols., 1993b). También la sobreexpresión o pérdida de proteínas ETS puede ser detectada en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo la sobreexpresión de ETS-2 en cáncer de próstata o mama (Sapi y cols., 1998; Sementchenko y cols., 1998) o la pérdida de PSE (ETS específico de la próstata) en cáncer de próstata (Nozawa y cols., 2000).

Dada la importancia de los factores de transcripción de esta familia en varios procesos biológicos y patológicos, la identificación de los genes diana específicos de las proteínas ETS resulta necesaria. Mientras que muchos factores ETS fueron inicialmente identificados como activadores o como represores transcripcionales, posteriormente fue evidente que algunos factores ETS pueden hacer tanto de activadores como de represores, dependiendo del promotor que regulen y del contexto celular en el que actúen (Seth y Watson, 2005).

1.7.4 Las proteínas de fusión EWS/ETS

Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing están caracterizados por una translocación cromosómica entre el gen *EWS* y varios miembros de la familia de factores de transcripción *ETS*, el gen *FLI-1* en la mayoría de los casos. En aproximadamente un 10-15% de los tumores de Ewing, la fusión involucra además del gen *EWS*, genes de la familia *ETS*, tales como *ERG*, *ETV1*, *E1A*, *FEV* o *ZSG* (Tabla 4). Recientemente se describió una nueva variante, *FUS*, un gen relacionado con *EWS*, que se fusiona con *ERG* mediante la translocación cromosómica t(16;21)(p11;q22).

Tabla 4. Translocaciones cromosómicas implicadas en los tumores de sarcoma de Ewing y su incidencia

Producto fusión	Translocación	Incidencia (%)	Ref.
EWS/FLI-1	t(11;22)(q24;12)	90-95	Delattre y cols., 1992
EWS/ERG	t(21;22)(q22;12)	5-10	Zucman y cols., 1993
EWS/ETV1	t(7;22)(q22;12)	<1	Jeon y cols., 1995
EWS/E1AF	t(17;22)(q12;12)	<1	Kaneko y cols., 1996
EWS/FEV	t(2;22)(q33;12)	<1	Peter y cols., 1997
EWS/ZSG	inv(22)	<1	Mastrangelo y cols., 2000
FUS/ERG	t(16;21)(p11;22)	<1	Shing y cols., 2003

En el tipo de translocación más frecuente, t(11;22)(q24;q12), los primeros 264 aminoácidos del gen *EWS* se encuentran fusionados con 232 aminoácidos del extremo carboxiterminal del gen *FLI-1*. Sin embargo, han sido descritos otros puntos de fusión en diferentes exones resultando en 12 tipos de proteínas de fusión EWS/FLI-1, que contienen

los primeros 264-348 aminoácidos de *EWS* y los últimos 191-324 aminoácidos de *FLI-1* (Delattre y cols., 1992; Plougastel y cols., 1993; Zucman y cols., 1993b). El tipo 1, que representa un 60% de todos los productos, resulta de la yuxtaposición de los primeros 7 exones de *EWS* con los exones 6-9 de *FLI-1*; el tipo 2, por la fusión de los 7 primeros exones de *EWS* con los exones 5-9 de *FLI-1*, y el tipo 3, por la unión de los 10 primeros exones de *EWS* con los exones 6-9 de *FLI-1* (Fig. 3).

El estudio de los productos de fusión obtenidos como consecuencia de la translocación $t(11;22)(q24;q12)$, reveló la existencia de diferentes fusiones *EWS/FLI-1*, pero no mostró evidencia de la formación de la proteína recíproca *FLI-1/EWS* (Delattre y cols., 1992; Zucman y cols., 1992), indicando que el cromosoma portador de la fusión *EWS/FLI-1* podría estar perdido en ESFT (Turc-Carel y cols., 1984; Douglass y cols., 1986).

Fig. 3. Representación esquemática de los tres tipos de fusión *EWS/FLI-1* más frecuentes en sarcoma de Ewing

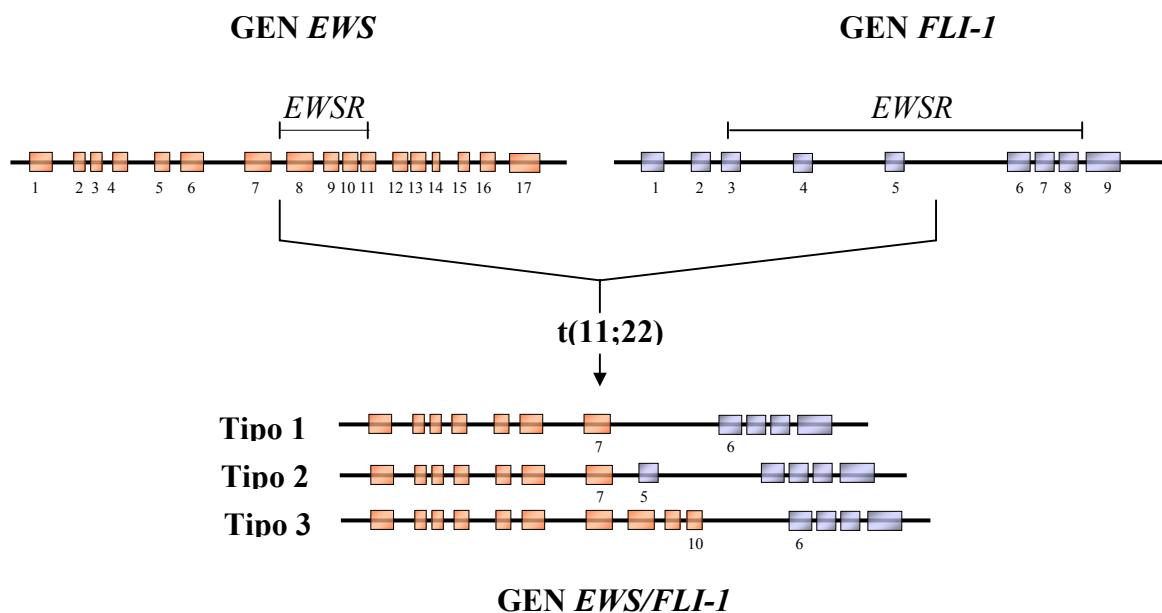


Figura modificada de Delattre y cols., 1994

Todas las proteínas de fusión *EWS/ETS* presentan actividad oncogénica, son capaces de transformar fibroblastos de ratón inmortalizados NIH3T3 (May y cols., 1993a-b; Lessnick y cols., 1995; Thompson y cols., 1999). Cuando *EWS/FLI-1* es transfectado en células NIH3T3, las células que lo expresan forman colonias en medio semisólido y son capaces

de formar tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos (Teitell y cols., 1999). De manera muy interesante, ni *EWS* ni *FLI-1* por sí mismos son capaces de transformar células en el mismo sistema (May y cols., 1993b), indicando que la proteína de fusión EWS/FLI-1 presenta mayor actividad transformante y tumorigénica. Para ello es necesario que el dominio de unión a DNA de *FLI-1* y el dominio de activación transcripcional de *EWS* estén presentes (May y cols., 1993a). Basándose en estos resultados se propuso que EWS/FLI-1 actúa como factor de transcripción aberrante que regula de forma inapropiada la expresión de genes, causando así la transformación oncogénica de las células diana (Delattre y cols., 1992; May y cols., 1993a; May y cols., 1993b; Lessnick y cols., 1995).

Estudios más recientes mostraron que la función de unión a DNA de la proteína EWS/FLI-1, aunque es requerida para el crecimiento independiente del anclaje de células NIH3T3 *in vitro*, no es necesaria para la promoción del crecimiento del tumor en NIH3T3 transfectadas en ratones inmunodeprimidos (Jaishankar y cols., 1999; Welford y cols., 2001). Por otro lado, la introducción de vectores de expresión EWS/FLI-1 antisentido o la utilización de siRNA dieron como resultado la inhibición del crecimiento, el aumento de la susceptibilidad a apoptosis, la pérdida de la capacidad de crecimiento independiente del anclaje, y la prevención de la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos (Ouchida y cols., 1995; Kovar y cols., 1996; Tanaka y cols., 1997; Toretsky y cols., 1997; Yi y cols., 1997; Lambert y cols., 2000; Prieur y cols., 2004; Siligan y cols., 2005). Estos resultados sugieren que la proteína EWS/FLI-1 contribuye a la tumorigénesis por mecanismos tanto dependientes como independientes de la unión a DNA. Sin embargo no se ha identificado ningún tumor de Ewing que presente la proteína de fusión EWS-ETS con el dominio de unión a DNA defectuoso, indicando que la actividad de unión a DNA es esencial para la función oncogénica de las proteínas de fusión en humanos. Además la naturaleza de la fusión entre EWS y FLI-1 determina el potencial transactivador de la oncoproteína resultante. En particular, la fusión más común EWS/FLI-1 tipo 1, genera una proteína de fusión con menor potencial de transactivación que la fusión tipo 2 (Lin y cols., 1999). Esta menor capacidad de transactivación se ha correlacionado con un mayor índice de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con ESFT (Zoubek y cols., 1996; de Alava y cols., 1998).

1.7.5 Genes regulados directa o indirectamente por las proteínas EWS/ETS

La búsqueda sistemática de genes diana de EWS/FLI-1 utilizando diferentes técnicas como *representational difference analysis* (RDA), microarrays o inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), ha revelado la existencia de diferentes genes que pueden ser potencialmente regulados por las proteínas de fusión EWS/ETS (Janknecht, 2005) (Tabla 5). Entre ellos podemos destacar genes regulados positivamente como *c-Myc*, *Ciclina D1*, *PDGF-C*, *PTPL-1*, *Id-2*, *EAT-2*, *PIM-3*, *Tenascin-C* y *Uridine phosphorylase*, mientras que la expresión de *p21*, *p27*, *p57*, *IGFBP-3* y *TGF β -RII* está reprimida .

Tabla 5. Genes regulados por EWS/FLI-1

Gen	Función	REF
<i>EAT-2</i>	Regulación inmune	Thompson y cols.; 1996
<i>mE2-C</i>	Degradación de la ciclina B	Arvand y cols, 1998
<i>Manic fringe</i>	Desarrollo somático	May y cols., 1997
<i>c-Myc</i>	Crecimiento celular	Bailly y cols.,1994
<i>TGFβ-RII</i>	Inhibición del crecimiento	Hahm y cols., 1999
<i>PDGF-C</i>	Metástasis	Zwerner y May, 2001
<i>Id2</i>	Regulación de la transcripción	Nishimori y cols., 2002
<i>p21</i>	Regulación del ciclo celular	Nakatani y cols., 2003
<i>p57KIP</i>	Regulador del ciclo celular	Dauphinot y cols., 2001
<i>PIM-3</i>	Serina quinasa	Deneen y cols., 2003
<i>Tenascin</i>	Factor invasión	Watanabe y cols., 2003
<i>IGFBP-3</i>	Modulador factor de crecimiento	Prieur y cols., 2004
<i>MK-STYX</i>	Homólogo de fosfatasa	Siligan y cols., 2005
<i>PTPL1</i>	Fosfatasa	Abaan y cols., 2005

Tabla modificada de Uren y Toretsky, 2005

Hasta la fecha solamente algunos genes han sido descritos como dianas directas de las proteínas de fusión EWS/FLI-1 en ESFT (*TGF β -RII*, *Id-2*, *p21*, *Tenascin-C*, *MK-STYX* y *PTPL-1*). La mayoría de las dianas directas descritas presentan una función importante en la activación de la proliferación, la evasión de la inhibición del crecimiento o de la apoptosis. Por lo tanto, la identificación de genes regulados directamente por EWS/FLI-1 es esencial para entender su papel en la oncogénesis de este tipo de tumores y cómo la

modulación de estas vías de señalización podría ser de gran utilidad para una terapia futura.

1.8 Vía de señalización de mTOR : inhibición mediante el uso de rapamicina

El descubrimiento de la rapamicina (también llamada sirolimus) como agente terapéutico se remonta la década de los 70, cuando una expedición médica canadiense aisló el principio activo en la arena de la Isla de Pascua (Rapa Nui), a partir del microorganismo *Streptomyces hygroscopicus*, y describió sus propiedades antibióticas y antifúngicas (Vezina y cols. 1975; Sehgal y cols, 1975). Recientemente la rapamicina ha sido identificada por el NCI (*National Cancer Institute*) como un agente no citotóxico que retrasa la proliferación tumoral, encontrando evidencia de actividad citostática contra varios tipos de cáncer *in vitro* e *in vivo* (Vignot y cols., 2005).

La rapamicina se une intracelularmente a miembros de *immunophilin family of FK506 binding proteins* (FKBPs), inhibiendo su acción enzimática como prolil-isomerasas. Aunque la familia de proteínas FKBP está formada por numerosos miembros, la proteína de unión descrita más importante es la FKBP12 (Heitman y cols., 1991). El complejo resultante rapamicina-FKBP12 interacciona con una proteína denominada *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR), también conocida como FRAP, RAFT1 o RAP1 (Sabatini y cols., 1994; Sabers y cols., 1995; Brown y cols., 1994; Chiu y cols., 1994) inhibiendo su actividad.

La proteína mTOR fue identificada (Brown y cols., 1994; Chiu y cols., 1994; Sabatini y cols., 1994) después del descubrimiento de dos genes, *TOR1* y *TOR2*, en *Saccharomyces cerevisiae* durante una búsqueda de genes resistentes al efecto inmunosupresor de la rapamicina (Helliwell y cols., 1994). La proteína mTOR es una serina-treonina quinasa de 289 kDa, altamente relacionada con la proteína TOR de levaduras, que pertenece a la familia PIKK (*PI3K-related kinases*) (Hunter, 1995; Keith y Schreiber, 1995). Los miembros de esta familia están involucrados en funciones celulares básicas, tales como control del crecimiento y del ciclo celular y puntos de control de la reparación de DNA (Mita y cols., 2003). Alteraciones en la función de PIKK resultan en una variedad de enfermedades, que incluyen desde cáncer a casos de inmunodeficiencia.

En células de mamíferos, la vía de señalización de mTOR puede ser activada por factores de crecimiento tales como IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (Fig. 4). La sobreexpresión del receptor IGFR-1 (*insulin-like growth-factor receptor 1*) y de su ligando IGF-1, se han descrito en diferentes tipos de cáncer (Easton y cols., 2006). Tras la unión del ligando y la autofosforilación del receptor, el IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) se asocia con estos receptores, dando lugar a la unión y activación de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), la cual activa a Akt, ambos considerados como protooncogenes.

La activación de PI3K puede ser regulada negativamente por el supresor de tumores PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*). Una reducción en la expresión de PTEN estimula indirectamente la actividad de PI3K, contribuyendo a la oncogénesis en humanos. Mutaciones o deleciones en PTEN son frecuentes en glioblastomas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón, melanoma y cáncer de próstata (Li y cols., 1997; Risinger y cols., 1997; Steck y cols., 1997).

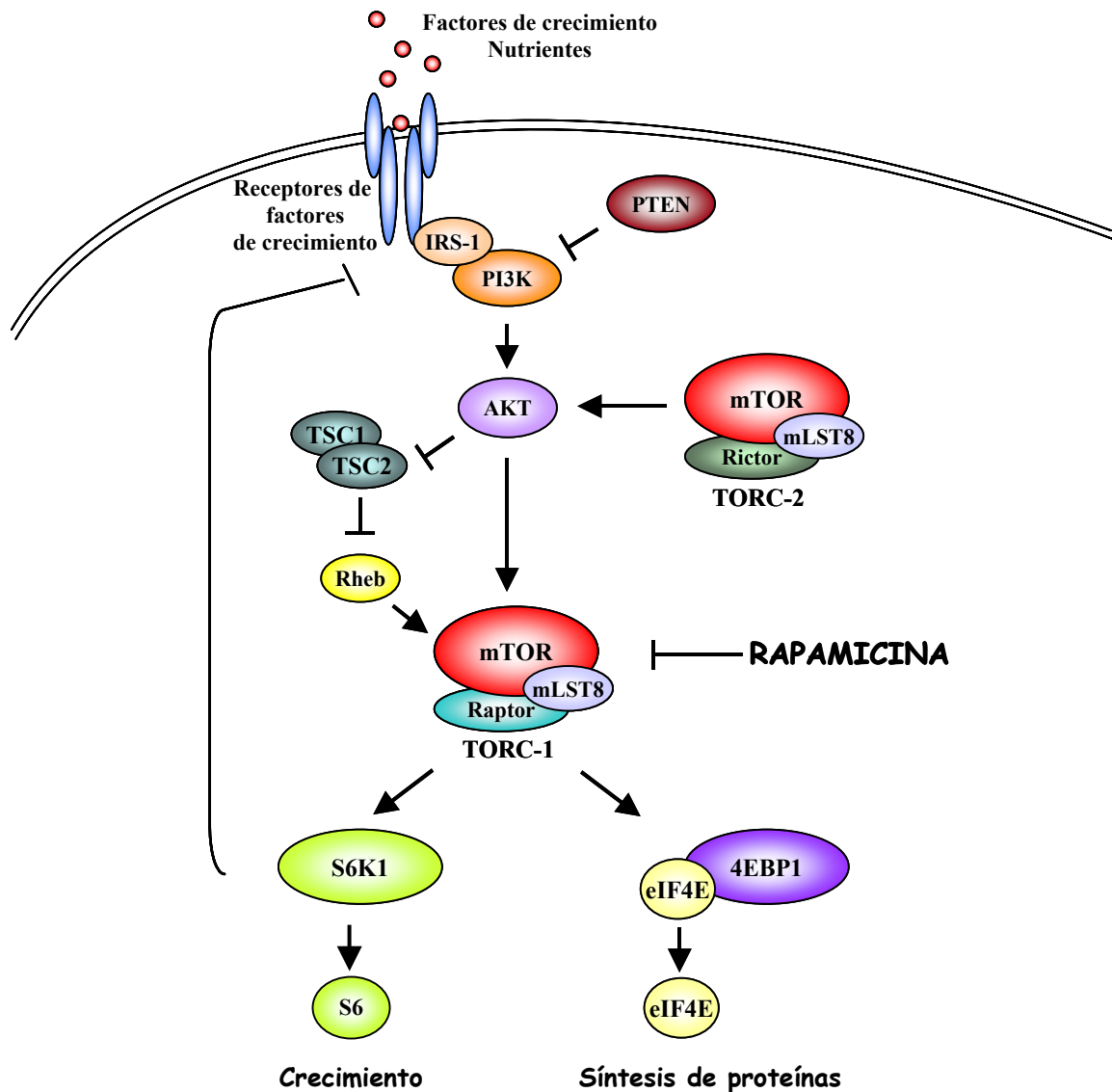
La proteína Akt, también conocida como PKB (*protein kinase B*) fosforila y/o interactúa con una serie de moléculas para ejercer sus funciones celulares normales, como el papel en la proliferación celular, supervivencia y diferenciación (Datta y cols., 1999; Testa y Bellacosa, 2001; Brazil y cols., 2002). PI3K se une directamente al dominio PH (*pleckstrin homology*) de la proteína Akt, dando lugar a un cambio en la conformación de la molécula permitiendo la activación por PDK1. De todas las dianas de Akt, mTOR destaca como una de las principales debido a que alteraciones en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR son las más frecuentemente encontradas en procesos de carcinogénesis en humanos.

La proteína Akt puede activar la vía de señalización de mTOR, inhibiendo el complejo TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1/tuberous sclerosis complex 2*) a través de la fosforilación directa del TSC2. El complejo TSC1/TSC2 está involucrado en la regulación de mTOR en función del estado de nutrientes. Este complejo, que tiene actividad GTPasa, inhibe a la proteína Rheb, una GTPasa pequeña que es requerida para la activación de mTOR (Hay y Sonenberg, 2004).

La proteína mTOR participa en la regulación de la iniciación de la transcripción del RNAm y la traducción de proteínas en respuesta a la concentración intracelular de

aminoácidos y otros nutrientes esenciales. También participa en la organización del citoesqueleto, tráfico de membrana, degradación de proteínas, biogénesis de ribosomas y la vía de señalización de la proteína quinasa C (PKC).

Fig. 4 . Representación esquemática de la vía de señalización de mTOR



La proteína mTOR se encuentra formando dos tipos de complejos. El primero de ellos es TORC1, que contiene mTOR, mLST8 (también conocido como G β L, *G protein β -subunit-like protein*) y Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*). El otro complejo, denominado TORC2, está formado por mTOR, mLST8 y Rictor (*rapamycin-insentive companion of mTOR*) (Kim y cols, 2002; Kim y cols., 2003). El complejo TORC2, a diferencia de TORC1, no es sensible a la rapamicina, y regula la proliferación celular vía

Akt y la organización del citoesqueleto vía de la PKC α (Kim y cols., 2002; Sarbassov y cols., 2004).

La proteína mTOR modula la traducción de RNAm específicos a través de la regulación y fosforilación de diferentes proteínas, fundamentalmente la quinasa ribosomal p70s6K (S6K1) y la proteína tipo 1 de unión al factor de iniciación eucariota-4E (4E-BP1), también conocida como PHAS-1.

La proteína 4E-BP1/PHAS-1 inhibe la iniciación de la traducción a través de su asociación con eIF-4E (factor de iniciación eucariótico 4E). La unión de 4E-BP1 a eIF-4E depende del estado de fosforilación de 4E-BP. En estado no fosforilado, 4E-BP1/PHAS-1 se une a eIF-4E e inhibe su actividad (Sonenberg y Gingras, 1998). En respuesta a un estímulo proliferativo, 4E-BP1/PHAS-1 se fosforila a través de mTOR y otras quinasas y disminuye su afinidad por eIF-4E. Esta acción promueve la disociación del complejo 4E-BP1/PHAS-1, incrementando la disponibilidad de eIF-4E para unirse a eIF-4G, -4B y -4A, formando el complejo eIF-4F y estimulando la traducción. Por el contrario, la ausencia de factores de crecimiento, o el tratamiento con rapamicina, dan lugar a la defosforilación de 4E-BP1/PHAS-1, el incremento en la unión a eIF-4E y, como consecuencia, la inhibición de la traducción de RNAm necesario para el paso de la fase G₁ a la S en el ciclo celular (Brunn y cols., 1997; Gingras y cols., 1998). El gen *eIF-4E* se encuentra alterado en diferentes tipos de cáncer, como los carcinomas de colon, de vesícula y de mama (Rosenwald y cols., 1999; Crew y cols., 2000; Li y cols., 2002).

La segunda diana regulada por mTOR es la proteína quinasa p70s6K. Esta proteína se encuentra sobreexpresada o constitutivamente activa en diferentes líneas celulares tumorales, así como en algunos carcinomas de mama (Couch y cols., 1999). Esta proteína es fosforilada y activada por la acción de mTOR, dando lugar a la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Hu y cols., 2000). La fosforilación de la proteína p70s6K controla un amplio rango de procesos celulares incluyendo la traducción de RNAm y la progresión de la fase G₁ a la S del ciclo celular (Ferrari y Thomas, 1994; Chou y Blenis, 1995). El tratamiento con rapamicina causa la defosforilación de la proteína p70s6K, inhibiendo su actividad. Por otro lado, la inhibición de mTOR puede incrementar la fosforilación y activación de Akt en diferentes líneas celulares. Para ello, S6K1 fosforila e inhibe la

expresión de IRS-1, protegiéndose así las células de la inhibición de la proliferación causada por la rapamicina (Shi y cols., 2005).

En la actualidad existen tres análogos de la rapamicina en diferentes fases de desarrollo. El más estudiado hasta la fecha es el CCI-779 o temsirolimus, derivado soluble de formulación intravenosa, que se encuentra actualmente en fase III de ensayos clínicos en Wyeth Ayest. El análogo de formulación oral RAD-001 o everolimus (Novartis Pharma) y el de formulación intravenosa AP23573 (Ariad Pharma), se encuentran en fase II. Cada uno de estos compuestos forma un complejo con la inmunofilina FKBP12, dando como resultado la inhibición de mTOR.

En cáncer de mama y carcinoma renal de células claras, la administración intermitente de los análogos de la rapamicina no dio lugar a efectos inmunosupresores, y sin embargo se mantuvo su actividad antitumoral. Como efectos secundarios, pueden aparecer reacciones en la piel y mucositis (Vignot y cols., 2005).

Además de los efectos bien caracterizados de mTOR sobre S6K1 y 4EBP1, la rapamicina interfiere con otros procesos intracelulares que están involucrados en el ciclo celular, incrementando con éllo su actividad antiproliferativa. Estos efectos farmacológicos son particularmente importantes en células en estado de crecimiento exponencial, que no sufren parada en G₁ en respuesta a la inhibición de la fosforilación de la p70s6k como consecuencia del tratamiento con la rapamicina.

La rapamicina incrementa el reciclaje de la ciclina D1, a nivel de RNAm y proteína, resultando en una deficiencia de los complejos CDK4 (quinasa 4 dependiente de ciclina)-ciclina D1, que son requeridos para la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb). La rapamicina también bloquea la eliminación del inhibidor de las CDK, la proteína p27, prolongando su vida media, y facilitando la formación de complejos p27 y CDK/ciclina. Estos efectos junto con la inhibición de la traducción de otros RNAm, dan lugar a una inhibición de la fase G₁ a la S del ciclo celular (Mita y cols., 2003). Estudios recientes mostraron evidencia de la unión de la p70s6K a la molécula pro-apoptótica BAD, que es fosforilada e inactivada, dando como resultado un incremento en la supervivencia celular. mTOR puede translocarse desde el citoplasma al núcleo causando la fosforilación de la

p53, su activación transcripcional y la inducción de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico (Vignot y cols., 2005) (Fig. 5).

Fig. 5. Representación esquemática de los efectos de los inhibidores de mTOR

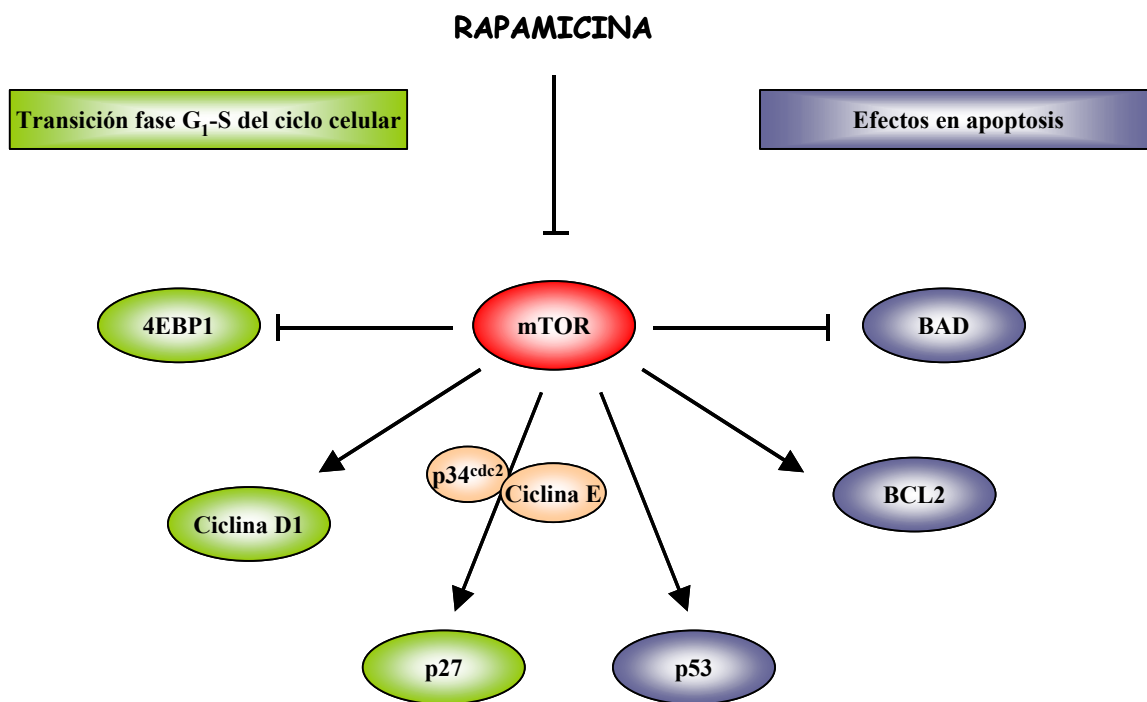


Figura modificada de Faivre y cols., 2006

1.9 Terapia antisentido en oncología

El progreso reciente en la identificación y caracterización de nuevas dianas moleculares para el cáncer y la efectividad limitada de los tratamientos convencionales han conducido al desarrollo de nuevos tipos de agentes anticancerígenos altamente específicos y efectivos para las células malignas. La terapia antisentido pertenece a esta clase de nuevas drogas, cuya finalidad es controlar la regulación de los genes que contribuyen a la progresión del cáncer sin afectar al crecimiento de las células normales, por lo que presenta una nueva alternativa con menos efectos secundarios que la quimioterapia convencional. Varios

genes implicados en regulación de la apoptosis, proliferación celular, metástasis y angiogénesis han sido validados como dianas moleculares para la terapia antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido (OAS) son moléculas cortas de DNA monocatenario complementarias a determinadas secuencias específicas del RNAm diana (secuencia sentido). En general, presentan una longitud de 12 a 25 nucleótidos, aunque lo más frecuente es que tengan una longitud de 18 a 21 nucleótidos (Dean y Bennett, 2003). Los OAS se unen al RNA mediante la formación de un heterodúplex bicatenario sentido-antisentido (RNAm-OAS) basado en la fidelidad de hibridación de Watson-Crick. La inhibición ocurre a través de varios mecanismos, incluyendo la modulación del *splicing* e inhibición de la traducción. Sin embargo, la inhibición de la expresión del gen diana es debida fundamentalmente al reclutamiento de la ribonucleasa H endógena, endonucleasa ubicua que reconoce los dúplex RNA-OAS y corta la cadena de RNA, dejando intacta la secuencia del OAS, que puede volver a unirse a otras moléculas de RNA diana (Fig. 6) (Baker y Monia, 1999; Crooke, 1999; Koller y cols., 2000).

Aunque la inhibición de la expresión del gen diana es el principal mecanismo biológico del OAS, también se han descrito efectos no específicos, que pueden contribuir a la respuesta. Estos efectos incluyen la estimulación del sistema inmune por secuencias tales como motivos CpG o GGGG (Wooldrige y cols., 1997).

Los OAS han sido denominados "la siguiente gran oleada en la revolución biotecnológica y la farmacología del futuro". Ciertamente, desde un punto de vista teórico, la aproximación antisentido, en la cual la diana molecular es una secuencia específica de un RNAm específico, debería presentar ciertas ventajas frente a otras drogas con proteínas como diana (Tanaka y Nyce, 2001).

Fig. 6. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido.

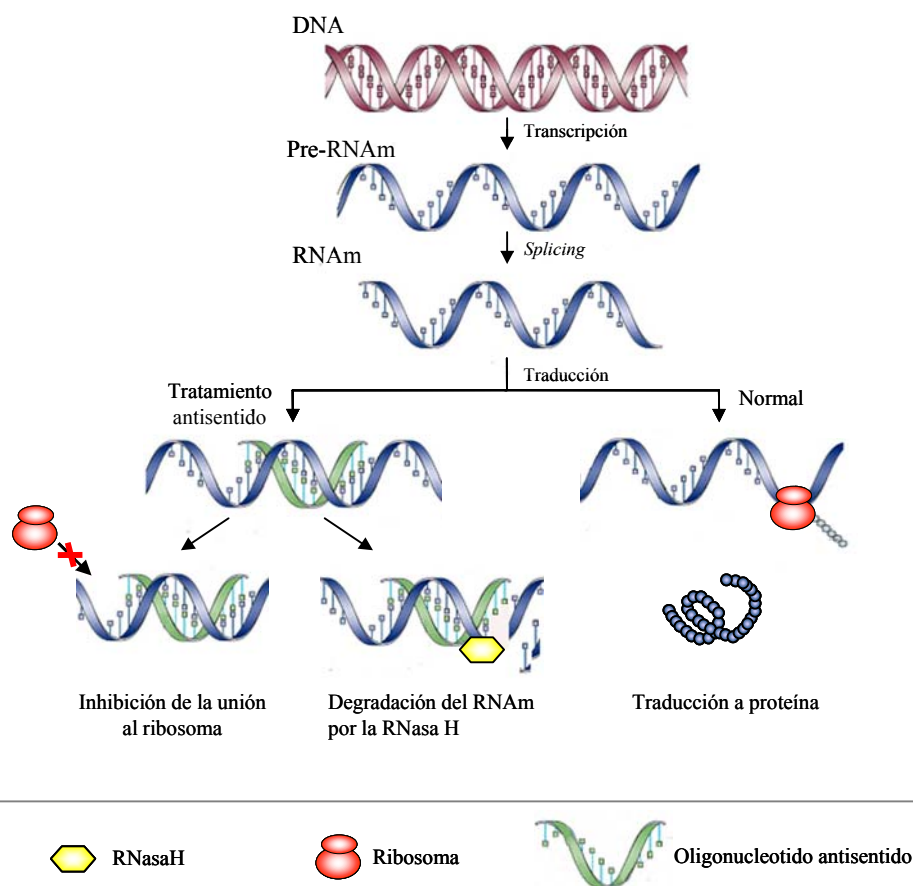


Figura modificada de Gleave y Monia, 2005.

Las ventajas que presenta la terapia antisentido frente a los tratamientos convencionales son entre otras, que la acción ocurre en un punto más próximo a la causa de la enfermedad (normalmente sobre la expresión discordante del RNA) en lugar de actuar sobre la proteína que participa ya en el proceso de la enfermedad, y otras ventajas de la acción sobre el RNA en lugar de la acción sobre la proteína, como son (Tanaka y Nyce, 2001):

- Mayor especificidad: la especificidad de unión de los oligonucleótidos antisentido a su RNA diana es mayor que la de las drogas tradicionales a su proteínas diana.
- Habilidad para investigar la hibridación con dianas no específicas permite realizar por adelantado estudios toxicológicos.

- La atenuación del RNAm diana podría requerir periodos mucho más largos para recuperar los niveles que causan la enfermedad, que la inhibición a nivel de proteína. Esto podría indicar mayor duración de efecto.
- Desarrollo más rápido que las drogas tradicionales.

La terapia antisentido ha evolucionado significativamente desde que en 1977, se demostró por primera vez la inhibición de la transcripción y traducción mediante hibridación de una secuencia de RNAm a su DNA complementario (Paterson y cols., 1977). Estudios posteriores mostraron la inhibición de la replicación y transformación celular del virus del sarcoma de Rous en fibroblastos de pollo, mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido de pequeño tamaño (Zamecnik y Stephenson, 1978).

Sin embargo, su utilización en clínica se ha visto dificultada por limitaciones farmacocinéticas como su eliminación rápida, debido a la degradación por enzimas nucleolíticas y su dificultad para acceder con actividad funcional al citoplasma y/o núcleo celular. Para superar estos problemas se han realizado diversas modificaciones estructurales en la molécula del oligonucleótido (Morán González y Domínguez-Gil Hurlé, 2005).

La primera modificación se basó en la sustitución de un átomo de oxígeno de cada grupo fosfato por un grupo metilo, dando lugar a un metilfosfonato (Fig. 7) (Herdewijn, 2000; Miller y Po, 1987). Esta modificación estructural aporta una mayor capacidad de penetración en las células, además de resistencia a las endonucleasas. Desafortunadamente las modificaciones estructurales introducidas producen cambios en la naturaleza química que dan lugar a una reducción de la actividad antisentido. Como consecuencia se diseñaron los denominados ASO de “primera generación”, en los que se ha sustituido un átomo de oxígeno de los grupos fosfato por un átomo de azufre, generando los oligonucleótidos fosforotioato. Esta modificación estructural aporta a la molécula carga negativa, alta solubilidad y resistencia a la degradación por nucleasas (Lonnberg y Vuorio, 1996). Estas propiedades determinan que los oligonucleótidos fosforotioato sean los ASO preferentemente utilizados en los ensayos preclínicos y clínicos (Morán González y Domínguez-Gil Hurlé, 2005).

Fig. 7. Estructura química de los oligonucleótidos antisentido

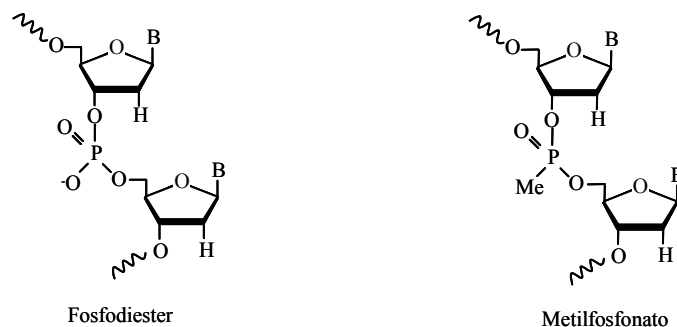


Figura modificada de Morán González y Domínguez-Gil Hurlé, 2005

Una modificación posterior se desarrolló en la síntesis de los OAS de “segunda generación” que contienen nucleótidos modificados en la posición 2’ de la ribosa. Los principales miembros de esta clase son los 2’-O-metil y 2’-O-metoxi-etil RNA (Fig. 8). Desafortunadamente el efecto antisentido de estas moléculas es menor debido a que son incapaces de activar la RNasaH (Kurreck, 2003).

Recientemente se han desarrollado los OAS de “tercera generación” con el fin de mejorar la afinidad por la diana molecular, la resistencia a nucleasas y las propiedades farmacocinéticas. Así, se han diseñado una gran variedad de nucleótidos modificados como son los ácidos nucleicos peptídicos; N3’-P5’ fosforoamidatos; 2’-desoxi-2’-fluoro-b-D-arabino ácidos nucleicos; ácidos nucleicos cerrados; morfolino oligonucleótidos; ácidos nucleicos ciclohexanos y DNA triples o tríplices (Fig. 8; Kurreck, 2003).

La eficacia de los OAS para inhibir la expresión génica también depende de su capacidad de penetración en las células diana. Debido a su naturaleza polianiónica presentan dificultad para atravesar la membrana por difusión pasiva. La captación de los OAS tiene lugar por transporte activo dependiente de la temperatura (Yakubov y cols., 1989), concentración y estructura de los oligonucleótidos (Vlassov y cols., 1994). Se han llevado a cabo numerosos estudios con la finalidad de aumentar su eficacia terapéutica, entre ellos la conjugación con policationes y con receptores de superficie de células diana, el acoplamiento a colesterol y la encapsulación en partículas lipídicas como microesferas o liposomas. Asimismo, los estudios *in vivo* han revelado que el uso de vectores en la liberación de fármacos antisentido mejora sus efectos biológicos. Estudios muy recientes

sugieren que modulando las propiedades fisicoquímicas de la superficie del transportador es posible controlar la liberación de los OAS introducidos en él (Biroccio y cols., 2003)

Fig. 8. Modificaciones químicas en la estructura de los oligonucleótidos antisentido

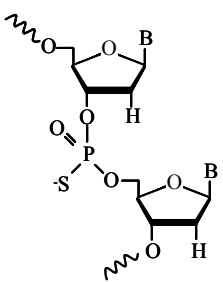
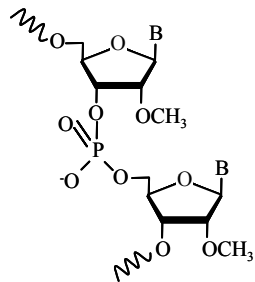
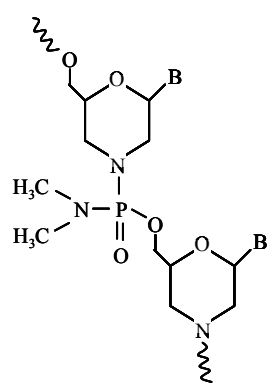
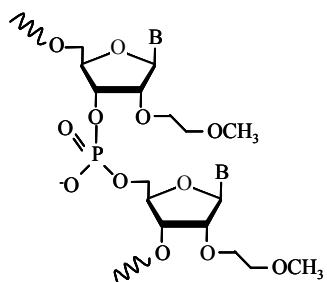
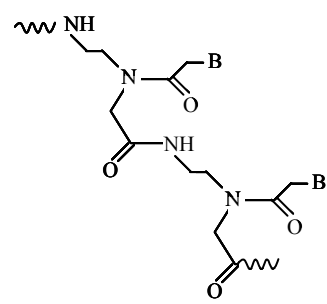
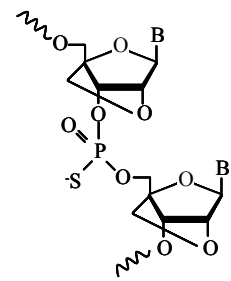
Primera generación	Segunda generación	Tercera generación
Resistentes a nucleasas Distribución en tejidos aceptable Actividad RNasa H	Mayor estabilidad Menor toxicidad Menor potencia debido a que no pueden activar la RNasa H	En estudio
 <p>Fosforotioato</p>	 <p>2'-O-metil</p>	 <p>Morfolino</p>
	 <p>2'-O-metoxi-etil</p>	 <p>Acidos nucleicos peptidicos</p>
	 <p>Acidos nucleicos cerrados</p>	

Figura modificada de Gleave y Monia, 2005.

Además del uso de secuencias antisentido que derivan de ácidos nucleicos que hibridan con hebras de RNAm por complementariedad de bases, también se han descrito otros tipos de estrategias antisentido. La primera consiste en la utilización de ribozimas y la segunda en el uso de RNA de interferencia (RNAi).

Los ribozimas son moléculas de RNA que catalizan enzimáticamente la hidrólisis de secuencias específicas de RNAm. Actúan sobre sustratos naturales concretos, pero en el caso de la terapia antisentido se diseñan de forma que combinen dicha actividad catalítica con la posibilidad, aportada por el apareamiento de bases, de reconocer específicamente diversas secuencias de RNA diana. Para poder utilizar los ribozimas como agentes terapéuticos, se han realizado diferentes tipos de aproximaciones, como su incorporación en plásmidos para poder ser administrados y la modificación de la estructura de forma que se conserve la actividad y aumente la estabilidad (Aboul-Fadl, 2005).

El RNAi se basa en un proceso celular innato que dirige la degradación de RNAm homólogos en pequeños RNA de doble cadena denominados siRNA (*small interfering RNAs*). El RNAi es iniciado por moléculas largas de DNA de doble cadena, que son procesadas en RNAs más cortos, de 21-23 nucleótidos, por el enzima Dicer. Esta proteína RNasa actúa como dímero que rompe las dos cadenas del DNA para producir siRNA con *short 3' overhanging ends*. Estos siRNAs son incorporados en un complejo proteína-RNA denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) y dirigidos hacia el transcrito específico con la secuencia complementaria (Ravichandran y cols., 2004).

1.9.1 Futuro de la terapia antisentido. Combinación con tratamientos anticáncer

Muchos OAS han mostrado su efectividad *in vitro* para reducir la expresión de genes diana, siendo efectivos contra una variedad de enfermedades humanas. Sin embargo, considerando la multitud de entidades moleculares y vías de señalización que regulan la proliferación y la apoptosis en la células cancerígenas, la inhibición de un solo gen diana no es suficiente para suprimir el crecimiento de tumores. Considerando los defectos multigenéticos de los tumores humanos, la combinación de OAS que inhiben específicamente la expresión de genes involucrados en la proliferación celular o apoptosis, combinados con drogas antineoplásicas representa una estrategia prometedora para mejorar la terapia anticancerígena. Actualmente se están desarrollando numerosos ensayos clínicos en los que se utilizan OAS tanto en monoterapia como en combinación con diferentes agentes antineoplásicos.

Los OAS probados son complementarios a determinadas dianas biológicas implicadas en la apoptosis, como son *bcl-2* o *bcl-xL*, genes que favorecen la proliferación celular, como *c-myb*, o genes involucrados tanto en la proliferación celular como en la supervivencia, como son *c-Myc* o *Mdm-2* (Tabla 6) (Morán González y Domínguez-Gil Hurlé, 2005).

La combinación de estos OAS con diferentes drogas antineoplásicas se encuentra en diferentes fases de ensayos clínicos. Además éstos mostraron que los OAS son bien tolerados y no incrementan la toxicidad de los tratamientos convencionales.

Tabla 6. Ejemplos de estudios preclínicos de OAS en terapia de combinación en tumores humanos

<i>Gen diana</i>	<i>Mecanismo</i>	<i>Tipo de tumor</i>	<i>Combinación con terapia convencional</i>	<i>Combinación con inhibidores de dianas molec.</i>
bcl-2	Apoptosis	Linfoma, melanoma, cáncer de próstata, gástrico y de mama	DTIC, paclitaxel, DOX, ciclofosfamida, CDP	Inhibidor de MAPK, antisentido contra PKA-1 y PLK1
bcl-2/bcl-xl	Apoptosis	Cáncer de mama y colon	DOX, paclitaxel, ciclofosfamida	OAS contra PKA-1, IRESSA
Clusterina	Apoptosis	Cáncer de próstata, vesícula y renal	CDP, paclitaxel, MTX, radiación ablación androgénica	ND
c-myb	Proliferación	Leucemia, cáncer de colon	CDP	ND
PKA-1	Proliferación	Cáncer de colon, mama, pulmón y próstata	Taxol, irinotecán	IRESSA, OAS contra bcl-2/bcl-xl,
c-myc	Proliferación /apoptosis	Melanoma	CDP	ND
Mdm-2	Proliferación /apoptosis	Cáncer de próstata, mama y colon	Irinotecán, 5-FU, paclitaxel, CDP, DOX	ND

PKA: protein quinasa tipo A; DTIC: dacarbacina; CDP: cisplatino; DOX: doxorubicina; MTX: mitoxantrona; 5-FU: 5-fluorouracilo; MAPK: protein quinasa activada por mitógenos, PKL-1: quinasa 1 asociada a proliferación, ND: no datos. (Morán González y Domínguez-Gil Hurlé, 2005)

1.10 Inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas : roscovitina.

Las proteínas quinasas ciclina-dependientes (CDKs, del inglés *cyclin-dependent kinases*) son proteínas serina/treonina quinasas, muy conservadas evolutivamente, que regulan dos procesos esenciales para la supervivencia de las células tumorales, la progresión del ciclo celular y la transcripción génica, mediante su asociación con subunidades reguladoras llamadas ciclinas (Morgan, 1995). La alteración de la activación de las CDKs o una

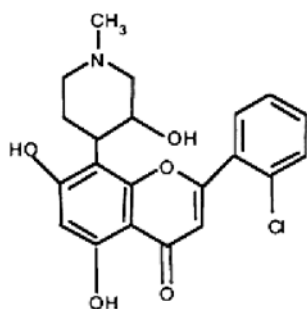
sobreexpresión de ciclinas, como la ciclina D y ciclina E, se han descrito frecuentemente en diferentes tipos de cáncer en humanos, por lo que su inhibición ha sido estudiada ampliamente como una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer. (Nurse, 2000).

De entre las diferentes funciones reguladas por las CDKs destaca el control en la entrada en cada fase del ciclo celular mediante la fosforilación de sustratos tales como pRb y *condensin* (Nurse, 2002; Kimura y cols., 1998). Las CDKs normalmente forman heterodímeros con ciclinas para crear complejos activos, tales como el complejo CDK2/ciclina E, que regula la entrada en fase S, y el complejo CDK2/ciclina A, que regula la salida de la fase S. Además también regulan el proceso de la transcripción mediante la fosforilación del dominio carboxiterminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II.

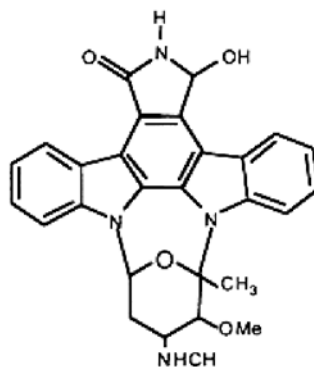
Se han considerado diferentes estrategias para modular la actividad de las CDKs. Estas estrategias incluyen efectos directos sobre la subunidad catalítica de las CDKs o la modulación indirecta de las vías de señalización que controlan la actividad de las CDKs (Senderowicz, 2003). La mayoría de los compuestos que actúan directamente sobre la subunidad catalítica de las CDKs modulan su actividad mediante interacciones específicas con la zona de unión del ATP a las ciclinas (De Azebedo y cols., 1997; Meijer y Kim, 1997; Zaharevitz y cols., 1999). Entre estas drogas podemos destacar el flavopiridol, el aminotiazol, el UCN-01 y la roscovitina (Fig. 9).

La segunda clase está formada por compuestos que modulan la actividad de las CDKs alterando la expresión y síntesis de las subunidades CDK/ciclina, incrementando los inhibidores endógenos, modulando la fosforilación de las CDKs, inhibiendo la quinasa que activa las CDK (CAK), o manipulando la maquinaria proteolítica que regula el catabolismo de los complejos CDK/ciclina o sus reguladores (Senderowicz, 2003). Sin embargo, la forma más efectiva de inhibir a las CDKs es por competición con el ATP por la unión a las CDKs.

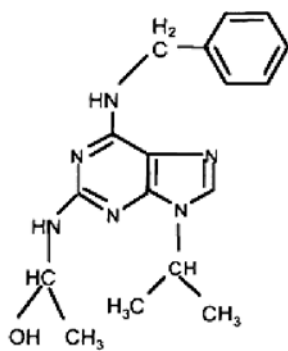
Fig. 9. Estructura de compuestos inhibidores de las CDKs.



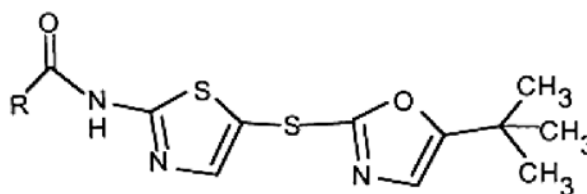
Flavopiridol



UCN-01



Roscovitina (CYC-202)



Aminotiazol

Figura modificada de Senderowicz, 2003

En general, los inhibidores de las CDKs (CDKIs) tienen efectos antiproliferativos en células en división, especialmente en células malignas (Blagosklonny y Pardee, 2001; Gray y cols., 1999). Dependiendo del inhibidor, la inhibición del crecimiento se produce en distintas fases del ciclo celular (Gray y cols., 1999). Los compuestos que inhiben el complejo CDK4/6 bloquean la fase G₁, mientras que los inhibidores selectivos de CDK1/2 paran el ciclo celular en fases G₁/G₂ y G₂/M (Gray y cols., 1999). Además, algunos inhibidores, sobre todo aquellos que inhiben la actividad de la CDK2, son capaces de inducir apoptosis en células cancerígenas (Edamatsu y cols., 2000; Gray y cols., 1999; Meijer y cols., 1997). Mientras que algunos CDKIs son bloqueadores de un amplio rango de diferentes CDKs (flavopiridol), otros son más selectivos presentando especificidad contra diferentes CDKs (roscovitina).

Debido a las diferentes funciones de las CDKs, sus inhibidores farmacológicos se están evaluando como nuevas aproximaciones terapéuticas en diferentes tipos de cáncer, desórdenes neurodegenerativos, alopecia, desórdenes cardiovasculares e infecciones virales, entre otros (Węsierkska-Gądek y Schmid, 2006).

La roscovitina (CYC202, Seliciclib, R-roscovitina) es un compuesto purínico derivado de citoquininas que compite específicamente por la zona de unión al ATP de las CDKs. La roscovitina es un potente inhibidor de la actividad quinasa de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK7 (Meijer y cols, 1997; Hajduch y cols., 1999). Concentraciones de roscovitina a nivel micromolar ejercen un fuerte efecto inhibitor de la actividad quinasa de los complejos CDK1/ciclina B1, CDK2/ciclina A y CDK2/ciclina E previniendo la progresión del ciclo celular en las fases G₁-S y G₂-M en células de mamíferos. También induce la inhibición del procesamiento del RNAr, la inhibición de la transcripción dependiente de la RNA-polimerasa II, la disrupción del nucleolo, y la inducción de apoptosis en diferentes fases del ciclo celular (McClue y cols., 2002; Alessi y cols., 1998; Ljungman y Paulsen, 2001; Lu y cols., 2001; Sirri y cols., 2002; David-Pfeuty y cols., 2001; Whittaker y cols., 2004). El estudio de tumores derivados de ratones inmunodeprimidos tratados con roscovitina mostró una reducción significativa del crecimiento respecto de los controles (McClue y cols., 2002). Además, estudios recientes han reportado que la roscovitina puede inducir activación y estabilización de p53 mediante la supresión de Mdm2 (David-Pfeuty y cols., 2001; Lu y cols., 2001).

Actualmente la roscovitina se encuentra en fase II de ensayos clínicos en combinación con gemcitabina/cisplatino en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas y como agente único para el tratamiento de mieloma múltiple (MacCallum y cols., 2005).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 La rapamicina induce una disminución de los niveles de expresión de las proteínas EWS/FLI-1 e inhibe la proliferación de células del sarcoma de Ewing

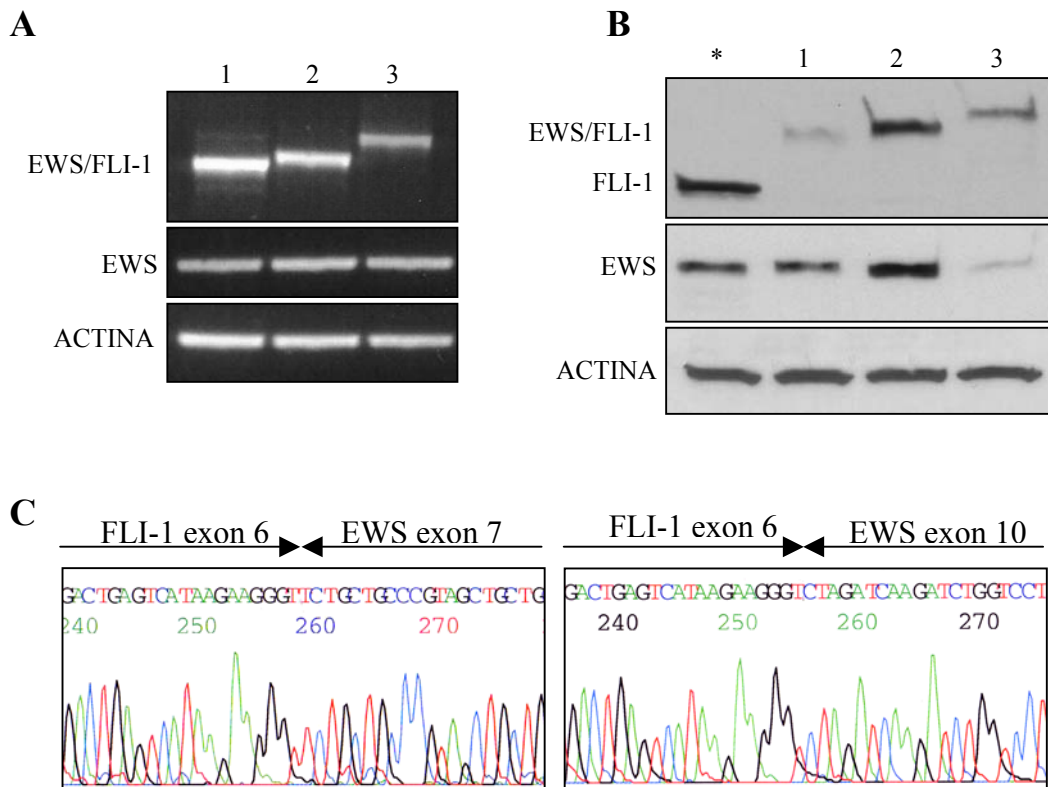
En el presente estudio se evaluó la posible implicación de la vía de señalización de mTOR en la proliferación de diferentes líneas celulares de ESFT, así como el uso potencial de la rapamicina como agente antitumoral en el tratamiento de este tipo de tumores.

2.1.1 Identificación de los distintos tipos de fusión EWS/FLI-1 en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing

Estudios previos realizados sobre los puntos de ruptura de los genes involucrados en la translocación cromosómica presente en ESFT, mostraron la existencia de diferentes tipos de fusión entre los genes *EWS* y *FLI-1* (Delattre y cols., 1992).

Para examinar la existencia de la translocación cromosómica entre los genes *EWS* y *FLI-1* en las diferentes líneas celulares de ESFT, se analizaron los niveles del RNAm procedente de tres líneas celulares representativas de cada tipo de fusión (TC-71, SK-ES-1 y A4573), mediante RT-PCR usando cebadores específicos. Tal y como se aprecia en la figura 10A, cada línea celular presentó diferentes niveles de expresión de *EWS/FLI-1*, además de diferente tamaño del fragmento amplificado, indicando que cada línea celular presentaba un tipo de fusión diferente. Los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 fueron analizados mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal específico para la proteína FLI-1 (Fig. 10B). Los resultados mostraron la existencia de un polipéptido correspondiente a la fusión EWS/FLI-1, de peso molecular y nivel de expresión diferente en cada línea celular. Como control negativo de la fusión, se analizaron los niveles de expresión de esta proteína en la línea celular de leucemia JURKAT, mostrando la existencia de un polipéptido de peso molecular aproximado de 50 kDa, correspondiente a la proteína FLI-1 (Fig. 10B). El tamaño de los fragmentos amplificados por RT-PCR y los polipéptidos obtenidos por Western blot, se correspondió con los tipos de fusión descritos en la literatura, tipo 1 en TC-71 (*EWS* exón 7 fusionado con *FLI-1* exón 6), tipo 2 en SK-ES-1 (*EWS* exón 7 fusionado con *FLI-1* exón 5) y tipo 3 en A4573 (*EWS* exón 10 fusionado con *FLI-1* exón 6).

Fig. 10. Identificación de los distintos tipos de fusión EWS/FLI-1 en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing



Estudio de la expresión de los diferentes tipos de fusión EWS/FLI-1 mediante RT-PCR (**A**) y Western blot (**B**) en las líneas celulares de ESFT (1. TC-71; 2. SK-ES-1; 3. A4573) utilizando JURKAT (*) como control negativo para la fusión. **C**: Secuencias de nucleótidos de cDNA correspondientes a la fusión EWS/FLI-1 tipo 1 y tipo 3, obtenidas mediante subclonación de los fragmentos de EWS/FLI-1 obtenidos por RT-PCR. La actina se utilizó como control de carga.

Para confirmar la existencia de un alelo del gen *EWS* intacto en todas las líneas celulares de sarcoma de Ewing, los niveles de expresión del RNAm fueron analizados mediante RT-PCR, usando cebadores específicos. Tal y como se muestra en la figura 10A, se obtuvo un fragmento del mismo tamaño en todas las líneas celulares, correspondiente al RNAm de *EWS*. Los niveles de expresión de la proteína EWS fueron analizados mediante Western blot (Fig. 10B), utilizando un anticuerpo policlonal, dirigido contra el extremo carboxi-terminal de la proteína EWS. Los resultados mostraron un polipéptido de peso molecular aproximado de 95 kDa en todas las líneas celulares, pero niveles de expresión diferentes.

Con objeto de confirmar la identidad de los fragmentos amplificados por RT-PCR y que éstos se correspondían con los diferentes tipos de fusión *EWS/FLI-1* descritos en la

literatura, fueron seleccionados los fragmentos correspondientes al tipo 1 y tipo 3. Una vez amplificados, éstos fueron subclonados en vectores pCR4TOPO, purificados y secuenciados con el analizador genético AbI Prism 377. Las dos secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con las secuencias publicadas en el banco de datos GenBank del NCBI utilizando el programa BLAST, mostrando que ambos tipos de fusión conservaban el mismo exón de *FLI-1* (exón 6) y diferentes exones de *EWS* (exón 7 en el tipo 1 y exón 10 en el tipo 3) (Fig. 10C).

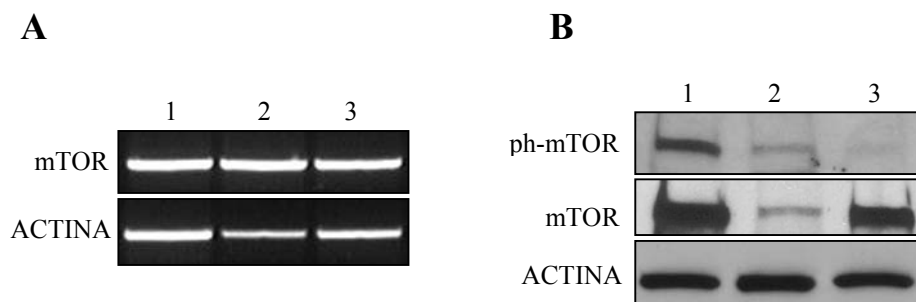
2.1.2 Estudio de los niveles de expresión de la proteína mTOR en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de ESFT es que los diferentes tipos de proteína de fusión pueden actuar sobre diferentes dianas y responder a estímulos por diferentes vías (Aryee y cols., 2000), con lo cual se hace indispensable la búsqueda de un único tratamiento efectivo contra los diferentes tipos de fusión implicados. El alto índice de alteraciones que ocurren en las vías de señalización que presentan las células tumorales sugiere que muchos de estos mecanismos aberrantes podrían ser dianas estratégicas para la terapia contra el cáncer. Estudios recientes han demostrado el papel esencial que juegan diversos factores de crecimiento y sus receptores en el mantenimiento del fenotipo neoplásico y la proliferación de líneas celulares de ESFT. Varios estudios han mostrado el papel del factor de crecimiento IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) y su correspondiente receptor (*IGFR-1*) en el mantenimiento del fenotipo neoplásico y la proliferación de este tipo de tumores (Scotlandi y cols., 1998; Toretsky y cols., 1999). Se ha propuesto que la inhibición de elementos en la vía de señalización tales como PI3K y/o AKT, podrían dar lugar a la inhibición de la actividad antitumoral o ayudar a la eficacia de otros agentes quimioterapéuticos (Hidalgo y Rowinsky, 2000). Debido a que la transformación por PI3K y AKT es dependiente de la fosforilación y activación de la proteína ribosomal p70s6K y la fosforilación del 4E-BP1 por mTOR (Aoki y cols., 2001), estudiamos el posible papel de mTOR en la proliferación de células de ESFT, y si su inhibición mediante rapamicina afectaba a la proliferación de este tipo de células.

Para estudiar la posible implicación de mTOR en la proliferación de líneas celulares de ESFT, y el uso de la rapamicina como agente antitumoral, primero se analizaron los

niveles de expresión de la proteína total, además de su estado de fosforilación, en las líneas celulares representativas de cada tipo de fusión mencionadas anteriormente. La amplificación con cebadores específicos de los cDNA obtenidos a partir de la retrotranscripción del RNAm extraído de las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573, mostró la expresión de diferentes niveles de RNAm en cada línea celular (Fig. 11A). El análisis mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales específicos para la proteína mTOR y la proteína modificada en el sitio de fosforilación descrito como lugar de activación (ph-mTOR), mostraron la expresión de diferentes niveles de un polipéptido de peso molecular aproximado de 289 kDa en todas las líneas celulares, y la expresión de niveles detectables de su forma activa fosforilada (Fig. 11B). Cabe destacar que los niveles de fosforilación observados (mayores en TC-71, intermedios en SK-ES-1 y menores en A4573) se correlacionaron con su capacidad de proliferación (tiempo de división celular aproximado es 20, 31 y 41h, respectivamente), indicando que mTOR podría participar en el mantenimiento de la proliferación de este tipo de células.

Fig. 11. Estudio de los niveles de expresión de mTOR en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing



Análisis de los niveles de expresión de mTOR mediante RT-PCR (A) y Western blot (B), y su forma fosforilada (ph-mTOR) en líneas celulares de ESFT (1. TC-71; 2. SK-ES-1, 3. A4573). La actina se usó como control de carga.

2.1.3 La rapamicina inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing independientemente del tipo de fusión EWS/FLI-1 que expresen

La rapamicina, considerada como un inhibidor específico de mTOR (Gingras y cols., 2001), y sus análogos solubles inhiben señales requeridas para la progresión del ciclo celular y la proliferación de diferentes líneas celulares derivadas de tumores como cáncer de pulmón de células pequeñas (Seufferlein y Rozengurt, 1996), osteosarcoma (Albers y

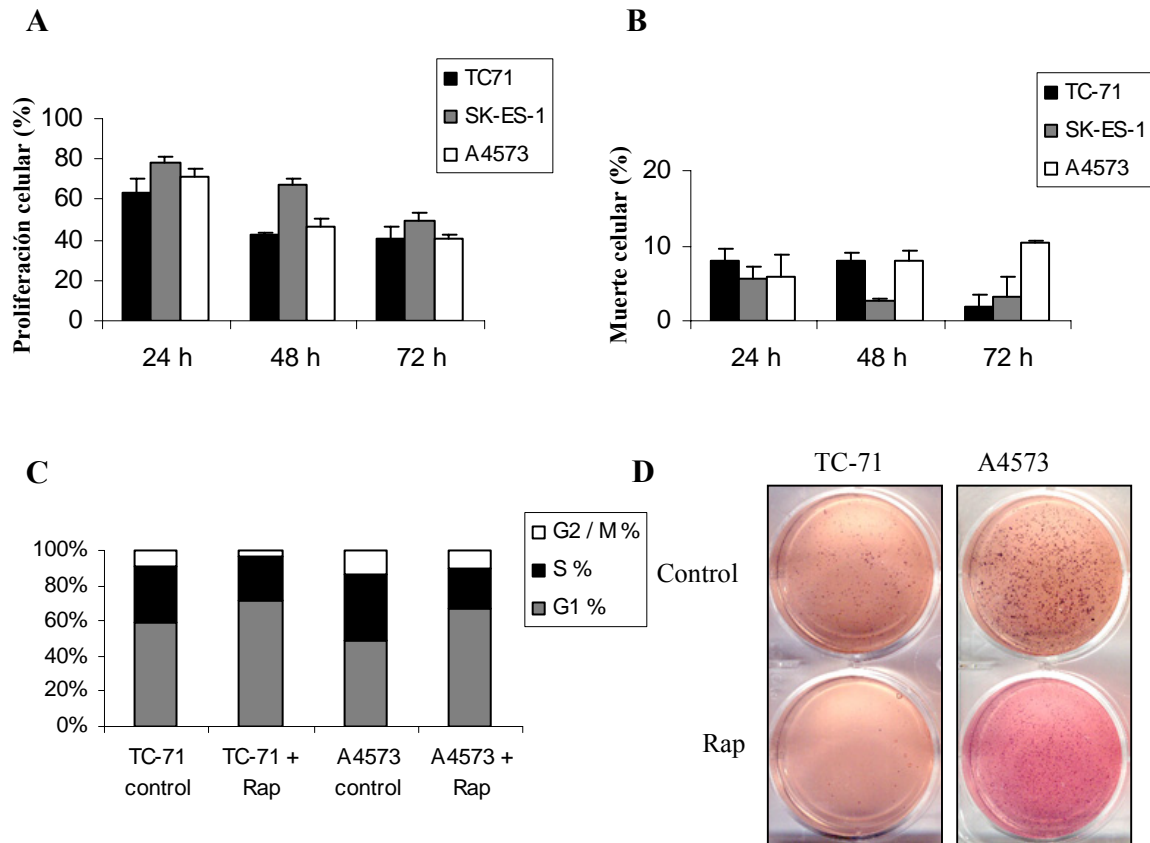
cols., 1993) o rhabdomyosarcoma infantil (Dilling y cols., 1994). En el presente estudio, las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573 fueron tratadas con rapamicina (10 ng/ml) durante diferentes períodos de tiempo (24, 48, 72h). El conteo del número de células viables, mediante el ensayo de exclusión de *trypan blue*, mostró una disminución progresiva de la proliferación celular, en función del tiempo, alcanzando grados de inhibición de aproximadamente un 60 % a las 72 h, respecto a células control no tratadas (Fig. 12A). Esta disminución no fue debida a un incremento en el número de células apoptóticas, pues los conteos no mostraron una variación significativa a lo largo del tratamiento (Fig. 12B). Se ha descrito que el tratamiento con rapamicina de células B de linfoma produce muerte celular programada, incluso a concentraciones mínimas (Muthukkumar y cols., 1995). Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo, coincidiendo con los de un estudio realizado en linfocitos T (Strauss y cols., 2002), muestran que la inducción de apoptosis es mínima, lo que nos condujo a estudiar los efectos de la rapamicina en el ciclo celular.

Los análisis mediante citometría de flujo, tras tratar las líneas celulares TC-71 y A4573 con 10 ng/ml de rapamicina durante 72 h, mostraron una parada en el ciclo celular en fase G₁. Comparando con las células control, las células tratadas con rapamicina mostraron un incremento en el número de células en fase G₁ (aproximadamente un 10-15 %) acompañado por una disminución del número de células en fase S y G₂/M (Fig. 12C). Cabe destacar que la mayor reducción del crecimiento respecto del control no tratado, se detectó en la línea celular (TC-71) la cual expresaba los niveles de fosforilación de la proteína mTOR más elevados, indicando que líneas celulares con niveles altos de fosforilación de esta proteína podrían ser más sensibles a la rapamicina.

Un trabajo reciente (Hermanto y cols., 2001) en células de cáncer de mama, demostró el papel de la vía PI3K/mTOR/p70s6K en el crecimiento independiente del anclaje, fenómeno característico de células tumorales y transformadas relacionado con tumorigénesis *in vivo* (Di Fiore y cols., 1987; Pierce y cols., 1991). De acuerdo con este estudio, se evaluó el efecto del tratamiento con rapamicina en el crecimiento de colonias en medio semisólido (agar semisólido o *soft agar*). Para evaluar el papel de mTOR en el crecimiento celular independiente de anclaje, se hicieron crecer las líneas celulares TC-71

y A4573 en agar semisólido suplementado con 10 ng/ml de rapamicina, durante un período de 14 días.

Fig. 12. La rapamicina inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing independientemente del tipo de fusión EWS/FLI-1 que expresen



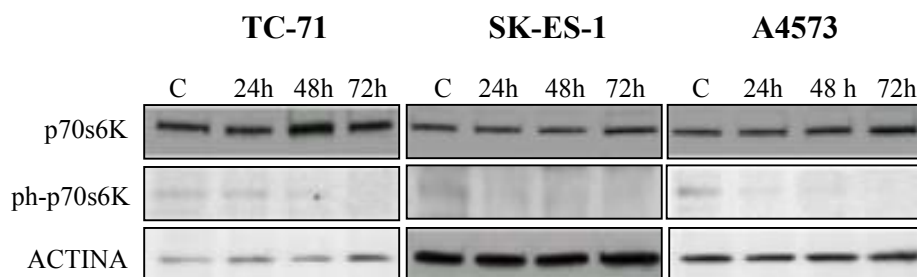
Estudio del efecto del tratamiento con 10 ng/ml de rapamicina durante diferentes periodos de tiempo, en los niveles de proliferación (A) y muerte celular (B) en las líneas celulares de sarcoma de Ewing TC-71, SK-ES-1 y A4573. C: Estudio de los efectos de la rapamicina en ciclo celular mediante citometría de flujo. D: Crecimiento de las líneas celulares TC-71 y A4573 en *soft agar* tratado con 10 ng/ml rapamicina.

Los resultados mostraron una reducción en el número de colonias formadas por ambas líneas celulares, siendo mayor la reducción en TC-71 (79,8%) que en A4573 (36,8%). La reducción del número de colonias también fue acompañada por una disminución en el tamaño de las colonias formadas por ambas líneas celulares (Fig. 12D). Confirmando lo anteriormente comentado, se detectó una correlación entre los niveles de fosforilación de la proteína mTOR y una mayor sensibilidad a la rapamicina.

2.1.4 La rapamicina induce la inhibición de la fosforilación de la proteína quinasa p70s6K

Para confirmar que la acción de la rapamicina en las células de ESFT era dependiente de mTOR, se examinaron los niveles de la proteína quinasa p70s6K, una de las dianas de mTOR, involucrada en el inicio de la traducción y la progresión de la fase G₁/S del ciclo celular (Lane y cols., 1993). Análisis mediante Western blots utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente a la proteína quinasa p70s6K y un anticuerpo monoclonal que reconoce su forma activa fosforilada, mostraron la expresión constitutiva y el estado fosforilado de esta proteína en los controles no tratados de las tres líneas celulares (Fig. 13). El tratamiento con 10 ng/ml de rapamicina durante diferentes períodos de tiempo (24, 48, 72 h) indujo la defosforilación progresiva de la proteína quinasa p70s6K. La forma fosforilada presentaba niveles apenas detectables a las 72h, mientras que los niveles de expresión de la proteína nativa no fueron afectados (Fig. 13).

Fig. 13. Inhibición de los niveles de fosforilación de la proteína quinasa p70s6K



Estudio mediante Western blot de la proteína quinasa p70s6K y de los cambios en su estado de fosforilación (ph-p70s6K) en respuesta al tratamiento con rapamicina. La actina se usó como control de carga.

En varias líneas celulares tumorales, incluyendo células de cáncer de pulmón y páncreas, se ha descrito una activación constitutiva de la vía mTOR/p70s6K (Seufferlein y Rozengurt, 1996; Shah y cols., 2001). En estos casos, la rapamicina inhibió los niveles de fosforilación de la proteína p70s6K resultando en una inhibición de la proliferación celular. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran una defosforilación progresiva de la proteína p70s6K como resultado del tratamiento con

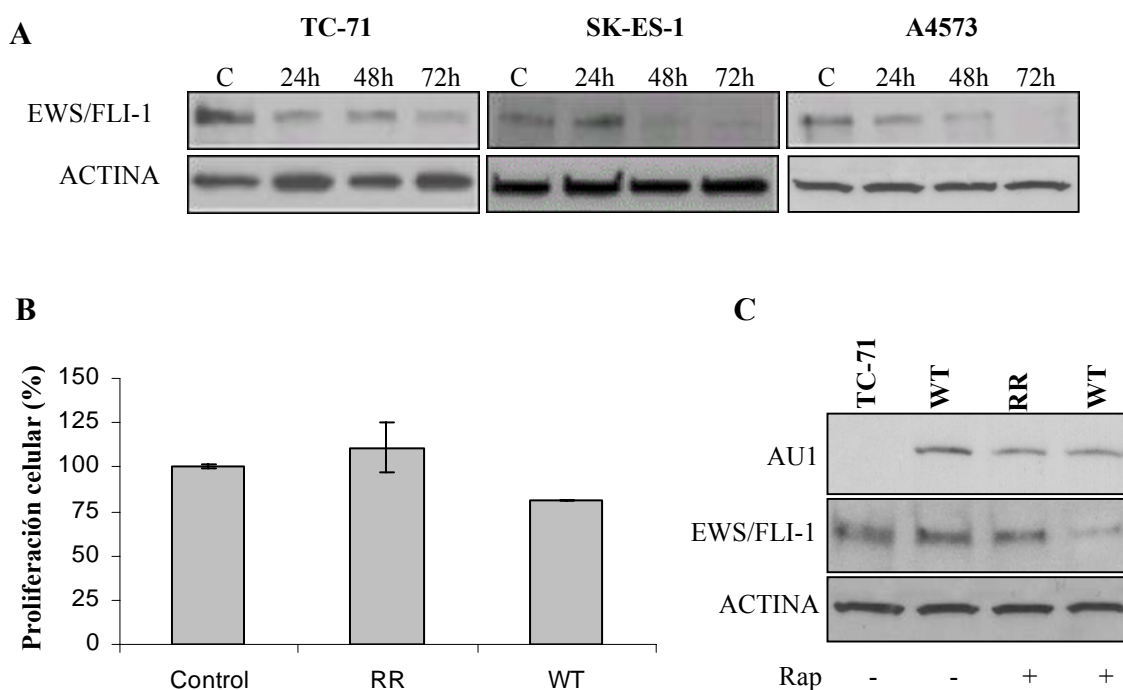
rapamicina, sin afectar a los niveles de expresión de la proteína total, indicando una posible inactivación de esta proteína.

2.1.5 Disminución de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con rapamicina

Estudios recientes sobre el tratamiento con rapamicina en líneas celulares de neuroblastoma (Misawa y cols., 2003) mostraron una inhibición de la proliferación celular, sin afectar al oncogén *N-myc* responsable de este tipo de tumores. Para estudiar el efecto de la rapamicina en los niveles de expresión del oncogén responsable de ESFT, las tres líneas celulares representativas, fueron tratadas con 10 ng/ml de rapamicina durante diferentes períodos de tiempo. Los resultados no mostraron una variación apreciable en los niveles de RNAm (dato no mostrado). Por otro lado, el análisis de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 mostró, como consecuencia del tratamiento, una disminución progresiva en los niveles de expresión respecto de los controles no tratados, llegando a ser prácticamente no detectables mediante Western blot a las 72 h de tratamiento (Fig. 14A). Cabe destacar que, la exposición a la rapamicina resultó en la inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 independientemente del tipo de fusión implicada. El hecho de que no se observaran cambios en los niveles de expresión del RNAm sugirió un mecanismo de regulación a nivel post-transcripcional.

A pesar de que la rapamicina está considerada como un inhibidor específico de mTOR (Gingras y cols., 2001), estudios recientes han sugerido la posibilidad de que esta droga pueda causar también inhibición de la proliferación celular por vías independientes de mTOR en diferentes líneas celulares, incluyendo los de cáncer de próstata (Van der Poel y cols, 2003) y cáncer de pulmón (Visner y cols, 2003). Para demostrar que la acción de la rapamicina en la disminución de la expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, es dependiente de la inhibición de mTOR, la línea celular TC-71 fue transfectada transitoriamente con un vector de expresión de la proteína mTOR normal (*wild-type*) fusionada a un péptido señal AU1 (*AmTOR^{wl}*), o con un vector de expresión de una versión mutante de mTOR resistente a la rapamicina (*AmTOR-SI*) (Abraham, 1998). Las células transfectadas fueron tratadas con 10 ng/ml de rapamicina durante 24 h.

Fig. 14. Disminución de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con rapamicina



A: Estudio de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 mediante Western blot, en las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573 tratadas con rapamicina durante diferentes periodos de tiempo. **B:** Proliferación celular respecto a células control no transfectadas, de células TC-71 transfectadas transitoriamente con el vector control, vector resistente a la rapamicina (RR) y *wild-type* (WT). **C:** Confirmación de la efectividad de la transfección mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-AU1; estudio de la variación en los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 en células transfectadas transitoriamente y tratadas con rapamicina. La actina se usó como control de carga.

La proliferación de las células transfectadas con el mutante mTOR resistente a la rapamicina no fue afectada negativamente por el tratamiento, mientras que en comparación con las células control no tratadas, las células transfectadas con el vector *wild-type* sufrieron una disminución en la proliferación celular de aproximadamente un 20% como consecuencia del tratamiento (Fig. 14B).

La eficacia de la transfección fue confirmada mediante Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra el péptido señal AU1 en todas las células transfectadas, utilizando como control proteína extraída de células TC-71 no transfectadas (Fig. 14C). Los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 fueron analizados mediante Western blot, utilizando el anticuerpo policlonal específico para la proteína FLI-1 mencionado anteriormente. Los resultados no mostraron una disminución significativa de la expresión de EWS/FLI-1 en células transfectadas con el vector resistente a la

rapamicina, mientras que los niveles de EWS/FLI-1 en células transfectadas con el vector *wild-type* sufrieron una disminución marcada, respecto a los niveles en células no transfectadas, o transfectadas con el vector *wild-type* pero no tratadas con rapamicina (Fig. 14C).

El hecho de que el tratamiento con rapamicina no afectara a la proliferación de células transfectadas con un vector mutante resistente a la rapamicina, acompañado de que los niveles de expresión de la proteína EWS/FLI-1 no se vieran alterados, al contrario que en células transfectadas con el vector mTOR *wild-type*, demostró la especificidad de la rapamicina en la disminución de los niveles de la proteína de fusión a través de la vía mTOR/p70s6K.

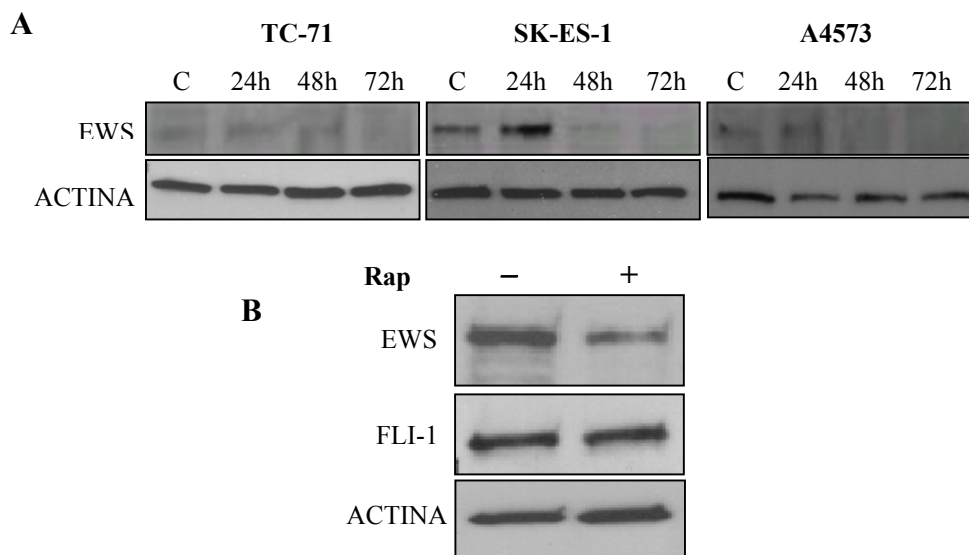
2.1.6 Inhibición de los niveles de expresión de la proteína EWS como consecuencia del tratamiento con rapamicina

Estudios proteómicos recientes sobre el control traduccional específico de la rapamicina en células T (Grolleau y cols., 2002) mostraron que la mayoría de las proteínas que eran totalmente inhibidas por esta droga eran proteínas de unión a RNA. Dado que la proteína EWS fue identificada como una proteína de unión a RNA (Kim y Pelletier, 1999; Arvand y Denny, 2001), estudiamos el efecto de la rapamicina sobre los niveles de expresión de la proteína EWS.

El estudio mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo carboxi-terminal de EWS, mostró una disminución progresiva en los niveles de expresión en las líneas celulares estudiadas, TC-71, SK-ES-1 y A4573, después del tratamiento con 10 ng/ml de rapamicina durante diferentes períodos de tiempo (24, 48, 72 h), siendo prácticamente no detectable a las 72 h después del tratamiento (Fig. 15A). Por otro lado, estudiamos los efectos producidos por la rapamicina en una línea celular que no expresaba la fusión EWS/FLI-1. El estudio mediante Western blot de los cambios producidos en los niveles de expresión de las proteínas EWS y FLI-1 en la línea celular de leucemia JURKAT, tratada con 10 ng/ml de rapamicina durante 72 horas, confirmó la disminución en los niveles de expresión de la proteína EWS como consecuencia del

tratamiento, mientras que los niveles de la proteína FLI-1 se mantenían estables (Fig. 15B).

Fig. 15. Inhibición de los niveles de expresión de la proteína EWS como consecuencia del tratamiento con rapamicina



A: Estudio de los cambios en los niveles de expresión de la proteína EWS mediante Western blot en las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573 tratadas con 10 ng/ml de rapamicina durante diferentes periodos de tiempo. **B:** Estudio de la variación en los niveles de expresión de las proteínas EWS y FLI-1, mediante Western blot, en la línea celular JURKAT tratada con 10 ng/ ml de rapamicina durante 72 h. La actina se usó como control de carga.

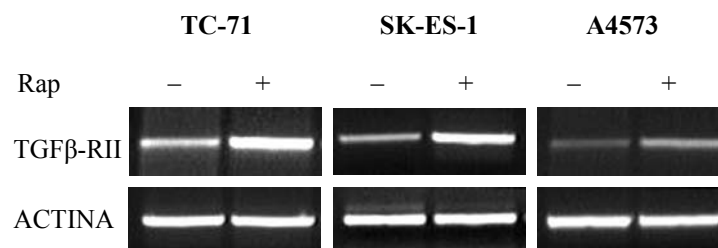
Estos resultados sugirieron que la porción amino-terminal de la proteína EWS en todos los tipos de fusión de la proteína EWS/FLI-1, le confiere susceptibilidad a la rapamicina, siendo esta la razón por la cual los niveles de la proteína EWS/FLI-1 se encuentran reducidos como consecuencia del tratamiento con rapamicina. Sin embargo, ya que la proteína EWS no es indispensable para el crecimiento de tumores de Ewing (Kovar y cols., 2001), es improbable que la disminución de su expresión pudiera estar implicada en la inhibición de la proliferación celular causada por la rapamicina.

2.1.7 La inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 induce la restauración de los niveles del RNAm del receptor tipo II del TGF β

El TGF β RII (receptor II del factor de crecimiento transformante β , TGF β) ha sido descrito como diana directa de la proteína EWS/FLI-1 (Hahm y cols., 1999) y otras

proteínas de fusión EWS/ETS (Im y cols., 2000). La expresión del TGF β RII en líneas celulares del sarcoma de Ewing se encuentra transcripcionalmente inhibida, dando lugar a una menor sensibilidad de estas células al efecto inhibitorio del crecimiento de TGF β y consecuente tumorigénesis. Estudios con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la fusión EWS/FLI-1 mostraron una restauración en los niveles de TGF β RII (Hahm y cols., 1999).

Fig. 16. La inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 induce la restauración de los niveles de RNAm de TGF β -RII



Estudio mediante RT-PCR de la variación en los niveles de expresión del RNAm de TGF β -RII en las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573, tratadas con 10 ng/ml de rapamicina durante 24 h. La actina se usó como control de carga.

De acuerdo con estos datos, en el presente trabajo se observó una restauración de los niveles de expresión del RNAm de TGF β RII tras el tratamiento durante 24 h con 10 ng/ml de rapamicina, en las líneas celulares TC-71, SK-ES-1 y A4573 (Fig. 16), demostrando de esta forma la efectividad de la rapamicina para revertir los efectos transcripcionales causados por la expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, responsable de los sarcomas de Ewing.

Varios autores han demostrado que la inducción de la parada del ciclo celular causada por la rapamicina resulta de la reducción en los niveles de ciclinas (Seufferlein y Rozengurt, 1996; Decker y cols., 2003). Además, se ha propuesto recientemente que inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y otros reguladores de la fase G₁ son dianas de la actividad transcripcional de EWS/FLI-1 (Matsumoto y cols., 2001; Nakatani y cols., 2003). De esta forma, parece que en células del sarcoma de Ewing la disminución de la expresión de EWS/FLI-1 podría ser un factor importante en la parada del ciclo celular en fase G₁. Esta interpretación está de acuerdo con la observación previa de que la inhibición

de la expresión de la proteína de fusión mediante oligonucleótidos antisentido específicos induce parada del ciclo celular en G₁ (Matsumoto y cols., 2001). El hecho de que en líneas celulares del sarcoma de Ewing se hayan detectado anomalías en reguladores del *checkpoint* de G₁ (Dennen y Denny, 2001) podría contribuir al incremento de la sensibilidad a la rapamicina.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la vía de mTOR juega un papel esencial en la proliferación de líneas celulares de sarcoma de Ewing, y sugieren la utilización de la rapamicina como agente citostático en el tratamiento de este tipo de tumores, independientemente del tipo de fusión implicado. Además, la rapamicina puede ser utilizada como una herramienta útil en la identificación de nuevas dianas moleculares de las proteínas de fusión EWS/FLI-1. Por último, ya que EWS y otros miembros de su familia participan en otras translocaciones cromosómicas implicadas en el origen de diferentes tipos de tumores, incluyendo tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas (Rausher y cols. 1994) o melanoma maligno de partes blandas (Zucman y cols. 1993), la rapamicina podría ser también un tratamiento útil para estos tipos de enfermedades neoplásicas.

2.2 La inhibición simultánea de EWS/FLI-1 a nivel transcripcional y post-transcripcional induce apoptosis en células del sarcoma de Ewing *in vitro* y prolonga la inhibición del crecimiento de tumores *in vivo*

A pesar del progreso de los últimos años en el tratamiento de ESFT mediante el uso de combinaciones de quimioterapia, radioterapia y cirugía, un porcentaje elevado de pacientes muere debido a la progresión de la enfermedad. Debido a que la proteína de fusión EWS/FLI-1 juega un papel muy importante en la patogénesis de ESFT (Uren y Toretsky, 2005), su inactivación parece ser una estrategia atractiva para el tratamiento de este tipo de tumores, no sólo por su papel en la tumorigénesis, sino también debido a su especificidad, ya que sólo aparece en células transformadas. En este estudio, se demostró la eficacia de un tratamiento que simultáneamente inhibió los niveles de expresión de EWS/FLI a nivel transcripcional y post-transcripcional, mediante la combinación de oligonucleótidos antisentido (AS-ODN) y la rapamicina, resultando en un incremento en la apoptosis de células de ESFT *in vitro* y en una marcada inhibición del crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos *in vivo*.

2.2.1 Inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con diferentes oligonucleótidos antisentido

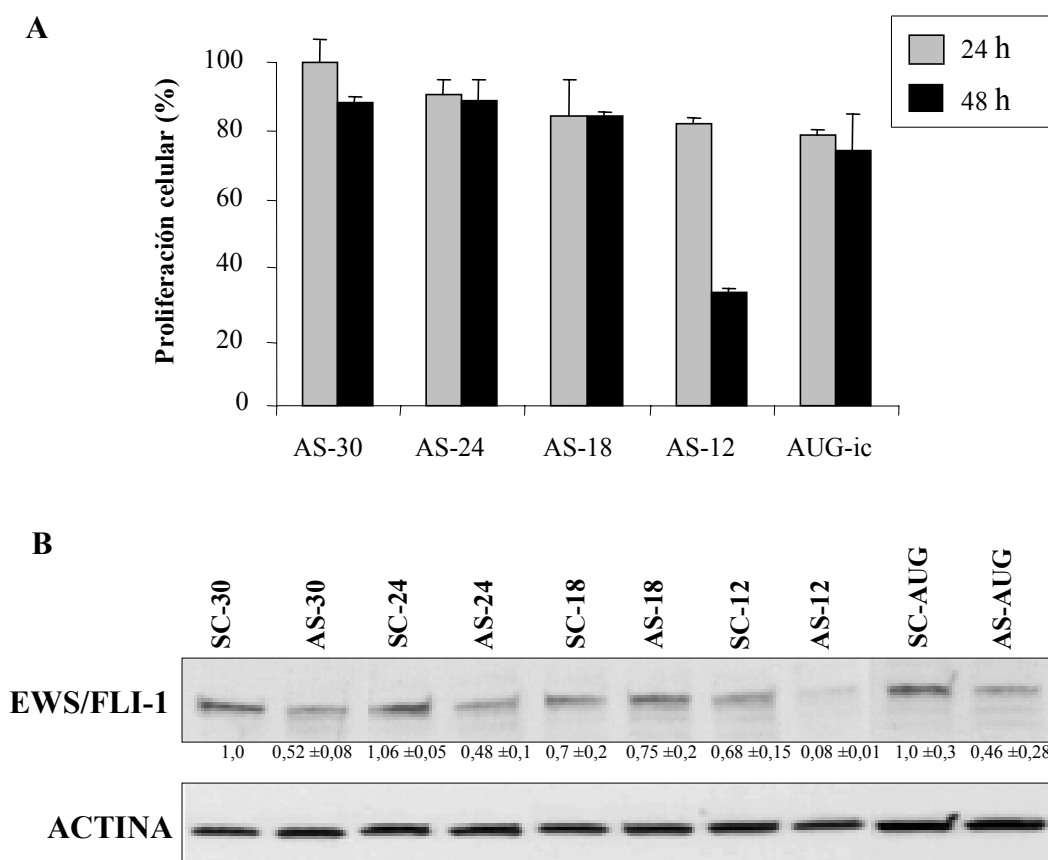
La inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 mediante el uso de oligonucleótidos antisentido o RNA de interferencia ha sido descrita por diferentes grupos (Ouchida y cols., 1995; Tanaka y cols., 1997; Toretsky y cols., 1997; Matsumoto y cols., 2001; Dohjima y cols., 2003; Kovar y cols., 2003; Chansky y cols., 2004; Maksimenko y Malvy, 2005). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en estos estudios presentaban una longitud variable de 15 a 25 nucleótidos y estaban dirigidas contra la zona de fusión de los genes *EWS* y *FLI-1* o contra la zona que contiene el codón de iniciación de la traducción AUG. En el presente estudio, con objeto de seleccionar el oligonucleótido más efectivo en la inhibición de los niveles de EWS/FLI-1, se diseñó un panel de cuatro oligonucleótidos de longitud variable (12 a 30 oligonucleótidos) dirigidos contra la zona de fusión EWS/FLI-1 tipo 3 y otro dirigido contra el codón de iniciación de la traducción (AS-AUG). Como control se utilizaron secuencias de la misma longitud y composición de bases, pero con los nucleótidos ordenados al azar o *scrambled* (SC) (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este estudio

		← EWS FLI-1 →			
Tipo 1	5'	GCAGCTACGGGCAGCAGA	ACCCTTCTTATGACTCAGTC		3'
Tipo 3	5'	GACCAGATCTTGATCTAG	ACCCTTCTTATGACTCAGTC		3'
AS-12	3'	TAGATC	TGGGAA		5'
SC-12	3'	ggatgt	agcaat		5'
AS-18	3'	AACTAGATC	TGGGAAGAA		5'
SC-18	3'	gcaggatgt	agcaatgta		5'
AS-24	3'	TAGAACTAGATC	TGGGAAGAATAC		5'
SC-24	3'	gatgcaggatgt	agcaatgtacag		5'
AS-30	3'	GTCTAGAACTAGATC	TGGGAAGAATACTGA		5'
SC-30	3'	acagatgcaggatgt	agcaatgtacagtag		5'
AS-AUG	5'	ATCCGTGGACGCCATTTTCTCTCCT			3'
SC-AUG	5'	gttatctattctccgaccgctcgtcc			3'

La línea celular A4573 del sarcoma de Ewing fue tratada con 10 μ M de AS-ODN durante 48 h. El conteo del número de células viables, mediante el ensayo de exclusión de *trypan blue*, mostró que el AS-ODN más efectivo inhibiendo la proliferación celular era el 12-mer AS-ODN (AS-12) (Fig. 17A), alcanzando un grado de inhibición de aproximadamente un 83 %, respecto del control tratado con el oligonucleótido *scrambled* correspondiente (SC-12). De acuerdo con esto, el análisis mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal específico para la proteína FLI-1, mostró que el AS-12 también era el más efectivo inhibiendo los niveles de expresión de la proteína fusión EWS/FLI-1 (Fig. 17B). La mayoría de las secuencias descritas en la literatura dirigidas contra el punto de fusión fueron de longitudes entre 15 y 25 nucleótidos de longitud. En este estudio, de acuerdo con otras publicaciones que demuestran que secuencias de oligonucleótidos más cortas, incluso heptanucleótidos, son más potentes y específicos para bloquear la expresión génica (Wagner y cols, 1996; Woolf, 1996; Flanagan y cols., 1999), un AS-12 dirigido contra la zona de fusión del tipo 3 de EWS/FLI-1 resultó ser el más efectivo en la inhibición tanto de la proliferación celular como en los niveles de expresión del oncogén responsable de este tipo de tumores.

Fig. 17. Inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 como consecuencia del tratamiento con diferentes OAS



A: Inhibición de la proliferación de células A4573 como consecuencia del tratamiento con 10 μ M de AS-ODN's de diferentes longitudes, durante 24 y 48 h, respecto a la proliferación de las células tratadas con la secuencia *scrambled*. **B:** Estudio de los cambios en los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 mediante Western blot. La actina se usó como control de carga. Los valores numéricos corresponden a las determinaciones densitométricas de la intensidad de la señal de 3 experimentos independientes, representado como valor medio \pm desviación estándar.

2.2.2 El tratamiento simultáneo con rapamicina y AS-12 induce un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de células del sarcoma de Ewing

Con el objetivo de conseguir el máximo efecto sobre la inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1, el AS-12 fue seleccionado para el tratamiento simultáneo con la rapamicina. Para ello, la línea celular A4573 fue tratada con rapamicina (10 ng/ml), AS-12 (10 μ M) o la combinación de ambos y los efectos en la proliferación celular fueron determinados a las 48 h después del tratamiento. Los resultados mostraron que, en comparación con controles tratados con SC-12, el tratamiento con rapamicina o AS-12

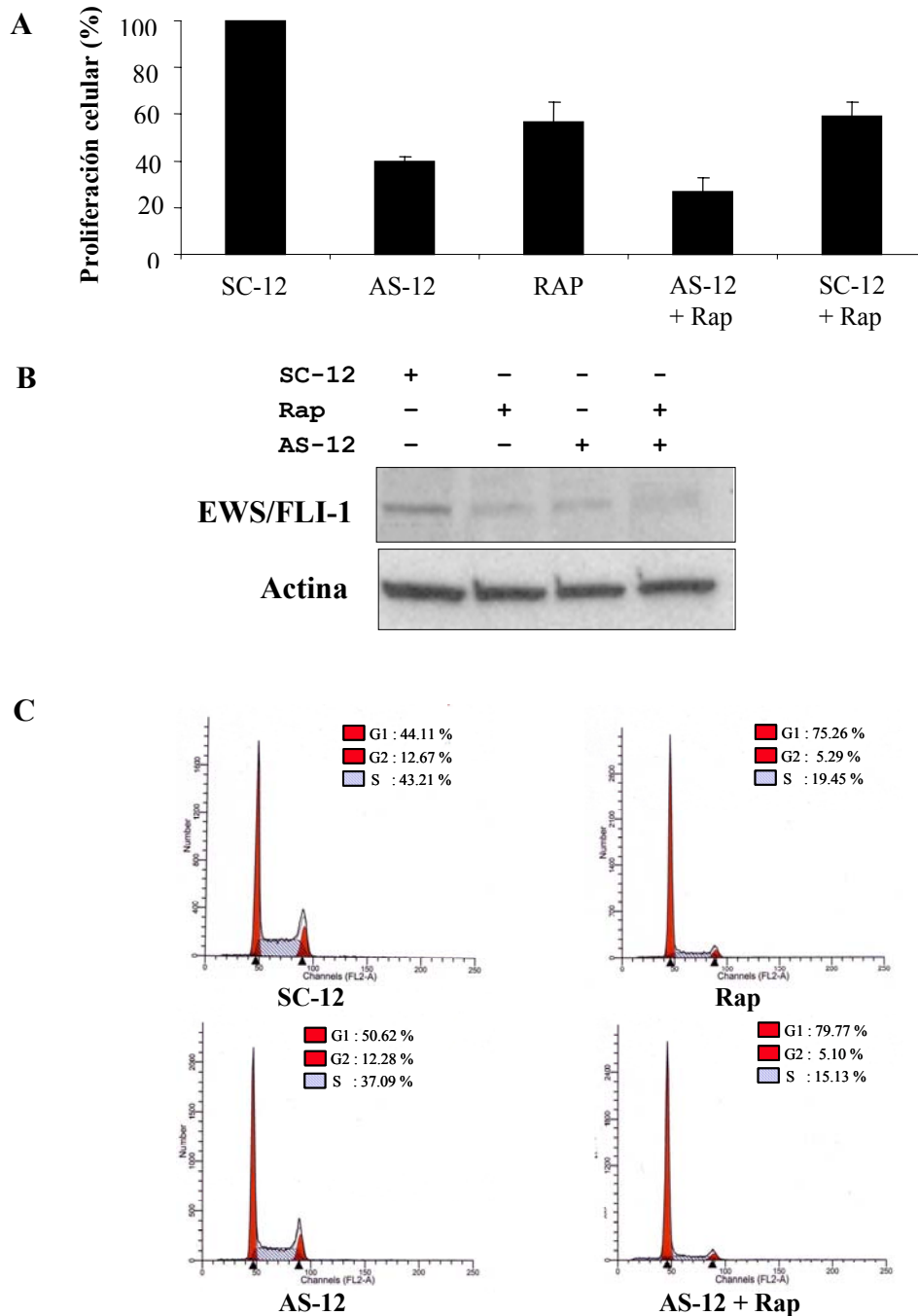
provocaron una reducción en la proliferación celular de aproximadamente un 40 % y 60 %, respectivamente. Los efectos de la combinación SC-12 y rapamicina en éste y otros experimentos fueron esencialmente idénticos a los resultados obtenidos con la rapamicina sólo, indicando que el SC-12 no modificó la respuesta celular a la rapamicina. Por el contrario, la combinación AS-12 y rapamicina disminuyó la proliferación celular alrededor de un 80 % (Fig. 18A).

Esta inhibición se correlacionó con la inhibición en los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, analizados mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la proteína FLI-1, siendo prácticamente abolidos a las 48 h después del tratamiento combinado con AS-12 y rapamicina (Fig. 18B).

Estudios previos mostraron que el producto de la fusión EWS/FLI-1 está involucrado en la progresión del ciclo celular, especialmente en la transición G₁-S del ciclo celular (Tanaka y cols., 1997) y el uso de oligonucleótidos antisentido contra EWS/FLI-1 provocaba una parada del ciclo celular en fase G₀-G₁ (Matsumoto y cols., 2001). Nosotros reportamos previamente que el tratamiento con rapamicina en líneas celulares de ESFT provocaba una inhibición en la proliferación celular debido a la inducción de parada en fase G₁ del ciclo celular (mirar apartado 2.1.3).

Consecuentemente estudiamos si el efecto producido por el AS-12 en la proliferación celular era debido a una parada en el ciclo celular y si la combinación provocaba un efecto más pronunciado. El análisis mediante citometría de flujo, tras tratar las células con 10 ng/ml de rapamicina, 10 µM de AS-12 o la combinación de ambos durante 48 h, mostró un mínimo efecto causado por el tratamiento con AS-12 solo (aproximadamente un 5 % de parada en G₁), mientras que la rapamicina inducía un efecto mucho más marcado (30 %). El tratamiento combinado indujo un efecto aditivo, aproximadamente un 35 % de parada en G₁ (Fig. 18C).

Fig. 18. El tratamiento simultáneo con rapamicina y AS-12 induce un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de células de sarcoma de Ewing

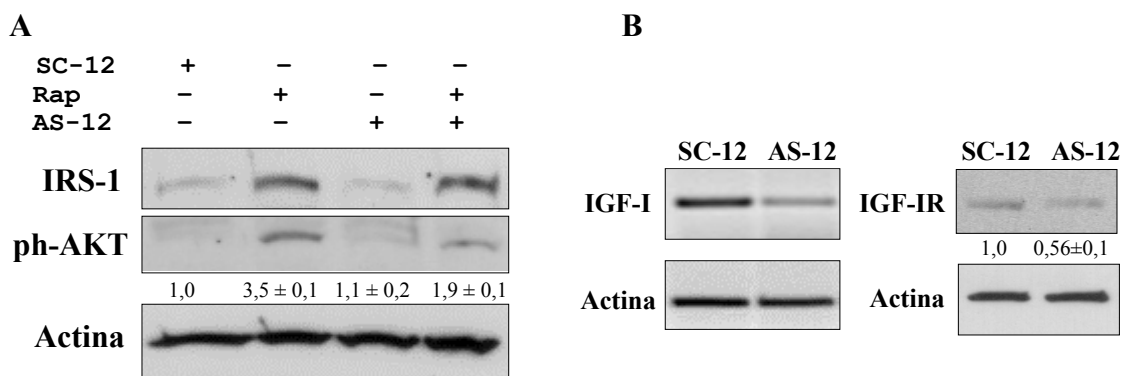


A: Inhibición de la proliferación celular en células A4573 tratadas con rapamicina, AS-12 o la combinación de ambos, respecto a las células control tratadas con SC-12 o la combinación con rapamicina. **B:** Los niveles de la proteína de fusión EWS/FLI-1 procedentes de células sometidas al mismo tratamiento fueron analizados mediante Western blot. La actina se usó como control de carga. **C:** Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo.

2.2.3 La rapamicina induce un incremento en los niveles de expresión de la proteína IRS-1 y en los niveles de fosforilación de AKT

Publicaciones recientes han descrito que la rapamicina y sus derivados, a través de la inhibición de mTOR, activan la vía de señalización de IGF-I mediante el incremento de los niveles de IRS-1 y fosforilación de AKT, atenuando de forma paradójica su efecto antitumoral (Shi y cols., 2005; O'Reilly y cols., 2006). Debido a que en ESFT la vía de señalización IGF-I/IGF-IR es determinante para el fenotipo neoplásico de este tipo de tumores (Toretzky y cols., 1997; Strammiello y cols., 2003), examinamos si la actividad antiproliferativa debida al tratamiento con AS-12 y rapamicina podría estar limitada por este efecto. Para ello, mediante Western blot, se analizaron los niveles de expresión de la proteína IRS-1 y los niveles de fosforilación de la proteína AKT (ph-AKT). Los resultados mostraron un incremento en los niveles de expresión de IRS-1, así como en los niveles de fosforilación de AKT (aproximadamente 3,5 veces) debido a la acción de la rapamicina. Sin embargo, aunque el tratamiento combinado inducía también un incremento en los niveles de IRS, los efectos sobre la fosforilación de AKT fueron mucho menores, indicando que el tratamiento con AS-12 previene el efecto de la rapamicina sobre el estado de fosforilación de AKT (Fig. 19A).

Fig. 19. La rapamicina provocó un incremento en los niveles de expresión de la proteína IRS-1 y en los niveles de fosforilación de AKT



A: Estudio de los cambios en los niveles de expresión de la proteína IRS-I y en la fosforilación de AKT mediante Western blot, en la línea celular A4573, tras el tratamiento con rapamicina, AS-12 o la combinación de ambos. **B:** Estudio del efecto del tratamiento con AS-12 respecto al SC-12 en los niveles de expresión de RNAm de IGF-I, mediante RT-PCR, y en los de su receptor IGF-IR mediante Western Blot. La actina se usó como control de carga. Los valores numéricos corresponden a las determinaciones densitométricas de la intensidad de la señal de 3 experimentos independientes, representado como valor medio ± desviación estandar.

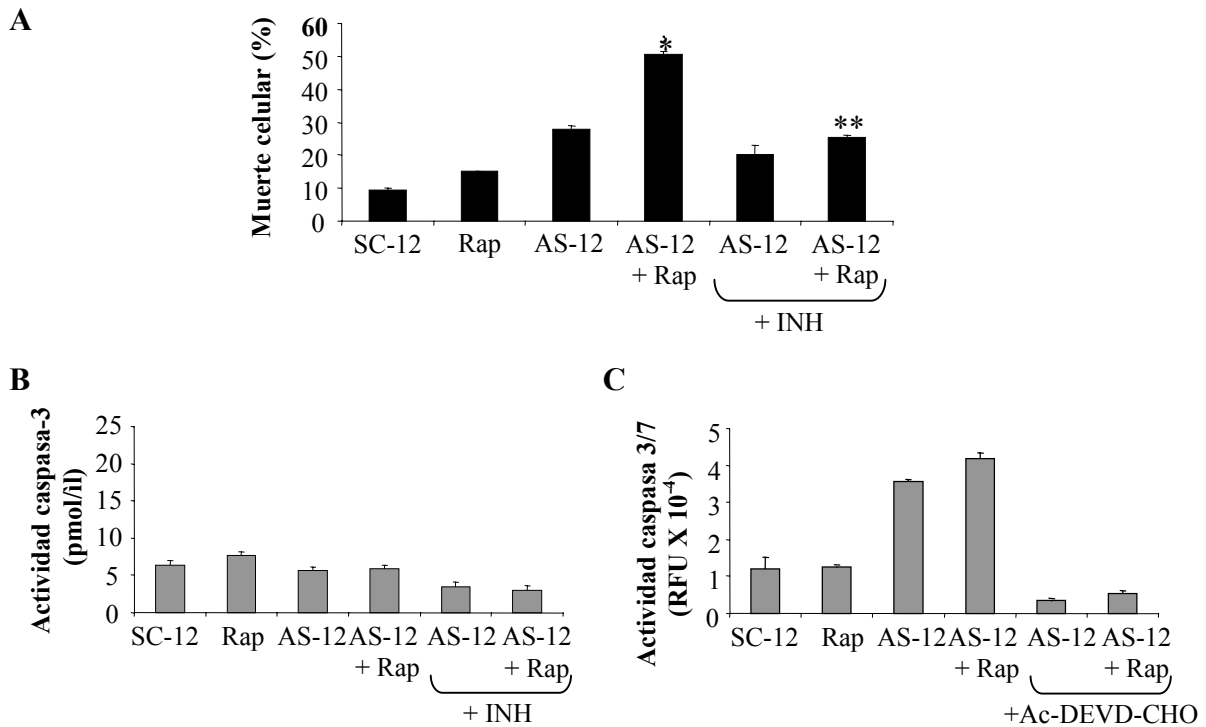
Este efecto podría ser debido a que la regulación negativa que ejerce el tratamiento con AS-12 sobre los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, resultó simultáneamente en una inhibición de los niveles de expresión de IGF-I y de su receptor IGF-IR, favoreciendo de esta forma la actividad antiproliferativa de la rapamicina (Fig. 19B).

2.2.4 El tratamiento con AS-12 induce apoptosis en células del sarcoma de Ewing

Puesto que el efecto que provocaba el tratamiento con AS-12 en la proliferación celular no era debido a una parada en el ciclo celular, y además ha sido descrito que la inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido induce apoptosis en líneas celulares de ESFT (Maksimenko y Malvy, 2005), estudiamos si el tratamiento con AS-12 en la línea celular A4573 inducía muerte celular. Mediante el ensayo de exclusión de *Trypan blue*, se observó que el efecto sobre los niveles de muerte celular del tratamiento con AS-12 durante 48h, era aproximadamente un incremento del 25-30 % respecto al control no tratado o tratado con SC-12 (Fig. 20A). Resultó interesante el hecho de que los niveles de muerte celular se incrementaran hasta el 50 % cuando la rapamicina se combinó con el AS-12. La inducción de la muerte celular fue parcialmente inhibida utilizando un inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (INH, Fig. 20A,B), aunque no se observaron cambios en la actividad de la caspasa-3 como consecuencia de los tratamientos con AS-12, rapamicina o la combinación de ambos (Fig. 20B).

Sin embargo, el uso de un ensayo específico para estudiar la actividad de las caspasas-3/7, *Apo-ONE homogeneous Caspase-3/7 assays*, mostró un marcado incremento en la actividad de estas caspasas tanto en el tratamiento con AS-12 solo, como en la combinación con la rapamicina (Fig. 20C). Esta actividad fue inhibida por el inhibidor específico de las caspasas-3/7 (Ac-DEVD-CHO), sugiriendo que el efecto apoptótico observado, tras el tratamiento con AS-12, era dependiente de la activación de la caspasa-7.

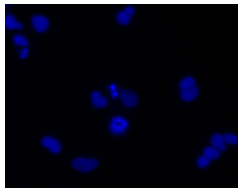

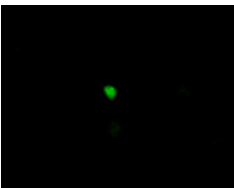
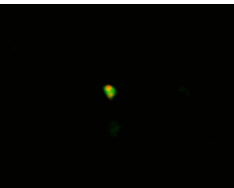
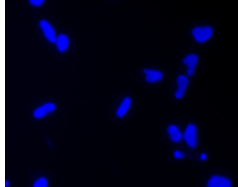

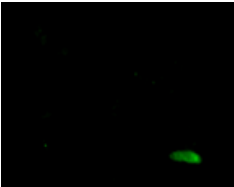
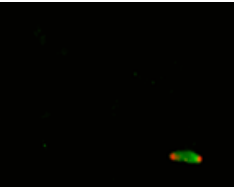
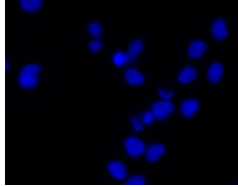
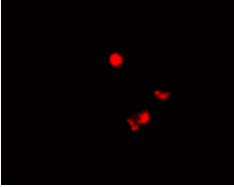
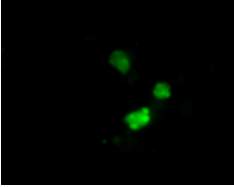
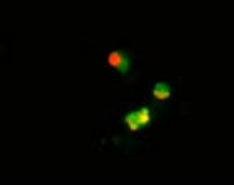
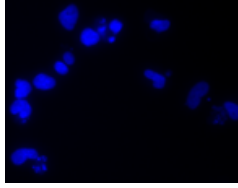
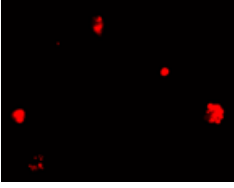
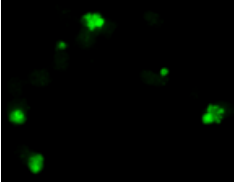
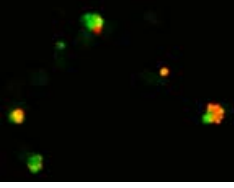
Fig. 20. El tratamiento con AS-12 induce apoptosis en la línea celular de sarcoma de Ewing A4573



A: Representación gráfica de los niveles de muerte celular determinados mediante ensayos de exclusión de *Trypan blue* en células A4573 tratadas con las diferentes drogas durante 48h, utilizando un inhibidor general de caspasas (INH) para inhibir la apoptosis (*P=0,015; **P=0,001). **B:** Estudio de la actividad de la caspasa-3 inducida por los diferentes tratamientos. **C:** Estudio de la actividad de las caspasas-3/7 en células tratadas de la misma manera (RFU: unidades relativas de fluorescencia).

Además, la detección *in situ* de células apoptóticas mediante ensayo de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling*) en células A4573 sometidas a los diferentes tratamientos durante 16 h y ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma activa de la caspasa-7, confirmó que tanto el tratamiento con AS-12 solo como combinado con rapamicina, inducía apoptosis dependiente de caspasa-7 (Fig. 21).

Fig. 21. El tratamiento con AS-12 induce apoptosis en la línea celular de sarcoma de Ewing A4573 dependiente de caspasa-7

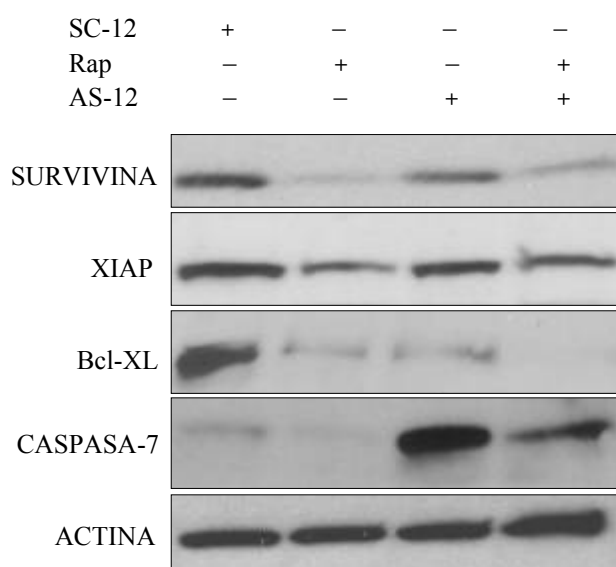
	DAPI	TUNEL	CASPASA-7	MERGE	CELULAS POSITIVAS EN TUNEL (%)
SC-12					0,7 ± 0,6
Rap					2,6 ± 1,8
AS-12					12,6 ± 0,3
AS-12 +Rap					16,7 ± 6,0

Detección de la muerte celular *in situ* mediante ensayo de TUNEL (rojo). Estudio mediante inmunofluorescencia (verde) de la expresión de la caspasa-7 activa. La morfología nuclear fue observada mediante DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (azul). La superposición de la señal roja y verde indica que la degradación parcial de la caspasa-7 ocurrió durante el proceso apoptótico. Los valores de la columna a la derecha de la imagen indican el porcentaje de células positivas en TUNEL, expresados como la media de tres experimentos independientes ± desviación estandard.

Para tratar de determinar el mecanismo por el cual el tratamiento con AS-12 solo o combinado con la rapamicina inducía apoptosis en células de ESFT, estudiamos posibles cambios en los niveles de expresión de diversas proteínas implicadas en mecanismos de apoptosis. Para el estudio mediante Western blot se utilizaron anticuerpos específicos contra diferentes proteínas involucradas en las vías de señalización de apoptosis, tales como la Survivina y la XIAP, pertenecientes a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), la proteína Bcl-xL, y la forma activa de la caspasa-7.

Los resultados mostraron que aunque el tratamiento con rapamicina sola inducía una regulación negativa de los niveles de expresión de Survivina, XIAP y Bcl-xL, no resultó en un incremento marcado en los niveles de fragmentación de la caspasa-7 (Fig. 22). El tratamiento con AS-12 provocó un aumento importante de los niveles de fragmentación de la caspasa-7 junto con una regulación negativa significativa de los niveles de expresión de Bcl-xL. Cuando el AS-12 fue combinado con la rapamicina, la expresión de proteínas de supervivencia, particularmente Bcl-xL, sufrieron una inhibición de los niveles de expresión. Resulta interesante que, a pesar de que los efectos apoptóticos observados en el tratamiento combinado eran mayores que los observados en el tratamiento con AS-12 solo, los niveles de fragmentación de caspasa-7 fueron menores que en el tratamiento con AS-12 (Fig. 22).

Fig. 22. Estudio de los cambios de niveles de expresión de proteínas relacionadas con apoptosis en células de ESFT tratadas con rapamicina, AS-12 o la combinación de ambos



Estudio mediante Western blot del efecto del tratamiento con rapamicina, AS-12 o la combinación de ambos en los niveles de expresión de diferentes proteínas involucradas en procesos apoptóticos, Survivina, XIAP, Bcl-xL y la forma parcialmente degradada de la caspasa-7. La actina se usó como control de carga

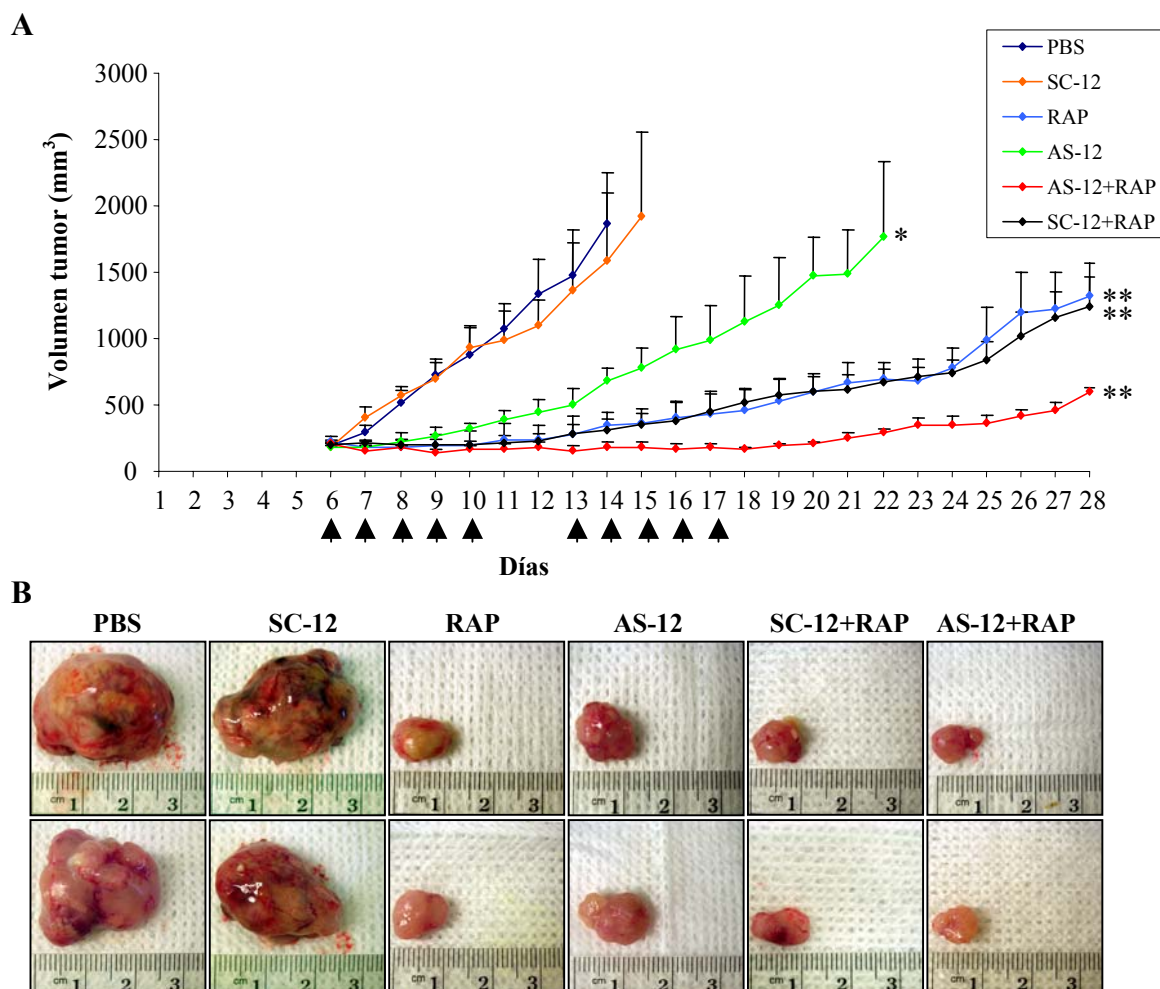
Esto podría ser explicado por un efecto diferencial del AS-12 solo o en combinación con la rapamicina en los niveles de expresión de XIAP y Survivina, que han sido identificados como potentes inhibidores de caspasa-3 y caspasa-7 (Schimmer, 2004). Mientras que

XIAP inhibe la actividad de las caspasas-3 y -7 a través de interacciones directas, el mecanismo por el cual la survivina inhibe las caspasas está todavía por determinar (Schimmer, 2004). En nuestro estudio, aunque tanto el AS-12 solo como la combinación del AS-12 con la rapamicina, provocaron una regulación negativa de los niveles de expresión de Survivina y XIAP, los efectos fueron mayores cuando se usaron conjuntamente. Los niveles de expresión mayores de XIAP y Survivina en células tratadas con AS-12, en comparación con los de las células tratadas con la combinación, podrían resultar en una inhibición más eficiente de las formas activas de la caspasa-7.

2.2.5 El tratamiento combinado induce una inhibición prolongada del crecimiento de tumores *in vivo* que se corresponde con la inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 y de fosforilación de la proteína quinasa p70s6K

La inhibición específica de la expresión de EWS/FLI-1 en tumores de ESFT en ratones inmunodeprimidos ha sido relacionada con la inhibición del crecimiento tumoral (Lambert y cols., 2000; Hu-Lieskovan y cols., 2005a). En este estudio, para evaluar los efectos del tratamiento *in vivo* con rapamicina, AS-12 o la combinación de ambos, establecimos un modelo de tumor en ratones inmunodeprimidos, mediante la inyección subcutánea de células A4573 resuspendidas en matrigel. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 200 mm³, los animales fueron agrupados al azar en 6 grupos, y se iniciaron los tratamientos durante dos series de 5 días, con dos días de descanso entre ambas series. El crecimiento del tumor fue seguido por un período de varias semanas y el volumen fue cuantificado mediante la fórmula Volumen tumor = largo (mm) x ancho² (mm²) (Carlsson y cols., 1983). Los resultados mostraron que no existían diferencias apreciables en el crecimiento tumoral entre los grupos control, es decir, aquellos animales tratados con SC-12 (5 mg/kg/día) o con vehículo control (PBS). Sin embargo, en el momento en que los animales control tuvieron que ser sacrificados siguiendo la normativa institucional del uso y cuidado de animales referente al máximo volumen tumoral permisible (día 14-15), los tumores tratados con AS-12 (5 mg/kg/día, intratumoral), rapamicina (1,5 mg/kg/día, intraperitoneal) y las combinaciones SC-12 con rapamicina y AS-12 con rapamicina ya sufrían un retraso importante en el desarrollo (Fig. 23A-B).

Fig. 23. El tratamiento combinado induce una inhibición prolongada del crecimiento de tumores in vivo.

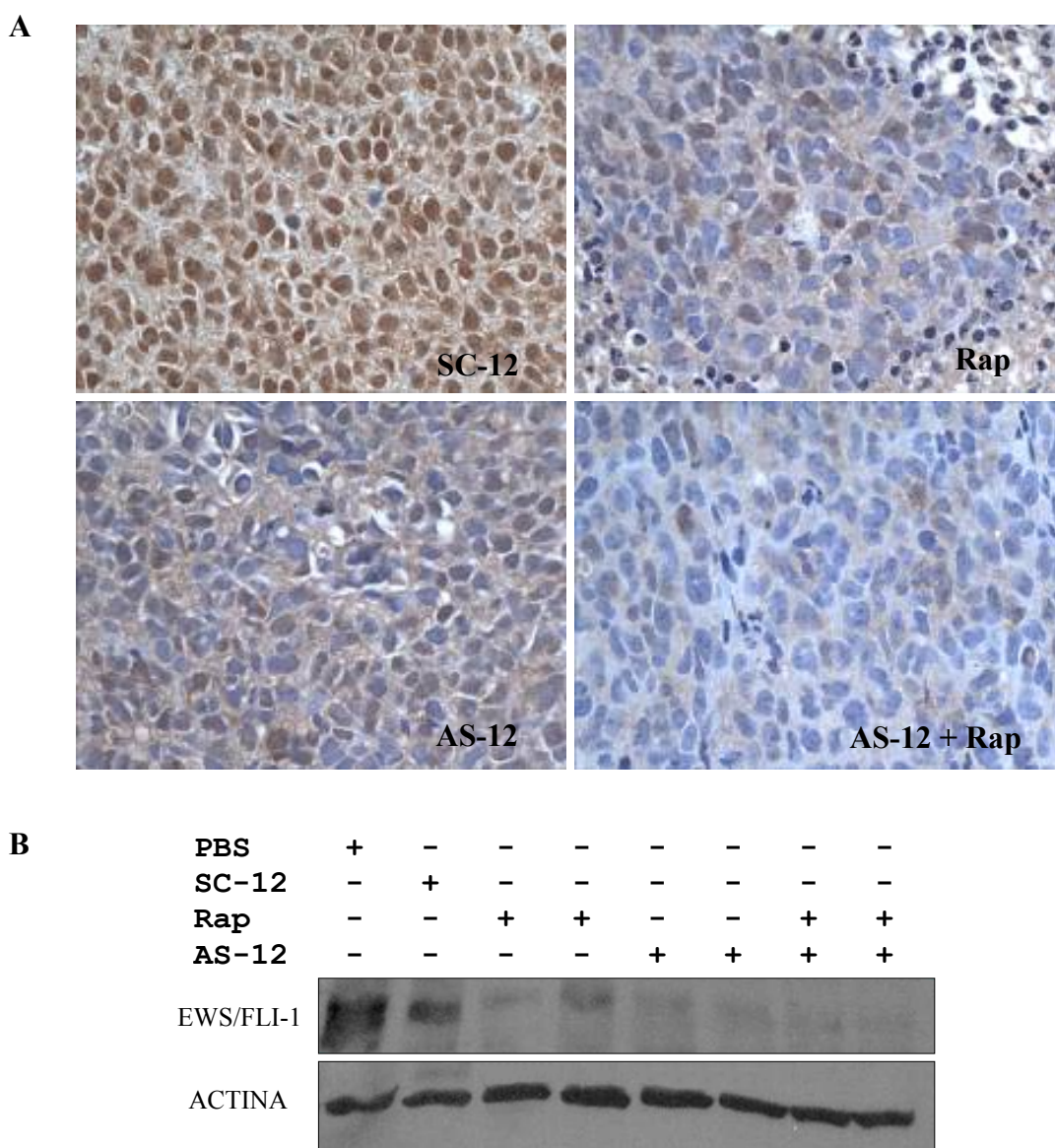


A: Representación gráfica del desarrollo de los tumores en ratones inmunodeprimidos (* $P=0,001$, ** $P=0,0001$, la diferencia observada fue estadísticamente significativa). Las flechas negras indican el régimen de inyecciones. **B:** Tumores aislados en el momento de la eutanasia (día 15).

Después de la segunda serie de tratamientos, la rapamicina resultó ser más efectiva en la inhibición del crecimiento de los tumores, comparando con el efecto producido por el AS-12 solo. No se observaron cambios significativos en el crecimiento de tumores tratados con rapamicina sola, o combinada con SC-12, mientras que la combinación de rapamicina y AS-12 resultó en una mayor inhibición del crecimiento de tumores, comparando con el efecto producido por la rapamicina sola (Fig. 23A).

Para relacionar los efectos antitumorales de estos tratamientos con los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, examinamos la expresión de esta proteína en tumores procedentes de animales control y animales tratados (día 12). El análisis mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la proteína FLI-1, en tumores procedentes de animales control mostró expresión de EWS/FLI-1 bien marcada y localización en el núcleo (Fig. 24A).

Fig. 24. La inhibición prolongada del crecimiento de tumores in vivo está relacionada con la inhibición de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1



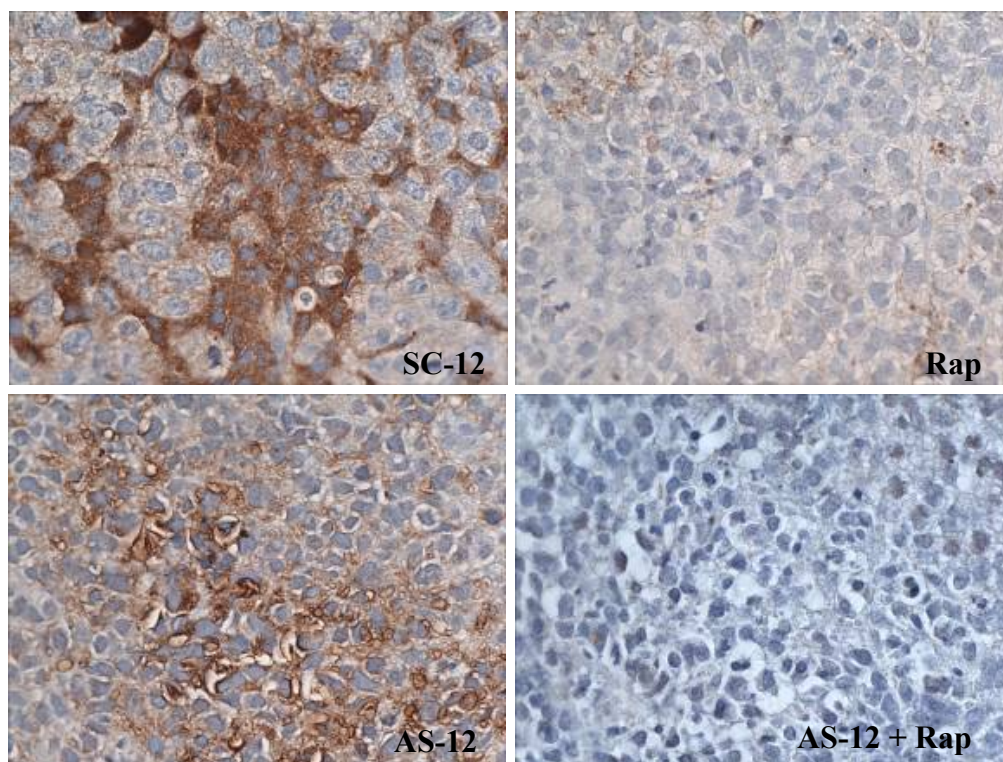
Estudio de la inhibición de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 como consecuencia de los diferentes tratamientos indicados mediante (A) inmunohistoquímica y (B) Western blot. La actina se usó como control de carga.

En tumores procedentes de animales tratados con AS-12 o rapamicina, se observó una inhibición de la expresión, siendo prácticamente no detectable en tumores procedentes de ratones tratados con AS-12 y rapamicina (Fig. 24A) El análisis mediante Western blot, utilizando el mismo anticuerpo que reconoce la proteína FLI-1, confirmó los resultados obtenidos por inmunohistoquímica (Fig. 24B).

Estudios previos han mostrado que la inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 mediante OAS o siRNA en ratones inmunodeprimidos se correlaciona con una inhibición del crecimiento de los tumores (Lambert y cols., 2000; Hu-Lieskovan y cols., 2005a). Sin embargo, el sistema de suministro para los tratamientos antisentido o siRNA todavía necesita mejorarse. Es importante remarcar que en el presente estudio los tratamientos se llevaron a cabo con un AS-12 sin ningún sistema de suministro y con una dosis de rapamicina baja (1,5 mg/kg/d), resultando, sin embargo, en un retraso del crecimiento del tumor y que su combinación resultó en una marcada inhibición del crecimiento del tumor.

Para validar la inhibición de la vía de señalización de mTOR por acción de la rapamicina, estudiamos los niveles de fosforilación de una de sus dianas, p70s6K. Tal y como se explicó en el apartado anterior, cuando mTOR es activo, la proteína p70s6K está fosforilada, dando lugar a la síntesis de proteínas ribosomales. La inhibición de esta vía resulta en la defosforilación de p70s6K e inhibe el proceso. De acuerdo con esto, los ensayos inmunohistoquímicos realizados mediante un anticuerpo monoclonal que reconoce la forma activa fosforilada de la proteína quinasa p70s6K, en muestras procedentes de ratones tratados con rapamicina, mostraron una disminución en los niveles de fosforilación de p70s6K. Además, los resultados mostraron una cooperación entre el AS-12 y la rapamicina para inhibir completamente los niveles de fosforilación de esta proteína (Fig. 25).

Fig. 25. La rapamicina induce una inhibición de los niveles de fosforilación de la proteína quinasa p70s6K *in vivo*

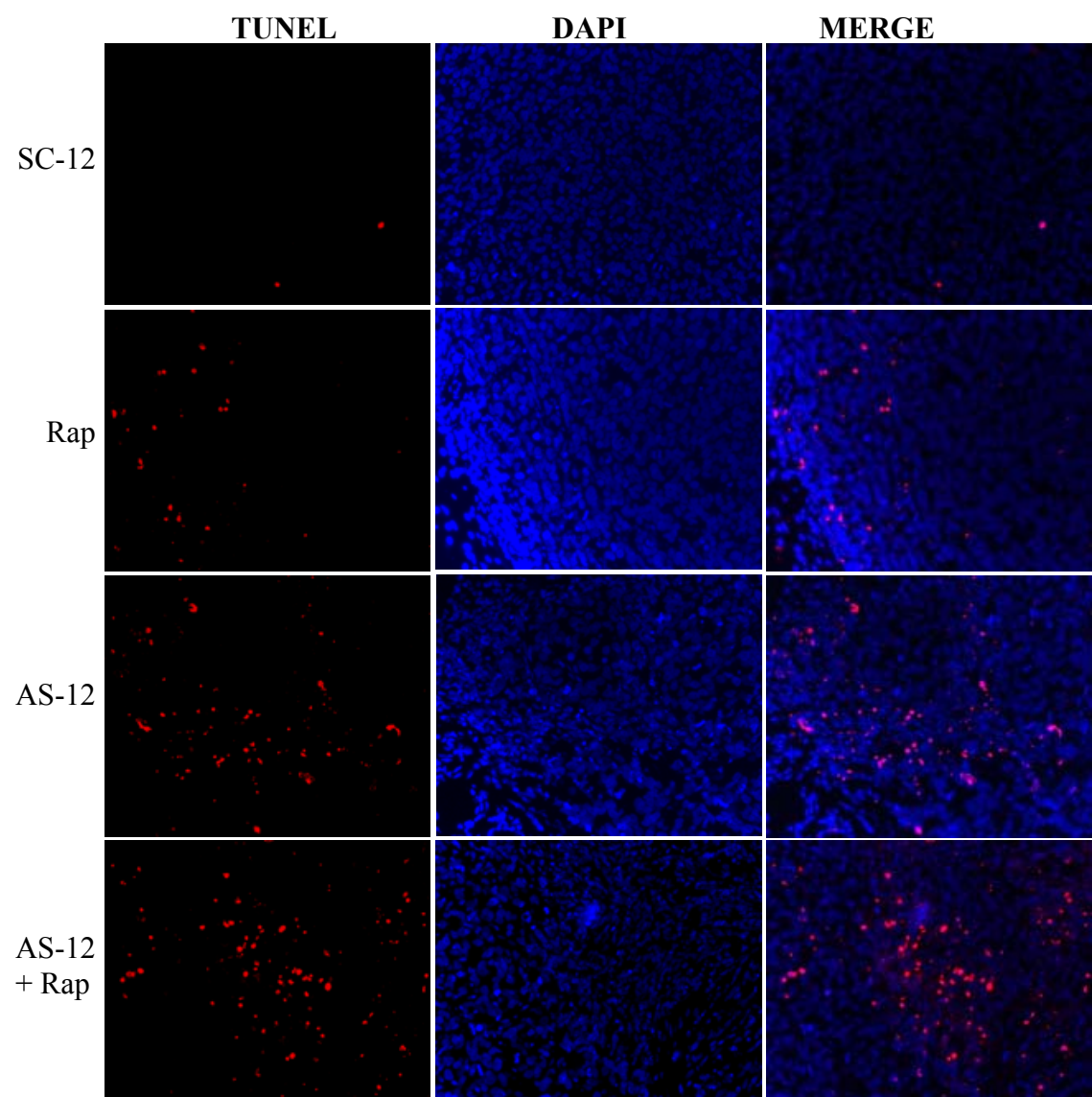


Estudio mediante inmunohistoquímica del cambio en el estado de fosforilación de la proteína p70s6K en secciones de tumores procedentes de ratones inmunodeprimidos tratados con SC-12, rapamicina, AS-12 y la combinación de rapamicina y AS-12.

2.2.6 El tratamiento combinado con AS-12 y rapamicina induce *in vivo* un incremento en los niveles de apoptosis dependiente de caspasa-3/7

Para verificar si los diferentes tratamientos inducían muerte celular *in vivo* se analizaron, mediante ensayos de TUNEL, los niveles de células apoptóticas en secciones seriadas de los tumores descritos anteriormente.

Fig. 26. El tratamiento con rapamicina y AS-12 induce apoptosis *in vivo*



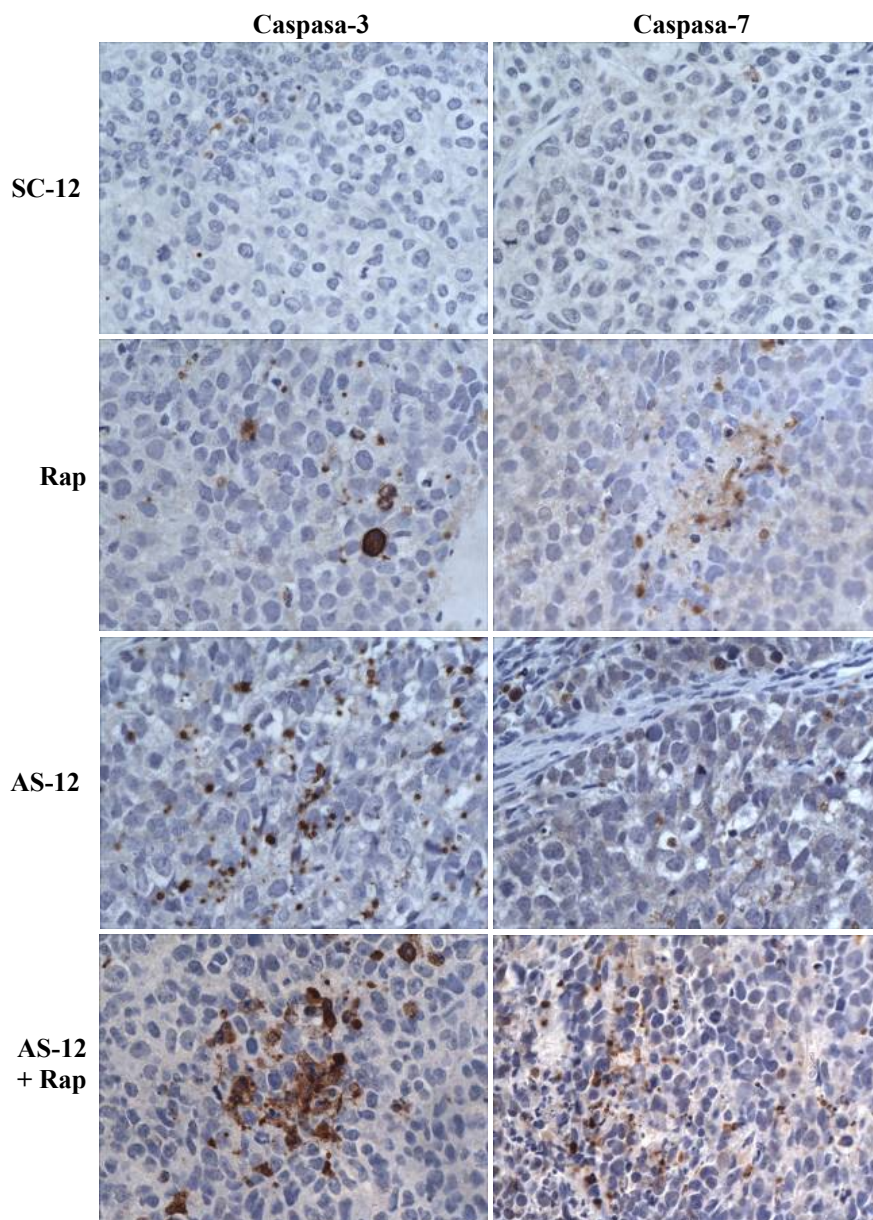
Detección *in situ* mediante TUNEL (rojo) de la muerte celular inducida por los tratamientos indicados en tumores procedentes de ratones inmunodeprimidos. La morfología nuclear fue observada mediante DAPI (azul).

Como muestra la figura 26, en muestras representativas de tumores procedentes de animales control (SC-12 o vehículo control) , el número de células positivas en ensayos de TUNEL fue mínimo. Por el contrario, se observó un grado creciente de apoptosis en tumores tratados con rapamicina, AS-12 y la combinación AS-12 con rapamicina.

Además, estos niveles de apoptosis observados se correlacionaron con la expresión de las formas activas de la caspasas 3 y 7 (Fig. 27). Al contrario de lo observado *in vitro*, todos los tratamientos resultaron en diferentes grados de apoptosis, dependiente no sólo de la

activación de la caspasa-7, sino también de la de caspasa-3. Aunque la razón que explique esta diferencia en los niveles apoptóticos *in vitro* e *in vivo* no se conoce, se han descrito procesos donde la rapamicina *in vivo*, además de efectos citostáticos indujo también efectos apoptóticos (Easton y Houghton, 2004; Amornphimoltham y cols., 2005).

Fig. 27. La terapia combinada con rapamicina y AS-12 induce apoptosis dependiente de caspasa-3 y caspasa-7



Estudio mediante inmunohistoquímica de los cambios en los niveles de expresión de las formas activas de las proteínas caspasa-3 y caspasa-7 en tumores procedentes de ratones inmunodeprimidos tratados con SC-12, rapamicina, AS-12 o la combinación de rapamicina y AS-12.

2.2.7 Implicación del TGF- β 1 en la inducción de apoptosis en células de ESFT como consecuencia del tratamiento con AS-12

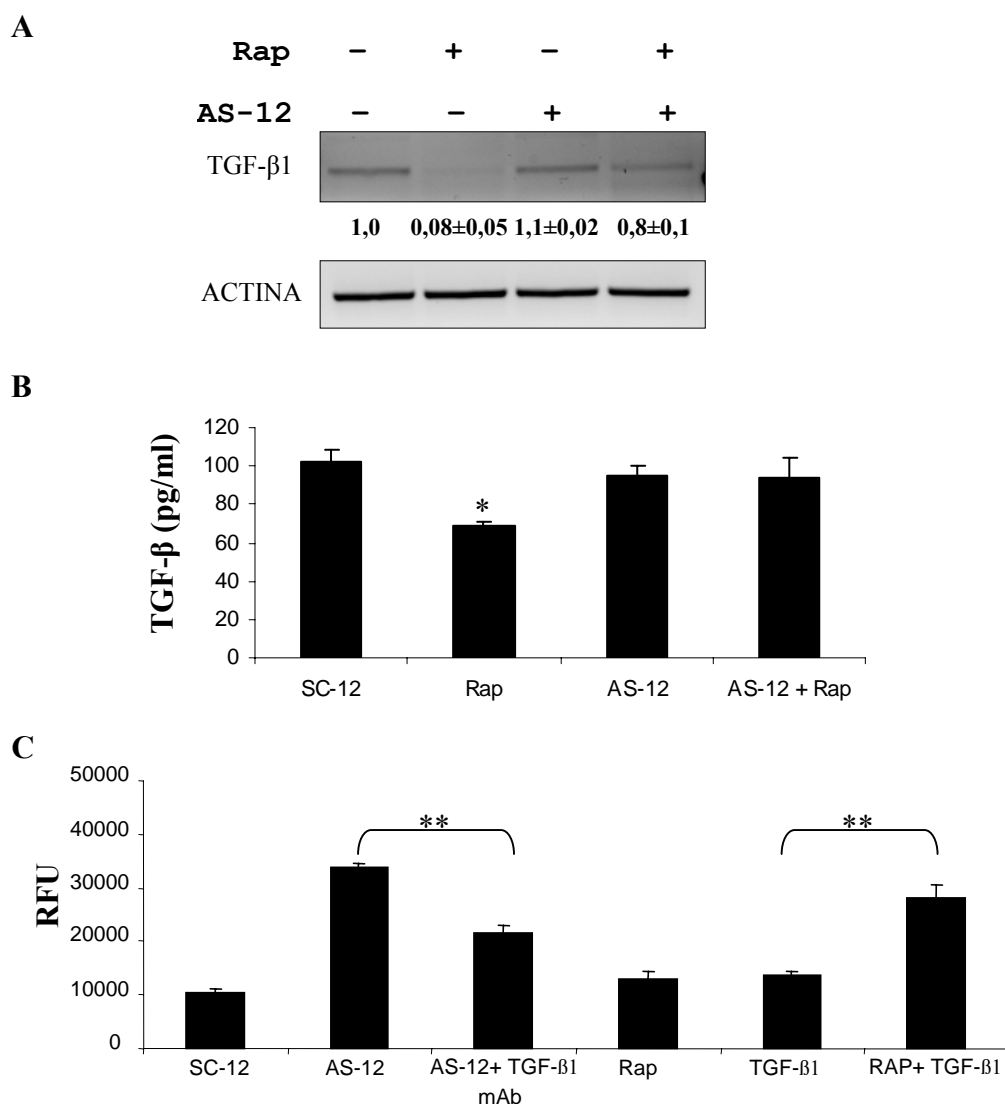
El TGF- β ha sido descrito como inhibidor de la proliferación celular e inductor de apoptosis en diferentes tipos de líneas celulares tumorales (Schuster y Krieglstein, 2002; Sanchez-Capelo, 2005). Debido a las funciones antiproliferativas y antiapoptóticas de TGF- β 1, no es sorprendente que esta vía de señalización se encuentre alterada en diferentes tipos de cáncer por mutaciones somáticas en el gen del receptor *TGF- β RII* (Siegel y Massague, 2003) o, como en el caso de ESFT, debido a una represión transcripcional directa por EWS/FLI-1. Puesto que la inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 restaura los niveles de expresión de TGF β -RII (Ham y cols., 1999), es posible que el tratamiento con AS-12 contribuya a la restauración de la vía de señalización TGF β /TGF β -RII, contribuyendo así al efecto apoptótico.

De esta forma, en este estudio analizamos los posibles cambios en los niveles de RNAm de TGF- β 1 mediante RT-PCR, y de la forma activa secretada por la línea celular A4573 tras el tratamiento con rapamicina, AS-12 o la combinación de rapamicina con AS-12, mediante ensayos de ELISA. En comparación con las células control tratadas con SC-12, el tratamiento con rapamicina sola resultó en una supresión prácticamente completa de los niveles de expresión del RNAm de TGF β 1 y una reducción significativa de los niveles de la proteína activa secretada (Fig. 28A-B). Por el contrario, los niveles de RNAm de TGF- β 1 y de la proteína secretada observados en los tratamientos con AS-12 no se vieron alterados significativamente. Este dato sugiere que el tratamiento con AS-12, por un mecanismo desconocido, previene el efecto supresor de la rapamicina sobre la expresión y secreción del TGF- β 1, contribuyendo al establecimiento del bucle pro-apoptótico (Siegel y Massague, 2003) del TGF- β 1 en células de ESFT .

Para determinar el papel del TGF- β 1 en el proceso apoptótico inducido por el AS-12 respecto al SC-12, estudiamos la actividad de la caspasa-3/7 en la línea celular A4573 tras el tratamiento con AS-12 solo y combinado con un anticuerpo neutralizante del TGF- β 1, durante 48 h. Por otro lado, tratamos la misma línea celular con diferentes concentraciones de TGF- β 1 recombinante, para determinar su respuesta en función de la dosis, obteniendo como resultado una dosis subletal igual a 0,1 ng/ml. Seguidamente estudiamos la actividad

de la caspasa-3/7 en células tratadas con 0,1 ng/ml de TGF-β1 recombinante y rapamicina, durante 48 h.

Fig. 28. Implicación del TGF-β1 en la inducción de apoptosis en células de ESFT como consecuencia del tratamiento con AS-12



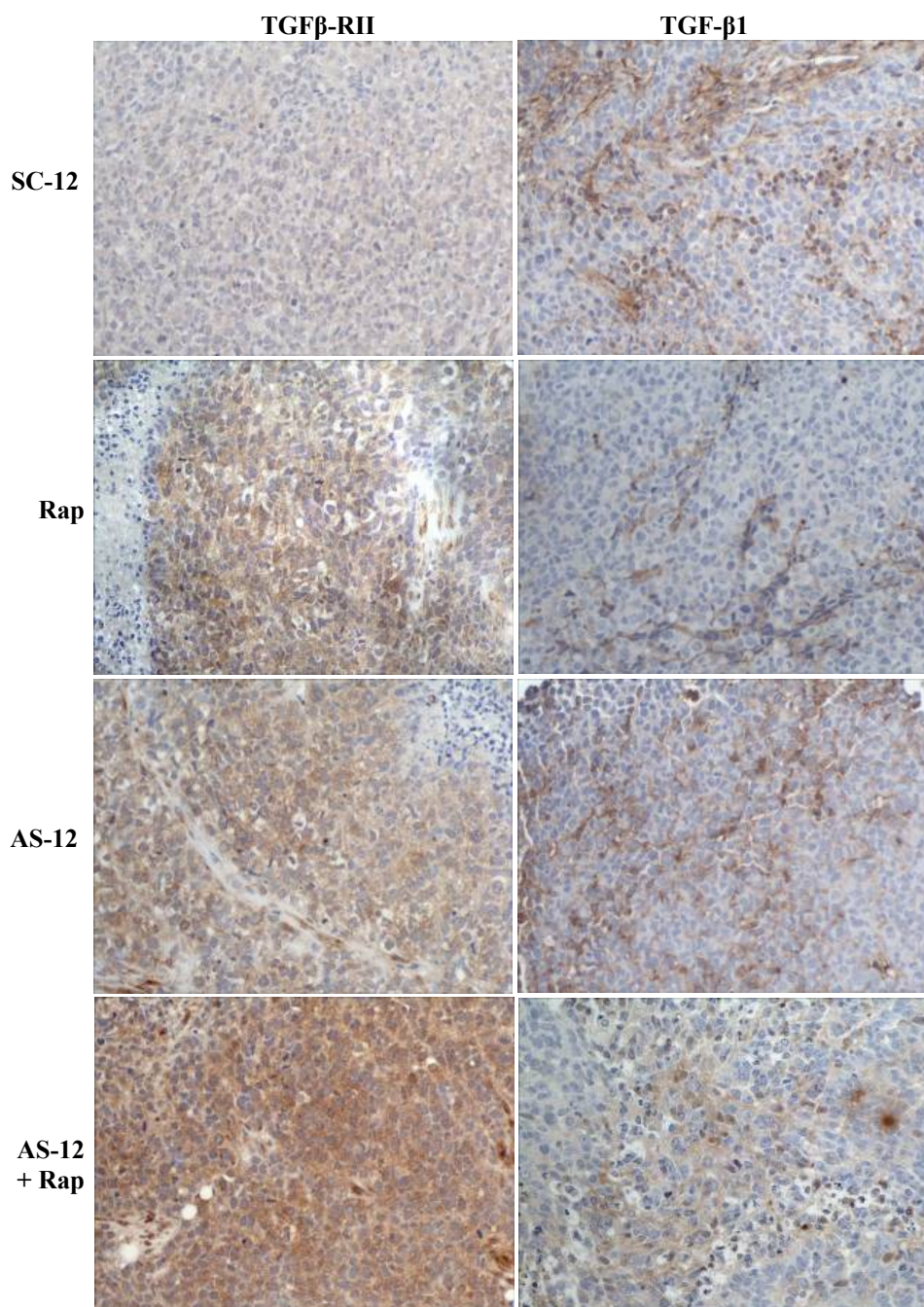
A: Análisis mediante RT-PCR de los niveles de expresión del RNAm del TGF-β1 en células A4573, tras el tratamiento con SC-12, rapamicina, AS-12 o la combinación rapamicina y AS-12. La actina se usó como control de carga. Los valores numéricos corresponden a las determinaciones densitométricas de la intensidad de la señal de 3 experimentos independientes, representado como valor medio ± desviación estándar. **B:** Estudio mediante ensayos de ELISA de los niveles de TGF-β1 activo secretado por células A4573 (*P=0,001, la diferencia observada fue estadísticamente significativa). **C:** Inhibición de la actividad caspasa-3/7 con el anticuerpo monoclonal contra TGF-β1 y su incremento en el tratamiento combinado con TGF-β1 y rapamicina (P≤ 0,01, la diferencia observada fue estadísticamente significativa). RFU: unidades (arbitrarias) de fluorescencia relativa.

Los resultados mostraron que el bloqueo del TGF- β 1, utilizando el anticuerpo neutralizante, resultaba en una reducción de los niveles de la actividad de las caspasas-3/7 inducido por el AS-12 solo (Fig. 28C). Mientras que los niveles de apoptosis inducidos por el TGF- β 1 recombinante fueron tan bajos como los inducidos por la rapamicina, la combinación de ambos incrementaba los niveles de muerte celular (Fig. 28C). Estos resultados mostraron la evidencia de la existencia del bucle TGF- β 1/TGF β -RII contribuyendo de esta forma a la actividad pro-apoptótica del AS-12 en células de ESFT.

Para confirmar la restauración del bucle TGF- β 1/TGF β -RII, ensayos inmunohistoquímicos realizados en muestras de tumores procedentes de ratones tratados con rapamicina, AS-12 o la combinación de rapamicina con AS-12 mostraron una restauración de los niveles del receptor TGF β -RII, siendo significativamente mayor el efecto debido al tratamiento combinado AS-12 con rapamicina (Fig. 29).

A diferencia de los ensayos *in vitro*, donde la expresión de RNAm y secreción de la proteína activa TGF- β 1 está inhibida por acción de la rapamicina, en los ensayos *in vivo* la producción de TGF- β 1 aparece en células no tumorales presentes en las muestras, contribuyendo de esta forma a restaurar la vía de señalización del TGF- β 1/TGF β -RII, resultando en un efecto apoptótico *in vivo*. Sin embargo, este mecanismo requiere mayor caracterización.

Fig. 29. Evidencia de la restauración del bucle TGF- β 1/TGF β -RII como consecuencia de los tratamientos con rapamicina, AS-12 o la terapia combinada en la línea celular A4573



Detección inmunohistoquímica de TGF- β 1 y su receptor TGF- β II en secciones de tumores procedentes de ratones tratados con SC-12, rapamicina, AS-12 o la terapia combinada rapamicina y AS-12.

2.2.8 El tratamiento con AS-12 es también efectivo en células del sarcoma de Ewing que presentan el tipo 1 de fusión EWS/FLI-1

Como se comentaba anteriormente, uno de los mayores problemas en el tratamiento de pacientes con sarcoma de Ewing es que los diferentes tipos de proteína de fusión pueden actuar sobre diferentes dianas y responder a estímulos por diferentes vías (Aryee y cols., 2000), con lo cual se hace indispensable la búsqueda de un único tratamiento efectivo en los diferentes tipos de fusión implicados.

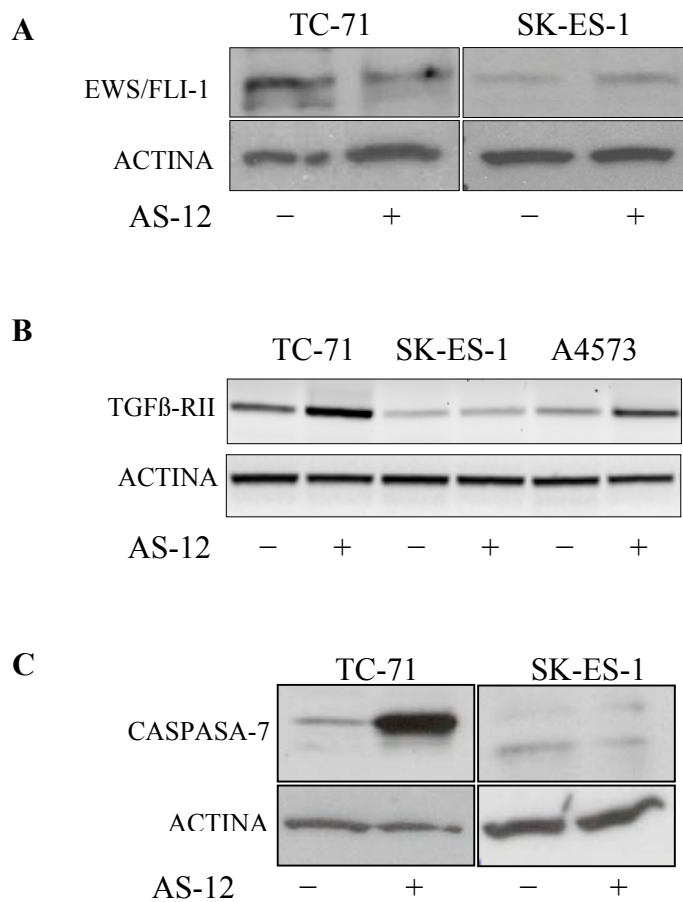
Para determinar si el tratamiento con AS-12 dirigido contra la zona de fusión de EWS/FLI-1 tipo 3, era efectivo en otros tipos de fusión EWS/FLI-1, las líneas celulares TC-71 (que expresa el tipo 1 de fusión EWS/FLI-1) y SK-ES-1 (EWS/FLI-1 tipo 2) fueron tratadas con 10 μ M de AS-12, durante 48 h. El estudio de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, mediante Western blot utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la proteína FLI-1, mostró que el AS-12 también era efectivo inhibiendo el tipo 1 de fusión presente en la línea celular TC-71, mientras que no causó ningún efecto en el tipo 2 de fusión (Fig. 30A).

De acuerdo con la capacidad de inhibir los niveles de expresión de EWS/FLI-1 tipo 1, pero no el tipo 2, el tratamiento con AS-12 también resultó en una restauración de los niveles de expresión del RNAm del receptor TGF β -RII (Fig. 30B) y en la fragmentación de la caspasa-7 en la línea celular TC-71, pero no en la línea celular SK-ES-1 (Fig. 30C).

Esta especificidad puede ser debida a que tanto el tipo 1 como el tipo 3 de fusión presentan la misma secuencia del gen *FLI-1* en la translocación (Koury, 2005), y modelos moleculares de la estructura secundaria del RNAm de *EWS/FLI-1* en la zona de fusión predijeron que los nucleótidos disponibles para el apareamiento de bases con el AS-ODN se encuentran localizados en la porción de FLI-1. De esta forma, parece ser que la interferencia de la porción FLI-1 es suficiente para causar los efectos observados en las líneas celulares de ESFT. La ausencia de dicha porción en el tipo 2 de fusión explicaría la falta de actividad del AS-12 en la línea celular SK-ES-1. Estos datos están de acuerdo con resultados publicados en otros estudios en los cuales AS-ODN o siRNA dirigidos contra el punto de translocación fueron utilizados para inhibir la expresión de EWS/FLI-1, y los más efectivos resultaron ser aquellos que se apareaban con la porción de FLI-1 de la translocación (Kovar y cols., 2003; Tanaka y cols., 1997; Dohjima y cols., 2003). Además

nuestros resultados indican que el AS-12 puede ser efectivo en la mayoría de tumores de sarcoma de Ewing, debido a que la mayoría de pacientes presentan el tipo 1 de translocación cromosómica (Arvand y Denny, 2001), e incluyendo aquellos que presentan la translocación tipo 3, el tratamiento con AS-12 abarcaría un rango de acción aproximado del 98-99 % de los casos.

Fig. 30. El tratamiento con AS-12 dirigido contra la fusión EWS/FLI-1 tipo 3 también es efectivo inhibiendo la proteína de fusión EWS/FLI-1 tipo 1.



Estudio del efecto del AS-12 dirigido contra el tipo EWS/FLI-1 tipo 3 en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing que expresan el tipo 1 (TC-71) y el tipo 2 (SK-ES-1). **A:** Estudio de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1 mediante Western blot. **B:** Estudio de los cambios de expresión en los niveles de RNAm de TGF-β1 como consecuencia del tratamiento con AS-12. **C:** Estudio de los niveles de expresión de la proteína caspasa-7 mediante Western blot. La actina se usó como control de carga

En resumen, la administración simultánea de AS-ODN's y rapamicina indujo muerte celular en células de ESFT, a través de un proceso involucrando la restauración de la vía de señalización pro-apoptótica del TGF-β1/TGFβ-RII. Los experimentos *in vivo* con el

tratamiento combinado AS-12 y rapamicina resultaron en un retraso en el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos, sugiriendo una exploración mayor del potencial de este tratamiento combinado como una nueva estrategia para el tratamiento de tumores de sarcoma de Ewing.

2.3 La roscovitina es un inductor efectivo de apoptosis en células de la familia de tumores del sarcoma de Ewing *in vitro* e *in vivo*

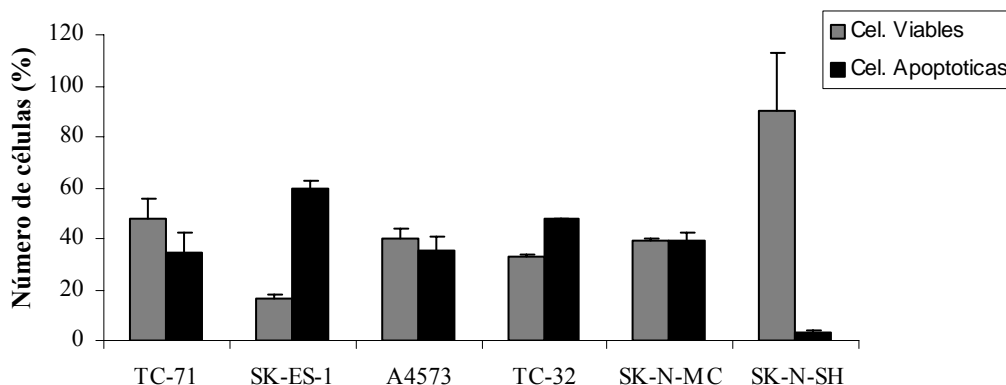
Estudios moleculares en diferentes tipos de tumores humanos, incluyendo ESFT, mostraron alteraciones en ciertos reguladores del ciclo celular, incluyendo la sobreexpresión de la ciclina D1 (Baer y cols., 2004; Zhang y cols., 2004; Schaefer y cols., 2004; Staeger y cols., 2004), la expresión elevada de la CDK2 (Ohali y cols., 2004) y la pérdida o expresión baja de los inhibidores de las CDKs, como las proteínas p16 (Kovar y cols., 1997), p21 (Dauphinot y cols., 2001) o p27 (Fukuma y cols., 2003). Además se ha descrito una asociación entre la expresión elevada de CDK2 y un alto riesgo y/o mal pronóstico de ESFT (Ohali y cols., 2004).

La inhibición de la CDK2 mediante inhibidores tales como la roscovitina se ha convertido en una aproximación terapéutica atractiva en diferentes tipos de tumor debido a su elevada especificidad inhibiendo los complejos CDK2/ciclina A y CDK2/ciclina E (Whittaker y cols., 2004; Maude y Ender, 2005), resultando además en la inducción de apoptosis en determinadas líneas celulares (Malumbres y Barbacid, 2001). Consecuentemente, en el presente estudio se evaluó el efecto de la roscovitina en la proliferación de líneas celulares de ESFT, así como en el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos *in vivo*.

2.3.1 La roscovitina induce muerte celular en células del sarcoma de Ewing pero no de neuroblastoma

El primer paso fue el tratamiento, en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing que expresaban diferentes tipos de proteína de fusión EWS/FLI-1 (TC-71, SK-ES-1 y A4573) y PNET (TC-32 y SK-N-MC), con 10 μ M de roscovitina durante 24h. El estudio de la proliferación celular mediante el ensayo de exclusión de *Trypan blue*, mostró una inhibición del crecimiento (≥ 60 %) en todas las líneas celulares de ESFT estudiadas, así como niveles de muerte celular elevados (> 35 %), en comparación con los experimentos control, en que las células fueron tratadas sólo con el disolvente (DMSO, Fig. 31).

Fig. 31. La roscovitina induce muerte celular en células de ESFT, pero no en células de neuroblastoma



Estudio del efecto del tratamiento con 10 μ M de roscovitina durante 24 h en la proliferación de células del sarcoma de Ewing (TC-71, SK-ES-1 y A4573), PNET (TC-32, SK-N-MC) y neuroblastoma (SK-N-SH).

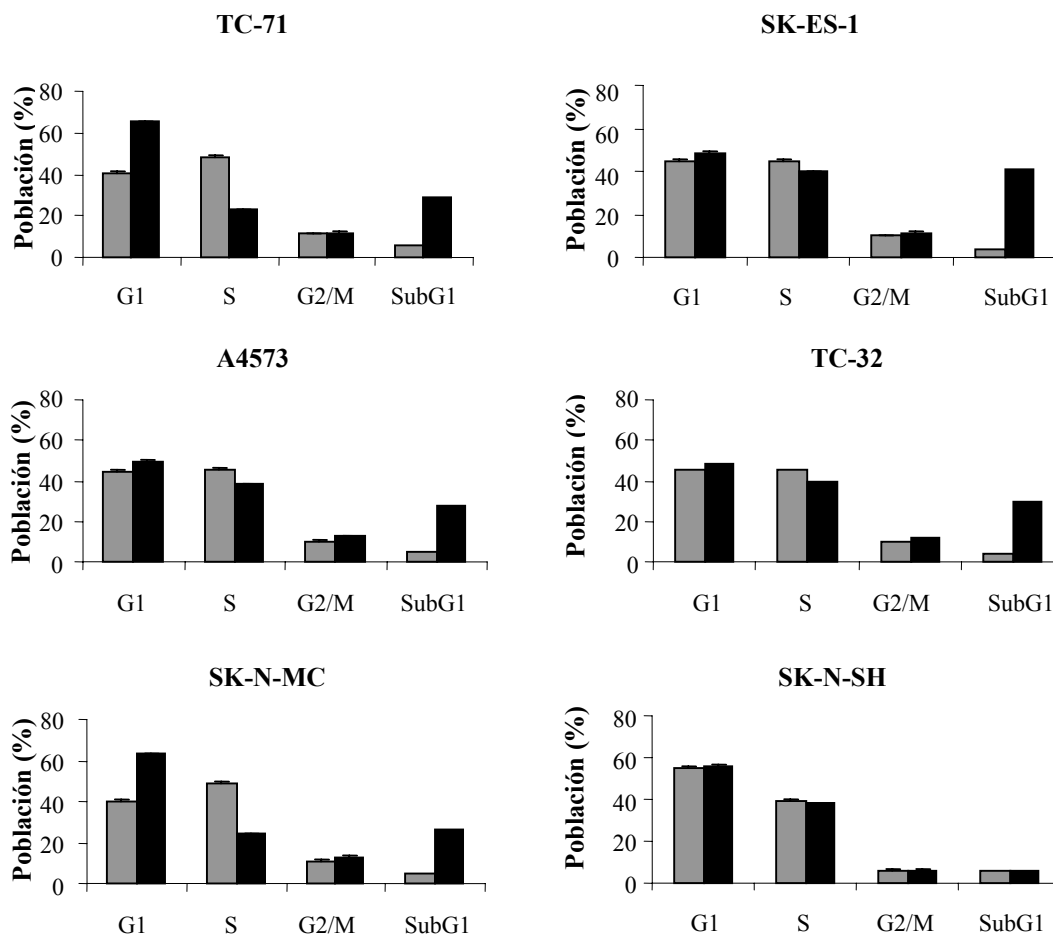
Por el contrario, la roscovitina no indujo un efecto apreciable en la inhibición de la proliferación celular ($< 10\%$) o en la inducción de muerte celular en células de neuroblastoma (SK-N-SH), sugiriendo de esta forma su especificidad en las células de ESFT. Aunque estudios previos en células de neuroblastoma tratadas con roscovitina (Ribas y Boix, 2004) mostraron la sensibilidad de estas células al tratamiento, en nuestro estudio, a diferencia del anterior, los tratamientos fueron realizados con una dosis 5 veces menor.

2.3.2 Efectos de la roscovitina en el ciclo celular en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing y neuroblastoma

Estudios realizados sobre el efecto del tratamiento con roscovitina en células de diferentes tipos de tumores, tales como carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y neuroblastoma (Schutte y cols., 1997) mostraron una inducción de la parada en el ciclo celular en fase G_1 y G_2 -M consistente con la inhibición de las quinasas dependientes de ciclinas CDK1 y CDK2. Para entender el mecanismo por el cual la roscovitina induce la inhibición de la proliferación en células de ESFT, estudiamos el efecto de esta droga en el

ciclo celular tras el tratamiento con 10 μ M de roscovitina durante 24 h, mediante ensayos de citometría de flujo (Fig. 32).

Fig. 32. Efectos inducidos en el ciclo celular por la roscovitina en células de ESFT y neuroblastoma



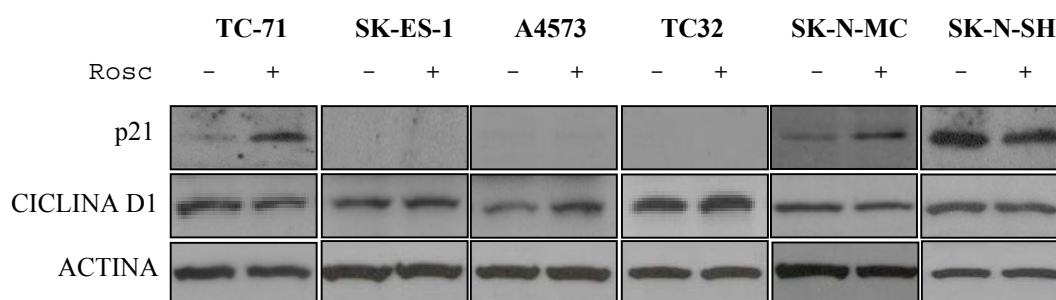
Estudio del efecto sobre la distribución celular, mediante citometría de flujo, del tratamiento con 10 μ M de roscovitina durante 24 h en células del sarcoma de Ewing (TC-71, SK-ES-1), PNET (TC-32, SK-N-MC) y neuroblastoma (SK-N-SH).

En comparación con los controles no tratados, los resultados mostraron una inducción de parada del ciclo celular en fase G₁ (30 %) en las líneas celulares TC-71 y SK-N-MC, mientras que prácticamente no afectaba a las otras líneas celulares de ESFT y de neuroblastoma. Tampoco se observó una parada significativa en la fase G₂-M en ninguna de las células tratadas. Por otro lado, de acuerdo con la muerte celular mostrada en la figura 31, en el estudio mediante citometría de flujo se observó una acumulación de células en la fracción sub-G₁ (aproximadamente un 25%), fracción correspondiente a

células apoptóticas, en todas las líneas celulares de ESFT, pero no en la línea celular de neuroblastoma.

Además, el hecho de que el tratamiento con roscovitina resultase en una parada en G₁ sólo en las líneas celulares TC-71 y SK-N-MC se correlacionó con un incremento en los niveles de expresión de la proteína inhibidora de las CDKs, p21 (Fig. 33), estudiados mediante Western blot, utilizando un anticuerpo específico que reconoce la proteína p21^{WAF1}. Por otro lado, estas dos líneas celulares son las únicas utilizadas en este estudio que presentan la translocación EWS/FLI-1 tipo 1, pero no está claro que exista una relación entre la sensibilidad a la roscovitina y el tipo de translocación en ESFT.

Fig. 33. Estudio de la expresión de las proteínas p21 y ciclina D1 en líneas celulares de ESFT y neuroblastoma tras el tratamiento con roscovitina



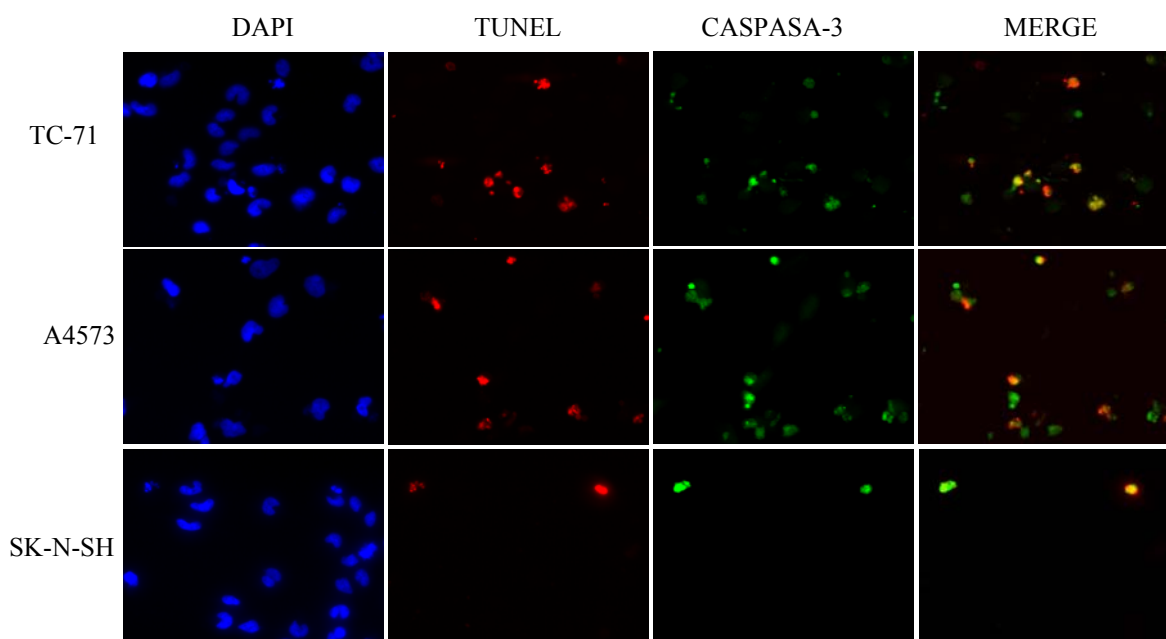
Estudio mediante Western blot de los cambios producidos en los niveles de expresión de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular p21 y ciclina D1, en líneas celulares de ESFT y neuroblastoma, tras el tratamiento con 10 µM de roscovitina durante 24 h.

Estudios en otros tipos de tumores (Whittaker y cols., 2004) mostraron que células tratadas con roscovitina sufrían una reducción en los niveles de expresión de la ciclina D1 como consecuencia del tratamiento. Para investigar el posible papel de la ciclina D1 en la respuesta al tratamiento con roscovitina en ESFT, sus niveles proteicos fueron analizados mediante Western blot tras el tratamiento durante 24 h con roscovitina (10 µM). En contraste con la reducción observada en otros tipos de tumores, la roscovitina no causó un efecto significativo en los niveles de expresión de la proteína ciclina D1 (Fig. 33) en ESFT.

2.3.3 La roscovitina induce apoptosis mediante un mecanismo que causa el aumento de expresión de la proteína Bax y la activación de la caspasa-3 simultáneamente

También se ha descrito que la roscovitina induce apoptosis como mecanismo de muerte celular en líneas celulares de diferentes tumores (McClue y cols., 2002; Wojciechowski y cols., 2003; Hahntow y cols., 2004; MacCallum y cols., 2005; Mgbonyebi y cols., 1999; Edamatsu y cols., 2000) y sensibiliza a las células al tratamiento con radiación (Maggiorella y cols., 2003) *in vitro* e *in vivo*. En el presente estudio, para determinar si la muerte observada en las células de ESFT como consecuencia del tratamiento con roscovitina era debida a apoptosis, se analizaron mediante ensayos de TUNEL, los niveles de células apoptóticas en células tratadas con roscovitina durante 24 h (Fig. 34).

Fig. 34. La apoptosis inducida por la roscovitina es dependiente de la caspasa-3



Detección de la muerte celular *in situ* inducida por la roscovitina en células de sarcoma de Ewing (TC-71 y A4573) y neuroblastoma (SK-N-SH) mediante ensayos de TUNEL (rojo). Estudio mediante inmunofluorescencia (verde) de la expresión de la caspasa-3 activa. La morfología nuclear fue observada mediante DAPI (azul). La superposición de las señales roja y verde indica que la degradación parcial de la caspasa-3 ocurrió durante el proceso apoptótico, pero no en las células de neuroblastoma.

Como se indica en la figura 34, la detección *in situ* de las células apoptóticas mostró que el número de células positivas en ensayos de TUNEL en las líneas celulares de ESFT, TC-71 y A4573, fue significativamente mayor, mientras que, confirmando lo anteriormente

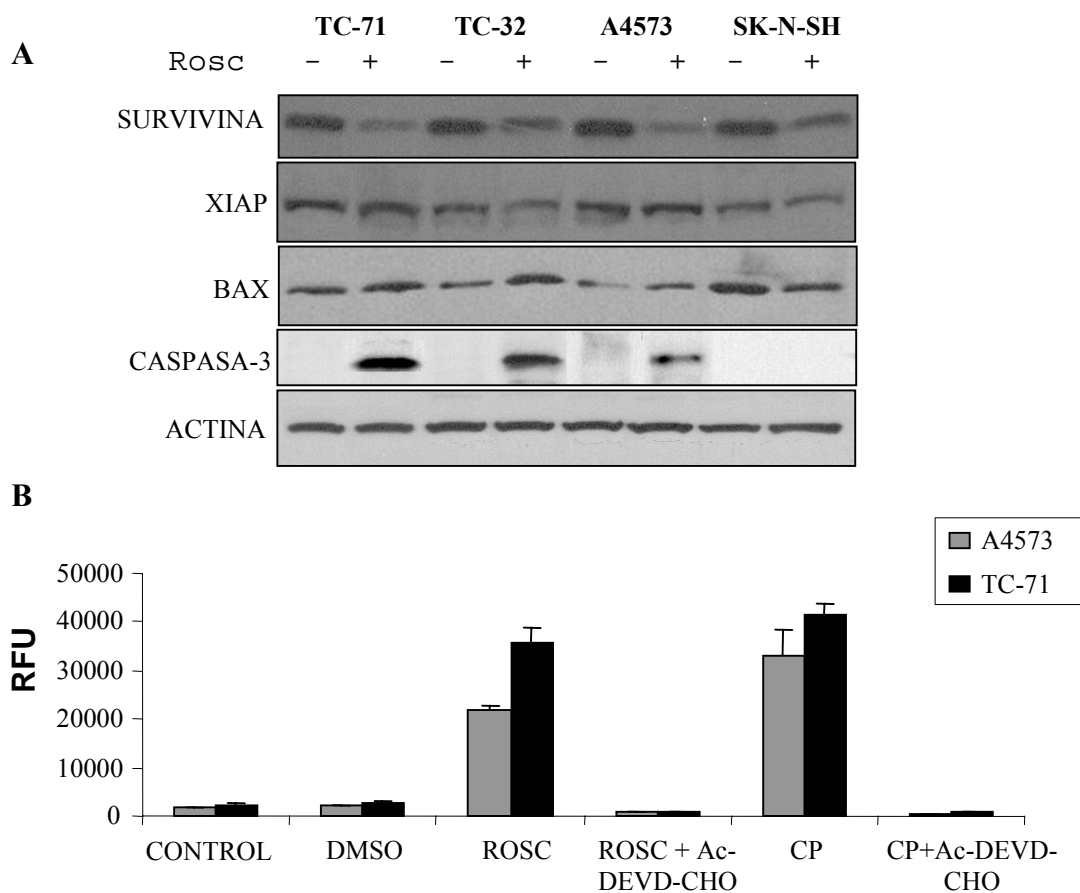
descrito, no se observó muerte en células de neuroblastoma. Además, la combinación de los ensayos de TUNEL con inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la forma activa de la caspasa-3, mostró una correlación entre la apoptosis observada y la expresión de la forma activa de la caspasa-3 (Fig. 34). Por otro lado, la cuantificación de los niveles de células positivas en ensayos de TUNEL, en tres ensayos independientes, también se correlacionó con los niveles de muerte celular descritos en la figura 31 (TC-71 : $36 \pm 5,01$ %; A4573 : $38 \pm 3,62$; SK-N-SH : $3 \pm 0,8$ %).

El mecanismo por el cual la roscovitina induce apoptosis no está bien establecido, aunque se ha involucrado a miembros de la familia de proteínas Bcl-2, tales como Bcl-xS, Bax y Bak (Hahntow y cols., 2004; Kim y cols., 2004). Los resultados mediante análisis de Western blot sugirieron que un incremento en los niveles de expresión de Bax es importante en la apoptosis mediada por la roscovitina en ESFT. Como muestra la figura 35A, los niveles proteicos de Bax fueron regulados positivamente (hasta 2,8 veces en la línea celular TC-32) tras el tratamiento con roscovitina en 3 líneas celulares de ESFT, mientras que los niveles de Bax sufrieron una regulación negativa de aproximadamente un 50 % en la línea celular de neuroblastosarcoma SK-N-SH. Además, los niveles de la forma activa de la caspasa-3 fueron detectados sólo en los extractos de células donde los niveles de Bax sufrieron un aumento debido al tratamiento con la roscovitina, mientras que en la línea celular de neuroblastoma no fueron detectados (Fig. 35A).

En otras líneas celulares tumorales, tales como las derivadas de leucemia linfocítica crónica (Hahntow y cols., 2004), se ha observado que los niveles de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), tales como Survivina y XIAP, fueron significativamente inhibidos tras el tratamiento con roscovitina.

De acuerdo con esto, en nuestro estudio todas las líneas celulares, incluida la de neuroblastoma, sufrieron una inhibición de los niveles de expresión de la Survivina y XIAP (Fig. 35A), tras el tratamiento con 10 μ M de roscovitina durante 24 h. Sin embargo la ausencia de la forma parcialmente degradada de la caspasa-3 en la línea celular SK-N-SH sugirió que un aumento de expresión de los niveles de la proteína Bax era necesario para la inducción de apoptosis por la roscovitina (Fig. 35A).

Fig. 35. La roscovitina induce apoptosis en células de ESFT mediante la regulación positiva de Bax y la activación de la caspasa-3



A: Estudio mediante Western blot de los cambios producidos en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con apoptosis (Survivina, XIAP, Bax, Caspasa-3) como consecuencia del tratamiento con roscovitina (Rosc). La actina se usó como control de carga. **B:** Representación gráfica de la actividad de la caspasa-3 tras el tratamiento con roscovitina (Rosc) respecto a las células control sin tratar o tratadas con DMSO, así como el efecto inhibitorio de la apoptosis mediante el inhibidor específico de las caspasas-3/7 Ac-DEVD-CHO. Como control positivo de la apoptosis dependiente de caspasas se utilizaron las mismas líneas celulares tratadas con cisplatino (CP). RFU : unidades (arbitrarias) de fluorescencia relativa.

Estudios recientes en células humanas B-CLL (Hahntow y cols., 2004) demostraron que el proceso apoptótico inducido por la roscovitina era dependiente de las caspasas-3/7. De acuerdo con esto, en las células de ESFT, los resultados mostraron que la apoptosis inducida por el tratamiento con roscovitina era bloqueada por el tratamiento con un inhibidor específico de las caspasa-3/7, Ac-DEVD-CHO (Fig. 35B). El nivel de apoptosis inducido por roscovitina en las líneas celulares TC-71 ($42,4 \pm 0,1$ %) y A4573 ($41,7 \pm 2,3$ %) fue reducido significativamente en células que fueron tratadas con roscovitina en presencia del inhibidor Ac-DEVD-CHO (Tabla 8). La reducción de los niveles de

apoptosis causada por Ac-DEVD-CHO fue consistente con la reducción del efecto apoptótico causado en las mismas células por el cisplatino (Tabla 8), un conocido inductor de apoptosis dependiente de caspasas en ESFT y otros tipos de líneas celulares (Siddik, 2003; Yen y cols., 2005). Estos resultados demuestran que el proceso apoptótico inducido por la roscovitina en ESFT es dependiente, al menos en parte, de la activación de las caspasas-3/7.

Tabla 8. Efecto de la inhibición de las caspasas-3/7 en la acción apoptótica de la roscovitina

	TC-71	A4573
Control (células no tratadas)	7,4 ± 1,2	8,9 ± 0,6
DMSO	6,7 ± 3,1	10,8 ± 0,3
Rosc	42,4 ± 0,1	41,7 ± 2,3
Rosc + Ac-DEVD-CHO	5,8 ± 0,5	9,2 ± 4,0
CP	39,9 ± 1,4	32,3 ± 3,8
CP + Ac-DEVD-CHO	9,2 ± 3,4	7,5 ± 2,0

Los resultados indican el porcentaje de células apoptóticas 24 h después del tratamiento indicado, expresados como la media de 3 experimentos independientes ± desviación estándar. Rosc, roscovitina; CP, cisplatino

Debido a que se ha sugerido que la roscovitina induce apoptosis mediante la activación de la vía de señalización de p53 (Blaydes y cols., 2000), y Bax es una diana transcripcional de p53, los niveles de RNAm de *Bax* fueron analizados mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que no existía una activación transcripcional en ninguna de las líneas celulares incluidas en este estudio (datos no mostrados), quizás como resultado de una inhibición transcripcional de la RNA polimerasa II inducida por la administración de roscovitina, que se traduce en la disminución de sus niveles proteicos y una pérdida de su estado fosforilado (Whittaker y cols., 2004; MacCallum y cols., 2005; Alvi y cols., 2005). Esto sugiere que el tratamiento con roscovitina induce un incremento en los niveles de Bax en ESFT a nivel post-transcripcional por mecanismos que implican una modificación después de la transcripción o mediante estabilización de la proteína, como ha sido descrito en otros sistemas experimentales (Tirado y cols., 2005). Este dato es consistente con el hecho de

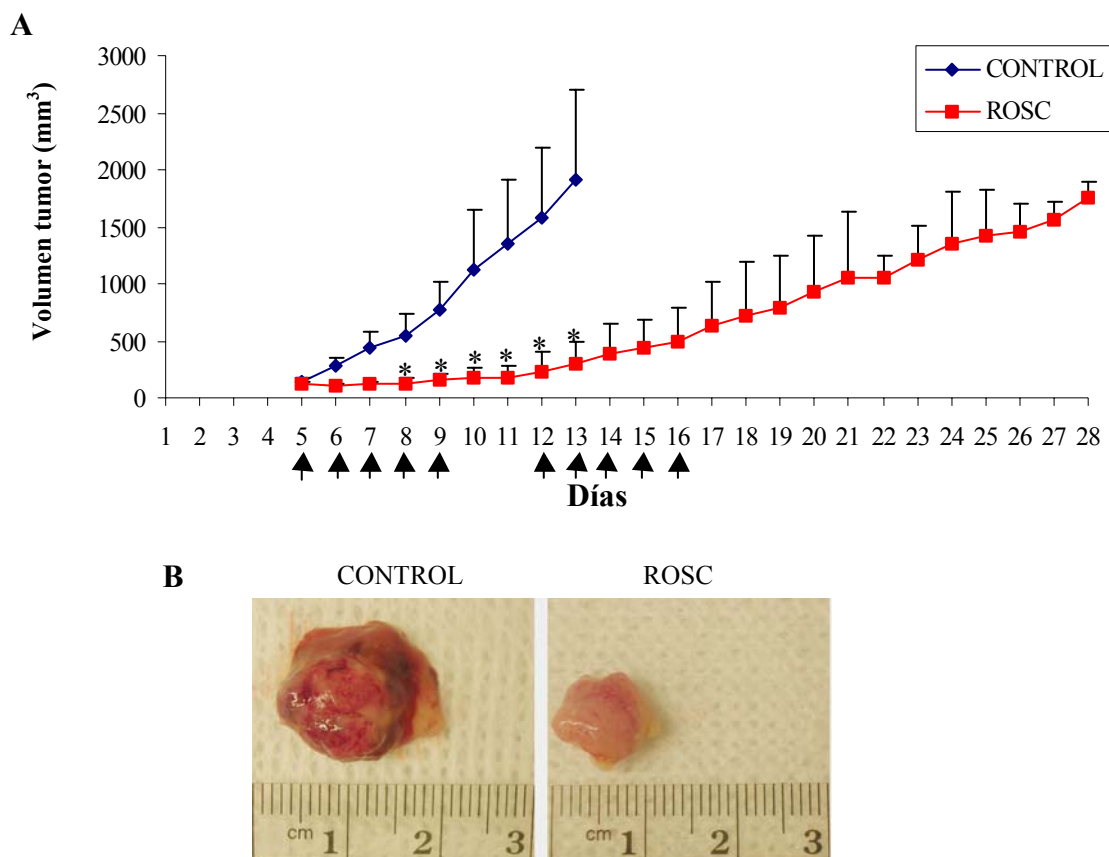
que las líneas celulares de ESFT utilizadas en este estudio expresan formas mutadas o no mutadas de p53. Además, el hecho de que no se detectara un incremento en los niveles de expresión del RNAm de p53 en las células de neuroblastoma, que expresan formas normales de p53, sugiere que la roscovitina no causó activación de p53 en ninguna de las células tratadas en este estudio, y que el proceso apoptótico causado por la roscovitina en ESFT era independiente de p53.

2.3.4 El tratamiento con roscovitina *in vivo* induce un retraso en el crecimiento de los tumores mediado por activación de caspasa-3

El siguiente paso fue el estudio de la acción de la roscovitina *in vivo*, mediante la evaluación del efecto del tratamiento con roscovitina sobre el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos, generados como se describió previamente en el apartado 2.1. En este estudio, cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 130 mm³, los ratones fueron tratados intraperitonealmente con 50 mg/Kg de roscovitina o con el solvente en que se preparó la roscovitina y el crecimiento del tumor fue seguido durante varias semanas.

Como muestra la figura 36, el crecimiento del tumor fue significativamente menor en los ratones tratados con roscovitina respecto a los animales control. Un día después de finalizar la primera serie de tratamientos de 5 días (día 10), los tumores tratados con roscovitina presentaban un tamaño 1,25 veces mayor que el tamaño al principio del tratamiento, mientras que los tumores procedentes de ratones no tratados presentaban un tamaño 14,5 veces mayor que su tamaño original. Los tumores en animales tratados con la roscovitina continuaron creciendo más lentamente en comparación con los animales no tratados, los cuales tuvieron que ser sacrificados, siguiendo las normas institucionales de cuidado y uso de animales, cuando su tamaño alcanzó valores 15 veces mayor al original. Los tumores de los animales tratados con roscovitina tardaron dos semanas más en alcanzar dicho volumen (Fig. 36).

Fig. 36. El tratamiento con roscovitina in vivo induce un retraso en el crecimiento de tumores



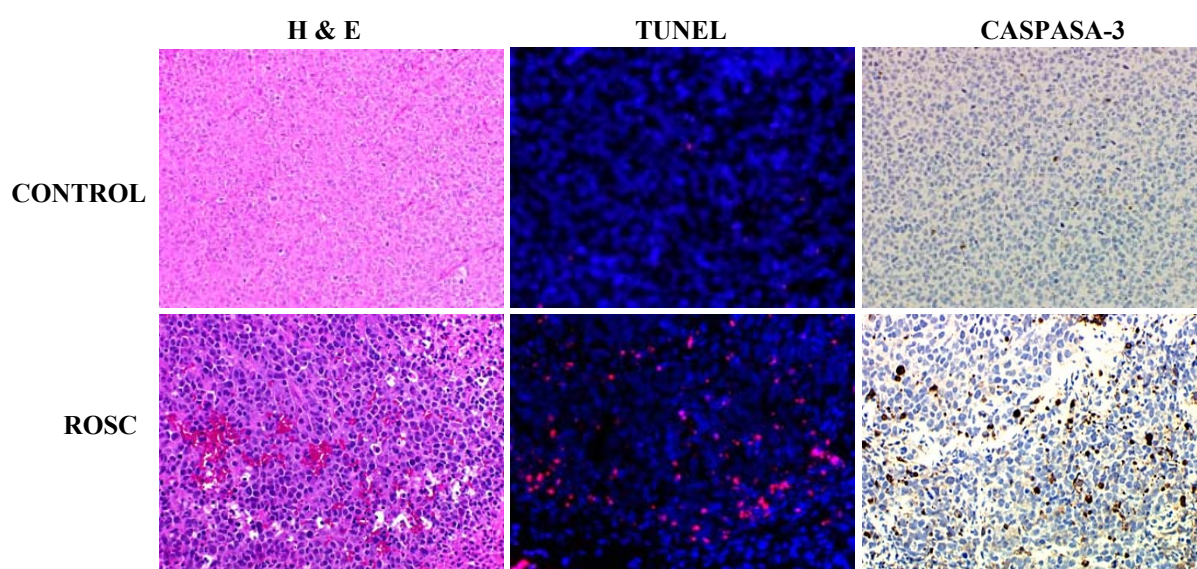
A: Representación gráfica del crecimiento de los tumores en ratones inmunodeprimidos. Las flechas negras indican el régimen de inyecciones. (* $P=0,001$, la diferencia observada fue estadísticamente significativa). **B:** Fotografía de tumores en el momento de la eutanasia. Rosc, Roscovitina.

Es importante indicar que, comparando con otro tipo de líneas tumorales, la roscovitina parece ser particularmente efectiva en el tratamiento de ESFT, tanto en cultivos celulares como en el crecimiento de tumores en ratones inmunodeprimidos. En el presente estudio, en cultivos celulares, se utilizó una concentración de roscovitina de $10 \mu\text{M}$ mientras que en estudios previos las concentraciones utilizadas fueron significativamente mayores (McClue y cols., 2002; Wojciechowski y cols., 2003; Węsierska-Gądek y cols., 2005). Además, mientras que el tratamiento en ESFT con una única inyección i.p. de 50 mg/kg/día , durante 5 días, resultó en una reducción del tamaño del tumor de $\sim 85 \%$ (días 5-8, Fig. 36A), otros estudios, tales como el crecimiento de tumores en ratones con células humanas de colon (LoVo) o de tumor uterino (MESSA-DX5), tratados con tres inyecciones diarias de 100 mg/kg/día durante el mismo tiempo, resultaron en una

reducción del tamaño tumoral del 45 % y del 62 %, respectivamente (McClue y cols., 2002). Estos resultados confirman la mayor sensibilidad de los ESFT al tratamiento con roscovitina que otro tipo de tumores.

Para verificar si el retraso del crecimiento de los tumores *in vivo* era debido a la inducción de apoptosis, se analizaron mediante ensayos de TUNEL secciones procedentes de tumores tratados con roscovitina y tumores control.

Fig. 37. El tratamiento con roscovitina *in vivo* induce un retraso en el crecimiento de tumores mediado por activación de caspasa-3



Tumores procedentes de ratones inmunodeprimidos tratados con roscovitina o tumores control fueron teñidos con H&E (hematoxilina y eosina), y examinados *in situ* mediante TUNEL (rojo) para evaluar la muerte celular inducida por la roscovitina. La morfología nuclear fue observada mediante DAPI (azul). Estudio mediante inmunohistoquímica de los niveles de expresión de la forma activa de la proteína caspasa-3 en tumores procedentes de ratones control y tratados con roscovitina.

Como muestra la fig. 37, el número de células positivas para TUNEL en los tumores tratados con roscovitina fue significativamente mayor que en los tumores control. Además, los niveles de apoptosis observados se correlacionan con la expresión de la forma activa de las caspasa-3 (Fig. 37), indicando que la roscovitina indujo apoptosis en ESFT *in vivo* por un mecanismo dependiente de caspasa-3.

En el estudio presente se describe por primera vez la sensibilidad uniforme de las células de ESFT al tratamiento con roscovitina *in vitro* e *in vivo*. Estos resultados proporcionan la

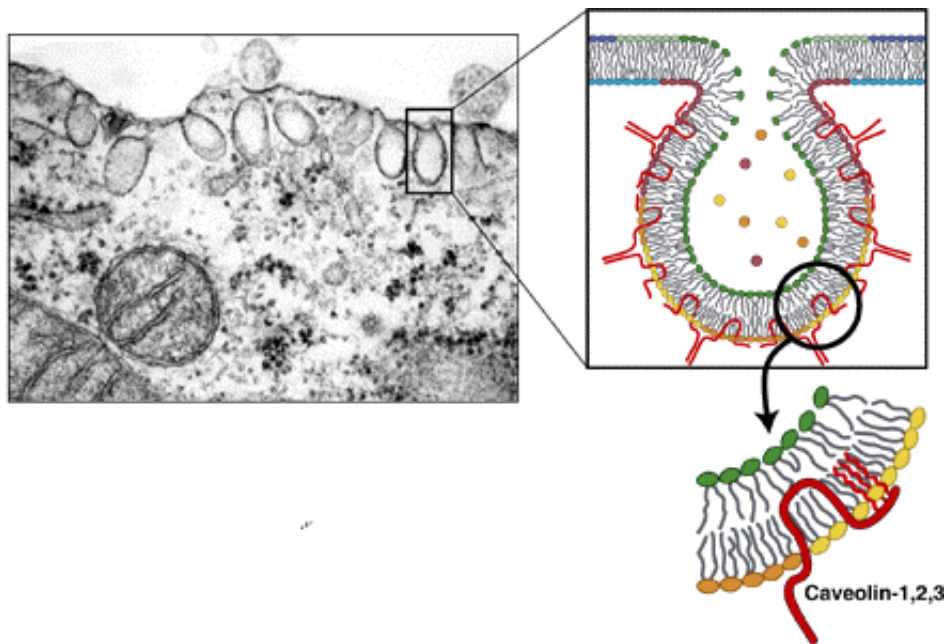
base para el uso de la roscovitina como una nueva aproximación terapéutica en el tratamiento de ESFT, ya sea administrada sola o en combinación con otras drogas. De hecho, se ha descrito que la combinación de la roscovitina con terapia génica contra *E2F-1*, favorece la inducción apoptótica en cáncer gástrico y pancreático (Atienza y cols., 2000; Elliott y cols., 2002), con radiación ionizante en carcinoma de mama (Maggiorella y cols., 2003) o con otras drogas quimioterapéuticas en glioma (Kim y cols., 2004) o carcinoma de vesícula y próstata (Lashinger y cols., 2005). Además los ensayos clínicos realizados mostraron una toxicidad muy baja de la roscovitina en fase Ib (McClue y cols., 2002; Fischer y Gianella-Borradori, 2003; Senderowicz, 2003; De la Motte y Gianella-Borradori, 2004). Teniendo todos estos datos en consideración, nuestros resultados sugieren que la roscovitina, sola o en combinación con otras drogas potencialmente sinérgicas, puede ser un agente terapéutico efectivo contra ESFT.

2.4 La caveolina-1 es una diana transcripcional de EWS/FLI-1 y juega un papel determinante en la expresión del fenotipo oncogénico y la tumorigénesis en células del sarcoma de Ewing

2.4.1 Caveolas y caveolinas

Las caveolas, denominadas en un principio *plasmalemmal vesicles*, son estructuras subcelulares que fueron descritas en 1953 en el endotelio del corazón (Palade, 1953). Dos años más tarde, Yamada describió unas estructuras similares en el epitelio de la vesícula biliar (Yamada, 1995), denominándolas *caveolae intracellulares* debido a su semejanza con pequeñas cuevas. Morfológicamente las caveolas están definidas como invaginaciones esféricas de la membrana plasmática de 50-100 nm de diámetro. La composición bioquímica de las caveolas es indistinguible de las balsas lipídicas o *lipid rafts* (parches o microdominios de la membrana plasmática, compuestos por colesterol, fosfolípidos y esfingolípidos) (Simons y Toomre, 2000) (Fig. 38). La diferencia fundamental, además de la forma invaginada de las caveolas, es la presencia de un conjunto de proteínas, denominadas caveolinas.

Fig. 38 *Caveolas y caveolinas*



Reproducida de Parton, 2001. **(Izquierda)** Microscopía electrónica de caveolas en la membrana plasmática de un fibroblasto humano. **(Derecha)** Diagrama que muestra la composición de una caveola

La caveolinas, proteínas de membrana de 21-24 kDa, son los mayores componentes las caveolas. Se han identificado diferentes miembros pertenecientes a esta familia, tales

como la caveolina-1 (CAV1), caveolina-2 (CAV2) y caveolina-3 (CAV3), que difieren en su estructura molecular y su distribución en tejidos. La CAV1 y la CAV2 se expresan en muchos tipos celulares, tales como adipocitos, células endoteliales, pneumocitos y fibroblastos, mientras que la CAV3 se expresa predominantemente en cardiomiocitos y células musculares (Razani y cols., 2002). Además, el desarrollo de un ratón carente de CAV1 (-/-) demostró un requerimiento absoluto de CAV1 para la formación de las caveolas, puesto que virtualmente todos los tejidos en estos ratones mostraron una carencia total de estas estructuras, indicando que la CAV1 es el único miembro de la familia que es requerido para la formación de las caveolas (Drab y cols., 2001).

Las caveolas y las caveolinas están involucradas en gran variedad de procesos celulares incluyendo endocitosis, homeostasis de lípidos, transducción de señales y tumorigénesis. Varios estudios han implicado a las caveolas y caveolinas en la patogénesis del cáncer, arteroesclerosis y enfermedades vasculoproliferativas, hipertrofia cardíaca y fallo cardíaco, distrofias musculares y diabetes mellitus (Razani y cols., 2002). La contribución de la CAV1 a la carcinogénesis ha sido ampliamente investigada en diferentes estudios clínicos. Sin embargo, el patrón de expresión de la CAV1 es controversial, pues tanto la pérdida como la sobreexpresión de la CAV1 han sido implicadas en el desarrollo tumoral y la progresión metastásica, dependiendo del tipo de factores intrínsecos específicos del tipo celular, tejido y tipo de tumor y/o del estadio de progresión tumoral (Razani y cols., 2001; Wiechen y cols. 2001b; Williams y cols., 2005; Williams y Lisanti, 2005; Lu y cols., 2003; Mouraviev y cols., 2002; Hung y cols., 2003).

Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la CAV1 podría actuar como gen supresor de tumores. Por ejemplo, una inhibición de los niveles de expresión de la CAV1 es típica del cáncer de mama (Hayashi y cols., 2001), pulmón (Kato y cols., 2004) y de ovario (Wiechen y cols., 2001a), así como de sarcomas mesenquimales (Wiechen y cols., 2001b). Los análisis de muestras humanas de cáncer de mama mostraron que aproximadamente un 16 % de éstos presentaban una mutación del gen dominante negativo *CAV1*, en carcinomas invasivos (Hayashi y cols., 2001). Los niveles de expresión de CAV1 en tumores primarios no metastásicos es baja, mientras que su expresión es mucho mayor en tumores metastásicos. Además la expresión exógena de CAV1 fue suficiente para suprimir

el crecimiento de tumores primarios tras la inoculación de células en las glándulas mamarias (Sloan y cols., 2004).

Por otro lado, varios estudios indicaron un papel de la CAV1 como promotor de tumores. Por ejemplo, en el caso del carcinoma de próstata, los niveles de expresión de la CAV1 son elevados, y se incrementan consistentemente en células de cáncer de próstata metastásicas (Yang y cols., 1998; Yang y cols., 1999). Estos datos sugieren que la CAV1 puede ser un marcador de pronóstico del cáncer de próstata. Además, los niveles de CAV1 se encuentran regulados positivamente en cáncer de próstata humano tras el tratamiento con andrógenos, mientras que la regulación de la CAV1 mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido (AS-ODN) reduce la incidencia de metástasis en ganglios linfáticos y pulmón (Li y cols., 2001; Tahir y cols., 2001). Estudios recientes mostraron una expresión bifásica de la CAV1 en tumores primarios de riñón y páncreas en comparación con tumores metastásicos derivados de los mismos (Williams y cols., 2005; Williams y Lisanti, 2005); Lu y cols., 2003; Mouraviev y cols., 2002; Hung y cols., 2003).

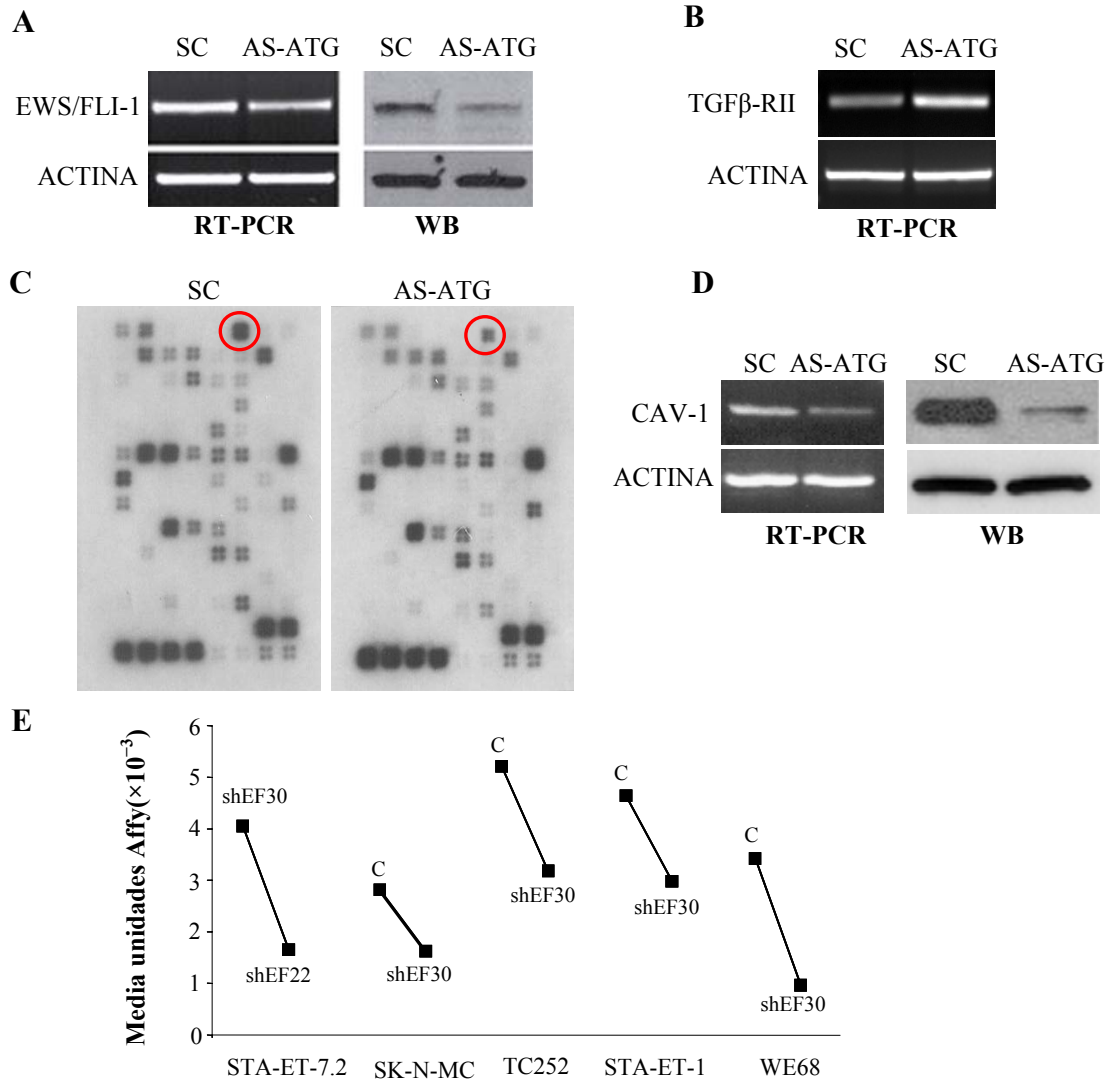
Hasta la fecha, no se han realizado estudios de la posible participación de la CAV1 en la patobiología de ESFT. En el presente estudio, mediante la utilización de AS-ODN, RNA de interferencia mediado por retrovirus, análisis basados en la expresión génica (*gene array-based analyses*) y estudios de reexpresión, se evaluó la posible implicación de la CAV1 en el fenotipo neoplásico y la capacidad tumorigénica de líneas celulares de ESFT.

2.4.2 Identificación de CAV1 como diana transcripcional directa de EWS/FLI-1

Para la identificación de nuevas dianas de la proteína de fusión EWS/FLI-1 relacionadas con invasión y metástasis, elegimos la línea celular A4573 como modelo a estudiar, puesto que representa un buen ejemplo de ESFT agresivo. La estrategia se basó en dos aproximaciones, la primera de ellas incluía la utilización de AS-ODN para inhibir la expresión de EWS/FLI-1 y de esta forma poder comparar las diferencias de expresión de genes relacionados con invasión y metástasis entre estas células y células de ESFT con una expresión normal de EWS/FLI-1. Para ello, basándonos en estudios previos realizados con AS-ODN dirigidos contra la región de iniciación de la traducción del RNAm de *EWS/FLI-1* en células de ESFT (Tanaka y cols., 1997), tratamos las células de ESFT con

10 μ M de un AS-ODN de 25 oligonucleótidos de longitud (AS-ATG), durante 48 h, reduciendo los niveles de expresión del RNAm de *EWS/FLI-1* y proteína a un 50 % y 65 %, respectivamente, respecto a los niveles en las células control tratadas con un oligonucleótido con una secuencia al azar (SC) (Fig. 39A).

Fig. 39. La expresión de *CAVI* está regulada por *EWS/FLI-1*



A : Estudio del efecto del AS-ATG en los niveles de expresión del RNAm de *EWS/FLI-1* (RT-PCR) y proteína (Western blot, WB) en la línea celular A4573, respecto al control (SC). **B** : Restauración de los niveles de RNAm de *TGFβ-RII* como consecuencia del tratamiento con AS-ATG. **C** : *Gene arrays* comparando la expresión de genes relacionados con metástasis en la línea celular tratada con AS-ATG respecto al control (SC). Los círculos rojos indican la localización de la *CAVI*. **D** : Detección del RNAm de la *CAVI* (RT-PCR) y proteína (WB) en las muestras utilizadas para los *gene arrays*. **E** : Cambios en la expresión en diferentes líneas celulares de ESFT, detectados por análisis *microarray*, tras la inhibición de la expresión de *EWS/FLI-1* con shRNA retrovirales dirigidos contra la zona de fusión (shEF22, shEF30), respecto de sus controles (C, shEF30). Los resultados (Affimetrix chip U133A) muestran el valor medio *Affy* para la sonda 203065_s_at and 212097_at. La actina se usó como control de carga.

Para evaluar la efectividad del AS-ODN utilizado en este estudio, determinamos los niveles de expresión del RNAm de *TGF β -RII*, que están reprimidos transcripcionalmente por EWS/FLI-1 (Hahm y cols., 1999). La inhibición de los niveles de expresión de *EWS/FLI-1* mediante la utilización de AS-ATG resultó en la restauración de los niveles de *TGF β -RII* (Fig. 39B), confirmando de esta forma los experimentos previamente publicados (Tanaka y cols., 1997), y los decritos anteriormente en esta tesis.

El siguiente paso fue el análisis comparativo de la expresión de 96 genes relacionados con metástasis, en células tratadas con el AS-ATG frente a células control tratadas con el SC, durante 48 h (Fig. 39C). Los resultados mostraron la variación de los niveles de expresión de diferentes genes (Tabla 9), siendo la CAV1 el gen más afectado (aproximadamente 2,5 veces menor) por la inhibición de EWS/FLI-1, indicando que podría ser una diana del oncogén responsable de ESFT. Estos resultados fueron validados mediante RT-PCR y Western blot, siendo la reducción de los niveles de expresión de RNAm de CAV1 de aproximadamente 2,5 veces, mientras que los niveles de proteína se redujeron unas 5 veces (Fig. 39D). De acuerdo con esto, estudios previos de perfil genético asociado a la expresión de EWS/FLI-1 en otros sistemas, también mostraron cambios en la expresión de CAV1. La inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 utilizando RNA de interferencia mediado por retrovirus, reguló de forma negativa la expresión de la CAV1 en células de ESFT (Smith y cols., 2006). Además la expresión de EWS/FLI-1 en células que normalmente no lo expresan (fibroblastos de ratón NIH-3T3, neuroblastoma humano y rabdomiosarcoma) incrementaron la expresión de CAV1 (Hu-Lieskovan y cols., 2005a; Lessnick y cols., 2002; Rorie y Weissman, 2004) y la expresión elevada de CAV1 fue indentificada como una característica diferenciadora de ESFT con otros sarcomas (Baird y cols., 2005) y tumores relacionados.

Debido a que el AS-ATG estaba dirigido contra la región de iniciación de la traducción de EWS/FLI-1, también afectó a los niveles del alelo normal de *EWS* presente en las líneas celulares de ESFT (dato no mostrado). Para determinar que la regulación negativa de los niveles de expresión de la CAV1 no era debida a la inhibición de los niveles de expresión de *EWS* o a una acción inespecífica del AS-ATG, exploramos el efecto sobre los niveles de expresión de la CAV1 mediante vectores retrovéricos de shRNAs diseñados contra diferentes tipos de translocaciones, en varias líneas celulares de ESFT, mediante el análisis

de datos procedentes de *microarrays* realizados previamente (Siligan y cols., 2005) con el *Affimetrix HG-U133A Gene Chip*. Los resultados mostraron que, respecto a células que contenían el vector vacío o que expresaban un shRNA con una secuencia diseñada al azar, los niveles de CAV1 fueron inhibidos de forma consistente (1,6-3,5 veces) como consecuencia de la inhibición de EWS/FLI-1 en todas las líneas celulares estudiadas (Fig. 39E).

Tabla 9. Estudio en la línea celular de sarcoma de Ewing A4573 de la expresión de genes implicados en metástasis

I. Genes sobre-expresados en la línea celular A4573 de ESFT

UniGene	Genebank	Símbolo	Descripción	Gen	Ref
Hs.74034	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kD	Caveolin-1	1,2,3,4
Hs.173894	M37435	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf-1	
Hs.214982	J03202	LAMC1	Laminin, gamma 1	Laminin B2	
Hs.36566	D26309	LIMK1	LIM domain kinase 1	LIM kinase	
Hs.5734	NM_012215	MGEA5	Meningioma expressed antigen 5	Hyalurodinase	
Hs.101448	U35113	MTA1	Metastasis associated 1	MTA-1	5
Hs.79070	X00364	MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	c-myc	1,2,3,4
Hs.118638	NM_000269	NM23A	Homo sapiens non-metastatic cells 1	NM23A	

II. Genes que presentan expresión baja en la línea celular A4573 de ESFT

UniGene	Genebank	Símbolo	Descripción	Gen	Ref
Hs.100426	AF159141	BRMS1	Homo sapiens breast cancer metastasis-suppressor 1	BrMS1	
Hs.19949	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis related cysteine protease	Caspase 8	
Hs.169610	M59040	CD44	CD44 antigen (homing function and indian blood group system)	CD44	2,5
Hs.75617	X05610	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	Collagen 4 A2	2,5
Hs.99863	NM_001972	ELA2	Homo sapiens elastase 2, neutrophil	Elastase	
Hs.77711	D12765	ETV4	Human mRNA for E1A-F	PEA3	
Hs.7636	X52192	FES	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase fes/fps	c-fes	
Hs.75297	X51943	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	α -FGF	
Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	β -FGF	
Hs.809	X57574	HGF	Hepatocyte growth factor	Scatter factor	
Hs.44227	AF084467	HPSE	Homo sapiens heparanase mRNA	Heparanase	
Hs.151250	U72671	ICAM5	Intracellular adhesion molecule 5, telencephalin	ICAM-5	
Hs.251664	M29645	IGF2	Insulin-like growth factor 2	IGF-II	2
Hs.265829	M59911	ITGA3	Integrin, alpha 3	Integrin α 3	
Hs.227730	X53586	ITGA6	Integrin, alpha 6 subunit	Integrin α6	5
Hs.95008	NM_002256	KISS1	Kiss-1 metastasis-suppressor	KISS1	
Hs.2258	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10	Stromelysin-2	
Hs.155324	X57766	MMP11	Human stromelysin-3	Stromelysin-3	
Hs.2399	D26512	MMP14	Homo sapiens mRNA for membrane-type matrix metalloproteinase 1	MT1-MMP	
Hs.90800	D83646	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	MMP16	
Hs.2256	X07819	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP-7	
Hs.73862	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	

Hs.167988	U63041	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM	
Hs.2561	X52599	NGFB	Nerve growth factor, beta polypeptide	NGFβ	
Hs.37040	X06374	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF α	5
Hs.77274	D00244	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA	5,2
Hs.81256	NM_002961	S100A4	Homo sapiens S100 calcium-binding protein A4	Mts1	5
Hs.55279	NM_002639	SERPINB5	Protease inhibitor 5 that has been shown to function as tumor suppressor in breast and prostate cancer	Maspin	
Hs.82085	M16006	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor, type 1	PAI-1	5
Hs.63236	NM_003087	SNCG	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	BCSG1	
Hs.313	M83248	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Osteopontin	5
Hs.198298	NM_005417	SRC	Human c-src-1 proto-oncogene	c-src	
Hs.170009	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TGF-α	
Hs.245188	NM_000362	TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	TIMP-3	

III. Genes regulados positiva o negativamente por el tratamiento antisentido EWS/FLI-1

UniGene	Genebank	Símbolo	Descripción	Gen	Ref
Hs.77274	D00244	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA	5,7
Hs.169610	M59040	CD44	CD44 antigen (homing function and indian blood group system)	CD44	5,6
Hs.167988	U63041	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM	7,5,6
Hs.325495	NM_003255	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP-2	

IV. Genes regulados negativamente por ASATG

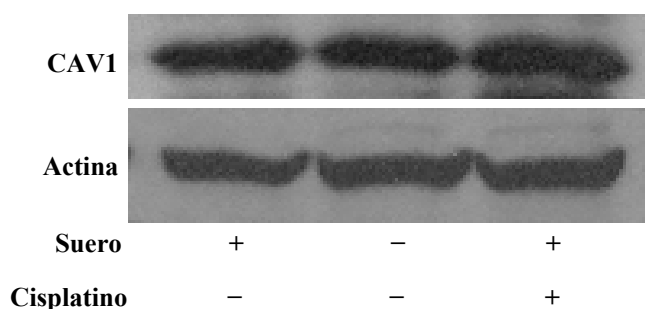
UniGene	Genebank	Símbolo	Descripción	Gen	Ref
Hs.74034	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kD	Caveolin-1	5
Hs.73793	M32977	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF	
Hs.194657	Z13009	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-Cadherin	E-Cadherin	
Hs.287797	BC009469	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor)	Integrin β1	

(1) Cao y cols., 2005; (2) Lessnick y cols., 2002; (3) Rorie y Weissman, 2004; (4) Kathuria y cols., 2004; (5) Fraga y col., 2004; (6) Chitaev y Troyanovsky, 1998; (7) Siligan y cols., 2005. Genes marcados en azul indican datos sobre expresión génica en ESFT que coinciden con estudios previos realizados por otros grupos.

Debido a que se ha demostrado que tanto el uso de AS-ODN como de siRNA para inhibir los niveles de expresión de EWS/FLI-1 dan lugar a la parada en el ciclo celular y/o apoptosis (Ouchida y cols., 1995; Tanaka y cols., 1997; Toretsky y cols., 1997; Matsumoto y cols., 2001; Dohjima y cols., 2003; Kovar y cols., 2003; Chansky y cols., 2004; Maksimenko y Malvy, 2005), la disminución de CAV1 podría ser un efecto indirecto a estos procesos. Para demostrar que este no es el caso, se estudiaron los niveles de expresión de CAV1 en células A4573 mantenidas en presencia o ausencia de suero, y después de la inducción de apoptosis tras el tratamiento con 5 µg/ml de cisplatino, durante 24 h. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión proteicos de CAV1 en ninguno de las condiciones mencionadas anteriormente (Fig. 40). Por lo tanto, la disminución en los niveles de la CAV1 como consecuencia de la inhibición inducida por el AS-ATG y/o el siRNA no es debida a efectos indirectos si no que,

probablemente tenga lugar como respuesta específica a la inhibición del oncogén responsable de ESFT.

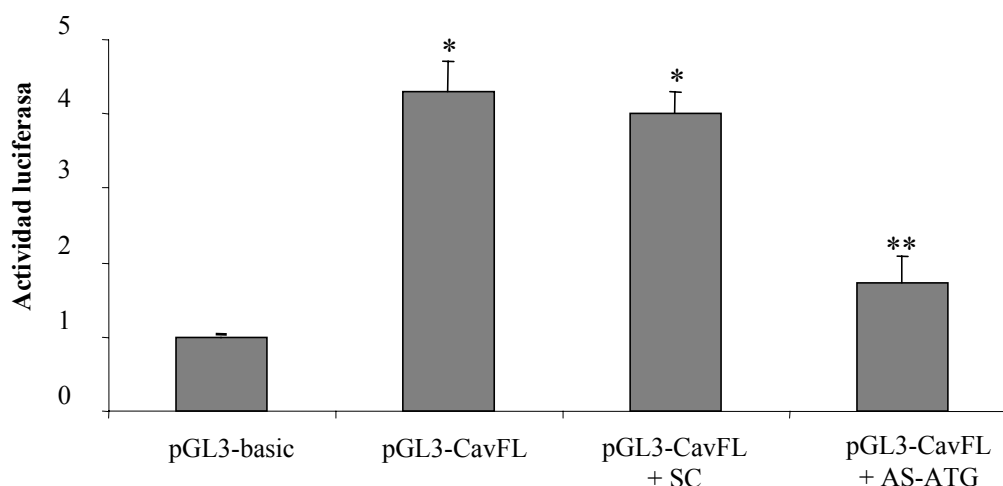
Fig. 40. Niveles de expresión de CAV1 en células A4573 en función del estado de proliferación o apoptosis



Estudio mediante Western blot de los niveles de expresión de CAV1 en células mantenidas en presencia o ausencia de suero, o bajo inducción de apoptosis mediante el tratamiento con 5 µg/ml de cisplatino durante 24 h. La actina se usó como control de carga.

El hecho de que los niveles de CAV1 fueran regulados negativamente tras la inhibición de los niveles de expresión de EWS/FLI-1 mediante dos métodos diferentes, en diferentes líneas celulares, sugirió que la CAV1 podría ser una diana transcripcional de EWS/FLI-1. Para explorar si EWS/FLI-1 participa en la regulación del promotor de *CAVI*, estudiamos la actividad luciferasa mediante ensayos de *gene reporter*, tras transfectar la línea celular A4573 con vectores de expresión que llevaban luciferasa bajo el control transcripcional del promotor de la *CAVI* (pGL3-CavFL) y manteniendo las células en presencia o ausencia de oligonucleótidos AS-ATG o los SC control (Fig. 41). Los resultados mostraron que el promotor de la *CAVI* era funcional en células A4573, y que el incremento en los niveles de luciferasa (aproximadamente 4 veces) respecto a los de las células transfectadas con un vector control sin promotor (pGL3-basic) no fue significativamente afectado cuando fueron tratadas con SC, mientras que la actividad luciferasa sólo se incrementó aproximadamente 1,7 veces en células tratadas con AS-ATG. Estos resultados sugirieron la implicación de EWS/FLI-1 como regulador de la expresión de la CAV1 en células de ESFT (Fig. 41).

Fig. 41. Ensayos de actividad luciferasa del promotor de CAV1



Estudio de la actividad luciferasa del promotor de la CAV1 (pGL3-CavFL) en la línea celular A4573 tratada con AS-ATG, respecto a los controles pGL3-basic y las células tratadas con oligonucleótido control (SC) (*P≤ 0,001 respecto pGL3-basic; **P≤ 0,001 respecto pGL3-Cav1 + SC)

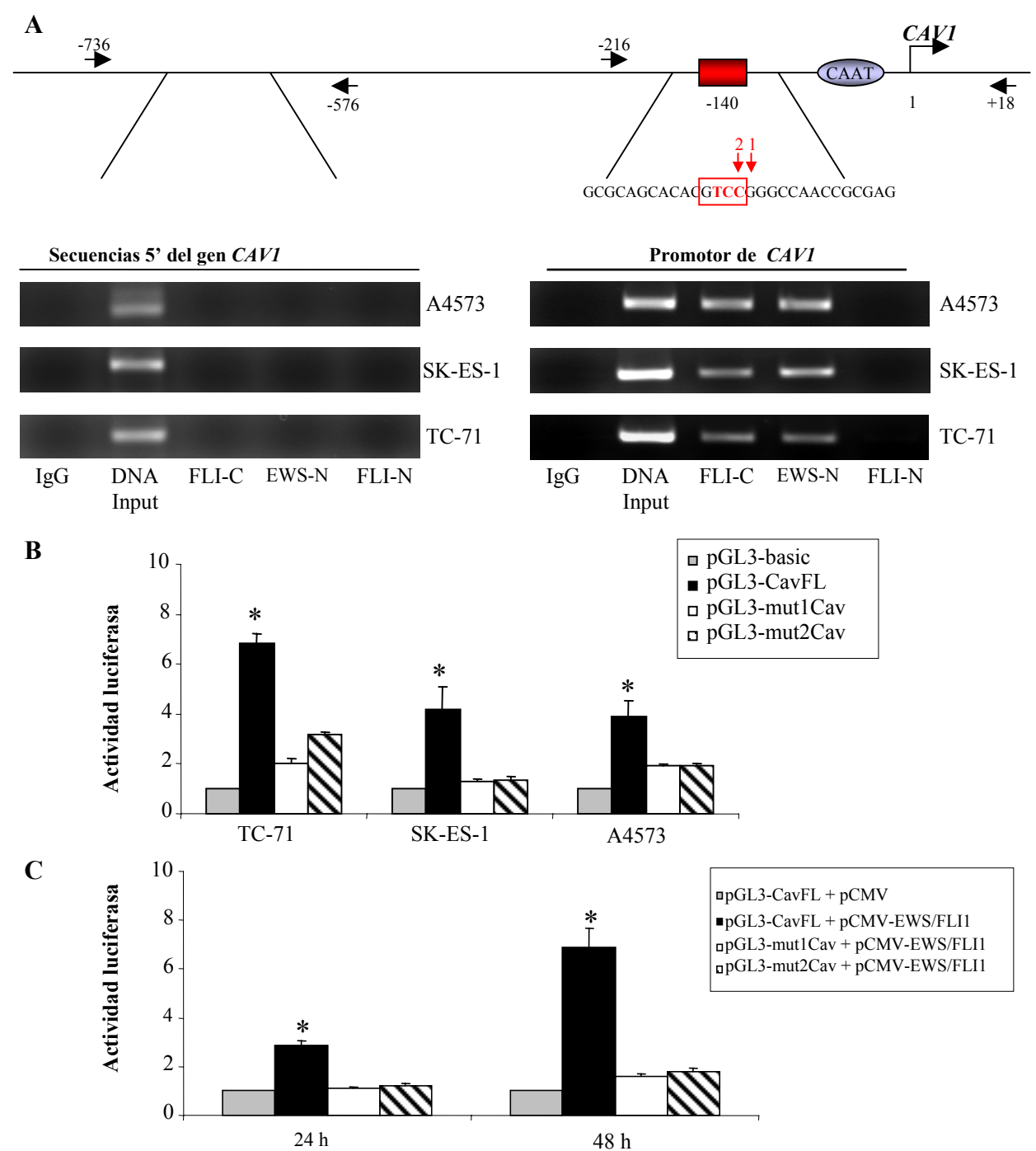
Para explorar la posibilidad de que CAV1 fuese una diana directa de EWS/FLI-1, estudiamos la interacción física directa entre EWS/FLI-1 y el promotor de la CAV1, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Debido a que existen diferentes subtipos de fusión EWS/FLI-1, los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se realizaron en tres líneas celulares de ESFT, portadoras de los tres tipos más frecuentes de proteínas de fusión EWS/FLI-1 (TC-71, SK-ES-1 y A4573). El análisis de la secuencia del promotor de *CAV1* (Genbank accession no. AF095591; Hurlstone y cols., 1999) con el programa MatInspector (Cartharius y cols., 2005), identificó una posible zona de unión a ETS (*Ets binding side*, EBS) en la posición -140. Curiosamente, esta zona GTCC (Fig. 42A) no es la secuencia consenso EBS (Sementchenko y Watson, 2000), pero contiene la zona invariable TCC del *ETS-binding core* (Wasylik y cols., 1993), que tiene actividad en otros promotores (Ma y cols., 1998). Para la amplificación del fragmento que contenía el EBS, se utilizaron cebadores específicos entre las posiciones -216 y +18 del promotor de *CAV1*. La inmunoprecipitación con el anticuerpo que reconoce el extremo carboxiterminal de la proteína FLI-1 mostró que todos los subtipos de EWS/FLI-1 estudiados se unían *in vivo* al EBS del promotor de *CAV1* (Fig. 42A). Además el hecho de que se obtuvieran resultados similares al inmunoprecipitar con un anticuerpo contra el extremo aminoterminal de la proteína EWS, y no cuando se inmunoprecipitaba con un anticuerpo

que reconoce el extremo aminoterminal de FLI-1 (que no está presente en las proteínas de fusión) o con una inmunoglobulina G (IgG) no específica, demostró que la expresión de *CAVI* está regulada por las proteínas de fusión EWS/FLI-1 (Fig. 42A). Los controles adicionales, incluyendo la inmunoprecipitación con los mismos anticuerpos seguida de amplificación con cebadores específicos para la amplificación de una porción del gen de la *CAVI* carente de EBS (posiciones -576 a -736), confirmaron la especificidad de los resultados obtenidos (Fig. 42A).

Para demostrar que las proteínas de fusión EWS/FLI-1 juegan un papel en la regulación de la actividad del promotor de *CAVI* se llevaron a cabo ensayos de *gene reporter* utilizando vectores diseñados para expresar luciferasa bajo el control transcripcional del promotor *wild-type* de *CAVI* (pGL3-CavFL) (Cao y cols., 2005) o versiones del mismo promotor en que se introdujeron mutaciones en dos posiciones del EBS (Fig. 42B): la primera consistía en el cambio de una G por una T en el nucleótido consecutivo al *ETS-binding core* (pGL3-mut1Cav) y la segunda en el cambio de una C por una T dentro del *core* (pGL3-mut2Cav). Estos vectores, y el control negativo pGL3-basic, fueron transfectados transitoriamente en tres líneas celulares de ESFT, TC-71, SK-ES-1 y A4573.

La cuantificación de la actividad luciferasa mostró que el promotor de *CAVI* era activo en las tres líneas celulares, y que su actividad se veía significativamente reducida (2,1 – 3,5 veces) en todas las líneas celulares como consecuencia de la mutación en el posible EBS. El mismo ensayo de *gene reporter* fue llevado a cabo en una línea celular de rhabdomyosarcoma (RD), línea de elección puesto que no tiene la translocación EWS/FLI-1 y expresan niveles de *CAVI* apenas detectables (Hu-Lieskovan y cols., 2005b; Khan y cols., 2001). Para ello, las células de rhabdomyosarcoma, fueron transfectadas transitoriamente con los mismos vectores de expresión con el promotor de *CAVI* junto con un vector en que el promotor de citomegalovirus (CMV) regula la expresión de EWS/FLI-1. Los resultados mostraron un incremento en la actividad de la luciferasa (hasta unas 7 veces mayor, 48 h después de la transfección) sólo en células cotransfectadas con el promotor *wild type* de la *CAVI* y el vector de expresión de EWS/FLI-1. Los niveles de luciferasa en células transfectadas con los vectores portadores de formas mutadas del promotor de *CAVI* no fueron significativamente diferentes de los de células transfectadas con el vector *wild type* de *CAVI* y el vector vacío CMV (Fig. 42C).

Fig. 42. *CAVI* es una diana directa de *EWS/FLI-1*



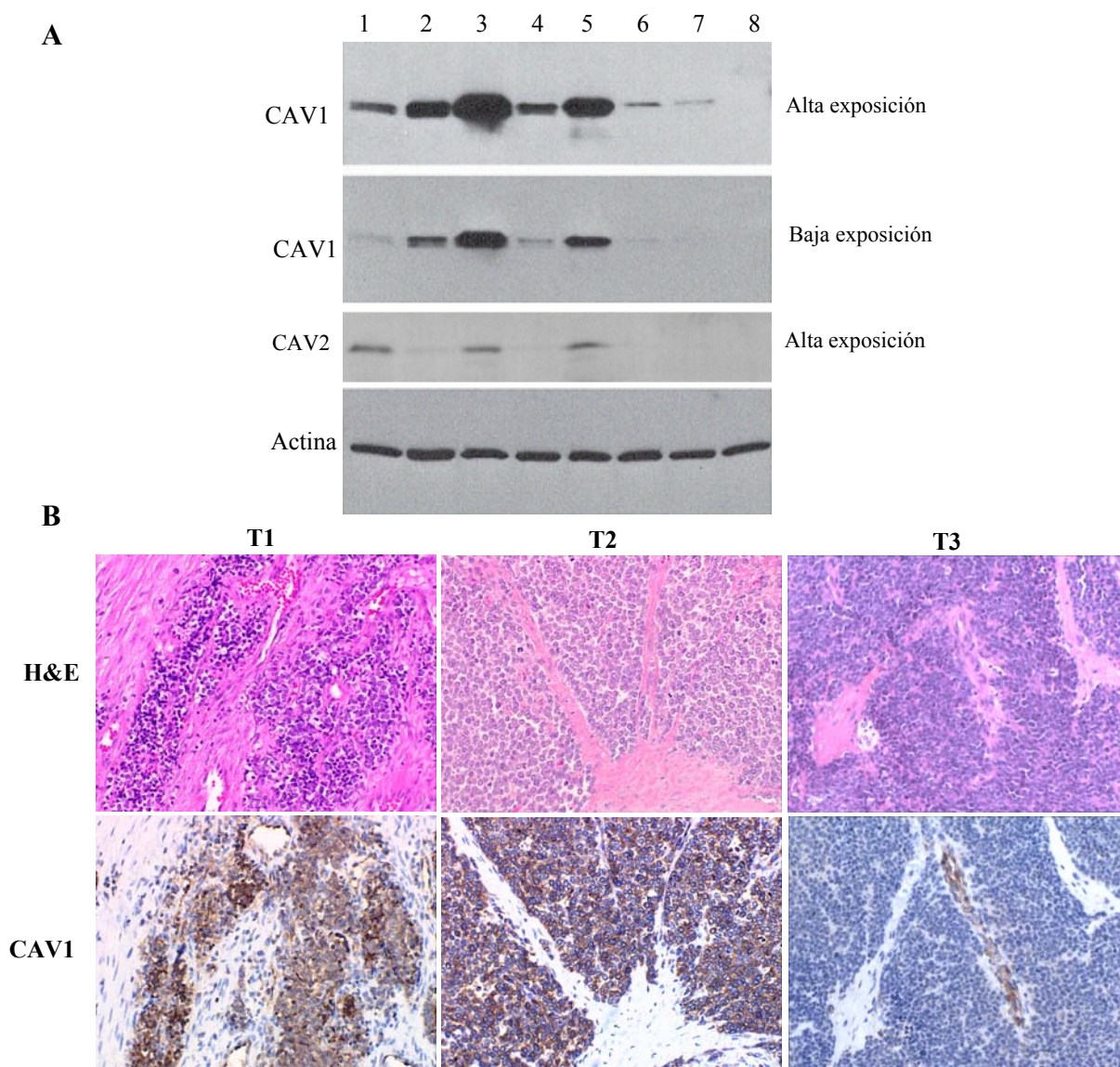
A : Región del promotor de *CAVI* portadora de la secuencia no-consenso EBS (rectángulo rojo). La secuencia invariable de nucleótidos del *core* está marcada en rojo; las flechas rojas indican las bases mutadas. Las flechas negras indican la posición de los cebadores específicos para amplificar la zona mediante PCR, para el ensayo de la inmunoprecipitación de la cromatina. **B** : Estudio de la actividad luciferasa del promotor de *CAVI* con las diferentes mutaciones, en tres líneas celulares de ESFT, relativo al promotor *wild-type* pGL3-Cav1 (* $P \leq 0,001$). **C** : Actividad luciferasa en células RD co-transfectadas con *EWS/FLI-1* y los vectores de expresión de la *CAVI* *wild-type* y mutados (* $P \leq 0,001$).

Los resultados obtenidos en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, junto con los de *gene reporter*, demostraron la unión de EWS/FLI-1 al EBS del promotor de *CAVI*, y esta llama particularmente la atención por ser un sitio ETS que no coincide perfectamente con la secuencia consenso. Sin embargo, se ha descrito que factores de transcripción que interaccionan con sitios ETS pueden unirse a zonas que no coinciden del todo con las secuencias consenso de alta afinidad descritas *in vitro* (Catharius y cols., 2005; Sementchenko y Watson, 2001). En particular, la zona de unión GTCC proporciona actividad funcional al promotor humano *HNP-defensin-1* (Ma y cols., 1998). Parece posible, que siendo un factor de transcripción aberrante, EWS/FLI-1, pudiera tener mayor afinidad por el EBS del promotor de la *CAVI*. Además, la idea de que la *CAVI* es una diana directa de EWS/FLI-1 se confirma mediante los ensayos de *gene reporter*, puesto que la actividad del promotor de la *CAVI* fue significativamente reducida mediante la inhibición de EWS/FLI-1 utilizando oligonucleótidos antisentido y mediante la mutación de un nucleótido del EBS o de una zona adyacente. Por otro lado, la actividad del promotor *wild type* de la *CAVI* aumentó cuando se transfectó conjuntamente con EWS/FLI-1 en células de rhabdomyosarcoma, mientras que su actividad no varió en las versiones mutadas.

2.4.3 Expresión de CAV1 en líneas celulares y tumores sólidos de ESFT

El siguiente paso fue el estudio de la expresión de los niveles proteicos de CAV1 en diferentes líneas celulares y en muestras procedentes de tumores de ESFT en humanos. Los resultados mostraron que todas las líneas celulares de sarcoma de Ewing estudiadas (TC-71, SK-ES-1 y A4573) y PNET (SK-N-MC y TC-32) presentaban niveles elevados de CAV1, incluso mayores que las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP, que han sido descritas como ejemplos de modelos con expresión elevada de CAV1 (Yang y cols., 1998) (Fig. 43A).

Fig. 43. CAV1 está sobreexpresada en células y en tumores sólidos del sarcoma de Ewing



A : Estudio de los niveles de expresión de las proteínas CAV1 y CAV2 en líneas celulares de ESFT (1. TC-71, 2. SK-ES-1, 3. A4573, 4. SK-N-MC, 5. TC-32) utilizando como control positivo las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 (6) y LNCaP(7) y como control negativo la línea celular de cáncer de colon HT-29 (8). La actina se usó como control de carga. **B** : Análisis inmunohistoquímicos de la expresión de la proteína CAV1 en muestras tumorales procedentes de pacientes (T1, T2, T3). H&E, hematoxilina y eosina.

Como comparación, las mismas líneas celulares mostraron niveles bajos de expresión de CAV2, detectables sólo tras tiempos de exposición bastante más largos que los necesarios para detectar CAV1 (Fig. 43A). Además en los ensayos inmunohistoquímicos realizados en 42 muestras procedentes de pacientes con tumores de ESFT, 35 mostraron tinción positiva para CAV1 (83,3%) (Fig. 43B, T1-T2) (Tabla 10), usando la tinción de células endoteliales en las mismas muestras como control positivo. La tinción fue negativa en las

porciones no tumorales de las muestras (T1) o restringida a las células endoteliales de los vasos sanguíneos en muestras tumorales consideradas negativas (T3).

Tabla 10. Análisis inmunohistoquímico de CAV1 en muestras procedentes de pacientes con ESFT

ID PACIENTE	EDAD (años)	TIPO FUSION	LOCALIZACION	ESTADIO	CAV1
C22	12	N/A	Humero	Primario	++
C3	24	N/A	Femur	Primario	++
A3	47	N/A	Ingle	Metastásico	+++
C	16	N/A	Tibia	Primario	+
A6	24	N/A	Dedo	Primario	+++
A12	10	N/A	Faringe	Metastásico	+++
B5	15	N/A	Femur	Primario	++
A3	38	N/A	L5	Primario	++
C1	11	N/A	Femur	Metastásico	+++
S1	N/A	N/A	Piel	Metastásico	+++
T236	25	EWS/FLI1 Tipo 1	Abdomen	Primario	+
T63	7	EWS/FLI1 Tipo 1	Femur	Primario	+++
T241	5	EWS/FLI1 Tipo 1	Torax	Primario	-
T142	12	EWS/FLI1 Tipo 2	Abdomen	Metastásico	+++
T143	12	EWS/FLI1 Tipo 1	Abdomen	Primario	-
T211	1	EWS/FLI1 Tipo 1	Abdomen	Primario	-
T117B	15	EWS/FLI1 Tipo 1	Femur	Metastásico	+++
T150	16	EWS/ERG	Pelvis	Primario	+++
T190	15	EWS/ERG	Mandibula	Primario	++
02B2	14	N/A	Costilla	Primario	+++
02B6	17	N/A	Femur	Primario	+++
94B6	12	N/A	Femur	Primario	+++
00B1	13	EWS/FLI1 Tipo 1	Femur	Primario	+++
99B2	11	N/A	Femur	Primario	+++
00B3	10	EWS/ERG	Femur	Primario	+++
04B9	4	EWS/FLI1 Tipo 1	Torax	Primario	+++
01B2	3	EWS/FLI1 Tipo 1	Abdomen	Primario	+++
96B9	2	N/A	Pelvis	Primario	+++
04B1	7	EWS/FLI1 Tipo 1	Pelvis	Primario	+++
99B3	16	EWS/ERG	Femur	Primario	+++
02B3	11	N/A	Sacro	Primario	+++
01B2	10	EWS/FLI1 Tipo 1	Mandibula	Primario	+++
98B8	4	N/A	Cuello	Primario	+++
01B2	3	EWS/FLI1 Tipo 1	Sacro	Primario	+++
98B2	10	EWS/FLI1 Tipo 1	Mandibula	Primario	+++
04B8	3	EWS/FLI1 Tipo 1	Mandibula	Primario	+++
4B07	16	N/A	N/A	N/A	++
4B08	9	N/A	N/A	N/A	++
4B09	13	N/A	N/A	N/A	+++
4B10	13	EWS/FLI1	N/A	N/A	-
4B11	16	EWS/FLI1	N/A	N/A	++
4B12	1	N/A	N/A	N/A	-

Los niveles elevados de expresión de CAV1 en todas las líneas celulares de ESFT estudiadas y en la mayoría de las muestras tumorales, confirmaron la noción de que CAV1 es una diana transcripcional directa de EWS/FLI-1, de acuerdo con datos publicados

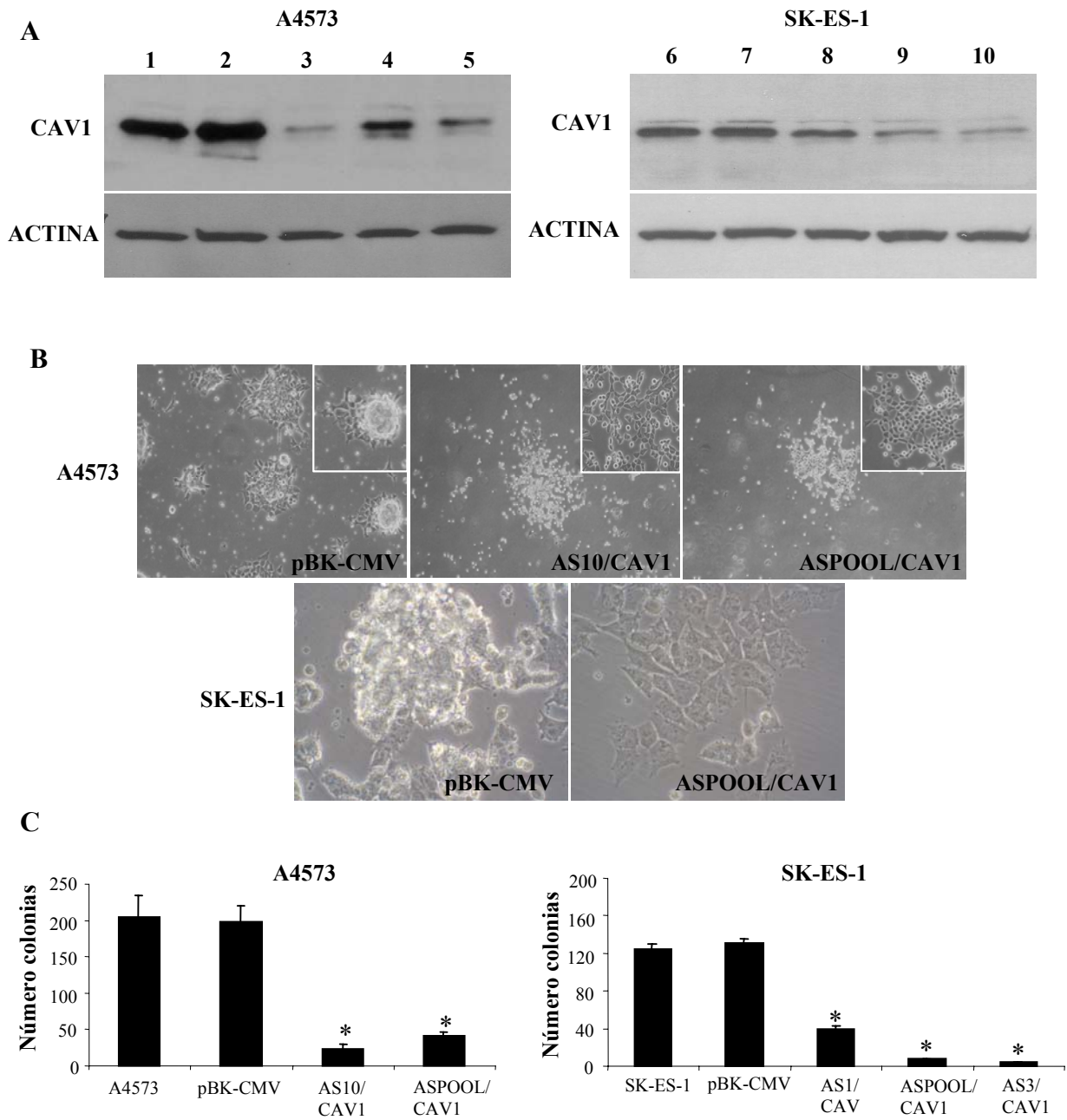
anteriormente que reportaban una asociación de la expresión de CAV1 con metástasis y mal pronóstico para diferentes tipos de cáncer (Williams y cols., 2005), y describió CAV1 como un posible marcador diagnóstico para ESFT (Hu-Lieskovan y cols., 2005b; Khan y cols., 2001; Baird y cols., 2005; Schaefer y cols., 2004).

2.4.4 La inhibición de la expresión de CAV1 reduce el crecimiento independiente del anclaje y la tumorigénesis de las células de ESFT

La proteína CAV1 puede actuar de forma diferente en función del contexto celular o tejido, tipo de tumor y/o estadio de progresión tumoral. Estudios previos mostraron que puede actuar como supresor de tumores, como ocurre en el caso del cáncer de mama (Williams y Lisanti, 2005), o como promotor de tumores, como en el cáncer de próstata (Williams y cols., 2005) o en sarcomas (Wiechen y cols., 2001b).

Para estudiar el posible papel de CAV1 en la oncogénesis inducida por EWS/FLI-1, elegimos la línea celular A4573 puesto que presentaba mayores niveles de expresión de CAV1 (Fig. 43, línea 3). Las células A4573 que fueron transfectadas establemente con un vector diseñado para expresar RNA antisentido de CAV1. Para generar el vector de expresión de CAV1 antisentido (pBK-ASCAV1), una secuencia conteniendo el ORF del gen *CAV1* humano flanqueada por sitios de restricción *Not1/Sall* fue insertada en posición antisentido en los sitios *Sall/Not1* del vector pBK-CMV, que permite la selección de células transfectadas por su resistencia a neomicina. Después de la transfección, los clones individuales y conjuntos heterogéneos de células resistentes al antibiótico fueron seleccionados con neomicina (0,8 mg/ml) posteriormente y mantenidos en presencia del mismo antibiótico. La eficacia de la transfección fue confirmada mediante Western blot de extractos proteicos procedentes de diferentes clones y de un conjunto celular policlonal, tras la selección con neomicina (Fig. 44A). En comparación con las células no transfectadas o transfectadas con el vector vacío (pBK-CMV), todas las células mostraron una reducción de los niveles de expresión de CAV1 (>80 % de inhibición), y el clon 10 (AS10/CAV1), con una reducción de aproximadamente un 90 % (Fig. 44A, línea 3), fue seleccionado para su caracterización.

Fig. 44. Inhibición de la expresión de CAV1 con AS-RNA inhibe el fenotipo maligno de células de sarcoma de Ewing in vitro (A4573 y SK-ES-1)



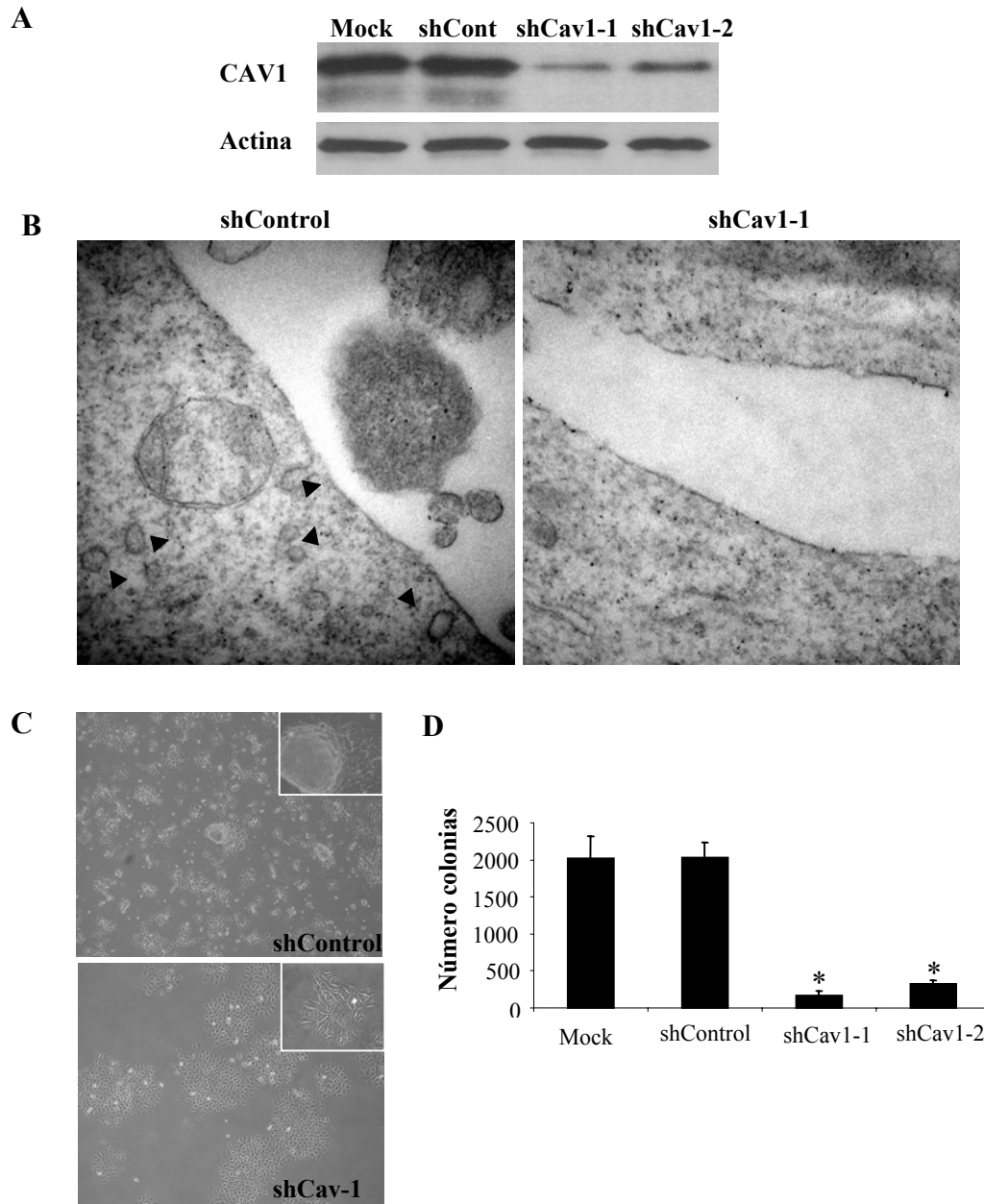
A : Estudio mediante Western blot de la reducción de los niveles proteicos de CAV1 en células de ESFT A4573 y SK-ES-1, transfectadas establemente con RNA antisentido. **1**; A4573 sin transfectar; **2**: A4573 transfectadas con el vector vacío; **3**: A4573 clon 10; **4**: A4573 clon 21; **5**: A4573 *pool*; **6**: SK-ES-1 sin transfectar; **7**: SK-ES-1 transfectadas con el vector vacío; **8**: SK-ES-1 clon 1; **9**: SK-ES-1 *pool*; **10**: SK-ES-1 clon 3. **B**: Micrografía de contraste de fase tomadas al 60 % de confluencia en cultivos control y transfectados en células A4573 y SK-ES-1. **C**: Representación gráfica del número de colonias creciendo en *soft-agar* en células transfectadas respecto al control no transfectado o transfectado con el vector vacío en A4573 y SK-ES-1 (* $P \leq 0,001$).

El estudio morfológico de las células transfectadas AS10/CAV1 y ASPOOL/CAV1 mostró una variedad de cambios en la morfología respecto a las células control no transfectadas o transfectadas con el vector vacío pBK-CMV, que crecían en forma de racimos densos con células que al crecer, formaban estructuras tridimensionales. Por el contrario, las células transfectadas AS/CAV1 o ASPOOL/CAV1 crecían en forma de monocapas más planas, pero manteniendo el mismo tamaño celular (Fig. 44B). Además, el estudio de la inhibición de CAV1 en el crecimiento en medio semisólido (o *soft-agar*), mostró una disminución significativa (aproximadamente un 90 %) en el número de colonias, tanto en células transfectadas AS10/CAV1 como en ASPOOL/CAV1 (Fig. 44C). Cambios similares fueron observados tanto en la morfología como en la inhibición del crecimiento en medio semisólido, en la línea celular SK-ES-1 de ESFT (Fig. 44A-B-C) tras la inhibición de los niveles de expresión de CAV1.

Para demostrar que la variación fenotípica observada era una consecuencia específica de la pérdida de la CAV1, estudiamos los efectos producidos mediante el uso de vectores comerciales para la expresión de shRNAs dirigidos contra dos regiones diferentes de CAV1 (shCav-1 y shCav-2). La eficacia de la transfección fue confirmada mediante Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la CAV1. Los resultados mostraron que la expresión estable de cada vector shRNA reducía significativamente los niveles de expresión de CAV1 (Fig. 45A), siendo algo más efectivo el shCav-1, respecto a los controles transfectados con el vector vacío (shCont) o sin transfectar (*mock*).

Estudios previos en ratones CAV1 (-/-) mostraron el requerimiento absoluto de la CAV1 para la formación de las caveolas (Drab y cols., 2001). En el estudio presente, como consecuencia de la inhibición de CAV1 se observó una desaparición prácticamente completa de las caveolas en la línea celular A4573, en comparación con las células control transfectadas con el vector vacío (shCont), tal y como muestra la imagen obtenida por microscopía electrónica (Fig. 45B).

Fig. 45. Inhibición de la expresión de CAV1 con vectores de expresión de shRNA previene la formación de caveolas e inhibe el fenotipo neoplásico de células A4573 in vitro



A : Estudio de la inhibición de los niveles de expresión de la proteína CAV1 mediante Western blot, tras la transfección estable con diferentes vectores de expresión de shRNA respecto a las células control no transfectadas (*mock*) o transfectadas con el vector vacío (*shCont*). **B** : Microscopía electrónica mostrando la desaparición virtual de las caveolas en células A4573 tras la inhibición de la CAV1 mediante shRNA respecto a las células control. **C** : Micrografía de contraste de fase tomadas al 50-60 % de confluencia en cultivos control y transfectados con shRNA en células A4573. **D**: Representación gráfica del número de colonias creciendo en *sof-agar* en células transfectadas respecto al control no transfectado o transfectado con el vector vacío en A4573 (* $P \leq 0,001$).

Por otro lado, también se observaron cambios morfológicos similares a los descritos anteriormente cuando las células eran transfectadas establemente con el RNA antisentido contra la CAV1 (Fig. 45C). El estudio del crecimiento en medio semisólido (o *soft-agar*) de células de sarcoma de Ewing transfectadas con los vectores shCav-1 y shCav-2 mostró una disminución en el número de colonias creciendo en medio semisólido (aproximadamente un 89 %) respecto la misma línea celular transfectada con el vector control (shCont) o las células sin transfectar (*mock*) (Fig. 45D).

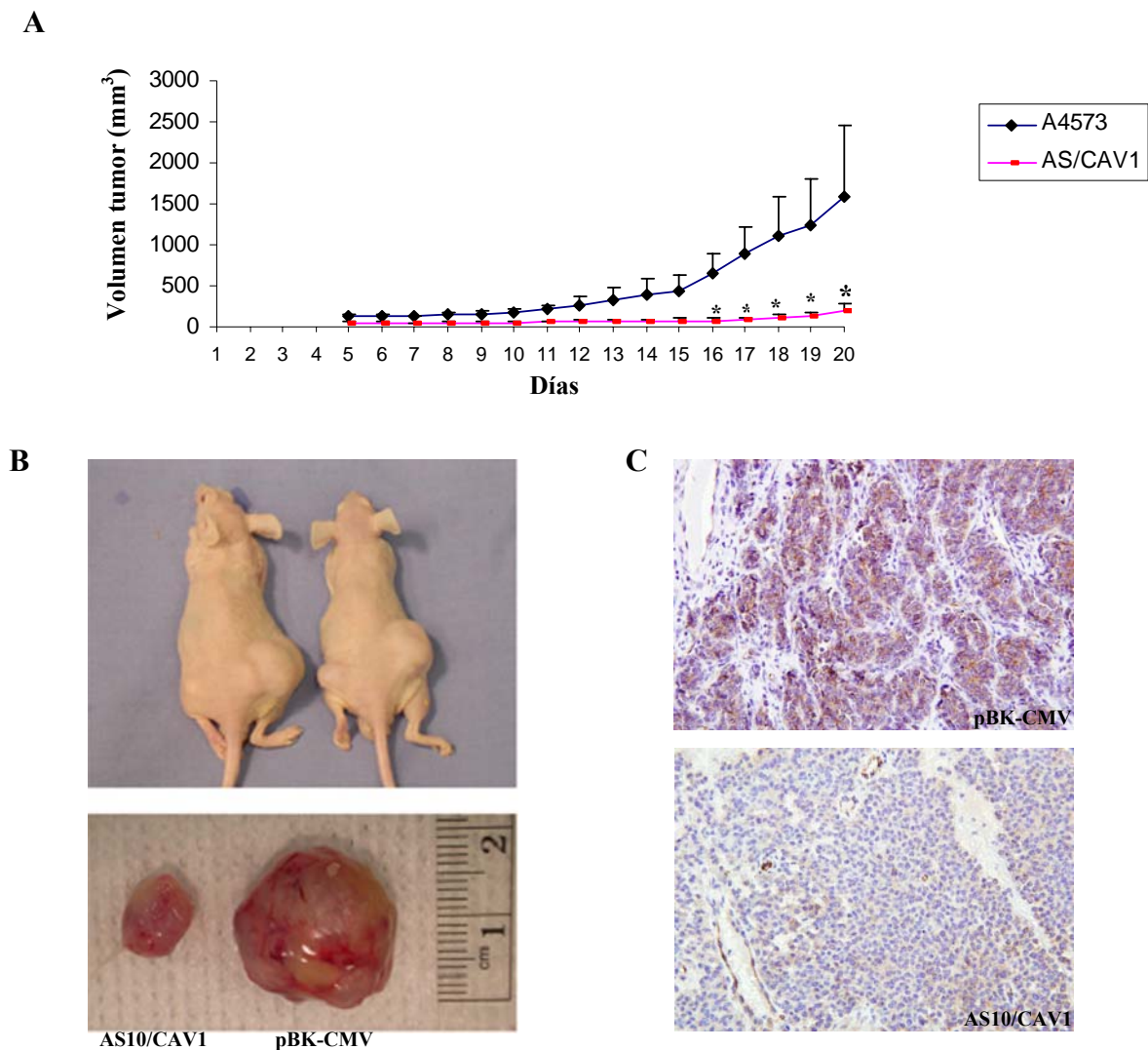
Estos datos demuestran que los efectos observados eran específicos de la inhibición de la CAV1, y confirmaron que la CAV1 juega un papel importante en el control de la morfología y algunas características neoplásicas de las células de ESFT.

2.4.5 La inhibición de la expresión de CAV1 reduce la tumorigénesis de las células de ESFT *in vivo*

El siguiente paso fue el estudio de los efectos de la inhibición de la CAV1 *in vivo*. Para ello, se inyectaron subcutáneamente células A4573/AS10/CAV1 en ratones inmunodeprimidos y como control, la misma línea celular transfectada con el vector vacío A4573/pBK-CMV.

El seguimiento de los tumores se llevó a cabo durante 20 días después de la inoculación celular, cuando los ratones control tuvieron que ser sacrificados siguiendo las normas institucionales de cuidado y uso de animales. Mientras que los tumores en animales control habían alcanzado un volumen de $\sim 1600 \text{ mm}^3$, los tumores derivados de células A4573/AS10/CAV1 que expresaban niveles muy bajos de CAV1, tenían un tamaño de $\sim 250 \text{ mm}^3$ (Fig. 46A-B).

Fig. 46. La inhibición de la expresión de CAV1 reduce la tumorigénesis de células de ESFT in vivo



A : Representación gráfica del crecimiento de los tumores procedentes de células A4573/AS10/CAV1 (AS/CAV1) respecto al control (A4573) (*P= 0,001, diferencias significativas en el volumen del tumor). **B** : Fotografía de ratones de cada grupo experimental con tumores y de los tumores extraídos, en el momento de la eutanasia. **C** : Análisis inmunohistoquímico de los niveles de expresión de CAV1 en secciones procedentes de tumores de ratones inyectados con células A4573/AS10/CAV1 (AS10/CAV1) y células control (pBK-CAV1).

El análisis inmunohistoquímico de secciones procedentes de tumores embebidos en parafina y derivados de la inoculación de células A4573/AS10/CAV1, no mostraron una tinción positiva para CAV1, mientras que la tinción era claramente positiva en tumores control derivados de la inoculación de células A4573 transfectadas con el vector vacío (A4573/pBK-CMV) (Fig. 46C).

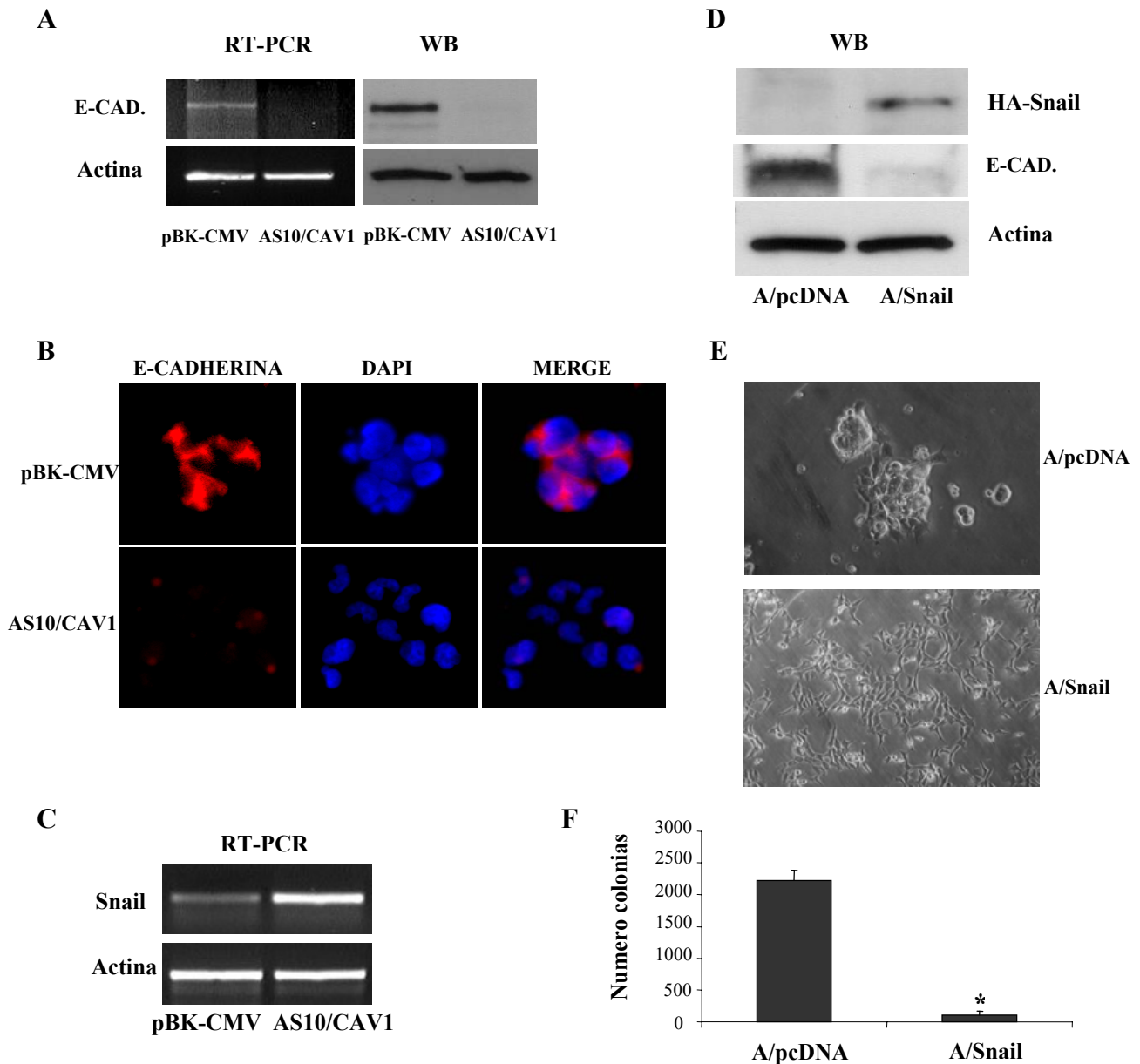
2.4.6 La reducción de la tumorigénesis debida a la inhibición de la expresión de CAV1 se corresponde con la regulación positiva de Snail y la pérdida de E-cadherina

El hecho de que la inhibición de los niveles de expresión de CAV1 provocase cambios morfológicos significativos y la reducción en el número de colonias creciendo en medio semisólido en líneas celulares de ESFT, junto con la inhibición de la tumorigénesis *in vivo*, demostró el papel de la CAV1 como un factor necesario para el desarrollo del fenotipo transformado en la carcinogénesis de ESFT. Estos datos también sugirieron que la inhibición de la expresión de CAV1 podría haber alterado los contactos intercelulares. Estudios previos mostraron que la alteración de los contactos intercelulares estaba mediada por la pérdida de E-cadherina (Lu y cols., 2003).

Para analizar si la alteración observada en los contactos celulares en A4574/AS10/CAV1 era debida a una pérdida o disminución de los niveles de E-cadherina, estudiamos sus niveles de expresión mediante RT-PCR y Western blot (Fig. 47A). Los resultados mostraron una pérdida total de los niveles de RNAm y proteína de la E-cadherina en A4573/AS10/CAV1, respecto a los niveles de expresión en las células control transfectadas con el vector vacío pBK-CMV. Estos resultados fueron confirmados también mediante ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 47B).

Debido a que Snail se ha descrito como un represor transcripcional de E-cadherina (Batlle y cols., 2000; Cano y cols., 2000) y que la inhibición de los niveles de CAV1 inducen una regulación positiva de los niveles de RNAm de *Snail* (Lu y cols., 2003), estudiamos si Snail era un mediador de los efectos de la disminución de los niveles de CAV1 en células de ESFT. Los resultados obtenidos mediante RT-PCR mostraron que, en comparación con las células control A4573/pBK-CMV, la disminución de CAV1 incrementaba la expresión de Snail (Fig. 47C), resultados que se confirmaron en células transfectadas con vectores shRNA para inhibir la expresión de CAV1 (Fig. 48A). La inhibición de los niveles de CAV1 utilizando dos vectores diseñados para interferir con dos secuencias diferentes de *CAV1*, resultó en ambos casos en un aumento de los niveles de expresión de RNAm de Snail (aproximadamente 2 veces) y la inhibición de los niveles de expresión de la proteína E-Cadherina, respecto a las células control no transfectadas o transfectadas con el vector vacío (Fig. 48B).

Fig. 47. Reducción de la tumorigénesis debida a la inhibición de la expresión de CAV1 está correlacionada con una regulación positiva de Snail y la pérdida de E-Cadherina



A : Estudio mediante RT-PCR y Western blot mostrando inhibición en los niveles de expresión de E-Cadherina en células A4573/AS10/CAV1 respecto las células control pBK-CMV. **B** : Inmunofluorescencia mostrando la expresión de E-Cadherina (rojo) y tinción nuclear (azul) en células control y A4573/AS10/CAV1. **C** : Análisis mediante RT-PCR de los niveles de Snail en células A4573/AS10/CAV1 y control. **D** : Western blot mostrando la eficiencia de la transfección con HA-Snail en A4573 y la consecuente disminución de los niveles de expresión de E-Cadherina. **E** : Micrografía de contraste de fase de células transfectadas con el vector vacío A/pcDNA y transfectadas con Snail (A/Snail). **F** : Representación gráfica del número de colonias creciendo en *sof-agar* de células transfectadas A/Snail respecto al control transfectado con el vector vacío en A4573 (* $P < 0,001$).

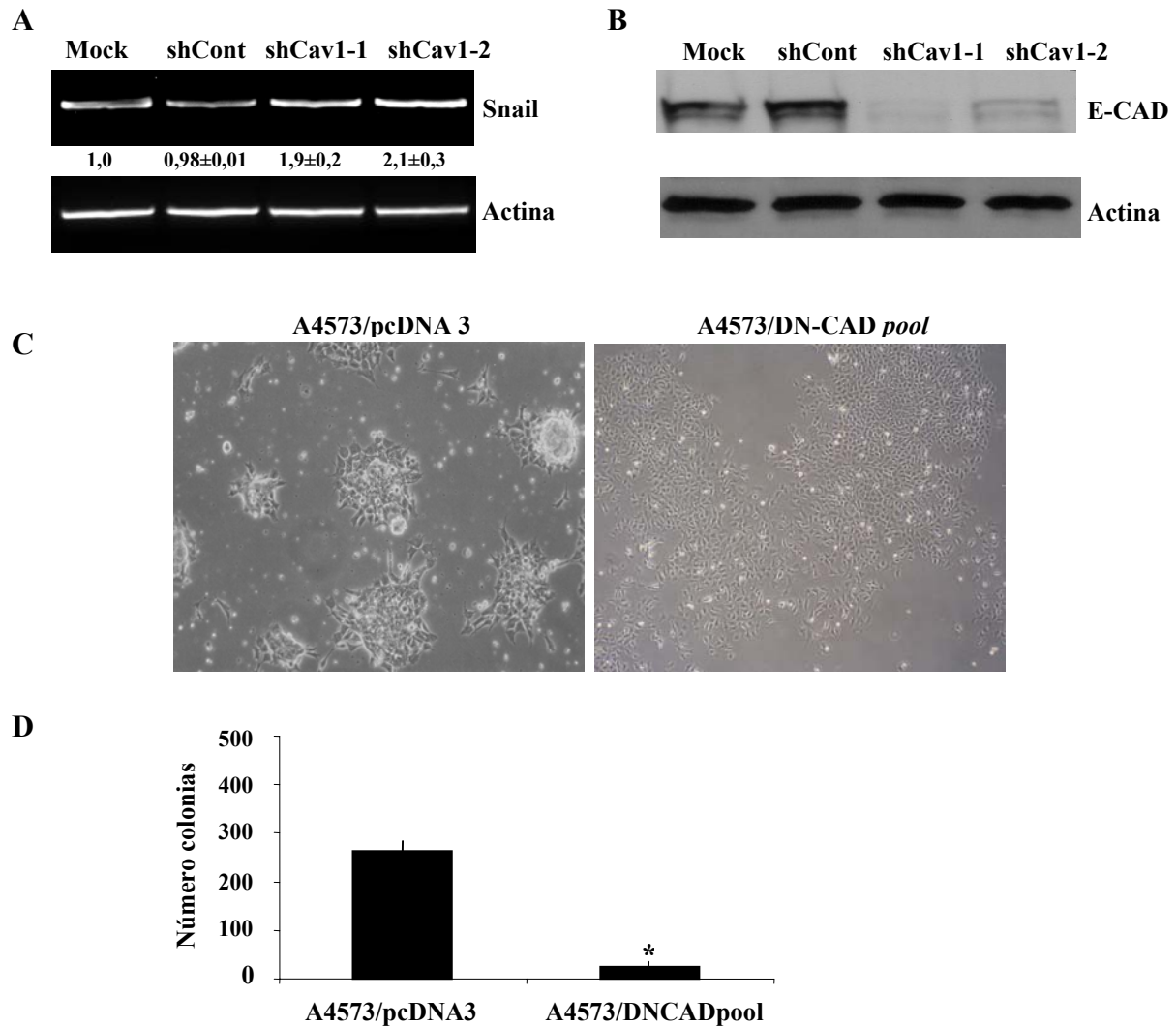
Para demostrar que el aumento de los niveles de expresión de Snail era el responsable de la pérdida de E-cadherina, la alteración de la morfología y la inhibición del crecimiento

independiente del anclaje de las células A4573/AS10/CAV1, la línea celular A4573 fue transfectada establemente con un vector de expresión en que el cDNA de *Snail* estaba fusionado con un péptido señal HA, amablemente cedido por la Dra. A. Cano (Universidad Autónoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España). Los resultados mostraron que la transfección de *Snail* inducía la inhibición de los niveles de expresión de E-cadherina (Fig. 47D) y alteraciones morfológicas en la línea celular A4573 (Fig. 47E) prácticamente idénticas a las inducidas por la inhibición de la CAV1 en A4573/AS10/CAV1, además de la inhibición del crecimiento en medio semi-sólido (Fig. 47F). Estos datos mostraron que el incremento de la expresión de *Snail* fue suficiente para reproducir un fenotipo esencialmente idéntico al provocado por la inhibición de la CAV1 en las células A4573/AS10/CAV1.

En ESFT, la CAV1 podría estar involucrada directa o indirectamente en el mantenimiento de los niveles bajos de *Snail* y, de esta forma, permitir la expresión funcional de la E-cadherina. La pérdida de E-cadherina ha sido descrita como una alteración frecuente en diferentes tipos de cáncer, y ha sido asociada con sus propiedades de invasión/metástasis (Fraga y cols., 2004). Para confirmar el papel biológico de la vía de señalización encabezada por la sobre-expresión de CAV1 en el mantenimiento de los niveles de E-cadherina en ESFT, la línea celular A4573 fue transfectada con un vector de expresión de un mutante dominante-negativo de E-cadherina amablemente cedido por el Dr. S.M. Troyanov (Washington University, St. Louis, MO, USA) para alterar la función de E-Cadherina, y después comparar con las células en las que se había inhibido la expresión de la CAV1 (A4573/AS10/CAV1) (Fig. 44B-C) o se había inducido la sobre-expresión de *Snail* (Fig. 47E-F).

En comparación con las células control transfectadas con el vector vacío, la expresión estable de un mutante dominante-negativo (Trp156Ala; Chitaev y Troyanosvsky, 1998) de E-cadherina, causó cambios morfológicos prácticamente idénticos a los inducidos por la inhibición de CAV1 o la sobre-expresión de *Snail* (Fig. 48C), además de provocar una inhibición del crecimiento de colonias en medio semisólido (Fig. 48D).

Fig. 48. Reducción de la tumorigénesis debido a la inhibición de CAV1 con vectores shRNA

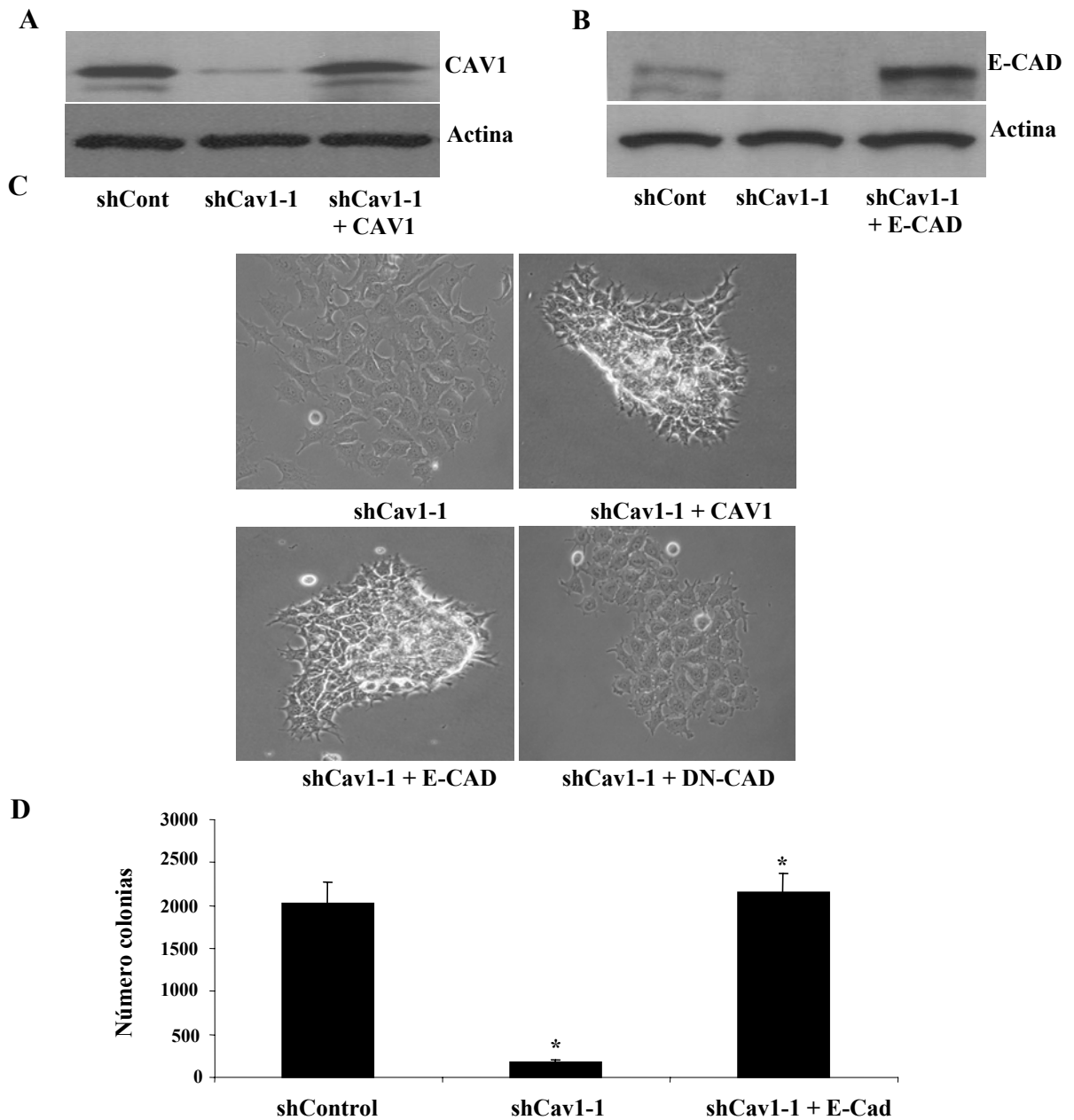


A : Análisis mediante RT-PCR de los cambios inducidos en los niveles de expresión de Snail como consecuencia de la inhibición de la CAV1 por vectores shCav1-1 y shCav1-2, en células A4573. Los valores numéricos corresponden a las determinaciones densitométricas de la intensidad de la señal de 3 experimentos independientes, representado como valor medio \pm desviación estándar. **B** : Estudio de la inhibición de la expresión de la proteína E-Cadherina en células transfectadas shCav-1 y shCav1-2, respecto a las células control no transfectadas o transfectadas con el vector vacío. **C** : Micrografía de contraste de fases de células A4573 transfectadas con el vector vacío A/pcDNA3 y transfectadas con el dominante negativo de la E-Cadherina. **D** : Representación gráfica del número de colonias creciendo en *sof-agar* de células transfectadas DN-CADpool A/Snail, respecto al control transfectado con el vector vacío en A4573 (*P= 0,01).

La importancia de la vía de señalización de CAV1/Snail/E-cadherina en el fenotipo maligno de las líneas celulares de ESFT fue confirmada mediante la reexpresión de CAV1 o E-cadherina en células donde se había inhibido la expresión de CAV1 mediante el uso de vectores shRNA (shCAV1-1) . La eficacia de la transfección fue confirmada mediante Western blot (Fig. 49A-B). Tras la reexpresión de CAV1 o E-cadherina, las células volvieron a crecer formando estructuras densas tridimensionales, mientras que las mismas

células transfectadas con la forma dominante-negativa de E-cadherina, no recuperaron el modelo original de crecimiento de las células A4573 (Fig. 49C). Además la reexpresión también resultó en el rescate de la habilidad de estas células de crecer en medio semisólido (Fig. 49D).

Fig. 49. Recuperación del fenotipo neoplásico mediante la reexpresión de CAV1 o de E-Cadherina



Estudio mediante Western blot de la recuperación de los niveles de CAV1 (**A**) y E-Cadherina (**B**) tras su reexpresión en células transfectadas con vectores shCav-1. La actina se usó como control de carga. **C** : La reexpresión de CAV1 o de E-Cadherina, pero no del mutante dominante negativo de E-Cadherina (DN-CAD), rescataron la morfología original. **D** : Representación gráfica de la capacidad de formación de colonias en *soft-agar* en células transfectadas shCav1 tras la reexpresión de E-Cadherina, respecto células transfectadas con shCav1-1 (*P= 0,001).

Estos resultados demostraron que, en líneas celulares de ESFT donde se había inhibido la expresión de CAV1, su reexpresión provocaba una recuperación de la morfología original y que la inhibición de CAV1 reducía su tumorigénesis, confirmando de esta forma el papel esencial de CAV1 en la promoción del fenotipo maligno en ESFT.

Aunque las células de ESFT expresan niveles detectables de la proteína CAV2, sus niveles de expresión son marcadamente más bajos que los de CAV1, y no fueron significativamente reducidos mediante la inhibición de la expresión de EWS/FLI-1. Esto podría indicar que CAV2 no participaría en la promoción del fenotipo maligno de las células de ESFT.

Recientemente fue descrito (Smith y cols., 2006) que la inhibición de la expresión de EWS/FLI-1 causaba la pérdida de la transformación oncogénica y tumorigénesis en células A673, sin afectar a su crecimiento en cultivo. Estos resultados demostraron que las funciones de EWS/FLI-1 en la estimulación de la proliferación celular y la inducción de la transformación oncogénica y tumorigénesis podrían ser disociadas, y consecuentemente, podrían estar mediadas por grupos independientes de dianas de EWS/FLI-1. En el presente estudio, el hecho de que la inhibición de EWS/FLI-1 resultase en la inhibición de CAV1 a pesar de su efecto en el crecimiento celular sugiere que la CAV1 pertenece a la categoría de dianas de EWS/FLI-1 relacionadas con la transformación oncogénica de ESFT.

Los resultados de este estudio demuestran la contribución de la vía de señalización CAV1/Snail/E-cadherina al fenotipo maligno de células de ESFT, así como la identificación de CAV1 como una diana directa de EWS/FLI-1. Puesto que las células normales presentan niveles más bajos de expresión de CAV1 que las células de ESFT, estos resultados sugieren la utilización de CAV1 como diana para desarrollar nuevas estrategias eficaces y específicas para el tratamiento de ESFT.

3. CONCLUSIONES

3.1 La rapamicina induce una disminución de los niveles de expresión de las proteínas EWS/FLI-1 e inhibe la proliferación de células del sarcoma de Ewing

- La vía de mTOR/p70s6K juega un papel importante en la proliferación de líneas celulares del sarcoma de Ewing
- El tratamiento con 10 ng/ml de rapamicina provoca una parada en el ciclo celular en fase G₁, sin inducir apoptosis, en diferentes líneas celulares del sarcoma de Ewing que expresan diferentes tipos de proteínas de fusión EWS/FLI-1. El mayor efecto se observa a las 72 h después de la administración de la droga.
- Como consecuencia del tratamiento, se produce una disminución de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1, independientemente del tipo de híbrido implicado.
- La rapamicina puede ser utilizada como herramienta útil en la búsqueda de nuevas dianas moleculares de las proteínas de fusión EWS/FLI-1. Además, la rapamicina puede ser utilizada como agente citostático en el tratamiento de sarcomas de Ewing.
- La rapamicina también podría tener un papel importante en el tratamiento de diferentes tipos de tumores donde esté involucrado EWS.

3.2 La inhibición simultánea de EWS/FLI-1 a nivel transcripcional y post-transcripcional induce apoptosis en células del sarcoma de Ewing *in vitro* y prolonga la inhibición del crecimiento de tumores *in vivo*.

- De todos los oligonucleótidos antisentido (AS-ODN) estudiados, dirigidos contra el punto de fusión EWS/FLI-1 tipo 3 o contra la zona que contiene el codón de iniciación de la traducción AUG, el más efectivo inhibiendo la proliferación celular y los niveles de expresión de EWS/FLI-1 es el 12-mer AS-ODN (AS-12).

- El tratamiento con AS-12 también es efectivo en células de sarcoma de Ewing que presentan el tipo 1 de fusión EWS/FLI-1.
- El tratamiento simultáneo con rapamicina y AS-12 induce un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación de células A4573 y en la parada del ciclo celular en fase G₁.
- Como consecuencia del tratamiento con rapamicina y AS-12, se produce una disminución de los niveles de expresión de la proteína de fusión EWS/FLI-1. El mayor efecto se observa a las 48 h después de la administración simultánea de las drogas.
- El tratamiento con AS-12 induce apoptosis dependiente de caspasa-7 a través de un mecanismo que involucra la restauración del bucle pro-apoptótico del TGF- β 1 en células de ESFT. Se observa un efecto aditivo cuando se combina con rapamicina.
- El tratamiento combinado provoca una inhibición prolongada del crecimiento de tumores *in vivo*, relacionada con la inhibición de la proteína de fusión y el incremento de apoptosis dependiente de caspasa-3/-7.
- Los resultados sugieren que el tratamiento combinado con rapamicina y AS-12 podría ser utilizado como una nueva estrategia para el tratamiento de tumores de sarcoma de Ewing.

3.3 La roscovitina es un inductor efectivo de apoptosis en células del sarcoma de Ewing *in vitro* e *in vivo*

- La roscovitina induce muerte celular en células del sarcoma de Ewing, pero no de neuroblastoma, mediante un mecanismo que causa el aumento de expresión de la proteína Bax y la activación de la caspasa-3.

- La roscovitina provoca parada en fase G₁ del ciclo celular como consecuencia del incremento en los niveles de expresión de la proteína p21 inhibidora de las CDKs.
- El tratamiento con roscovitina induce un retraso del crecimiento de tumores *in vivo* relacionado con la activación de caspasa-3
- La roscovitina podría ser utilizada sola o en combinación con otras drogas potencialmente sinérgicas como agente terapéutico en el tratamiento de ESFT.

3.4 La caveolina-1 es una diana transcripcional de EWS/FLI-1 y juega un papel determinante en la expresión del fenotipo oncogénico y la tumorigénesis en células del sarcoma de Ewing

- La expresión de CAV1 se encuentra regulada directamente por la proteína de fusión EWS/FLI-1.
- Los niveles de CAV1 son elevados en todas las líneas celulares de ESFT estudiadas y en la mayoría de muestras tumorales.
- La vía de señalización CAV1/Snail/E-cadherina juega un papel importante en el fenotipo maligno de células de ESFT. La inhibición de la expresión de CAV1 reduce el fenotipo maligno de células de sarcoma de Ewing mediante la regulación positiva de Snail y la pérdida de E-cadherina.
- La inhibición de la expresión de CAV1 reduce la tumorigénesis de células de ESFT *in vivo*.
- La CAV1 podría ser utilizada como diana para desarrollar nuevas estrategias eficaces y específicas para el tratamiento de ESFT.

4. BIBLIOGRAFÍA

Abaan OD, Levenson A, Khan O, Furth PA, Uren A, Toretsky JA. PTPL1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI-1 and modulates Ewing's sarcoma tumorigenesis. *Oncogene* 2005; 24(16):2715-22.

Aboul-Fadl T. Antisense oligonucleotides: the state of the art. *Curr Med Chem* 2005; 12(19):2193-214.

Abraham RT. Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1998; 10(3):330-6.

Albers NW, Williams RT, Brown EJ, Tanaka A, Hall FL, Schreiber SL. FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* 1993; 268(30):22825-9.

Alessi F, Quarta S, Savio M, Alessi F, Quarta S, Savio M, Riva F, Rossi L, Stivala LA, Scovassi AI, Meijer L, Prospero E. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G₁ phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exp Cell Res* 1998; 245:8-18.

Alvi AJ, Austen B, Weston VJ, Fegan C, MacCallum D, Gianella-Borradori A, Lane DP, Hubank M, Powell JE, Wei W, Taylor AM, Moss PA, Stankovic T. A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood* 2005; 105(11):4484-91.

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

Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 2005;65:9953-61.

Angervall L, Enzinger FM. Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer* 1975; 36:240-251.

Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and AKT. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98, 136-141.

Araya N, Hiraga H, Kako K, Arao Y, Kato S, Fukamizu A. Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(2):653-60.

Arvand A, Bastians H, Welford SM, Thompson AD, Ruderman JV, Denny CT. EWS/FLI1 up regulates mE2-C, a cyclin-selective ubiquitin conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* 1998; 17(16):2039-45.

Arvand A, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001; 20,5747-5754.

Aryee DN, Sommergruber W, Muehlbacher K, Dockhom-Dowrniczak B, Zoubek A, Kovar H. Variability in gene expression patterns of Ewing tumor cell lines differing in EWS/FLI1 fusion type. *Lab Invest* 2000; 80(12):1833-44.

Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of thoracopulmonary region in childhood: A distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 1979; 43:2438-2451.

Atienza C Jr, Elliott MJ, Dong YB, Yang HL, Stilwell A, Liu TJ, McMasters KM. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer induces an apoptotic response in human gastric carcinoma cells that is enhanced by cyclin dependent kinase inhibitors. *Int J Mol Med* 2000; 6(1):55-63.

Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma. *C R Seances Acad Sci III* 1983; 296(23):1105-7.

Baer C, Nees M, Breit S, Selle B, Kulozik AE, Schaefer KL, Braun Y, Wai D, Poremba C. Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2004; 110:687-94.

Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, Ghysdael J. 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* 1994; 14(5):3230-41.

Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, Glatfelter AA, Duray PH, Meltzer PS. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 2005; 65(20):9226-35.

Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 3-18.

Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2):84-9.

Belyanskaya LL, Gehrig PM, Gehring H. Exposure on cell surface and extensive arginine methylation of ewing sarcoma (EWS) protein. *J Biol Chem* 2001; 276(22):18681-7.

Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* 2006; 11(5):503-19.

Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. 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* 1996; 15(18):5022-31.

Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene* 2003; 22(42):6579-88.

Blagosklonny MV, Pardee AB. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res* 2001; 61(11):4301-5.

Blaydes JP, Craig AL, Wallace M, Ball HM, Traynor NJ, Gibbs NK, Hupp TR. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 2000; 19(34):3829-39.

Borden EC, Baker LH, Bell RS, Bramwell V, Demetri GD, Eisenberg BL, Fletcher CD, Fletcher JA, Ladanyi M, Meltzer P, O'Sullivan B, Parkinson DR, Pisters PW, Saxman S, Singer S, Sundaram M, van Oosterom AT, Verweij J, Waalen J, Weiss SW, Brennan MF. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin Cancer Res* 2003; 9(6):1941-56.

Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002; 1;111(3):293-303.

Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; 369, 756-758.

Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 1997; 277(5322):99-101.

Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol* 2003; 56:96-102.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2):76-83.

Cao S, Fernandez-Zapico ME, Jin D, Puri V, Cook TA, Lerman LO, Zhu XY, Urrutia R, Shah V. KLF11-mediated repression antagonizes Sp1/sterol-responsive

element-binding protein-induced transcriptional activation of caveolin-1 in response to cholesterol signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(3):1901-10.

Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas-an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 105(1):20-3.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21(13):2933-42.

Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, Kahn-Farooqi W, Zielinska-Kwiatkowska A, Blackburn M, Chansky K, Conrad EW 3rd, Bruckner JD, Greenlee TK, Yang L. Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 2004; 22(4):910-7.

Chitaev NA, Troyanovsky SM. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol* 1998; 142(3):837-46.

Chiu MI, Katz H, Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 12574-12578.

Chou MM, Blenis J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(6):806-14.

Couch FJ, Wang XY, Wu GJ, Qian J, Jenkins RB, James CD. Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59(7):1408-11.

Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, Cranston DW, de Benedetti A, Harris AL. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br J Cancer* 2000; 82(1):161-6.

Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 31-41.

Daldrup-Link HE, Franzius C, Link TM, Laukamp D, Sciuk J, Jurgens H, Schober O, Rummeny EJ. Whole-body MR imaging for detection of bone metastases in children and young adults: comparison with skeletal scintigraphy and FDG PET. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 177:229–236.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; 15;13(22):2905-27.

Dauphinot L, De oliveira C, Melot , Sovenet N, Thomas V, Weissman BE, Delattre O. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 2001; 20(25):3258-65.

David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y, Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 2001;20:5951–63.

De Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998; 16(4):1248-55.

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 1997; 243(1-2):518-26.

De la Motte S, Gianella-Borradori A. Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(4):232-9.

Dean NM, Bennett CF. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 2003; 22(56):9087-96.

Decker T, Hipp S, Ringshausen I, Bogner C, Oelsner M, Schneller F, Peschel C. Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood* 2003; 101(1):278-85.

Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, Aurias A, Thomas G. The Ewing family of tumors-a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *New Engl J Med* 1994; 331(5):294-299.

Delattre O, Zucman J, Plougastrel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 1992; 359:162-165.

Deloulme JC, Prichard L, Delattre O, Storm DR. The prooncprotein EWS binds calmodulin and is phosphorylated by protein kinase C through an IQ domain. *J Biol Chem* 1997; 272(43):27369-77.

Deneen B, Welford SM, Ho T, Hernandez F, Kurland I, Denny CT. PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol Cell Biol* 2003; 23(11):3897-908.

Dennen B, Denny CT. Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene* 2001; 20(46):6731-41.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. Erb-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237(4811):178-82.

Dierick AM, Roels H, Langlois M. The immunophenotype of Ewing's sarcoma. An immunohistochemical analysis. *Pathol Res Pract* 1993; 189(1):26-32.

Dilling MB, Dias P, Shapiro DN, Germain GS, Johnson RK, Houghton PJ. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 1994; 54(4):903-7.

Dohjima T, Lee NS, Li H, Ohno T, Rossi JJ. Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/FLI-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther* 2003; 7:811-816.

Donaldson LW, Petersen JM, Graves BJ, McIntosh LP. Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry* 1994; 33(46):13509-16.

Douglass EC, Valentine M, Green AA, Hayes FA, Thompson EI. t(11;22) and other chromosomal rearrangements in Ewing's sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77(6):1211-5.

Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293:2449-52.

Easton JB, Houghton PJ. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8:551-64.

Easton JB, Kurmasheva RT, Houghton PJ. IRS-1: auditing the effectiveness of mTOR inhibitors. *Cancer Cell* 2006; 9(3):153-5.

Edamatsu H, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F. Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* 2000; 19(27):3059-68.

Elliott MJ, Farmer MR, Atienza C Jr, Stilwell A, Dong YB, Yang HL, Wong SL, McMasters KM. E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells. *Tumour Biol* 2002; 23(2):76-86.

Enneking WF. Musculoskeletal tumor society: staging of musculoskeletal neoplasms. *Skeletal Radiol* 1985; 13:183-194.

Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 1921; 21:17-24.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(8):671-88.

Fellinger EJ, Garin-Chesa P, Su SL, DeAngelis P, Lane JM, Rettig WJ. Biochemical and genetic characterization of the HBA71 Ewing's sarcoma cell surface antigen. *Cancer Res* 1991; 51(1):336-40.

Ferrari S, Thomas G. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994; 29(6):385-413.

Fischer PM, Gianella-Borradori A. CDK inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12(6):955-70.

Flanagan WM, Wagner RW, Grant D, Lin K-Y, Matteucci MD. Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide. *Nat Biotechnol* 1999; 17:48-52.

Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 2004; 64(16):5527-34.

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

Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998; 12(4):502-13.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001; 15, 807-826.

Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(6):468-79.

Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; 77(2):307-16.

Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* 1998; 75:1-55.

Gray N, Detivaud L, Doerig C, Meijer L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr Med Chem* 1999; 6(9):859-75.

Grolleau A, Bowman J, Pradet-Balade B, Puravs E, Hanash S, Garcia-Sanz JA, Beretta L. Global and specific translational control by rapamycin in T cells uncovered by microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2002; 277(25):22175-83.

Gu M, Antonescu CR, Guiter G, Huvos AG, Ladanyi M, Zakowski MF. Cytokeratin immunoreactivity in Ewing's sarcoma: prevalence in 50 cases confirmed by molecular diagnostic studies. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:410-416

Hackl W, Luhrmann R. Molecular cloning and subcellular localisation of the snRNP-associated protein 69KD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties. *J Mol Biol* 1996; 264(5):843-51.

Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PHB, Triche CJ, Kim SJ. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS/FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999; 23(2):222-7.

Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004; 18(4):747-55.

Hajduch M, Havlieek L, Vesely J, Novotny R, Mihal V, Strnad M. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457:341-53.

Hart AH, Reventar R, Bernstein A. Genetic analysis of ETS genes in *C. elegans*. *Oncogene* 2000; 19(55):6400-8.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 15;18(16):1926-45.

Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 2001; 61(6):2361-4.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991; 253 (5022): 905-9.

Helliwell SB, Wagner P, Kunz J, Deuter-Reinhard M, Henriquez R, Hall MN. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* 1994; 5(1):105-18.

Herdewijn P. Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense Nucleic Acids Drug Dev* 2000; 10: 297-310.

Hermanto U, Zong CS, Wang LH. Erb2-overexpressing human mammary carcinoma cells display an increased requirement for the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in anchorage-independent growth. *Oncogen* 2001; 20, 7551-7562.

Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19; 6680-6686.

Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, Vollmer RT, Humphrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical pathologic diagnosis of sarcomas: a prospective study. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:965-977.

Hsu T, Schulz RA. Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene* 2000; 19(55):6409-16.

Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J, Jaffe RB. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002). *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):880-6.

Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. 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* 2005a; 65:8984-8992.

Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. 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* 2005b; 65(11):4633-44.

Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW, Kao SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(8):461-7.

Hunter T. When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* 1995; 83(1):1-4.

Hurlstone AF, Reid G, Reeves JR, Fraser J, Strathdee G, Rahilly M, Parkinson EK, Black DM. Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene* 1999; 18(10):1881-90.

Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, Denny CT, Kim SJ. EWS/FLI-1, EWS-ERG and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer Res* 2000; 60(6):1536-40.

Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, Tannery NH, Agostini RM Jr, Medina J, Goodman M. The neuroectodermal tumor of bone. *Am J Surg Pathol* 1984; 8:885-898.

Jaishankar S, Zhang J, Roussel MF, Baker SJ. Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. *Oncogene* 1999; 30;18(40):5592-7.

Janknecht R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 2005; 363:1-14.

Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995; 10(6):1229-34.

Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F, Fujinaga K. Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15(2):115-21.

Kathuria H, Cao YX, Ramirez MI, Williams MC. Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem* 2004; 279(29):30028-36.

Kato T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Ohbuchi T, Katoh H. Difference of caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 214(1):121-8.

Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 1995; 270(5233):50-1.

Kennedy JG, Frelinghuysen P, Hoang BH. Ewing sarcoma: current concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr* 2003; 15:53-57.

Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001; 7(6):673-9.

Khoury JD. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol*, 2005; 12(4):212-20.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 110(2):16

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 2003; 11:895-904.

Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS. Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 2004; 23(2):446-56.

Kim J, Pelletier J. Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. *Physiol Genomics* 1999; 1(3):127-38.

Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T. Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 *in vitro*. *Science* 1998; 282:487-90.

Koller E, Gaarde WA, Monia BP. Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21:142-8.

Kovar H, Aryee DN, Jug G, Henockl C, Schemper M, Delattre O, Thomas G, Gadner H. EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells *in vitro*. *Cell Growth Differ* 1996; 7(4):429-37.

Kovar H, Ban J, Pospisilova S. Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:275-81.

Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 1997; 15(18):2225-32.

Kovar H, Jug G, Hattinger C, Spahn L, Aryee DNT, Ambros PF, Zoubek A, Gadner H. The EWS protein is dispensable for Ewing tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61(16):5992-7.

Kovar H. Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. *Curr Opin Oncol* 1998; 10:334-342.

Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270(8):1628-44.

Labelle Y, Zucman J, Stenman G, Kindblom LG, Knight J, Turc-Carel C, Dockhorn-Dworniczak B, Mandahl N, Desmaze C, Peter M, et al. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet* 1995; 4(12):2219-26.

Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Hum Pathol* 2000; 31:532–538.

Ladanyi M, Gerald W. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res* 1994; 54(11):2837-40.

Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Subra F, Pinto-Alphandary H, Malvy C, Auclair C, Couvreur P. EWS/FLI-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:401-6.

Lane HA, Fernández A, Lamb NJ, Thomas G. p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature* 1993; 363(6425):170-2.

Lashinger LM, Zhu K, Williams SA, Shrader M, Dinney CP, McConkey DJ. Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(11):4902-8.

Leprince D, Gégonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stehelin D. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 1983; 306(5941):395-7.

Lessnick SL, Braun BS, Denny CT, May WA. Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 1995; 10(3):423-31.

Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 2002; 1(4):393-401.

Li BD, Gruner JS, Abreo F, Johnson LW, Yu H, Nawas S, McDonald JC, DeBenedetti A. Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann Surg* 2002; 235(5):732-8.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275(5308):1943-7.

Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, Ren C, Wang J, Tahir SA, Thompson TC. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(11):4386-92.

Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 1999; 59(7):1428-32.

Lizard-Nacol S, Lizard G, Justrabo E, Turc-Carel C. Immunologic characterization of Ewing's sarcoma using mesenchymal and neural markers. *Am J Pathol* 1989; 135(5):847-55.

Ljungman M, Paulsen MT. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol Pharmacol* 2001; 60:785-9.

Llombart-Bosch A, Lacombe MJ, Contesso G, Peydro-Olaya A. Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features: An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopic support. *Cancer* 1987; 60:1570-1582.

Llombart-Bosch A. Sarcoma de Ewing y tumor neuroectodérmico primitivo periférico de hueso y partes blandas. IV Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, 2001.

Lonnberg H, Vuorio E. Towards genomic drug therapy with antisense oligonucleotides. *Ann Med* 1996; 28(6):511-22.

Lu W, Chen L, Peng Y, Chen J. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene* 2001; 20(25):3206-16.

Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003; 4(6):499-515.

Ma Y, Su Q, Tempst P. Differentiation-stimulated activity binds an ETS-like, essential regulatory element in the human promyelocytic defensin-1 promoter. *J Biol Chem* 1998; 273(15):8727-40.

MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP, Green SR. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 2005; 65(12):5399-407.

Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, Chavaudra N, Jeanson L, Milliat F, Eschwege F, Bourhis J. Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003; 63(10):2513-7.

Maksimenko A, Malvy A. Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9:825-30.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3):222-31.

Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S, Bullrich F, Testi MA, Mezzelani A, Radice P, Azzarelli A, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 2000; 19(33):3799-804.

Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Flil fusion gene results in changes in the expression of G₁ regulatory genes. *Br J Cancer* 2001; 84:768-775.

Maude SL, Ender GH. Cdk inhibition in human cells compromises chk1 function and activates a DNA damage response. *Cancer Res* 2005; 65(3):780-6.

May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* 1997; 17(4):495-7.

May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT. 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* 1993a; 90(12):5752-6.

May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. 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* 1993b; 13(12):7393-8.

McClue SJ, Blake D, Clarke R, Cowan A, Cummings L, Fischer PM, MacKenzie M, Melville J, Stewart K, Wang S, Zhelev N, Zheleva D, Lande DP. *In vitro* and *in vivo* antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* 2002; 102(5):463-8.

Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 243(1-2):527-36.

Meijer L, Kim SH. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Methods Enzymol* 1997; 283:113-28.

Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59(8):1903-10.

Miller PS, Ts'o Po. A new approach to chemotherapy based on molecular biology and nucleic acid chemistry: Matagen (masking tape for gene expression). *Anticancer Drug Des* 1987; 2: 117-28.

Misawa A, Hosoi H, Tsuchiya K, Sugimoto T. Rapamycin inhibits proliferation of human neuroblastoma cells without suppression of MycN. *Int J Cancer* 2003; 104, 233-237.

Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(4 Suppl 1):S169-77.

Mo Y, Vaessen B, Johnston K, Marmorstein R. Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA. *Nat Struct Biol* 2000; 7(4):292-7

Morán González D, Domínguez-Gil Hurlé A. Antisense therapy in oncology: present situation. *Farm Hosp* 2005; 29(4):269-82.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374(6518):131-4.

Mouraviev V, Li L, Tahir SA, Yang G, Timme TM, Goltsov A, Ren C, Satoh T, Wheeler TM, Ittmann MM, Miles BJ, Amato RJ, Kadmon D, Thompson TC. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol* 2002; 168:1589-96.

Muthukkumar S, Ramesh TM and Bondada S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation* 1995; 60(3):264-70.

Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Iwamoto Y. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003; 278(17):15105-15.

Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ. Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118(6):608-15.

Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, Irifune H, Zembutse H, Tanaka T, Aoyama T, Hosaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Toguchida J, Nakamura Y, Tokino T. The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 2002; 21(54):8302-9.

Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Nishimune Y, Nozaki M. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2000; 60(5):1348-52.

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; 100:71–8.

Nurse PM. Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep* 2002; 22(5-6):487-99.

Ohali A, Avigad S, Zaizov R, Ophir R, Horn-Saban S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Yaniv I. Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. *Oncogene* 2004; 23(55):8997-9006.

Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, Rao VN, Reddy ES. 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* 1994; 9(10):3087-97.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500-1508.

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

Owen LA, Lessnick SL. Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* 2006; 5(18):2049-53.

Pahlich S, Bschr K, Chiavi C, Belyanskaya L, Gehring H. Different methylation characteristics of protein arginine methyltransferase 1 and 3 toward the Ewing Sarcoma protein and a peptide. *Proteins* 2005; 61(1):164-75.

Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* 1953; 24:1424-1436.

Panagopoulos I, Hoglund M, Mertens F, Mandahl N, Mitelman F, Aman P. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene* 1996; 12(3):489-94.

Parton RG. Life without caveolae. *Science* 2001; 293:2404-5.

Paterson BM, Roberts BE, Kuff EL. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(10):4370-4.

Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O. A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 1997; 14(10):1159-64.

Petermann R, Mossier BM, Aryee DN, Khazak V, Golemis EA, Kovar H. Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hsRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene* 1998; 17(5):603-10.

Pierce JH, Arnstein P, Di Marco E, Artrip J, Kraus MH, Lonardo F, Di Fiore PP, Aaronson SA. Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1991; 6(7):1189-94.

Plougastel B, Zucman J, Peter M, Thomas G, Delattre O. Genomic structure of the EWS gene and its relationship to EWSR1, a site of tumor-associated chromosome translocation. *Genomic* 1993; 18(3):609-15.

Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. 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* 2004; 24(16):7275-83.

Ramani P, Rampling D, Link M. Immunocytochemical study of 12E7 in small round-cell tumours of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity. *Histopathology* 1993; 23(6):557-61.

Rausher FJ 3rd, Benjamin LE, Fredericks WJ, Morris JF. Novel oncogenic mutations in the WT1 Wilm's tumor suppressor gene. a t(11;22) fuses the Ewing's sarcoma gene, EWS1, to WT1 in desmoplastic small round cell tumor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994; 59:137-46.

Ravichandran LV, Dean NM, Marcusson EG. Use of antisense oligonucleotides in functional genomics and target validation. *Oligonucleotides* 2004; 14(1):49-64.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001; 276(41):38121-38.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002; 54(3):431-67.

Ribas J, Boix J. Cell differentiation, caspase inhibition, and macromolecular synthesis blockage, but not BCL-2 or BCL-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs. *Exp Cell Res* 2004; 295(1):9-24.

Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997; 57(21):4736-8.

Rodriguez-Galindo C. Pharmacological management of Ewing sarcoma family of tumors. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(6):1257-70.

Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2004; 64(4):1266-77.

Rorie CJ, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res* 2004; 64(20):7288-95.

Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, Savas L, London IM, Pullman J. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene* 1999; 18(15):2507-17.

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; 78(1):35-43.

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; 270(2):815-22.

Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:15-34.

Sandberg AA, Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123(1):1-26.

Sapi E, Flick MB, Rodov S, Kacinski BM. Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent growth and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58(5):1027-33.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; 14(14):1296-302.

Schaefer KL, Brachwitz K, Braun Y, Diallo R, Wai DH, Zahn S, Scheider DT, Kuhnen C, Vollmann A, Brockhoff G, Gabbert HE, Poremba C. Constitutive activation of neuregulin/ERBB3 signaling pathway in clear cell sarcoma of soft tissue. *Cancer Res* 2004; 64:3395-405.

Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64(20):7183-90.

Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell issue Res* 2002; 307:1-14.

Schutte B, Nieland L, van Engeland M, Henfling ME, Meijer L, Ramaekers FC. The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res* 1997; 236(1):4-15.

Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, Serra M, Manara MC, Picci P, Baldini N. Blockage of insulin-like growth factor-I receptor

inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 1998; 58(18):4127-31.

Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* 1975; 28:727-32.

Sementchenko VI, Schweinfest CW, Papas TS, Watson DK. ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. *Oncogene* 1998; 17(22):2883-8.

Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000; 18;19(55):6533-48.

Senderowicz AM. Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene* 2003; 29;22(42):6609-20.

Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(16):2462-78.

Seufferlein T, Rozengurt E. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1996; 1;56(17):3895-7.

Shah SA, Potter MW, Ricciardi R, Perugini RA, Callery MP. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res* 2001; 97(2):123-30.

Shanfield RI. Immunohistochemical analysis of neural markers in peripheral primitive neuroectodermal tumor (pPNET) without light microscopic evidence of neural differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 1997; 5:78-86.

Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-

like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(10):1533-40.

Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, Tillman RM, Ramani P, Cullinane C, Coleman N. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res* 2003; 1;63(15):4568-76.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7265-79.

Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807-821.

Siligan C, Ban J, Bachmaier R, Spahn L, Kreppel M, Schaefer KL, Poremba C, Aryee DN, Kovar H. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 2005; 24(15):2512-24.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1):31-39.

Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol* 2002;156:969-81.

Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene* 2004; 23(47):7893-7.

Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, Lessnick SL. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 2006; 9(5):405-16.

Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(2):268-75.

Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 2004; 64(22):8213-21.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15(4):356-62.

Stout AP. A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc* 1918; 12:2-12.

Strammiello R, Benini S, Manara MC, Perdichizzi S, Serra M, Spisni E, Picci P, Scotlandi K. Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* 2003; 35(11-12):675-84.

Strauss G, Osen W, Degatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:255-266.

Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, Thompson TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61(10):3882-5.

Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Fli1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 99:239-247.

Tanaka M, Nyce JW. Respirable antisense oligonucleotides: a new drug class for respiratory disease. *Respir Res* 2001; 2(1):5-9.

Tefftg M, Vawter GF, Mitus A. Paravertebral “round cell” tumors in children. *Radiology* 1969; 92:1501-1509.

Teitell MA, Thompson AD, Sorensen PH, Shimada H, Triche TJ, Denny CT. EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts. *Lab Invest* 1999; 79(12):1535-43.

Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20):10983-5.

Thacker MM, Temple HT and Scully SP. Current treatment for Ewing’s sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005; 5(2):319-31.

Thompson AD, Braun BS, Arvand A, Stewart SD, May WA, Chen E, Korenberg J, Denny C. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 1996; 13(12):2649-58.

Thompson AD, Teitell MA, Arvand A, Denny CT. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 1999; 30;18(40):5506-13.

Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Rapamycin induces apoptosis of JN-DSRCT-1 cells by increasing the Bax: Bcl-xL ratio through concurrent mechanisms dependent and independent of its mTOR inhibitory activity. *Oncogene* 2005; 24:3348-57.

Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 1997; 31(1-2):9-16.

Toretsky JA, Thakar M, Eskenazi AE, Frantz CN. Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Cancer Res* 1999; 59(22):5745-50.

Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 12(1):1-19.

Uren A, Toretsky JA. Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol* 2005; 1(4):521-8.

Van der Poel G, Hanrahan C, Zhong H, Simons W. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res* 2003; 30(6):380-6.

Varani G, Nagai K. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998; 27:407-45.

Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 1975; 28:721-6.

Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005; 16(4):525-37.

Visner GA, Lu F, Zhou H, Liu J, Kazemfar K, Agarwal A. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin. *Circulation* 2003; 107(6):911-6.

Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197(2):95-108.

Wagner LM, Neel MD, Pappo AS, Merchant TE, Poquette CA, Rao BN, Rodriguez-Galindo C. Fractures in pediatric Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23(9):568-71.

Wagner RW, Matteucci MD, Grant D, Huang T, Froehler BC. Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. *Nat Biotechnol* 1996; 14:840-844.

Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993; 15;211(1-2):7-18.

Watanabe G, Nishimori H, Irifune H, Sasaki Y, Ishida S, Zembutsu H, Tanaka T, Kawaguchi S, Wada T, Hata J, Kusakabe M, Yoshida K, Nakamura Y, Tokino T. Induction of tenascin-C by tumor-specific EWS-ETS fusion genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36(3):224-32.

Weidner N, Tjoe J. 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* 1994; 18(5):486-94.

Welford SM, Hebert SP, Deneen B, Arvand A, Denny CT. DNA binding domain-independent pathways are involved in EWS/FLI1-mediated oncogenesis. *J Biol Chem* 2001; 9;276(45):41977-84.

Węsierska-Gądek J, Gueorguieva M, Horky M. Roscovitine-induced up-regulation of p53AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(1):113-24.

Węsierska-Gądek J, Schmid G. Dual action of the inhibitors of cyclin-dependent kinases: targeting of the cell-cycle progression and activation of wild-type p53 protein. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15(1):23-38.

West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma an peripheral primitive neuroectodermal tumor. *J Clin Oncol* 1997; 15:583-588.

West DC. Ewing sarcoma family of tumors. *Curr Opin Oncol* 2000; 12:323-9.

Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P. The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 2004; 64(1):262-72.

Widhe B, Widhe T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82:667-674.

Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R, Sers C. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001a; 159(5):1635-43.

Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, Schneider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol*. 2001b; 158(3):833-9.

Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Loda M, Lisanti MP. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem* 2005; 280(26):25134-45.

Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:494-506.

Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Węsierska-Gądek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003; 106(4):486-95.

Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89(8):2994-8.

Woolf T. It's not the size, it's the potency. *Nat Biotechnol* 1996;14:824.

Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko LV, Vlassov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(17):6454-8.

Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1:445-458.

Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(8):1873-80.

Yang G, Truong LD, Wheeler TM, Thompson TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res* 1999; 59(22):5719-23.

Yen HC, Tang YC, Chen FY, Chen SW, Majima HJ. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042:516-22.

Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 1997; 14(11):1259-68.

Zaharevitz DW, Gussio R, Leost M, Senderowicz AM, Lahusen T, Kunick C, Meijer L, Sausville EA. Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* 1999; 59(11):2566-9.

Zakaryan RP, Gehring H. Identification and characterization of the nuclear localization/retention signal in the EWS proto-oncoprotein. *J Mol Biol* 2006; 363(1):27-38.

Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous Sarcoma Virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75(1): 280-284.

Zhang D, Paley AJ, Childs G. The transcriptional repressor ZFM1 interacts with and modulates the ability of EWS to activate transcription. *J Biol Chem* 1998; 273(29):18086-91.

Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PH, Triche TJ. Selective usage of D-Type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2004; 64:6026-34.

Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gardner H, Kovar H. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 1996; 14(4):1245-51.

Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Epstein AL, Stenman G, Speleman F, Fletchers CD, Aurias A, Thomas G. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nat Genet* 1993a; 4(4):341-5.

Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Plougastrel B, Joubert I, Melot T, Peter M, De Jong P, Rouleau G, Aurias et al. Cloning and characterization of the Ewing's Sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints. *Genes Chromosom Cancer* 1992; 5:271-277.

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

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

Zwerner JP, May WA. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* 2001; 20(5):626-33.

5. ANEXOS

5.1 ARTÍCULO I

Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation

Silvia Mateo-Lozano^{1,2}, Oscar M Tirado^{1,2} and Vicente Notario^{*:1}

¹Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Washington, DC, USA

Ewing's sarcoma (ES) is the prototype of a family of tumors (ESFT) of neuroectodermal origin formed by small, round cells with limited neural differentiation, which arise most frequently within bones in children or adolescents. The proliferation of ESFT cells is highly dependent on the establishment of, and signaling through several growth factor-mediated autocrine loops. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central regulator of translation and cell proliferation, involved in the cellular response to various nutritional, stress and mitogenic effectors. As mTOR has recently been associated with certain human cancers, we investigated the possibility that mTOR played a role in the regulation of ES cell proliferation. Results showed that ES cell lines carrying *EWS/FLI-1* alleles of different types expressed different levels of total and phosphorylated mTOR protein. We demonstrate that rapamycin, an mTOR inhibitor, efficiently blocked the proliferation of all cell lines by promoting cell cycle arrest at the G₁ phase. This was paralleled by the downregulation of the levels of the *EWS/FLI-1* proteins, regardless of their fusion type, and the concomitant restoration of the expression of the TGF- β type 2 receptor (TGF β RII), which is known to be repressed by several EWS-ETS fusion proteins. The expression of a rapamycin-resistant mTOR construct prevented both the proliferation blockade and the *EWS/FLI-1* downregulation. These data demonstrate that mTOR signaling plays a central role in ES cell pathobiology and strongly suggest that the use of rapamycin as a cytostatic agent may be an efficient tool for the treatment of ES patients.

Oncogene (2003) 22, 9282–9287. doi:10.1038/sj.onc.1207081

Keywords: mTOR; rapamycin; EWS/FLI-1; Ewing's sarcoma

Ewing's sarcoma (ES) and primitive neuroectodermal tumors (PNET) are characterized by the presence of a specific chromosomal translocation leading to the fusion

of the 5' end of the *EWS* gene and the 3' end of various genes encoding transcription factors of the ETS family, usually *FLI-1* and *ERG*. The most frequent fusion, resulting from a t(11;22)(q24;q12) translocation, involves *EWS* and *FLI-1* and is found in about 90–95% of the cases (Arvand and Denny, 2001). Identification of several breakpoints for both *EWS* and *FLI-1* demonstrated that *EWS/FLI-1* fusion genes are heterogeneous. Breakpoints of type 1 (exon 7 of *EWS*/exon 6 of *FLI-1*), type 2 (exon 7 of *EWS*/exon 5 of *FLI-1*) and type 3 (exon 10 of *EWS*/exon 6 of *FLI-1*) (Delattre *et al.*, 1992) are most commonly detected in patients (Zucman *et al.*, 1993). Although similar *FLI-1* sequences present in distinct *EWS/FLI-1* fusion proteins provide their DNA-binding specificity, they show different transactivation potential and their differential activities correlate with the malignant characteristics of the cells in culture and with the clinical presentation of the tumors (Lin *et al.*, 1999). When detected early, localized ES/PNET tumors have a relatively good prognosis, with survival rates of up to 60–70%. However, these tumors metastasize quite efficiently and the treatment of metastatic disease has been rather unsuccessful to date (Rodriguez-Galindo *et al.*, 2003). Consequently, understanding the mechanisms that sustain ES/PNET growth and promote metastasis may lead to the identification of novel therapeutic targets and agents that will help in devising more effective treatment protocols.

Recent studies have demonstrated essential roles for signaling pathways triggered by growth factors such as IGF-1 and PDGF-C and their receptors in maintaining the neoplastic phenotype and proliferation of ES/PNET cells (Scotland *et al.*, 1998; Toretsky *et al.*, 1999; Zwerner and May, 2001; Üren *et al.*, 2003). Accordingly, it has been proposed (Hidalgo and Rowinsky, 2000) that inhibition of elements common to both signaling systems, such as PI3K, AKT or transducers further downstream, may provide effective antitumor activity in itself and/or enhance the chemotherapeutic efficacy of other agents. The fact that transformation by PI3K and AKT is dependent on the phosphorylation and activation of the 40S ribosomal protein S6 kinase (p70^{S6K}) and the phosphorylation of eucaryotic initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1) by mTOR (Aoki *et al.*, 2001) led us to explore the possible involvement of mTOR in ES/PNET cell proliferation as well as the potential use of the mTOR-specific inhibitor rapamycin

*Correspondence: V Notario, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Research Building, Room E215, 3970 Reservoir Road, NW, Washington, DC 20057-1482, USA; E-mail: notariov@georgetown.edu

²Both contributed equally to this work

Received 5 June 2003; revised 6 August 2003; accepted 6 August 2003

(Abraham, 1998) as an antitumor agent for ES/PNET tumors. In this study, we assessed the activity of rapamycin against ES tumor cell lines representative of the three most common EWS/FLI-1 fusion types. We demonstrate that rapamycin inhibited the proliferation of all ES cell lines by downregulating the levels of the EWS/FLI-1 fusion proteins, independent of the fusion type involved.

In order to establish a possible role for mTOR in ES cell proliferation, we first determined whether the mTOR protein was expressed, and its phosphorylation status, in cell lines TC-71, SK-ES-1 and A4573, which carry type 1, 2 and 3 EWS/FLI-1 fusions (Delattre *et al.*, 1992), respectively. Western analyses with anti-mTOR and anti-phospho-mTOR (Figure 1a) showed that, when growing exponentially, all three lines expressed various levels of mTOR protein and contained detectable levels of its phosphorylated, active form. Interestingly, the levels of phospho-mTOR observed in the three cell lines (greatest in TC71, intermediate in SK-ES-1 and lowest in A4573, Figure 1a) correlated with their growth rates (the respective doubling times were about 20, 31 and 41 h), thus supporting the notion that mTOR may participate in maintaining their proliferation potential. The three ES cell lines were then exposed to rapamycin (10 ng/ml) for different time periods, and the effect of

this treatment on cell proliferation was followed by determining viable cell numbers using the trypan blue exclusion assay. Relative to time-matched, untreated controls, cell counts did not increase in treated cultures of any of the three cell lines. This time-dependent, relative decrease reached about 60% by 72 h after treatment (Figure 1b, top panel). This decrease could not be accounted for by a parallel increase in apoptosis, as cell death did not vary significantly during the

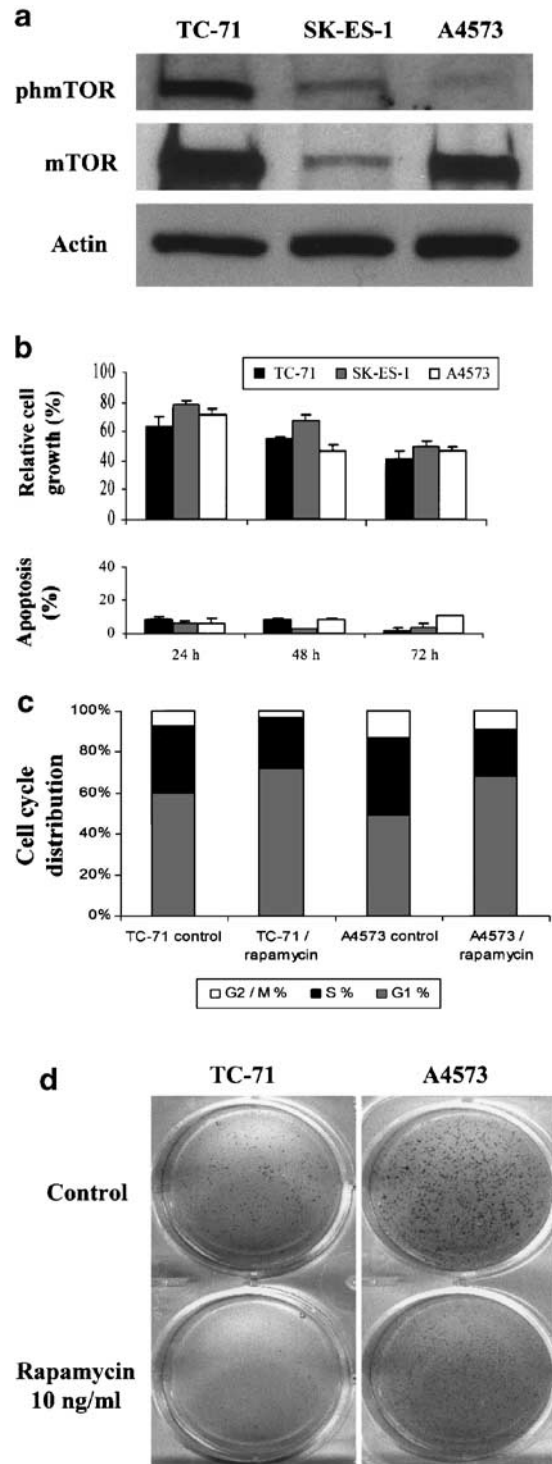


Figure 1 Rapamycin inhibits ES cell proliferation independent of their EWS/FLI-1 fusion type. ES cell lines differed in the content and phosphorylation status of the mTOR protein (a), but their proliferation was efficiently inhibited by rapamycin in all cases, with little apoptotic effect (b). Cell cycle arrest at G₁ is the mechanism underlying the growth-inhibitory effect (c), which is also reflected in the diminished ability of the cells to form colonies in soft agar (d). *Methods:* A4573 and SK-ES-1 cells were obtained from Dr Timothy J Kinsella (Case Western Reserve University). TC-71 cells were obtained from Dr Jeffrey A Toretsky (Georgetown University Medical Center). SK-ES-1 and A4573 cells were maintained in DMEM and TC-71 cells were maintained in RPMI 1640. These media (from Biofluids, Rockville, MD, USA) were supplemented with antibiotics and 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For proliferation assays and cell cycle analysis, 10⁶ cells were seeded in 100-mm dishes. The following day, the medium was aspirated and replaced by a medium containing rapamycin (10 ng/ml). After different time periods, cells were harvested by trypsinization and washed once with PBS. The numbers of viable cells were determined using the trypan blue (Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) exclusion assay, with the help of a hemocytometer. For cell cycle analysis, cells were harvested 72 h after exposure to rapamycin, washed once in PBS, fixed in citrate buffer, pH 7.6, resuspended in PBS containing 20 μg/ml of propidium iodide (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, USA), and incubated for 30 min at 37°C before flow cytometric analysis on a FACScan instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), performed at the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resource of the Lombardi Cancer Center. Anchorage-independent growth, a well-established criterion for neoplastic transformation, was evaluated by culturing the cells into 0.4% agarose (Invitrogen) in the appropriate complete medium, with a 0.6% agarose underlay. Cell suspensions (10⁴ cells/dish) were plated with or without rapamycin (10 ng/ml) and incubated as above. Colonies were counted 14 days after seeding. Rapamycin was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Western analysis was performed as described in the legend of Figure 2. Antibodies against phospho-mTOR and mTOR were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), and the anti-actin antibody was obtained from Abcam Ltd (Cambridge, UK)

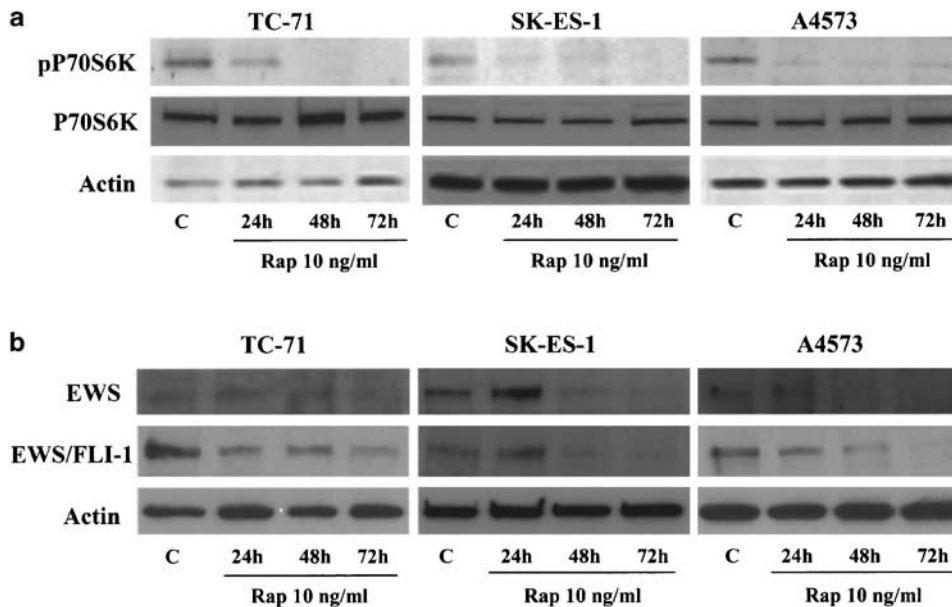


Figure 2 Rapamycin inhibited the phosphorylation of p70^{S6K} (a) and downregulated the expression levels of the EWS and EWS/FLI-1 proteins (b) in ES cells, regardless of their fusion type. *Methods:* For Western blot analysis, ES cells treated with either rapamycin (10 ng/ml) or vehicle for 24, 48 or 72 h were lysed with RIPA buffer containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin and 10 mg/ml leupeptin) and the lysates were centrifuged at 13 000 g, at 4°C, for 30 min. The protein contents of the supernatants were determined with the BCA protein assay system (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein (50 μg) from each lysate were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking with 5% skim milk in PBS containing 0.2% Tween-20, at room temperature for 1 h, membranes were incubated overnight at 4°C with each of the antibodies. Next, the blots were incubated at room temperature for 1 h with an HRP-conjugated secondary antibody (1/2000) and the peroxidase activity was analysed with the ECL chemiluminescent substrate kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Antibodies against p70^{S6K} and phospho-p70^{S6K} were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies to FLI-1, used to detect the EWS/FLI-1 fusions, and EWS were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). β-Actin (Abcam Ltd) detection was used as a loading reference

rapamycin treatment (Figure 1b, bottom panel). Flow-cytometric analysis demonstrated that exposure to rapamycin resulted in cell cycle arrest. After 72 h of rapamycin treatment, about 70% of TC-71 and A4573 cells were arrested in the G₁ phase (Figure 1c). Furthermore, rapamycin treatment also inhibited significantly the anchorage-independent growth of ES cells (Figure 1d), causing a reduction of about 80 and 37% in the number of colonies of TC-71 and A4573 cells, respectively, which grew on soft-agar cultures.

To ascertain that mTOR inhibition mediated the action of rapamycin on ES cell proliferation, we examined its effect on p70^{S6K}, a known mTOR target involved in translation initiation and cell cycle G₁/S progression (Lane *et al.*, 1993). Treatment of all three ES cell lines with rapamycin resulted in a time-dependent, progressive decrease in p70^{S6K} phosphorylation (Figure 2a). However, rapamycin did not cause any significant alteration of their total p70^{S6K} content. On the other hand, most interestingly, rapamycin exposure also resulted in the progressive decrease over time of the levels of the EWS/FLI-1 proteins present in the three ES cell lines, regardless of the fusion type involved. This effect was most evident after 72 h of rapamycin treatment (Figure 2b). In addition, similar to the EWS/FLI-1 hybrid proteins, the expression levels of the normal EWS protein were also downregulated by rapamycin (Figure 2b). The fact that RT-PCR analyses

indicated that *EWS/FLI-1* and *EWS* mRNA levels did not change during rapamycin treatment (data not shown) suggested that a translational or post-translational mechanism mediates their downregulation.

TGF-β type 2 receptor (TGFβ RII) has been described as a direct target of EWS/FLI-1 (Hahm *et al.*, 1999) and other EWS-ETS hybrid proteins (Im *et al.*, 2000). TGFβ RII expression is transcriptionally repressed in ES cells and tumors as well as in other cell types ectopically expressing the fusion proteins. The repression of TGFβ RII makes ES cells less sensitive to the growth-inhibitory effect of TGFβ and, consequently, provides them with an important proliferative advantage in their conversion to malignancy (Hahm *et al.*, 1999; Im *et al.*, 2000). Therefore, we examined whether rapamycin treatment would restore TGFβ RII mRNA expression. Results showed that, in agreement with the downregulatory effect on the EWS/FLI-1 repressor molecules (Figure 2b), exposure to 10 ng/ml of rapamycin for 24 h resulted in a marked increase of the expression of TGFβ RII mRNA in the three ES cell lines tested (Figure 3).

Rapamycin is considered as an inhibitor specific for mTOR (Gingras *et al.*, 2001). However, recent reports have identified certain effects of rapamycin that suggest the possibility that the drug may also act through alternative, mTOR-independent mechanisms (Van der Poel *et al.*, 2003; Visner *et al.*, 2003). Consequently, in

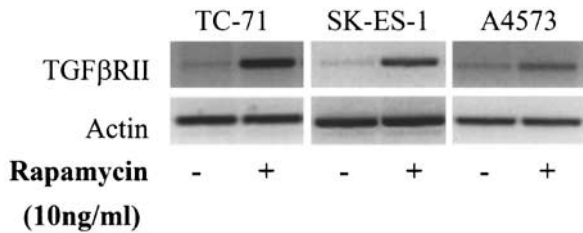


Figure 3 Downregulation of EWS/FLI-1 by rapamycin treatment restores TGFβ RII mRNA expression. TGFβ RII has been found to be repressed by EWS/FLI-1 in ES tumors. Results showed that the expression of TGFβ RII mRNA was increased in all three ES cells after exposure to 10 ng/ml of rapamycin for 24 h. *Methods:* Total RNA (3 μg), obtained from ES cells by means of the 'RNeasy Mini kit' (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), was reverse transcribed using 200 U of Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Gibco-BRL, Bethesda, MD, USA) in a 20 μl reaction volume, in the presence of 25 μg/ml Oligo (dT), first strand buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM DTT and 10 mM of each dATP, dGTP, dCTP and dTTP. The RNA and the Oligo (dT) mix were heated at 70°C for 10 min. After cooling to 4°C, the other reagents were added and reverse transcription was performed at 42°C for 50 min. TGFβ RII and Actin PCR primers were designed using Oligo 6.0 software (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN, USA), based on GenBank published sequences. The TGFβ RII sequences were amplified using the oligos CTGGTGGGGAAAGGTCGC, as the upper primer, and AGGCAGCAGGTTAGGTCCG as the lower. Human actin was used as a standard for competitive RT-PCR measurements and it was amplified using CACTGTGCCCATC-TACGAG and AGGGTGTAACACGCAGC as the upper and lower primers, respectively. Amplifications were carried out in a 2700 Perkin-Elmer thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and consisted of 35 cycles. Denaturation was performed at 94°C for 15 s, annealing at 57.4°C and extension at 72°C for 45 s. PCR products were separated on 1.5% agarose gels and quantified using the Molecular Analyst/Macintosh data analysis software and a Bio-Rad Image Analysis System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Amplified products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the supplier's instructions and sequenced using an ABI Prism 310 genetic analyzer (Perkin-Elmer Corporation)

order to demonstrate conclusively a role for mTOR in ES cell proliferation as well as the specificity of rapamycin in downregulating EWS/FLI-1, we transiently transfected TC-71 cells with AU1-tagged constructs for the expression of either wild-type (AmTOR^{wt}) or rapamycin-resistant (AmTOR-SI) mTOR, and then treated them with rapamycin (10 ng/ml) for 24 h. The proliferation of cells expressing the rapamycin-resistant mTOR mutant was not affected negatively by the treatment, whereas, relative to untreated control cells, a statistically significant decrease in cell number of about 20% ($P \leq 0.02$) was observed in the case of TC-71 cells transfected with wild-type mTOR (Figure 4a). Moreover, Western blot analyses showed no significant evidence of EWS/FLI-1 protein downregulation in cells transfected with rapamycin-resistant mTOR, while a marked decrease in EWS/FLI-1 was observed in TC-71 cells transfected with wild-type mTOR, relative to untransfected cells or to cells transfected with wild type and not treated with rapamycin (Figure 4b).

It is becoming increasingly apparent that rapamycin, or its more soluble analog CCI-779, is a promising tool

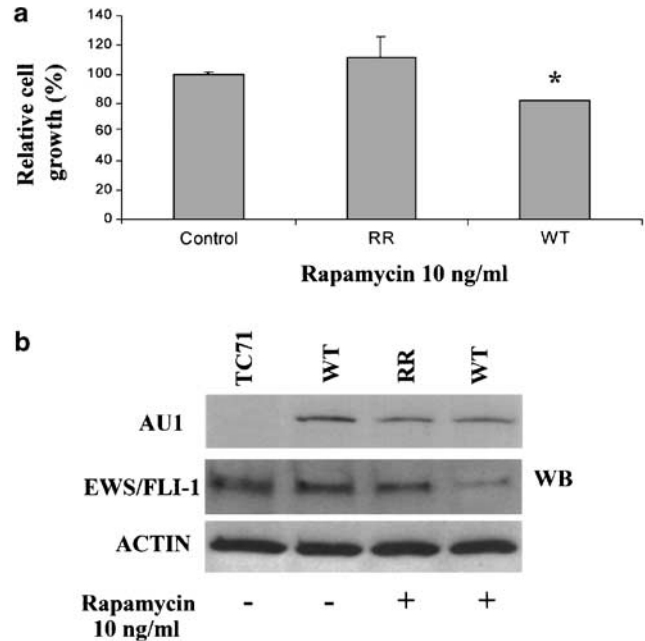


Figure 4 Expression of a rapamycin-resistant (RR) mTOR mutant in TC-71 cells prevented the inhibitory effect of rapamycin on cell proliferation (a) and the downregulation of the EWS/FLI-1 protein (b). As expected, relative to untreated, untransfected TC-71 cells (Control), the response to rapamycin exposure, for 24 h, of cells transfected with a wild-type (WT) mTOR construct agreed with the data shown in Figure 1, with regard to cell proliferation, and in Figure 2, with regard to the expression of EWS/FLI-1. *Methods:* Expression vectors encoding AU1-tagged wild-type (AmTOR^{wt}) and mutant (AmTOR-SI), rapamycin-resistant mTOR cDNAs were generously provided by Dr Robert T Abraham (The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA). These vectors and the empty pcDNA3 control plasmid (4 μg of each) were transfected using Lipofectamine (Life Technologies) as recommended by the manufacturers. The transfection efficiency was monitored by Western analysis using a monoclonal antibody specific for the AU-1 tag (Covance, Berkeley, CA, USA). Cell proliferation assays were performed as described in the legend of Figure 1. Western analyses (WB) were carried out as described in the legend of Figure 2. Samples were run in triplicate and experiments were repeated at least three times. An ANOVA was used to assess the statistical significance of differences between group means, and groups were considered significantly different at $P \leq 0.02$. Bars, \pm s.d.; (*), $P \leq 0.02$ for test group versus untreated control group

for the treatment of several cancers (Daniels and Adjei, 2001; Luan *et al.*, 2003). As such, they are currently undergoing clinical trials against various tumor types (Elit, 2002). Our results are consistent with the notion that rapamycin represents a novel class of cytostatic anticancer agents that induces G₁ cell cycle arrest of the target cells. Our finding that rapamycin is effective against ES cells, regardless of the type of EWS/FLI-1 that they contain, is particularly significant because ES tumors carrying non-type 1 fusions generally have poorer prognosis and clinical outcomes (De Alava *et al.*, 2000). Our results strongly suggest that the inclusion of rapamycin in treatment protocols for patients with localized or metastatic ES tumors could have great beneficial effects.

Several studies reported that the induction of cell cycle arrest by rapamycin resulted from a decrease in the levels of cyclins (Seufferlein and Rozengurt, 1996; Decker *et al.*, 2003). Moreover, it has been recently proposed that cyclin-dependent kinase inhibitors and other G₁ regulators are targets of the EWS/FLI-1 transcriptional activity (Matsumoto *et al.*, 2001; Nakatani *et al.*, 2003). Thus, it appears that, in ES cells, downregulation of EWS/FLI-1 expression may be an important contributor to the observed G₁ cell cycle arrest. This interpretation is in agreement with the previous observation that inhibition of the expression of the fusion protein with specific antisense oligodeoxynucleotides induced G₁ cell cycle arrest (Matsumoto *et al.*, 2001). This does not exclude the possibility that abnormalities in G₁ checkpoint regulators known to occur in ES cells (Deneen and Denny, 2001) may also contribute to, and most likely increase their sensitivity to rapamycin. In this regard, the presence in ES cells of altered pRB, p16, p27 or cyclin D1 may be predictors of enhanced rapamycin efficacy (Sausville *et al.*, 1999). As EWS/FLI-1 is the main determinant of the malignancy of ES tumors (Arvand and Denny, 2001), rapamycin treatment may have a dual effect as a cytostatic agent and suppressor of the neoplastic phenotype of ES cells.

It has been shown that the treatment of ES cells with antibodies specific to several cell surface receptors downregulated EWS/FLI-1 expression (Scotlandi *et al.*, 1998; Girnita *et al.*, 2000; Benini *et al.*, 2001), suggesting that maintenance of its transforming potential requires specific growth factor-triggered signaling processes, such as the PI3K-AKT or the ERK1/2 MAP kinase pathways. Ours is the first study to investigate a possible role for mTOR signaling in ES cells. The mTOR-p70^{S6K} signaling pathway has been shown to be constitutively activated in several tumor cell lines, including small-cell lung cancer cells and pancreatic cancer cells (Seufferlein and Rozengurt, 1996; Shah *et al.*, 2001). Our finding that the expression of a rapamycin-resistant mTOR mutant prevents the downregulation of EWS/FLI-1 and the proliferation blockade induced by rapamycin on ES

cells, demonstrates that mTOR plays a central role in regulating the levels of EWS/FLI-1 protein expression. Results from a recent proteomics study on the specific translational control by rapamycin in T cells showed that most proteins totally inhibited by the drug were RNA-binding proteins (Grolleau *et al.*, 2002). EWS was identified as a RNA-binding protein (Kim and Pelletier, 1999; Arvand and Denny, 2001) and, in agreement with that function, our results demonstrate that it is also downregulated by rapamycin treatment. However, because the EWS protein is dispensable for Ewing tumor growth (Kovar *et al.*, 2001), it is unlikely that its downregulation may play a role in the observed inhibition of ES cell proliferation caused by rapamycin. Nevertheless, it appears that it is the invariable presence of EWS in all types of EWS/FLI-1 fusions that makes these proteins susceptible to downregulation by rapamycin.

One of the major problems in the treatment of the family of ES tumors is that fusion proteins of different types may act over different targets and/or respond to stimulation by different signaling pathways (Aryee *et al.*, 2000). Our results demonstrate that mTOR signaling plays an essential role in cell proliferation in ES tumors and strongly support our proposal on the use of rapamycin as a cytostatic agent in the therapy in ES tumors. In addition, rapamycin may be an invaluable tool to identify molecular targets of EWS-FLI-1 proteins of different fusion types. Furthermore, because EWS and other members of its family have been described as partners in chromosomal translocations present in other tumor types (Kim and Pelletier, 1999), it is possible that rapamycin may be also useful in the treatment of those malignancies.

Acknowledgements

This work was supported by US Public Health Service Grant PO1-CA74175 from the National Cancer Institute, NIH. Technical help was provided by the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resource of the Lombardi Cancer Center, funded through US Public Health Service Grant P30-CA51008.

References

- Abraham RT. (1998). *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 330–336.
- Aoki M, Blazek E and Vogt PK. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 136–141.
- Arvand A and Denny CT. (2001). *Oncogene*, **20**, 5747–5754.
- Aryee DNT, Sommergruber W, Muehlbacher K, Dockhorn-Dworniczak B, Zoubek A and Kovar H. (2000). *Lab. Invest.*, **80**, 1833–1844.
- Benini S, Manara MC, Baldini N, Cerisano V, Serra M, Mercuri M, Lollini P-L, Nani P, Picci P and Scotlandi K. (2001). *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1790–1797.
- Daniels GA and Adjei AA. (2001). *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **1**, 211–221.
- De Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Barr FG and Ladanyi M. (2000). *Am. J. Pathol.*, **156**, 849–855.
- Decker T, Hipp S, Rongshausen I, Bogner C, Oelsner M, Schneller F and Peschel C. (2003). *Blood*, **101**, 278–285.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaziere C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A and Thomas G. (1992). *Nature*, **359**, 162–165.
- Deneen B and Denny CT. (2001). *Oncogene*, **20**, 6731–6741.
- Elit L. (2002). *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **3**, 1249–1253.
- Gingras AC, Raught B and Sonenberg N. (2001). *Genes Dev.*, **15**, 807–826.
- Girnita L, Girnita A, Wang M, Meis-Kindblom JM, Kindblom L-G and Larsson O. (2000). *Oncogene*, **19**, 4298–4301.
- Grolleau A, Bowman J, Pradet-Balade B, Puravs E, Hanash S, Garcia-Sanz JA and Beretta L. (2002). *J. Biol. Chem.*, **277**, 22175–22184.

- Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PHB, Thiele CJ and Kim SJ. (1999). *Nat. Genet.*, **23**, 222–227.
- Hidalgo M and Rowinsky EK. (2000). *Oncogene*, **19**, 6680–6686.
- Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PHB, Denny CT and Kim SJ. (2000). *Cancer Res.*, **60**, 1536–1540.
- Kim J and Pelletier J. (1999). *Physiol. Genomics*, **1**, 127–138.
- Kovar H, Jug G, Hattinger C, Spahn L, Aryee DNT, Ambros PF, Zoubek A and Gadner H. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 5992–5997.
- Lane HA, Fernández A, Lamb NJ and Thomas G. (1993). *Nature*, **363**, 170–172.
- Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH and Ladanyi M. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 1428–1432.
- Luan FL, Ding R, Sharma VK, Chon WJ, Lagman M and Suthanthiran M. (2003). *Kidney Int.*, **63**, 917–926.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S and Iwamoto Y. (2001). *Br. J. Cancer*, **84**, 768–775.
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T and Iwamoto Y. (2003). *J. Biol. Chem.*, **278**, 15105–15115.
- Rodriguez-Galindo C, Spunt SL and Pappo AS. (2003). *Med. Pediatr. Oncol.*, **40**, 267–287.
- Sausville EA, Zaharevitz D, Gussio R, Meijer L, Louarn-Leost M, Kunick C, Schultz R, Lahusen T, Headlee D, Stinson S, Arbuck SG and Senderowicz A. (1999). *Pharmacol. Ther.*, **82**, 285–292.
- Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini P-L, Nicoletti G, Landuzzi L, Serra M, Manara MC, Picci P and Baldini N. (1998). *Cancer Res.*, **58**, 4127–4131.
- Seufferlein T and Rozengurt E. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 3895–3897.
- Shah S, Potter MW, Ricciardi R, Perugini RA and Callery MP. (2001). *J. Surg. Res.*, **97**, 123–130.
- Toretsky JA, Thakar M, Eskenazy AE and Frantz CN. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 5745–5750.
- Üren A, Merchant MS, Sun CJ, Vitolo MI, Sun Y, Tsokos M, Illei PB, Landanyi M, Passaniti A, Mackall C and Toretsky JA. (2003). *Oncogene*, **22**, 2334–2342.
- Visner GA, Lu F, Zhou H, Liu J, Kazemfar K and Agarwal A. (2003). *Circulation*, **107**, 911–916.
- Van der Poel G, Hanrahan C, Zhong H and Simons W. (2003). *Urol. Res.*, **30**, 380–386.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G and Delattre O. (1993). *EMBO J.*, **12**, 4481–4487.
- Zwerner JP and May WA. (2001). *Oncogene*, **20**, 626–633.

5.2 ARTÍCULO II

Combined Transcriptional and Translational Targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's Sarcoma

Silvia Mateo-Lozano, Prafulla C. Gokhale, Viatcheslav A. Soldatenkov
Anatoly Dritschilo, Oscar M. Tirado, and Vicente Notario

Abstract **Purpose:** To show the efficacy of targeting EWS/FLI-1 expression with a combination of specific antisense oligonucleotides and rapamycin for the control of Ewing's sarcoma (EWS) cell proliferation *in vitro* and the treatment of mouse tumor xenografts *in vivo*.
Experimental Design: EWS cells were simultaneously exposed to EWS/FLI-1 – specific antisense oligonucleotides and rapamycin for various time periods. After treatment, the following end points were monitored and evaluated: expression levels of the EWS/FLI-1 protein, cell proliferation, cell cycle distribution, apoptotic cell death, caspase activation, and tumor growth in EWS xenografts implanted in nude mice.
Results: Simultaneous exposure of EWS cells in culture to an EWS/FLI-1 – targeted suppression therapy using specific antisense oligonucleotides and rapamycin resulted in the activation of a caspase-dependent apoptotic process that involved the restoration of the transforming growth factor- β –induced proapoptotic pathway. *In vivo*, individual administration of either antisense oligonucleotides or rapamycin significantly delayed tumor development, and the combined treatment with antisense oligonucleotides and rapamycin caused a considerably stronger inhibition of tumor growth.
Conclusions: Concurrent administration of EWS/FLI-1 antisense oligonucleotides and rapamycin efficiently induced the apoptotic death of EWS cells in culture through a process involving transforming growth factor- β . *In vivo* experiments conclusively showed that the combined treatment with antisense oligonucleotides and rapamycin caused a significant inhibition of tumor growth in mice. These results provide proof of principle for further exploration of the potential of this combined therapeutic modality as a novel strategy for the treatment of tumors of the Ewing's sarcoma family.

In recent years, it has become abundantly clear that the EWS/FLI-1 translocation is the most important molecular determinant of the pathobiology of the Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT; ref. 1). Over 90% of ESFT carry EWS/FLI-1 chimeric transcripts and their protein products, consisting of the NH₂ terminus of EWS fused to the COOH-terminal portion of FLI-1 proteins (2). Despite aggressive treatment strategies, such as high-dose chemotherapy combined with surgery and/or

extended radiotherapy, the prognosis for Ewing's sarcoma (EWS) patients with large primary tumors or metastatic disease remains poor (2). Consequently, approaches that efficiently target the EWS/FLI-1 proteins may improve therapeutic strategies for ESFT treatment.

Antisense-based gene expression knockdown is a developing, promising area of cancer therapeutics, as confirmed by recent clinical trials (3). Antisense oligonucleotides are designed to bind to RNA through Watson-Crick hybridization (4). The best characterized antisense mechanism of action involves cleavage of the target gene transcript by endogenous cellular nucleases, such as RNase H (5). Several chemical modifications have been developed to enhance the properties and effectiveness of antisense oligonucleotides. One of the oligonucleotide chemistries most frequently used involves their phosphorothioate modification (5), the extent of which renders the antisense oligonucleotide molecules increasingly resistant to nuclease degradation (6). Although inhibition of gene expression is the predominant mechanism by which antisense oligonucleotides exert their biological activity, non-antisense effects have also been described to contribute, sometimes in a dose-dependent fashion (7), to the overall action of certain antisense oligonucleotides (5).

The mammalian target of rapamycin (mTOR) protein kinase controls translation initiation through two pathways, activation of ribosomal S6K1 to enhance translation of mRNAs that bear a

Authors' Affiliation: Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, V.T. Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington, District of Columbia

Received 3/14/06; revised 8/22/06; accepted 8/31/06.

Grant support: National Cancer Institute/NIH USPHS grant P01-CA74175 and Microscopy and Imaging, Macromolecular Analysis, and Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resources of the V.T. Lombardi Comprehensive Cancer Center funded through USPHS grant 2P30-CA51008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: S. Mateo-Lozano is a registered student in the Ph.D. Doctorate Program in Biochemistry and Molecular Biology of the Universitat Autònoma, Barcelona, Spain.

Requests for reprints: Vicente Notario, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Room E215, Research Building, 3970 Reservoir Road NW, Washington, DC 20057-1482. Phone: 202-687-2102; Fax: 202-687-2221; E-mail: notariov@georgetown.edu.

© 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0609

5' terminal oligopyrimidine tract and suppression of 4E-BPs to allow cap-dependent mRNA translation (8). The fact that the mTOR pathway is up-regulated in many human cancers identifies it as a novel therapeutic target (8). Rapamycin and its derivatives (CCI-779, RAD001, and AP23576) are immunosuppressor macrolides that block mTOR functions and have shown antiproliferative activity against a variety of neoplastic malignancies (9). We previously reported that mTOR signaling plays a central role in EWS cell pathobiology, and that rapamycin targets the EWS/FLI-1 proteins to mediate its antitumor effect on EWS cells (10), thus showing that rapamycin provides a viable alternative for ESFT treatment.

It seemed reasonable that combining a mRNA-targeting strategy, such as using antisense oligonucleotides, with another approach targeting the protein product of the same gene would not only enhance the gene expression suppressive effect but also circumvent the need of high dosage for either individual treatment, thus minimizing possible toxicities to normal cells. Moreover, this notion could be especially valid for EWS because the EWS/FLI-1 target is present in tumor cells and absent in normal cells. We now show that concurrent administration of an *EWS/FLI-1*-specific antisense oligonucleotide (AS-12) with rapamycin triggers EWS cell death in culture through a process involving the transforming growth factor- β (TGF- β)-induced apoptotic pathway and a substantial inhibition of tumor growth in mouse xenografts. Overall, our results provide proof of principle for the inclusion of this combined therapeutic modality as a novel strategy for ESFT treatment.

Materials and Methods

Culture conditions, antibodies, and general reagents. EWS cells were cultured and maintained as described (10). Polyclonal antibodies against Survivin, Bcl-xL, phospho-p70s6k, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, IRS-1, and monoclonal anti-phospho-(Ser⁴⁷³)AKT were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Mouse monoclonal anti-X-linked inhibitor of apoptosis (anti-XIAP) was from BD Biosciences (San Jose, CA). Rabbit polyclonals anti-FLI-1 and anti-TGF- β receptor II (TGF- β -RII) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-TGF- β neutralizing antibody was from Abcam Ltd. (Cambridge, United Kingdom). β -Actin (Abcam) was used as a loading reference. All antisense oligonucleotides and sequence-scrambled (SC) control oligonucleotides were synthesized by Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX) with two phosphorothioate-modified bonds from each end. Rapamycin was from LC Laboratories (Woburn, MA). Recombinant human TGF- β 1 was from Chemicon International, Inc. (Temecula, CA). Trypan blue was from Life Technologies (Grand Island, NY). All other general reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Apoptosis and cell cycle assays. Apoptosis was evaluated by viable cell counting and/or terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) assays. Cell viability was determined as described (10). TUNEL assays were done for *in situ* detection of apoptotic cells using the red-based TMR *In situ* Death Detection kit from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). Cells were cultured in chamber slides (Nunc, Naperville, IL) to a density of 5×10^4 . Sixteen hours after exposure to *EWS/FLI-1* antisense oligonucleotide (10 μ mol/L), rapamycin (10 ng/mL), or their combination, cells were washed with PBS, fixed in freshly prepared paraformaldehyde (4% in PBS) for 30 minutes at room temperature, rinsed thrice in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 minutes, and incubated with the TUNEL reaction mixture for 1 hour at 37°C in a humidified atmosphere in the dark. TUNEL-positive cells were visualized with a Nikon E600 fluorescence microscope. Cell cycle distribution of cells harvested 24 hours after exposure to similar

treatments was evaluated by flow cytometric analysis as described (10), on a FACScan instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA), using the ModFit LT Analysis System (Verity Software House, Topsham, ME) at the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resource of the V.T. Lombardi Comprehensive Cancer Center. Parallel experiments were done using SC oligonucleotide (10 μ mol/L) as control. The same TUNEL kit described above was used on deparaffinated 5- μ m tumor sections. All treatments were carried out in triplicate. Oligonucleotides were added directly to the EWS cell cultures, without any auxiliary delivery system.

Caspase assays. A4573 cells (2×10^4 per well) were seeded into 96-well plates. After overnight incubation, cells were treated for 24 hours with either AS-12 (10 μ mol/L), rapamycin (10 ng/mL), their combination, or DMSO vehicle (as negative control), each in the presence or absence of the Ac-DEVD-CHO caspase-3/7 inhibitor (20 μ mol/L). All treatments were done in triplicate. Parallel control experiments were done using SC-12 (10 μ mol/L). After treatment, caspase-3 alone and caspase-3/7 activity determinations were done using, respectively, CaspACE and Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assays (Promega, Madison, WI) following manufacturer's protocols.

Reverse transcription-PCR. Conditions for RNA preparation, reverse transcription, amplification, and PCR product analysis and quantification were as described (11). Primers ACAAGCCCAACAACAAGG (upper) and ATCGGGATGCCAAAGAGG (lower) were used to amplify *EWS/FLI-1*; primers used to amplify TGF- β 1 were TGCTGCCGC-TGCTGCTAC (upper) and GCACCTCCCCCTGGCTC (lower); and the primers CTGGTGGGAAAGGTCGC (upper) and AGGCAGCAGGT-TAGGTCG (lower) were used to amplify human TGF- β RII. Primers for actin amplification were described previously (11). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semiquantitative estimate of relative mRNA abundance (12, 13).

Immunologic techniques. Procedures for Western immunoblotting, immunofluorescence, and immunohistochemistry were previously described (10, 11, 14). Antibodies against FLI-1, php70s6k, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7 (all at 1:50 dilution), TGF- β RII (at 1:100 dilution), or TGF- β 1 (at 1:250 dilution) were used for immunohistochemistry assays. ELISA was used to determine the amount of active TGF- β 1 secreted into the culture media by cells treated for 48 hours with SC-12, rapamycin, AS-12, or their combinations; these were analyzed for active TGF- β 1 levels using the E_{max} ImmunoAssay System (Promega) according to the manufacturer's directions. Three independent experimental replicas were used for these analyses.

In vivo studies. Male BALB/c athymic (*nu/nu*) nude mice (5-6 weeks old) were obtained from the U.S. National Cancer Institute. Mice were housed in the animal facilities of the Division of Comparative Medicine, Georgetown University. All animal work was done under protocols approved by the Georgetown University Animal Care and Use Committee. Procedures for tumor induction and tumor volume evaluation were as described (14). Once tumors reached a mean volume of about 200 mm³, mice were randomized into six groups (12 animals per group), and treatment was initiated. Treatment groups included AS-12 alone, SC-12 alone, rapamycin alone, AS-12 plus rapamycin, SC-12 plus rapamycin, and vehicle control. Oligonucleotides (given i.t. at a dose of 5 mg/kg) and rapamycin (given i.p. at a dose of 1.5 mg/kg) given as a single daily injection. Animals in the vehicle control group received i.p. injections of the rapamycin carrier solution alone. All animals were treated for two 5-day series with a 2-day break in between. At specified times during the treatment, or whenever tumors reached the maximum volume allowed by institutional tumor burden guidelines, representative animals from each treatment group were sacrificed by asphyxiation with CO₂. Animals treated with either rapamycin alone or with the oligonucleotide/rapamycin combinations were euthanized 4 weeks after initiation of the experiment. Tumors were immediately excised from sacrificed animals, measured, and used for protein, TUNEL, and immunohistochemical assays.

Statistical analysis. Unless otherwise indicated, reverse transcription-PCR and Western blot analyses were repeated at least thrice. Data from densitometric quantification analyses were expressed as mean \pm SD. For these and other assays involving statistical analysis, ANOVA or Student's *t* tests were used to assess the significance of differences between groups or individual variables, respectively. $P \leq 0.01$ was regarded as significant.

Results

A 12-mer antisense oligonucleotide reduces EWS/FLI-1 protein expression levels and inhibits the proliferation of A4573 and TC-71 cells but not of SK-ES-1 cells. A panel of five antisense oligonucleotides of different lengths (12-30 nucleotides) targeting either the translocation junction or the translation initiation codon (AS-AUG) of the *EWS/FLI-1* gene were used to treat A4573 cells. SC control oligonucleotides matched in length to each antisense sequence (Fig. 1A) were used as controls. The most effective cell proliferation inhibitor was the 12-mer antisense oligonucleotide (AS-12; Fig. 1B), which also caused the greatest reduction in EWS/FLI-1 protein levels (>83%), relative to its matched scrambled (SC-12) control (Fig. 1C). Consequently, AS-12 was selected for subsequent experiments. To test its target specificity, AS-12 was used to treat TC-71 and SK-ES-1 EWS cells, which carry *EWS/FLI-1* fusion types 1 and 2, respectively, whereas A4573 cells carry a type 3 fusion. Interestingly, AS-12 efficiently inhibited the proliferation of TC-71 cells (data not shown) and also reduced their EWS/FLI-1 protein levels to about 50% but had no apparent effect on SK-ES-1 cells (Fig. 1D). Unless stated otherwise, essentially identical results were obtained from treatments with either vehicle (PBS) or the SC-12 control oligonucleotide in these and other experiments. Because EWS/FLI-1 is known to transcriptionally repress the expression of the type II receptor for TGF- β (TGF β -RII; ref. 15), we tested whether AS-12 treatment had any effect on TGF β -RII mRNA levels. Results (Fig. 1E) showed that, relative to SC-12-treated controls, the down-regulation of EWS/FLI-1 protein caused by AS-12 was paralleled by an up-regulation of TGF β -RII mRNA in both TC-71 and A4573 cells, with no effect on SK-ES-1 cells (Fig. 1E), thus showing the efficacy of AS-12 treatment to revert the transcriptional activity of EWS/FLI-1.

Combining AS-12 with rapamycin results in additive anti-proliferative effects on EWS cells. To maximize the suppressive effects on EWS/FLI-1, A4573 cells were treated with a combination of AS-12 and rapamycin, a drug previously shown to down-regulate the EWS/FLI-1 protein expression in EWS cells (10). Cells were treated with AS-12 and rapamycin alone or in combination, and their effect on cell proliferation was determined 48 hours later. Results (Fig. 2A) showed that, relative to controls treated with SC-12 alone, treatment with rapamycin or AS-12 alone reduced cell proliferation by about 40% and 60%, respectively. The effects of the SC-12/rapamycin combination in this and other experiments were essentially identical to those of rapamycin alone, indicating that SC-12 did not modify the cellular response to rapamycin. Contrary, the AS-12/rapamycin combination diminished cell proliferation by around 80%. This inhibitory outcome correlated with the down-regulating effect of each treatment on EWS/FLI-1 protein expression, which was nearly abolished by the AS-12/rapamycin combination (Fig. 2B). We reported previously that

rapamycin inhibited EWS cell proliferation by inducing G₁-phase cell cycle arrest (10), and others have published that certain antisense oligonucleotides against EWS/FLI-1 reduced cell proliferation by inducing cell cycle arrest also (16). Consequently, we tested whether AS-12 reduced EWS cell proliferation by inducing cell cycle arrest, and whether the AS-12/rapamycin combination had a more pronounced effect. As shown in Fig. 2C, AS-12 alone induced a minor (5%) G₁ phase cell cycle arrest, and rapamycin alone had a more marked effect (30% increased G₁), whereas an additive effect (35% increased G₁) was observed for cells treated with the AS-12/rapamycin combination.

Recent reports described that rapamycin and its derivatives, by inhibiting mTOR, activate insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling by increasing the levels of IRS-1 and phospho-AKT, paradoxically attenuating in this way their own antitumor effect (17, 18). Because this may pose a particularly serious problem for ESFT, given that IGF-I/IGF-IR signaling is an important determinant of the malignant properties of these tumors (19, 20), we examined whether the antiproliferative activity of the AS-12/rapamycin combination might be limited by a similar mechanism. As shown in Fig. 2D, rapamycin alone did increase the levels of both IRS-1 and phospho-AKT (by about 3.5-fold). Interestingly, however, although the AS-12/rapamycin combination also increased the levels of IRS-1, it had a much smaller effect on the levels of phospho-AKT (Fig. 2D). The simultaneous treatment with AS-12 prevented the induction by rapamycin of a greater increase in phospho-AKT most likely because the down-regulation of EWS/FLI-1 brought about by AS-12 resulted simultaneously decreased the levels of both IGF-I and IGF-IR (Fig. 2E), thereby favoring the antiproliferative activity of rapamycin.

AS-12 treatment induces apoptosis in A4573 cells. The marked reduction in A4573 cell proliferation produced by AS-12 treatment (Fig. 2A) could not be explained by the minor (~5%) G₁-arresting effect of AS-12 on the cell cycle (Fig. 2C). This, and the fact that antisense oligonucleotide treatment directed against the *EWS/FLI-1* gene has been shown to induce apoptosis in EWS cells in some instances (16), prompted us to test whether AS-12 treatment induced apoptosis in A4573 cells. Indeed, relative to untreated and vehicle- or sequence-scrambled treated controls, AS-12 alone induced a marked level (25-30%) of cell death, which was significantly enhanced (to about 50%) when AS-12 was combined with rapamycin (Fig. 3A, left). Induction of cell death was partially prevented by a general caspase inhibitor (INH; Fig. 3A), although, interestingly, no variations in the levels of caspase-3 activity were detected after any of the treatments (Fig. 3A, right). However, the use of a dual caspase-3/7-specific assay allowed the detection of marked increases in caspase activity induced by both the AS-12 alone and the AS-12/rapamycin combination (Fig. 3B), which were inhibited by the Ac-DEVD-CHO caspase-3/7-specific inhibitor (Fig. 3B), suggesting that the apoptotic process triggered by AS-12 was most likely caspase-7 dependent. Furthermore, detection of cleaved caspase-7 by TUNEL and immunofluorescence showed (Fig. 3C) that both AS-12 alone and AS-12/rapamycin induced a caspase-7-dependent apoptotic process, and that the combined treatment was a more effective apoptosis inducer than either drug alone (Fig. 3D). To better understand the mechanism by which AS-12 triggered apoptosis and the reason for the increased effectiveness of the

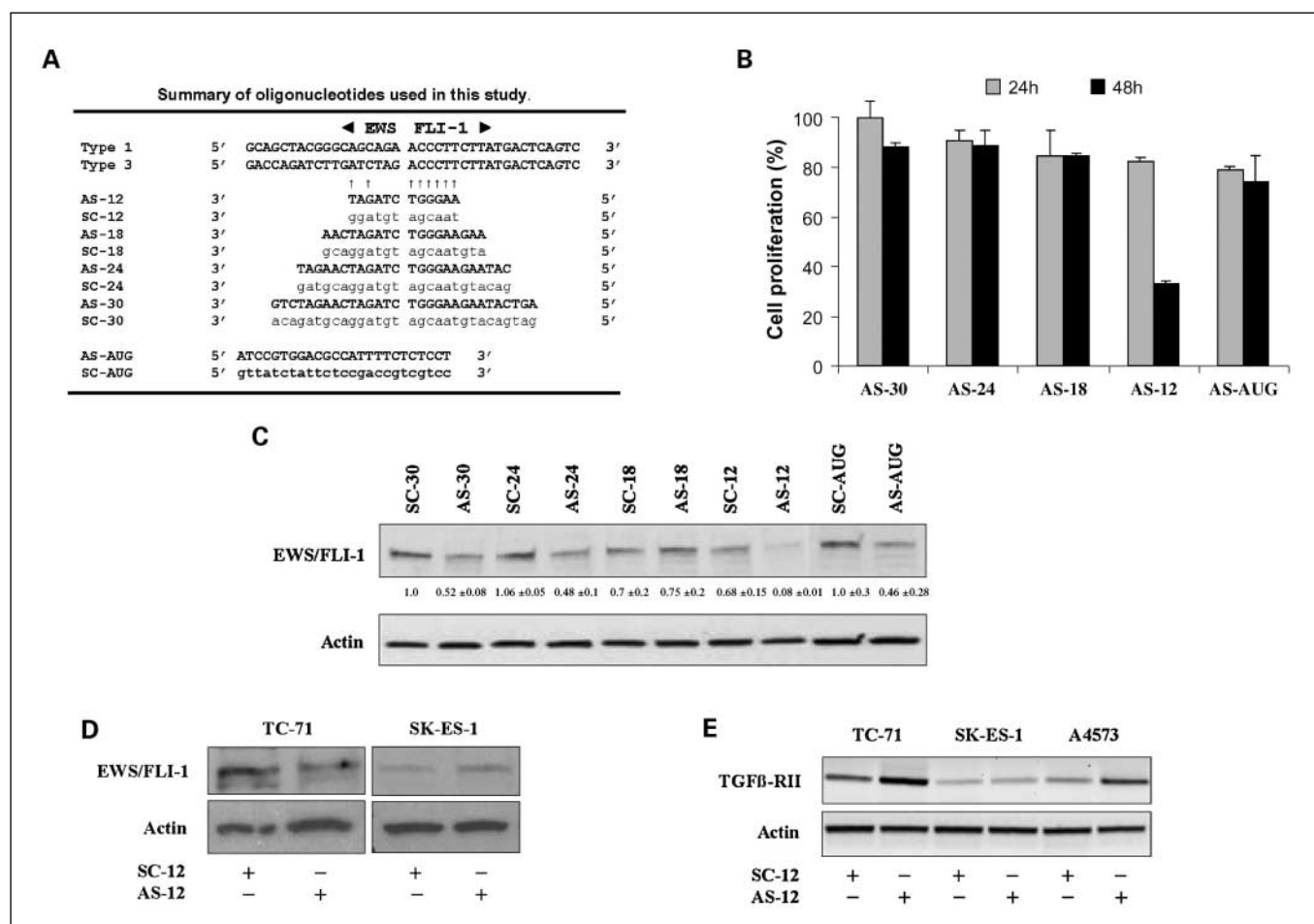


Fig. 1. A 12-mer antisense oligonucleotide (AS-12) targeted against the type 3 junction of the *EWS/FLI-1* gene reduces *EWS/FLI-1* protein levels and the proliferation of EWS cells. **A**, A4573 cells were treated for the indicated times with a set of five different antisense oligonucleotides (10 μmol/L): four directed against the translocation breakpoint sequence and one against the region containing the translation initiation codon (AS-AUG). Columns, mean percentage of cell proliferation relative to the proliferation of cells treated with the corresponding sequence-scrambled, control oligonucleotides; bars, SD. **B**, Western blot analysis of *EWS/FLI-1* levels comparing each antisense oligonucleotide with its matched sequence-scrambled oligonucleotide control. Actin was used as the loading control. Densitometric determinations (mean ± SD) of signal intensity from three independent experiments. **C**, Western blot analysis of *EWS/FLI-1* expression levels in TC-71 and SK-ES-1 cells treated with AS-12 or control SC-12 oligonucleotides. **D**, mRNA levels of TGFβ-RII analyzed by reverse transcription-PCR in the EWS cells shown after treatment with AS-12 or control SC-12 oligonucleotides (10 μmol/L, in both cases). Actin was used as internal control for normalization purposes.

combined treatment, Western blot analyses were used to test for possible changes caused by the various treatments in the expression of key apoptotic effectors. Although rapamycin treatment alone induced the down-regulation of the Survivin, XIAP, and Bcl-xL proteins, it did not result in the accumulation of detectable levels of cleaved caspase-7 (Fig. 3E). However, treatment with AS-12 alone resulted in a remarkable extent of caspase-7 cleavage, along with a significant reduction of Bcl-xL (Fig. 3E). When AS-12 and rapamycin were combined, the expression of the survival proteins, particularly Bcl-xL, was down-regulated, and caspase-7 cleavage was also observed (Fig. 3E). In agreement with its ability to down-regulate the expression of type 1, but not type 2, *EWS/FLI-1* proteins (Fig. 1D), treatment with AS-12 alone also induced caspase-7 cleavage in TC-71 cells but not in SK-ES-1 cells (Fig. 3F).

Combined AS-12/rapamycin therapy inhibits the growth of ESFT-derived tumors *in vivo* by triggering a caspase-3/7-dependent apoptotic response. A nude mouse tumor xenograft model system established as described in Materials and Methods was used to evaluate the effects of AS-12, rapamycin,

and their combination *in vivo*. When tumors reached a volume of ~200 mm³, animals were randomized into six groups, treated as described in Materials and Methods, and tumor growth was followed over a period of up to several weeks. No appreciable differences in tumor growth were observed among animals in the PBS and SC-12 control groups. However, as illustrated in Fig. 4A, at the time when animals from control groups had to be sacrificed following Institutional Animal Care and Use guidelines on maximum allowable tumor burden (days 14-15), AS-12 alone, rapamycin alone, SC-12/rapamycin, and AS-12/rapamycin had already caused significant delays in tumor development ($P \leq 0.0013$, for the last three experimental groups). After the second 5-day treatment series, treatment with rapamycin alone was more effective at delaying tumor growth than was the treatment with AS-12 alone. No differences in tumor growth were observed between animals treated with rapamycin alone and those treated with the SC-12/rapamycin combination, whereas the AS-12/rapamycin combination resulted in a more robust inhibition than that caused by rapamycin alone for the duration of the experiment (Fig. 4A).

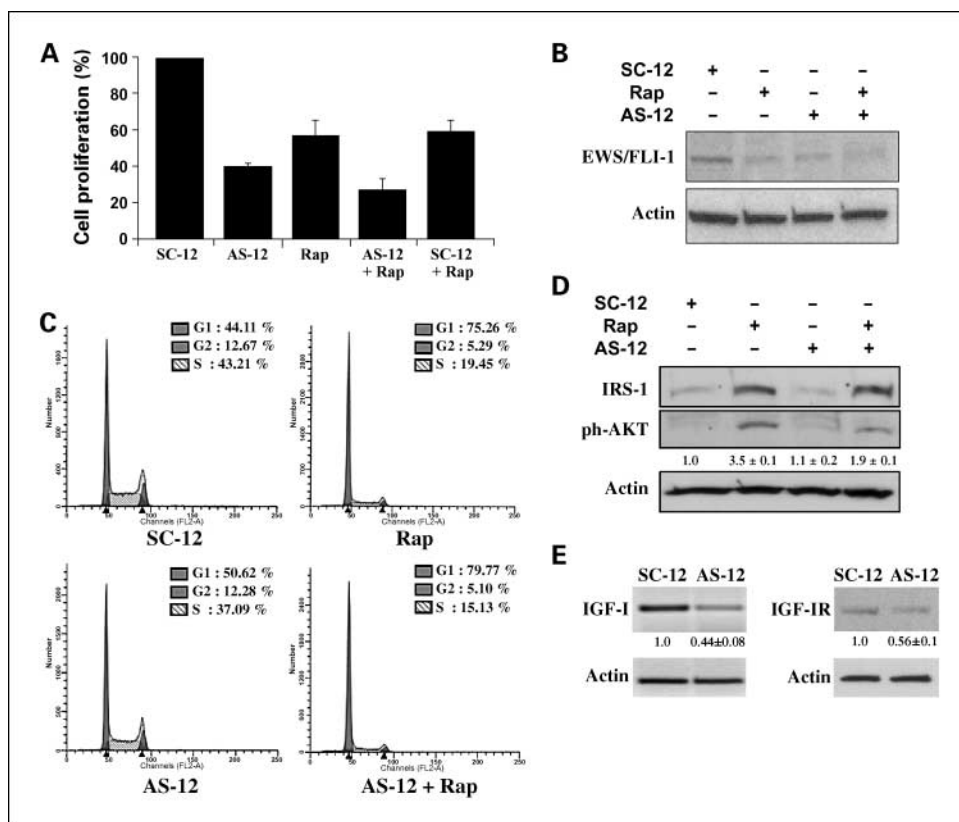
To correlate the antitumor effects of these treatments with the levels of EWS/FLI-1 expression, we examined EWS/FLI-1 protein expression in tumors from control and treated animals. On day 12 (Fig. 4A), tumors were harvested, paraffin embedded, sectioned, and immunostained for EWS/FLI-1. No appreciable differences in EWS/FLI-1 expression levels were observed among animals in the two control groups and, as shown in Fig. 4B, EWS/FLI-1 expression was strong and localized in the nucleus of cells in tumors from control mice. In tumors from mice treated with AS-12 or rapamycin, the immunoreactive EWS/FLI-1 stain decreased, being nearly undetectable in tumors from mice treated with the AS-12/rapamycin combination (Fig. 4B). Western immunoblot analyses of tumor samples corroborated immunohistochemical assays (Fig. 4C). Following the approach used in some clinical trials to evaluate the efficacy of mTOR-specific inhibitors (21), we tested the efficacy of rapamycin in our system by analyzing the phosphorylation status of p70s6k, the downstream substrate of mTOR, in tumor samples from control and treated mice. Results (Fig. 4D) showed a remarkable cooperativity between AS-12 and rapamycin to completely suppress p70s6k phosphorylation, an effect much more pronounced than the inhibition levels caused by each individual treatment.

To verify whether the different treatments also induced apoptosis *in vivo*, we analyzed tumor cell apoptosis by TUNEL assay in serial sections of the tumors described above. As shown in Fig. 5A, in samples representative of tumors from both groups of control animals the number of apoptotic, TUNEL-positive cells was minimal. In contrast, increasing levels of apoptosis were observed in tumors derived from animals treated with rapamycin, AS-12, and the AS-12/

rapamycin combination. Furthermore, these increasing levels of apoptosis observed in treated animals correlated with the expression of cleaved forms of caspase-3 and caspase-7, as detected by immunohistochemical analysis in the same samples (Fig. 5B).

Treatment with sublethal concentrations of TGF- β 1 together with rapamycin results in EWS cell apoptosis. Because elevated expression levels of the TGF β -RII receptor were restored as a consequence of the down-regulation by AS-12 of EWS/FLI-1, its transcriptional repressor, it seemed possible that the re-establishment of a TGF- β /TGF β -RII proapoptotic loop (22) in AS-12-treated cells may contribute to its apoptotic effect. Therefore, we analyzed possible changes in the levels of TGF- β 1 mRNA and active secreted protein in A4573 cells brought about by treatments with AS-12 alone, rapamycin alone, or the AS-12/rapamycin combination. Relative to SC-12 controls, treatment of A4573 cells with rapamycin alone resulted in an almost complete suppression of TGF- β 1 mRNA expression (Fig. 6A) and a significant reduction of the levels of secreted active TGF- β 1 (Fig. 6B), whereas the levels of TGF- β 1 mRNA and secreted protein observed in cells subjected to treatments involving AS-12 were not significantly different from those in SC-12 controls (Fig. 6A and B). These data suggested that AS-12, by an unknown mechanism, prevented the suppressive effect of rapamycin on TGF- β 1 expression and secretion and contributed to the establishment of a TGF- β 1 proapoptotic autocrine loop in EWS cells. To provide further support for the involvement of TGF- β in the process of AS-12-induced apoptosis, we first treated A4573 cells with increasing concentrations of TGF- β 1, to determine their dose response, with cell death as the end point (data not shown). Next,

Fig. 2. Enhanced inhibitory effects on EWS cells of the simultaneous treatment with AS-12 and rapamycin. A4573 cells were treated with rapamycin (*Rap*; 10 ng/mL), AS-12 (10 μ mol/L), or their combination for 48 hours. **A**, histogram representation of data on the percentage of cell proliferation relative to that of control cultures. **B**, EWS/FLI-1 protein levels in cells subjected to the same treatments were analyzed by Western blot. Actin was used as the loading control. **C**, cell cycle analysis: treated and control cells were stained with propidium iodide, and their DNA content was determined by flow cytometry. **D**, immunoblot showing that rapamycin increased the levels of IRS-1 and phospho-AKT (*ph-AKT*), but the latter were much less increased when treatment included AS-12 plus rapamycin. **E**, AS-12 down-regulated the levels of IGF-1 and IGF-IR, as shown by reverse transcription-PCR and Western immunoblot, respectively. Actin was used as internal control for normalization purposes in (**B**), (**D**), and (**E**).



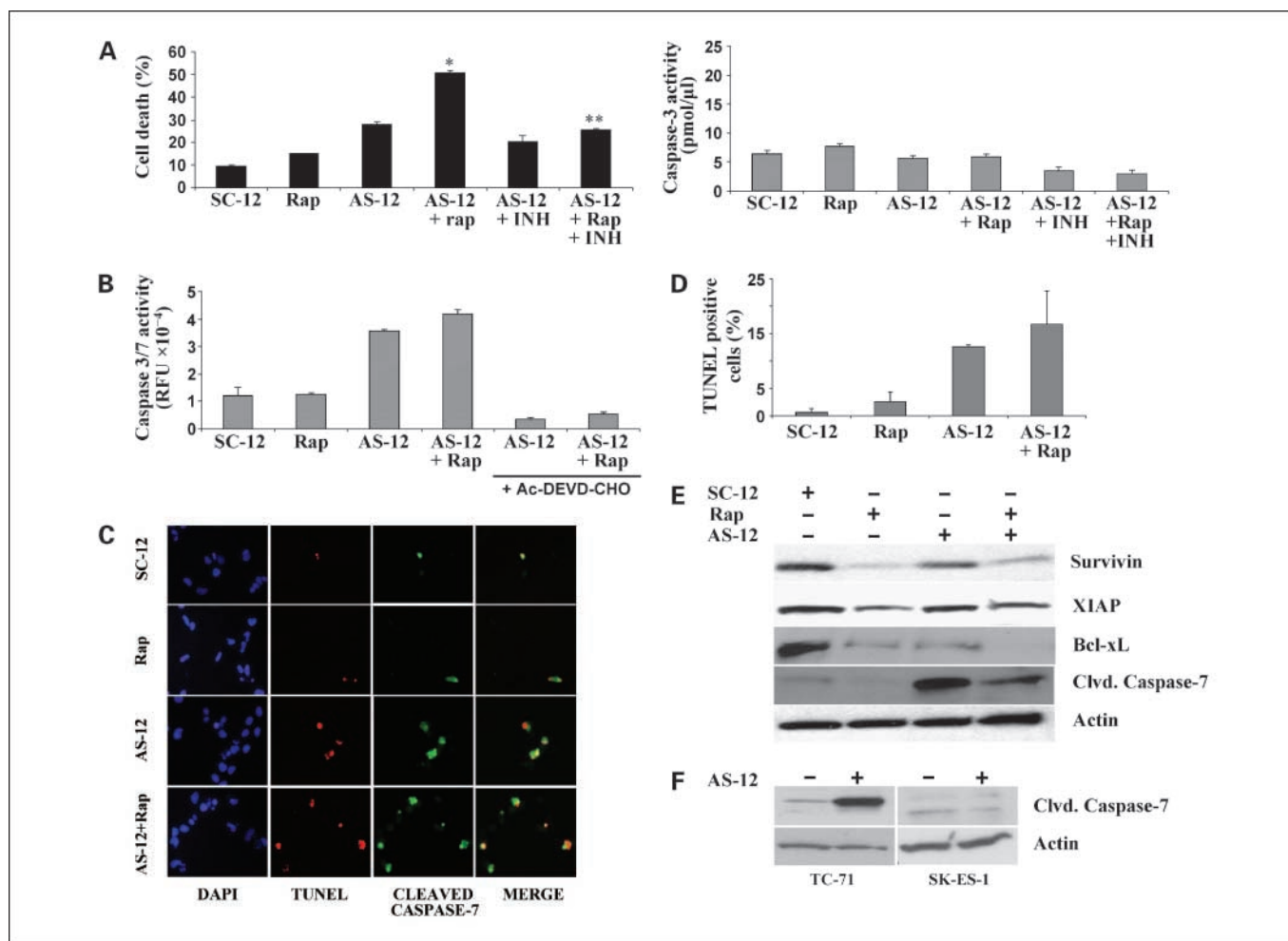


Fig. 3. Combined treatment with AS-12 and rapamycin results in additive apoptotic effects on EWS cells. *A*, exponentially growing cultures of A4573 cells were treated with rapamycin (*Rap*; 10 ng/mL), AS-12 (10 μ mol/L), or their combination for 48 hours. Percentage of cell death (*black columns*) determined by the trypan blue exclusion assay. *, $P = 0.015$; **, $P = 0.001$. Caspase-3 activity (*gray columns*) was determined as explained in Materials and Methods. A pan-caspase inhibitor (INH) was used to block apoptosis. *B*, caspase-3/7 assays showed that the apoptotic process induced by the AS-12 and the AS-12/rapamycin combination was blocked by the simultaneous addition of Ac-DEVD-CHO, a caspase-3/7-specific inhibitor, to the cultures (+Ac-DEVD-CHO). RFU, relative fluorescence units. *C*, apoptotic cells were detected by TUNEL assays (*red*). Immunofluorescence (*green*) was used to visualize caspase-7 cleavage, using an antibody specific for the cleaved caspase-7 polypeptide form. Nuclear morphology was visualized by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Merge of red and green fluorescent signals indicated that caspase-7 cleavage occurred during the apoptotic process induced by the treatments shown. *D*, quantitative data were obtained by counting TUNEL-positive cells in five different fields per slide. *E*, protein levels of Survivin, XIAP, Bcl-xL, and cleaved caspase-7 were detected after the treatments shown by Western blot using specific antibodies. Actin was used as the loading control. *F*, TC-71 and SK-ES-1 cells were treated with AS-12 (10 μ mol/L) for 48 hours and lysed, and the levels of cleaved caspase-7 were analyzed by Western blot using a specific antibody. Actin was used as the loading control. Representative of three independent experiments.

we treated A4573 cells with AS-12 alone or with AS-12 plus a TGF- β 1 neutralizing antibody and followed the effect on apoptosis by measuring caspase-3/7 activity levels 48 hours later. Results (Fig. 6C) showed that blocking TGF- β 1 significantly decreased the level of caspase-3/7 activity induced by AS-12. Conversely, simultaneous treatment of the cells with a sublethal dose of TGF- β 1 (0.1 ng/mL) plus rapamycin induced levels of apoptosis, as measured by caspase-3/7 activity, similar to those observed after treatment with AS-12 alone (Fig. 6C), whereas the levels of apoptosis induced by TGF- β 1 alone were as low as those elicited by treatment with rapamycin alone. These results provided strong evidence in support of the existence of a TGF- β 1/TGF- β RII loop contributing to the proapoptotic activity of AS-12 on EWS cells. This notion was further strengthened by the observation with immunohistochemical methods of a similar situation, with regard to levels of

expression of TGF- β 1 and TGF- β RII, in tumors induced in nude mice by injection of cells treated with AS-12 alone, rapamycin alone, or their combination (Fig. 6D), thus recapitulating *in vivo* the conditions detected in cultured cells: although both rapamycin and AS-12 increased the expression of TGF- β RII, contrary to the cases involving AS-12 treated cells, TGF- β 1 production in tumors induced by cells treated with rapamycin alone seemed restricted to non-tumor cells present in the specimens (Fig. 6D).

Discussion

In recent years, aggressive multidisciplinary approaches have significantly improved the prognosis for ESFT patients. Nevertheless, despite these aggressive treatment modalities, the prognosis for patients with metastases or early relapse remains

very poor (23). Consequently, more effective therapeutic options are needed. The EWS/FLI-1 protein plays a key role in the pathogenesis of ESFT (24). As an aberrant transcription factor, it regulates the expression of a variety of genes (15, 25–31) that modulate important functions in tumor cells, such as cell proliferation, apoptosis, and differentiation. Therefore, the EWS/FLI-1 protein represents a unique therapeutic target for the treatment of ESFT (24). In the present study, we show the effectiveness of a treatment that simultaneously targeted the EWS/FLI-1 protein at the transcriptional level, with an antisense oligonucleotide directed against the translocation junction of the *EWS/FLI-1* gene, as well as post-transcriptionally, by inhibiting translation of the EWS/FLI-1 protein with rapamycin. The AS-12/rapamycin combination efficiently induced apoptosis of EWS cells *in vitro* and led to a marked inhibition of EWS tumor growth *in vivo*.

Inhibition of the expression of the *EWS/FLI-1* gene by using antisense oligonucleotide or small interfering RNA has been investigated by other groups (1, 16). Most of the sequences targeting the translocation junction used in previous studies ranged from 15 to 25 nucleotides in length (16). However, in agreement with previous reports showing that shorter sequences, even as short as heptanucleotides, behaved as more potent

and specific gene expression suppressive agents (32–34), a 12-mer antisense oligonucleotide (AS-12) directed against the breakpoint junction of a type 3 *EWS/FLI-1* translocation was clearly the most effective of the antisense oligonucleotides used in our study. Although AS-12 treatment had little effect on EWS cell cycle, it was a potent inducer of apoptosis both *in vitro* and *in vivo*, significantly reducing the growth of A4573-derived EWS tumors in mice. Interestingly, this same antisense oligonucleotide (AS-12) was also effective targeting the type 1 *EWS/FLI-1* translocation present in TC-71 cells. This is noteworthy because type 1 and type 3 *EWS/FLI-1* translocations involve the same sequence from exon 6 of the *FLI-1* gene (35), and molecular modeling of *EWS/FLI-1* mRNA secondary structure around the breakpoint region predicted that the nucleotides available for pairing with antisense oligonucleotides targeted against the junction sequence would be predominantly located within the FLI-1 side of the hybrid transcript (36). Therefore, it seems that, although the AS-12 spans both sides of the junction point, its interference with the *FLI-1* portion is sufficient to cause the observed effects on EWS cells. The absence of such specific sequence in type 2 translocations would explain its lack of activity on SK-ES-1 cells. These data agree with results from other studies in which

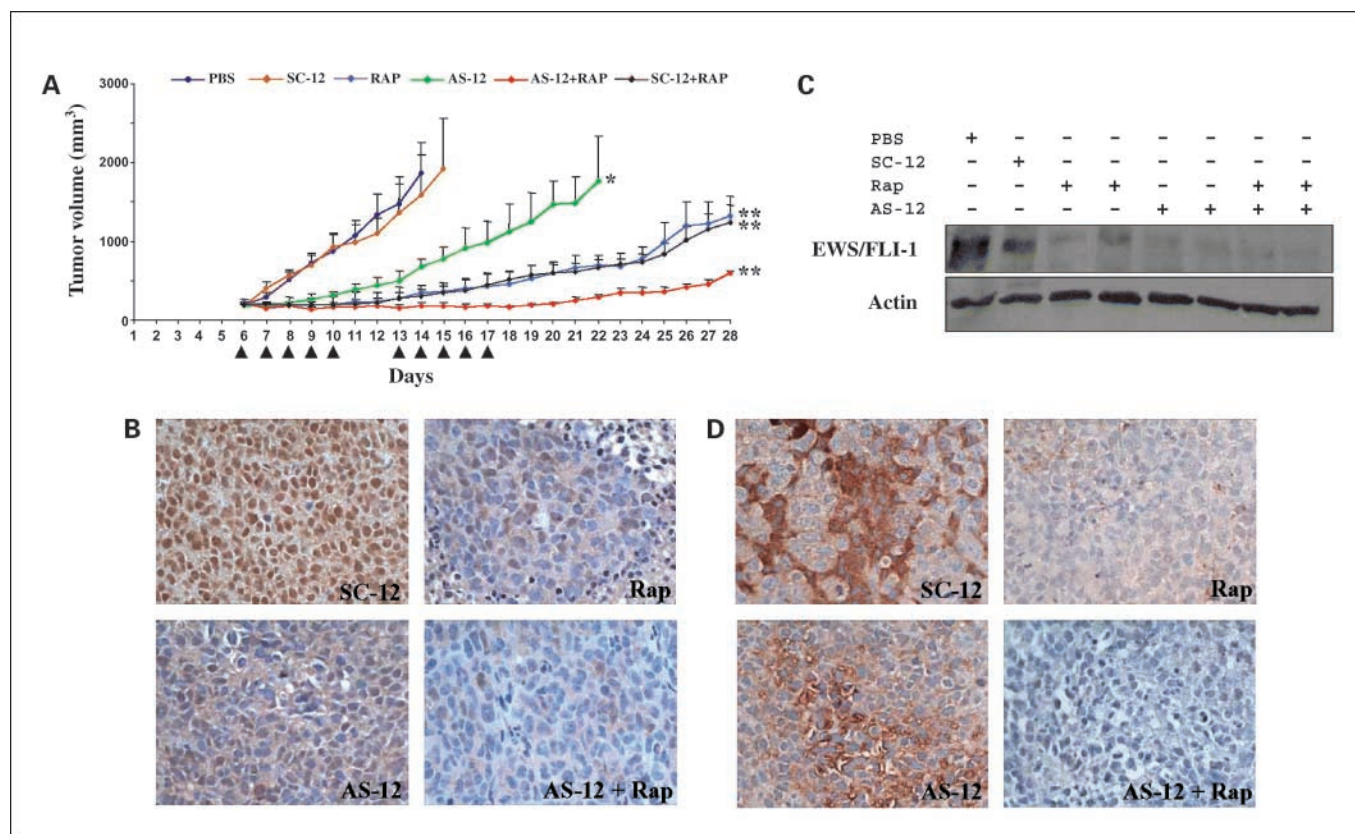


Fig. 4. Simultaneous treatment with AS-12 and rapamycin inhibits the growth of EWS tumor xenografts *in vivo*. **A**, xenografts established by s.c. inoculation of A4573 cells in nude mice were allowed to grow to a mean volume of about 200 mm³. Animals were randomized into five groups (*n* = 12 in all cases). One group was treated with rapamycin (*Rap*), given as single daily i.p. injections (arrowheads), at a dose of 1.5 mg/kg, for either 5 days or two 5-day series with 2-day break in between. Another group was treated with AS-12, given as single daily i.t. injections, at a dose of 5 mg/kg following the same schedule as rapamycin. A third group was treated with a combination of both AS-12 and rapamycin using the same schedule. The remaining two groups included control animals that received either i.p. injections of the rapamycin carrier solution or i.t. injections with SC-12 (5 mg/kg) following identical schedules. Tumor growth was followed from the time of the first injection of the treatment schedule, to monitor the effect of the various treatments. *, *P* = 0.001; **, *P* = 0.0001. Control and treated mice were euthanized at different times after treatment initiation for up to several weeks after completion of the treatment. At those times, tumors were removed and examined for evidence of down-regulation of EWS/FLI-1 expression by immunohistochemistry (**B**; ×40) and Western analysis (a representative blot in **C**), and the phosphorylation status of p70s6k (**D**; ×40) by immunohistochemistry.

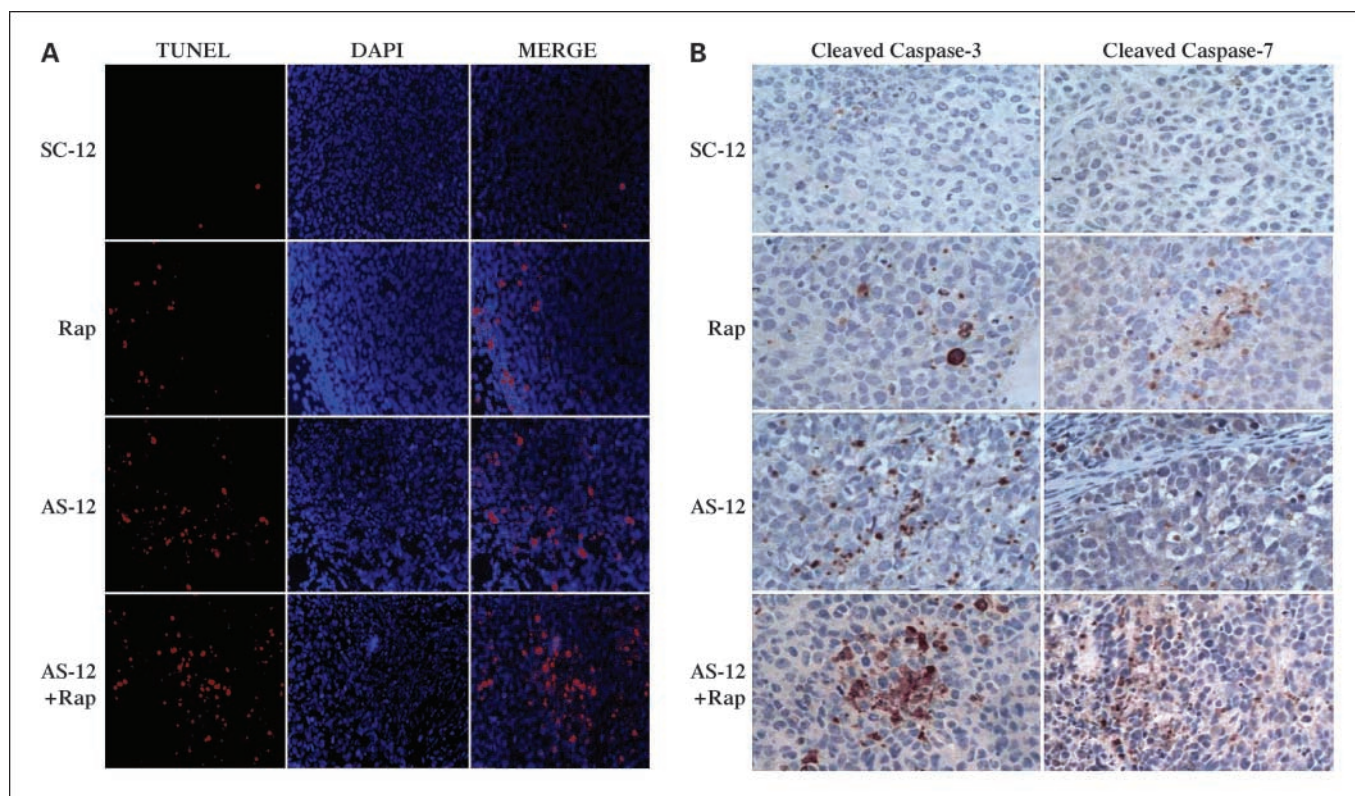


Fig. 5. Combined therapy with AS-12 plus rapamycin induces a caspase-3/7–dependent apoptotic process in EWS tumor cells *in vivo*. Control animals and mice treated as shown were euthanized at different times after treatment initiation for up to several weeks. At those times, tumors were examined for evidence of apoptosis by *in situ* TUNEL assays (A; $\times 20$) or caspase-3/7 activation by immunohistochemistry (B; $\times 40$). Data correspond to tumors excised 7 days into the treatment schedule.

antisense oligonucleotides or small interfering RNA directed against the translocation point were used to knockdown EWS/FLI-1 expression, which generally indicated that the most effective oligonucleotides were those targeting the *FLI-1* portion of the translocation (1, 37, 38). Furthermore, our results indicate that AS-12 could be effective against the majority of EWS tumors because most patients present with type 1 translocations (2) and, including those with type 3, the range of action of AS-12 may approach the 98% to 99% of the cases.

We described previously that rapamycin down-regulated the expression of the EWS/FLI-1 protein and inhibited the proliferation of EWS cells *in vitro* (10). We hypothesized that combining rapamycin with antisense oligonucleotides specifically designed against *EWS/FLI-1* could overcome some of the possible limitations of the use of antisense oligonucleotides, such as their susceptibility to degradation and generally poor uptake (39), thus enhancing their effectiveness. Indeed, results showed that combined treatments were markedly more efficient than individual treatments at inhibiting EWS/FLI-1 expression, reducing cell proliferation, and, most importantly, at inducing co-operative apoptotic effects both *in vitro* and *in vivo*. In light of reports (17, 18) that rapamycin, by increasing IRS-1 and phospho-AKT levels, could attenuate its own antitumor activity, combining AS-12 and rapamycin became mutually beneficial: rapamycin contributing a potent cell cycle arresting activity, and AS-12 counteracting the potential self-attenuating, antiapoptotic effect of rapamycin not only by reducing the expression of both IGF-I and IGF-IR but also by

maintaining the normal secreted levels of active TGF- β 1 in the presence of rapamycin, which would have down-regulated them otherwise.

TGF- β has been shown to inhibit cell proliferation and induce apoptosis in a variety of cancer cells (40, 41). Given the antiproliferative and proapoptotic functions of TGF- β , it is not surprising that this pathway is disrupted in some cancers either by somatic mutations within the *TGF- β RII* gene (22) or, as in the case of ESFT, by EWS/FLI-1–dependent *TGF- β RII* transcriptional suppression (15). The differential effect between AS-12 and rapamycin on TGF- β expression may explain why whereas AS-12 induced apoptosis, rapamycin predominantly inhibited cell proliferation (10). Although both AS-12 and rapamycin (10) restored high levels of expression of the TGF- β -RII receptor *in vitro* and *in vivo*, in contrast with the effects observed in cases involving AS-12-treated cells, the strong down-regulation of TGF- β 1 expression caused by rapamycin *in vitro* and on EWS tumor cells *in vivo* would disrupt the activity of the TGF- β 1-induced apoptotic pathway. Although understanding the mechanism by which, when in combination, AS-12 prevents the down-regulating effect of rapamycin on TGF- β 1 expression requires further experimentation, it seems a crucial event for eliciting the enhanced apoptotic activity of the AS-12/rapamycin combination on EWS cells and their inhibitory activity on tumor growth *in vivo*.

Our results agree with the recent report that *EWS/FLI-1* silencing induced apoptosis in EWS cells (31). Although some caspase-3 cleavage was observed in AS-12-treated cells

(data not shown), caspase activity assays and dual caspase-7 immunofluorescence/TUNEL analyses showed that the apoptotic process induced by AS-12 was mainly caspase-7 dependent *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, the apoptotic levels elicited by the AS-12/rapamycin combination were greater than those induced by AS-12 treatment alone, although AS-12 by itself caused a greater extent of caspase-7 cleavage. This can be explained by the differential effect of AS-12 alone or in combination with rapamycin on the levels of Survivin and XIAP, members of the IAP family of proteins, which have been identified as potent caspase inhibitors (42). Whereas XIAP is known to inhibit activated caspase-3 and caspase-7 through direct interactions, the mechanism by which Survivin inhibits caspases is less clear (38). In our study, although both AS-12 alone and in combination with rapamycin down-regulated Survivin and XIAP, the extent of down-regulation of both Survivin and XIAP induced by treatment with the AS-12/rapamycin combination was substantially greater than the down-regulation induced by AS-12 alone. The increased abundance of Survivin and XIAP in AS-12-treated cells, relative to AS-12/rapamycin-treated cells, may result in a more efficient inhibition of the active forms of caspase-7 in spite of their increased levels after the former treatment.

Sequence-specific down-regulation of EWS/FLI-1 expression in EWS xenografts has been shown to correlate with tumor

growth inhibition (43, 44). However, the delivery system for antisense and small interfering RNA oligonucleotides still remains an important unsolved issue. In this regard, it is important to point out that in our study individual treatments with naked AS-12 oligonucleotide or low-dose rapamycin (1.5 mg/kg/d) significantly delayed tumor growth, and their combination markedly inhibited tumor growth. Moreover, the extent of tumor growth inhibition correlated with the effectiveness of the various treatments to target the expression of the EWS/FLI-1 fusion protein. Remarkably, contrary to what was observed *in vitro*, all treatments induced different grades of apoptosis that was associated not only with caspase-7 but also with caspase-3 activation. Although the reason for this difference between the *in vivo* and *in vitro* apoptotic processes remains to be elucidated, rapamycin-induced apoptosis *in vivo* has been reported to occur even when only cytostatic effects are induced *in vitro* (45, 46). In our study, it is possible that *in vivo* TGF- β 1 may be provided by autocrine and paracrine mechanisms that would allow higher levels of the activity of the TGF- β 1 apoptosis-induced pathway, thus resulting in a greater involvement of caspase-3 in the process than *in vitro*. However, this mechanistic possibility requires further characterization.

In summary, simultaneous administration of EWS/FLI-1-targeted antisense oligonucleotides and rapamycin induces the

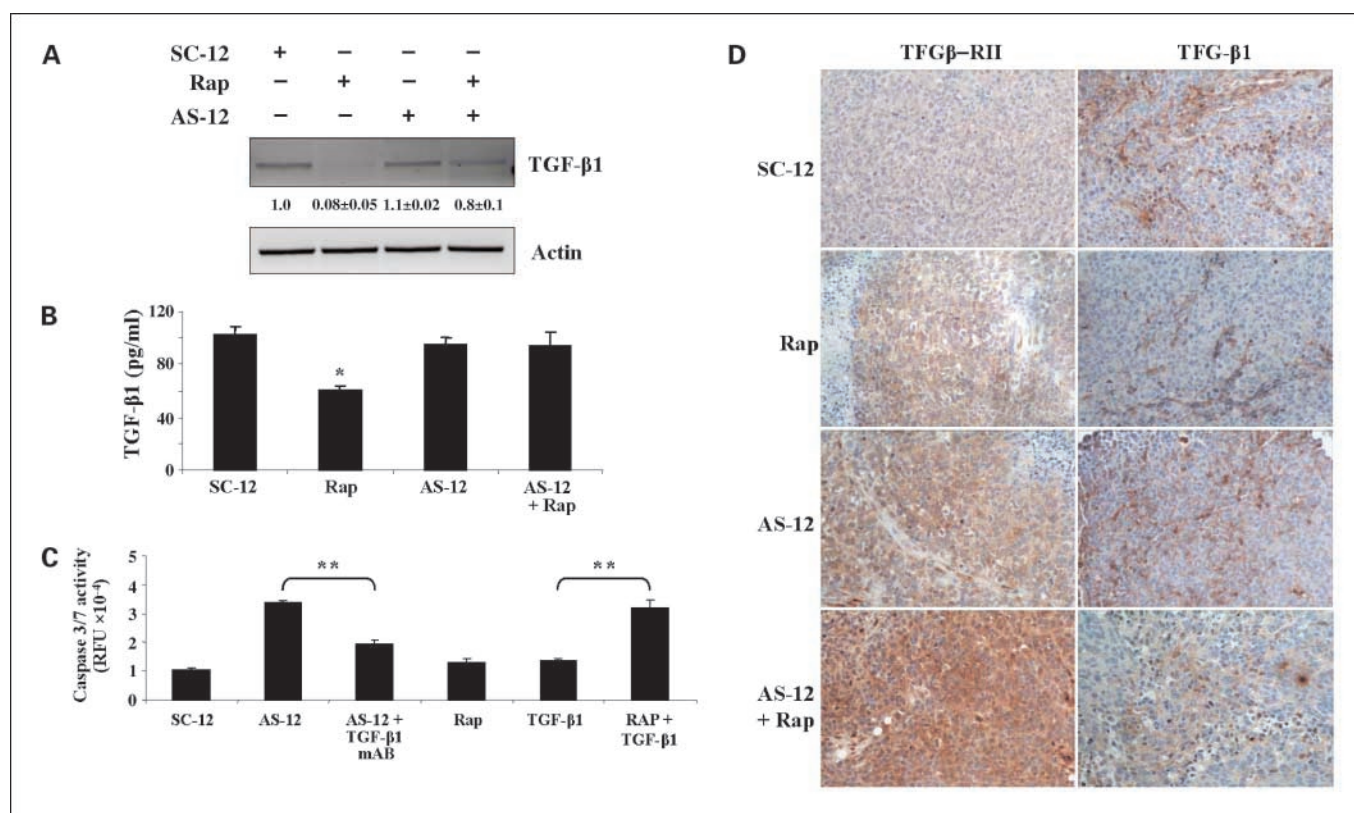


Fig. 6. Involvement of TGF- β 1 in the induction of apoptosis of EWS cells by AS-12. *A*, A4573 cells were treated with rapamycin (*Rap*; 10 ng/mL), AS-12 (10 μ mol/L), or their combination for 48 hours. Cells were then lysed, and the *TGF- β 1* mRNA levels were analyzed by semiquantitative reverse transcription-PCR. Actin was used as the reference. Quantitative data indicated below each lane were normalized to sample loading. Mean \pm SD densitometric values from three independent experimental replicas. *B*, an ELISA specific for the active form of TGF- β 1 was used to establish effect of the treatments indicated on the amount of active TGF- β 1 secreted by A4573 cells. *, $P = 0.001$, the observed difference was statistically significant. *C*, the involvement of a TGF- β 1/TGF- β RII autocrine loop was supported by the inhibition of caspase-3/7 activity with a monoclonal antibody against TGF- β 1 and its increase by simultaneous treatments with TGF- β 1 and rapamycin. **, $P \leq 0.01$, the observed differences were statistically significant. *D*, immunohistochemical detection of TGF- β 1 and TGF- β RII in tumors induced by injection into nude mice of A4573 cells treated as indicated ($\times 20$).

apoptotic cell death of EWS cells through a process involving the restoration of the TGF- β 1/TGF- β 1RII proapoptotic pathway. *In vivo* experiments with the antisense/rapamycin combination conclusively show a robust inhibition of the growth of tumor

xenografts in mice, thus providing proof of principle supporting further exploration of the potential of this combined therapeutic modality as a novel strategy for the treatment of tumors of the ESFT.

References

- Kovar H, Ban J, Pospisilova S. Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 2003;13:275–81.
- Arvand A, Denny C. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20:5747–54.
- Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:468–79.
- Crooke ST. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004;55:61–95.
- Dean MN, Bennet FC. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 2003;22:9087–96.
- Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene* 2003;22:6579–88.
- Levin AA. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:69–84.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335–48.
- Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;16:525–37.
- Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits ES cell proliferation. *Oncogene* 2003;22:9282–7.
- Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Rapamycin induces apoptosis of JN-DSRCT-1 cells by increasing the Bax:Bcl-xL ratio through concurrent mechanisms dependent and independent of its mTOR inhibitory activity. *Oncogene* 2005;24:3348–57.
- Coenen Schimke JM, Ljungqvist OH, Sarkar G, Conover CA, Sreekumaran Nair K. A quantitative PCR measurement of messenger RNA expression of IGF-I, IGF-II and IGFBP-5 in human skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res* 1999;9:179–86.
- Wang JA, Fan S, Yuan RQ, et al. Ultraviolet radiation down-regulates expression of the cell-cycle inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Biol* 1999;75:301–16.
- Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family of tumors *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2005;65:1–8.
- Hahm KB, Cho K, Lee C, et al. Repression of the gene encoding the TGF- β type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;23:222–7.
- Maksimenco A, Malvy A. Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9:825–30.
- Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1533–40.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500–8.
- Toretzky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ. The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 1997;272:30822–7.
- Strammiello R, Benini S, Manara MC, et al. Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* 2003;35:675–84.
- Granville CA, Memmott RM, Gills JJ, Denis PA. Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res* 2006;12:679–89.
- Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807–21.
- Kontny U. Regulation of apoptosis and proliferation in Ewing's sarcoma-opportunities for targeted therapy. *Hematol Oncol* 2006;24:14–21.
- Uren A, Toretzky JA. Pediatric malignancies provide unique cancer therapy targets. *Curr Opin Pediatr* 2005;1:14–9.
- Bailey RA, Bosselut R, Zucman J, et al. 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* 1994;14:3230–41.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, et al. Downregulation and forced expression of EWS-FLI1 fusion gene results in changes in the expression of G(1) regulatory genes. *Br J Cancer* 2001;84:768–75.
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-FLI1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003;278:15105–15.
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 2001;20:3258–65.
- Nishimori H, Sasaki Y, Yoshida K, et al. The Id2 gene is a novel target of transcriptional activation by EWS-ETS fusion proteins in Ewing family tumors. *Oncogene* 2002;21:8302–9.
- Watanabe G, Nishimori H, Irifune H, et al. Induction of tenascin-C by tumor-specific EWS-ETS fusion genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:224–32.
- Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delatre O. 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* 2004;24:7275–83.
- Wagner RW, Matteucci MD, Grant D, Huang T, Froehler BC. Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. *Nat Biotechnol* 1996;14:840–4.
- Woolf T. It's not the size, it's the potency. *Nat Biotechnol* 1996;14:824.
- Flanagan WM, Wagner RW, Grant D, Lin K-Y, Matteucci MD. Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide. *Nat Biotechnol* 1999;17:48–52.
- Khoury JD. Ewing sarcoma family of tumors. *Adv Anat Pathol* 2005;12:212–20.
- Maksimenco A, Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Couvreur P, Malvy C. Therapeutic potentialities of EWS-FLI-1 mRNA-targeted vectorized antisense oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1002:72–7.
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-FLI1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;99:239–47.
- Dohjima T, Lee NS, Li H, Ohno T, Rossi JJ. Small interfering RNAs expressed from a Pol III promoter suppress the EWS/FLI-1 transcript in an Ewing sarcoma cell line. *Mol Ther* 2003;7:811–6.
- Sokol DL, Gewirtz AM. Monitoring antisense oligodeoxynucleotide activity in hematopoietic cells. *Methods* 1999;17:219–30.
- Schuster N, Kriegelstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002;307:1–14.
- Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:15–34.
- Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004;64:7183–90.
- Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, et al. EWS/FLI-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:401–6.
- Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. 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* 2005;65:8984–92.
- Easton JB, Houghton PJ. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2004;8:551–64.
- Amorphimoltham P, Patel V, Sodhi A, et al. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 2005;65:9953–61.

5.3 ARTÍCULO III

Roscovotine Is an Effective Inducer of Apoptosis of Ewing's Sarcoma Family Tumor Cells *In vitro* and *In vivo*

Oscar M. Tirado, Silvia Mateo-Lozano, and Vicente Notario

Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Washington, District of Columbia

Abstract

The Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT) comprises several well-characterized malignant neoplasms with particularly aggressive behavior. Despite recent progress in the use of multimodal therapeutic approaches and aggressive local control measures, a substantial proportion of patients die because of disease progression. Furthermore, this outcome has not changed significantly over the last 15 to 20 years. Consequently, new, more effective therapeutic options are sorely needed for the treatment of ESFT. Because ESFT cells overexpress several cyclin-dependent kinases (CDK), we explored the efficacy against ESFT of roscovotine, a CDK inhibitor shown to be surprisingly safe for humans in clinical trials of their anticancer activity. Results showed that ESFT cell lines are uniformly sensitive to roscovotine. In addition to exerting comparatively minor cell cycle effects, roscovotine treatment concomitantly caused the up-regulation of the expression of the proapoptotic protein BAX and the down-regulation of both survivin and XIAP, thus resulting in caspase-dependent apoptosis. Furthermore, *in vivo* experiments showed that s.c. growth of ESFT xenografts was also significantly slowed by i.p. injection of roscovotine. These results strongly suggest that roscovotine may be an effective therapeutic agent against ESFT and recommend its evaluation against ESFT in clinical trials and its inclusion in future treatment protocols. (Cancer Res 2005; 65(20): 9320-27)

Introduction

Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT), which includes Ewing's sarcoma (EWS), Askin's tumor, and primitive neuroectodermal tumors (PNET), are the second most common bone tumors in children, adolescents, and young adults (1). These tumors are characterized by the presence, in over 90% of the cases, of a balanced translocation between human chromosomes 11 and 22 that joins the 5' end of the *EWS* gene and the 3' end of the *FLI1* gene. The resulting hybrid gene encodes the EWS/FLI1 fusion protein, which has been shown to be responsible for the malignant properties of ESFT (1). Despite aggressive combinations of chemotherapy, radiotherapy, and surgery, ~50% of patients eventually relapse, even after 5 years, and >30% of patients with

localized disease and ~80% of patients with metastatic disease die due to disease progression (2). Although recently reported experimental evidence (3, 4) compellingly supports the introduction of promising, alternative therapeutic approaches for ESFT, new, more effective treatment options are sorely needed.

Molecular analyses have shown that, like most other human tumors (5, 6), ESFT frequently carry mutations in cell cycle regulators, including overexpression of cyclin D1 (7–10); elevated expression of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2; ref. 11); losses or low expression of CDK inhibitors, such as p16^{Ink4}, p21^{WAF1}, or p27^{KIP1} (12–14); and other chromosome 9 abnormalities (15, 16). Reversion of some of these alterations after forced down-regulation of EWS/FLI-1 strongly suggested that G₁-S regulatory genes may work downstream of EWS/FLI-1 and that imbalances in their expression may contribute to tumorigenesis (1). Furthermore, an association has been detected between elevated expression of CDK2 and high risk/poor prognosis Ewing's sarcoma (11). This finding is particularly important because CDK2 inhibition has become recently an attractive therapeutic approach (5, 17, 18). Indeed, inhibitors such as roscovotine (CYC202, Seliciclib, R-roscovotine) have been shown not only to inhibit the kinase activities of the CDK2/cyclin A and CDK2/cyclin E complexes with high specificity and potency (17, 18), but are also proving unexpectedly safe for humans in clinical trials of their anticancer activity (19–22). In addition, several lines of evidence showed that CDK inhibitory drugs induce apoptosis of tumor cells (5). Roscovotine has been reported to induce apoptosis of a variety of established tumor cell lines in culture and in tumor xenografts (19, 23–26). Because tumors with dysfunctional CDK inhibitors, a known characteristic of ESFT cells (12–14, 27, 28), have been reported to be especially susceptible to CDK inhibition (5, 29), it seemed extremely likely that ESFT cells may be highly sensitive to CDK inhibition. Consequently, we tested the effect of roscovotine on EWS and PNET cells in culture and in nude mice xenografts. Results of the present study show that roscovotine is indeed a very efficient inducer of apoptosis of ESFT cells, via a mechanism involving caspase activation and the up-regulation of Bax protein expression and has a potent antitumor activity. Therefore, our data strongly suggest that roscovotine may be a useful therapeutic agent for the treatment of ESFT.

Materials and Methods

Culture conditions, antibodies, and general reagents. A4573 and SK-ES-1 cells were obtained from Dr. Timothy J. Kinsella (University Hospitals of Cleveland, OH). TC-71 cells were obtained from Dr. Jeffrey A. Toretsky (Georgetown University Medical Center, Washington, DC). TC32, SK-N-MC, and SK-N-SH cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). SK-ES-1, A4573, and SK-N-MC cells were maintained in DMEM (Biosource, Camarillo, CA) supplemented with penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Gaithersburg, MD). SK-N-SH, TC-32, and TC-71 cells were maintained in RPMI 1640 (Biosource) with the same supplements. Cells were maintained at 37°C

Note: O.M. Tirado and S. Mateo-Lozano contributed equally to this work. S. Mateo-Lozano is a registered student in the Ph.D. Doctorate Program in Biochemistry and Molecular Biology of the Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Requests for reprints: Vicente Notario, Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Room E215, Research Building, 3970 Reservoir Road, Northwest, Washington, DC 20057-1482. Phone: 202-687-2102; Fax: 202-687-2221; E-mail: notariov@georgetown.edu.

©2005 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1276

in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Polyclonal antibodies against Bax, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and survivin were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Monoclonal XIAP antibody was from BD PharMingen (Palo Alto, CA). β -Actin (Abcam, Ltd., Cambridge, United Kingdom) detection was used as loading reference. Oligonucleotide primers were purchased from Bio-Synthesis (Lewisville, TX). Roscovitine was purchased from EMD Biosciences, Inc. (San Diego, CA) or LC Laboratories (Woburn, MA). Trypan blue was obtained from Life Technologies (Grand Island, NY). All other general reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Apoptosis and cell cycle assays. Apoptosis was evaluated by viable cell counting and/or terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) assays. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method: Cells were suspended in 0.04% trypan blue in PBS, placed on a hemocytometer, and counted under the microscope. TUNEL assays were done for the *in situ* detection of apoptotic cells using the red-based TMR *In situ* Death Detection kit from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). Cells were cultured in chamber slides (Nunc, Naperville, IL) to a population density of 5×10^4 cells. Sixteen hours after roscovitine exposure, cells were washed with PBS, fixed in freshly prepared paraformaldehyde (4% in PBS) for 30 minutes at room temperature, rinsed thrice in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 minutes, and incubated with the TUNEL reaction mixture for 1 hour at 37°C in a humidified atmosphere in the dark. TUNEL-positive cells were visualized with a Nikon E600 fluorescence microscope. For cell cycle analysis, cells were harvested 24 hours after exposure to roscovitine, washed once in PBS, fixed in citrate buffer (pH 7.6), resuspended in PBS containing 20 μ g/mL of propidium iodide (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA), and incubated for 30 minutes at 37°C before flow cytometric analysis on a FACScan instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA), done at the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resource of the Vincent T. Lombardi Comprehensive Cancer Center. The same *in situ* death detection kit was used for TUNEL assays done on deparaffinated 5 μ m tumor sections.

Caspase assays. Cultures of TC-71 and A4573 cells were established by plating either 2×10^4 cells per well in 96-well tissue culture plates (for caspase activity determinations) or 2×10^5 cells per well in six-well plates (for apoptosis assays). After overnight incubation, cells were treated for 24 hours with either 10 μ mol/L roscovitine, 5 μ g/mL cisplatin (as a positive inducer of caspase-3-dependent apoptosis), or DMSO vehicle (as the negative control), each in the presence or absence of the Ac-DEVD-CHO caspase-3/7 inhibitor at a 20 μ mol/L final concentration. All treatments were done in triplicate. Following treatment, the extent of apoptosis induction was determined as described above, and caspase-3/7 activity determinations were carried out using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's protocol. Briefly, once the reagent and the cell culture plates had been equilibrated to room temperature, an equal volume of reagent was added directly to the cell cultures, the plates were shaken at 500 rpm, and the fluorescent output was determined 8 hours after adding the reagent in a fluorescent plate reader with a 485/535 excitation/emission filter and a gain setting of 25.

Western blot analysis. Cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer containing protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/mL aprotinin, and 10 mg/mL leupeptin) and the lysates were centrifuged at $13,000 \times g$ at 4°C for 30 minutes. Protein content in the supernatants was determined with the BCA protein assay system (Pierce, Rockford, IL). Proteins (40 μ g) in cell extracts were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% nonfat dry milk in PBS containing 0.2% Tween 20, membranes were incubated at 4°C overnight with the different antibodies. Blots were then incubated for 1 hour at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000) and the peroxidase activity was analyzed with the ECL chemiluminescence substrate system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Immunofluorescence. Cells were grown in chamber slides, fixed, and permeabilized as described for TUNEL assays. Permeabilized cells were then incubated for 30 minutes at room temperature with 10% donkey serum in PBS to block nonspecific binding. After thorough rinsing with PBS, cells were incubated for 1 hour at 37°C with anti-cleaved caspase-3 antibody followed

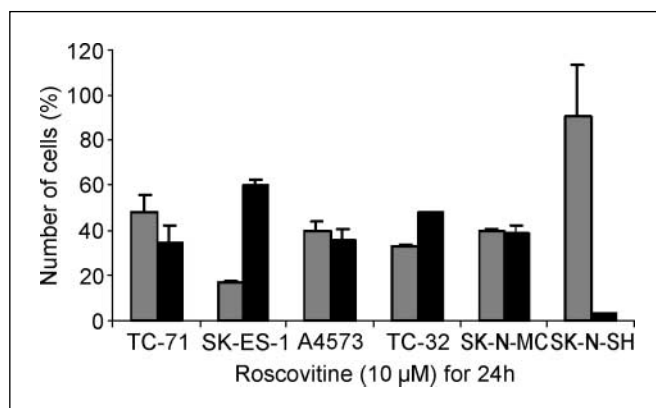


Figure 1. Roscovitine induces cell death in ESFT cultures but not in neuroblastoma cells. Exponentially growing cultures of the cell lines shown were treated with roscovitine, at the indicated concentration, for 24 hours. Then, viable and dead cell numbers were determined using the trypan blue exclusion assay. Experiments were carried out thrice, with triplicate cultures each time. Columns, mean; bars, SD. Roscovitine did not affect neuroblastoma cells (SK-N-SH cell line), while inducing substantial levels of cell death in ESFT cell cultures (all other cell lines). \square , Viable cells; \blacksquare , Dead cells.

by 30 minutes at 37°C with FITC-coupled anti-rabbit antibody. Cells were rinsed again with PBS and twice with distilled water, and mounted in Vectashield medium for fluorescence with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA), which provided nuclear counterstaining and visualized using a Nikon E600 fluorescence microscope. Appropriate controls were maintained by substituting the primary antibody with normal donkey and/or rabbit serum to check for nonspecific binding.

In vivo studies. Male athymic nude mice (5-6 weeks old) were obtained from the National Cancer Institute. Mice were housed in the animal facilities of the Georgetown University Division of Comparative Medicine. All animal work was done under protocols approved by the Georgetown University Animal Care and Use Committee. Mice were inoculated s.c. into the right posterior flank with 4×10^6 A4573 cells in 100 μ L of Matrigel basement membrane matrix (Becton Dickinson). Xenografts were grown to a mean tumor volume of 129 ± 30 mm³. Roscovitine was first dissolved in either absolute methanol or DMSO (1 volume). A carrier solution was produced by using a diluent containing 10% Tween 80, 20% *N,N*-dimethylacetamide, and 70% polyethylene glycol 400 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Mice were randomized into two groups (six animals per group) and treatment was initiated. One group was treated with roscovitine, administered as a single daily i.p. injection, at a dose of 50 mg/kg, for either 5 days or two 5-day series with a 2-day break in between. The control group received i.p. injections of the carrier solution following identical schedules. All mice were sacrificed by asphyxiation with CO₂. Roscovitine-treated mice were euthanized either 7 days after the first injection or up to 4 weeks after completion of the treatment. At those times, tumors were removed, measured, and prepared for TUNEL assays. Primary tumor volumes were calculated by the formula $V = (1/2)a \times b^2$, where a is the longest tumor axis and b is the shortest tumor axis. Data are given as mean values \pm SE in quantitative experiments. Statistical analysis of differences between groups was done by a one-way ANOVA followed by an unpaired Student's t test.

Immunohistochemistry. All tumors and tissues were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were stained with H&E, assayed for apoptosis by TUNEL as described above, or assessed for expression of cleaved caspase-3, using a rabbit polyclonal anti-cleaved human caspase-3 (Cell Signaling) at a 1:50 dilution, and the ABC peroxidase labeling procedure (DakoCytomation California, Inc., Carpinteria, CA) for immunologic detection.

Results and Discussion

Treatment of exponentially growing cultures of three EWS (TC-71, SK-ES-1, and A4573) and two PNET (SK-N-MC and TC-32) cell

lines with roscovitine (10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours led to a strong inhibition of cell proliferation (above 60%) and the promotion of substantial levels of cell death (>35%) in all cases, relative to cultures incubated with solvent alone (Fig. 1). In contrast, no remarkable effects (<10% inhibition of cell proliferation and

apoptotic levels nearly indistinguishable from background) were observed in cultures of similarly treated SK-N-SH neuroblastoma cells (Fig. 1), thus supporting the specificity of the inhibitory action of roscovitine on ESFT cells. Although a previous study reported sensitivity of neuroblastoma cells to roscovitine treatment (29),

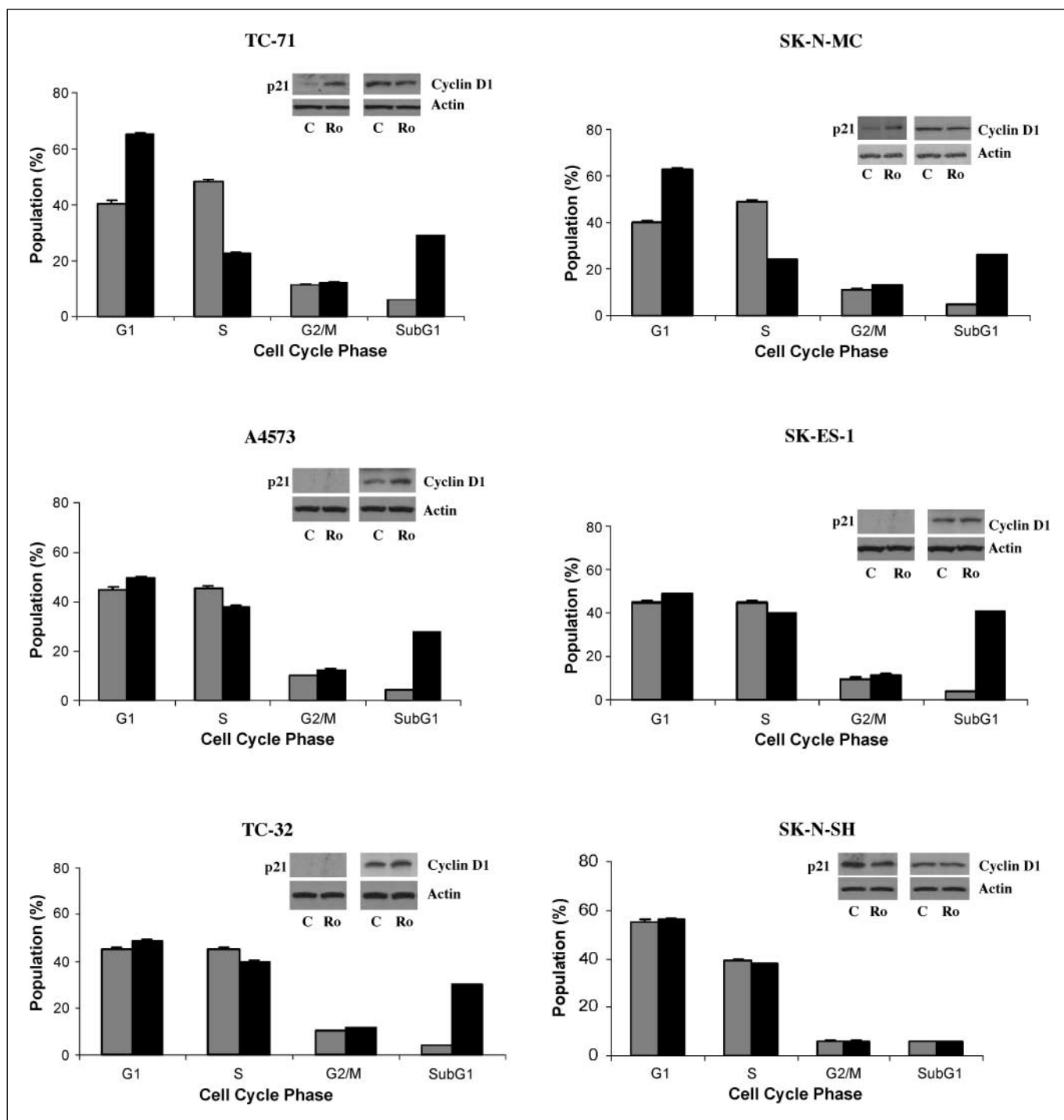


Figure 2. Cell cycle effects of roscovitine treatment. Exponentially growing cultures of the cell lines shown were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ roscovitine. Then, cells were stained with propidium iodide and their DNA content was determined by flow cytometry. Columns, relative percentages (mean values) of the roscovitine-treated (black columns) and untreated, control (gray columns) cell populations that could be assigned to cell cycle phases or to the sub-G₁ stage, a commonly used indicator of apoptosis; bars, SD. Experiments were carried out thrice, with triplicate cultures each time. Cells harvested from the same roscovitine-treated (Ro) and control (C) cultures were lysed, and expression of the p21^{WAF1} protein (p21) and cyclin D1 were examined by Western immunoblot analyses with specific antibodies, using actin as loading control (insets).

it must be pointed out that the inhibitor dose used in that study was 5-fold greater than that used in our experimental protocols.

To further understand the mechanism of roscovitine inhibition of ESFT cell proliferation, we analyzed the cell cycle distribution of the ESFT and neuroblastoma cell lines after treatment with roscovitine (10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours. Relative to untreated controls, results showed a noticeable induction of G₁-phase arrest (up to 30%) in TC-71 and SK-N-MC cells, whereas only very slight G₁ phase changes were observed for the other ESFT cells and the neuroblastoma SK-N-SH cells (Fig. 2). No significant G₂-M arrest was observed in any of the cells tested. Interestingly, the fact that G₁ arrest was observed only in TC-71 and SK-N-MC cells correlates with the ability of these cells, but lacking in all the others, to up-regulate the levels of p21^{WAF1} protein in response to roscovitine (Fig. 2, *left insets*). Whether there is any association between this response and the fact that TC-71 and SK-N-MC were the only ones among the cell lines tested that carry a type 1 EWS/FLI-1 translocation (4) remains to be elucidated. To investigate the possible involvement of cyclin D1 in the observed cell cycle response to roscovitine treatment, cyclin D1 expression levels were examined in roscovitine-treated cells and in untreated controls. Results showed that, contrary to the reduction observed in cell lines derived from other tumor types (17), roscovitine did not cause any remarkable change in cyclin D1 levels in any of the cell lines tested (Fig. 2, *right insets*). Nevertheless, in agreement with the cell death data shown in Fig. 1, a sizable accumulation of cells in the sub-G₁ fraction (around 25%), which is suggestive of apoptotic death, was observed for all ESFT cells, but not for the neuroblastoma SK-N-SH cells (Fig. 2).

Taking into account the sub-G₁ information from the fluorescence-activated cell sorting analysis, together with the fact that roscovitine has been reported to induce apoptosis in various cancer cell lines (19, 23–26, 30, 31) and to sensitize cells to radiation (32) and chemotherapy-induced apoptosis (33) both *in vitro* and *in vivo*, we did TUNEL assays to explore the possibility that ESFT cells were undergoing apoptosis after roscovitine exposure. Results (Fig. 3) showed that, indeed, roscovitine induced apoptotic cell death in TC-71 and A4573 cells, but not in SK-N-SH cells. Moreover, results from experiments combining TUNEL assays with immunofluorescence using a specific antibody against the cleaved form of human caspase-3 strongly suggested that the apoptotic process induced by roscovitine was caspase-3 dependent (Fig. 3, *Cleaved-C3*). Quantification of the proportion of cells positive for caspase-3 cleavage (36 \pm 5.01% for TC-71; 38 \pm 3.62% for A4573; 3 \pm 0.8% for SK-N-SH) showed an excellent correlation not only with TUNEL data (Fig. 3), but also with the proportions of dead cells described for each cell line in Fig. 1. The mechanism by which roscovitine induces apoptosis is not well established, although involvement of proapoptotic members of the Bcl-2 family of proteins, such as Bcl-xS, Bax, and Bak, has been suggested (24, 34). Results from Western immunoblot analyses strongly suggested that up-regulation of Bax protein levels is an important event in roscovitine-induced ESFT apoptosis. As shown in Fig. 4A, Bax was markedly up-regulated (by as much as 2.8-fold in TC-32 cells) after roscovitine treatment in each of the three ESFT cell lines tested, whereas Bax levels were actually decreased by \sim 50% in SK-N-SH neuroblastoma cells. Furthermore, in agreement with the immunofluorescence data (Fig. 3), cleaved caspase-9 (data not

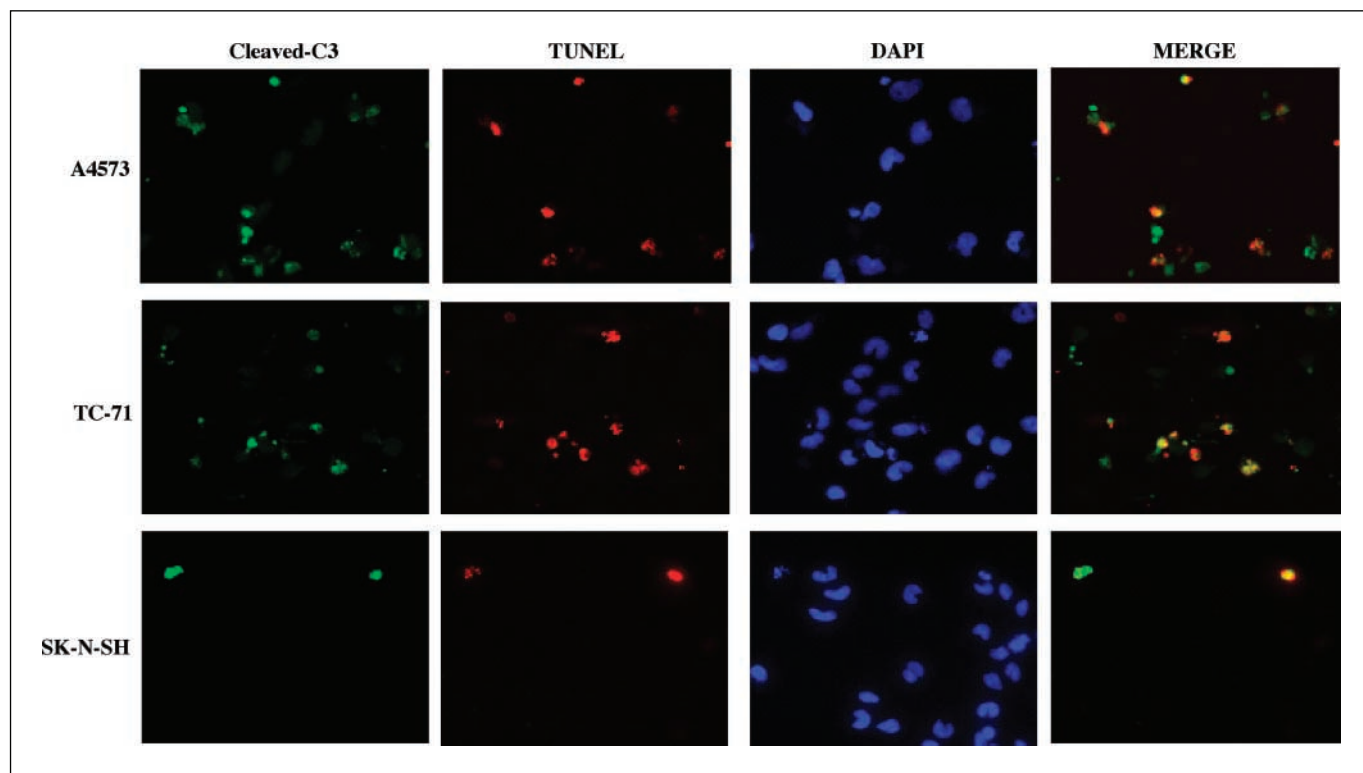


Figure 3. Roscovitine-induced apoptosis of ESFT cells involves cleavage of caspase-3. ESFT (A4573 and TC-71) cells and neuroblastoma SK-N-SH cells were grown in slide chambers and treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ roscovitine for 16 hours. Then, apoptosis was examined by TUNEL assays (*red*), caspase-3 cleavage (visualized as green immunofluorescence using a specific antibody to the cleaved caspase-3 polypeptide form), and nuclear morphology (after DAPI staining). Merge of red and green fluorescent signals indicated that caspase-3 cleavage occurred during the apoptotic process induced by roscovitine in the ESFT cells, but not in the neuroblastoma cells.

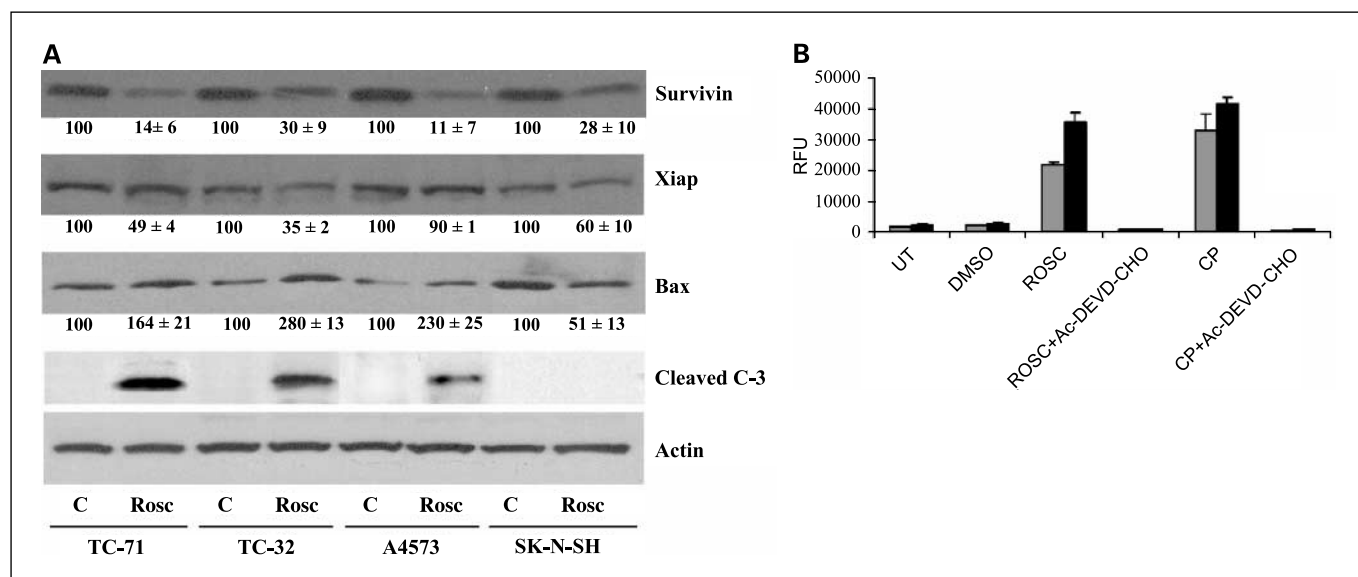


Figure 4. Roscovitine induces apoptosis in ESFT cells by concomitant up-regulation of the Bax protein and activation of caspase-3. **A**, ESFT (TC-71, TC-32, A4573) cells and SK-N-SH neuroblastoma cells were treated with 10 μ M roscovitine for 24 hours, lysed, and protein levels of surviving, XIAP, Bax, and cleaved caspase-3 were analyzed by Western immunoblot using specific antibodies. Actin was used as the loading control. A representative blot is shown for each protein. Experiments were carried out thrice, with triplicate cultures each time. The relative densitometric intensities of the signals (mean value \pm SD) from extracts of control (C) and roscovitine-treated (Rosc) cells are shown under the corresponding bands. **B**, the apoptotic process induced by treatment of the cells lines indicated with roscovitine (ROSC) was blocked by the simultaneous addition of Ac-DEVD-CHO, a caspase-3/7-specific inhibitor, to the cultures (+Ac-DEVD-CHO columns). The extent of apoptosis inhibition correlated well with the magnitude of the inhibitory effect of Ac-DEVD-CHO on the caspase-3/7 enzymatic activity in the same cells. Cisplatin (CP)-treated cells were used as positive controls for caspase-dependent apoptosis, whereas untreated cells (UT) and cells exposed to solvent alone (DMSO) were used as negative controls. \square , A4573; \blacksquare , TC-71.

shown) and cleaved caspase-3 polypeptides were observed (Fig. 4A) only in extracts of those cells in which the Bax protein was up-regulated by roscovitine, but were undetectable in SK-N-SH cell extracts. In agreement with what was previously observed in other human tumor cell types, such as chronic lymphocytic leukemia (24), the levels of proteins of the IAP family, such as Survivin and XIAP, were significantly down-regulated after roscovitine treatment in all cell lines tested (Fig. 4A). However, the absence of caspase cleavage in SK-N-SH cells strongly suggested that Bax up-regulation is a necessary requisite for the induction of apoptosis by roscovitine.

Furthermore, in agreement with results reported previously on the effect of roscovitine on human B-CLL cells (24), the caspase-3/7 dependence of the apoptotic process induced on ESFT cells by roscovitine was shown by the fact that apoptosis was blocked by treatment with Ac-DEVD-CHO, a caspase-3/7-specific inhibitor. The extent of apoptosis induced by treatment of TC-71 (42.4 ± 0.1 %) and A4573 (41.7 ± 2.3 %) cultures with roscovitine was markedly reduced when the treatment was carried out in the presence of Ac-DEVD-CHO (Table 1), which essentially prevented the apoptotic action of roscovitine and kept the proportions of apoptotic cells in the cultures at about background levels (Table 1). The decrease in roscovitine-induced apoptotic levels caused by Ac-DEVD-CHO was consistent with the reduction in the apoptotic effect caused in the same cells by cisplatin (Table 1), a known inducer of caspase-dependent apoptosis in ESFT and other cell types (35, 36), and with the extent of inhibition of the caspase-3/7 enzymatic activity induced by the inhibitor in TC-71 and A4573 cells (Fig. 4B). These results showed that the apoptotic process induced by roscovitine in ESFT cells was dependent, at least in part, on caspase-3/7 activation.

Because it has been suggested that roscovitine induces apoptosis by activating the p53 pathway (37), and Bax is a well-

known transcriptional target of p53, we analyzed the mRNA levels of Bax after treatment with roscovitine by reverse transcription-PCR. No transcriptional activation of Bax was observed in any of the cells included in this study (data not shown), perhaps as a result of the transcriptional inhibition caused by the reported effect of roscovitine on the loss of RNA polymerase II phosphorylation and total protein levels (17, 25, 38), suggesting that roscovitine treatment causes Bax up-regulation in ESFT cells at the posttranscriptional level by mechanisms involving either posttranslational modification or protein stabilization, such as those described in other experimental systems (39). These results are consistent with the fact that the ESFT cell lines used in this study have mutated or null p53 protein. Additionally, the fact that no up-regulation of Bax mRNA was detected in SK-N-SH cells, which express wild-type p53, suggest that roscovitine did not cause p53 activation in any of the cell lines tested, and that the apoptotic process triggered by roscovitine in ESFT cells is p53 independent. Although the precise molecular mechanism of Bax up-regulation mediated by roscovitine in ESFT cells remains to be elucidated, it seems clear that its overall inhibitory effect on cell proliferation *in vitro* primarily results from the efficient induction of apoptotic cell death, which in some cases may take place with the concomitant induction of G₁ phase cell cycle arrest.

We subsequently investigated the effect of roscovitine *in vivo* by evaluating the effect of drug treatment on tumor growth using nude mice xenografts of A4573 ESFT cells generated as described under Materials and Methods. When tumors reached a volume of ~ 130 mm³, animals were injected i.p. with roscovitine or with the carrier solution alone, following different schedules, and tumor growth was measured over a period of up to several weeks. As can be seen in Fig. 5A, tumor growth was significantly slower

Table 1. Effect of caspase-3/7 inhibition on the apoptotic action of roscovitine on EWS cells

Treatment	EWS cell line	
	TC-71	A4573
UT	7.4 ± 1.2	8.9 ± 0.6
DMSO	6.7 ± 3.1	10.8 ± 0.3
ROSC	42.4 ± 0.1	41.7 ± 2.3
ROSC + Ac-DEVD-CHO	5.8 ± 0.5	9.2 ± 4.0
CP	39.9 ± 1.4	32.3 ± 3.8
CP + Ac-DEVD-CHO	9.2 ± 3.4	7.5 ± 2.0

NOTE: Results are given as percentage of apoptotic cells 24 hours after the indicated treatments and correspond to mean ± SD.

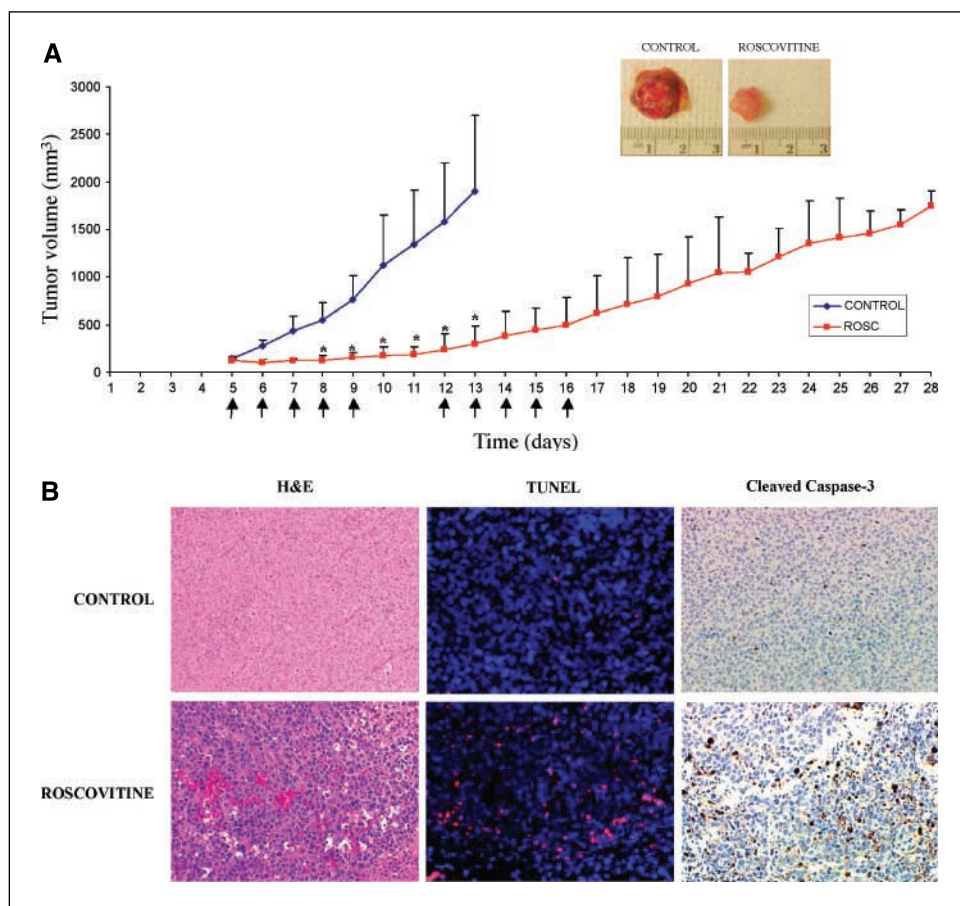
Abbreviations: UT, untreated cells; ROSC, roscovitine; CP, cisplatin.

in roscovitine-treated mice than in control animals, as a reflection of the markedly smaller size of individual tumors observed after excision (Fig. 5A, *inset*). One day after completion of the first 5-day treatment series, tumors in roscovitine-treated animals had grown only ~1.25-fold relative to their size at the time of treatment initiation, whereas tumors in untreated mice had already attained a volume ~14.5-fold their original size. These values represented a difference of ~11.5-fold in tumor volume

and, although tumors in roscovitine-treated animals continued to grow very slowly, a significant difference (~7.5-fold) in tumor size was still evident at the time (day 13; Fig. 5A) when control animals, whose tumors had grown to ~15-fold their initial size, had to be sacrificed following Institutional Animal Care and Use guidelines. Counting from day 1 of roscovitine treatment, tumors in control animals reached a volume thrice the original in ~2 days, whereas it took ~10 days for the tumors in treated animals to triplicate their initial volume (Fig. 5A). Overall, this difference indicated that roscovitine treatment resulted in an ~5-fold reduction in tumor growth.

It is important to point out that roscovitine seemed to be particularly effective against ESFT cells, relative to other human tumor cell types, both in culture and in nude mouse xenografts. Our working concentration in culture (10 μmol/L) compares favorably with the reported IC₅₀ values for cytotoxicity of roscovitine on a variety of human tumor and untransformed cell lines (19, 23–26). Furthermore, and most importantly, treatment for 5 consecutive days with only one i.p. injection at 50 mg/kg/d (total roscovitine dose of 250 mg/kg) reduced tumor size, relative to untreated control animals, by ~85% (days 5–8; Fig. 5A), whereas treatment schedules including three daily i.p. injections at 100 mg/kg/d for 5 days (total dose of 1,500 mg/kg) were reported to reduce by only 45% and 62%, respectively, the growth of tumors induced in nude mice with human colon (LoVo) and uterine (MESSA-DX5) tumor cell lines (19). The fact that our treatment achieved a better antitumor response with 6-fold lower total doses strongly indicates that roscovitine is substantially more efficient

Figure 5. Roscovitine treatment of established ESFT xenografts results in tumor growth delay mediated by the induction *in vivo* of an apoptotic process that involves caspase-3 activation. **A**, xenografts established by s.c. inoculation of A4573 cells in mice were grown to a mean volume of 130 mm³. Animals were randomized into two groups. One group (*n* = 6) was treated with roscovitine, administered as single daily i.p. injections (arrows), at a dose of 50 mg/kg, for either 5 days or two 5-day series with a 2-day break in between. The control group (*n* = 6) received i.p. injections of the carrier solutions following identical schedules. Results shown correspond to one of the experimental replicas using the two 5-day treatment schedule. Tumor growth in roscovitine-treated animals was markedly slower than the growth of tumors in control animals, in agreement with the much smaller size (*inset*) of tumors excised from individual control or roscovitine-treated animals. Asterisks indicate that the differences observed in tumor growth were statistically significant (*P* = 0.001). **B**, control and roscovitine-treated mice were euthanized at different times after the first roscovitine injection for up to several weeks after completion of the treatment. At those times, tumors were removed, measured, stained with H&E, and examined for evidence of apoptosis by *in situ* TUNEL assays and immunohistochemistry with an anti-cleaved caspase-3 specific antibody. Data from the analysis of tumors excised 7 days after the first roscovitine injection are shown. Results indicated that roscovitine efficiently induced apoptosis of ESFT cells *in vivo*.



against ESFT than against other human tumor cells. These results showed that roscovitine efficiently inhibited ESFT cell growth *in vivo* as well as in culture. To further elucidate the mechanism of roscovitine action *in vivo*, we examined whether tumor tissues showed any evidence of apoptosis. As shown in Fig. 5B, results from both TUNEL assays (Fig. 5B, middle) and immunohistochemical detection of cleaved caspase-3 (Fig. 5B, right) showed that roscovitine also induced apoptosis of ESFT tumors *in vivo* by a caspase-dependent mechanism. In contrast, negligible signs of apoptosis were detectable in tumors from control animals (Fig. 5B, top) injected with carrier solution alone.

The present study provides the first description that ESFT cells are uniformly sensitive to roscovitine both *in vitro* and *in vivo*. It has been reported that roscovitine induced apoptotic cell death in maturing cerebellar granule neurons (40). However, it seems likely that these data may be a consequence of an increased sensitivity of rat primary cells in culture rather than a reflection of a universal sensitivity of normal human cells to roscovitine. Indeed, reports from clinical trials (19–22) consistently indicated that roscovitine showed very low toxicity in phase Ib clinical trials and that it is now entering phase II trials. Taking this into consideration, along with reports on the selectivity of roscovitine for rapidly prolifer-

ating over nonproliferating cells (19, 41), our data also provide the basis for a new promising approach for the management of ESFT either as a single treatment or in combination with other therapeutic modalities. In fact, enhanced apoptotic induction has been previously shown *in vitro* and *in vivo* using roscovitine in combination with either *E2F-1* gene therapy for gastric and pancreatic cancers (42, 43), with ionizing radiation on human breast carcinoma (32), or with certain chemotherapeutic drugs on glioma (33) or bladder and prostate carcinoma (44). Overall, our results strongly suggest that roscovitine may be an effective therapeutic agent against ESFT, alone or in combination with other potentially synergistic treatments, and support its inclusion in ESFT treatment protocols.

Acknowledgments

Received 4/12/2005; revised 7/20/2005; accepted 8/2/2005.

Grant support: USPHS grant PO1-CA74175 from the National Cancer Institute, NIH, and the Microscopy and Imaging Macromolecular Analysis and the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resources of the Lombardi Comprehensive Cancer Center, funded through USPHS grant 2P30-CA51008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

References

- Arvand A, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20:5747–54.
- Kolb EA, Kushner BH, Gorlick R, et al. Long-term event-free survival after intensive chemotherapy for Ewing's family of tumors in children and young adults. *J Clin Oncol* 2003;21:3423–30.
- Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B, et al. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int J Cancer* 2000;88:252–9.
- Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 2003;22:9282–7.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222–31.
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:417–25.
- Baer C, Nees M, Breit S, et al. Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2004;110:687–94.
- Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PHB, Triche TJ. Selective usage of D-type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res* 2004;64:6026–34.
- Schaefer KL, Brachwitz K, Wai DH, et al. Expression profiling of t(12;22) positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic up-regulation of potential new marker genes including *ERBB3*. *Cancer Res* 2004;64:3395–405.
- Staeger MS, Hutter C, Neumann I, et al. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 2004;64:8213–21.
- Ohali A, Avigad S, Zaizov R, et al. Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. *Oncogene* 2004;23:8997–9006.
- Kovar H, Jug G, Aryee DNT, et al. Among genes involved in the *RB* dependent cell cycle regulatory cascade, the *p16* tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 1997;15:2225–32.
- Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57^{KIP2} and c-Myc expression. *Oncogene* 2001;20:3258–65.
- Fukuma M, Okita H, Hata J, Umezawa A. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 2003;22:1–9.
- López-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the *9p21* locus and *p53* genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 2001;81:803–14.
- Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol* 2003;56:96–102.
- Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P. The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 2004;64:262–72.
- Maude SL, Enders GH. Cdk inhibition in human cells compromises Chk1 function and activates a damage response. *Cancer Res* 2005;65:780–6.
- McClue SJ, Blake D, Clarke R, et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* 2002;102:463–8.
- Fischer PM, Gianella-Borradori A. CDK inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:955–70.
- Senderowicz AM. Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther* 2003;2:S84–95.
- De la Motte S, Gianella-Borradori A. Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42:232–9.
- Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Węsierska-Gądek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;106:486–95.
- Hahtow IN, Schneller F, Oelsner M, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004;18:747–55.
- MacCallum DE, Melville J, Frame S, et al. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 2005;65:5399–407.
- Węsierska-Gądek J, Gueorguieva M, Horky M. Roscovitine-induced up-regulation of p53/AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4:113–24.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Flil1 fusion gene results in changes in the expression of G₁ regulatory genes. *Br J Cancer* 2001;84:768–75.
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, et al. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Flil1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003;278:15105–15.
- Ribas J, Boix J. Cell differentiation, caspase inhibition, and macromolecular synthesis blockage, but not BCL-2 or BCL-XL proteins, protect SH-SY5Y cells from apoptosis triggered by two CDK inhibitory drugs. *Exp Cell Res* 2004;295:9–24.
- Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1903–10.
- Edamatsu H, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F. Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* 2000;19:3059–68.
- Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, et al. Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2003;65:2513–7.
- Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS. Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 2004;23:446–56.
- Mihara M, Shintani S, Nakashiro K, Hamakawa H. Flavopiridol, a cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor, induces apoptosis by regulating Bcl-x in oral cancer cells. *Oral Oncol* 2003;39:49–55.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79.
- Yen HC, Tang YC, Chen FY, Chen SW, Majima HJ. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:516–22.
- Blaydes JP, Craig AL, Wallace M, et al. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two

- cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 2000;19:3829–39.
38. Alvi AJ, Austen B, Weston VJ, et al. A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood* 2005;105:4484–91.
39. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Rapamycin induces apoptosis of JN-DSRCT-1 cells by increasing the Bax: Bcl-xL ratio through concurrent mechanisms dependent and independent of its mTOR inhibitory activity. *Oncogene* 2005;24:3348–57.
40. Monaco EA III, Beaman-Hall CM, Mathur A, Vallano ML. Roscovitine, olomucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1947–64.
41. Atanasova G, Jans R, Zhelev N, Mitev V, Poumay Y. Effects of cyclin-dependent kinases inhibitor CYC202 (R-roscovitine) on the physiology of cultured human keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 2005;70: 824–36.
42. Atienza C, Jr., Elliott MJ, Dong YB, et al. Adenovirus-mediated *E2F-1* gene transfer induces an apoptotic response in human gastric carcinoma that is enhanced by cyclin dependent kinase inhibitors. *Int J Mol Med* 2000;6:55–63.
43. Elliott MJ, Farmer MR, Atienza C, Jr., et al. *E2F-1* gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells. *Tumour Biol* 2002;23:76–86.
44. Lashinger LM, Zhu K, Williams SA, Shrader M, Dinney CPN, McConkey DJ. Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand resistance via a p21 dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005;65: 4902–8.

5.4 ARTÍCULO IV

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

Oscar M. Tirado,¹ Silvia Mateo-Lozano,¹ Joaquín Villar,¹ Luis E. Dettin,² Anna Llorc,³ Soledad Gallego,³ Jozef Ban,⁴ Heinrich Kovar,⁴ and Vicente Notario¹

¹Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center; ²Microscopy and Imaging Shared Resource of the V.T. Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington, District of Columbia; ³Unitat d'Oncologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and ⁴Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria

Abstract

Tumors of the Ewing's sarcoma family (ESFT), such as Ewing's sarcoma (EWS) and primitive neuroectodermal tumors (PNET), are highly aggressive malignancies predominantly affecting children and young adults. ESFT express chimeric transcription factors encoded by hybrid genes fusing the EWS gene with several ETS genes, most commonly FLI-1. EWS/FLI-1 proteins are responsible for the malignant phenotype of ESFT, but only few of their transcriptional targets are known. Using antisense and short hairpin RNA-mediated gene expression knockdown, array analyses, chromatin immunoprecipitation methods, and reexpression studies, we show that caveolin-1 (CAV1) is a new direct target of EWS/FLI-1 that is overexpressed in ESFT cell lines and tumor specimens and is necessary for ESFT tumorigenesis. CAV1 knockdown led to up-regulation of Snail and the concomitant loss of E-cadherin expression. Consistently, loss of CAV1 expression inhibited the anchorage-independent growth of EWS cells and markedly reduced the growth of EWS cell-derived tumors in nude mice xenografts, indicating that CAV1 promotes the malignant phenotype in EWS carcinogenesis. Reexpression of CAV1 or E-cadherin in CAV1 knockdown EWS cells rescued the oncogenic phenotype of the original EWS cells, showing that the CAV1/Snail/E-cadherin pathway plays a central role in the expression of the oncogenic transformation functions of EWS/FLI-1. Overall, these data identify CAV1 as a key determinant of the tumorigenicity of ESFT and imply that targeting CAV1 may allow the development of new molecular therapeutic strategies for ESFT patients. (Cancer Res 2006; 66(20): 9937-47)

Introduction

Ewing's sarcoma (EWS), a highly aggressive malignancy of soft tissues and predominantly bone, is the second most common bone tumor in children and young adults (1). Survival rates for patients with primary tumors are about 60%. However, 20% to 30% of cases

are already metastatic at diagnosis, with survival rates below 20% (2). Over 90% of EWS cases express chimeric proteins encoded by hybrid genes generated by translocations involving the *EWS* and *FLI-1* genes. These *EWS/FLI-1* genes are heterogeneous with regard to the location of the translocation junction, resulting in different breakpoints (3). Regardless of the fusion type, all EWS/FLI-1 proteins act as aberrant transcription factors that promote oncogenesis by modulation of multiple target genes (4). Although several EWS/FLI-1 targets [i.e., transforming growth factor- β RII (TGF β RII), Id2, p21, and PTPL1] have been already described (5–8), direct targets specific to the most aggressive tumors of the Ewing's sarcoma family (ESFT) have not been yet discovered. Identification of such targets is crucial to better understand the disease, improve treatment options and, ultimately, enhance patient survival.

Caveolae are plasma membrane invaginations that regulate several intracellular signaling pathways. The defining components of caveolae are 21- to 25-kDa proteins termed caveolins. Caveolin-1 (CAV1) and caveolin-2 (CAV2) are ubiquitously expressed. Caveolin-3 (CAV3) is only expressed in muscle tissue (9). CAV1 is the only member of the family shown to be required for caveolae formation (10). Roles in tumor development and metastatic progression have been attributed to both CAV1 loss and overexpression. A negative regulatory role has been proposed on the basis of the reduced CAV1 levels detected in cancers such as ovarian, colon, lung, and breast carcinomas and various sarcomas (11–14). Experiments with cultured cells and animal models showed that CAV1 acts as a tumor suppressor in breast cancer and other tumors (14, 15). In contrast, high CAV1 levels were associated with enhanced tumor progression and metastatic activity in kidney, bladder, esophagus, and prostate tumors (14, 16, 17). Recent studies showed a biphasic expression of CAV1 in primary versus metastatic oral, kidney, and pancreatic tumors (14, 18). CAV1 function in tumor development and metastasis is determined by intrinsic factors specific to different cell, tissue, and tumor types and/or malignant progression stages (11–18).

Studies of the putative CAV1 involvement in ESFT pathobiology have not been reported to date. Based on results from experiments using antisense oligonucleotides, retroviral-mediated RNA interference, gene array-based analyses, and reexpression studies, we now report for the first time the identification of CAV1 as a new transcriptional target of EWS/FLI-1. We show that suppression of CAV1 expression down-regulates the malignant phenotype of EWS cells *in vitro* and their tumorigenicity in nude mice. CAV1 knockdown up-regulates Snail and concomitantly decreases E-cadherin. The fact that reexpression in CAV1 knockdown cells of either CAV1 or E-cadherin rescued the oncogenic phenotype of unmanipulated EWS cells strongly supports a role for CAV1 as an

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

S. Mateo-Lozano is a registered student in the Ph.D. Doctorate Program in Biochemistry and Molecular Biology of the Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Requests for reprints: Vicente Notario, Department of Radiation Medicine, Georgetown University Medical Center, Research Building, Room E215, 3970 Reservoir Road, Northwest, Washington, DC 20057-1482. Phone: 202-687-2102; Fax: 202-687-2221; E-mail: notariov@georgetown.edu.

©2006 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0927

important determinant of ESFT tumorigenicity and suggests that targeting *CAVI* may allow the development of new molecular therapeutic strategies for ESFT patients.

Materials and Methods

Cell lines, survival assays, general methods, and reagents. EWS cell lines were cultured as described (19–21). HTC-116, HT-29, PC-3, and RD cells were maintained in either RPMI 1640 (HTC-116, HT-29, and RD) or DMEM (PC-3) supplemented with penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum (all from Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), at 37°C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Cell survival was measured by using the trypan blue exclusion assay as described (19, 20). Antisense (ATCCGTGGACGCCATTTCTCTCCT) and the sequence scrambled control (GTTATCTATTCTCCGACCGTCGTC) oligonucleotides (ESAS2 and ESSC2 in ref. 22), from Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX), contained two phosphorothioate modified bonds from each end. Oligonucleotides were directly added to cell cultures, without any carriers, and maintained at 10 μmol/L in the medium for 48 hours. The hemagglutinin (HA)-tagged Snail cDNA vector was a generous gift from Dr. A. Cano (Universidad Autónoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain), and the wild-type and dominant-negative E-cadherin expression vectors were generous gifts from Dr. S.M. Troyanovsky (Washington University, St. Louis, MO). *EWS/FLI-1*-targeted, pSR-based retroviral short hairpin RNA (shRNA) vectors (EF4, EF22, and EF30) were described previously (21). The pCMV-EWS/FLI-1 expression construct was a generous gift from Dr. Dennis K. Watson (Medical University of South Carolina, Charleston, SC).

General immunologic techniques. Anti-HA-tag antibody was from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA). *CAVI*, *FLI-1* (COOH-terminal specific), and EWS (NH₂-terminal specific) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-*FLI-1* (NH₂-terminal-specific) was from Calbiochem/EMD Biosciences, Inc. (San Diego, CA), and monoclonal anti-E-cadherin antibody was from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-β-actin (Abcam Ltd., Cambridge, England) detection was used for loading normalization. Western blot analyses were done as described (19, 20). All immunofluorescence and immunohistochemical techniques were essentially as described (20).

Chromatin immunoprecipitation assays. The ChIP-IT kit (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA) was used following manufacturer's protocols, after cross-linking with 1% formaldehyde for 15 minutes. Chromatin was sheared by sonication on ice, and agarose gel electrophoresis was used to select for chromatin fragments with an average size of <500 bp. Primers GAACCTTGGGGATGTGCG (upper) and GCCTACCTCCGAGTCTACG (lower) were used for PCR amplification of input DNA and DNA precipitated with anti-*FLI-1*-N, anti-*FLI-1*-C, or anti-EWS antibodies, or with a nonspecific control IgG. These primers were designed to amplify a 234-bp fragment containing the ETS-binding site (EBS) located within the *CAVI* promoter (positions –216 to +18).

***CAVI* knockdown with antisense and shRNA expression constructs and reexpression experiments.** To generate the pBK-ASCAVI antisense *CAVI* expression vector, a human *CAVI* (Invitrogen) *NotI/SalI* fragment encompassing its coding sequences was inserted into the *SalI/NotI* sites of pBK-CMV (Invitrogen). Validated SureSilencing human *CAVI* shRNA and control plasmids were from SuperArray Bioscience Corp. (Frederick, MD). EWS cells were transfected using LipofectAMINE (Invitrogen) following manufacturer's protocols. Transfected cells were selected with neomycin (0.8 mg/mL) for 14 days, and antibiotic-resistant pools and individual colonies were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (0.2 mg/mL). The sense *CAVI* construct, pBK-CMV-*CAVI*, including the entire *CAVI* open reading frame but lacking the 3' untranslated region, was used for the reexpression of *CAVI* in A4573 cells expressing a shRNA construct targeted to the *CAVI* 3' sequences. The pBK-CMV-*CAVI* vector and pCHC6-hygro, a plasmid that provides hygromycin resistance, were cotransfected (at a 50:1 molar ratio) into A4574/shCav1 cells using LipofectAMINE. Transfected cells were selected for 2 weeks with hygromycin (100 μg/mL) in medium

containing the neomycin maintenance dose (as above), and resistant cellular pools and individual colonies were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (as above) and hygromycin (50 μg/mL). Similar conditions were used for E-cadherin reexpression experiments.

Gene arrays. Total RNAs (2 μg) from cells treated with scrambled or ASATG oligonucleotides were processed using the SuperArray Ampolabeling Linear Polymerase Reaction kit. Array analyses were independently replicated twice for each experiment. Hybridizations were done on GEArray Q Series (#HS-007, Human Metastasis; see <http://www.superarray.com> for functional gene grouping, and Supplementary Table S1) according to manufacturer's protocols. Relative gene expression levels from each replicated array were determined by densitometry, normalized for loading with β-actin, and analyzed with the GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray) software. Arrays for the analysis of *EWS/FLI-1* shRNA effect on gene expression were carried out and analyzed as previously described (21).

Electron microscopy. General procedures were as described (23). Preparations were examined and photographed using a Hitachi H-7600 instrument (Hitachi High Technologies America, Inc., Pleasanton, CA).

Reverse transcription-PCR. RNA extraction, reverse transcription-PCR (RT-PCR) conditions, and PCR product analysis and sequencing were as described (19, 20). Primers ACAAGCCCAACAACAAGG (upper) and ATCGGGATGCCAAAGAGG (lower) were used for amplification of *CAVI*; for *E-cadherin*, CTCACATTTCCCAACTCTCTC (upper) and CGCTCCT-TCTTCATCATAG (lower); TCCAGCAGCCTACGACCAG (upper) and AGGAGAAGGACGAAGGAGCC (lower) for *Snail*; and for *EWS/FLI-1* we used ACAAGCCCAACAACAAGG (upper) and ATCGGGATGCCAAAGAGG (lower). Primers were from Bio-Synthesis. Amplifications of type-2 receptor for TGFβ (TGFβR2) and human β-actin were as described (19, 20). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semiquantitative estimate of relative mRNA abundance.

Site-directed mutagenesis and luciferase reporter assays. The reporter plasmid pGL3-cavFL, carrying luciferase under transcriptional control of the human, full-length *CAVI* promoter was a gift from Dr. Vijay Shah (Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN). Two similar constructs containing either a G → T mutation (pGL3-mut1Cav) or a C → T mutation (pGL3-mut2Cav) within the ETS-binding site present in the human *CAVI* promoter (position –140; Fig. 2A) were generated using the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis system (Stratagene Corp., La Jolla, CA) and each of the mutant primers (both from Bio-Synthesis) GCGCAGCACACGTCTGGCCAACCGCGAGC (for the pGL3-mut1Cav construct) or GCGCAGCACACGTCTGGGCCAACCGCGAGC (for pGL3-mut2Cav). The expected mutations (in bold and underlined above) were verified by sequencing. For gene reporter assays, cells were plated in six-well plates, in triplicate, and cotransfected with 4 μg of either pGL3-cavFL, pGL3-mut1Cav, pGL3-mut2Cav, or the pGL3-basic, promoterless vector, plus 5 ng of the pRL-SV40 vector, with LipofectAMINE 2000 (Invitrogen). Luciferase activity in cell lysates was determined with a Dual-Luciferase Reporter System (Promega Corp., Madison, WI) by luminometry, and data were normalized to *Renilla* luciferase activity and total protein concentration.

Anchorage-independent growth and tumorigenicity assays. Soft agar assays were done as described (19). Tumorigenicity assays were carried out essentially as described (20), under protocols approved by the Georgetown University Animal Care and Use Committee. Immunodeficient, athymic nude (BALB/c *nu/nu*) mice (from the U.S. National Cancer Institute) were injected s.c. into the right posterior flank with 4 × 10⁶ pBK-CMV- or AS10/*CAV*-transfected cells in 100 μL of Matrigel basement membrane matrix (BD Biosciences). Tumor growth was monitored daily for 20 days.

Statistical analysis. Unless otherwise indicated, RT-PCR and Western blot analyses were repeated at least thrice. Data from densitometric quantification analyses were expressed as mean ± SD. For these and other assays involving statistical analysis, ANOVA or Student's *t* tests were used to assess the significance of differences between groups or individual variables, respectively. *P* ≤ 0.01 was regarded as significant.

Results

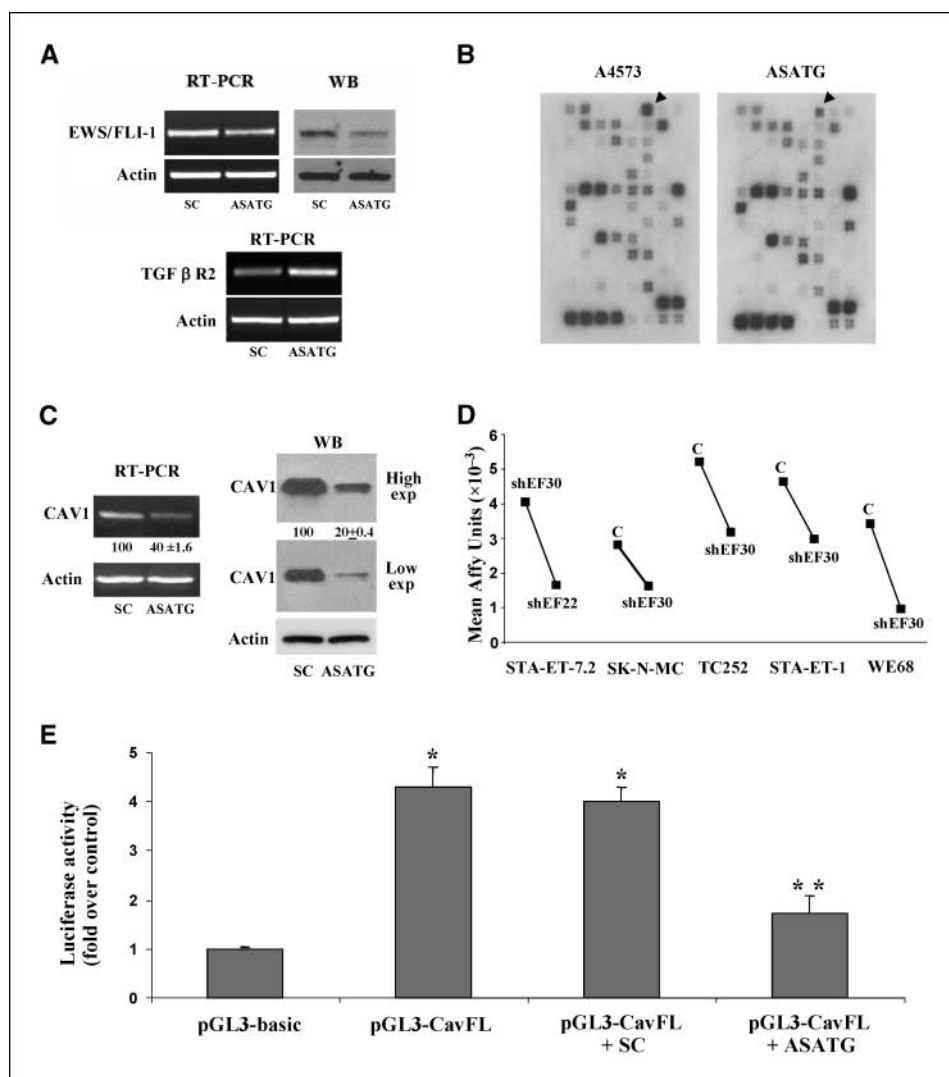
Consistent down-regulation of CAV1 by EWS/FLI-1 knock-down in EWS cells. To identify EWS/FLI-1 targets related to invasion/metastasis, we initially studied A4573 EWS cells, which carry a type 3 translocation (24) and, having a high proliferation rate, represent a good model for aggressive EWS. Our strategy involved two steps: antisense oligonucleotide treatment to knockdown EWS/FLI-1 expression and comparative array analysis of subsequent expression changes of genes related to invasion and metastasis. Exposure of A4573 cells, for 48 hours, to a 25-mer antisense oligonucleotide (ASATG) targeting the *EWS/FLI-1* mRNA translation initiation region (22) reduced *EWS/FLI-1* mRNA and protein by about 50% and 65%, respectively, relative to control cells treated with control scrambled oligonucleotide (Fig. 1A), which had no detectable effect. Up-regulation of *TGF β 2*, a known target transcriptionally repressed by EWS/FLI-1 (5), validated the functional effectiveness of ASATG treatment (Fig. 1A). Comparative analyses between scrambled and ASATG-treated cells using cDNA arrays containing 96 metastasis-associated genes (Fig. 1B) identified *CAV1* as the gene showing the greatest extent of down-regulation (~ 2.5 -fold) after ASATG treatment (complete data and a comparison with previous reports on EWS/FLI-1 expression

profiling are included in Supplementary Table S1). Results on *CAV1* down-regulation were validated by RT-PCR and Western blot analyses. Relative to scrambled controls, ASATG treatment substantially reduced *CAV1* mRNA (~ 2.5 -fold) and, more remarkably, *CAV1* protein (~ 5 -fold; Fig. 1C).

Because ASATG targeted the translation initiation region of EWS/FLI-1, it could also down-regulate the expression of the normal *EWS* allele present in EWS cells. To ascertain that *CAV1* down-regulation was not a consequence of *EWS* down-regulation (~ 1.8 -fold; data not shown) or a nonspecific effect of either the antisense technique or the A4573 cells, we explored the effect on *CAV1* expression of EWS/FLI-1 knockdown with retroviral constructs expressing translocation type-specific shRNAs in various other EWS cell lines, by examining data from microarray analyses done previously (21) with the Affimetrix HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Results (Fig. 1D) showed that, relative to cells expressing either translocation type mismatched shRNA constructs or the empty pSR vector, *CAV1* was consistently down-regulated (1.6- to 3.5-fold) by EWS/FLI-1 knockdown in all EWS cell lines tested.

The consistent *CAV1* down-regulation caused by EWS/FLI-1 knockdown with two different methods, in multiple EWS cell lines,

Figure 1. *CAV1* is a transcriptional target of EWS/FLI-1. **A**, EWS/FLI-1 antisense treatment (ASATG) reduced *EWS/FLI-1* mRNA (RT-PCR) and protein [Western blot (WB)] in A4573 cells, relative to cells treated with scrambled oligonucleotides. Accordingly, EWS/FLI-1 down-regulation concomitantly up-regulated *TGF β 2* mRNA. **B**, biotin-labeled cDNAs from ASATG (right) and scrambled (SC)-treated (left) cells were hybridized to metastasis-gene arrays. Representative comparison, indicating (black arrowheads) the location of *CAV1*. **C**, detection of *CAV1* mRNA (RT-PCR) and protein (Western blot) in extracts of cells used for array analyses; experiments were carried out at least twice. Numerical values reflect relative densitometric signal intensities (mean value \pm SD). Two exposures (high exp and low exp) are shown to better illustrate *CAV1* expression differences. **D**, changes in *CAV1* expression in the indicated EWS cells detected by microarray analysis after EWS/FLI-1 knockdown with junction type-specific retroviral shRNA (bottom) relative to their respective controls (shEF30 and C; top); results (from Affimetrix chip U133A) are shown as mean Affy values for probe sets 203065_s_at and 212097_at. **E**, luciferase reporter assays showed that the activity of the *CAV1* promoter was inhibited in A4573 cells treated with the ASATG oligonucleotide, whereas it was not affected by exposure to the control scrambled oligonucleotide. *, $P \leq 0.001$ versus pGL3 basic; **, $P \leq 0.001$ versus pGL3-Cav1 + SC.



strongly suggested that CAV1 could be an EWS/FLI-1 transcriptional target. To explore whether EWS/FLI-1 participates in the regulation of the *CAV1* promoter, we did gene reporter assays after transfection of A4573 cells with a construct carrying luciferase under the transcriptional control of the full-length *CAV1* promoter (pGL3-cavFL) and maintaining the cells in the presence or absence of the ASATG oligonucleotide or the scrambled control. Results (Fig. 1E) showed that the *CAV1* promoter was functional in A4573, and that the increase in luciferase levels (~4-fold) relative to control pGL3-basic-transfected cells was not significantly affected by treatment with the scrambled control, whereas luciferase activity was only increased by about 1.7-fold in cells treated with ASATG. The significant ($P \leq 0.01$) difference between *CAV1* promoter activity in untreated or scrambled-treated cells versus ASATG-treated cells further implicated EWS/FLI-1 as a regulator of *CAV1* expression in EWS cells.

CAV1 is a direct target of EWS/FLI-1. Reasoning that regulating *CAV1* expression in EWS cells may be a function common to EWS/FLI-1 proteins carrying distinct fusion subtypes, we used chromatin immunoprecipitation to investigate the possible binding of EWS/FLI-1 proteins *in vivo* to EBS(s) present

within the human *CAV1* promoter, using EWS cell lines (TC-71, SK-ES-1, and A4573) representative of the main three EWS/FLI-1 junction subtypes (19). Analysis of possible EBS(s) in the human *CAV1* promoter (Genbank accession no. AF095591; ref. 25) with the MatInspector software (26), identified a putative EBS at position -140. Interestingly, this site (GTCC; Fig. 2A) is a nonconsensus EBS (27) that retains the invariant TCC ETS-binding core (28) and was shown to have prominent ETS-binding activity in the human HNP-*defensin-1* promoter (29). Using a set of primers that amplified a fragment between positions -216 and +18, encompassing the EBS (Fig. 2A), and an antibody that recognized the COOH terminus of the FLI-1 protein, results showed that EWS/FLI-1 proteins did bind *in vivo* to the EBS within the *CAV1* promoter in all cell lines tested (Fig. 2A). Furthermore, the fact that similar results were obtained when immunoprecipitations were carried out with an antibody against the NH₂ terminus of the EWS protein, but not when an antibody against the NH₂ terminus of FLI-1 (not present in the EWS/FLI-1 hybrid proteins) or a nonspecific immunoglobulin (IgG) control were used, strongly supported the notion that *CAV1* expression is regulated by EWS/FLI-1. The specificity of these results was further strengthened by

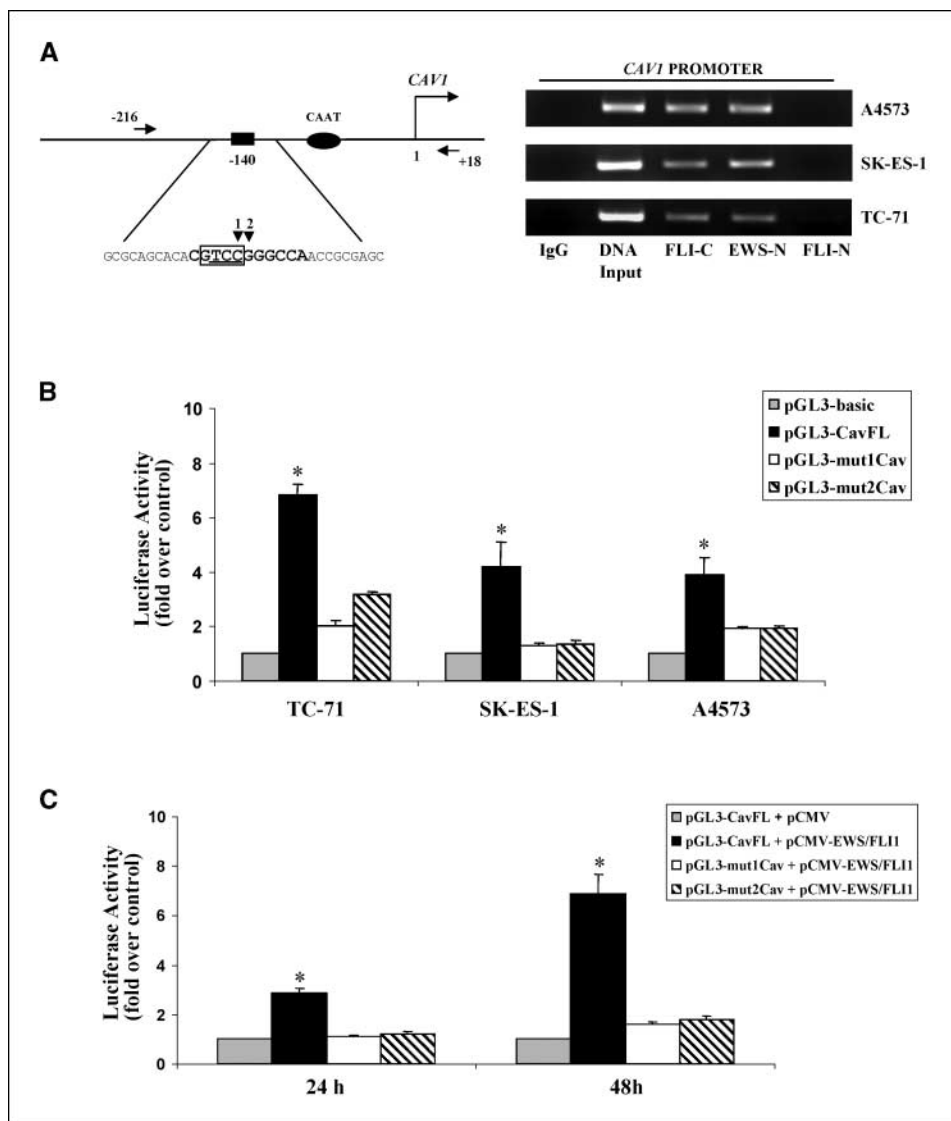


Figure 2. CAV1 is a direct target of EWS/FLI-1. **A**, *CAV1* promoter region encompasses a nonconsensus EBS (black rectangle). The nucleotide sequence of the main motif is framed, and the invariant core is underlined in capitals (▼), bases mutated in **B** and **C**. Small arrows show the position and coordinates of PCR primers used for chromatin immunoprecipitation analysis (right). Immunoprecipitation of soluble chromatin from indicated cells was done with antibodies shown (against NH₂- or COOH-terminal peptides) or a nonspecific immunoglobulin (IgG). Final DNA extracts and total input DNA, as positive control, were PCR amplified with the same primers. **B**, relative to luciferase expression levels driven by the wild-type promoter (pGL3-Cav1), mutations of the EWS/FLI-1 binding site within the *CAV1* promoter significantly reduced its activity to luciferase levels approaching those in negative controls (pGL3-basic), in the three EWS cell lines indicated. *, $P \leq 0.001$ (Student's *t* test). **C**, relative luciferase activity in RD cells cotransfected with EWS/FLI-1 and wild-type or mutated constructs of the *CAV1* promoter. Only the wild-type promoter could be progressively activated over time by introduction of EWS/FLI-1 in cells that do not express the oncoprotein, whereas the luciferase activity levels driven by the mutated forms of the promoter were indistinguishable from the controls. *, $P \leq 0.001$ versus cells without EWS/FLI-1.

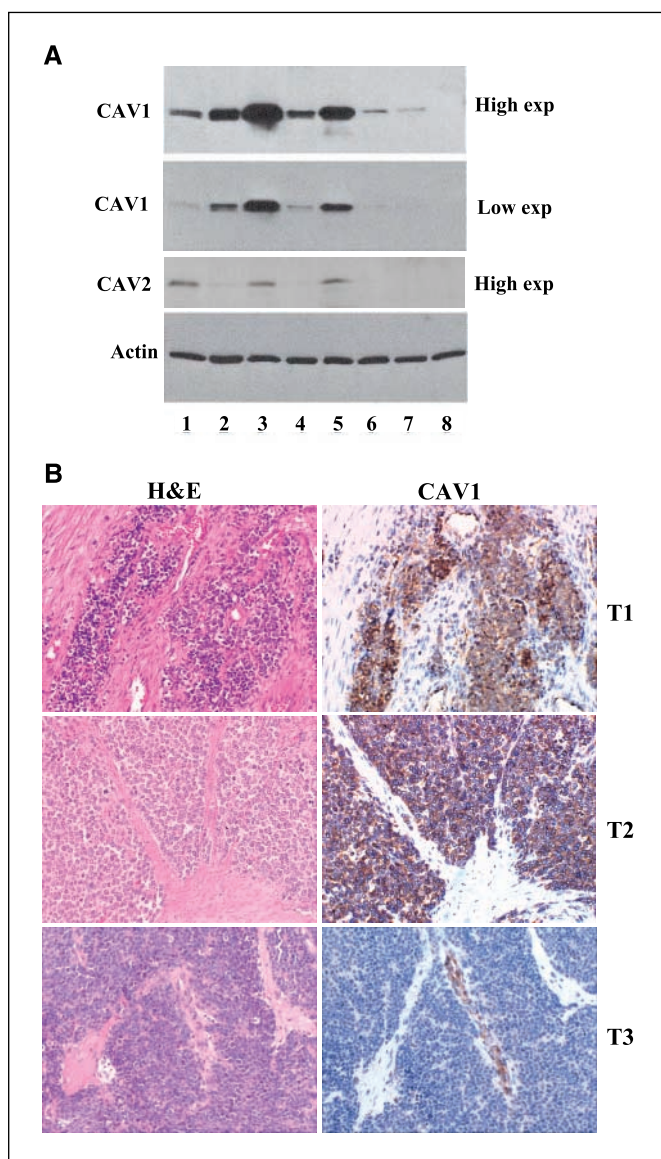


Figure 3. CAV1 is highly expressed in EWS cell lines and solid tumors. *A*, immunoblot analysis, with anti-CAV1 antibody, of lysates from ESFT cell lines (lane 1, TC-71; lane 2, SK-ES-1; lane 3, A4573; lane 4, SK-N-MC; lane 5, TC-32) carrying different *EWS/FLI-1* translocations, prostate cancer cell lines (lane 6, PC3; lane 7, LNCaP), included as positive controls, and a colon cancer cell line (lane 8, HT-29), used as the negative control. EWS cells express much lower levels of CAV2, also shown for comparative purposes. Two exposures are shown to better illustrate expression differences. β -Actin was used as the loading control. *B*, immunohistochemical analysis of CAV1 protein expression in representative EWS tumor specimens showing either intense cytoplasmic staining of the tumor cells (T₁ and T₂) or negative CAV1 staining (T₃). Staining in CAV1-negative tumors was restricted to endothelial vascular cells. *H&E*, H&E-stained serial sections. Magnification, $\times 40$.

the fact that no PCR products were obtained in chromatin immunoprecipitation experiments with a primer set designed to amplify a 160-bp nonoverlapping upstream *CAV1* gene fragment (positions -576 to -736) lacking an EBS (Supplementary Fig. S1).

To further show that *EWS/FLI-1* proteins indeed play a role in controlling *CAV1* promoter activity, we did gene reporter assays using constructs carrying luciferase under the transcriptional control of either the full-length (pGL3-CavFL) wild-type *CAV1* promoter (30) or versions of the same promoter in which we

altered the EBS by site-directed mutagenesis at two different positions (Fig. 2A): a G \rightarrow T at the nucleotide immediately flanking the ETS-binding invariant core (pGL3-mut1Cav) and a C \rightarrow T within the core itself (pGL3-mut2Cav). These constructs, and the pGL3-basic negative control, were transiently transfected into TC-71, SK-ES-1, and A4573 cells, and luciferase levels were determined. Results (Fig. 2B) showed that the *CAV1* promoter was functional in the three cell lines, and that its activity was significantly reduced (~ 2.1 - to 3.5-fold) in the three cell types ($P \leq 0.001$ in all cases) by introduction of each of the single mutations within the putative *EWS/FLI-1* binding site. In additional experiments, we used RD rhabdomyosarcoma cells to perform gene reporter assays by cotransfecting the same *CAV1* promoter constructs described above with a cytomegalovirus (CMV)-based *EWS/FLI-1* expression construct. Interference from endogenous factors is greatly minimized in RD cells because they do not carry *EWS/FLI-1* translocations and express nearly undetectable *CAV1* levels (refs. 31, 32; data not shown). Results (Fig. 2C) showed increased luciferase activity (up to about 7-fold, 48 hours posttransfection; $P \leq 0.001$ versus all other cases) only in cells cotransfected with the wild-type *CAV1* promoter and *EWS/FLI-1*. Luciferase levels in cells cotransfected with either of the *CAV1* promoter mutants were not significantly different from those in cells cotransfected with wild-type *CAV1* promoter and empty CMV vector.

Taken together, these data not only provided unambiguous evidence supporting that *CAV1* is a direct transcriptional target of *EWS/FLI-1* but also predicted that *CAV1* would be expressed at high levels in ESFT cell lines and tumor samples. Indeed, expression analyses showed that ESFT cell lines (Fig. 3A, lanes 1-5) expressed substantially greater *CAV1* levels than prostate cancer cell lines (Fig. 3A, lanes 6 and 7), generally considered as examples of high *CAV1* expression (33). For comparison, the same EWS cell lines expressed *CAV2* at very low levels (Fig. 3A), only detectable after exposures much longer than those needed to detect *CAV1*. Interestingly, the elevated levels of *CAV1* expression in EWS cells were not affected by either their proliferation status or the induction of apoptosis, as shown by the fact that they remained invariable when A4573 cells were either cultured without serum or induced to undergo apoptosis by cisplatin treatment (Supplementary Fig. S2A). In addition, strong *CAV1* staining was detected in 35 of 42 (83.3%) ESFT tumor samples tested (Fig. 3B; Supplementary Table S2), using the staining of endothelial cells within the samples as the normal positive reference. *CAV1* staining was negative in nontumor portions of the samples (Fig. 3B, T₁) or restricted to endothelial cells in blood vessels in tumor samples scored as negative (Fig. 3B, T₃).

CAV1 knockdown inhibits anchorage-independent growth and tumorigenicity of EWS cells. To investigate a possible role for *CAV1* in *EWS/FLI-1*-induced oncogenesis, A4573 cells, which express the highest *CAV1* levels among the ESFT cell lines tested (Fig. 3A, lane 3), were stably transfected with an antisense *CAV1* cDNA construct. Antisense efficacy was determined by Western analysis of extracts of several individual transfected clones and one cellular pool isolated after antibiotic selection (Fig. 4A), to rule out possible clonal variability confounders. Relative to untransfected cells and to cells transfected with empty vector (pBK-CMV), all transfected cells showed substantially reduced *CAV1* expression ($>80\%$ inhibition), and clone 10 (AS10/*CAV1*), with *CAV1* reduced about 90% (Fig. 4A, lane 3), was selected for further characterization. *In vitro*, although there were no

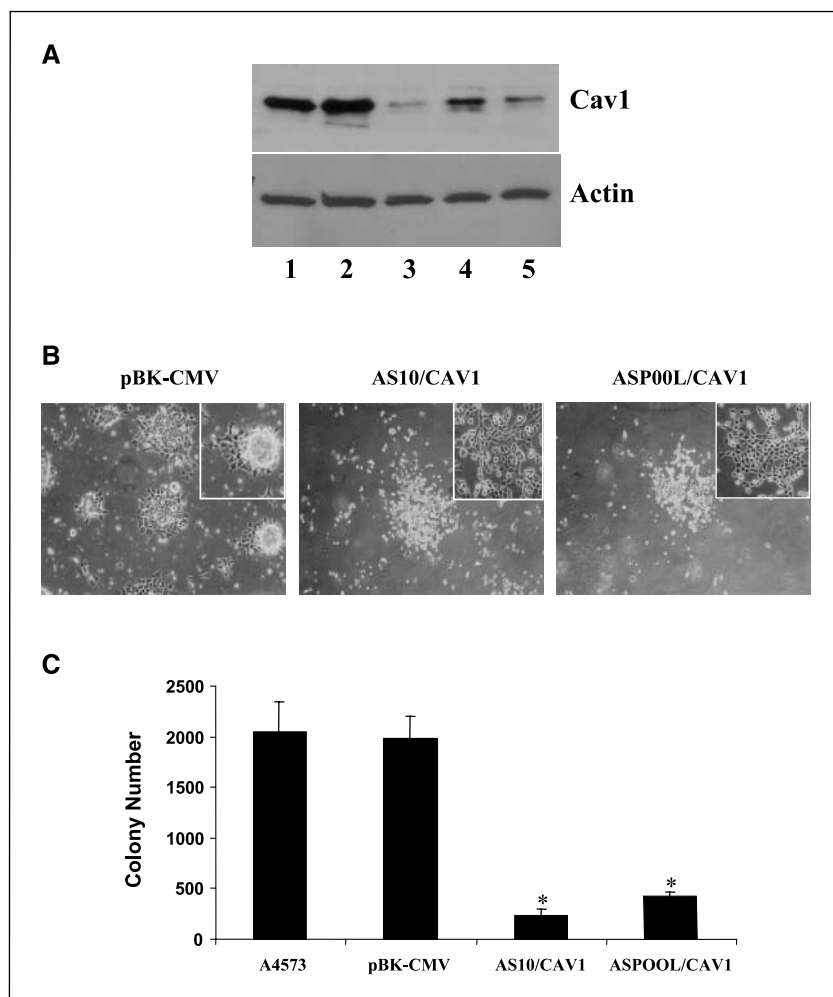


Figure 4. Knockdown of CAV1 expression with antisense RNA down-regulates the malignant phenotype of EWS cells *in vitro*. **A**, immunoblot showing substantially reduced CAV1 levels in individual clones (lane 3, AS10/CAV1; lane 4, AS21/CAV1) and a pool (lane 5, ASPOOL/CAV1) of A4573 cells stably expressing CAV1 antisense RNA compared with untransfected A4573 cells (lane 1) and cells transfected with empty vector DNA (lane 2). β -Actin was the loading control. **B**, phase-contrast micrographs taken from 60% confluent cultures of control A4573/pBK-CMV cells (left) and A4573/AS10/CAV1 (middle) and A4573/ASPOOL/CAV1 (right) antisense-expressing cells, illustrating the different morphologies and growth patterns in culture of the antisense-transfected cells relative to those transfected with vector alone. *Inset*, details of the different morphologies and growth modalities. **C**, anchorage-independent growth assay showing data analysis from triplicate cultures of parental A4573, A4573/pBK-CMV, A4573/AS10/CAV1, and A4573/ASPOOL/CAV1 cells plated in soft agar giving rise to colonies larger than 0.5 mm in diameter. *, $P \leq 0.001$, statistical significance versus untransfected and control vector-transfected cells.

significant differences in growth and cell cycle distribution between AS10/CAV1 cells and pBK-CMV-transfected cells (Supplementary Fig. S2B), CAV1 down-regulation resulted in remarkable morphologic changes (Fig. 4B). Whereas, similar to untransfected A4573 cells, control pBK-CMV-transfected (A4573/pBK-CMV) cells grew in dense clusters with small cells piling up into three-dimensional structures, A4573/AS10/CAV1 and A4573/ASPOOL/CAV1 antisense-transfected cells seemed strikingly more flat and growing in loosely packed monolayers of more refractile cells, but retained the A4573 original size (Fig. 4B). Furthermore, CAV1 down-regulation inhibited anchorage-independent growth of A4573 cells, causing a significant ($\sim 90\%$, $P < 0.01$) reduction in the number of colonies growing in soft-agar cultures (Fig. 4C). Similar morphologic changes and inhibition of anchorage-independent growth were observed with individual clones and pooled populations of all cell lines tested (data from similar experiments with SK-ES-1 cells are shown in Supplementary Fig. S3). The specific dependence of these phenotypic changes on the loss of CAV1 was shown by the fact that essentially identical results were obtained when CAV1 knockdown was achieved by transfection of A4573 cells with shRNA vectors targeting two different CAV1 regions. Stable expression of each shRNA vector substantially reduced CAV1 levels (Fig. 5A), caused a nearly complete disappearance of caveolae from the cells, as shown by electron microscopy (Fig. 5B), resulted in morphologic

changes similar to those described above (Fig. 5C), and significantly inhibited ($\sim 89\%$, $P < 0.01$) soft agar growth (Fig. 5D). These results showed that the observed effects were indeed due to CAV1 down-regulation, and confirmed that CAV1 plays an important role controlling the morphology and some neoplastic traits of EWS cells.

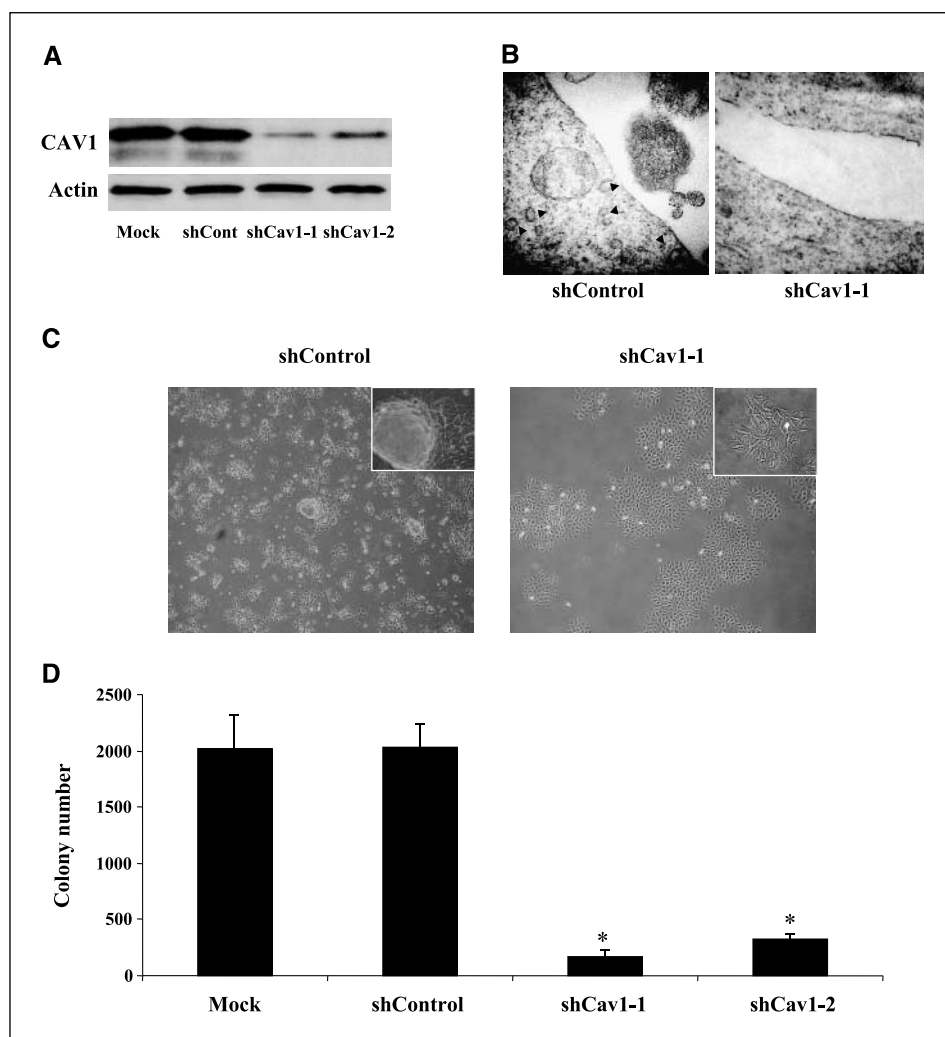
Most importantly, *in vivo* experiments showed that, as early as 16 days after s.c. injection into nude mice, A4573/AS10/CAV1-derived xenografts were significantly smaller ($P = 0.001$) than those induced by A4573/pBK-CMV control cells (Fig. 6A). Four days later, when tumors derived from A4573/pBK-CMV cells reached an average volume about 1,600 mm³, and mice had to be sacrificed to comply with institutional Animal Care and Use guidelines, tumors derived from A4573/AS10/CAV1 cells had reached an average volume of only 250 mm³ (Fig. 6B). Immunohistochemical analyses of paraffin-embedded tumors showed no detectable CAV1 expression in A4573/AS10/CAV1 xenografts compared with the highly positive staining of A4573/pBK-CMV-derived tumors (Fig. 6C). Altogether, these data show that CAV1 is a key positive effector, necessary the development of the transformed phenotype in EWS carcinogenesis.

Down-regulation of CAV1 function leads to Snail up-regulation and the concomitant loss of E-cadherin expression. The altered morphology of CAV1 knockdown cells (Fig. 4B and Fig. 5C), their inability to grow in soft agar (Fig. 4C and Fig. 5D),

and slow growth as nude mouse xenografts (Fig. 6A and B) suggested that CAV1 down-regulation could have disrupted intercellular contacts, probably by inducing the loss of E-cadherin as described for other systems (15). The loss of *E-cadherin* mRNA and protein in A4573/AS10/CAV1 cells was confirmed by RT-PCR and immunoblotting (Fig. 7A) and immunofluorescence analyses (Fig. 7B). Because Snail has been described as a transcriptional repressor of E-cadherin (34, 35), and CAV1 down-regulation induced *Snail* mRNA up-regulation in other cell types (15), we examined whether Snail mediated the CAV1 knockdown effects in EWS cells. RT-PCR assays showed that CAV1 down-regulation increased *Snail* mRNA expression in A4573 cells (Fig. 7C). The specific dependence of E-cadherin and Snail expression changes on CAV1 loss was shown by the fact that CAV1 knockdown with the same *CAV1* shRNA vectors mentioned above yielded essentially identical results (Supplementary Fig. S4A). To show that the increased Snail expression was responsible for the E-cadherin loss, the altered morphology, and the inhibition of anchorage-independent growth of A4573/AS10/CAV1 cells, A4573 cells were transfected with a HA-tagged *Snail* cDNA expression vector. Snail transfection did strongly down-regulate E-cadherin (Fig. 7D), induced concomitant morphologic alterations in A4573 cells (Fig. 7E) essentially identical to those induced by CAV1 down-regulation in A4573/AS10/CAV1 cells, and blocked their

anchorage-independent growth (Fig. 7F). These data clearly showed that increased expression of Snail was sufficient to recapitulate in A4573 cells a phenotype essentially identical to that promoted by CAV1 knockdown in A4573/AS10/CAV1 cells. In the context of EWS tumor progression, CAV1 may be directly or indirectly involved in maintaining Snail expression at low levels to allow the functional expression of E-cadherin. Because E-cadherin loss has been described as a frequent alteration in a variety of tumor types and has been associated with their invasive/metastatic properties (36), we sought to more firmly establish the biological significance of the pathway leading from CAV1 overexpression to maintenance of E-cadherin in EWS by transfecting A4573 cells with a dominant-negative construct to disrupt E-cadherin function and comparing its effects to those induced by CAV1 knockdown (Fig. 4B and C) or by Snail overexpression (Fig. 7E and F). Relative to A4573 cells transfected with empty vector, stable expression of a dominant-negative E-cadherin mutant (Trp156Ala; ref. 37) caused morphologic changes essentially identical (Supplementary Fig. S4B) to those induced by CAV1 down-regulation and Snail overexpression and also caused a significant ($P < 0.01$) decrease in the ability of A4573 cells to grow in soft agar (Supplementary Fig. S4C). Basically, the same effects were observed with SK-ES-1 and TC-71 cells (data not shown). The contribution and importance of the CAV1/Snail/

Figure 5. Knockdown of CAV1 expression with shRNA constructs prevents caveolae formation and down-regulates the malignant phenotype of EWS cells *in vitro*. **A**, immunoblot showing substantially reduced CAV1 levels in A4573 cells stably expressing either of two shRNA constructs targeting different *CAV1* sequences (shCav1-1 and shCav1-2), relative to mock-transfected or vector-transfected (shCont) A4573 cells (lane 1). β -Actin was the loading control. **B**, electron micrographs illustrating the virtual disappearance of caveolae from cells after shRNA-mediated CAV1 knockdown (shCav1) compared with vector-transfected (shControl) cells. **C**, phase-contrast micrographs taken from 50% to 60% confluent cultures of the same cell types as in (B) illustrating the different morphologies and growth patterns in culture, essentially identical to those observed in control- and antisense-transfected A4573 cells (in Fig. 4). *Inset*, details of the different morphologies and growth modalities. **D**, anchorage-independent growth assay showing data analysis from triplicate cultures of parental A4573 (Mock), vector-transfected cells (shControl), and cells stably expressing the two shRNA constructs indicated. Represent cells plated in soft agar giving rise to colonies larger than 0.5 mm in diameter. *, $P \leq 0.001$, statistical significance versus untransfected and control vector-transfected cells.



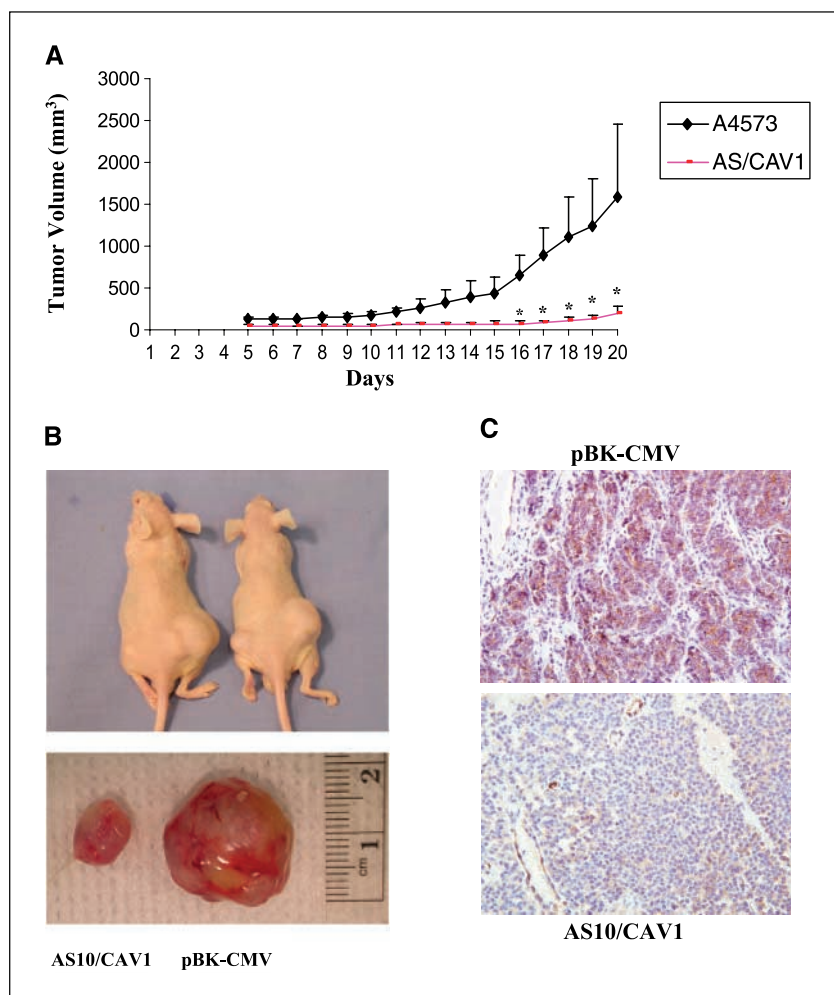


Figure 6. CAV1 knockdown down-regulates the tumorigenicity of EWS cells. **A**, xenografts established by s.c. injection of A4573/pBK-CMV cells ($n = 10$) and A4573/AS10/CAV1 ($n = 10$) cells in athymic (BALB/c *nu/nu*) nude mice were grown for 20 days. Tumor growth in animals injected with A4573/AS10/CAV1 cells was markedly slower than that of tumors in animals injected with A4573/pBK-CMV cells. *, $P = 0.001$, statistically significant differences in tumor volume. **B**, mice carrying A4573/pBK-CMV and A4573/AS10/CAV1 cells were euthanized when controls reached an average tumor volume of about 1,600 mm³ (20 days). At that time, tumors were excised and measured. Results agreed with data in (A). **C**, immunohistochemical analysis of sections from tumors excised from mice injected with the indicated cells, using a rabbit anti-CAV1 antibody, showed the dramatically reduced levels of CAV1 caused by antisense expression in A4573/AS10/CAV1 cells. Magnification, $\times 20$.

E-cadherin pathway to the malignant phenotype of EWS cells was shown by the fact that reexpression of CAV1 or E-cadherin, but not of dominant-negative E-cadherin, in A4573 cells in which CAV1 expression was previously knockdown with shRNA constructs rescued the growth pattern and morphology characteristic of the A4573 cells: cells regained expression of CAV1 or E-cadherin (Fig. 8A) and grew again in dense clusters of small cells piling up into three-dimensional structures, whereas the same cells transfected with dominant-negative E-cadherin, as a control, did not recover the original A4573 phenotypic traits (Fig. 8B). Furthermore, these reexpression experiments resulted in the rescue of the ability of A4573 cells to form colonies with high efficiency in soft agar cultures (shown for the case of E-cadherin in Fig. 8C).

Discussion

Efficient antisense oligonucleotide-mediated EWS/FLI-1 down-regulation led to array experiments to identify possible EWS/FLI-1 targets involved in EWS invasion/metastasis. Results from these experiments and microarray analyses of other EWS cells in which EWS/FLI-1 was knockdown with junction type-specific shRNAs (21) consistently and reproducibly identified CAV1 as a possible EWS/FLI-1 target. Results agree with (Supplementary Table S1) and are supported by previous reports describing CAV1

expression changes in studies of EWS/FLI-1 gene expression profiling in other systems. EWS/FLI-1 knockdown by retroviral-mediated RNA interference down-regulated CAV1 expression in EWS cells (38). Moreover, expression of EWS/FLI-1 in cells that do not express it (mouse NIH/3T3, human neuroblastoma and rhabdomyosarcoma), increased CAV1 expression (31, 39, 40), and increased expression of CAV1 was identified as a feature differentiating EWS from other sarcomas (41) and related tumor types (32).

Because our results also agreed with reports that ETS transcription factors enhance *CAV1* promoter transactivation (42), we analyzed it by chromatin immunoprecipitation assays with PCR primers that would amplify the -140 region containing its putative EBS and antibodies that should (against the EWS NH₂ terminus or the FLI-1 COOH terminus) or should not (against the FLI-1 NH₂ terminus or a non-specific IgG) immunoprecipitate DNA-cross-linked EWS/FLI-1. Considering the negative results obtained with PCR primers for a *CAV1* gene region that would not cofractionate with the EBS-containing fragment, data from chromatin immunoprecipitation experiments strongly supported the EWS/FLI-1 binding to the *CAV1* promoter EBS, which, interestingly, is a nonconsensus ETS site. However, it is important to note that ETS-binding factors can bind to sites that do not conform to their *in vitro*-derived high-affinity consensus sequences (27, 28), and that this particular site (GTCC) was shown to have

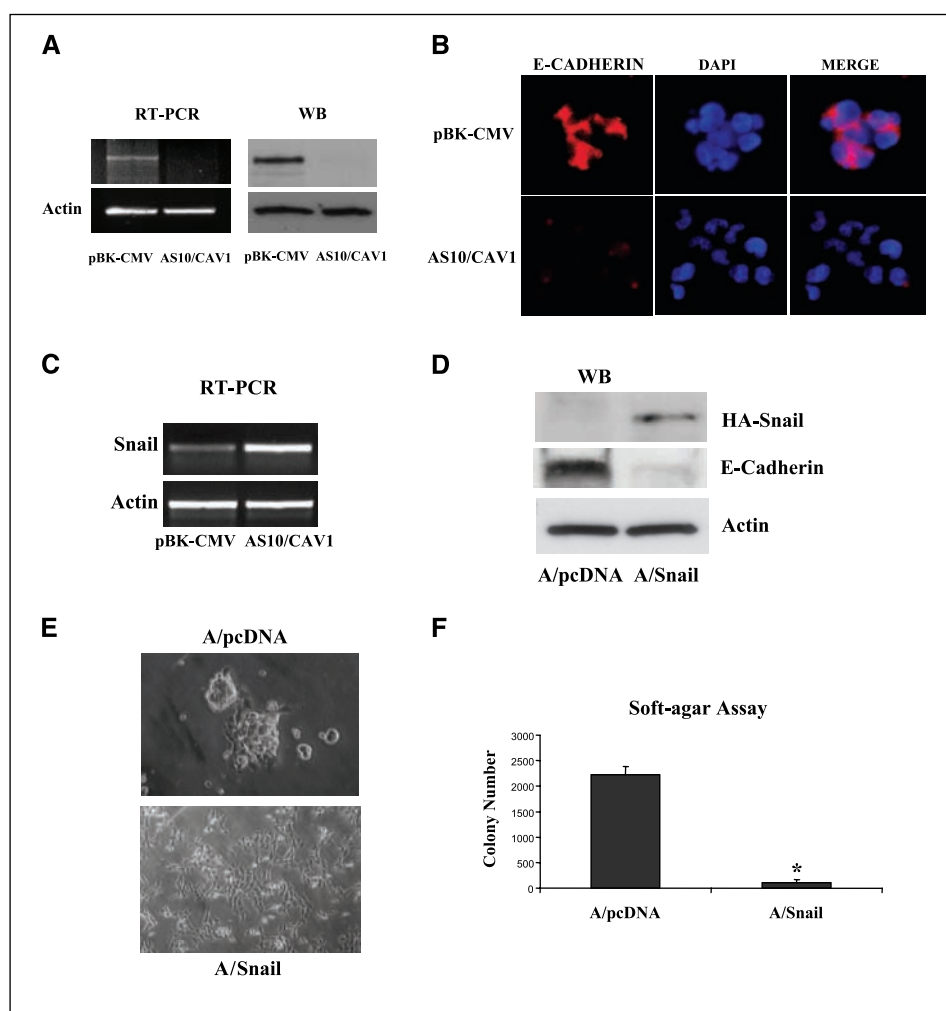
substantial ETS-binding activity in the human HNP-*defensin-1* promoter (29). It seems possible that, as an aberrant transcription factor, EWS/FLI-1 may have greater affinity for the nonconsensus *CAVI* promoter EBS. That *CAVI* is a direct EWS/FLI-1 target was also strongly supported by (a) results from luciferase reporter assays demonstrating that the *CAVI* promoter activity was significantly reduced by both antisense-mediated EWS/FLI-1 down-regulation (Fig. 1E) and by mutations within or immediately adjacent to the putative EWS/FLI-1 binding site (Fig. 2B), and (b) the fact that the wild-type *CAVI* promoter, but not its mutated versions, was up-regulated when cotransfected with an EWS/FLI-1 expression construct into RD cells, which express negligible *CAVI* levels and no EWS/FLI-1 (Fig. 2C). Together with the high *CAVI* expression detected in EWS cell lines and most EWS tumor samples tested, these data provide strong evidence supporting that *CAVI* is a direct EWS/FLI-1 transcriptional target, are consistent with the reported association of *CAVI* expression with metastasis and bad prognosis for different cancers (14), and agree with data (31, 32, 41, 43) describing *CAVI* as a potentially useful diagnostic marker for EWS.

CAVI is a "tumor- and metastasis-modifying" gene product (14) that may act differently depending on cell/tissue context, tumor type, and/or progression stage. Previous reports showed that *CAVI* acts as a tumor suppressor in cancers such as breast tumors (14), and as a tumor promoter in prostate and other tumors (17),

including some soft tissue sarcomas (12). Our results demonstrating that in EWS cells (a) *CAVI* knockdown promoted remarkable morphologic changes and reduced their anchorage-independent growth; (b) reexpression of *CAVI* in *CAVI*-knockdown cells rescued their original morphology; and (c) *CAVI* down-regulation significantly reduced their tumorigenicity, conclusively show that *CAVI* functions to promote the malignant phenotype in EWS carcinogenesis. Although EWS cells express *CAV2*, its expression levels are markedly lower than those of *CAVI* and were not consistently down-regulated by EWS/FLI-1 knockdown in the EWS cell lines tested. It seems unlikely that *CAV2* may be an important coparticipant with *CAVI* in promoting the EWS malignant phenotype.

Smith et al. (38) recently showed that EWS/FLI-1 knockdown caused the loss of oncogenic transformation and tumorigenicity by EWS A673 cells, without affecting their growth in culture. These results strongly supported that EWS/FLI-1 functions such as stimulation of cell proliferation and induction of oncogenic transformation and tumorigenesis may be dissociated and, consequently, may be mediated by independent sets of EWS/FLI-1 targets. The fact that EWS/FLI-1 knockdown results in *CAVI* down-regulation regardless of its effect on cell growth strongly suggests that *CAVI* belongs in the category of EWS/FLI-1 targets related to EWS oncogenic transformation. EWS/FLI-1 knockdown in A673 EWS cells down-regulated *CAVI*

Figure 7. Inhibition of tumorigenicity by *CAVI* down-regulation correlates with up-regulation of Snail and the concomitant loss of E-cadherin. **A**, RT-PCR and Western blot analysis showing that, relative to control A4573/pBK-CMV cells, the expression of E-cadherin mRNA and protein are down-regulated in A4573/AS10/*CAVI* cells. β -Actin was used as the loading control. **B**, immunofluorescence microscopy images of E-cadherin (Texas Red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained nuclei (blue) in A4573/pBK-CMV (three-dimensional aggregates) and A4573/AS10/*CAVI* (singly attached) cells. **C**, RT-PCR analysis indicates that *Snail* mRNA is markedly up-regulated in A4573/AS10/*CAVI* cells relative to control A4573/pBK-CMV cells. β -Actin was used as the loading control. **D**, Western blot analysis indicates that stable transfection of HA-tagged Snail cDNA into A4573 cells (A/Snail) results in substantial down-regulation of E-cadherin protein levels, relative to the levels observed in cells transfected with empty vector (A/pcDNA). β -Actin was used as the loading control. **E**, phase-contrast micrographs of empty vector (A/pcDNA) and Snail-transfected (A/Snail) A4573 cells show that Snail expression recapitulates the morphology and growth pattern (shown in Fig. 4 and Fig. 5C) induced by antisense-mediated down-regulation of *CAVI* in A4573/AS10/*CAVI* cells. **F**, analysis of colony formation data from triplicate cultures of A4573 transfected with empty vector (A/pcDNA) or with the Snail expression construct (A/Snail) plated in soft agar and giving rise to colonies larger than 0.5 mm in diameter. *, $P < 0.001$, differences observed were statistically significant.



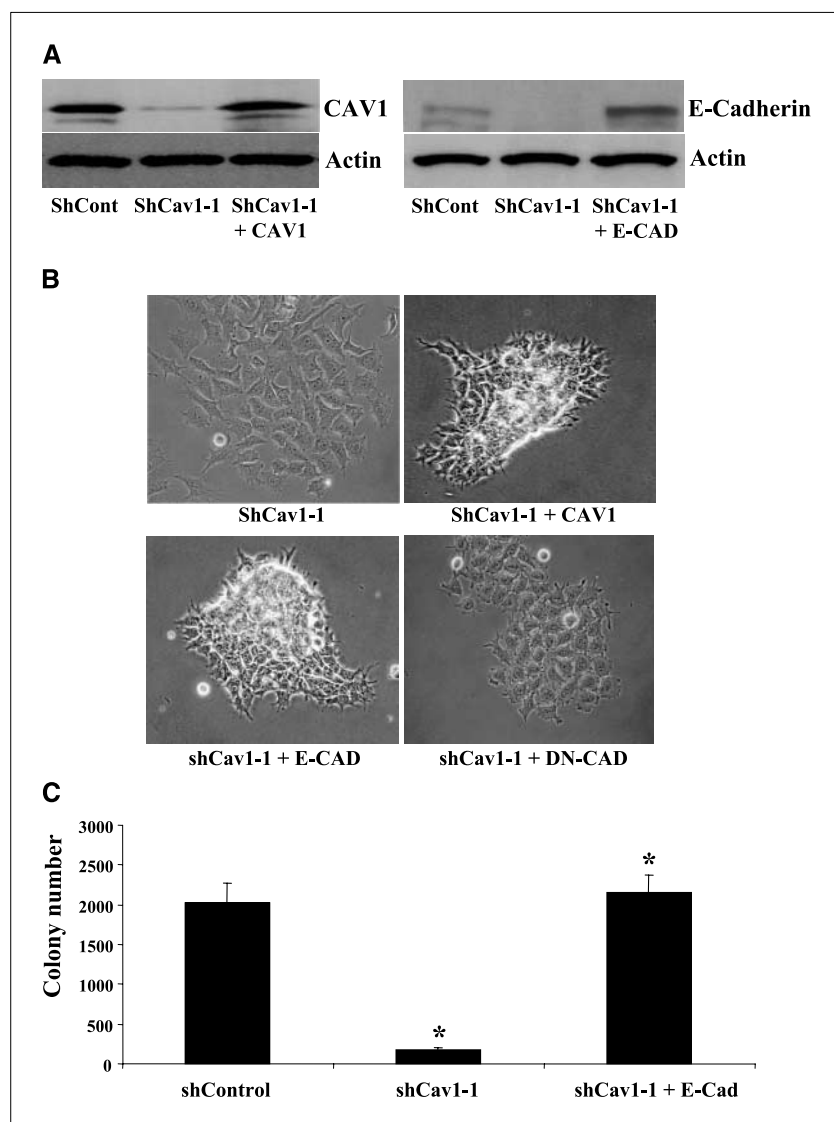


Figure 8. Reexpression of CAV1 or E-cadherin in CAV1 knockdown cells rescues the growth pattern, morphology, and colony formation in soft agar cultures. *A*, Western immunoblots showing the recovery of CAV1 and E-cadherin expression in CAV1 knockdown (ShCav1) cells after transfection with CMV-based constructs with either the *CAV1* open reading frame (lacking the 3' untranslated sequences and thus resistant to shCAV1-1) or the full-length *E-cadherin* cDNA. β -Actin was used as the loading reference. *B*, reexpression of CAV1 or E-cadherin (E-CAD) but not of dominant-negative E-cadherin (DN-CAD) rescued the original morphology. *C*, colony formation in soft agar cultures was also rescued by reexpression of E-cadherin ($P \leq 0.001$ in all cases versus shControl).

without affecting their growth in culture (38), whereas EWS/FLI-1 knockdown consistently down-regulated CAV1 in all EWS cells tested by us, although their proliferation was slowed down to different degrees. The absence of CAV1 expression changes when cells were grown without serum or induced to undergo apoptosis (Supplementary Fig. S2) also support the dissociation between CAV1 expression and proliferation status in EWS cells.

Our results show the contribution of the CAV1/Snail/E-cadherin pathway to the malignant phenotype of EWS cells. The observations that (a) EWS cells displayed essentially identical phenotypic characteristics after either CAV1 knockdown, Snail overexpression, or E-cadherin down-regulation and, in particular, (b) these phenotypic traits could be reversed by reexpression of CAV1 or E-cadherin in cells in which CAV1 expression was down-regulated to those typical of unmanipulated A4573 cells, are consistent with a coordinated regulation of CAV1, Snail, and E-cadherin in EWS cells and agree with reports indicating that CAV1 down-regulation up-regulates Snail mRNA in other cell types (15), and that Snail is a direct repressor of

E-cadherin expression (34, 35). Consistent with the CAV1/Snail/E-cadherin pathway working downstream of EWS/FLI-1 in EWS cells, EWS/FLI-1 expression was not altered by ectopic changes in the expression of any individual pathway component. However, our finding that EWS cells express E-cadherin contrasts with the frequent E-cadherin loss reported for other tumors (36). Nevertheless, simultaneous CAV1 and E-cadherin expression has been described also in some tumor cell lines and solid tumors (44, 45), and E-cadherin down-regulation correlated with diminished cell-cell adhesion, cell proliferation, and tumor growth in mice (46). Our finding that E-cadherin expression is not lost in EWS cells places EWS closer to synovial sarcomas (45) and agrees with the recent description of a novel tumor progression pathway not involving E-cadherin loss (47). Overall, our results show that E-cadherin expression in EWS cells is dependent on CAV1 and necessary for tumor development and strongly suggest that intercellular contacts are important in EWS tumorigenesis.

By identifying CAV1 as a direct EWS/FLI-1 target necessary for EWS tumorigenicity, our findings also recognize CAV1 as a

suitable target for developing new ESFT therapies that, because normal cells express much lower CAV1 levels, may provide an improved treatment scenario with greater specificity and efficacy.

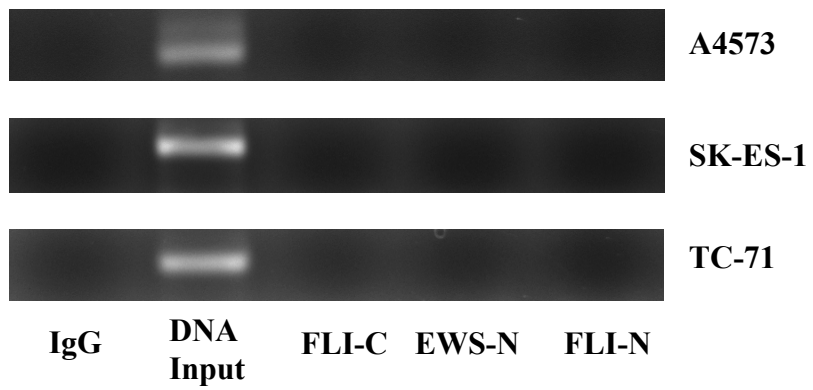
Acknowledgments

Received 3/13/2006; revised 7/21/2006; accepted 8/22/2006.

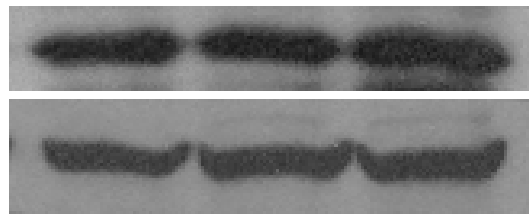
References

- Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS. Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:276-87.
- Barker LM, Pendergrass TW, Sanders JE, Hawkins DS. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:4354-62.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992;359:162-5.
- Arvand A, Denny CT. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 2001;20:5747-54.
- Hahn KB, Cho K, Lee C, et al. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet* 1999;23:222-7.
- Fukuma M, Okita H, Hata J, Umezawa A. Upregulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein, is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma. *Oncogene* 2003;22:1-9.
- Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, et al. Identification of p21^{WAF1/CIP1} as a direct target of EWS-FLI1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem* 2003;278:15105-15.
- Abaan OD, Levenson A, Khan O, Furth PA, Uren A, Toretzky JA. PITPL1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 and modulates Ewing's Sarcoma tumorigenesis. *Oncogene* 2005;24:2715-22.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999;11:7289-304.
- Drab M, Verkade P, Elger M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2404-5.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001;276:38121-38.
- Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, et al. Downregulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 2001;158:833-9.
- Williams TM, Medina F, Badano I, et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis *in vivo*. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* 2004;279:51630-46.
- Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:494-506.
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 2003;4:499-515.
- Mouraviev V, Li L, Tahir SA, et al. The role of caveolin-1 in androgen insensitive prostate cancer. *J Urol* 2002;168:1589-96.
- Williams TM, Hassan GS, Li J, et al. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in TRAMP mice. *J Biol Chem* 2005;280:25134-45.
- Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW, Kao SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:461-7.
- Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 2003;22:9282-7.
- Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V. Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2005;65:9320-7.
- Siligan C, Ban J, Bachmaier R, et al. EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 2005;24:2512-24.
- Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-FLI1 antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;99:239-47.
- Artym V, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 2006;66:3034-43.
- Soldatenkov VA, Trofimova IN, Rouzaut A, McDermott F, Dritschilo A, Notario V. Differential regulation of the response to DNA damage in Ewing's sarcoma cells by ETS1 and EWS/FLI-1. *Oncogene* 2002;21:2890-5.
- Hurlstone AFL, Reid G, Reeves JR, et al. Analysis of the *CAVEOLIN-1* gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumors and tumor derived cell lines. *Oncogene* 1999;18:1881-90.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005;21:2933-42.
- Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19:6533-48.
- Wasyluk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993;211:7-18.
- Ma Y, Su Q, Tempst P. Differentiation-stimulated activity binds an ETS-like, essential regulatory element in the human promyelocytic *defensin-1* promoter. *J Biol Chem* 1998;273:8727-40.
- Cao S, Fernandez-Zapico ME, Jin D, et al. KLF11-mediated repression antagonizes Sp1/sterol-responsive element-binding protein-induced transcriptional activation of caveolin-1 in response to cholesterol signaling. *J Biol Chem* 2005;280:1901-10.
- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. 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* 2005;65:4633-44.
- Khan J, Wei JS, Ringner M, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7:658-9.
- Yang G, Truong LD, Timme TL, et al. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1873-80.
- Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84-9.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
- Fraga MF, Herranz M, Espada J, et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 2004;64:5527-34.
- Chitaev NA, Troyanovsky SM. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol* 1998;142:837-46.
- Smith R, Owen LA, Trem DJ, et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies *NKX2.2* as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 2006;9:405-16.
- Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 2002;1:393-401.
- Rorie CJ, Weissman BE. The Ews/Fli-1 fusion gene changes the status of p53 in neuroblastoma tumor cell lines. *Cancer Res* 2004;64:7288-95.
- Baird K, Davis S, Antonescu CR, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 2005;65:9226-35.
- Kathuria H, Cao YX, Ramirez MI, Williams MC. Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem* 2004;279:30028-36.
- Schaefer KL, Brachwitz K, Wai DH, et al. Expression profiling of t(12;22) positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic up-regulation of potential new marker genes including ERBB3. *Cancer Res* 2004;64:3395-405.
- Miotti S, Tomassetti A, Facetti I, Sanna E, Berno V, Canevari S. Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases. *Am J Pathol* 2005;167:1411-27.
- Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, et al. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004;23:8629-38.
- Alper O, De Santis ML, Stromberg K, Hacker NF, Cho-Chung YS, Salomon DS. Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2000;88:566-74.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006;9:261-72.

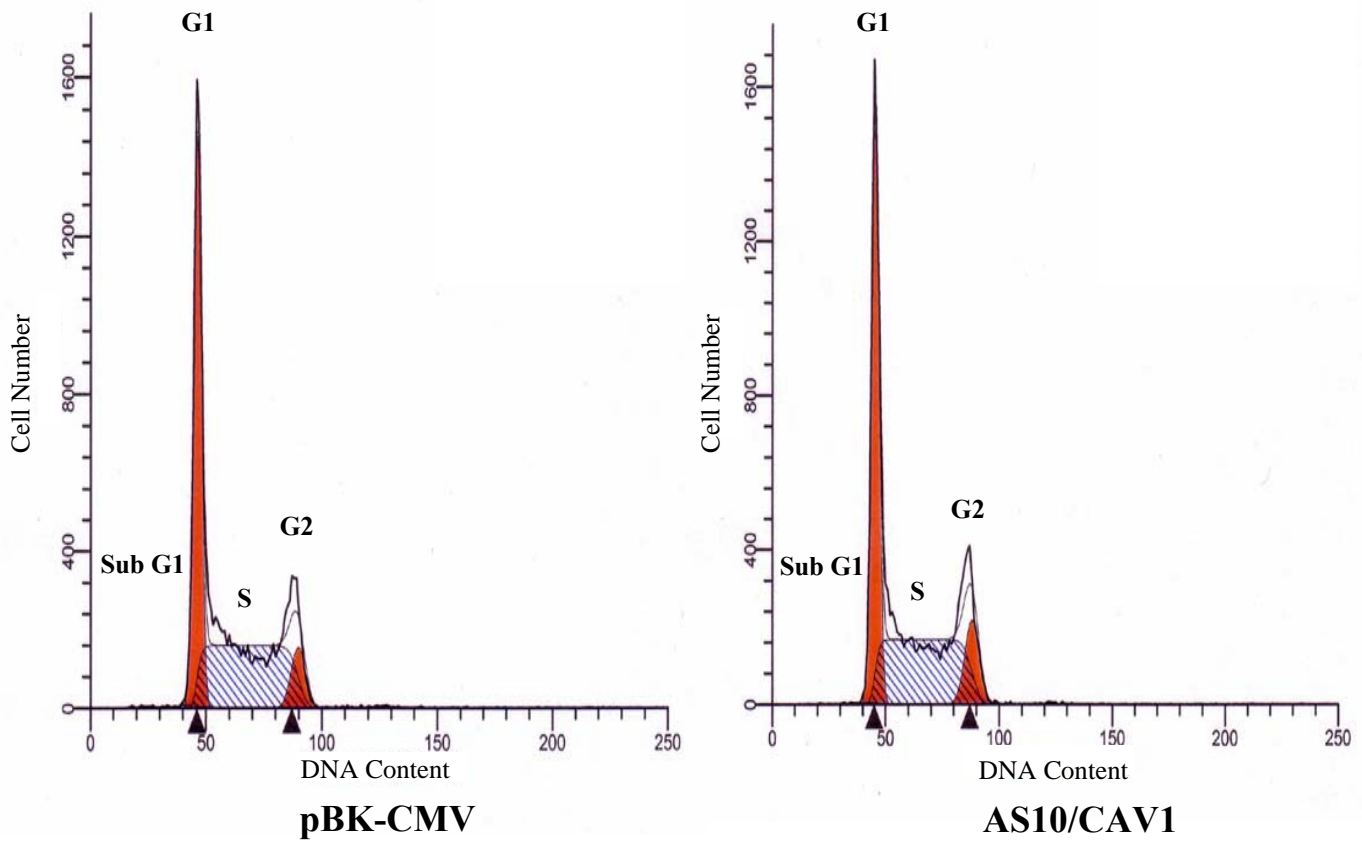
CAV-1 PROMOTER UPSTREAM REGION

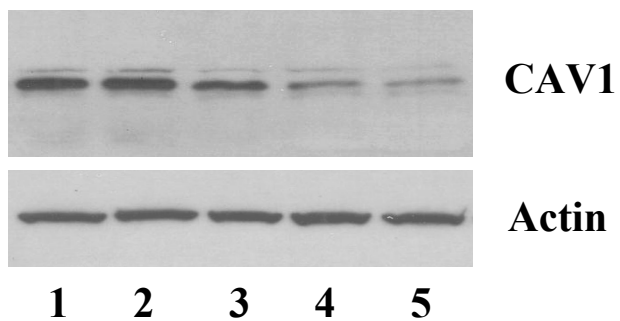
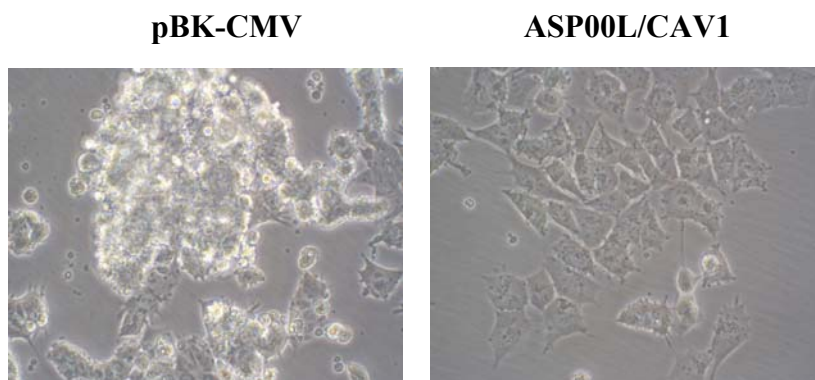
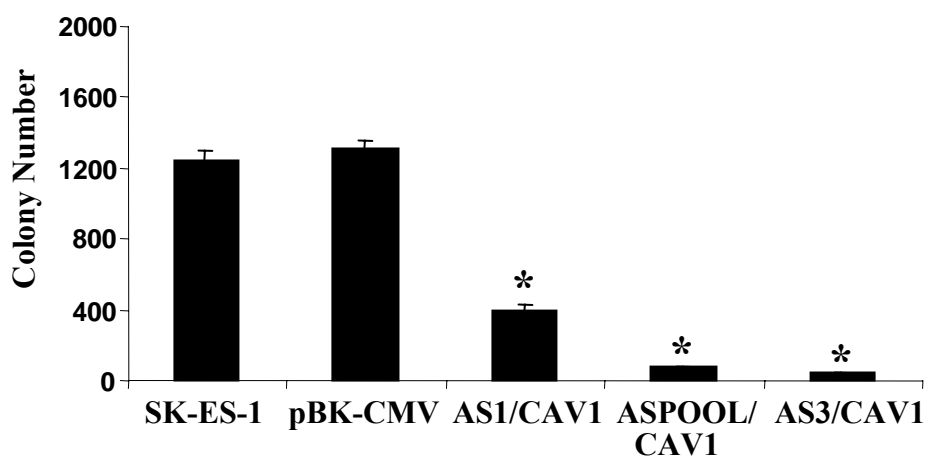


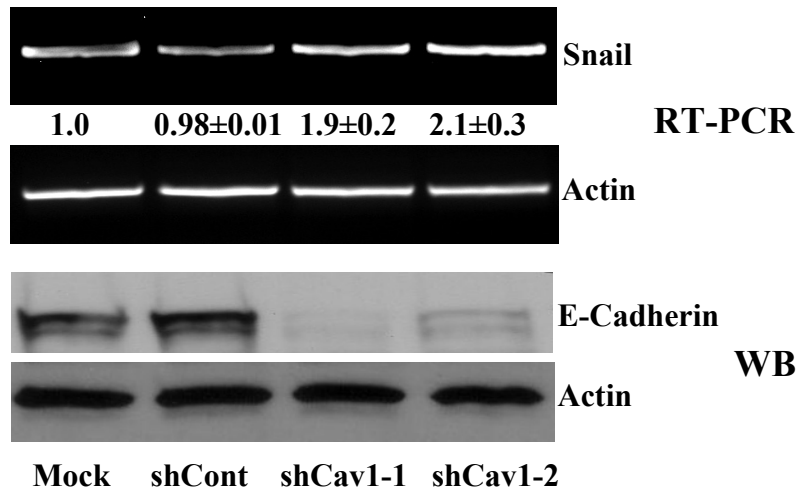
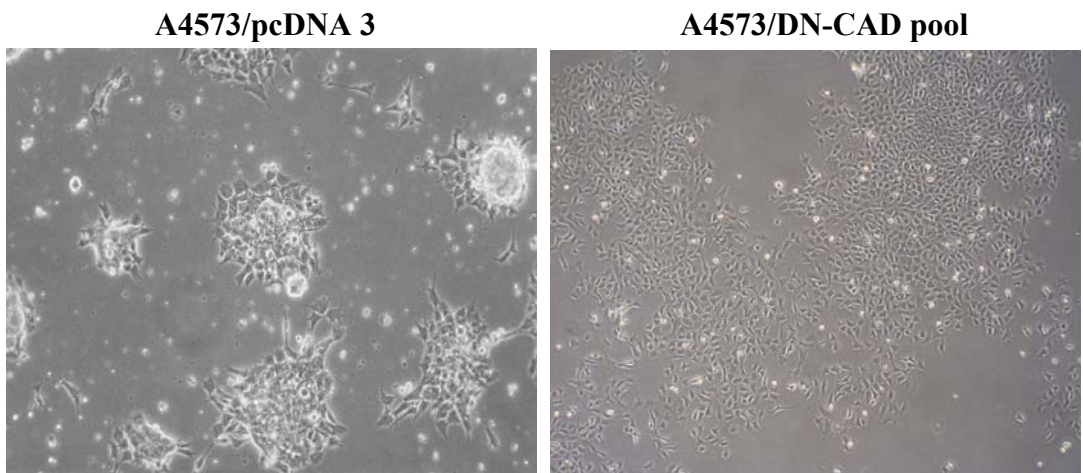
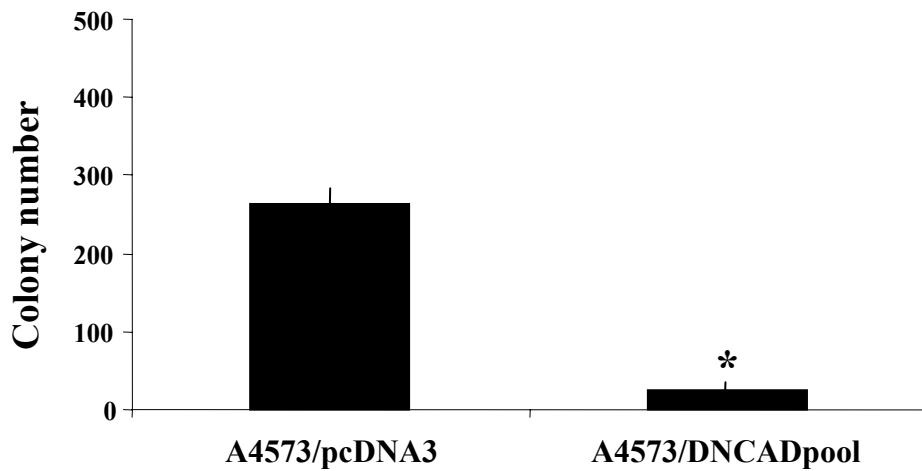
Supplemental FIGURE 1

A**A4573 cells****CAV1****Actin**

Serum	+	-	+
Apoptosis	-	-	+

B**Supplemental FIGURE 2**

A**B****C****Supplemental FIGURE 3**

A**B****C****Supplemental FIGURE 4**

I - Genes overexpressed in A4573 Ewing's sarcoma cells

UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name	Ref
Hs.74034	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kD	Caveolin-1	30,39,40,42
Hs.173894	M37435	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf-1	
Hs.214982	J03202	LAMC1	Laminin, gamma 1	Laminin B2	
Hs.36566	D26309	LIMK1	LIM domain kinase 1	LIM kinase	
Hs.5734	NM_012215	MGEA5	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	Hyaluronidase	
Hs.101448	U35113	MTA1	Metastasis associated 1	MTA-1	36
Hs.79070	X00364	MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	c-myc	30,39,40,42
Hs.118638	NM_000269	NM23A	Homo sapiens non-metastatic cells 1	NM23A	

II - Genes underexpressed in A4573 Ewing's sarcoma cells

UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name	Ref
Hs.100426	AF159141	BRMS1	Homo sapiens breast cancer metastasis-suppressor 1	BrMS1	
Hs.19949	NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis related cysteine protease	Caspase 8, FLICE	
Hs.169610	M59040	CD44	CD44 antigen (homing function and indian blood group system)	CD44	36,39
Hs.75617	X05610	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	Collagen 4 A2	36,39
Hs.99863	NM_001972	ELA2	Homo sapiens elastase 2, neutrophil	Elastase	
Hs.77711	D12765	ETV4	Human mRNA for E1A-F	PEA3	
Hs.7636	X52192	FES	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase fes/fps	c-fes	
Hs.75297	X51943	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	α -FGF	
Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	β -FGF	
Hs.809	X57574	HGF	Hepatocyte growth factor	Scatter factor	
Hs.44227	AF084467	HPSE	Homo sapiens heparanase mRNA	Heparanase	
Hs.151250	U72671	ICAM5	Intracellular adhesion molecule 5, telencephalin	ICAM-5	
Hs.251664	M29645	IGF2	Insulin-like growth factor 2	IGF-II	39
Hs.265829	M59911	ITGA3	Integrin, alpha 3	Integrin α 3	
Hs.227730	X53586	ITGA6	Integrin, alpha 6 subunit	Integrin α 6	36
Hs.95008	NM_002256	KISS1	Kiss-1 metastasis-suppressor	KISS1	
Hs.2258	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10	Stromelysin-2	
Hs.155324	X57766	MMP11	Human stromelysin-3	Stromelysin-3	
Hs.2399	D26512	MMP14	Homo sapiens mRNA for membrane-type matrix metalloproteinase 1	MT1-MMP	
Hs.90800	D83646	MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	MMP16	
Hs.2256	X07819	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP-7	
Hs.73862	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	
Hs.167988	U63041	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM	
Hs.2561	X52599	NGFB	Nerve growth factor, beta polypeptide	NGF β	
Hs.37040	X06374	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF α	36
Hs.77274	D00244	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA	36,39
Hs.81256	NM_002961	S100A4	Homo sapiens S100 calcium-binding protein A4	Mts1	36
Hs.55279	NM_002639	SERPINB5	Protease inhibitor 5 that has been shown to function as tumor suppressor in breast and prostate cancer	Maspin	
Hs.82085	M16006	SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor, type 1	PAI-1	36
Hs.63236	NM_003087	SNCG	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	BCSG1	
Hs.313	M83248	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Osteopontin	36
Hs.198298	NM_005417	SRC	Human c-src-1 proto-oncogene	c-src	
Hs.170009	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TGF- α	
Hs.245188	NM_000362	TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	TIMP-3	

Genes significantly up- and down-regulated by EWS/FLI-1 antisense treatment (≥ 1.8 , $p \leq 0.0001$)

III - Up-regulated genes by ASATG

UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name	Ref
Hs.77274	D00244	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA	36,37
Hs.169610	M59040	CD44	CD44 antigen (homing function and indian blood group system)	CD44	36,37
Hs.167988	U63041	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	NCAM	21,36,37
Hs.325495	NM_003255	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP-2	

IV - Down-regulated genes ASATG

UniGene	Genebank	Symbol	Description	Gene name	Ref
Hs.74034	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kD	Caveolin-1	36
Hs.73793	M32977	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF	
Hs.194657	Z13009	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-Cadherin	E-Cadherin	
Hs.287797	BC009469	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor)	Integrin β 1	

PATIENT ID	AGE (years)	FUSION TYPE	LOCALIZATION	STAGE	CAVEOLIN-1
C22	12	N/A	Humerus	Primary	++
C3	24	N/A	Femur	Primary	++
A3	47	N/A	Groin	Metastatic	+++
C	16	N/A	Tibia	Primary	+
A6	24	N/A	Finger	Primary	+++
A12	10	N/A	Pharynx	Metastatic	+++
B5	15	N/A	Femur	Primary	++
A3	38	N/A	L5	Primary	++
C1	11	N/A	Femur	Metastatic	+++
S1	N/A	N/A	Skin	Metastatic	+++
T236	25	EWS/FLI1 Type 1	Abdomen	Primary	+
T63	7	EWS/FLI1 Type 1	Femur	Primary	+++
T241	5	EWS/FLI1 Type 1	Thorax	Primary	-
T142	12	EWS/FLI1 Type 2	Abdomen	Metastatic	+++
T143	12	EWS/FLI1 Type 1	Abdomen	Primary	-
T211	1	EWS/FLI1 Type 1	Abdomen	Primary	-
T117B	15	EWS/FLI1 Type 1	Femur	Metastatic	+++
T150	16	EWS/ERG	Pelvis	Primary	+++
T190	15	EWS/ERG	Jaw	Primary	++
02B2	14	N/A	Rib	Primary	+++
02B6	17	N/A	Femur	Primary	+++
94B6	12	N/A	Femur	Primary	+++
00B1	13	EWS/FLI1 Type 1	Femur	Primary	+++
99B2	11	N/A	Femur	Primary	+++
00B3	10	EWS/ERG	Femur	Primary	+++
04B9	4	EWS/FLI1 Type 1	Thorax	Primary	+++
01B2	3	EWS/FLI1 Type 1	Abdomen	Primary	+++
96B9	2	N/A	Pelvis	Primary	+++
04B1	7	EWS/FLI1 Type 1	Pelvis	Primary	+++
99B3	16	EWS/ERG	Femur	Primary	+++
02B3	11	N/A	Sacrum	Primary	+++
01B2	10	EWS/FLI1 Type 1	Jaw	Primary	+++
98B8	4	N/A	Neck	Primary	+++
01B2	3	EWS/FLI1 Type 1	Sacrum	Primary	+++
98B2	10	EWS/FLI1 Type 1	Jaw	Primary	+++
04B8	3	EWS/FLI1 Type 1	Jaw	Primary	+++
4B07	16	N/A	N/A	N/A	++
4B08	9	N/A	N/A	N/A	++
4B09	13	N/A	N/A	N/A	+++
4B10	13	EWS/FLI1	N/A	N/A	-
4B11	16	EWS/FLI1	N/A	N/A	++
4B12	1	N/A	N/A	N/A	-

Supplemental Data

Caveolin-1 (*CAVI*) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells

Oscar M Tirado, Silvia Mateo-Lozano, Joaquín Villar, Luis E. Dettin, Anna Llord, Soledad Gallego, Jozef Ban, Heinrich Kovar, and Vicente Notario

Supplemental Experimental Procedures

Cell Cycle analysis

For cell cycle analysis, cells were harvested 24 h after exposure to Cp, washed once in PBS, fixed in 75% ethanol, resuspended in PBS containing 20 µg/ml of propidium iodide (EMD Biosciences Inc.), and incubated for 30 min at 37 °C before flow cytometric analysis was performed at the Flow Cytometry/Cell Sorting Shared Resource of the Vincent T. Lombardi Comprehensive Cancer Center on a FACScan instrument (Becton Dickinson).

Legend for Supplemental Figures and Tables

Supplemental Figure 1. Soluble chromatin from cells indicated was used, after sonication and fractionation to select for chromatin fragments with an average size of less than 500 bp, for IP reactions with antibodies against N- (FLI-N) or C-terminal (FLI-C) FLI-1 peptides, anti-N-terminal EWS (EWS-N) or a non-specific immunoglobulin control (IgG). Final DNA extracts and total input DNA, as positive control, were amplified by PCR with primers designed to amplify a 160-bp fragment of the *CAVI* gene that did not contained any ETS-binding site

(positions -576 to -736). This primer set included GCCTGCTTATTTTTCTTTCCACACC (upper) and CACAGAGGGAGGGATGAGAGACGG (lower).

Supplemental Figure 2. (A) Immunoblot demonstrating that CAV1 expression levels do not appreciably change when A4573 cells are either grown in the absence of serum or induce to undergo apoptosis by treatment with cisplatin (5 μ g/ml). β -actin was the loading control. (B) Cell cycle analysis. Exponentially growing A4573/pBK-CMV and A4573/AS10/CAV1 cells were for 24 h, stained with propidium iodide, and their DNA contents were determined by flow cytometry. No differences in cell cycle distribution between control cells and those in which CAV1 was downregulated.

Supplemental Figure 3. (A) Immunoblot demonstrating substantially reduced CAV1 expression in SK-ES-1 cells stably expressing CAV1 AS RNA (lane 3: clone 1; lane 4, pool; lane 5: clone 3), compared with untransfected SK-ES-1 cells (lane 1) and cells transfected with vector (pBK-CMV) DNA (lane 2). β -actin was the loading control. (B) Phase contrast micrographs of SK-ES-1/pBK-CMV cells (left) and SK-ES-1/ASPOOL/CAV1 cells (right) illustrating their different morphologies and growth patterns in culture. (C) Data analysis from triplicate cultures of parental of SK-ES-1, SK-ES-1/pBK-CMV, SK-ES-1/AS1/CAV1, SK-ES-1/ASPOOL/CAV1 and SK-ES-1/AS3/CAV1 cells plated in soft-agar giving rise to colonies larger than 0.5 mm in diameter. Asterisk indicates statistical significance ($p < 0.01$).

Supplemental Figure 4. (A) CAV1 knockdown with shRNA constructs (shCav1-1 and shCav1-2) targeting two different CAV1 sequences resulted in increased (about 2-fold) expression of Snail and a concomitant decrease in E-cadherin expression, relative to mock transfected (Mock) cells and cells transfected with the control plasmid (shCont). β -actin was the loading control. Data from densitometric analyses of three replicated experiments are indicated (as mean \pm SD).

(B) Phase contrast micrographs of A4573 cells transfected with pcDNA3 vector DNA (A4573/pcDNA3, left) or with a DN mutant of E-cadherin (A4573/DNCAD pool, right) illustrating their different morphologies and growth patterns in culture. (C) Data analysis from triplicate cultures of A4573/pcDNA3 and A4573/DNCAD pool cells plated in soft-agar giving rise to colonies larger than 0.5 mm in diameter. Asterisk shows statistical significance ($p < 0.01$).

Supplemental Table 1. Data from the gene-expression study performed on ASATG-treated cells. Blocks I and II show genes included in the array used (#HS-007 from SuperArray) that were over- or underexpressed in untreated A4573 cells relative to the internal controls present in the array. Blocks III and IV show those genes that were up- or downregulated by ASATG treatment. Red is utilized to indicate agreement between our data and previous studies on gene expression in Ewing's sarcoma. Reference numbers correspond to those included in the text.

Supplemental Table 2. Immunohistochemical analysis of caveolin-1 expression in ESFT samples. Results are presented as N/A, not applicable; (-) negative; (+) low staining; (++) medium staining; or (+++) intense staining. The intensity of caveolin-1 staining was graded in relation to that of endothelial cells in the same tumor specimens.