



Centro Pfizer- Universidad de Granada- Junta de
Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e
Inmunología de la Universidad de Granada



Implicación de la proteasa ADAMTS1 y sus sustratos en angiogénesis y cáncer

Estefanía Martino Echarri

Tesis Doctoral

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Estefanía Martino Echarri
D.L.: GR 2310-2012
ISBN: 978-84--9028-177-2

JUAN CARLOS RODRÍGUEZ MANZANEQUE ESCRIBANO, Investigador principal del grupo de Proteasas y Matriz Extracelular en el Centro Pfizer- Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), Granada.

Certifica que **ESTEFANÍA MARTINO ECHARRI**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección en GENYO el trabajo de investigación titulado: “**Implicación de la proteasa ADAMTS1 y sus sustratos en angiogénesis y cáncer**”. Este trabajo de investigación reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada a de

de 2012

VºBº del Director

La interesada

Juan Carlos Rodríguez Manzaneque Escribano

Estefanía Martino Echarri

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia su respaldo y ánimos durante la realización de esta Tesis. A mi madre, por convencerme de que podía conseguir lo que me propusiese. A mi hermano y a mi tía Milagros, por haberme visitado allí donde he ido para darme todo su apoyo y por lograr que no me despegue de mi gente. A mi abuela Elena, por su amor incondicional y su ayuda insustituible en momentos clave de mi vida.

A mis amigos Lee y Francesca, porque han sido mi familia en Granada y por haber tenido el placer de descubrir junto a ellos esta hermosa ciudad. A mi cuadrilla de Munárriz, por nuestros viajes y vuestras visitas que siempre aportan una dosis de locura y buen humor. A mis amigas de Pamplona, por las geniales acogidas en las visitas a mi ciudad. A mis compañeras y amigas Margot y Chia-yu, porque no me imagino Londres sin vosotras dos.

A todos aquellos con los que compartí buenos momentos en el Institut de Recerca del Vall d'Hebron, en especial a mi querida Martita. A todos los compañeros de Genyo, por estos últimos meses de apoyo incondicional. A Luisja, por sus innumerables consejos y ayudas en la recta final de la tesis. A Rubén, por prestarme su ayuda con su especialidad en el laboratorio y por sus chascarrillos infinitos. A Suyapa, por su valiosa ayuda en el laboratorio y los buenos momentos fuera y dentro de Genyo. A los recién llegados, Javi y Antonio, porque siempre da gusto ver que tu grupo continúa en marcha cuando te vas y es un placer ver que el relevo es excepcional. A Carmen, porque gracias a tu entusiasmo y alegría los años que hemos compartido en el laboratorio han sido inmejorables. Muy especialmente a Juan Carlos y Mariadel, porque además de vuestra aportación incalculable a mi formación científica siempre habéis estado ahí. Además, agradeceremos vuestra calidad científica, humildad y vuestro buen humor que ameniza y facilita el trabajo diario.

Y finalmente a Miquel, por aceptar iniciar una historia juntos en Granada y por alegrar cada día de mi vida.

Nota

A lo largo del texto se utilizarán las abreviaturas de los términos en inglés. Es debido al uso extendido del inglés en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas de manera cotidiana en lenguaje científico. Muchos de los acrónimos en inglés son de uso general en ciencia, por lo que para simplificar el texto se mantendrán las abreviaturas en inglés. Al final del texto se incluye un apéndice en el que se detalla el nombre en español e inglés.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1 ANGIOGÉNESIS	7
1.1 COMPONENTES DE LA VASCULATURA	10
1.1.1 <i>Células endoteliales</i>	10
1.1.2 <i>Reclutamiento de pericitos y estabilización de nuevos vasos</i>	11
1.1.3 <i>Membrana basal vascular</i>	13
1.2 ANGIOGÉNESIS EN CÁNCER.....	14
1.2.1 <i>Tratamiento antiangiogénico del cáncer y resistencia</i>	16
1.3 MECANISMOS ALTERNATIVOS DE VASCULARIZACIÓN.....	17
1.4 MODELOS DE ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS	18
1.4.1 <i>Ensayo de retina</i>	19
1.4.2 <i>Ensayo del anillo de aorta (Aortic Ring Assay, ARA)</i>	20
1.4.3 <i>Cultivos bidimensionales y tridimensionales</i>	21
2 ENTORNO EXTRACELULAR	23
2.1 MATRIZ EXTRACELULAR.....	23
2.2 MEMBRANA BASAL.....	24
2.2.1 <i>Componentes de la membrana basal</i>	25
2.2.2 <i>Función de la membrana basal</i>	25
2.2.3 <i>Membrana basal y cáncer</i>	26
2.3 PROTEASAS EXTRACELULARES	27
2.3.1 <i>Metaloproteasas</i>	28
2.3.2 <i>Inhibidores endógenos de metaloproteasas</i>	30
2.3.3 <i>Metaloproteasas en angiogénesis y cáncer</i>	31
2.3.4 <i>Técnicas de identificación de sustratos</i>	33
3 ADAMTS1	35
3.1 REGULACIÓN Y ACTIVACIÓN DE ADAMTS1	35
3.2 SUSTRATOS DE ADAMTS1.....	36
3.3 IMPLICACIÓN DE ADAMTS1 EN ANGIOGÉNESIS.....	38
3.4 FUNCIÓN DE ADAMTS1 EN CÁNCER Y METÁSTASIS.....	39
3.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE ADAMTS1	40
4 NIDÓGENOS	43

4.1	ESTRUCTURA Y CAPACIDAD DE UNIÓN DE LOS NIDÓGENOS	43
4.2	PROTEOLISIS DE LOS NIDÓGENOS	44
4.3	FUNCIÓN DE LOS NIDÓGENOS.....	46
4.4	NIDÓGENOS Y ANGIOGÉNESIS.....	47
4.5	NIDÓGENOS Y CÁNCER	48
5	IGFBPs	51
5.1	ESTRUCTURA Y CAPACIDAD DE UNIÓN DEL IGFBP2	52
5.2	PROTEOLISIS DEL IGFBP2	53
5.3	FUNCIÓN DEL IGFBP2.....	53
5.4	IMPLICACIONES EN CÁNCER DEL IGFBP2.....	54
	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
	RESULTADOS	59
1	STUDIES OF NIDOGEN-1 AND NIDOGEN-2 PROTEOLYSIS AND DEPOSITION IN VASCULAR BASEMENT MEMBRANES. CONTRIBUTION OF ADAMTS1 PROTEOLYTIC ACTIVITY DURING VASCULARIZATION.	63
2	DOWN-REGULATION OF ADAMTS1 IN HUMAN BREAST CARCINOMA AND RELEVANCE OF ITS PROTEOLYTIC ACTIVITY ON VASCULAR BASEMENT MEMBRANE COMPONENTS NIDOGEN-1 AND NIDOGEN-2.	89
3	RE-EVALUATION OF THE CONTRIBUTION OF IGFBP2 IN GLIOMA. RELEVANCE OF ITS PROTEOLYSIS INDUCED BY ADAMTS1 PROTEASE.	115
	DISCUSIÓN.....	131
1	EFFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE ADAMTS1.....	133
2	ADAMTS1 COMO MODULADOR DE ANGIOGÉNESIS	134
3	ADAMTS1 EN CÁNCER	136
4	PROTEOLISIS DE LOS NIDÓGENOS.....	139
5	NIDÓGENOS Y CÁNCER.....	141
6	IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS SUSTRATOS DE ADAMTS1	143
7	PROTEOLISIS DEL IGFBP2 Y SU FUNCIÓN EN GLIOMA.....	143
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	145
	CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES	147
	APÉNDICE	149
	BIBLIOGRAFÍA.....	153
	ANEXO PUBLICACIONES.....	161

RESUMEN

Investigaciones recientes están demostrando que el microentorno extracelular es muy dinámico, ya que tiene que modificarse en respuesta a estímulos durante procesos como inflamación, angiogénesis y desarrollo. Las proteasas extracelulares son responsables de importantes modificaciones post-traduccionales de proteínas para permitir la reestructuración del entorno que facilite la migración celular y que module la activación de proteínas señalizadoras. Nuestro interés se centra en el estudio de la metaloproteasa ADAMTS1 (*α disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats 1*) que es el primer miembro de la familia de metaloproteasas ADAMTSs. Se ha descrito para ADAMTS1 una importante función inhibidora de angiogénesis aunque su contribución en cáncer sigue resultando controvertida.

Partiendo de la hipótesis de que el conocimiento de los sustratos de esta proteasa nos ayudará a comprender mejor su función en cáncer y angiogénesis, se realizaron diferentes aproximaciones proteómicas para la determinación de nuevos sustratos de la proteasa. De manera muy relevante se encontraron los nidógenos como sustratos de ADAMTS1. Los nidógenos forman parte de la membrana basal por lo que tienen una estrecha relación con la vasculatura. Nuestro interés se ha centrado en la determinación del efecto proteolítico *in vivo* de ADAMTS1 sobre los nidógenos y su impacto en su correcta localización en la membrana basal vascular para determinar su posible implicación en el efecto antiangiogénico de ADAMTS1.

Nuestros resultados corroboran la función antiangiogénica de ADAMTS1. La expresión elevada de la proteasa viene acompañada de modificaciones de la morfología de los vasos sanguíneos en un modelo de xenógrafo, sugiriendo anomalías en su funcionalidad. Además, la sobreexpresión de la proteasa en este modelo inhibe drásticamente la formación de tumores y en muestras de cáncer de mama se observa una disminución en la expresión de ADAMTS1 en comparación con tejido sano. Estos datos evidencian una potencial función protectora de ADAMTS1 frente al desarrollo tumoral. En el análisis detallado de la vasculatura tumoral, así como de tejidos sanos de modelos murinos con distintos niveles de ADAMTS1, se observa una alteración en la localización de nidógenos en la membrana basal vascular, de manera inversa a la presencia de la proteasa. Además, nuestros datos sugieren que tanto la expresión de ADAMTS1 como la proteólisis de nidógenos parecen dos eventos esenciales para regular la angiogénesis.

En la búsqueda de nuevos sustratos de la proteasa ADAMTS1 se ha identificado el IGFBP2, un miembro de la familia de los IGFBPs. Nuestros estudios muestran que la proteólisis del IGFBP2 ocurre de manera relevante en glioma. Mientras que el análisis de datos de expresión de gliomas corrobora a IGFBP2 como un factor de mal pronóstico, también obtuvimos una relación directa con la expresión de ADAMTS1. Mediante diversos ensayos se demuestra que ADAMTS1 puede ejercer una inducción de la actividad de IGFII, posiblemente debido a la proteólisis de IGFBP2. En este contexto, es importante resaltar los hallazgos de fenómenos de mimetismo vascular en gliomas, junto a nuestras evidencias que resaltan la contribución de ADAMTS1 en estos eventos.

Nuestros resultados evidencian que ADAMTS1 en función de la disponibilidad de un sustrato concreto puede realizar una función diferente, por tanto, resulta determinante el estudio detallado de la interacción sustrato-proteasa para elucidar la función de esta proteasa en cáncer.

ABSTRACT

Recent observations are demonstrating the extracellular space is a very dynamic microenvironment due to the constant modifications of extracellular components in response to stimuli for angiogenesis, inflammation and development. The extracellular proteases are responsible for the post-traducctional modifications to allow the reorganization of the extracellular environment cells to migrate and the modulation of signalling molecules activation. We focus our attention in the first member of the ADAMTSs family of metalloproteases, ADAMTS1 (*a desintegrin and metalloproteinasa with thrompospondin repeats 1*). It is been demonstrate its action as an angiogenesis inhibitor and a controversial action in tumors.

Our hypothesis about the knowledge of protease substrates will help for the understanding of its function in angiogenesis and cancer, encouraged us to realize different proteomic approaches for the detection of new substrates of ADAMTS1. Very relevantly nidogens were found in the screening of ADAMTS1 substrates. Nidogens are components of basement membrane making these molecules to be tightly related to vasculature. Our interest is focused in the determination of nidogen cleavage *in vivo* by ADAMTS1 protease and its impact on their proper localization on vascular basement membrane to determine their possible implication in the antiangiogenic effect of ADAMTS1.

Our results corroborate the antiangiogenic function of ADAMTS1. The elevated expression of the protease goes in parallel to the decrease vessel density and morphological changes in tumor vessels from xenograft model, which suggests abnormalities in vessel functionality. Even more, the overexpression of the protease in this model inhibits almost completely the appearance of tumors and breast tumor samples present decreased ADAMTS1 expression in comparison to healthy tissue. These data evidence a potential role of ADAMTS1 as tumor protective protease. In the detailed analysis of vasculature of tumors and normal mouse tissue expressing different levels of ADAMTS1, it is been found that the protease presence inversely modulates nidogens deposition on the vascular basement membrane. However, ADAMTS1 expression and nidogens proteolysis appear to be essential steps for correct angiogenesis.

In the search of new substrates of ADAMTS1 IGFBP2 is identified, this protein is a member of IGFBPs family. Our results demonstrate IGFBP2 cleavage happens relevantly in glioma, in addition. In our analysis of expression data IGFBP2 is corroborated as poor prognosis marker, in addition, it has a direct relation with ADAMTS1 expression. Several assays determined that ADAMTS1 has an inducing effect over IGFII action, possibly due to IGFBP2 proteolysis. It is important to highlight the evidences of vaculogenic mimicry events in glioma together with our observations of ADAMTS1 implication in these phenomena.

Our results evidence that ADAMTS1 behave differently depending on the bioavailability to determined substrates for the development of tumors. It seems determinant the study of protease-substrate interaction for the elucidation of ADAMTS1 function in cancer.

INTRODUCCIÓN

1 ANGIOGÉNESIS

En un organismo adulto en condiciones normales, cada tejido tiene suficiente aporte de nutrientes y oxígeno que serán suministrados a través de la sangre. La vasculatura es la estructura que permitirá el aporte sanguíneo a los tejidos. Para proporcionar un abastecimiento adecuado los vasos forman una red jerárquica organizada en arterias, capilares y venas, básica para que el flujo sanguíneo ocurra correctamente. Durante el desarrollo o en procesos de crecimiento tisular o inflamación, será necesario un incremento del número de vasos en los tejidos para dar cabida al aumento en los requerimientos de oxígeno y nutrientes. Las nuevas estructuras se formarán mediante dos procesos principales, la angiogénesis y la vasculogénesis (Potente et al., 2011).

Durante el desarrollo, la formación del plexo inicial de la vasculatura ocurre mediante el reclutamiento de células endoteliales precursoras (*Endothelial Progenitor Cells, EPCs*) de origen mesodérmico, también llamadas angioblastos. Este proceso de formación de la red primitiva recibe el nombre de vasculogénesis. Sin embargo, en el individuo adulto durante procesos de angiogénesis fisiológica y patológica también se ha observado un reclutamiento de EPCs, indicando que la vasculogénesis no es un proceso estrictamente restringido al desarrollo (Potente et al., 2011; Weis and Cheresh, 2011).

La angiogénesis es precisa para ampliar la complejidad de la red inicial formada por vasculogénesis que será muy básica e inmadura. Además, la angiogénesis será necesaria durante la madurez, ante procesos fisiológicos o patológicos que requieran mayor aporte energético. Este proceso consiste en el crecimiento y progreso de brotes a partir del plexo previo (Potente et al., 2011). Este fenómeno ocurre en condiciones fisiológicas y patológicas aunque las diferencias estructurales entre los vasos formados en ambas situaciones son muy marcadas.

Para la iniciación de la angiogénesis serán necesarias señales que desencadenen el proceso, se denominan estímulos proangiogénicos. Los vasos quiescentes recibirán un estímulo proangiogénico que activará las células de la vasculatura e impulsarán el crecimiento de nuevos vasos. En condiciones basales se generan vasos con patrón muy ordenado y estable que mantienen la adecuada oxigenación y difusión de nutrientes. Para que este proceso suceda con normalidad se requiere un estricto equilibrio entre las señales proangiogénicas y antiangiogénicas (Tabla 1). Las señales proangiogénicas se originan, por ejemplo, ante daño tisular o hipoxia. Estos estímulos activadores requieren señales antiangiogénicas que indiquen el final del proceso y apaguen las señales activadoras. El apagado de los estímulos angiogénicos permitirá la estabilización y la maduración adecuada de los nuevos vasos. Esta estabilización también vendrá inducida por la adhesión de pericitos (*Pericytes, PCs*) y localización adecuada de proteínas extracelulares que permitirán el apropiado funcionamiento de los nuevos vasos (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008).

A continuación se describen algunos de estos factores angiogénicos más importantes y sus efectos sobre la vasculatura de manera somera para ayudar en la comprensión del grueso del texto.

Los factores proangiogénicos más potentes son el VEGF-A (Factor de crecimiento endotelial vascular A, *Vascular Endothelial Growth Factor A*) y el FGF-2 (Factor de crecimiento de fibroblastos 2, *Fibroblast Growth Factor 2*) aunque existen multitud de factores que también colaborarán con la formación de la vasculatura en diferente medida. Por ejemplo, el HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos, *Hepatocyte Growth Factor*) y el TGFβ (Factor de crecimiento transformante β, *Transforming Growth Factor β*) son también dos factores de crecimiento capaces de activar a las células de la vasculatura y modular la angiogénesis. Por otro lado, el PDGFB (Factor de crecimiento derivado de plaquetas B, *Platellet Derived Growth Factor B*) atraerá PCs a los nuevos vasos en formación haciendo posible su maduración y estabilización. Además, las efrinas y las angiopoyetinas también van a intervenir en la formación correcta de angiogénesis (Tabla 1 A).

Entre los factores antiangiogénicos destacan la angiostatina, la endostatina y la trombospondina-1 (TSP1) que tienen un potente efecto inhibitor de angiogénesis. Además los TIMPs (Inhibidores tisulares de metaloproteasas, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) son inhibidores de proteasas que impedirán la migración endotelial y la remodelación extracelular teniendo un efecto negativo sobre la angiogénesis (Tabla 1 B).

A.- Factores Proangiogénicos	
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos-2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
PDGFB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas B
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
SDF-1	Factor de crecimiento derivado del estroma
S1P	Esfingosina 1 fosfato
IL-8	Interleucina 8
Efrinas	
Angiopoyetinas	
B.- Factores Antiangiogénicos	
Angiostatina	
Endostatina	
TSP1	Trombospondina-1
Tumstatin	Fragmento proteolítico del colágeno IV
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
Chondromodulin	
PEDF	Factor derivado de epitelio pigmentado
IP-10	Proteína inducida por interferón gamma 10
PF4	Factor plaquetario 4
BAI-1	Inhibidor de angiogénesis específico de cerebro

Tabla 1 Listado de diferentes factores proangiogénicos (A) y antiangiogénicos (B).

Los vasos fisiológicos, para realizar su función de conductores de sangre, tiene que cumplir unos requisitos estructurales que impidan el escape del flujo sanguíneo. Esta estructura permitirá que la sangre llegue con la presión adecuada a los tejidos para permitir el difusión de oxígeno y nutrientes. La estructura de la vasculatura es común a la mayor parte de los tejidos. La luz del vaso está delimitada por células endoteliales (*Endothelial Cells*, ECs) que están unidas estrechamente, originando una monocapa de células llamada endotelio. La membrana basal (*Basement Membrane*, BM) vascular es una red de proteínas especializada, que recubre el

endotelio aportando estabilidad a los vasos. Existen otros tipos celulares que van a otorgar firmeza a los vasos que son las células de soporte. Las células de soporte o de pared variarán en su nomenclatura y propiedades dependiendo de la complejidad vascular de la que formen parte. Así, los capilares están recubiertos por PCs y en los vasos de mayor calibre como venulas o arteriolas encontramos las vSMC (Células de músculo liso, *vascular Smooth Muscle Cells*). Además los fibroblastos aparecerán rodeando las arterias o venas que colaborarán en la formación de una pared más resistente y flexible (Figura 1 A) (Jain, 2003). En el apartado 1.1 de la introducción se describirá con más detalle cada uno de los componentes de la vasculatura y su función durante la angiogénesis.

Como se ha citado anteriormente, la angiogénesis también ocurre en procesos patológicos. En una patología como el cáncer, la angiogénesis ocurrirá de manera desregulada. La angiogénesis en el tumor se origina a partir de la vasculatura fisiológica colindante que invadirá la masa tumoral. La activación de la vasculatura fisiológica se produce a través de las células tumorales, que expresan elevadas cantidades de factores de crecimiento y citoquinas. Este aumento sostenido de factores proangiogénicos sobre los antiangiogénicos en el entorno tumoral producirá una desregulación del equilibrio fisiológico, generando vasos estructural y funcionalmente anormales. Algunas de estas aberraciones estructurales son el diámetro ensanchado del vaso, su morfología tortuosa y un recubrimiento irregular de proteínas extracelulares (desarrollado más extensamente en el punto 1.2 de esta introducción) (Weis and Cheresh, 2011).

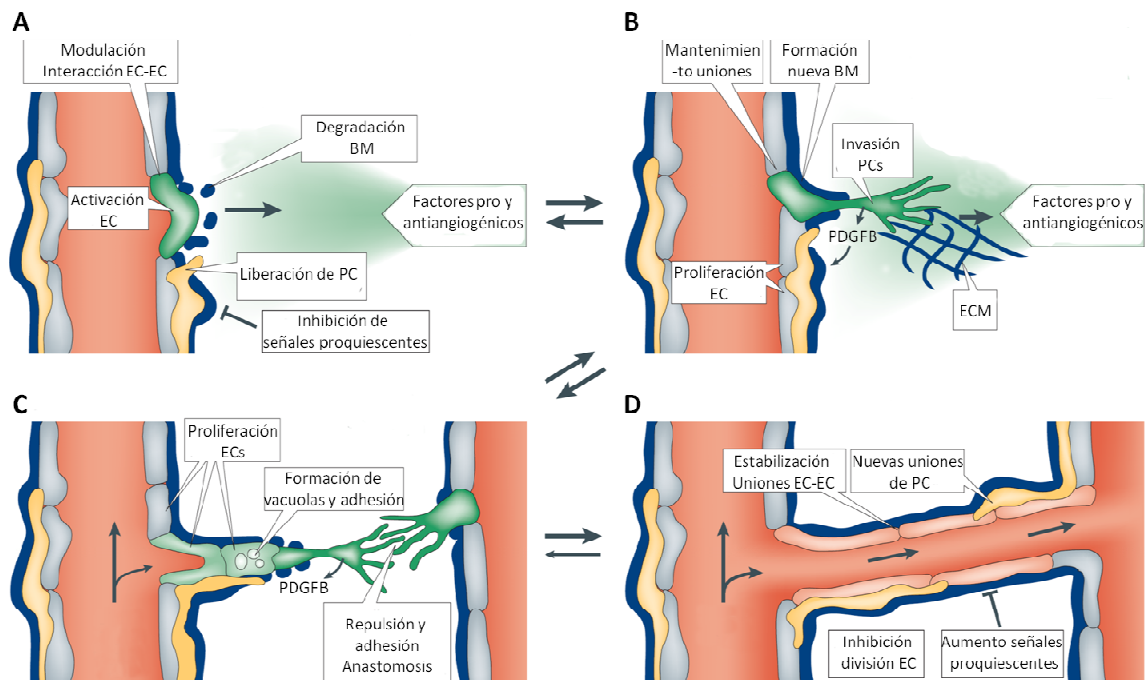


Figura 1 Representación gráfica del proceso de angiogénesis desde su activación inicial hasta permitir el flujo sanguíneo a través del nuevo vaso. (A) Activación inicial por señales proangiogénicas, que provocan una remodelación de la BM y la liberación de PCs y ECs del lugar original. (B) Especialización de las ECs que dirigen el crecimiento de la nueva estructura (células de la punta), formación de una nueva BM y proliferación de las ECs del tallo. (C) Formación de la luz del nuevo vaso entre las células del tallo, e interacción con otras estructuras por anastomosis. (D) Reorganización de la nueva BM y de los PCs, inhibición de las señales proangiogénicas y retorno a un estado quiescente para permitir el flujo sanguíneo a través de la nueva estructura. Modificado de (Adams and Alitalo, 2007).

En condiciones normales en estado adulto el endotelio es quiescente, pero es muy versátil en respuesta a estímulos proangiogénicos que desencadenarán la movilización y división de ECs. La remodelación de la ECM (Matriz extracelular, *Extracellular Matrix*) mediante la acción de determinadas proteasas extracelulares es necesaria para que las ECs y PCs se desprendan de la BM (Figura 1 A). No todas las ECs van a responder de la misma manera a la inducción de angiogénesis, ocurre una selección de células directoras del crecimiento del brote, células de la punta, y células adyacentes colaboradoras para la elongación del tubo, la proliferación celular y en la formación de la luz del vaso, estas últimas denominadas células del tallo (Figura 1 B-C). Para que estos nuevos brotes de la vasculatura sean funcionales han de formar correctamente la nueva BM y tienen que adherirse los PCs que permitirán su estabilización (Figura 1 D) (Adams and Alitalo, 2007; Herbert and Stainier, 2011; Jain, 2003).

1.1 COMPONENTES DE LA VASCULATURA

En este nuevo apartado se describirán en profundidad las características de los componentes ya señalados en el apartado anterior (ECs, PCs, y BM), detallando la función que cumple cada uno de ellos durante la angiogénesis.

1.1.1 Células endoteliales

Las ECs poseen apariencia adoquinada e interaccionan entre sí a través de uniones célula-célula, permitiendo una asociación muy estrecha que impide el escape de fluido sanguíneo al exterior. El VEGF-A es el activador más importante de las ECs, en general, es el estroma el principal productor de este factor de crecimiento aunque las mismas ECs pueden generarlo bajo condiciones de hipoxia. El VEGF-A será expresado ante un requerimiento de oxígeno, iniciando así el proceso de angiogénesis. Por tanto el VEGF-A es el desencadenante principal de los procesos asociados a la angiogénesis (Herbert and Stainier, 2011).

A continuación se describen los pasos detallados que las ECs han de llevar a cabo para la formación de nuevas estructuras vasculares. El VEGF-A (y otros factores proangiogénicos) actúa sobre las ECs (Figura 1 A), provocando su activación y especialización, destacando aquellas ECs que forman filopodios y marcan la orientación del crecimiento vascular (Figura 1 B). Además estas células activarán la expresión de determinadas proteasas que les permitan invadir el tejido mediante la degradación de la BM y ECM (Figura 1 A-B). Detrás de estas células directoras una hilera de ECs con capacidad de división continuará en unión directa a las células de la punta y alargarán el brote hasta fusionarlo con otro brote mediante anastomosis (Figura 1 C). Las células del tallo poseen menor número de filopodios, tienen capacidad de proliferación (Figura 1 C), generan ramificaciones en la vasculatura y producirán componentes de la BM que irán consolidando los brotes (Figura 1 B). Esta diferenciación de células de la punta o células del tallo se ha estudiado en detalle los últimos años situando a la vía de Notch como el principal responsable. Notch se expresa en las células del tallo mientras que está ausente en las células de la punta las cuales expresan el ligando DLL4 (Ligando parecido a delta-4, *Delta-like ligand 4*). Todas las ECs en presencia de VEGF expresan DLL4 pero aquellas que lo hagan más rápidamente serán seleccionadas como células de la punta, selección que se da de forma transitoria y reversible (Potente et al., 2011).

Una vez se ha formado el brote será necesario que la estructura abra un lumen para permitir el flujo sanguíneo. Las células del tallo serán las encargadas de crear la luz del vaso para su

consecuente funcionalidad. Existen varios mecanismos para realizar éste proceso, el primero es la internalización de vacuolas por pinocitosis y agrupación de las mismas para posteriormente fusionarlas con vacuolas de las ECs vecinas (Figura 1 C). Por otro lado, la adopción de una estructura peculiar mediante la reorganización de uniones célula-célula también puede dar origen a un nuevo lumen. Se cree que la elección del mecanismo usado por los brotes para formar el lumen depende del nicho vascular o del tipo de vaso que esté en formación (Potente et al., 2011).

La actuación de señales de supervivencia para las ECs y la vasculatura son vitales para impedir la regresión de los vasos en desarrollo (Figura 1 D). La expresión y señalización intracrina del VEGF promueve la supervivencia de las ECs. También se ha determinado que FGF-2 es clave para el mantenimiento de la integridad vascular debido a su habilidad para mantener uniones adherentes. Del mismo modo, ANG1 (Angiopoyetina-1, *angiopoietin-1*) y TIE2 (Tirosina quinasa con dominios parecidos a inmunoglobulinas y EGF 2, *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2*), ligando y receptor respectivamente, controlan la supervivencia y quiescencia de la vasculatura. Por último es necesario mencionar que el flujo sanguíneo se considera otro estímulo positivo, ya que el estrés que produce inhibe la apoptosis de ECs. Estas señales harán posible que los vasos recién formados se mantengan (Figura 1 D) (Potente et al., 2011).

Como ya se ha citado previamente la vasculatura necesita la presencia de PCs colaborando con las ECs. Estos PCs además participan en la formación y ensamblaje de los componentes de la BM necesarios para la maduración de la vasculatura. A continuación se describen las peculiaridades de los PCs y se detalla su función durante la angiogénesis.

1.1.2 Reclutamiento de pericitos y estabilización de nuevos vasos

Rodeando el endotelio existen un conjunto de células que ayudan a la formación y estabilidad de nuevos vasos; estos son los PCs y las vSMC. Los PCs son las células de soporte que recubren capilares, tienen un cuerpo redondeado y expanden a lo largo del capilar su citoplasma, que a su vez formará extensiones perpendiculares a la primaria uniéndose muy fuertemente a las ECs a las que recubren (Figura 2 A). Las vSMC son células de soporte de arteriolas o vénulas que adoptarán diferente morfología en cada uno de ellos (Armulik et al., 2011). En las arteriolas las vSMC adquieren una posición perpendicular al vaso formando estructuras circulares alrededor, hasta revestirlo por completo. En las vénulas las vSMC adoptan una estructura estrellada y van a cubrir el vaso de manera alterna. En general el cuerpo de las vSMC va a ser más aplanado que el de los PCs (Figura 2 A). Actualmente se sigue estudiando si los PCs se generan por división de los PCs preexistentes en el tejido, si se diferencian a partir de vSMC de vasos grandes colindantes, o si ambos tipos celulares se diferencian a partir de células mesenquimales (*Mesenchymal Stem cells*, MSCs) reclutadas al lugar dónde ocurre la angiogénesis (Armulik et al., 2011; Nussenbaum and Herman, 2010).

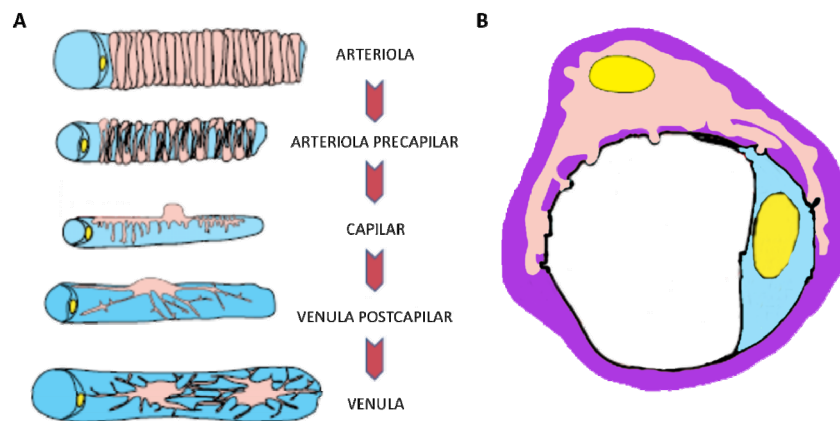


Figura 2 Modos de recubrimiento de PCs y vSMC en los distintos tipos de vasculatura. (A) Las células de la pared (rosa) recubren las ECs (azul) adquiriendo distintas morfologías dependiendo de la función del vaso al que recubren. (B) Detalle de un hipotético corte transversal de un vaso en el que se distinguen ECs, PCs y BM (lila). Modificado de (Armulik et al., 2011).

Los PCs en la vasculatura no están en contacto directo con las ECs ya que entre ambos tipos celulares se encuentra la BM (tratada más adelante), que además de recubrir el endotelio también reviste la superficie de los PCs. No obstante, existen puntos en los que los PCs entran en contacto directo con el endotelio, esto ocurre en las escasas interrupciones que existen en la BM a lo largo de los capilares (Figura 2 B).

Son varias las funciones que les han sido atribuidas a los PCs, sin embargo, como se describirá a continuación, muchas de ellas están aún por confirmar. Los PCs contribuyen en la formación de la BM, varios ensayos *in vitro* demuestran que la interacción entre PCs y ECs es necesaria para el ensamblaje de la BM. En el ensayo de tubulogénesis con ECs la formación de la BM es muy limitada en comparación con el ensayo realizado con ECs combinación con PCs (Stratman et al., 2009; Stratman et al., 2010). Además los PCs colaboran en el mantenimiento la estructura de los vasos ayudando a la maduración de BM y estabilización de los mismos (Armulik et al., 2011). Está por determinar si los PCs contribuyen en la contracción de los capilares que es un evento necesario para permitir el flujo sanguíneo. Existen varios estudios en los que parece evidente la implicación de los PCs en la contracción de los capilares (Fernandez-Klett et al., 2010; Peppiatt et al., 2006). Varias cuestiones han surgido tras la publicación de estos ensayos, ya que no aclaran el tipo de vaso en el que observan los resultados (capilares, vénulas o arteriolas), siendo necesaria la aportación de nuevas evidencias al respecto.

El mecanismo por el que los PCs son reclutados al lugar de la angiogénesis está mediado por las ECs. Las ECs activadas expresan el ligando PDGFB, lo cual provoca la atracción de PCs que expresan el receptor PDGFR β (Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β , *Platletet Derived Growth Factor Receptor β*) (Figura 1 B-C) (Armulik et al., 2011). Al mismo tiempo, existen otros factores que van a regular la atracción de PCs y la estabilización de vasos. Por ejemplo, el TGF β es una citoquina que actúa sobre los PCs promoviendo su migración, diferenciación, proliferación y estimulándolos para la producción de componentes de la ECM. Además Ang-1 a través de su receptor TIE2 expresado por las ECs media la estabilización de los vasos, promueve la adhesión de PCs e incrementa las uniones entre ECs evitando el escape del

fluido (Potente et al., 2011). Todas estas interacciones durante la formación de la nueva vasculatura, regularán la adecuada formación de los vasos fisiológicos.

Para que la maduración de la vasculatura se complete correctamente, no es suficiente con que los PCs lleguen al lugar de la angiogénesis sino que además las señales proangiogénicas iniciales han de desactivarse. La desactivación de las señales proangiogénicas permitirá que el endotelio vuelva al estado de reposo, puedan adherirse los PCs y ambas puedan formar correctamente la BM (Figura 1 D). En tumores la vasculatura se forma de manera continua y las señales proangiogénicas no se apagan, impidiendo la adhesión de PCs, lo que genera vasos anormales. El menor recubrimiento de PCs en la vasculatura tumoral también provocará que las uniones entre ECs sean más laxas, facilitando la permeabilidad de células tumorales al torrente sanguíneo y por tanto la formación de metástasis (Weis and Cheresh, 2011).

Las moléculas usadas para identificar estas células son: SMA (Actina de músculo liso, *Smooth Muscle Actin*), NG2 (Proteoglicano de sulfato de condroitina 4, *chondroitin sulphate proteoglycan 4*) y PDGFR β . Ninguno de estos marcadores de PCs es suficiente para distinguir entre PCs y vSMC, por lo que el término PCs se usa comúnmente en la literatura para denominar a ambas poblaciones (Armulik et al., 2011).

Ya se ha comentado con anterioridad que tanto los PCs como las ECs serán los responsables de la formación de una red de proteínas especializada que recubre los vasos, designada BM vascular. A continuación se describirá la importancia de la BM vascular durante el proceso de angiogénesis.

1.1.3 Membrana basal vascular

La BM es una compleja red de proteínas extracelulares que recubre el endotelio y también aparece rodeando cada capa de epitelio, tejido adiposo y células nerviosas. La BM vascular tiene una función estructural ya que ayuda en la adhesión de PCs y ECs de manera adecuada, estrecha las uniones entre EC-EC y estabiliza los vasos en formación (LeBleu et al., 2007).

Los componentes comunes a todas las BM son colágeno IV, laminina, nidógeno y perlecano. Existen numerosas BM atendiendo a su composición, ya que además de los componentes mencionados están compuestas por otros minoritarios que darán funciones específicas. Dada la gran variedad de tejidos en los que las BM juegan un papel importante, se entiende la complejidad de estructuras que son capaces de formar. En el próximo apartado 2.2.1 se desarrollará más extensamente las características de los componentes de la BM y su ensamblaje.

En adición a su función estructural, la BM supone un reservorio de factores de crecimiento y citoquinas hasta la recepción de estímulos que potencien su biodisponibilidad por remodelación de la BM. Esta BM tendrá que ser formada de nuevo, las ECs como los PCs son capaces de sintetizar las proteínas que componen la BM. Se ha descrito que el contacto directo entre ECs y PCs parece ser determinante para el correcto ensamblaje de la BM (Figura 1 y Figura 2 B) (Stratman et al., 2009). Se ampliará la información sobre la función de la BM en el punto 2.2.2 de la introducción.

La BM vascular ha de ser remodelada para permitir el desarrollo de nueva vasculatura. Para su transformación es necesario que tanto las ECs como las células del estroma modifiquen la

expresión de determinadas proteasas. Éstas digerirán las proteínas extracelulares, dejando espacio para la formación de nuevos vasos. Mientras que las células en reposo expresan cantidades muy limitadas de dichas proteasas, en respuesta a estímulos proangiogénicos su expresión se incrementa ampliamente. Por ejemplo, se ha descrito que el VEGF-A y el FGF-2 estimulan la transcripción, expresión y actividad de determinadas proteasas en ECs que van a orquestar el proceso de reestructuración de la BM y ECM para permitir la angiogénesis (LeBleu et al., 2007).

Algunos de los procesos proteolíticos sufridos por los componentes de la BM vascular harán que se expongan epítomos de estas proteínas que normalmente están ocultos. En numerosas ocasiones los fragmentos generados quedan expuestos para interacción con integrinas, con efectos potenciadores o inhibidores de la angiogénesis. El efecto de los fragmentos proteolíticos se realizará mediante la activación o inhibición de la proliferación y migración de ECs. De la misma manera la liberación de factores de crecimiento retenidos en la BM participará en la regulación de la angiogénesis. Un balance controlado entre estas señales pro y antiangiogénicas será necesario para la formación adecuada de la vasculatura (Kalluri, 2003).

Las funciones descritas hasta ahora para los componentes de la vasculatura corresponden a situaciones fisiológicas. No obstante, la angiogénesis sucederá también en condiciones patológicas. Concretamente en cáncer las modificaciones en la morfología de los nuevos vasos formados son enormes y han sido descritas ampliamente. En el apartado siguiente se presentan más detalladamente las características de la vasculatura tumoral por tratarse de uno de los puntos tratados en este trabajo.

1.2 ANGIOGÉNESIS EN CÁNCER

En 1971 el laboratorio de Judah Folkman y colaboradores comienza a sugerir la importancia que la angiogénesis tiene para el crecimiento tumoral (Folkman, 1971). Hasta entonces, la angiogénesis en los procesos tumorales había pasado prácticamente inadvertida. Estos investigadores presentan evidencias de que la angiogénesis ocurre ante procesos concretos como son el desarrollo tumoral, la curación de una herida o en procesos inflamatorios. Estos resultados plantean que el bloqueo de la vasculatura tumoral impedirá el crecimiento de la masa tumoral. La estrategia antiangiogénica para combatir el tumor se plantea entonces como un potencial tratamiento crónico. Desde la aparición del tumor se podría tratar al paciente con fármacos antiangiogénicos, convirtiendo el cáncer en una enfermedad crónica que permita la supervivencia con la masa tumoral en estado quiescente. Es entonces cuando la comunidad científica comienza a indagar dianas para conseguir inhibir la angiogénesis de manera eficaz. No será hasta 1989 con el descubrimiento del VEGF (Leung et al., 1989) cuando comiencen a sintetizarse fármacos antiangiogénicos contra ésta diana consiguiendo los primeros resultados esperanzadores de la terapia antiangiogénica en el tratamiento del cáncer.

Como ya se ha mencionado, los vasos desarrollados en el interior del tumor tendrán una estructura marcadamente diferente a la normal, ya que el balance entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos está totalmente desregulado (Figura 3 A-D). Las células tumorales expresan multitud de citoquinas y factores de crecimiento que activarán los vasos quiescentes del organismo que invadirán la masa tumoral. Formada la nueva vasculatura en el tumor el endotelio estará constitutivamente activo dado que las señales proangiogénicas no se

apagan (Figura 3 D). Para hacer posible que la vasculatura madure y se vuelva quiescente es necesario que las señales proangiogénicas cesen, por lo que en el tumor los vasos serán inmaduros y defectuosos (Figura 3 C). Esto será en parte debido a la ausencia de PCs recubriendo la vasculatura (Figura 3 C).

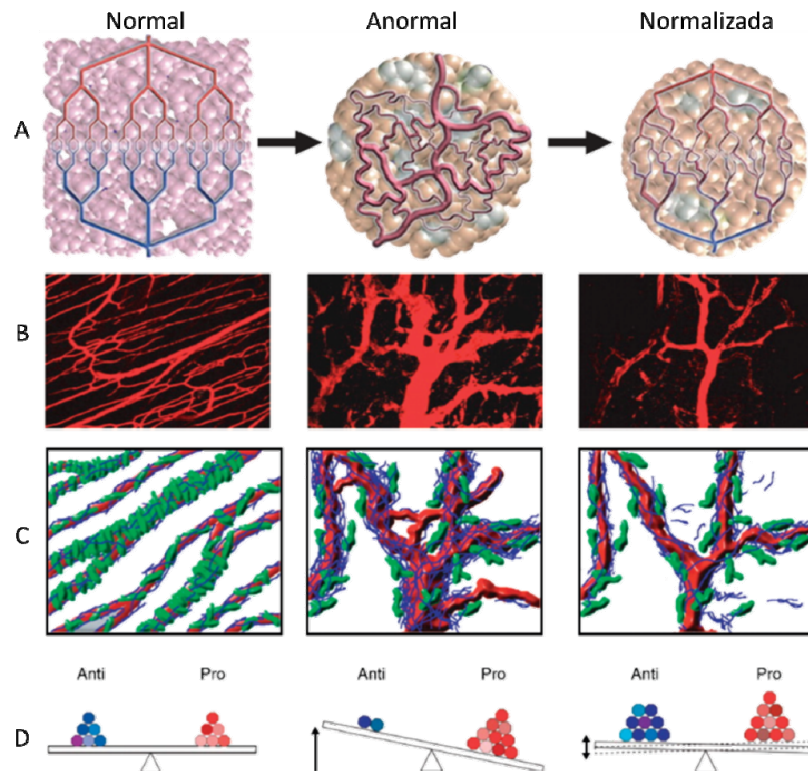


Figura 3 Diferencias en la morfología de la vasculatura normal, tumoral y normalizada. La vasculatura normal muestra un patrón de vasos ordenado y jerárquico (A-B) con un recubrimiento abundante de PCs (verde) y BM (azul) (C) esto es debido a un balance apropiado de factores pro y antiangiogénicos (D). La vasculatura tumoral muestra un patrón de vasos desordenado, con morfología tortuosa y ensanchamiento de la luz del vaso (A-B). Además tiene un pobre y laxo recubrimiento de PCs y BM (C) generado por el aumento de factores proangiogénicos (D). Mediante el bloqueo de factores angiogénicos se produce una normalización de la vasculatura tumoral por estrechamiento de la luz del vaso (A-B) se recupera la adhesión de PCs y BM (C) y se restablece el equilibrio entre factores angiogénicos (D). Modificado de (Goel et al., 2011).

El crecimiento de la vasculatura tumoral debería resultar en un incremento en la oxigenación y alimentación del tumor, pero la nueva vasculatura está compuesta por vasos tortuosos, con débiles interacciones entre ECs y con recubrimiento variable en grosor de la BM por lo que el suministro de oxígeno y alimentos no es del todo efectivo (Figura 3 C). Además, el escape de flujo de los vasos y el crecimiento tumoral desmesurado hacen que la presión aumente en el estroma, impidiendo la correcta difusión. En adición al impedimento en la difusión de nutrientes y oxígeno, la quimioterapia tampoco será todo lo efectiva que debería. De manera paralela acidificación y desoxigenación del estroma harán de selectores positivos de las células tumorales más agresivas y resistentes, ya que serán capaces de sobrevivir al microambiente hostil del tumor con mayor facilidad. En adición, la morfología anormal de los vasos favorece que las células tumorales se extravasen y colonicen otros órganos pudiendo dar origen a metástasis. Por tanto, la angiogénesis tumoral va a ser determinante para la malignidad tumoral (Potente et al., 2011).

Además de células tumorales co-existen otros tipos celulares en el tumor que ayudarán al desarrollo del mismo al segregar estímulos angiogénicos o participando en el reclutamiento de precursores endoteliales desde la médula ósea. Por ejemplo, se ha demostrado que las EPCs colaboran en la formación de la vasculatura tumoral mediante segregación de citoquinas y factores de crecimiento. Otro tipo celular son fibroblastos asociados al cáncer (*Cancer-Associated Fibroblasts*, CAF), responsables de la síntesis aberrante de proteínas de la ECM y factores de crecimiento proangiogénicos. Por su parte las células inflamatorias perciben el tumor como una herida y se desplazan al lugar, pudiendo diferenciarse a macrófagos asociados al tumor (*Tumor Associated Macrophages*, TAM). Estas células se asocian con la vasculatura tumoral y liberan sus citoquinas y factores proangiogénicos. Otras células que colaboran con el crecimiento del tumor son los PCs y células vSMC, atraídas mediante liberación de PDGFB (Weis and Cheresh, 2011).

1.2.1 Tratamiento antiangiogénico del cáncer y resistencia

Para el tratamiento antiangiogénico del cáncer se han generado fármacos inhibidores del VEGF-A o sus receptores para bloquear el crecimiento tumoral. El primer fármaco efectivo en ensayos preclínicos fue un anticuerpo dirigido contra el VEGF-A, Bevacizumab. Los ensayos preclínicos auguraban unos resultados espectaculares pero en la clínica vieron su eficacia dramáticamente reducida (Goel et al., 2011; Jain, 2002). Además, se han desarrollado varios anticuerpos que bloquean los receptores del VEGF que ofrecen ventajas con respecto al bloqueo del ligando. Al bloquear los receptores del VEGF se inhibe el crecimiento vascular, la ramificación de los vasos y el reclutamiento de células de la médula ósea (Potente et al., 2011).

Estudios clínicos con estos inhibidores de la ruta del VEGF ofrecen resultados positivos aunque limitados ya que prolongan la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes en un rango de semanas a meses. Sin embargo, han surgido varios problemas para estos tratamientos porque no todos los pacientes responden a la terapia y los que responden adquieren resistencia, haciendo más complejo el tratamiento con estos anticuerpos. Se ha determinado que el tumor puede seguir generando vasos mediante la expresión de otros factores de crecimiento independientes del VEGF, sugiriendo la necesidad del bloqueo de nuevas vías de señalización.

Se ha observado que el Bevacizumab incrementa la eficacia de la quimioterapia. Actualmente, el tratamiento con Bevacizumab está aprobado en combinación con quimioterapia en varios tipos de cáncer en estado avanzado. Varios fármacos contra los receptores de VEGF: Sorafenib, Pazopanib, Vandetanib y Sunitinib han sido aprobados en clínica para el tratamiento de tipos muy concretos de cáncer. Actualmente el efecto del bloqueo de los receptores del VEGF en ensayos preclínicos ha hecho emerger resultados contradictorios. Por un lado, se observa que la terapia genera tumores más agresivos e invasivos, ya que la hipoxia se agrava en el tejido tumoral y crea un entorno proinflamatorio (Ebos and Kerbel, 2011). Otros en cambio mediante un bloqueo sostenido de los receptores del VEGF consiguen normalizar la vasculatura, ofreciendo una ventaja para combatir la metástasis y para el tratamiento combinado con quimioterapia (Norden et al., 2009). Esta normalización consiste en un incremento del reclutamiento de PCs y un estrechamiento de la luz del vaso, aunque este efecto ocurre de manera transitoria (Figura 3) (Goel et al., 2011).

Los tratamientos actuales no suponen grandes aumentos en la supervivencia de los pacientes, y esto hace que se continúen desarrollando nuevas terapias en base a dos teorías. Una consiste en la combinación de terapias contra el VEGF y PDGFB que actúa también sobre los PCs, potenciando la destrucción del vaso. Sin embargo, éste tratamiento combinado incrementa la permeabilidad vascular y puede potenciar la metástasis. Por otro lado, la normalización de la vasculatura antes de aplicar quimioterapia está siendo otro de los puntos de interés, ya que incrementa la efectividad de la quimioterapia porque los vasos perfunden mejor el fármaco (Carmeliet et al., 1996).

Actualmente se desconocen las vías de señalización paralelas al VEGF que permitan desarrollar fármacos con acción combinada o nuevos antiangiogénicos con independencia de la ruta del VEGF. Además el tratamiento sostenido con una terapia antiangiogénica para conseguir la normalización de la vasculatura aún tiene que ser estudiado en detalle. Todavía está por determinar su efecto antimetastásico y potenciador del efecto de la quimioterapia (Potente et al., 2011).

1.3 MECANISMOS ALTERNATIVOS DE VASCULARIZACIÓN

En los últimos años se están descubriendo mecanismos alternativos de vascularización en el tumor. La formación de la vasculatura no va a ser sólo originada a partir de los mecanismos fisiológicos que ocurren en estado adulto o durante el desarrollo como la angiogénesis o mediante reclutamiento de EPCs (Hillen and Griffioen, 2007).

Una de las estrategias tumorales es la de aprovechar la vasculatura existente en el tejido sobre el cual se desarrolla el tumor. Actualmente se conoce que todos los tumores se originan como una masa avascular. En tejidos altamente vascularizados los tumores en desarrollo pueden utilizar los vasos existentes en el tejido para crecer alrededor sin generar una respuesta angiogénica inicial. Este proceso alternativo de vascularización recibe el nombre en inglés de *vessel co-option* es decir, es un fenómeno de “asimilación” de la vasculatura normal del tejido para el desarrollo tumoral. En estados posteriores este apoyo vascular no será suficiente y tendrán que activarse mecanismos angiogénicos adicionales para posibilitar el crecimiento tumoral (Hillen and Griffioen, 2007).

Otro mecanismo que puede ser de gran importancia en el tumor es la multiplicación de estructuras vasculares. Recibe el nombre de angiogénesis introsusceptiva, y consiste en la división de un vaso en dos de menor tamaño que el inicial. Este fenómeno ocurre muy rápidamente ya que no requiere división de las ECs y sucede de manera fisiológica durante el desarrollo. En tumores es muy importante dada la elevada velocidad de proliferación de estas estructuras que potenciarán el crecimiento del tumor (Hillen and Griffioen, 2007).

Uno de los procesos alternativos que está siendo estudiado en profundidad en los últimos años es el mimetismo vascular. Fue descrito inicialmente por el laboratorio de MJ Hendrix (Maniotis et al., 1999). Las propias células tumorales son capaces de mimetizar a las ECs generando una vasculatura paralela al endotelio con capacidad de perfusión. Más recientemente, varias publicaciones indican que las células madre tumorales (*Cancer Stem Cells*, CSCs) son las que poseen la facultad de generar el mimetismo vascular. Se ha observado en varios tipos tumorales (ovario, riñón, mama, leucemia y recientemente en glioblastoma) cómo las CSCs son capaces de

diferenciarse a células vasculares. En trabajos recientes las CSCs de glioblastoma (GBM), en condiciones específicas, se comportan como un cultivo endotelial o vSMC. Sin embargo estas CSCs aisladas de GBM al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes son capaces de generar tumores con un incremento en la formación de estructuras pseudo-vasculares (El Hallani et al., 2010; Ricci-Vitiani et al., 2010). Según las primeras publicaciones que referían este fenómeno, las estructuras generadas son fácilmente reconocibles mediante la tinción con ácido periódico-Schiff (*Periodic Acid-Schiff*, PAS) que tiñe los componentes de la ECM. Estos pseudo-vasos sobreexpresan componentes de la ECM como laminina y colágeno IV que generarán estas estructuras muy positivas para la tinción PAS. La tinción con PAS es sólo orientativa de la existencia de las estructuras, por lo que es necesaria una determinación molecular más detallada de los factores expresados por las células tumorales que les permite la trans-diferenciación a endotelio. EphA2 (Receptor de la ephrina A2, *Ephrine A2 receptor*), VE-cadherina (cadherina endotelial vascular, *Vascular Endothelial Cadherin*) y endogлина son algunos de los marcadores más importantes para la determinación de células tumorales que llevan a cabo este mimetismo vascular, al menos hasta la fecha (Hendrix et al., 2003; Weis and Cheresch, 2011).

Aún queda mucho por conocer sobre los mecanismos que desencadenan el fenómeno del mimetismo vascular. Está ganando importancia su estudio ya que podrían ser de gran ayuda por su potencial uso en terapia antiangiogénica, ya que estas estructuras influirían en la resistencia de los pacientes a los tratamientos antiangiogénicos. Sigue en aumento el número de tipos tumorales en los que se ha descrito este fenómeno, incrementando su relevancia e incluso sugiriendo un posible efecto generalizado en el desarrollo tumoral. Además, es esperable que el tratamiento combinado contra angiogénesis y mecanismos alternativos de vascularización bloquee las probables compensaciones entre ambos fenómenos, haciendo realidad el mantenimiento de la masa tumoral en estado quiescente. Puede que el conocimiento más profundo sobre las moléculas implicadas ayude en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

1.4 MODELOS DE ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS

Como se ha descrito anteriormente el proceso de angiogénesis es muy complejo y comprende numerosos eventos, por lo que en ocasiones no es suficiente con el análisis a tiempos finales de las muestras a estudiar. Por lo tanto, se hace necesaria la observación de la progresión de las estructuras en desarrollo. El estudio de la angiogénesis *in vivo* tiene numerosas limitaciones. La primera es la dificultad para observar el desarrollo de la vasculatura del animal *in vivo*. La segunda es la imposibilidad de atribuir funciones concretas a células específicas en un contexto tan diverso. Por tanto, generalmente se utilizan modelos *in vitro* o *ex vivo* que facilitan la visualización y simplificación del entorno.

Existen tres modelos animales en los que la vasculatura en formación queda expuesta al exterior permitiendo el estudio detallado de su desarrollo. Estas excepciones son el modelo del pez cebra, el CAM (membrana corialantoide, *chick chorioallantoic membrane*) y el de córnea. Estos ensayos tienen la limitación de que los modelos animales usados en el pez cebra y en el CAM se realizan con animales muy alejados evolutivamente de los mamíferos por lo que los resultados no siempre serán fieles a las observaciones para mamíferos. Mientras que el ensayo de córnea se realiza sobre las retinas de ratón o rata, esta supone una técnica invasiva para el animal.

Además, nuevos avances en el campo de la microscopía han desarrollado tecnologías que permiten profundizar en el tejido del animal y observar los procesos de desarrollo vascular en sistemas *in vivo*. Por ejemplo, la microscopía multifotón requiere de la colocación, en la superficie del tejido a observar, un vidrio a modo de ventana y permite la observación del tejido a gran profundidad (Masters et al., 1999).

Varios ensayos han sido propuestos con intención de estudiar a fondo la vasculatura fuera de un sistema *in vivo*. En los sucesivos apartados se desarrollarán más detalladamente las técnicas usadas para la obtención de los resultados expuestos en este trabajo. Entre estos se encuentra el ensayo de retina, menos flexible ya que sólo permite analizar la vasculatura de la retina tras el sacrificio del animal. También, el ensayo *ex vivo* del anillo de aorta es un método tradicional que no ha caído en desuso por su versatilidad y robustez. Por último, los cultivos celulares en matrices bidimensionales y tridimensionales en el que una matriz sirve de soporte para la formación de estructuras vasculares.

1.4.1 Ensayo de retina

La retina es una capa interna del ojo sensible a la luz debido a los conos y bastones, que son las células mayoritarias que componen este tejido. Las neuronas de la retina son las encargadas de transmitir los impulsos recibidos por los conos y bastones a través del nervio óptico (Figura 4 A). La retina está altamente vascularizada, la formación del plexo vascular en la retina se produce de manera radial, desde el lugar dónde brota el nervio óptico hacia la periferia hasta alcanzar los extremos de la retina. Una vez formada la vasculatura principal se producirá una invasión vertical del tejido. Al ser un proceso jerárquicamente ordenado es un modelo excepcional para estudiar la angiogénesis fisiológica y las patologías oculares. Además permite observar el efecto que poseen determinados genes en la angiogénesis, estudiando la retina de ratones modificados genéticamente (Fruttiger, 2007).

En humanos, la vascularización de la retina ocurre en el útero a partir de la semana 16, sin embargo, en ratones comienza a desarrollarse postnatalmente (PN) (dependiendo de la cepa de ratón el desarrollo de la retina está ligeramente retrasado). En ratones, el plexo superficial de la retina comienza a formarse el día 1 PN y alcanzará la periferia de la retina en el día 7 PN. A partir del día 7 PN la vasculatura de la retina comienza a invadir verticalmente el tejido para llegar a formar el plexo profundo, además se remodelan las estructuras ya formadas. Este plexo se forma a gran velocidad y alcanza su madurez en el día 12 PN, a continuación comienza la formación del plexo intermedio que terminará de formarse el día 15 PN. Al final de la tercera semana PN las tres capas vasculares están completamente formadas con multitud de conexiones entre los 3 plexos (Figura 4 B) (Stahl et al., 2010).

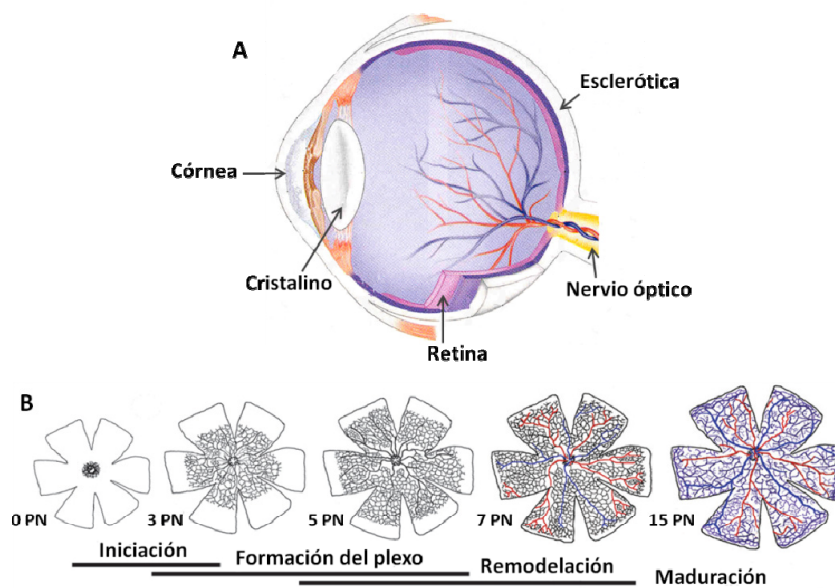


Figura 4 (A) Esquema del corte transversal de un ojo y las diferentes capas que lo componen. (B) Esquema del crecimiento radial de la vasculatura en la retina a partir del día 0 PN hasta el 15 PN. Se detallan los procesos que tienen que ocurrir en cada estado hasta la maduración. En rojo están representadas las arterias y en azul las venas. Modificada de (Hofmann and Iruela-Arispe, 2007).

La técnica consiste en extraer los ojos de los animales a estudiar y se realiza la disección del mismo eliminando la córnea, el cristalino y la esclerótica hasta conseguir quedarnos únicamente con la retina (Figura 4 A). Estas retinas pueden someterse a tinción para los marcadores de interés o puede realizarse una extracción de RNA o proteína (Pitulescu et al., 2010).

1.4.2 Ensayo del anillo de aorta (Aortic Ring Assay, ARA)

La aorta es la principal arteria del cuerpo, recorre el tórax desde el corazón sobre la columna vertebral hasta el abdomen donde se bifurca. Su longitud hace que sea muy interesante para el ensayo de angiogénesis ya que de la aorta de un ratón se pueden extraer entre 30-40 anillos. También el hecho de ser un tejido que mantiene la estructura vascular intacta con respecto a el modelo *in vivo* y estar formado por varios tipos celulares como los vSMC, fibroblastos, macrófagos y células dendríticas, va a representar fielmente la angiogénesis a partir de vasos preexistentes en el organismo (Aplin et al., 2008).

Es un método que conserva la parte beneficiosa de los trabajos *in vivo*, ya que es un tejido formado por ECs en el mismo estadio en el que están en el animal. Normalmente, para conseguir cultivos primarios puros las ECs tienen que ser sometidas a varias selecciones y pases en cultivo que pueden cambiar sus propiedades. También el hecho de tener presentes todos los tipos celulares que encontramos en el sistema *in vivo* hace que reproduzca muy fielmente la angiogénesis en el animal. Además posee los beneficios de un cultivo *in vitro* ya que las condiciones de cultivo son fácilmente modificables, adición de inhibidores de angiogénesis, factores de crecimiento, modificación de la matriz de colágeno enriquecida para otras proteínas extracelulares e infección con virus de las células del anillo. Por todos estos motivos es un ensayo muy usado en el campo de la angiogénesis y también por ser muy robusto y reproducible en sus resultados (Aplin et al., 2008).

La metodología consiste en la disección de la aorta completa de un ratón, se aísla del tejido adiposo y conectivo, se corta en anillos que posteriormente son embebidos en una matriz tridimensional de colágeno. Los anillos se cultivan con determinados factores de crecimiento que harán posible el desarrollo de brotes. Mediante cuantificación del número de brotes o la longitud de los mismos seremos capaces de determinar si las diferentes condiciones son capaces de modificar las propiedades angiogénicas de los anillos (Aplin et al., 2008; Baker et al., 2012).

1.4.3 Cultivos bidimensionales y tridimensionales

Los cultivos bidimensionales permiten elucidar si las células sembradas en la superficie de la matriz tienen características endoteliales, con la limitación de que las estructuras formadas no son tubos propiamente dichos.

En los últimos años está aumentando el uso de matrices semi-sólidas para el estudio del comportamiento celular. Estas estructuras mimetizan el entorno extracelular ya que están compuestas por componentes estromáticos mayoritarios como el colágeno I. El matrigel es una compleja matriz aislada del sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Está compuesto por elevadas cantidades de laminina, nidógeno, colágeno y numerosos factores de crecimiento y citoquinas. Posee la peculiaridad de formar matrices semi-sólidas a temperatura ambiente. El matrigel se ha utilizado tanto para ensayos *in vitro* como *in vivo*. El ensayo más común consiste en aplicar sobre la superficie de la placa de cultivo una capa de matrigel, se deja solidificar y se siembran diferentes células sobre la matriz. Este ensayo se lleva a cabo con ECs, que se usan como controles, y células tumorales para estudiar si tienen propiedades plásticas que les permitan llevar a cabo fenómenos de mimetismo vasculogénico. La composición rica en factores de crecimiento del matrigel hará posible que las células con características endoteliales formen estructuras en forma de redes en la superficie de la matriz mimetizando la formación de vasos. Este ensayo se utiliza muy comúnmente para el estudio de fenómenos de mimetismo vascular en el que las células tumorales con propiedades plásticas llevan a cabo esta formación de estructuras (Maniotis et al., 1999).

La necesidad de generar ensayos que mimeticen las estructuras tubulares formadas por las ECs más fielmente ha llevado al desarrollo de matrices tridimensionales en las que las ECs son capaces de invadir la matriz para formar tubos.

Es un ensayo *in vitro* en el que las ECs originan tubos en una matriz tridimensional de colágeno I. Dependiendo de cómo se realice el ensayo permite mimetizar estudios de vasculogénesis o de angiogénesis. Además facilita la observación de los efectos en la modificación de la ECM o la sobreexpresión de determinadas moléculas tan sólo en uno de los tipos celulares que participan en el ensayo. Además este ensayo ha permitido elucidar cuáles son los mecanismos que llevan a cabo la formación del lumen durante la angiogénesis (Koh et al., 2008; Sacharidou et al., 2011).

Para estudiar la angiogénesis se genera una matriz sólida de colágeno, en la parte superior se siembran las ECs y se añaden diferentes factores de crecimiento y citoquinas o al medio o a la matriz. Dará como resultado la formación de tubos invasivos de ECs a lo largo de la matriz de colágeno. Por otro lado, el ensayo de vasculogénesis consiste en la inmersión de ECs dentro de la matriz sólida de colágeno que formarán tubos dentro de ésta. Éste ensayo puede modificarse al añadir PCs a estos cultivos de ECs, la presencia de éstos afectará en la formación de las

estructuras y facilitará la supervivencia y maduración de los tubos haciéndolos más sólidos y permitiendo estudiar la formación de BM (Koh et al., 2008).

Por último indicar que también existen otro tipo de ensayos realizados sobre matrices de fibrina en las que se embeben unas mini-esferas recubiertas de células con capacidad endotelial. Mediante adición de determinados factores de crecimiento las células lograrán proliferar y migrar formando brotes a partir de la superficie de las mini-esferas. Es un ensayo comúnmente realizado con ECs aunque recientemente se ha modificado para su uso en mimetismo vascular (Casal et al., 2010). Este hecho genera un modelo tridimensional, en comparación con el bidimensional de matrigel, para el estudio de los procesos alternativos de vascularización.

2 ENTORNO EXTRACELULAR

El entorno extracelular es de suma importancia para el proceso angiogénico. Tras la activación del endotelio, las ECs comienzan a sintetizar y secretar proteasas que digieren el entorno extracelular. La modificación del entorno extracelular permitirá la migración y proliferación de ECs y PCs y por tanto la angiogénesis.

Las células en los tejidos necesitan un soporte estructural, denominado ECM, que les permita anclarse para ser capaces de reestructurar su citoesqueleto. Por tanto, el entorno extracelular está formado por proteínas estructurales pero a su vez va a contener un importante porcentaje de factores de crecimiento, glicoproteínas de unión a integrinas, proteínas matricelulares, proteasas y multitud de pequeñas moléculas (sales, nutrientes y oxígeno) que por difusión alcanzarán la superficie celular (Daley et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

Además, en el entorno extracelular el mantenimiento de la homeostasis extracelular va a ser muy importante para la supervivencia celular y la correcta funcionalidad de los tejidos. La homeostasis incluirá un contenido apropiado en iones, mantenimiento del pH, adecuado porcentaje de oxígeno y nutrientes. En este entorno extracelular y como parte de los componentes solubles se detectarán proteínas de unión a factores de crecimiento, factores de crecimiento y proteasas. En este entorno las modificaciones post-traduccionales mediadas por proteasas que sufren los componentes del estroma van a ser de gran importancia ya que pueden modular, por ejemplo, las interacciones entre proteínas de unión y factores de crecimiento (Daley et al., 2008).

2.1 MATRIZ EXTRACELULAR

La ECM es una red de proteínas y polisacáridos que sustenta a las células en cada tejido proveyendo de estabilidad a los mismos. Los principales componentes de esta matriz son proteínas como el colágeno I, fibronectina, lamininas, vitronectina y elastina (Daley et al., 2008). Los proteoglicanos, principalmente los heparán sulfatos (HS), también son componentes importantes de estas matrices. La ECM hace de sustento para el anclaje de muchos factores de crecimiento y proteasas extracelulares que forman parte del estroma. La ECM tiene una composición diferente dependiendo del tejido particular del que forma parte que ayudará en la especialización de los tejidos y órganos (Daley et al., 2008).

Hay muchos puntos desconocidos sobre cómo se realiza el ensamblaje la ECM. Se conoce que las integrinas, que realizan la interacción celular con componentes de la ECM como fibronectina, laminina y colágeno, van a ser las responsables de la polimerización de fibronectina. La formación de filamentos de fibronectina parece ser el primer evento en la formación de la ECM y por tanto es un proceso vital para la correcta localización del resto de componentes de la ECM como trombospondina-1 y colágeno I (Daley et al., 2008).

Esta compleja red de proteínas además de organizar el estroma dónde se sustentarán los tejidos y dar robustez a los órganos, es capaz de regular la proliferación y supervivencia celular. También interviene en la migración, diferenciación y en la fisonomía de las células en dichos tejidos.

La ECM va a someterse a remodelación frente a diferentes estímulos, las proteasas serán las encargadas de digerir los componentes clave para permitir los procesos celulares que solventen la carencia inicial. Además esta proteólisis de los componentes de la ECM generará fragmentos con capacidad de señalización. En adición, la modificación por proteólisis de esta membrana originará que factores de crecimiento anclados a la ECM se liberen activando determinadas vías de señalización (Daley et al., 2008).

2.2 MEMBRANA BASAL

La BM es una ECM especializada que está presente en todos los tejidos, recubre cada capa epitelial, muscular, tejido graso, células nerviosas y endotelio del organismo. Su componente mayoritario es colágeno IV y otros abundantes son laminina, perlecano y nidógeno. El colágeno IV va a formar una monocapa y de la misma manera laminina formará otra paralela ya que ambas proteínas tienen capacidad para autopolimerizar (Figura 5). Nidógenos y perlecano entrelazan ambas redes de colágeno y laminina para conseguir la estabilidad de la BM (Figura 5).

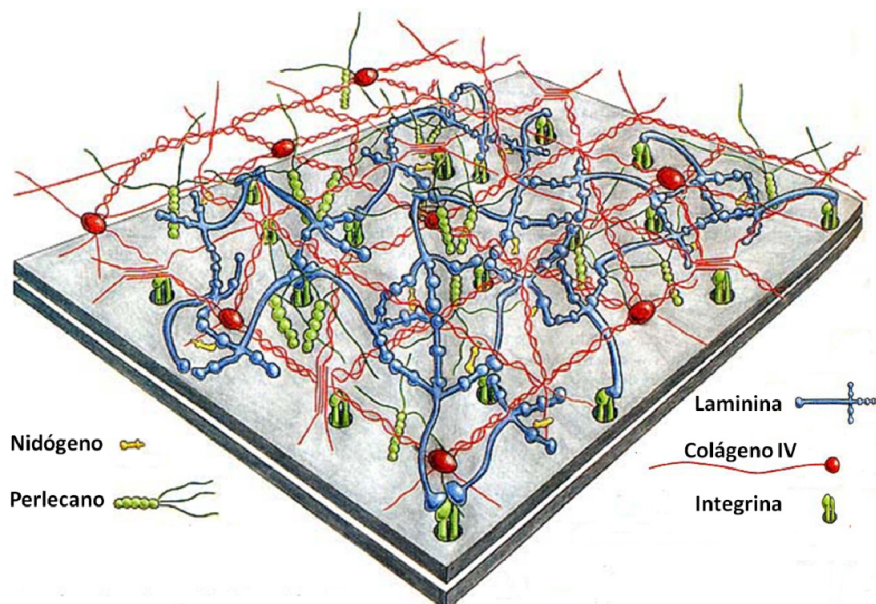


Figura 5 Representación esquemática de la estructura de la BM. Se representan las dos redes formadas por laminina (azul) y colágeno IV (rojo). Además aparecen el nidógeno (amarillo) y perlecano (verde) mediando la interacción entre ambas redes. Se observan los puntos de interacción de los componentes de la BM con las integrinas (localizadas en la superficie de la membrana celular). Modificada de (Isenberg and Wong, 2006).

Para dar cabida a las necesidades de cada tejido hay una gran heterogeneidad de BM, que se generan a partir de variaciones en los miembros que la componen y en diferencias en el ensamblaje de los monómeros de las redes de colágeno IV y laminina. Existen varios componentes minoritarios (fibulinas, agrina, colágeno XV, colágeno XVIII, BM90 y BM40) de la BM en adición a los componentes ubicuos ya nombrados. También existen variantes alternativas de expresión de las proteínas de la BM, además de que su expresión variará dependiendo de las diferencias en su regulación génica lo que aumentará la variabilidad de las BM. Al mismo tiempo, mecanismos post-traduccionales como proteólisis determinarán las posibilidades de interacción con otros componentes de la BM (LeBleu et al., 2007).

Por lo tanto, estas BM tienen que someterse a remodelación para permitir llevar a cabo diferentes procesos fisiológicos o patológicos. Por ejemplo, durante el desarrollo o durante la

reproducción en el estadio adulto, la BM tiene que sufrir importantes remodelaciones. Del mismo modo las BM vasculares que van a rodear el endotelio tienen que modificar su estructura durante la angiogénesis para permitir la generación de nuevos vasos. Esta remodelación será un proceso ordenado en el que intervendrán las células del tejido sobreexpresando determinadas proteasas. La digestión de proteínas clave de la BM posibilitará la migración celular y generará el espacio adecuado para la formación de las estructuras requeridas (LeBleu et al., 2007).

2.2.1 Componentes de la membrana basal

Para entender mejor la función de las BM será necesario conocer la estructura de cada uno de sus componentes. A continuación, se describen las características más importantes de cada uno de los componentes mayoritarios de las BM.

El colágeno IV es un colágeno no fibroso, mediante unión de tres monómeros se forma el protómero que a su vez se enlazan formando hexámeros en forma de araña. La unión de varias estructuras de éste tipo tendrá como consecuencia la formación de una monocapa (Figura 5) (Kalluri, 2003).

Existen 11 genes que codifican para 11 hebras de laminina diferentes que se designan como α , β y γ . Las isoformas de laminina están formadas por heterotrímeros y mediante interacción de éstas se forma una monocapa parecida a la del colágeno IV (Figura 5) (LeBleu et al., 2007).

Los nidógenos son proteínas triglobulares cuya función principal es la unión entre las dos redes de laminina y colágeno IV. Nid2 tiene una expresión más restringida a la BM vascular mientras que Nid1 aparece en la totalidad de las BM (Ho et al., 2008). Se desarrollará más extensamente en el apartado 4 de la introducción por ser uno de los protagonistas de parte de los resultados del trabajo presentado.

Perlecano es un proteoglicano que tiene varios lugares de unión al resto de componentes de la BM. Al igual que los nidógenos el perlecano hace de puente entre las dos estructuras en forma de redes de laminina y colágeno (LeBleu et al., 2007).

Se había asumido que el colágeno IV lidera la formación de las BM pero recientes publicaciones apuntan a la laminina como la responsable del ensamblaje de las mismas (Li et al., 2005; McKee et al., 2007). Parece que después de la formación de las dos redes principales nidógeno y perlecano las unificarán y permitirán el anclaje de componentes minoritarios (fibulina, colágeno XV y otros) y factores de crecimiento.

2.2.2 Función de la membrana basal

A pesar de la gran variabilidad en la composición de las BM y el gran número de tejidos en los que las BM están presentes las funciones realizadas serán comunes en todos ellos. Principalmente las BM tienen una función estructural, en el endotelio estabilizan el tubo, en la BM epitelial unirá la capa epitelial con el tejido conectivo subyacente y durante el desarrollo como sustento para las capas germinales. En este proceso servirán de soporte estructural a las células organizadas en capas bien diferenciadas originarán el ectodermo, mesodermo y endodermo durante la gastrulación (Rowe and Weiss, 2008).

Además de la visión clásica de que las proteínas que componen las BM sólo llevan a cabo funciones estructurales, nuevas evidencias están mostrando su implicación en numerosos

procesos biológicos y de señalización como se describirá a continuación. Para comenzar, se ha descrito la función de almacenaje de factores de crecimiento que serán liberados mediante la proteólisis de los componentes de la BM. Los factores de crecimiento FGF y VEGF tienen capacidad de unión a HS permitiendo su anclaje a la BM (Rowe and Weiss, 2008).

También los componentes de la BM tienen multitud de lugares de unión a integrinas, permitiendo la señalización celular. Estos componentes son capaces de modular la diferenciación, inhibición y promoción de la división celular a través de las uniones RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) a integrina. En respuesta a daño tisular, angiogénesis e inflamación las BM han de ser remodeladas por proteasas que modificarán el entorno extracelular, teniendo un efecto señalizador sobre las células colindantes (LeBleu et al., 2007). Los fragmentos generados por proteólisis del colágeno IV serán activos y tendrán una potente función antiangiogénica (Kalluri, 2003).

La BM es necesaria para la formación de nueva vasculatura, así como para el correcto funcionamiento de la misma. Las ECs son quiescentes cuando se encuentran unidas a la BM, cuando las uniones se modifican por proteólisis las ECs interactúan con otros epítomos de las BM que potencian su división y movilización para la generación de nuevos vasos. La BM vascular es también una membrana semipermeable selectiva con un tamaño de poro de 50 nm que permite la difusión pasiva de pequeñas moléculas desde el torrente sanguíneo. Por ejemplo, será vital en el riñón para la adecuada filtración de sustancias (Kalluri, 2003).

2.2.3 Membrana basal y cáncer

Se han descrito anomalías en la BM de la vasculatura tumoral al analizar en detalle su estructura. Varias publicaciones describen discontinuidad de las mismas, grosor irregular de las BM en tumores y ensanchamiento por disminución en la adhesión de PCs.

Por ejemplo, en un trabajo realizado en tres modelos tumorales murinos diferentes describen anomalías similares. No detectan diferencias en el recubrimiento de BM sobre las ECs, no obstante, la estructura de la BM es anormal e inmadura en los vasos tumorales. La asociación entre ECs y PCs es muy laxa, causando que el grosor de la BM aumente en comparación con la vasculatura normal. Además, la BM en estos tumores está formada por numerosas capas que generará irregularidades en el grosor de la BM. También aumenta el número de brotes a partir de vasos preexistentes en el tumor en comparación con la vasculatura normal (Baluk et al., 2003).

No sólo la BM vascular va a ser diferente en cáncer sino que la BM epitelial va a ser también sometida a cambios. En cáncer la BM epitelial permanece intacta durante procesos iniciales del carcinoma *in situ*. Los carcinomas empiezan a desarrollarse hacinados dentro de una BM, que tiene que ser proteolizada para permitir la migración de las células tumorales. Cuando este proceso ocurre en un carcinoma, el tumor se transformará en invasivo y pasará a ser considerado maligno. El primer paso en este proceso es que la célula tumoral cree un pseudópodo y que aumente la expresión de proteasas. Estas proteasas generarán una interrupción en la continuidad de la BM, a través del cual la célula tumoral será capaz de migrar (Rowe and Weiss, 2008).

2.3 PROTEASAS EXTRACELULARES

Las proteasas fueron consideradas durante muchos años como enzimas degradadoras sin especificidad alguna y cuya función era abrir espacio en los tejidos en respuesta a las necesidades locales del organismo. Hoy sabemos que existen multitud de proteasas que tienen funciones diferentes y sustratos específicos y que no sólo modifican la ECM para permitir la migración celular, sino que su actividad está envuelta en numerosos procesos celulares (Lopez-Otin and Hunter, 2010; van Domselaar et al., 2010).

Las proteasas están clasificadas en familias y subfamilias atendiendo principalmente a sus características estructurales. El 2 % del genoma humano codifica para diferentes proteasas, lo que se traduce en más de 550 proteasas (Puente et al., 2003). El proyecto del degradoma humano consiste en la descripción del total de sustratos de cada una de las proteasas. Además incluye la descripción de la expresión específica de cada proteasa en procesos fisiológicos y patológicos concretos o en determinados tipos celulares, tejidos u órganos (Lopez-Otin and Overall, 2002). El estudio del degradoma pretende, mediante el conocimiento de los sustratos y la expresión específica de las proteasas, determinar y describir sus mecanismos de acción. El elevado número de proteasas muestra la complejidad de este proyecto (van Domselaar et al., 2010).

La complejidad observada para el degradoma humano es muy elevada, pero en ratón se incrementa por encima de las 600 proteasas. A pesar de las diferencias en el número de proteasas, el 82 % del degradoma murino tiene su ortólogo en humano. El resto de componentes comunes de los degradomas humano y murino superan el 80 % de homología en la secuencia génica. Las diferencias encontradas entre los genes del degradoma en ambas especies se corresponden con proteasas envueltas en procesos inmunológicos y en el sistema reproductivo. Ambos procesos indican cambios necesarios para permitir la adaptación al medio por parte de ambas especies (Puente et al., 2003).

Las proteasas son responsables de importantes modificaciones post-traduccionales. Dado que su efecto es irreversible, las proteasas están sometidas a una estrecha regulación. Mediante su acción catalítica regulan la actividad y el destino de numerosas proteínas, controlan su localización extracelular o intracelular, procesan el corte de proteínas de la superficie celular, activan o inactivan otras proteasas y citoquinas, realizan la conversión de receptores agonistas en sus antagonistas y la exposición de nuevas proteínas anteriormente encriptadas. Además, algunas de ellas juegan un papel determinante en la activación del sistema inmune (Lopez-Otin and Overall, 2002).

Las proteasas extracelulares se pueden clasificar en grandes familias en función de su estructura, su sitio activo y los sustratos de las mismas (van Hinsbergh et al., 2006). Por ejemplo, las serinproteinasas, son endopeptidasas que tienen un efecto indirecto en la promoción de angiogénesis por la activación de otras proteasas. Otra familia de proteasas extracelulares son las cisteinas catépsinas su principal actividad la realizan intracelularmente pero se ha descrito también su implicación en la degradación de componentes de la ECM, en el crecimiento tumoral y la apoptosis. Existe otra familia que son las aspartato proteinasas, los miembros más conocidos de esta familia son las caspasas intracelulares que tiene un importante papel en la apoptosis celular. Las aminopeptidasas o carboxipeptidasas son exopeptidasas que liberan uno o dos

aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal. Varias proteasas de esta familia están expresadas en endotelio y tienen un potencial efecto en la angiogénesis.

Se desarrollará más extensamente la familia de las metaloproteasas que son endopeptidasas que pertenecen a la super-familia de las metzincin. La introducción más detallada de esta familia ayudará a entender mejor la función de la proteasa sobre la que se han desarrollado los resultados, ADAMTS1. La familia de metaloproteasas está compuesta a su vez por tres grandes familias: las metaloproteasas de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs) son 23 miembros en el ser humano y 24 en ratón (Kessenbrock K et al., 2010), las metaloproteasas con dominio desintegrina (*α disintegrin and metalloproteinase*, ADAMs) son 25 miembros en el ser humano y 36 miembros en ratón (Edwards DR et al., 2008) y las ADAMTSs (*α disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin repeats*) que cuenta con 19 miembros tanto en humano como en ratón (Kuno and Matsushima, 1998) (Figura 6).

En el siguiente apartado se detallarán la estructura, sustratos y funciones de cada una de estas familias. Se introducen de manera general las familias para detallar a continuación las características de ADAMTS1 en el apartado 3.

2.3.1 Metaloproteasas

Todas las metaloproteasas poseen un dominio catalítico dependiente de cinc, siendo la presencia del metal en el sitio activo el que da nombre a esta familia. Todas ellas son inactivas en su forma intacta y requieren de un procesamiento, generalmente mediado por furina, que libere el prodominio activando así el sitio catalítico. Las tres familias tienen el dominio catalítico localizado en el extremo N-terminal. Sin embargo, en el extremo C-terminal es dónde se localizan las modificaciones estructurales que les otorgan sus peculiaridades. La región C-terminal determinará las funciones y sustratos específicos así como su localización soluble, transmembranal o anclada a la ECM. Por tanto, la estructura básica de esta familia de proteasas está formada por un péptido señal (Pre), un propeptido (Pro) y el dominio catalítico (Cat) (Shiomi et al., 2010).

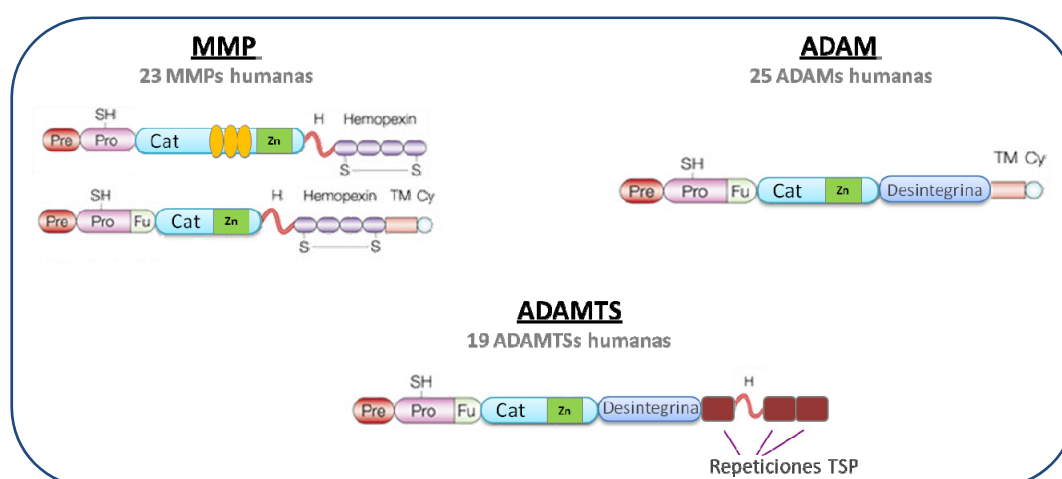


Figura 6 Representación esquemática de la estructura de las familias de metaloproteasas y el número de miembros que las componen. Se representa el péptido señal (Pre), el prodominio (Pro), el dominio catalítico dependiente de cinc (Cat), el dominio transmembranal (TM), el dominio desintegrina y las repeticiones TSP. También se señala el lugar para el corte de furina (Fu) y la región citoplasmática (Cy) de las proteasas transmembranales.

2.3.1.1 MMPs

Se ha relacionado ampliamente la expresión de algunas de estas proteasas con el potencial metastásico de los tumores así como con el crecimiento tumoral y el desarrollo de nuevos vasos. Se describirá más en detalle su implicación en angiogénesis, cáncer y metástasis en el punto 2.3.3 de esta introducción.

Existen otros dominios además de los comunes para todas las metaloproteasas que varían dentro de la familia como el dominio transmembranal (TM), sólo presente en las MMPs ancladas a la matriz (*Membrane-Type Matrix Metalloproteinases*, MT-MMP). Se realiza otro tipo de clasificación atendiendo al tipo de sustrato al que proteolizan y la localización celular, refiriéndose así a colagenasas (MMP1, MMP8 y MMP13), estromalisinas (MMP3, MMP10 y MMP11), matrilisinas (MMP7 y MMP26) y gelatinasas (MMP2 y MMP9) (Rundhaug, 2005).

Generalmente los sustratos de estas proteasas son proteínas estructurales como colágeno, gelatina y agregano. Aunque también proteolizan numerosas moléculas de señalización como TGF β y proteínas de unión a factores de crecimiento. Mediante el corte de la proteína de unión, se modulará la actividad de los factores de crecimiento. Un ejemplo son los IGFbPs (Proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a insulina, *Insuline-like Growth Factor Binding Protein*) que unen IGFs (Factor de crecimiento parecido a insulina, *Insuline-like Growth Factor*) (Shiomi et al., 2010).

2.3.1.2 ADAMs

Los primeros miembros de esta familia se descubrieron por su papel relevante en la fertilidad, además, varios miembros de ésta familia son importantes en angiogénesis. Se tratará con más detalle en apartado 2.3.3 de la introducción su papel en angiogénesis y en cáncer (Blobel, 2005; Murphy, 2008).

Además de los dominios comunes para todas las metaloproteasas, las ADAMs están compuestas por ésta familia contiene un dominio desintegrina (llamado así por parecerse a la secuencia de las desintegrinas del veneno de serpiente). También contiene una región rica de cisteínas, un dominio parecido al de unión al EGF, un dominio transmembranal y uno citoplasmático (Figura 6).

Algunos de los miembros de la familia procesan gelatina, colágeno y fibronectina, aunque varias tienen capacidad para proteolizar TGF α y TNF α (Factor de necrosis tumoral α , *Tumor necrosis factor α*) entre otras moléculas de señalización para permitir su activación. Es más conocida su función en el procesamiento de factores de crecimiento anclados a la superficie celular y a los receptores de los factores de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Blobel, 2005). Sin embargo, hay muchos miembros de esta familia para los que todavía no se han descrito sustratos y parece que no tiene función catalítica a pesar de que su sitio activo está intacto (Shiomi et al., 2010).

2.3.1.3 ADAMTSs

Para esta familia de metaloproteasas se ha encontrado que algunos de sus miembros son relevantes para la inhibición de la angiogénesis y que pueden tener una función en el desarrollo tumoral que se describirá más ampliamente en el apartado 2.3.3 de la introducción.

La familia de las ADAMTSs está compuesta 19 miembros extracelulares. Su estructura está formada por los dominios comunes para todas las metaloproteasas, un dominio desintegrina, una repetición TSP, una región rica en cisteínas, una zona de unión y un número variable de repeticiones TSP (Figura 6). Además la diferente función de cada una de las ADAMTSs va a venir marcada por el número de repeticiones TSP que posea en el extremo C-terminal. Estas repeticiones son las que van a otorgar a las proteasas de ésta familia capacidad de unión y anclaje a diferentes componentes de la ECM haciendo variar su actividad. Aunque no se describirán en detalle, existe otra pequeña familia de proteínas parecidas a las ADAMTSs que está formada por 7 miembros, todas ellas carecen de dominio metaloproteasa o desintegrina aunque se asemejan a los dominios secundarios de las ADAMTSs (Wagstaff et al., 2011).

Los sustratos más comunes para esta familia de metaloproteasas son los proteoglicanos agregano, versicano y brevicano, aunque también algunos miembros pueden procesar vWF (Factor vonWillenbrand, *vonWillenbrand Factor*) y procolágeno (Shiomi et al., 2010).

2.3.2 Inhibidores endógenos de metaloproteasas

Las metaloproteasas en su forma intacta son inactivas por la presencia del prodominio, que bloquea el sitio catalítico, hasta su liberación por proteólisis. Una vez activadas la metaloproteasas, es necesaria la existencia de inhibidores que permitan la regulación de su actividad. Esta modulación se realiza por proteínas endógenas extracelulares que van a bloquear la actividad de las proteasas tanto en condiciones normales como en patológicas. Se han descrito tres grupos de moléculas endógenas inhibitoras de la actividad de las metaloproteasas: TIMPs, RECK y TFPis.

Los TIMPs son proteínas de entre 20-29 kDa que inhiben las metaloproteasas en un ratio estequiométrico 1:1. Existen 4 TIMPs de los cuales TIMP1-3 tienen una expresión generalizada mientras que TIMP4 se expresa casi únicamente en corazón. Los TIMPs generalmente tienen efecto inhibitor solapado sobre las proteasas extracelulares. TIMP3 es el más promiscuo ya que es capaz de inhibir miembros de diferentes familias y el TIMP4 es el más restringido (Ghajar et al., 2008; van Hinsbergh and Koolwijk, 2008). Realizan su acción mediante la unión de su región N-terminal con el sitio catalítico de las proteasas impidiendo su unión y posterior corte de los componentes de la ECM. Los TIMPs muestran diferencias en la adhesión e inhibición de determinadas proteasas. Por ejemplo TIMP2 y TIMP3 son buenos inhibidores de MT1-MMP, MMP19 y ADAM17 mientras que TIMP1 no tiene efecto inhibitor sobre estas. Se describió la inhibición de ADAMTS1 por TIMP3 (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002) aunque actualmente se sabe que TIMP2 también inhibe su función, no obstante, TIMP1 y TIMP4 son incapaces de bloquear su actividad (Wagstaff et al., 2011).

RECK (Inductor reverso, proteína rica en cisteínas con motivos Kazal, *reversion-inducing, cysteine-rich protein with Kazal motifs*) es un inhibidor de metaloproteasas que se localiza en la superficie de la membrana plasmática. Regula al menos la actividad de MT1-MMP, MMP2, MMP9 y ADAM10. El bloqueo de la expresión de RECK en ratones hace que la vasculatura esté fuertemente dañada durante el desarrollo causando una muerte prematura de los animales (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008).

Los TFPis (inhibidor de la señalización del factor tisular, *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) son dos proteínas extracelulares de entre 40-30 kDa y actúan como inhibitoras endógenas de proteasas.

Se sabe que tienen un importante papel en la iniciación de la coagulación. El TFPI-2 fue descubierto inicialmente como inhibidor de serinoproteasas, es capaz de bloquear la actividad de tripsina, plasmina y calicreina. La inhibición de estas serinoproteasas bloqueará la activación mediada por estas sobre otras proteasas. Además, se ha observado el efecto inhibitorio de TFPI-2 sobre MMP2, MMP9 y MMP13 (Herman et al., 2001).

2.3.3 Metaloproteasas en angiogénesis y cáncer

Las primeras observaciones sobre el modo de acción de las proteasas llevaron a generalizaciones erróneas, ya que se supuso que todas las proteasas tenían funciones proangiogénicas y protumorigénicas. Este concepto fue desmentido por varios estudios con diferentes metaloproteasas, en las que algunas de ellas demuestran tener propiedades antiangiogénicas y antitumorales. Aunque se ha avanzado mucho en la determinación de la labor que desempeña cada una de las proteasas en la formación de la nueva vasculatura, todavía queda mucho que conocer sobre su implicación en cáncer y metástasis. Además aún es necesaria la descripción de los sustratos específicos, solapados y posibles compensaciones de la actividad de las diferentes metaloproteasas. El proyecto del degradoma pretende simplificar y aunar esfuerzos para conseguir comprender mejor su función en los diferentes procesos fisiológicos o patológicos. Se sabe también que algunas de ellas pueden tener una función dual que puede variar por la presencia o ausencia de determinados sustratos y su propio estado proteolítico puede regular su actividad (Lopez-Otin and Overall, 2002).

Los propios factores de crecimiento que median la angiogénesis fisiológica y durante procesos tumorales son capaces de incrementar los niveles de expresión de las proteasas necesarias para la degradación de la BM y la migración endotelial a través de la ECM. Las principales responsables de la degradación de la BM son MT1-MMP, MT2-MMP y MT3-MMP. Las ECs de la punta las expresa para permitir la invasión y migración. A pesar de su destacada función durante la angiogénesis no tienen una función relevante en la angiogénesis patológica (Ghajar et al., 2008).

Dentro del grupo de las MMPs solubles, la MMP2 incrementa su expresión ante estímulos proangiogénicos y la MMP9 permite la formación de vasos y ramificaciones en la vasculatura sana, y en la angiogénesis tumoral libera el VEGF-A que potenciará el desarrollo tumoral (Kessenbrock et al., 2010). La proteólisis mediada por MMP7 libera el VEGF de la ECM en la angiogénesis fisiológica. Sin embargo, en cáncer MMP7 corta Fas de la superficie de las células tumorales, reduce el efecto de la quimioterapia ya que impide que se desencadene la apoptosis. En la angiogénesis fisiológica MMP3 y MMP13 liberan el FGF-2 anclado a la ECM potenciando su función proangiogénica. MMP14 y MMP2 son capaces de modular señales de crecimiento para el tumor al proteolizar TGF β para su activación. Además MMP2, MMP9 y MMP14 regulan la actividad del TGF β de manera indirecta al proteolizar componentes de la ECM que lo liberan y permiten su función (Weis and Cheresh, 2011).

Varias proteasas potencian la formación de metástasis a partir del tumor primario. MMP3 modula el corte de E-cadherin dando lugar a EMT (Transición de epitelio a mesenquima, *Epithelial to Mesenchymal Transition*) que permite la migración de células tumorales a sangre. Por otro lado, MMP9, MMP3 y MMP10 están relacionadas con la formación del nicho

premetastásico. Además MMP1, MMP2, MMP13 y MMP14 son importantes en la invasión de células tumorales y por tanto en la malignidad tumoral y metástasis (Kessenbrock K et al., 2010).

No sólo se han descrito acciones favorables para la progresión tumoral por parte de las MMPs. Por ejemplo, MMP8 y MMP12 tienen efecto antitumoral, ambas son expresadas por células del sistema inmune que potencian la acción antitumoral. En adición, la expresión de MMP26 en pacientes con carcinomas está relacionada con una recuperación favorable. El efecto dual descrito para algunas proteasas (MMP3, MMP9, MMP11 y MMP19) aporta aún mayor complejidad en la descripción de la función de éstas en angiogénesis y cáncer (Lopez-Otin and Matrisian, 2007).

Respecto a la familia ADAMs, se ha descrito que ECs, PCs y leucocitos expresan de manera basal algunos de sus miembros: ADAM10, ADAM12, ADAM15 y ADAM17. Se sabe que la expresión de ADAM17 y ADAM10 es necesaria en las ECs para realizar el corte y liberación de ectodominios de receptores como Tie-1 y Notch que activarán respuestas intracelulares necesarias para permitir la generación de nuevos vasos. Recientemente se ha descrito que ADAM8 y ADAM9 también tienen un papel relevante en el proceso de vasculogénesis (van Hinsbergh and Koolwijk, 2008).

Algunos miembros de la familia de las ADAMs aparecen sobreexpresados en tumores. ADAM17 está sobreexpresada en muestras de carcinoma de colon humano en células neoplásicas y en ECs. Además ADAM17 es un factor pronóstico de la evolución de los tumores de mama. También ADAM12 aparece expresada en células de soporte del tumor en muestras de modelos murinos de mama, colon y próstata. Otros análisis de cáncer de próstata revelan un incremento en la expresión de ADAM9, ADAM10 y ADAM17. También ADAM9 se expresa en metástasis en el hígado y en miofibroblastos en la zona del frente invasivo (Murphy, 2008).

Además ADAM15 ha demostrado ser relevante en la angiogénesis patológica y muestra una expresión elevada en adenocarcinomas agresivos. Hay indicios de que ésta regula la comunicación de ECs con las células de cáncer de próstata permitiendo la metástasis (Dreymueller et al., 2011; van Hinsbergh and Koolwijk, 2008)

La familia de las ADAMTSs se ha estudiado más ampliamente debido a la actividad antiangiogénica descrita inicialmente para ADAMTS1 y ADAMTS8. Se cree que su actividad viene mediada por las repeticiones TSP del extremo C-terminal que les proporcionan capacidad de adhesión a componentes de la ECM (Porter et al., 2005). Se tratará más detalladamente la relación de esta proteasa con angiogénesis y cáncer en los apartados 3.3 y 3.4 de esta introducción.

Varias publicaciones indican que la expresión de ADAMTS8 está reducida en cáncer de mama, en gliomas y en NSCLC (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas, *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*). ADAMTS9 también es un inhibidor de la angiogénesis, el animal deficiente para la metaloproteasa muestra un incremento en la vascularización de la córnea (Wagstaff et al., 2011). ADAMTS12 tiene un efecto antiangiogénico no dependiente de su actividad catalítica. ADAMTS12 tiene actividad supresora de tumores tanto por su efecto antiangiogénico como antiproliferativo sobre las células del tumor. ADAMTS13 facilita la extravasación de células tumorales y por lo tanto la progresión de la enfermedad, aunque publicaciones recientes indican

funciones opuestas. ADAMTS9, ADAMTS15 y ADAMTS18 demuestran tener una función antitumoral (Wagstaff et al., 2011).

2.3.4 Técnicas de identificación de sustratos

Para poder llevar a cabo el proyecto global del degradoma (Lopez-Otin and Overall, 2002) es de suma importancia la determinación de los sustratos específicos, esto ayudará a describir las funciones únicas de cada proteasa. A continuación se detallan las técnicas usadas de forma inicial y los avances que han surgido respecto a métodos de detección y caracterización de sustratos de las proteasas. Como se describirá en el texto, las técnicas proteómicas han sufrido un gran avance en las últimas décadas. Mientras que en un inicio los test se realizaban con librerías peptídicas, siendo estas muy limitadas, en la actualidad somos capaces de analizar muestras complejas y conseguir resultados más fiables (Lopez-Otin and Overall, 2002).

Hasta la última década, ha sido predominante el uso de librerías peptídicas. Para determinar la especificidad del corte de una proteasa sobre los sustratos, se realizaban varias rondas con los diferentes sustratos incluidos en librerías peptídicas. Existen dos técnicas que son divididas según el soporte biológico usado, fagos o células. El ensayo consiste en el uso de fagos que expresan los péptidos en la superficie y están anclados a un sustrato. Al poner en contacto los fagos con la proteasa, si es un sustrato específico, los fagos que expresan la proteína reconocida se despegan. Se propagan los fagos despegados en bacteria para amplificar el material y se secuencian para conocer el lugar de reconocimiento de la proteasa. Otro es mediante el uso de librerías celulares de sustratos peptídicos (*Cellular Libraries of Peptide Substrates*, CLIPS) en el que las células muestran en superficie los péptidos con una molécula fluorescente en el extremo externo. Esto permitirá hacer una selección por citometría tras exposición a la proteasa, se seleccionan las células no marcadas que serán las que la poseen el péptido reconocido por la proteasa (van Domselaar et al., 2010). Ambas son técnicas sensibles pero que necesitan de varias rondas de amplificación y secuenciación posterior. Con el objetivo de facilitar este proceso, se desarrolló un PreChip que permitía hacer un estudio en un solo paso de 1000 péptidos al azar marcados con fluorescencia. Y del mismo modo, la liberación de la molécula fluorescente indicaba el reconocimiento del péptido.

La Identificación proteómica de sitios de corte por proteasas (*Proteomic identification of protease cleavage sites*, PICS) supuso un gran avance ya que permitía determinar nuevos sustratos sin tener una idea previa de las posibles dianas. Las proteínas son digeridas con tripsina o quimiotripsina, después se incuban con la proteasa de interés y los nuevos extremos N-terminales se marcan con biotina y se aíslan con estreptavidina inmovilizada. Los péptidos eluidos son sometidos a espectrometría de masas (*Mass spectrometry*, MS) (van Domselaar et al., 2010).

Sin embargo, con la intención de ser capaces de analizar muestras complejas, como medios condicionados de células o fluidos biológicos, donde existen multitud de sustratos para las proteasas se desarrollaron los geles en dos dimensiones. Primero se separan las proteínas por punto isoeléctrico en tiras de acrilamida en las que hay un gradiente de pH. Cuando las proteínas alcanzan su punto óptimo se someten a electroforesis en SDS-PAGE geles. Mediante tinción de plata se ven los puntos que se han modificado en presencia o ausencia de la proteasa. Se mejora esta técnica mediante el uso de fluorocromos, como el 2D-DIGE (gel de electroforesis

bidimensional, *Difference Gel Electrophoresis*). El 2D-DIGE es un gel bi-dimensional en el que las proteínas, previamente marcadas con fluorocromos, se separan en un gel de dos dimensiones. Así las proteínas se identifican mediante excitación con la longitud de onda apropiada, detectando puntos a lo largo del gel marcados con los diferentes fluorocromos. Esto nos permitirá observar las variaciones de las proteínas que han sufrido proteolisis. Esta pequeña mejora en la introducción de fluorocromos para el marcaje protéico, hace mucho más sencilla la detección de péptidos específicos generados por el corte de la proteasa de interés. Los péptidos seleccionados se someterán posteriormente a MS. Ambas técnicas tienen la limitación de que no detectan proteínas con punto isoelectrónico fuera del rango 3-10 pH (Canals et al., 2006).

Otra nueva técnica desarrollada es un gel de electroforesis de una dimensión asociado a cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*, LC) y MS. Las bandas del SDS-PAGE gel se cortan, se digieren con tripsina y se someten a LC y MS. La cromatografía líquida permite la separación física de los componentes en el medio analizado y el espectrómetro de masas permite determinar pequeños cambios en el tamaño de los péptidos analizados. Mediante codificación isotópica (*Stable Isotope Labelling with Aminoacids in Cell culture*, SILAC o *Isotope-coded protein label*, ICPL) se puede hacer más sensible esta técnica ya que van a generar pequeñas diferencias en el peso de las proteínas expuestas a isótopos más o menos pesados. Esta técnica va a permitir la identificación de péptidos de manera muy precisa consiguiendo estimaciones muy precisas en los tamaños de los fragmentos esperables (van Domselaar et al., 2010).

3 ADAMTS1

ADAMTS1 (desintegrina y metaloproteasa con dominios trombospondina, *A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin motif-1*) es el primer miembro de la familia de las ADAMTSs. ADAMTS1 fue descrita por primera vez en un modelo murino de adenocarcinoma de colon que origina una respuesta caquécica. En este trabajo demuestran que la expresión de ADAMTS1 se sobrerregula en respuesta a inflamación (Kuno et al., 1997).

Hoy sabemos que esta proteasa es importante en el desarrollo y en angiogénesis así como en procesos patológicos como artritis y cáncer. Se conocen varios sustratos estructurales para esta proteasa, los proteoglicanos y componentes de la BM. Sin embargo, queda mucho por describir sobre su regulación y función en procesos fisiológicos y en cáncer.

Para el estudio detallado de la función de ADAMTS1 se utilizarán modelos murinos. Aunque el gen de *adamts1* en humano se localiza en el cromosoma 21, y en el ratón en el cromosoma 16 (Kuno et al., 1999), ambos poseen una homología del 84 % (Puente et al., 2003). Esta elevada similitud entre su secuencia génica genera que ADAMTS1 esté muy conservada entre ambas especies, haciendo posible el uso de modelos murinos para estudiar la función de la proteasa. Por tanto, los resultados obtenidos en ratón permitirán la extrapolación a humanos.

3.1 REGULACIÓN Y ACTIVACIÓN DE ADAMTS1

ADAMTS1 se expresa en condiciones normales en la mayoría de los tejidos aunque sus niveles basales de expresión son bajos. Generalmente se encuentran las tres isoformas de la proteasa. En primer lugar la proactiva, que es la proteína completa de 110 kDa que mantiene el prodominio. El corte del prodominio del extremo N-terminal, como resultado del procesamiento por furina genera un fragmento activo de 87 kDa. En tercer lugar se detecta otro fragmento activo de 65 kDa, que posee menor afinidad a heparina debido a que el corte se produce sobre la isoforma de 87 kDa eliminando las dos últimas repeticiones TSP en el extremo C-terminal (Figura 7 A). Se ha determinado cómo el segundo corte en el extremo C-terminal, se produce por mediación de varias metaloproteasas como MMP8, MMP2 y MMP15 (Figura 7 B) (Rodríguez-Manzanares et al., 2000). También se ha descrito como la propia proteasa ADAMTS1 es capaz de sufrir autoproteólisis. El autocorte producido tiene efecto sobre la actividad de la proteasa, lo que indica que tiene capacidad para regular su propia actividad (Liu et al., 2006).

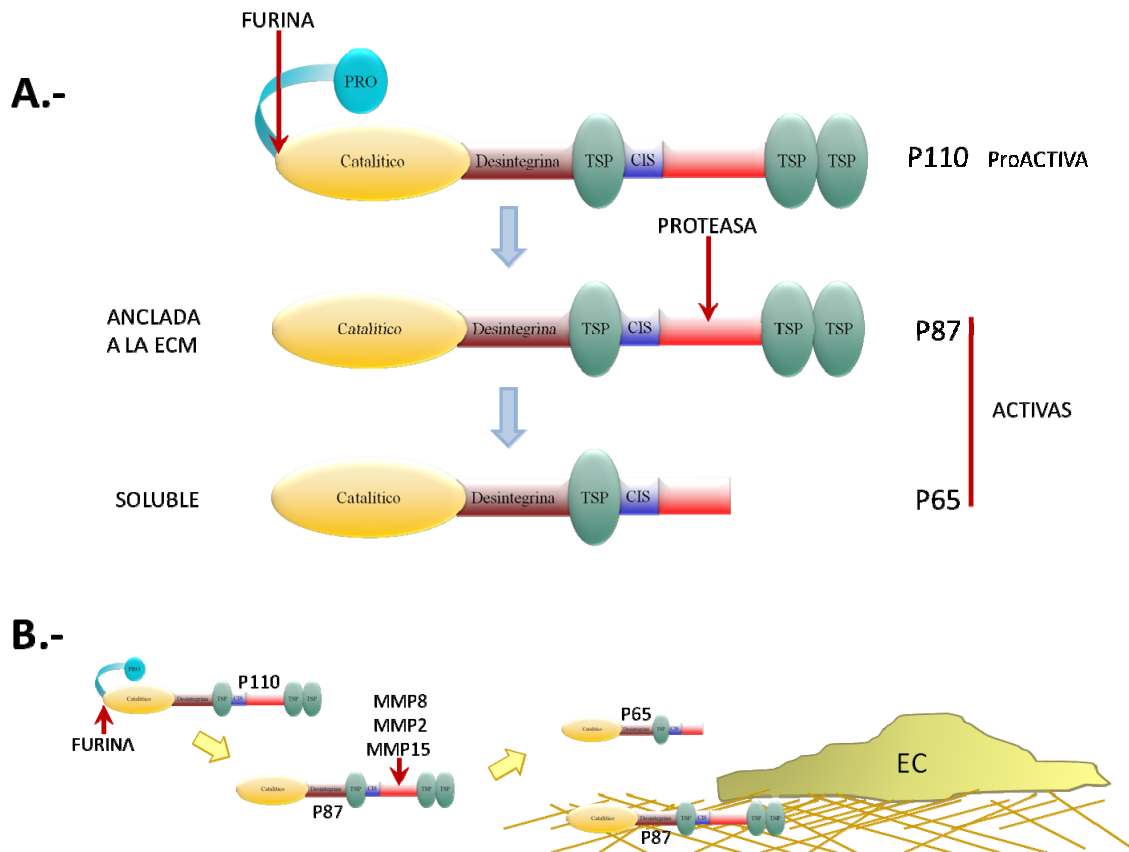


Figura 7 (A) Estructura de ADAMTS1, lugares de procesamiento y productos resultantes con sus tamaños respectivos. (B) Localización de la proteasa en el entorno extracelular en función del procesamiento sufrido. El corte por furina activa la proteasa que mantiene su capacidad de unión a la ECM y el segundo corte mediado por MMPs produce otra forma activa soluble. Modificado de (Rodríguez-Manzaneque et al., 2000).

Se han publicado varios trabajos en los que se detalla cómo se regula la expresión de ADAMTS1 mediante procesos epigenéticos. En NSCLC se observa cómo el gen de ADAMTS1 está silenciado por metilación en un 30% de los casos en comparación con el 7% observado en tejido normal (Choi et al., 2008).

Existe otra publicación en las que se describe cómo la expresión de ADAMTS1 se incrementa en ECs en respuesta a estímulos angiogénicos como la hipoxia. Para elucidar el mecanismo, se observó la secuencia del promotor de ADAMTS1 y se localizaron 3 regiones de homología para el factor de hipoxia (*hipoxia inducible factor*, HIF), que podrían permitir la unión de HIF y modular la expresión de la proteasa (Hatipoglu et al., 2009).

3.2 SUSTRATOS DE ADAMTS1

Para elucidar el papel que ADAMTS1 juega en condiciones normales y en cáncer es importante conocer los sustratos de la proteasa para describir y comprender mejor su función. Como sustratos más ampliamente descritos están varios proteoglicanos como el agregano (Kuno et al., 2000; Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), versicano (Sandy et al., 2001) y brevicano (Matthews et al., 2000). El corte excesivo de agregano puede estar relacionado con artritis ya que es un componente mayoritario del cartílago en las articulaciones. El versicano está presente en los

vasos sanguíneos y en piel, además se ve incrementada su expresión en tumores (Tabla 2) (Ricciardelli et al., 2011).

TIPO DE PROTEÍNA	SUSTRATO	FUNCIÓN O TEJIDO ESPECÍFICOS	REFERENCIA
Proteoglicanos	AGRECANO	Cartílago	(Rodríguez-Manzaneque et al., 2002)
	BREVICANO	Cerebro	
	VERSICANO	Matriz extracelular	(Sandy et al., 2001)
	SINDECANO-4	Unión célula-célula y célula-ECM	(Rodríguez-Manzaneque et al., 2009)
Proteínas de la BM	NIDÓGENO1	Todos los tejidos	(Canals et al., 2006)
	NIDÓGENO2	Todos los tejidos	
Proteínas solubles o anclada a la ECM	SEMAFORINA 3C	Tejido nervioso	(Esselens et al., 2010)
	TFPI-2	Entorno extracelular	(Torres-Collado et al., 2006)

Tabla 2 Sustratos de ADAMTS1 clasificados según el tipo de proteína. Se detalla también el tejido o función específica que caracteriza a cada uno de los sustratos y se incluye además una referencia bibliográfica.

Respecto al TFPI-2, éste se identificó a partir del hallazgo de su interacción con ADAMTS1. La proteólisis tiene lugar en el extremo C-terminal de TFPI-2 alterando su capacidad de unión a componentes de la ECM. Entre las funciones del TFPI-2 destaca la de mantenimiento del entorno extracelular, por lo que el corte mediado por ADAMTS1 desregulará el equilibrio generado por el factor tisular (Tabla 2) (Torres-Collado et al., 2006).

Más recientemente se han identificado dos nuevos sustratos de la proteasa ADAMTS1, los nidógenos 1 (Nid1) y 2 (Nid2), mediante técnicas proteómicas (DIGE) a partir de medio condicionado de células de mamífero (Tabla 2) (Canals et al., 2006). Estos se describirán más extensamente en el apartado 4 de esta introducción.

Se ha descrito recientemente que el corte de ADAMTS1 sobre el sindecano-4 provoca defectos en la adhesión celular y promueve la migración celular (Rodríguez-Manzaneque et al., 2009). El sindecano-4 es un proteoglicano heparán sulfato anclado a la membrana celular que participa en las uniones célula-célula y célula-ECM (Tabla 2).

Por último se ha demostrado cómo ADAMTS1 a través del corte de Semaforina 3C es capaz de inducir la movilidad de células tumorales. Las semaforinas, en condiciones normales, tienen una importante función durante el desarrollo en sistema nervioso, sin embargo, numerosas evidencias apuntan a su papel en el desarrollo tumoral y en la metástasis (Esselens et al., 2010).

Según estos datos, ADAMTS1 es capaz de proteolizar proteínas de carácter estructural, en ocasiones específicas de tejidos como el agrecano y el versicano, pero también presentes en prácticamente la totalidad de los órganos, como los nidógenos. Además ADAMTS1 proteoliza a

un inhibidor de proteasas como es el TFPI-2 teniendo un papel regulador sobre la actividad de otras proteasas. Estas observaciones evidencian la posible regulación de ADAMTS1 sobre otras proteínas con función de señalización.

3.3 IMPLICACIÓN DE ADAMTS1 EN ANGIOGÉNESIS

ADAMTS1 se ha descrito ampliamente como una molécula antiangiogénica, uno de los mecanismos de acción que se han descrito para esta proteasa es el secuestro por unión directa al VEGF, así ADAMTS1 es capaz de inhibir la proliferación de ECs y por tanto la formación de nuevos vasos (Luque et al., 2003). Además en varios trabajos independientes describen una reducción en la angiogénesis tumoral en presencia de ADAMTS1 (Iruela-Arispe et al., 2003; Reynolds et al., 2010).

Por el contrario, ADAMTS1 es un gen sobreexpresado por las ECs en respuesta a hipoxia. No obstante, esta sobreexpresión de ADAMTS1 frente a hipoxia ocurre de manera transitoria, es decir, se puede considerar como un gen de respuesta rápida, a diferencia de la expresión sostenida del VEGF durante el proceso angiogénico. La expresión de ADAMTS1 en ECs se reduce a las 3 horas de la iniciación de la angiogénesis en un modelo *in vitro* de hipoxia. Además observan que la adición de ADAMTS1 recombinante potencia la migración de ECs (Hatipoglu et al., 2009). En línea con la publicación anterior, la presencia de ADAMTS1 es necesaria en la invasión de las ECs en la matriz de colágeno, ensayo que mimetiza los procesos angiogénicos durante la curación de la herida (Su et al., 2008). ADAMTS1 aparece como una proteína necesaria para la correcta invasión de las ECs durante la formación de nuevos vasos en respuesta a estímulos proangiogénicos, pero a su vez tiene un efecto antiangiogénico más potente que algunos inhibidores reconocidos como TSP y endostatina (Luque et al., 2003).

Se ha demostrado que al menos parte de la actividad antiangiogénica de ADAMTS1 está mediada por los dominios TSP, ya que el corte que libera los dominios TSP reduce la capacidad antiangiogénica de ADAMTS1 (Rodríguez-Manzaneque et al., 2000). Sin embargo, en otro trabajo publicado por este mismo grupo demuestra que no sólo los dominios TSP son importantes sino que el dominio catalítico también posee un efecto antiangiogénico y por tanto antitumoral y antimetastásico (Iruela-Arispe et al., 2003).

Ha sido estudiada también la implicación de la proteasa ADAMTS1 en la formación de estructuras pseudo-vasculares en tumores. Se seleccionaron dos tipos tumorales que llevan a cabo mimetismo vascular cuando presentan un fenotipo agresivo: sarcoma de Ewing y melanoma uveal. La expresión de ADAMTS1 se ve incrementada en las líneas celulares agresivas pero no en el resto, lo que relaciona la expresión de la proteasa con el fenómeno de mimetismo vascular. La inhibición de la expresión de ADAMTS1 en estas líneas tumorales hace que su capacidad vasculogénica se vea comprometida (Casal et al., 2010). Esta publicación forma parte de los resultados de este trabajo por lo que se detallará en sucesivos apartados. De esta manera se demuestra también la doble implicación de la proteasa en fenómenos angiogénicos y en procesos tumorales. Por lo que a continuación se tratarán las evidencias obtenidas para la proteasa en diferentes tipos tumorales.

3.4 FUNCIÓN DE ADAMTS1 EN CÁNCER Y METÁSTASIS

ADAMTS1 ha sido estudiada en procesos tumorales, describiendo funciones dispares como promotor o inhibidor de tumores y metástasis.

Hay varios trabajos que demuestran el potencial protumoral y prometastásico de ADAMTS1. Uno de estos ensayos es un experimento con xenógrafos sometidos a inyección de células de origen humano de carcinoma de mama, observando una sobreexpresión de ADAMTS1 en las células con elevado potencial metastásico. Estas células que sobreexpresan ADAMTS1 ejercen su función junto con MMP1 a través de la proteólisis del ligando parecido a EGF (Ligando parecido al factor de crecimiento epidérmico, *Epidermal Growth Factor-like ligands*) que dirigirá la metástasis a hueso (Kang Y, 2003). Una reciente publicación, que continúa la línea del trabajo anterior, realizan un ensayo con tumores de mama y con metástasis a hueso de pacientes. Detectan mayor expresión de ADAMTS1 en el tumor primario de pacientes con peor prognosis y mayor expresión de ADAMTS1 en las metástasis a hueso de diferentes tipos tumorales (Casimiro et al., 2012). Estos resultados sugieren una relación de ADAMTS1 y malignidad tumoral e incremento de metástasis que va en línea con el trabajo de Kang y colaboradores. En otro trabajo basado en cáncer de páncreas en humanos, describen que los pacientes que sobreexpresan ADAMTS1 presentan más metástasis a nódulos linfáticos (Masui T, 2001). Estos datos apoyan los resultados anteriores, ya que ADAMTS1 parece potenciar la metástasis de las células tumorales. En una publicación reciente usando el ratón deficiente (*knock out*, ko) para *adamts1* en un cruce con el MMTV-PyMT, que genera tumores de mama de manera espontánea, el animal resultante producirá tumores de mama en total ausencia de la proteasa ADAMTS1. En este trabajo describen una disminución en el crecimiento tumoral y en la metástasis en ausencia de la proteasa, indicando que ADAMTS1 es necesario para la progresión tumoral. El corte producido por ADAMTS1 sobre versicano aparece como el responsable de la respuesta inmune favorable al crecimiento tumoral (Ricciardelli et al., 2011). Existen otros indicios que van en la misma línea que los anteriores ya que describen la función de ADAMTS1 como un promotor tumoral, en este caso promueve el crecimiento tumoral mediante la inducción de una reacción del estroma (Rocks et al., 2008). En otro trabajo, la inhibición de ADAMTS1 mediante un anticuerpo específico inhibe el crecimiento de células tumorales de mama 4T1 (Hirano et al., 2011). Según las publicaciones nombradas parece claro que ADAMTS1 tiene un importante papel promotor tumoral y metastásico.

En contraste, otros estudios sugieren la actividad antitumoral y antimetastásica de la proteasa ADAMTS1. Por ejemplo, en el análisis de muestras humanas de tumores de mama se detecta que la expresión de ADAMTS1 es menor que en el tejido sano. Sin embargo, en el análisis anterior no encuentran una correlación directa entre el nivel de expresión de ADAMTS1 y la progresión de la enfermedad (Porter et al., 2004). En línea con los resultados un ensayo con células CHO (células de ovario de hámster, *Chinese Hamster Ovary*) sobreexpresoras de ADAMTS1 muestran una reducción en el crecimiento tumoral y en el potencial metastásico (Kuno et al., 2004). Además, dos trabajos describen una reducción en la angiogénesis tumoral y por lo tanto una disminución en el desarrollo tumoral cuando la expresión de ADAMTS1 se incrementa (Iruela-Arispe et al., 2003; Reynolds et al., 2010). Otros datos aportan evidencias del potencial antitumoral de ADAMTS1 ya que está silenciado epigenéticamente en el 85% de líneas celulares de cáncer de colon (Lind et al., 2006). En contraste en otra publicación se describen

diferencias en la morfología de la vasculatura de tumores generados con células de próstata sobreexpresoras de ADAMTS1, aunque no detectan diferencias en la densidad vascular del tumor o en el tamaño de los mismos (Gustavsson et al., 2010). Describen a ADAMTS1 como una proteína que puede modificar las características morfológicas de los vasos en los tumores sin tener efecto en la angiogénesis tumoral ni en el desarrollo tumoral.

Por último, en relación con el aparente efecto dual de la proteasa, podemos destacar un trabajo que justificaría tales acciones a través del diferente procesamiento de ADAMTS1. Realizan inyecciones de células de carcinoma de mama, TA3 o con LLC (Carcinoma pulmonar de Lewis, *Lewis Lung Carcinoma*), observando que la molécula intacta de ADAMTS1 tiene propiedades prometastásicas y los diferentes fragmentos de ADAMTS1 tienen propiedades antimetastásicas (Liu et al., 2006). Además, en el trabajo de ADAMTS1 y mimetismo vascular, se observa cómo los tumores que expresan elevadas cantidades de ADAMTS1 poseen menor densidad vascular, sin embargo, se detectan estructuras pseudo-vasculares (Casal et al., 2010). Por tanto ADAMTS1 también es relevante en su función dual en los procesos vasculares de angiogénesis y mimetismo vascular en tumores. Siendo estas posibles explicaciones para actividades tan dispares en tumores o en metástasis para ADAMTS1.

3.5 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE ADAMTS1

Para elucidar la función de ADAMTS1 en angiogénesis y cáncer se hace necesaria la utilización de modelos animales. Además de la posibilidad de realizar ensayos con xenógrafos, para el estudio del procesamiento de determinados sustratos es muy interesante el análisis de muestras provenientes de animales con expresión variable de la proteasa. Para el estudio del efecto de la ausencia de la proteasa *in vivo*, se ha desarrollado el modelo murino *adamts1* ko. Por otro lado, se ha desarrollado recientemente un modelo de animal sobreexpresor de la proteasa que todavía no ha tenido demasiada difusión (Hu et al., 2011). Por tanto, el modelo de síndrome de Down (*Down's Syndrome*, DS) que posee 3 copias del gen de *adamts1* puede funcionar como un modelo para el estudio del incremento en la expresión de la proteasa.

En el estudio detallado del ratón *adamts1* ko se describieron notables diferencias en el tamaño de los animales, concretamente a los 9 meses del nacimiento se observan reducciones en el tamaño de los animales *adamts1* ko en un 70%. Además los riñones de los ratones *adamts1* ko presentaban una mayor proporción de tejido fibrótico, así como un incremento en el lumen de los riñones. Del mismo modo las hembras ko mostraban una reducción en la fertilidad de un 90% en las deficientes y un 13% en las heterocigotas (het). Observando en detalle el útero y los ovarios de las mismas, se detectaron malformaciones en los órganos reproductores femeninos. ADAMTS1 tiene un papel no redundante en procesos de desarrollo del sistema reproductor y renal que afectan la supervivencia de las crías en los días cercanos al nacimiento (Shindo et al., 2000). La ausencia de la proteasa permite estrechar sus efectos mediante la observación del estado proteolítico de sus sustratos, si la localización de los sustratos se modifica en ausencia de la proteasa y el estudio de la relevancia de la proteasa en tumores.

El modelo murino de DS, Tc1 se generó a partir de la inserción de la mayor parte del cromosoma 21 humano (Hsa21) en ratón. En el ratón la información genética contenida en el cromosoma 21 humano se localiza dividida entre el cromosoma 16, 17 y 10 (Figura 8). En concreto el gen de *adamts1* se encuentra localizado en el cromosoma 16 murino, algo que no influirá para la

generación del modelo de DS. Centrándonos en la expresión de ADAMTS1 veremos cómo en este modelo tendremos la expresión endógena de las dos copias del gen murino y la introducida mediante la información humana (Figura 8). Este modelo reproduce muy fielmente las anomalías descritas para los pacientes con DS como retraso mental y alteraciones variables entre individuos en corazón (O'Doherty et al., 2005). Además este modelo es importante en cáncer, ya que en paralelo a las afecciones ya conocidas para personas con DS, se sabe que tienen menor incidencia de tumores sólidos (Hasle, 2001). Existen otros modelos murinos de DS en los que el total del contenido genético es de origen murino, por ejemplo, en el modelo Ts65Dn la trisomía es generada mediante la inserción casi total del cromosoma 16 de origen murino (Figura 8) (Reeves et al., 1995).

Parte de los resultados presentados en este trabajo de investigación se se desarrollarán en los modelos animales del *adamts1* ko y el Tc1 como modelos de ausencia y sobreexpresión de la proteasa respectivamente.

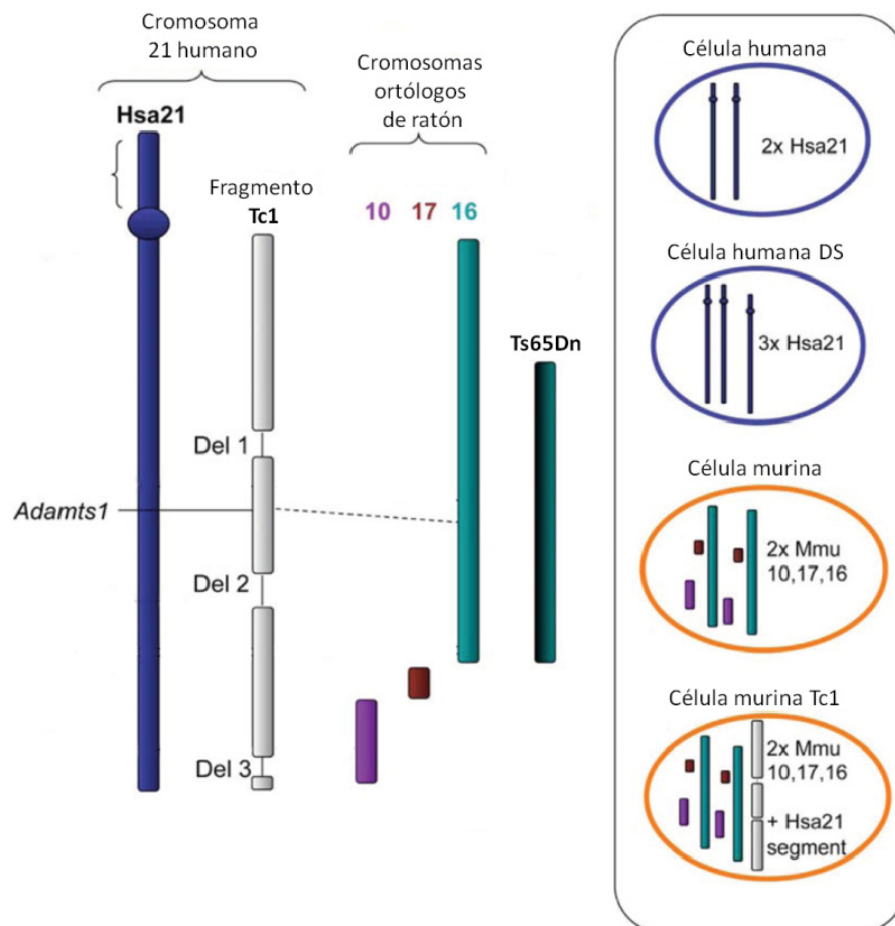


Figura 8 Representación esquemática del cromosoma 21 humano y el fragmento insertado en el modelo murino Tc1. A su lado, los correspondientes cromosomas ortólogos de ratón 10, 17 y 16 para el 21 humano. A su vez se representa la copia parcial del cromosoma 16 introducida para generar otro modelo murino de DS, Ts65Dn. Para todos los cromosomas se destaca la localización de *adamts1*. A la derecha se representa el contenido genético de las células de cada uno de los modelos animales. Modificado de (Reynolds et al., 2010).

4 NIDÓGENOS

Los nidógenos son proteínas extracelulares que componen la totalidad de las BM (ya introducido en el apartado 2.2). El Nid1 fue descrito inicialmente y nombrado como entactina (Carlin et al., 1981). Nid1 fue aislado por primera vez de la ECM de células en diferenciación de carcinoma embrionario. Más tarde se extrajo de el sarcoma transplantable EHS y se determinó que se trataba de la misma molécula encontrada con anterioridad. El Nid2 se detectó por vez primera al aislar cDNA de un clon de osteoblastos. Más tarde se detectó la expresión del Nid2 en la totalidad de los tejidos (Kohfeldt et al., 1998).

4.1 ESTRUCTURA Y CAPACIDAD DE UNIÓN DE LOS NIDÓGENOS

Ambos nidógenos poseen una estructura triglobular, conectados por un dominio rod y una región de unión (Figura 9). Nid1 y Nid2 son proteínas de elevado peso molecular, 150 kDa y 200 kDa respectivamente. Los nidógenos comparten una elevada homología en la secuencia de los dominios globulares pero es mucho más reducida en las zonas de unión. Cada región de la molécula tiene diferente capacidad de adhesión a otras proteínas de la ECM. El dominio G1 o NIDO aparece comúnmente separado del resto de la proteína ya que en la región de unión hay una zona muy sensible a proteólisis que libera este dominio del resto. El dominio G3 también es sensible a proteólisis, la liberación por corte de parte de la proteína va a producir cambios en su interacción con otros componentes de la BM (Figura 9). Los fenómenos proteolíticos pueden también potenciar la adquisición de una estructura tridimensional diferente variando su potencial de interacción con otras proteínas de la ECM (Ho et al., 2008).

Los dominios que poseen elevada capacidad de unión a otros componentes son el G2 y G3 siendo los mediadores de la mayor parte de interacciones con el resto de componentes de la BM. Ambos nidógenos interaccionan con Laminina, colágeno IV y perlecano. Es el dominio G2 el que interacciona con colágeno IV y perlecano, sin embargo, es el dominio G3 el que une laminina. Por tanto, son estos dos dominios los responsables de la estabilización de las BM mediante la unión de las redes creadas independientemente por laminina y colágeno IV (detallado en el apartado 2.2.1). Además ambos nidógenos tienen capacidad de unión a HS a través de su dominio G2 que permitirá la interacción de las BM con componentes de la ECM (Ho et al., 2008). Asimismo numerosos factores de crecimiento tienen lugares de unión a HS, por lo que podría permitir la interacción indirecta de éstos con los nidógenos.

No obstante, ambos nidógenos presentan diferencias de afinidad para otras moléculas extracelulares. El Nid1 unirá fibulina-1 en el dominio G3 y fibulina-2 en el dominio G1 pero Nid2 no unirá ninguna de las dos. Se ha determinado la importancia de las fibulinas en la formación de fibras elásticas, pero además se han detectado anomalías en la expresión y procesamiento de fibulina-1 en determinados tipos de cáncer (Cheng et al., 2008; Greene et al., 2003) y se ha descrito su función inhibidora de angiogénesis y crecimiento tumoral (Xie et al., 2008). Por tanto la interacción entre fibulina-1 y Nid1 puede ser importante en procesos tumorales y angiogénicos y puede verse modificada por los cambios en el procesamiento proteolítico de ambas moléculas. Por otro lado, colágeno XIII es capaz de unir Nid2 pero su capacidad de unión a Nid1 es reducida. En ratones deficientes para colágeno XIII se observa una degeneración

muscular y defectos en la formación de las BM, sugiriendo que su presencia e interacción con Nid2 es determinante para el correcto ensamblaje de las BM (Ho et al., 2008).

Además en el dominio rod existen repeticiones RGD que van a mediar en la interacción de los nidógenos con integrinas (Figura 9). Se ha determinado que la integrina $\alpha 3\beta 1$ es la más importante para la interacción con ambos nidógenos, con menor contribución de la integrina $\alpha 6\beta 1$. Los lugares RGD para Nid1 y Nid2 van a estar localizados en diferente posición del dominio rod como indica la Figura 9. Aunque ambos nidógenos parecen tener los mismos mediadores de interacción con células, en la práctica la capacidad de unión de varias líneas celulares de diferente origen a Nid2 es similar a la de laminina, pero sorprendentemente la unión a Nid1 se ve reducida del orden de 10^2 - 10^3 (Ho et al., 2008).

Se han descrito recientemente diferencias en la unión a laminina entre Nid1 y Nid2. El bloqueo del lugar de unión de los nidógenos a laminina da como resultado la pérdida casi total de la localización de Nid1 en la BM, siendo la laminina necesaria para retener el Nid1. Sin embargo, no ocurre lo mismo para Nid2, aunque el lugar de unión de laminina esté bloqueado el Nid2 sigue apareciendo correctamente localizado en la BM (Mokkapatil et al., 2010). Estas nuevas observaciones están aportando información de que los dos nidógenos no son tan similares en funciones como se pensaba. Nuevos estudios arrojarán más luz sobre sus funciones específicas.

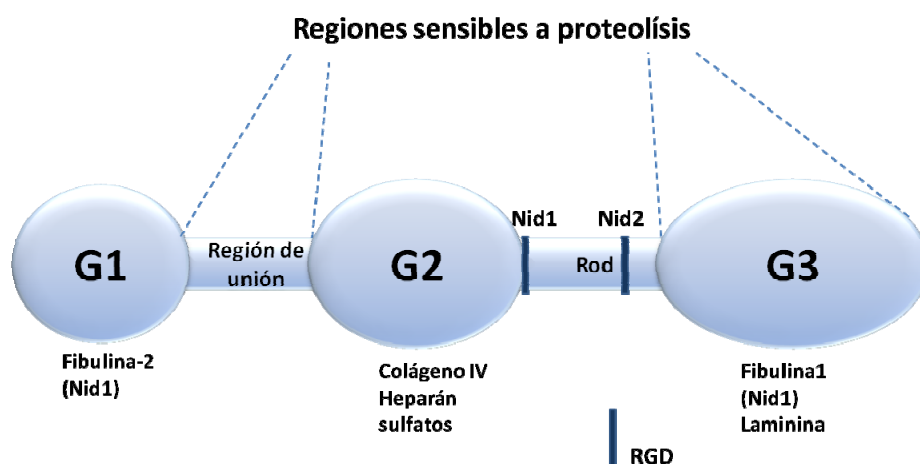


Figura 9 Representación esquemática de la estructura de los nidógenos con los tres dominios globulares, la región de unión y el dominio rod. Se detallan las regiones más sensibles a proteólisis y los puntos de interacción con otras proteínas de interés. Se señalan los dominios RGD específicos del Nid1 y del Nid2.

4.2 PROTEOLISIS DE LOS NIDÓGENOS

Estas moléculas aparecen ampliamente proteolizadas en vivo en tejido sano, indicando su alta sensibilidad al corte y la posible necesidad del corte para realizar su función de manera correcta. Se han determinado varias proteasas de diferentes familias que intervienen en el procesamiento de nidógenos: serinproteasas, varias metaloproteasas y el corte más recientemente descrito producido por ADAMTS1.

La primera publicación que trata de elucidar los responsables del corte proteolítico de Nid1 realiza varias reacciones *in vitro* con diferentes familias de proteasas. El estudio comprende varias serinproteasas (trombina, plasmina, calicreina, tripsina y elastasa de leucocitos) en el que todas ellas son capaces de proteolizar Nid1, pero la elastasa de leucocitos lo hace de manera

más eficiente. Del mismo modo realizan la digestión con varias metaloproteasas. Entre ellas, MMP3 y MMP7 proteolizan Nid1 entre el dominio G1 y G2, teniendo un segundo lugar de corte dentro del dominio G3 produciendo múltiples fragmentos. Sin embargo, MMP1 y MMP2 son incapaces de proteolizar Nid1 (Mayer et al., 1993). Estos resultados demuestran que no todas las proteasas son capaces de digerir Nid1, aunque varios miembros de cada familia sean capaces de realizarlo.

En un trabajo en el que se profundiza sobre la funcionalidad de la proteasa MMP3 en la regresión del tejido mamario tras la lactancia detectan un claro proceso proteolítico sobre Nid1. Generan el ratón sobreexpresor de MMP3, el sobreexpresor de TIMP1 y el doble MMP3-TIMP1. TIMP1 inhibe la acción proteolítica de MMP3. En este modelo describen cómo la inhibición de MMP3 bloquea el corte de Nid1 en el tejido epitelial y reduce la apoptosis de células epiteliales mamarias (Alexander et al., 1996). Poniendo en evidencia que el corte de MMP3 sobre Nid1, de algún modo, es necesario para llevar a cabo la apoptosis de células epiteliales. Estos resultados sugirieron que el estado proteolítico de Nid1 va a ser el responsable de la apoptosis de las células epiteliales mamarias.

Otra proteasa, MMP19, proteoliza Nid1 cerca del dominio G3 generando un fragmento mayor compuesto por los dominios G1-G2 y otro menor que correspondería al G3. Para elucidar los sustratos de la proteasa se realizaron técnicas proteómicas que señalaron a Nid1 como la proteína diana de MMP19 (Titz et al., 2004). Esta observación demuestra que el procesamiento excesivo producido sobre Nid1 inhibe la formación de estructuras mostrando la importancia del estado proteolítico del nidógeno para realizar su función estructural en la BM.

En ambos casos se demuestra la importancia de los procesos de proteólisis para la correcta función de los nidógenos. En el primer caso el corte es necesario para que la apoptosis suceda y en el segundo el exceso en el corte de Nid1 va a impedir la formación de estructuras vasculares.

El Nid1 ha sido mucho más estudiado que el Nid2 por lo que aún se desconocen las proteasas que digieren a este último, con excepción del producido por ADAMTS1. No obstante, existen evidencias de que sufre proteólisis al igual que el Nid1 ya que se ha determinado cómo aparece proteolizado en varios tejidos en condiciones basales (corazón, pulmón, músculo y riñón) siguiendo la línea de las observaciones para Nid1 (Murshed et al., 2000).

ADAMTS1 es capaz de proteolizar tanto Nid1 como Nid2 de manera igualmente efectiva. El procesamiento de ADAMTS1 sobre los nidógenos se produce entre los dominios G1 y G2. Este corte originará fragmentos de diferente peso molecular. En el caso de Nid1, en el que la proteína intacta es de 150kDa, da lugar a dos fragmentos mayoritarios de 110 kDa y 40 kDa. El procesamiento generado sobre Nid1 es similar a uno de los cortes que se detecta en presencia de MMP3 y MMP7, pero es completamente diferente al observado en presencia de la MMP19. Para el Nid2 de 200 kDa la proteólisis libera un fragmento de 160 kDa y otro de 40 kDa correspondiente al dominio G1 (Canals et al., 2006). Se desarrollará más sobre el efecto y función del corte de ADAMTS1 sobre los nidógenos en los resultados.

Estos trabajos sugieren que el corte de las proteasas sobre los nidógenos modifica su estructura y cambian las propiedades de adhesión de los nidógenos, con la consiguiente modificación en su función.

4.3 FUNCIÓN DE LOS NIDÓGENOS

Los Nidógenos son componentes de la BM generados mayoritariamente por células mesenquimales, mientras las células epiteliales van a formar la laminina que interacciona con los nidógenos. Por tanto la formación de la BM epitelial va a permitir la interacción entre estos dos tipos celulares con diferente origen ontogénico dando lugar a una fuerte unión epitelio-mesenquima. Además, los nidógenos forman también la BM vascular en la que tanto las ECs como los PCs de origen mesenquimal colaborarán en la síntesis de los componentes de la BM. Su función estructural es la de ensamblar las dos redes de colágeno IV y laminina formadas individualmente mediante autopólimerización. Los nidógenos junto con perlecano, fibulina y otros componentes minoritarios median la unificación y estabilización de ambas monocapas (Ho et al., 2008).

Generalmente los nidógenos aparecen fusionados a laminina en condiciones normales, dificultando la detección de funciones de señalización específicas de nidógeno. Además, se ha detectado cómo los complejos laminina-nidógeno incrementan la actividad de señalización de laminina en células epiteliales mamarias de ratón. Así que la unión de nidógeno a laminina puede modular la actividad de laminina. Nid1 regula la expresión mediada por laminina 1 de genes epiteliales mamarios (Pujuguet et al., 2000).

La ausencia de uno de los nidógenos no es suficiente para observar trastornos en la formación de la BM de los ratones deficientes. Sin embargo, el animal doble ko para ambos *nidógenos* muere perinatalmente indicando que ambos componentes tienen efecto redundante y que pueden sufrir compensación en ausencia del otro pero que su presencia es necesaria para el correcto desarrollo de las BM. El Nid2 es capaz de compensar a Nid1 en su ausencia pero en el caso del *nid2* ko no se observa compensación por parte de Nid1 (Miosge et al., 2002; Murshed et al., 2000; Schymeinsky et al., 2002). Sin embargo, el animal *nid1* ko presenta problemas en el desarrollo neuronal (Dong et al., 2002) y también existen indicios de retraso en la curación de la herida (Baranowsky et al., 2009). Además, la capacidad de las ECs de formar estructuras reticulares en matrigel se inhibe por la proteólisis excesiva de Nid1. Estos resultados parecen indicar la importancia del Nid1 en la formación de estas estructuras (Titz et al., 2004). Por tanto, estos resultados sugieren que Nid1 tiene una función en el desarrollo neuronal, en la curación de la herida y en la angiogénesis.

Recientemente se ha descrito la interacción entre TEM-7 (Marcador de endotelio tumoral-7, *Tumor endothelial marker-7*) y Nid1. TEM-7 aparece anormalmente sobreexpresado en endotelio tumoral, se ha visto como células transfectadas con TEM-7 y sembradas sobre Nid1 se adhieren de manera extensiva en comparación con las controles (Ho et al., 2008). Indicando que Nid1 podría ser importante en la angiogénesis patológica a través de la interacción con otras moléculas.

Todo parece indicar que los nidógenos no son simples proteínas estructurales sino que pueden tener funciones de señalización a través de laminina, TEM-7 y otras potenciales moléculas aún por determinar. Además los fragmentos generados por proteólisis de los nidógenos pueden tener funciones diferentes que la proteína completa.

4.4 NIDÓGENOS Y ANGIOGÉNESIS

Varios trabajos relacionan los nidógenos con procesos angiogénicos, aunque generalmente las publicaciones existentes se limitan al estudio de Nid1 en la formación de tubos que mimetizan los procesos vasculogénicos *in vitro* sobre matrices de diferentes composiciones.

Mediante el ensayo *ex vivo* del anillo de aorta en rata, se determinó cómo los complejos formados por la interacción laminina-Nid1 podían modular la formación de brotes a partir del anillo. Concentraciones elevadas del complejo inhibían la formación de estructuras, mientras que bajas concentraciones del complejo incrementaban la formación de las mismas. El enriquecimiento de la matriz con Nid1 produce un ligero aumento no significativo en el número de estructuras, pero sí se observa una elongación significativa de los brotes. Diferentes fragmentos de laminina se usaron para complementar la matriz pero ninguno de ellos mostró un efecto notable. El análisis más detallado de la BM formada en los brotes fuertemente enriquecidos con el complejo, muestra que las BM son más gruesas y estables mientras los controles están más expuestos a reorganización (Nicosia et al., 1994). Se demuestra así cómo elevadas cantidades del complejo laminina-nidógeno incrementan la maduración y estabilidad de los vasos impidiendo el crecimiento de brotes, sin embargo, bajas cantidades de las proteínas de la BM potencian la formación de vasos. Por su lado el nidógeno incrementa la longitud de los brotes que se generan a partir del anillo sugiriendo su papel activador de la angiogénesis.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, MMP19 realiza un corte sobre Nid1. Se observa cómo el efecto proteolítico de MMP19 sobre Nid1 inhibe la formación de estructuras vasculares sobre matrigel. Determinan como el corte observado se produce entre los dominios G1-G2 y el G3. Además fueron capaces de inhibir estas modificaciones mediadas por MMP19 al usar un anticuerpo que bloqueaba el dominio G3 de Nid1, indicando que el fragmento G3 originado por proteólisis es el causante del efecto antiangiogénico (Titz et al., 2004). Por tanto, el procesamiento del Nid1 va a ser clave en la formación de pseudo-vasos en matrigel y los fragmentos generados por proteólisis pueden tener un papel clave en la angiogénesis

Otros autores, mediante cultivo tridimensional de ECs embebidas en la matriz de colágeno I, observan la formación de estructuras tubulares y determinan una localización reducida de las proteínas de la BM en torno a los tubos. Sin embargo, modifican el ensayo mediante la adición de PC al cultivo con intención de generar estructuras más cercanas a las que se originan durante la angiogénesis *in vivo*. Por tanto, se utiliza un co-cultivo tridimensional de ECs y PCs, que formarán estructuras similares a las de las ECs solas, pero para las que se detallan diferencias con respecto al cultivo de ECs solas. Mediante la realización de una comparativa a diferentes tiempos para las ECs solas o la combinación con PCs se detectan los diferentes componentes de la BM. Se observa más proteínas de la BM rodeando las estructuras tubulares en el co-cultivo, sugiriendo que los PCs son necesarios para la formación correcta de la BM y la apropiada localización de los nidógenos. Además se muestra que las estructuras formadas por el co-cultivo son más estrechas y alargadas en comparación con el cultivo de ECs, indicando que su formación se asemeja más a los vasos formados en un sistema *in vivo* (Stratman et al., 2009). De manera muy interesante, en la detección de la proteína en las BM de las estructuras tubulares se detecta una proporción muy importante de la proteína en su estado procesado, dando a entender que el corte de los nidógenos va a ser importante para su correcta localización y posible función señalizadora en el ensayo de tubulogénesis.

En otro ensayo se realizó la extracción de EC a partir de retinas frescas de los animales wt y Dll4^{+/-} siendo un modelo enriquecido para células de la punta. Mediante un análisis de expresión génica detectan varios genes sobreexpresados en el animal mutante como son ADAMTS1, Nid1 y Nid2. Mediante hibridación *in situ* se localizó la expresión de Nid1 en las células de la punta siendo la expresión de Nid2 más extensa, observando hibridación en células del tallo. Además la localización de los nidógenos en la vasculatura creciente ocurre muy temprano en el desarrollo localizándose las células del frente invasivo (del Toro et al., 2010). En este ensayo nuevamente se aportan indicios de que los nidógenos son importantes para la angiogénesis, más concretamente en este ensayo para la formación del plexo vascular en la retina. Además en otro trabajo aportan indicios de que los nidógenos se encuentran proteolizados en la retina (Kunze et al., 2010), sugiriendo también que su proteólisis será necesaria para la correcta localización de los nidógenos en la BM.

Parece clara la implicación y la importancia de los nidógenos para la correcta formación de estructuras vasculares. Además uno de los puntos recurrentes en muchos de los trabajos mostrados es el estado proteolítico de estas proteínas para que realicen su función de manera óptima. Se desarrollará este punto en los resultados obtenidos en el estudio de ADAMTS1.

4.5 NIDÓGENOS Y CÁNCER

No hay muchos trabajos que realicen una caracterización exhaustiva de los niveles de expresión, proteólisis y localización de los nidógenos en las BM en diferentes modelos tumorales. Sin embargo, existen varias publicaciones que resaltan incrementos o disminuciones en los niveles de expresión de los nidógenos. Todos los estudios nombrados a continuación han sido realizados en tumores de diferente origen con posibles diferencias en su regulación, explicando así los resultados dispares detallados en este punto.

En el análisis de líneas celulares humanas de carcinomas renales y en adenocarcinomas pancreáticos y en experimentos con xenógrafos observan una sobre regulación de la expresión de Nid1 (Oivula et al., 1999). Es una observación muy limitada ya que la realizan en un número muy pequeño de líneas celulares y no analizan muestras de pacientes.

En un nuevo ensayo, se analizan muestras de sangre humanas de 100 pacientes sanas y 100 con carcinoma de ovario, se determina que Nid2 es un marcador en suero de cáncer de ovario (Kuk et al., 2010). En una publicación reciente en la que usan un procedimiento experimental similar, analizan suero de 165 pacientes con concarcinoma hepatocelular. Los resultados revelan una disminución en los niveles de Nid2 en suero y que se corrobora con los niveles de expresión reducidos de Nid2 en el tejido tumoral (Cheng et al., 2012). Los resultados obtenidos en carcinoma hepatocelular van en la dirección contraria a las observaciones obtenidas para cáncer de ovario, dando la posibilidad de que la variabilidad sea debida a las diferencias en el tipo de tumor estudiado.

Por otro lado, en dos modelos murinos de carcinoma hepatocelular, la expresión de Nid1 se ve incrementada (Lai et al., 2011). Esta observación está realizada para dos modelos de ratón del mismo tipo tumoral que el estudio en humanos mencionado anteriormente. En el caso anterior encuentran que la expresión de Nid2 está reducida en suero y en el tumor y en el estudio con animales determinan un incremento en la expresión de Nid1 en los modelos animales de este

tipo tumoral. Estas observaciones añaden aún mayor complejidad sobre la función que Nid1 y Nid2 pueden desempeñar durante el desarrollo de tumores y en concreto del carcinoma hepatocelular.

En los últimos años también se ha descrito la interacción de Nid1 con el TEM7 que es una proteína transmembranal altamente expresada en ECs tumorales (Lee et al., 2006). Lo que indicaría que Nid1 tiene un papel relevante en la formación de la angiogénesis tumoral mediante la interacción con esta proteína de endotelio tumoral. Apoyando esta interacción existe una publicación en la que caracterizan el endotelio de cáncer colorectal en comparación con el endotelio sano. Encuentran Nid1 y TEM7 sobreexpresadas en el endotelio tumoral del cáncer colorectal en comparación con el sano (St Croix et al., 2000).

En dos trabajos independientes muestran la observación opuesta a lo expuesto arriba, describen una disminución en la expresión de Nid1 o Nid2 en el tejido tumoral en comparación con el control. Tanto el gen de *nid1* como el de *nid2* aparecen metilados de manera aberrante en carcinoma de colon y en carcinoma gastrointestinal en humanos, siendo mucho mayor la metilación en los tumores en comparación con el tejido control. Esto será reflejado en una expresión muy baja de dichos genes en ambos tipos tumorales lo que podría afectar a la formación de una BM más permeable a la migración de células tumorales al torrente sanguíneo (Ulazzi et al., 2007). Por otro lado muestran que el gen de *nid1* es un posible locus para el comienzo de melanoma en humanos, ya que se determinan SNPs (Polimorfismo de un único nucleótido, *Single Nucleotide Polymorphisms*) dentro del gen de *nid1* que se relacionan con el riesgo de padecer melanoma. Los niveles de expresión de Nid1 en melanomas primarios se ven reducidos con respecto a la expresión en piel normal (Nan et al., 2011).

Por otro lado, otro artículo describe cómo en las células tumorales altamente metastásicas de un modelo murino de melanoma son las que presentan niveles importantes de Nid1 (Valente et al., 1996). Esta observación va en sentido opuesto a la reducción en la expresión de Nid1 en el desarrollo de melanomas observado en el trabajo anterior, aunque las observaciones se han realizado en el primer caso en humano y en el segundo en modelo murino no eran de esperar unos resultados tan opuestos.

Los últimos hallazgos sobre Nidógenos los han aportado mediante el uso del animal deficiente para Nid1 o Nid2 encontrando que la ausencia de Nid2 pero no la de Nid1 resulta en un incremento en la metástasis a pulmón (Mokkapati et al., 2012). Indica que Nid2 es una molécula protectora de metástasis yendo en línea con los últimos trabajos tratados en los que los niveles de expresión de Nid1 o Nid2 se ven reducidos en el tumor con respecto al tejido control.

Hasta ahora, las observaciones obtenidas en estos trabajos son parciales y en muchos casos contradictorias. Parece que un análisis exhaustivo de la localización de las proteínas, su estado proteolítico y su expresión pueden ayudar a arrojar más luz sobre el verdadero efecto global de estas proteínas en cáncer.

5 IGFBPs

Los IGFBPs son proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a insulina, IGFs. Existen 6 miembros de esta familia, nombrados del IGFBP1 al IGFBP6 y todos ellos poseen entre 216-289 aminoácidos lo que se traduce en pesos moleculares cercanos a 30-40 kDa. Los IGFBPs están formadas por tres dominios principales que son el N-terminal y el C-terminal, muy conservados entre los diferentes miembros de la familia, y el central que difiere entre cada IGFBPs siendo el dominio que les otorga las propiedades específicas a cada uno de ellos. El extremo C-terminal presenta motivos RGD que permitirán su interacción con integrinas y proteoglicanos. Las interacciones de los fragmentos C-terminal y N-terminal con integrinas, heparina y proteoglicanos han sido demostradas mediante reacciones *in vitro*. Las regiones específicas de interacción de los IGFBPs con los IGFs se encuentran en los dominios N-terminal y C-terminal, por tanto, modificaciones grandes en la conformación tridimensional de los IGFBPs producirán la liberación de los IGFs.

Nuevas evidencias comienzan a aparecer sobre la posible función señalizadora de las proteínas de unión aunque su acción más establecida y demostrada es la de regular la biodisponibilidad de los IGFs al IGF1R. Para que los IGFs tengan una función de señalización tienen que liberarse de su unión con las IGFBPs. Los IGFs, junto con insulina, tienen un importante papel en el crecimiento. Pueden actuar como factores de crecimiento pero a su vez como hormonas, que regulan el crecimiento y el metabolismo en el organismo. IGF1 e IGF2 son producidas en el hígado y segregadas a sangre, sin embargo, en tejido neoplásico están altamente expresadas por lo que estos factores de crecimiento colaboran con el tumor de manera autocrina, paracrina y endocrina. El gen del *igf1* está silenciado en estado adulto, pero en varios tipos tumorales su expresión se incrementa ayudando al crecimiento del tejido tumoral. Los IGFs realizan su función de señalización mediante interacción con los receptores de membrana IGF1R (Pollak, 2008).

Los receptores de los factores de crecimiento parecidos a insulina IGF1R (*Insuline-like Growth Factor Receptor*) están expresados en la mayoría de tejidos sanos. Los dos tipos de receptores, IGF1R e IGF2R, tienen estructuras tetraméricas la parte extracelular está formada por la cadena α , es la que interacciona con los factores de crecimiento, y la β , es la que activa la cascada de señalización. El IGF2R une el IGFs pero no tiene capacidad de señalización, lo secuestra y bloquea su actividad impidiendo su unión al IGF1R. El IGF1R es el receptor que lleva a cabo la señalización intracelular pero competirá en su unión por el ligando con el IGF2R. Se ha observado también un incremento en la expresión del IGF1R en procesos neoplásicos lo que ayudará a que el incremento del factor de crecimiento tenga efecto protumoral (Pollak, 2008).

La función de los IGFBPs es la de unión a los IGFs para ejercer de transportadores de los factores de crecimiento. Además, los IGFBPs prolongan la vida del factor de crecimiento mediante su unión directa. Del mismo modo, cuando se forma el complejo IGFBPs-IGFs los IGFs no pueden interaccionar con el receptor y la señalización se bloquea. Sin embargo, los IGFBPs tienen lugares sensibles a proteólisis. Mediante la proteólisis, la interacción de los IGFBPs con IGFs se ve alterada, reduciendo su posibilidad de adhesión y liberando los IGFs que podrán llevar a cabo su función de señalización a través del IGF1R (Figura 11). Por tanto, los IGFBPs mediante su unión a los IGFs modulan su actividad. Se han localizado por secuenciación los sitios de corte sobre

IGFBP3, IGFBP4 e IGFBP5 dando como resultado aminoácidos en la región central de los IGFBPs, indicando que es la más sensible a proteólisis (Firth and Baxter, 2002).

Las IGFBPs no sólo cumplen una función fisiológica, regulando la disponibilidad del factor de crecimiento a sus receptores. Algunas de estas moléculas tienen importancia en el desarrollo tumoral ya que son sobreexpresadas por el tejido neoplásico. También se han descrito funciones de señalización de los IGFBPs independientes de IGFs. Algunos miembros de la familia poseen regiones RGD o zonas de interacción con heparina que hacen posible su unión a integrinas o proteoglicanos teniendo un efecto directo sobre la localización de la molécula y sobre la señalización celular (Figura 11) (Firth and Baxter, 2002).

Se desarrollará más extensamente la estructura y capacidad de unión del IGFBP2 en el siguiente apartado ya que será una de las proteínas clave de los resultados presentados.

5.1 ESTRUCTURA Y CAPACIDAD DE UNIÓN DEL IGFBP2

El precursor del IGFBP2 está formado por 328 aminoácidos, de los que 40 aminoácidos corresponden al péptido señal, lo que le otorga un peso molecular de 36 kDa a la proteína madura. El IGFBP2 no sufre glicosilación y posee mayor afinidad por IGFII que por IGF1. La región C-terminal tiene un lugar RGD de interacción con integrinas o glicosaminoglicanos. Éste lugar RGD interacciona con las integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ permitiendo llevar a cabo la señalización celular dependiente de su unión a IGFII. Además los dominios RGD son capaces de interactuar con proteoglicanos. Se ha localizado también un lugar de unión con heparina en el dominio C-terminal que podría ser importante en el anclaje del IGFBP2 a la ECM (Fukushima and Kataoka, 2007).

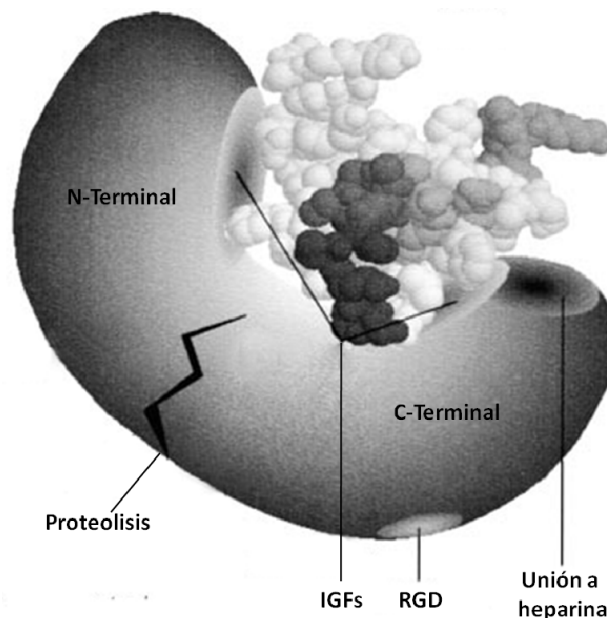


Figura 10 Estructura del IGFBP2 en la que se representan los dominios C- y N-terminales y los sitios de interacción con IGFs, el lugar donde sufre proteólisis y las regiones RGD y de interacción con heparina. Modificado de (Firth and Baxter, 2002).

Se sabe que estas proteínas de unión sufren proteólisis modificando su capacidad de unión a IGFs, se detallan a continuación los procesos proteolíticos descritos hasta el momento para IGFBP2.

5.2 PROTEOLISIS DEL IGFBP2

El IGFBP2 sufre proteólisis en su dominio central, es posible detectar de manera basal la proteína cortada en suero, leche y fluido cerebroespinal. Varias serinproteasas (trombina, catepsina, elastasa y calicreina) y metaloproteasas (MMP7 y MMP9) son capaces de proteolizar el IGFBP2 en su región central. Se sabe que la forma cortada tiene menor afinidad por el factor de crecimiento que la proteína completa por lo que la proteólisis del IGFBP2 media la liberación del IGFII y fosforilación del receptor.

Por ejemplo, se sabe que MMP7 es capaz de proteolizar IGFBP2 liberando el IGFII que fosforila el receptor estimulando el crecimiento celular (Miyamoto et al., 2007).

Por otro lado, MMP9 interactúa con el complejo formado por IGFII-IGFBP2 mediante el corte del IGFBP2 liberando el factor de crecimiento que promueve la proliferación y la movilidad celular en astrocitomas. En este trabajo no se detectó corte por parte de otras MMPs, revelando cierta especificidad en el corte producido por MMP9 sobre el complejo (Rorive et al., 2008)

Por tanto la proteólisis sobre IGFBP2 tendrá un efecto potenciador de las señales de proliferación y migración (Figura 11).

5.3 FUNCIÓN DEL IGFBP2

Además de las funciones ya descritas comunes a todos los IGFBPs existen otras observaciones para el IGFBP2. Hay evidencias de que el IGFBP2 puede incrementar la actividad del IGFII aunque no queda claro el mecanismo de acción, se sugiere que gracias a la capacidad de anclaje del IGFBP2 a la superficie celular incrementan la accesibilidad de las células al IGFII (Firth and Baxter, 2002).

Además el IGFBP2 tiene capacidad de unión a heparina, existen evidencias opuestas sobre si es necesaria la unión al IGFII para poder unir heparina, ya que la unión está mediada a través del dominio de interacción con IGFII. Por lo tanto, según esta hipótesis si el IGFBP2 y el IGFII están unidos no van a poder anclarse a los proteoglicanos.

La interacción de IGFBP2 con integrinas, a través de dominios RGD, puede tener funciones opuestas tanto potenciadoras como inhibitoras de la inducción de los IGFs. Estos cambios en los efectos observados pueden ser debidos al tipo celular usado en los experimentos. Los fragmentos C-terminales de varios IGFBPs tienen actividad por sí solos, por tanto es esperable que el fragmento C-terminal del IGFBP2 sea activo (Figura 11) (Fukushima and Kataoka, 2007).

En algunos tumores IGFBP2 es sobreexpresado y el estroma tumoral posee un pH ácido, el dominio C-terminal tiene mayor afinidad por heparina en estas circunstancias. En el entorno tumoral se concentrarán todas las formas IGFBP2-IGFII, IGFBP2 y el C-terminal de IGFBP2. Esto hará que el IGFII se libere y realice su acción de inductor de crecimiento junto con el dominio C-terminal del IGFBP2 mediante interacción con heparina (Kuang et al., 2006).

Por último, se ha detectado IGFBP2 en el citoplasma de células tumorales, aportando evidencias de su capacidad de internalización y señalización intracelular. Parece que el IGFBP2 es transportado al citoplasma mediante endocitosis pudiendo viajar al núcleo para colaborar en la transcripción o permanecer en el citoplasma potenciando las señales del IGFII a través del IGF1R (Figura 11) (Fukushima and Kataoka, 2007).

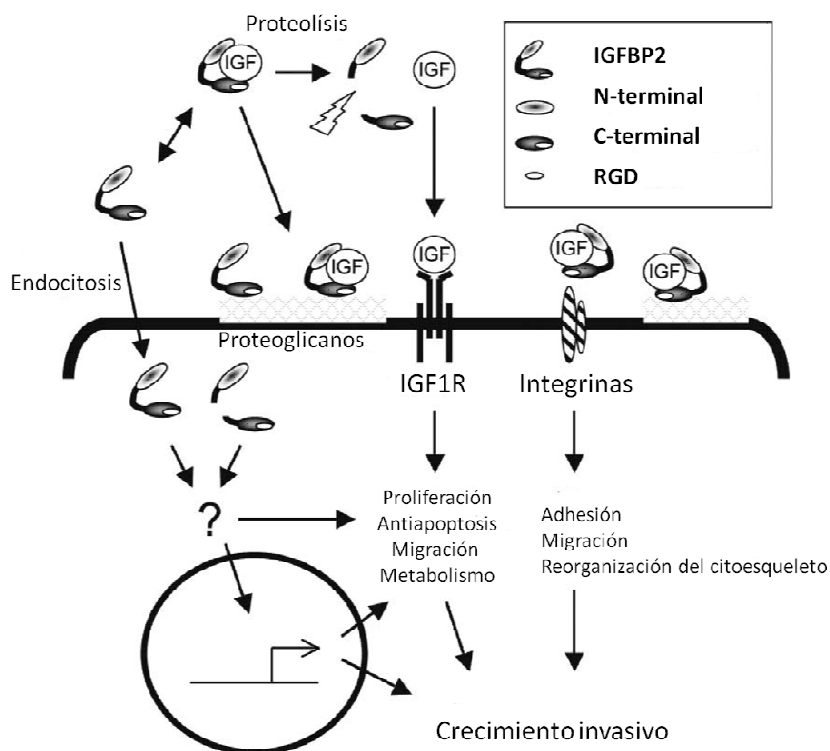


Figura 11 Representación esquemática de la vía de acción del IGFBP2. En su localización extracelular el IGFII se une al IGFBP2 hasta que es liberado por proteólisis. El IGFII libre interacciona con el IGF1R. La capacidad de unión del IGFBP2 a integrinas, proteoglicanos y heparina media la señalización intracelular. Además el IGFBP2 puede ser transportado al citoplasma por endocitosis pudiendo colaborar en la transcripción o ayudando en la señalización del IGF1R. Modificado de (Fukushima and Kataoka, 2007).

5.4 IMPLICACIONES EN CÁNCER DEL IGFBP2

Se ha demostrado que la expresión de IGFBP2 es un factor pronóstico en pacientes con los siguientes tipos tumorales: colon, adrenal, mama, ovario, próstata, sistema nervioso central, leucemia, hepatoblastoma y tiroides. Es decir, se demuestra una correlación positiva entre el incremento en la expresión del IGFBP2 y la malignidad tumoral. Sin embargo, no es un factor predictivo del riesgo de padecer cáncer (Hoeflich et al., 2001). En el tumor los IGFs estarán sobreexpresados en el tejido tumoral junto con IGFBP2 y elevados niveles del IGF1R (Firth and Baxter, 2002).

Dado que existe una sobreexpresión de IGFBP2 en el tumor y que la interacción IGFBP2 con IGFII reduce la señalización y el crecimiento tumoral, es lógico pensar que otras funciones están actuando en el tumor para que la sobreexpresión de IGFBP2 potencie el crecimiento tumoral. Por ejemplo, la asociación del IGFBP2 en la superficie celular a través de RGD o heparina puede regular la señalización intracelular. Además se cree que el incremento en la proteólisis del IGFBP2 localizado en la superficie celular en tumores potenciará la señalización del IGFII en el tumor (Pollak, 2008). Por otro lado, el transporte citoplásmico del IGFBP2 e incluso intranuclear

puede regular la transcripción de factores de crecimiento tumorales. Aunque aún continua sin ser elucidado el mecanismo de acción, varios trabajos reportan observaciones relacionadas con el desarrollo tumoral y el aumento en la expresión del IGFBP2 (Firth and Baxter, 2002). A continuación se realiza una descripción de estos trabajos.

Se han descrito efectos contradictorios para el IGFBP2 en tumores, tanto inhibitorios como estimuladores. Los efectos inhibidores han sido descritos para numerosas líneas celulares mediante la adición de IGFBP2 exógeno que inhibe la proliferación celular. Además la interacción del RGD del IGFBP2 con la integrina $\alpha 5\beta 1$ reduce la adhesión y proliferación de células de sarcoma. Por otro lado los efectos estimuladores de la proliferación se describen en líneas celulares de colon, adrenal y próstata que están asociadas con la mayor expresión del IGFBP2, que en glioma incrementa la migración mediante la unión con $\alpha 5$ (Hoeflich et al., 2001; Kuang et al., 2006). Parece que la acción mediada por el RGD de IGFBP2 va a ser dependiente del tipo tumoral e incluso del tejido.

Se ha descrito recientemente un efecto independiente de IGFII para IGFBP2 en adenocarcinoma pulmonar en el que se observa que la proteína de unión tiene un efecto antiapoptótico sobre las células tumorales mediado por caspasa 3 (Migita et al., 2010).

IGFBP2 ha sido más ampliamente estudiado en GBM dónde numerosas publicaciones muestran una elevada expresión de esta proteína en tumores. Además es muy abundante la concentración de IGFBP2 en fluido cerebroespinal de los pacientes que sufren este tumor altamente agresivo (Fukushima and Kataoka, 2007).

La sobreexpresión de IGFBP2 en células de GBM hace aumentar la movilidad y la invasión a través de la inducción en la expresión de MMP2. En línea con estos resultados, la inhibición de la expresión de IGFBP2 en líneas celulares de GBM reduce la movilidad y la invasión de las mismas. (Fukushima and Kataoka, 2007). Con estos resultados queda claro que IGFBP2 tiene un efecto en la migración de células de GBM, aunque continua sin ser elucidado el mecanismo concreto de acción. No obstante, parece que puede estar mediado en parte por la interacción de IGFBP2 con integrinas.

Se ha determinado cómo el incremento en la angiogénesis en GBM hace aumentar la expresión de IGFBP2 acompañado por la expresión de VEGF, sin embargo no ocurre así en tumores menos agresivos del sistema nervioso central (Hoeflich et al., 2001). Varios genes relacionados con angiogénesis son válidos para discernir los tumores primarios de los secundarios, es decir los más agresivos. En este trabajo encuentran el IGFBP2 relacionado con la angiogénesis y colocalizado con el VEGF en los tumores más agresivos (Godard et al., 2003).

Se ha descrito cómo el IGFBP2 en el fluido cerebroespinal aparece proteolizado, siendo determinante para la liberación del factor de crecimiento activando la migración y la proliferación en astrocitomas y células de cáncer de colon (Miyamoto et al., 2007; Rorive et al., 2008). Estos resultados implican que no sólo la señalización del IGFBP2 será relevante en los tumores, sino que la proteólisis del IGFBP2 va a ser importante para la señalización del IGFII y migración celular. Además todavía continúa sin ser descrito un papel funcional de los fragmentos generados por proteólisis de IGFBP2, que pueden tener importancia en cáncer.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los tejidos biológicos, ante determinadas necesidades, tienen que sufrir remodelación de su entramado extracelular para permitir la movilidad celular y poder responder de manera adecuada. Por ejemplo, ante hipoxia las señales proangiogénicas movilizarán las células endoteliales y permitirán su proliferación y por tanto la formación de nuevos vasos. Las proteasas extracelulares son responsables de permitir dicha remodelación y, además, activan otras proteasas y pueden modificar la función de otros componentes extracelulares, incluyendo factores de crecimiento. Estas proteasas han sido largamente estudiadas como importantes efectores post-traduccionales. Existe una gran familia de proteasas extracelulares que son las metaloproteasas, que a su vez está compuesta por varias familias como son las MMPs, las ADAMs y las ADAMTSs. Varias metaloproteasas han sido directamente relacionadas con procesos angiogénicos, desarrollo tumoral y metástasis. Nuestro interés se centra en el estudio del primer miembro de la familia de las ADAMTSs, ADAMTS1.

Desde su descubrimiento, a la proteasa ADAMTS1 se le han atribuido propiedades antiangiogénicas. Estas observaciones llevaron a investigar su posible función en el desarrollo tumoral y la metástasis. Aunque existen numerosas observaciones al respecto quedan muchos aspectos funcionales de ADAMTS1 por esclarecer, en angiogénesis y durante el desarrollo tumoral en general.

Nuestro interés se ha centrado, en primer lugar, en la determinación y en la descripción de sustratos específicos de la proteasa ADAMTS1 mediante técnicas proteómicas, y a continuación su caracterización en diferentes modelos de estudio. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que un conocimiento más amplio de sus sustratos y la determinación del papel que juegan en la angiogénesis y en cáncer nos ayudarán en la descripción de las funciones específicas de la proteasa.

OBJETIVO GENERAL

Determinación de los sustratos de la proteasa ADAMTS1 y el estudio de la proteólisis de los mismos para su función en angiogénesis y cáncer.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Caracterización de la contribución de ADAMTS1 al mimetismo vascular.
2. Evaluación del efecto modulador de ADAMTS1 sobre la angiogénesis, dependiendo de sus niveles de expresión.
3. Descripción del efecto de la sobreexpresión de ADAMTS1 en el desarrollo vascular y el crecimiento tumoral.
4. Determinación del estado proteolítico de los nidógenos en tejido sano y en muestras tumorales, y su relación con la expresión diferencial de ADAMTS1.
5. Estudio del efecto de la proteólisis de los nidógenos en su correcta localización en la membrana basal vascular.
6. Determinación de nuevos sustratos de la proteasa ADAMTS1 mediante aproximaciones proteómicas.
7. Determinación de la implicación de ADAMTS1 y del corte del IGFBP2 en glioma.
8. Comprobación del corte del IGFBP2 por la proteasa ADAMTS1 y estudio de su alteración funcional.

RESULTADOS

Índice de Resultados

Manuscritos para publicación 61

1. Studies of Nidogen-1 and Nidogen-2 proteolysis and deposition in vascular basement membranes. Contribution of ADAMTS1 proteolytic activity during vascularization..... 63
2. Down-regulation of ADAMTS1 in human breast carcinoma and relevance of its proteolytic activity on vascular basement membrane components Nidogen-1 and Nidogen-2..... 89
3. Re-evaluation of the contribution of IGFBP2 in glioma. Relevance of its proteolysis induced by ADAMTS1 protease..... 115

Artículos Publicados..... 161

1. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's síndrome. 163
2. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. 181

Studies of Nidogen-1 and Nidogen-2 proteolysis and deposition in vascular basement membranes. Contribution of ADAMTS1 proteolytic activity during vascularization.

Estefanía Martino-Echarri^a, María del Carmen Plaza-Calonge^a, Rubén Fernández-Rodríguez^a, M. Luisa Iruela-Arispe^b, Elizabeth M.C. Fisher^c, Victor L.J. Tybulewicz^d, Louise E. Reynolds^e, Kairbaan M. Hodivala-Dilke^e, and Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque^a

^aGENYO (Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research), Granada, Spain.

^bDepartment of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, CA, USA.

^cDepartment of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology, London, UK.

^dDivision of Immune Cell Biology, MRC National Institute for Medical Research, London, UK.

^eAdhesion and Angiogenesis Laboratory, Barts Institute of Cancer, Queen Mary University of London, London, UK.

*Address correspondence to:

Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque, GENYO, Avda. de la Ilustración, 114, Granada 18007, Spain. E-mail: juancarlos.rodriguez@genyo.es

Running Title: Cleavage of Nidogens and contribution of ADAMTS1.

Summary

Nidogens are basement membrane components known to mediate an intricate network of interactions with further components. While this basement membrane requires robust stability properties, its remodelling has to be precisely tuned to overcome phenomena as angiogenic stimuli. Basal proteolysis of nidogens has been previously observed in mouse tissues however the functional relevance of this process has not been studied. Among the responsible proteases we focused our attention on ADAMTS1. This protease has been mainly reported as an anti-angiogenic factor although further studies also suggested its role as a pro-tumorigenic molecule. In any case our research is focused in the functional interaction of ADAMTS1 with its specific substrates, nidogens in this report. Here we performed a series of experimental approaches trying to reveal such relationship. Using relevant biological tools with opposite expression levels of ADAMTS1, as the *adamts1* KO and the Tc1 mouse model, we evaluated the deposition of nidogens in vascular structures of different tissues, and we also performed *ex vivo* Aortic-Ring and *in vitro* tubulogenesis assays to disclose ADAMTS1 properties. Our results confirmed the dual modulatory capacity of ADAMTS1 during neo-vascularization events, so they provided a relevant platform to pursue deeper analyses to elucidate the relevance of proteases and their substrates for proper vascular BM formation.

Key Words: ADAMTS1, angiogenesis, basement membrane, endothelium, nidogen, vascular sprouting.

1. Introduction

Basement Membrane (BM) is a specialized extracellular matrix (ECM) mainly formed by secreted proteins from endothelial cells (ECs) and pericytes (PCs) (Stratman et al., 2009). The close interaction between these cells is required for the formation of mature and stable blood vessels. During the formation of new vascular structures from existing vessels, process known as angiogenesis, angiogenic factors stimulate quiescent ECs provoking a cascade of events including detachment of PCs, proteolysis of BM and ECM components, ECs invasion, division and migration. During this process, BM has to be properly remodeled to contribute to the organization of new vascular structures. Such remodeling is mediated by extracellular proteases which knowledge has been importantly remarked during last decade (Lopez-Otin and Overall, 2002).

Main components of BM are collagen IV, laminin, perlecan and nidogens. The contribution of nidogens appears related with their cross-linking properties (LeBleu et al., 2007). Nidogens are globular proteins with different binding capacities to further ECM molecules (Kalluri, 2003).

Both Nid1 and Nid2 are largely known to experience proteolysis (Mayer et al., 1993) and, in fact, they are found cleaved in mouse tissues (Miosge et al., 2002). Structural changes on nidogens by proteolysis may be important because binding capacity to other BM components can be altered. Several proteases have been reported as responsible for nidogens cleavage, including serine-proteases and various MMPs (Mayer et al., 1993). More recently, our own laboratory identified both Nid1 and Nid2 as substrates of ADAMTS1 using sensitive proteomic approaches (Canals et al., 2006).

The extracellular protease ADAMTS1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) was first shown to display anti-angiogenic properties (Vazquez et al., 1999) and its catalytic activity has been reported on various proteoglycans (Rodriguez-Manzaneque et al., 2009; Rodriguez-Manzaneque et al., 2002; Sandy et al., 2001), and further extracellular components (Canals et al., 2006; Esselens et al., 2010; Torres-Collado et al., 2006). Studies regarding the actions of ADAMTS1 appear controversial. In one side, its angiostatic properties have been recently updated in the Tc1 mouse model of Down's Syndrome (Reynolds et al., 2010), and also associated with a new role during tumor plasticity phenomena associated to decreased vessel density (Casal et al., 2010). In supposed contradiction various reports attribute to ADAMTS1 a relevant action for metastasis (Lu et al., 2009) and tumor growth (Ricciardelli et al., 2011; Rocks et al., 2008). Some of these contributions observe the putative role of ADAMTS1 as a modifier of the extracellular media corroborating the necessity to advance in the characterization of functional substrates.

Here we performed a series of experimental approaches in an attempt to characterize the roles of ADAMTS1 during neo-vascularization processes, and the putative contribution of its substrates Nid1 and Nid2, as main components of the vascular BM.

2. Results

2.1. Basal proteolysis of nidogens in different mouse tissues.

As introduced, the cleavage of both nidogens has been previously shown in mouse tissues (Miosge et al., 2002), although the relevance of such phenomena has not been studied. In accordance to our previous findings regarding the activity of ADAMTS1 on nidogens (Canals et al., 2006), we decided to screen this cleavage process in several tissues (muscle, heart and kidney). As a novelty we included in our studies samples from two mouse models with opposite levels of ADAMTS1: i) *adamts1* knockout mice, and ii) Tc1 mice, with an extra copy of ADAMTS1. Although both strains were generated from similar genetic backgrounds (*C57BL/6J* and *129S8* mice), some analyses had to be performed in control animals from each colony, pointed in the text and in the figures as WT (derived from *adamts1* KO strain) and WT(Tc1) (from Tc1 mice).

The analysis of ADAMTS1 expression by qRT-PCR first showed predominant levels in muscle (Fig. 1A). The expression of human ADAMTS1 was corroborated in all the tissues tested from Tc1 mice (Fig. 1B). In line with our interest in Nid1 and Nid2 we also evaluated their expression pattern (Fig. 1C-D), showing quite relevant lower levels of both molecules in kidneys.

Finally we evaluated the presence of nidogens in total protein extracts from these tissues (and lung), but no differences were observed (Suppl. Fig. 1A-B). We could confirm that cleavage of these molecules is occurring, with different degrees among tissues and more relevant to Nid2, but it appears independent of ADAMTS1 presence, at least at this level.

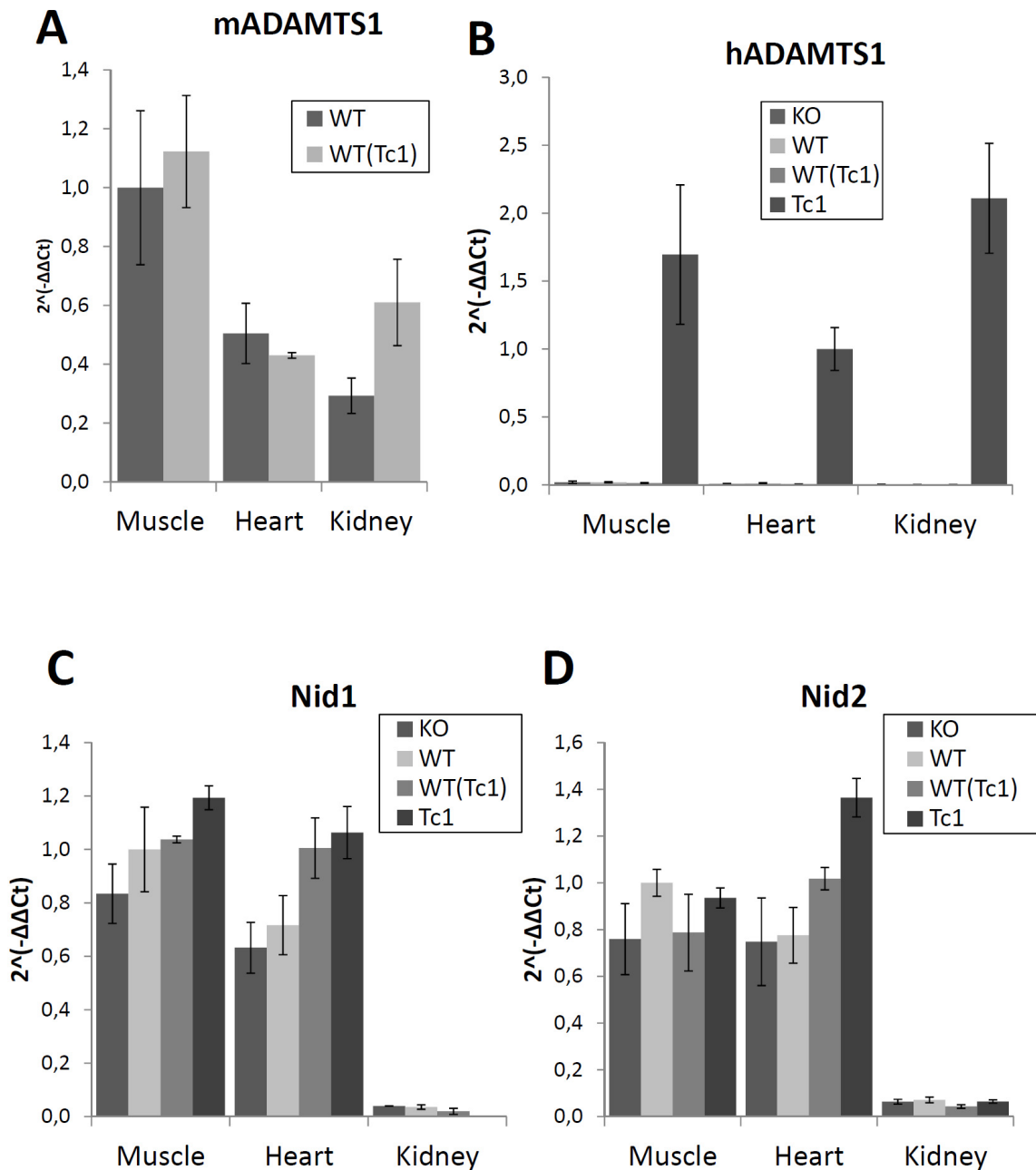


Figure 1 Quantitative RT-PCR for expression of genes of interest in muscle, heart and kidney of three animals for genotype. **(A)** Expression levels of mouse ADAMTS1 in WT and WT(Tc1) mice tissues. **(B)** Expression levels of human ADAMTS1 in *adamts1* KO, WT, WT(Tc1) and Tc1 mice tissues. **(C)** Expression levels of mouse Nid1 in *adamts1* KO, WT, WT(Tc1) and Tc1 mice tissues. **(D)** Expression levels of mouse Nid2 in *adamts1* KO, WT, WT(Tc1) and Tc1 mice tissues. Graph represents the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ value from independent ΔCt for each animal corrected to mouse actin, the SEM represents the error bar.

2.2. Alteration of Nid1 immunolocalization in blood vessels in an ADAMTS1-dependent manner.

Although our gene and protein evaluations did not show relevant differences, we decided to assess nidogens by immunoanalysis. As noticed, both nidogens are importantly expressed so their broad distribution throughout the tissue could mask a potential local effect of the protease ADAMTS1. Importantly we focused our attention to vascular structures and its associated BM. We analyzed muscle, heart and kidney sections from WT and *adams1* KO mice. By confocal analysis we approached the co-localization of Nid1 and CD31 signals, obtaining a new image with white dots that mirrors such coincidence. WT muscle and heart display very low levels of co-localization and, in both cases, the genetic deletion of ADAMTS1 was accompanied by an increased co-localization (Fig. 2A-B), in agreement with a hypothetical reduction of Nid1 proteolysis, at least at a local level. In the case of WT kidney, tissue that presents a lower expression of ADAMTS1 (Fig. 1A), we observed a higher deposition of Nid1 in vascular structures, confirmed by its co-localization with CD31 (Fig. 2C). The immuno-analysis of kidney from *adams1* KO mice did not show relevant differences. For this last tissue we had the chance to use innovative confocal software that allows the quantification of specific co-localization between several markers, providing an “Overlap Coefficient” (Fig. 2D). Unfortunately kidneys did not show relevant differences, but similar analyses of muscle and heart samples are underway.

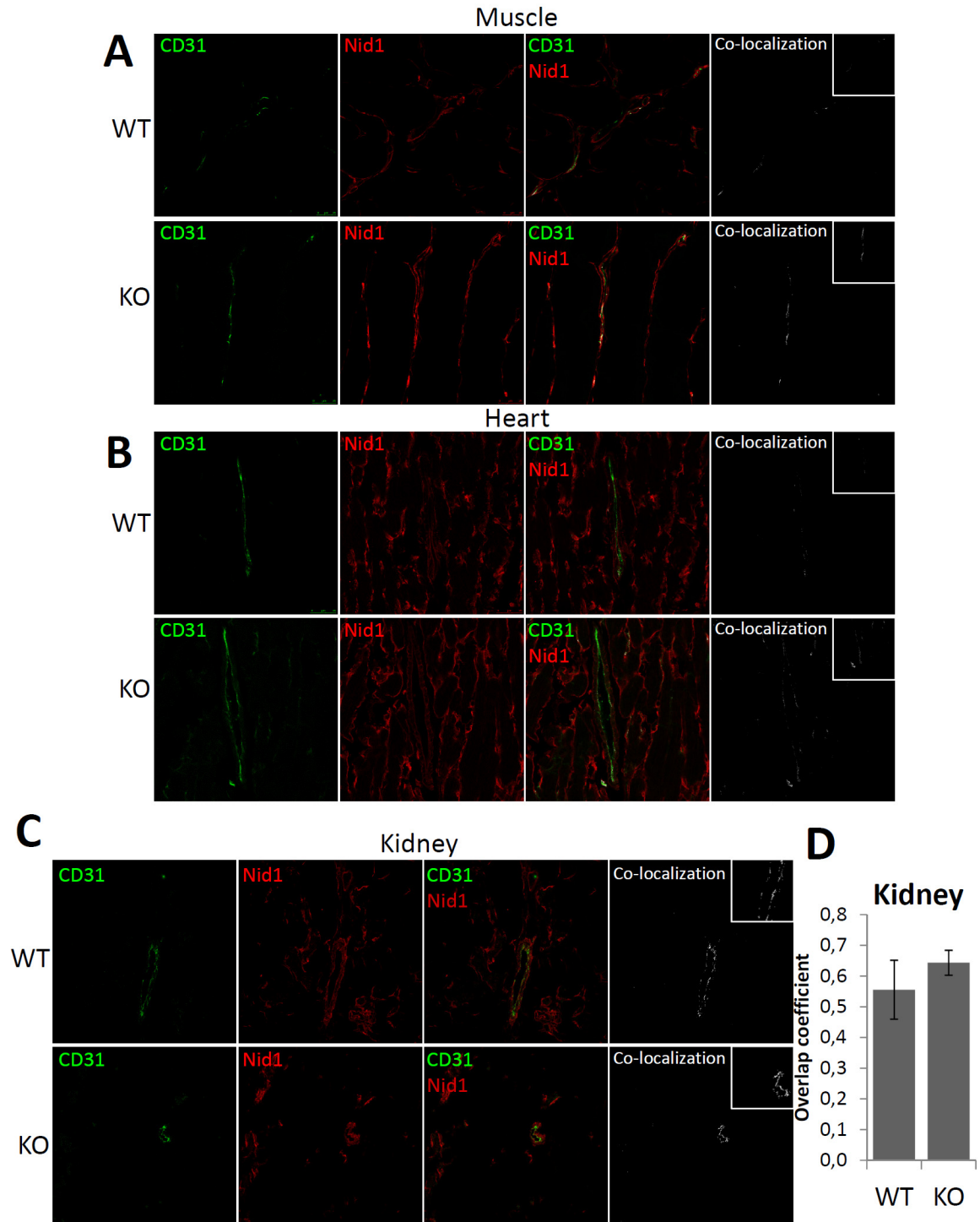


Figure 2 Immunolocalization of Nid1 on vascular BM from normal mouse tissue. **(A)** Confocal images (40x magnification) were acquired from muscle sections immunofluorescently labeled for CD31 (green) and Nid1 (red). **(B)** Confocal images (40x magnification) were acquired from heart sections immunofluorescently labeled for CD31 (green) and Nid1 (red). **(C)** Confocal images (40x magnification) were acquired from kidney sections immunofluorescently labeled for CD31 (green) and Nid1 (red). **(A-C)** Co-localization study was obtained by ImageJ software processing. White dots represent the co-localization of both CD31 and Nid1 signals. **(D)** Overlapping coefficient for Nid1 and CD31 signals in kidney sections was obtained by confocal software analysis tool. Analysis was performed for more than 5 pictures from different mouse groups, finding no significant differences on co-localization ($p=0,163$).

2.3. Analysis of the vasculature of retinas from WT, *adamts1* KO and Tc1 mouse models.

In line with our interest to evaluate the vasculature, we decided to focus our attention in the retina of our mouse models, as a highly vascularized tissue. A first comparison between retinas from adult WT and *adamts1* KO mice did not show any differences regarding morphology of the vasculature and deposition of nidogens (data not shown). A second trial included retinas from adult Tc1 animals. Also in this case the vasculature did not appear altered, and a closer analysis of Nid1 and Nid2 revealed their deposition surrounding vessels (Suppl. Fig. 2A-B). Giving the nature of this vascular network, mainly populated by endothelial and mural cells, we compared expression, between mouse endothelial cells and whole retina, of our genes of interest: ADAMTS1, Nid1 and Nid2. While ADAMTS1 was predominant in the retina, we found both Nid1 and Nid2 highly expressed in endothelial cells (Suppl. Fig. 2C). The expression of markers CD31 (for endothelial cells) and NG2 (for pericytes) supported the nature of this network.

Since the retina vasculature suffers a major development during early neonatal age (Stahl et al., 2010), we focused our analyses to retinas from postnatal day 5 (PN5) mice. For this approach, we were able to compare just WT and Tc1 because *adamts1* KO mice have severe difficulties to breed newborn homozygous KO, so we did not get enough animals to be evaluated. To visualize vasculature we used FITC-BS1Lectin. A first low-magnification view of the vascular plexus already showed a relevant delay in the formation of this structure in Tc1 mice retina in comparison with WT specimens (Fig. 3A). Such effect was quantified by measuring the diameter length of the vascular plexus from different retinas, resulting in a significant difference ($p=0,0063$) (Fig. 3B). In addition we looked for the deposition of Nid1 in this vascular network. We distinguished different areas in the plexus: i) the tip cells at the border, and ii) the main vessels at the central zone. We approached a co-localization study of Nid1 and BS1Lectin label, showing that in both areas, tips (Fig. 3C) and main vessels (Fig. 3D), there was an apparent reduction of co-localization in the Tc1 mice, displaying an increased patchy appearance for Nid1 staining. This alteration could be associated with a potential action of ADAMTS1, more important in the Tc1 scenario.

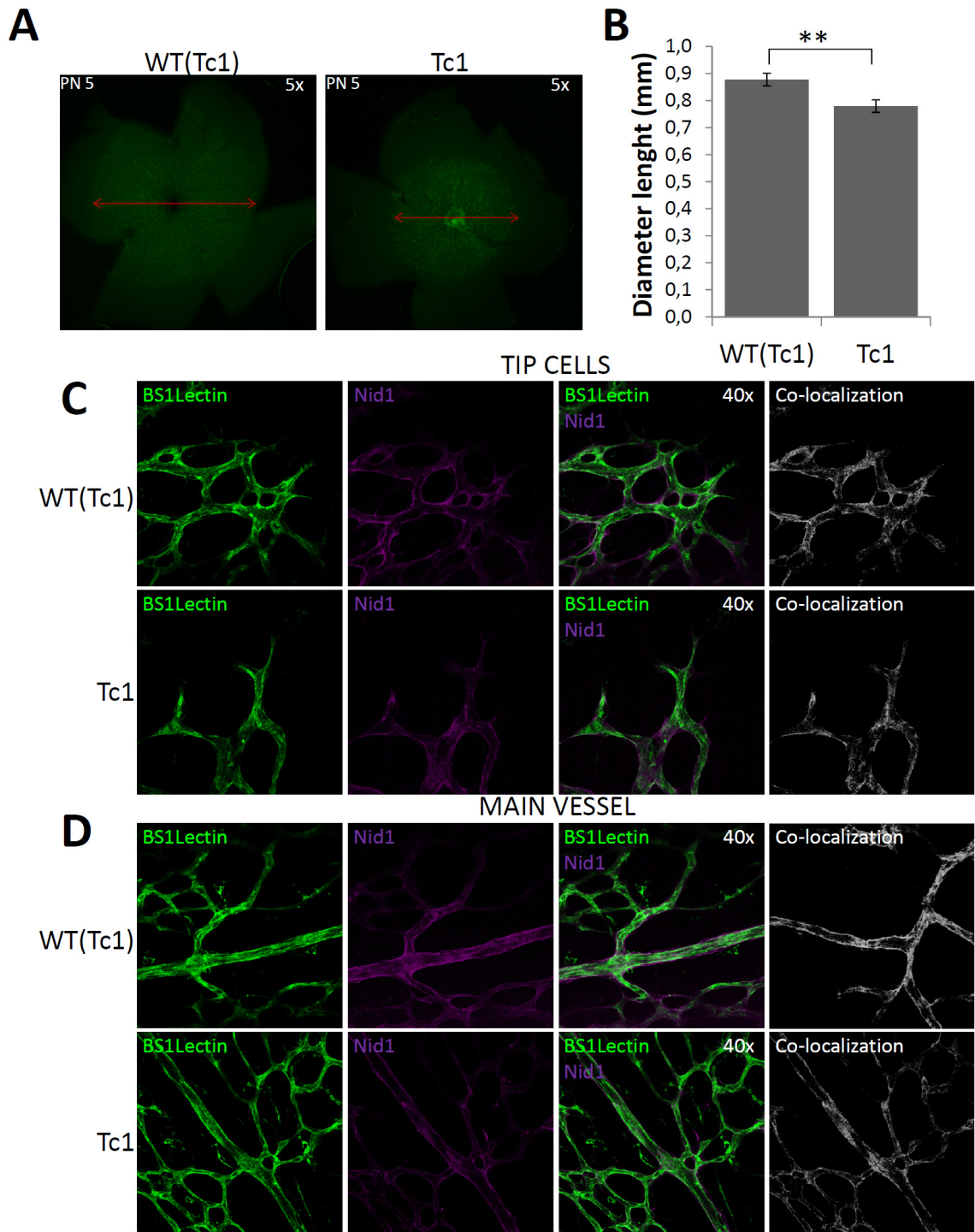


Figure 3 (A) Whole mount retinas 5 days old (PN 5) mice were stained for FITC-BS1lectin. A delay in plexus formation is observed at 5x magnification and diameter length is represented by a red arrow. (B) Quantification of diameter length (mm) of wt(Tc1) retinas (n=12) and Tc1 retinas (n=12) results in significant differences (**, $p < 0,01$) on plexus formation delay for Tc1 mice. (C) Confocal images (40x magnification) were acquired from tip cells in retinas stained for FITC-BS1Lectin (green) and Nid1 (purple). (D) Confocal images (40x magnification) were acquired from main vessel in retinas stained for FITC-BS1Lectin (green) and Nid1 (purple). Co-localization study was obtained by ImageJ software processing. White dots represent the co-localization of both FITC-BS1Lectin and Nid1 signals.

2.4. Contribution of ADAMTS1 to endothelial sprouting in the Aortic-Ring assay.

Previous results supported that ADAMTS1 plays an important role for the reduced tumor angiogenesis in the Tc1 mouse model (Reynolds et al., 2010). Using the Aortic-Ring assay, this manuscript reported the negative effects in sprouting in the presence of an extra copy of the protease (Tc1 mouse) and, in an opposite scenario, an increased sprouting in heterozygous *adamts1* KO mice, corroborating the anti-angiogenic properties of ADAMTS1. With the purpose to apply this knowledge to the relevance of nidogens proteolysis we first reproduced these significant differences ($p=0,0397$) between WT(Tc1) and Tc1 aortas (Fig. 4A). The nature of these sprouts was confirmed by co-staining with BS1Lectin (that labels endothelium) and SMA (for mural cells) (Suppl. Fig. 3).

To determine the specificity of this effect we performed ADAMTS1 overexpression, by lentiviral infection, in aortic rings from WT mice. As controls we included infections with a LacZ-lentivirus, and with an ADAMTS1-inactive mutant (Z11) previously described (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). After 8 days, images of sprouting rings were captured and properly processed for gene expression analysis. We confirmed overexpression of the human transgene by qRT-PCR (Fig. 4B). The quantification of sprouts showed a significant decrease in presence of ADAMTS1 ($p=0,019$), while the infections with the mutant inactive form provoked a minor decrease but not significant (Fig. 3C). These results confirmed the inhibitory properties of ADAMTS1 on endothelial cells, as previously reported and more recently highlighted with our own contribution studies in the Tc1 mouse model.

In addition we approached this methodology with aortas from the *adamts1* KO mice. To our surprise we observed a clear and reproducible impairment for sprouting in these set of aortas (Fig. 5). Quantification of several experiments displayed very strong and significant differences as represented in the graph ($p=9,01562E-07$). These observations suggested that ADAMTS1 expression would also be required for initiation of sprouting, confirming a role for ADAMTS1 as a maintenance factor during neo-vascularization.

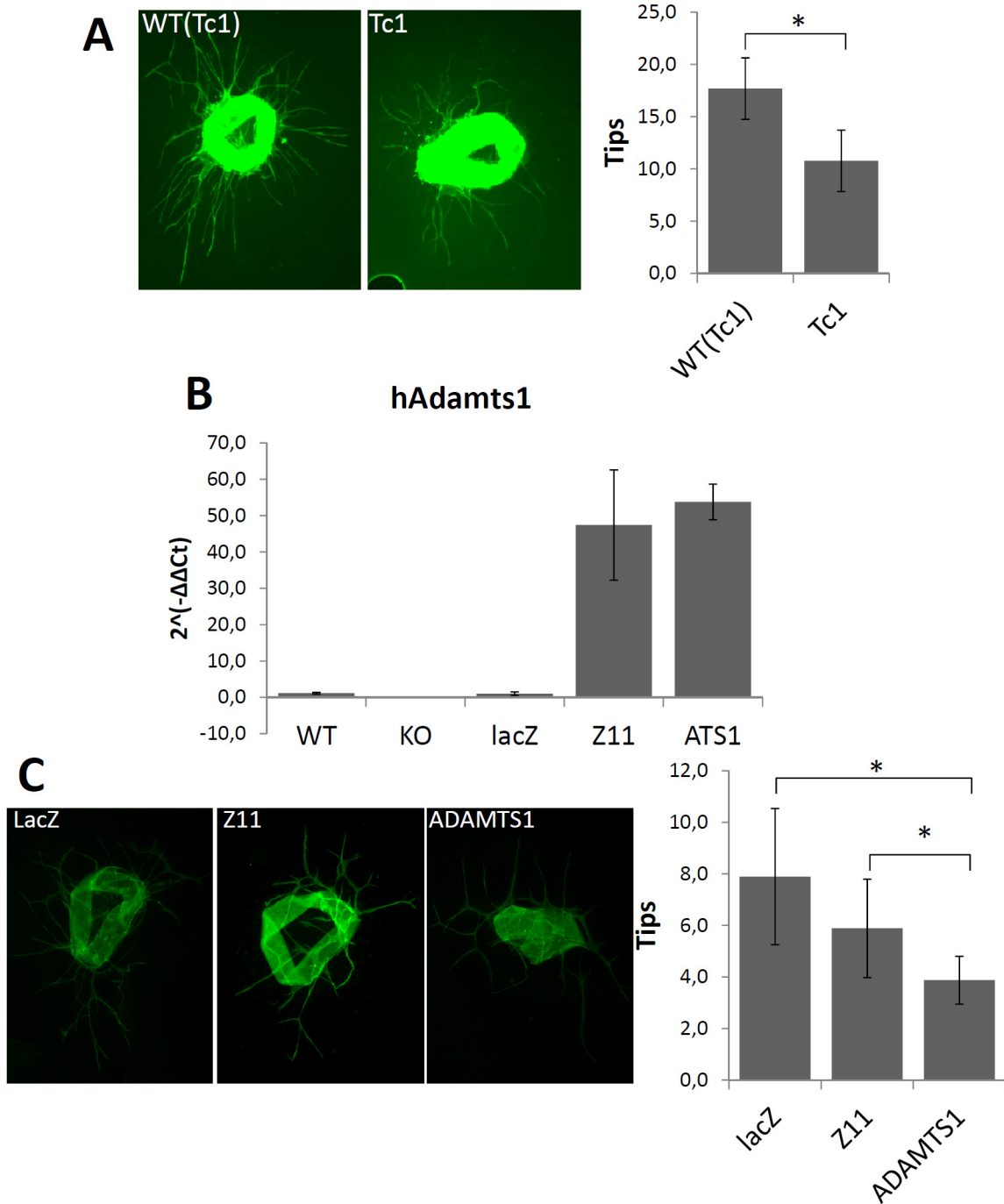


Figure 4 Aortic rings to assay the effect of ADAMTS1 in sprouting. **(A)** Representative images (5x magnification) from wt(Tc1) and Tc1 rings (day 10) stained for FITC-BS1Lectin. Quantification of tips in the aortic ring assay for wt(Tc1) (n=80) and Tc1 (n=78) finding significant differences for a T-test (*, p<0,05). **(B)** qRT-PCR for human ADAMTS1 expression on rings infected with lentivirus. Graph represents the 2^{-ΔΔCt} value corrected to mouse actin, the SD represents the error bar. **(C)** Representative images (5x magnification) from control lacZ, inactive mutant (Z11) and active protease ADAMTS1 rings (day 8) stained for FITC-BS1Lectin. Quantification of tips from rings infected either with lacZ (n=38), Z11 (n=62) or ADAMTS1 (n=40). Significant differences found for ADAMTS1 infection in comparison with control and inactive mutant for T-test (*, p<0,05).

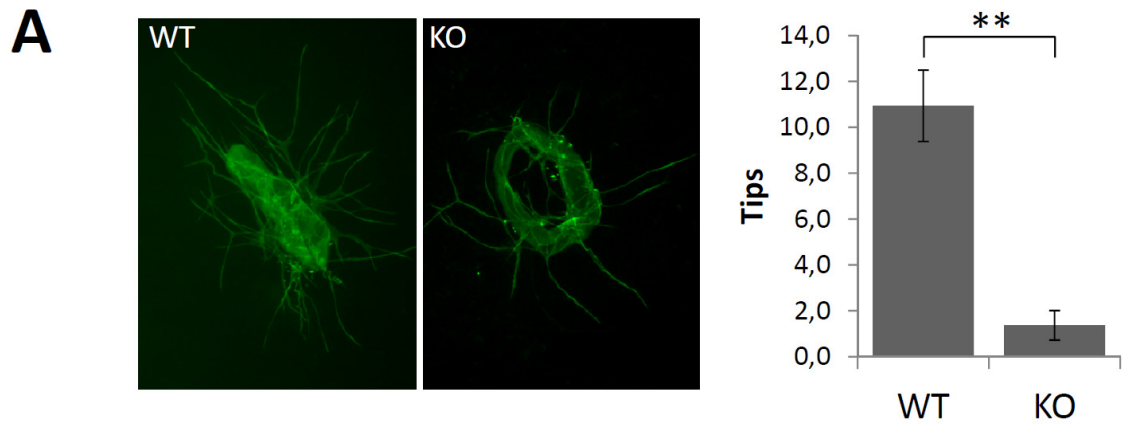


Figure 5 Representative images (5x magnification) from wt and ko for *adamts1* rings (day 6) stained for FITC-BS1Lectin. Quantification of tips from sprouts of aortic rings of wt (n=52) and ko (n=69) animals finding significant differences (**, $p < 0,01$).

2.5. Basal proteolysis of Nidogens is required for correct deposition in BM.

In previous sections we proceeded with different levels of complexity, from mouse tissues to *ex-vivo* techniques. Finally we performed *in vitro* tubulogenesis assays in a collagen matrix that involved the culture of isolated ECs and PCs. Importantly, previous studies have demonstrated the requirement of co-culturing ECs and PCs for adequate formation of BM surrounding new forming tubular structures (Stratman et al., 2009). As nidogens are main components of these structures, we approached these experiments to evaluate the proteolytic state of these molecules together with their deposition in the BM. First we checked which cells are expressing our main protagonists: ADAMTS1, Nid1 and Nid2 (Fig. 6A). Although both cell types (endothelial HUVEC and pericytes HBVP) do express all molecules, it appears that PCs are the main source for all of them. We analyzed by immunofluorescence the deposition of Nid1 in new forming tubular structures, observing an increased signal under co-culture conditions in comparison with single culture of HUVEC (Fig. 6B), as previously reported (Stratman et al., 2009). Then we evaluated the state of Nid1 and Nid2 proteins at 24, 48 and 72 hours after the beginning of the assay. As shown, the cleavage of both Nid1 and Nid2 is increased over time and more significantly in the co-culture conditions (Fig. 6C), finding more noticeable differences for Nid2.

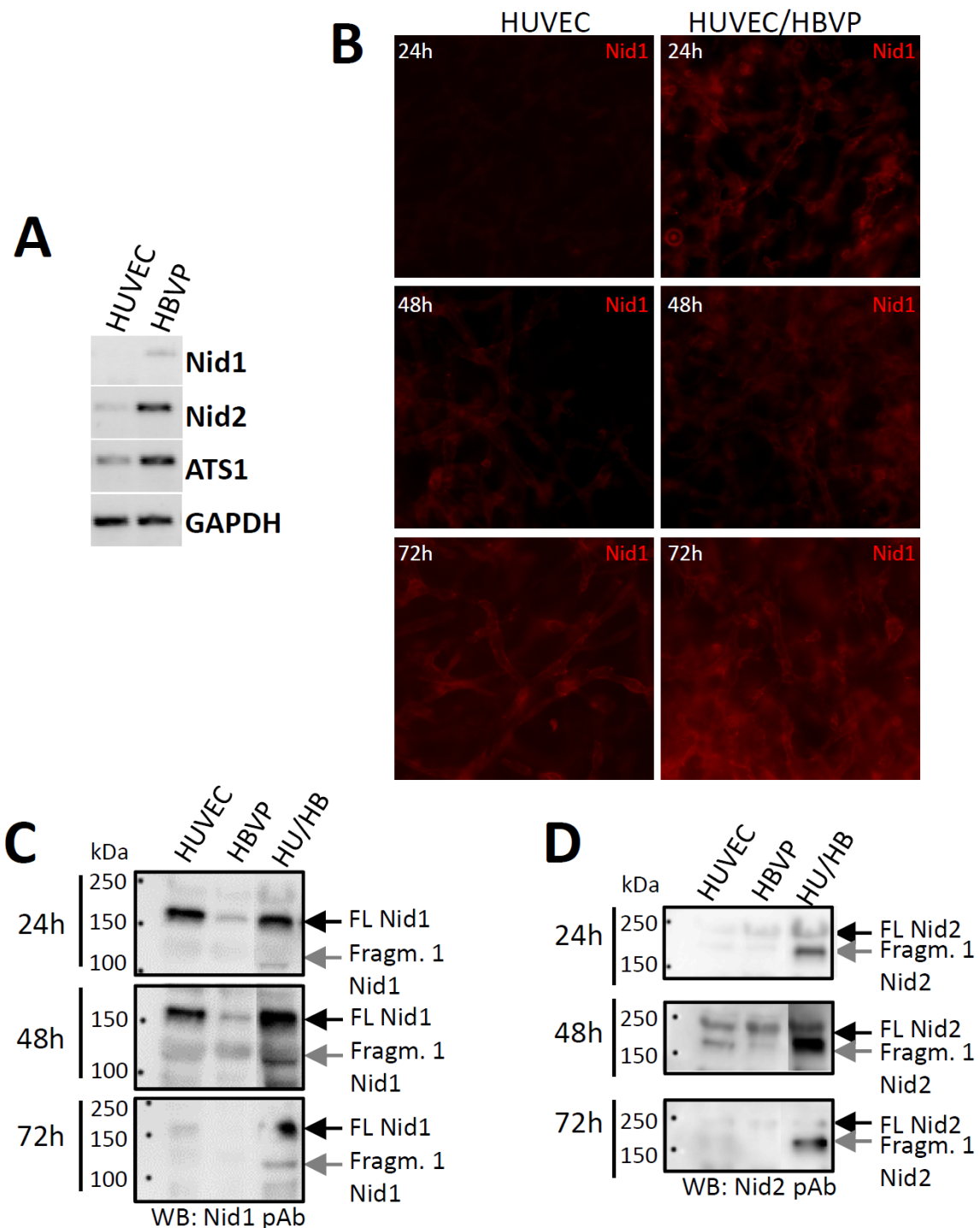


Figure 6 Tubulogenesis assay for investigating nidogen processing during tube formation. **(A)** RT-PCR was performed for HUVEC and HBVP cultured in plastic for Nid1, Nid2, ADAMTS1 using GAPDH as internal control. **(B)** Fluorescent microscopy (20x magnification) images Nid1 (red) staining of tubulogenesis assay was performed for HUVEC and HUVEC co-cultured with HBVP for 24, 48 and 72 hours. **(C)** WB for Nid1 in tubulogenesis assay at different time points (24, 48 and 72 hours) for HUVECs or HBVPs alone or the combination of HUVEC with HBVP (HU/HB). Black arrows indicate full length (FL) protein and grey arrows indicate proteolytic fragment. **(D)** WB for Nid2 in tubulogenesis assay at different time points (24, 48 and 72 hours) for HUVECs or HBVPs alone or the combination of HUVEC with HBVP (HU/HB). Black arrows indicate full length (FL) protein and grey arrows indicate proteolytic fragment.

3. Discussion

Proteolysis of nidogens has been observed for many years (Miosge et al., 2002) although the specific evaluation of these processes and their functional implications have not been deeply studied. Such proteolysis has been attributed to serine-proteases and MMPs (Mayer et al., 1993), and our own laboratory identified ADAMTS1 as a “nidogenase” (Canals et al., 2006). Recent advances in matrix biology are confirming the necessity to re-evaluate the contribution of extracellular matrix components during physiological and pathological conditions, so the expert community claims for profound studies to better understand the biology of matrix components.

The current existence of mouse models with altered levels of ADAMTS1 (*adamts1* KO and Tc1 models) provoked our interest to evaluate nidogens in these scenarios. Although our initial experiments with whole protein extracts did not show any differences, probably due to the broad expression of nidogens throughout the tissue, the finest immunolocalization approach displayed more relevant observations. The increased co-localization of Nid1 with endothelium in the ADAMTS1 deficient animals, more important in muscle, suggested a potential contribution of this protease for the proper deposition in vascular surrounding areas. Under our perspective we did not observe vascular alterations but it will be important to evaluate additional tissues such as ovary and placenta, in which ADAMTS1 expression appears important and, in fact, some authors observed relevant alterations in the *adamts1* KO specimen (Shozu et al., 2005).

In a similar manner we were partially disappointed with our observations in the adult retinas, a great model to study vasculature. New advances in the field are supporting studies of the mouse retina as a powerful experimental system to analyze angiogenic blood vessel growth (Pitulescu et al., 2010). However these studies need to be addressed at earlier stages, mainly between days 3 to 9 after birth. Our observations with developing retinas of Tc1 mice confirm such impression. In this sense we are encouraged to obtain a relevant number of *adamts1* KO mice at early developmental stages to perform these evaluations, so we can determine properly potential vascular alterations. Importantly, a recent report identifies ADAMTS1 and both nidogens, together with additional genes, as relevant molecules that appeared increased in tip cell populations of developing retinas (del Toro et al., 2010). Our work also showed high expression levels of ADAMTS1 in adult retinas compared with ECs, although at this late point the retinas have reached a maturation stage that makes more difficult to find any differences. Regarding nidogens, their proteolysis has also been observed in retina (Kunze et al., 2010) but without further functional studies. Additional findings support the contribution of nidogens for BM formation in the retina (Balasubramani et al., 2010), and the nature of this BM is acquiring a major protagonism in the vascular field as a key modulator of endothelial sprouting (Stenzel et al., 2011). All these advances support our attempts to reveal the relevance of nidogens proteolysis for their proper deposition and their putative functional relationship with ADAMTS proteases.

Our results with the Aortic-Ring assay provided a special interest, giving the opposite effects observed for ADAMTS1. In some way, such controversy has some precedents during the last years, in one side with those experimental approaches that determine an anti-angiogenic action to ADAMTS1 (Iruela-Arispe et al., 2003; Reynolds et al., 2010) and in the other, those contributions that suggested its pro-tumorigenic and pro-metastatic roles (Liu et al., 2006; Lu et al., 2009). In our hands we first confirmed the inhibitory properties of ADAMTS1 overexpression during sprouting formation. Later, the evaluation of sprouting in aorta rings from *adamts1* KO mice clearly showed a major impairment, suggesting its relevance during this process. It is necessary to mention that *adamts1* KO mice are viable although the colony has important breeding problems, apparently due to major issues with the female reproductive system (Shozu et al., 2005). In line with our expertise we are encourage to perform the overexpression of ADAMTS1 in KO aortas to evaluate the capacity to rescue such sprouting defect. Also it will be important to evaluate the relevance of nidogens in these settings with changing levels of ADAMTS1. A previous report already suggested a role to nidogens during aortic sprouting according to their contribution to form a correct BM (Nicosia et al., 1994).

Our last tubulogenesis assays also reflect the potential relevance of nidogens proteolysis for the formation of a neo-vasculature although additional experiments need to be performed. We confirmed that proteolysis is occurring during this process, as previously observed (Stratman et al., 2009), however these authors did not focus their attention on proteolysis phenomena. A recent report showed an interesting collaboration among ADAMTS1 and its inhibitor TIMP3 (Schrimpf et al., 2012). Both molecules are alternatively expressed in pericytes, pointing to the protease as a marker of activation of pericytes, and TIMP3 as a stabilizer of the capillary tubular network, mainly by exerting its inhibitory function over ADAMTS1. This protease was also revealed as an important factor in ECs during tubulogenesis in a collagen matrix (Su et al., 2008) showing that its inhibition provoked a decreased invasive capability.

Our results suggest a main contribution of PCs as ADAMTS1-provider cells, although we also confirmed its expression in ECs, and its important induction under hypoxia conditions (Hatipoglu et al., 2009). It is important to remark our ongoing work to isolate different populations of cells (ECs and PCs) from WT and *adamts1* KO mice. These biological tools will allow us to approach these assays and disclose the contribution of ADAMTS1 in every single step of the tubulogenesis process.

4. Experimental Procedures.

4.1. Cell culture, transfection and treatments.

Parental or overexpressing ADAMTS1 HEK293 cells, previously described (Canals et al., 2006), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin, and 1 % of 200 mM L-glutamine.

Human umbilical vein endothelial cells (TCS Cellworks), HUVEC, and Human brain vascular pericytes (Innoprot), HBVP, were cultured in M199 supplemented with 20 %

FBS, 1 % penicillin-streptomycin, and 1 % of 200 mM L-glutamine, 0.2 mg/ml of heparin and 50 ug/ml of endothelial mitogen (AbD serotec, 4110-5004).

All cell lines were cultured at 37 °C with 5 % CO₂ under saturated humidity.

Coating 2 ug/cm² of poly-L-lysine (P4707, Sigma-Aldrich) was used for culture of PCs and 0.2 mg/cm² porcine gelatine (G9136, Sigma-Aldrich) coating is used for HUVECs culture.

For routine analysis and substrate validation, conditioned medium from the indicated cell lines was collected after 24 h of incubation in serum-free medium.

Mouse lung endothelial cells, MLECs, were isolated as detailed explained in (Reynolds and Hodivala-Dilke, 2006).

4.2. Tubulogenesis.

200ul of M199 containing 10⁷ ECs alone or in combination with 2,5x10⁶ PCs were embedded in 800ul of a mixture of collagen I and M199 media to obtain a 2,5 mg/ml collagen I matrix. 28ul of suspension were placed in each well from a 96well plate. The plate was placed in the incubator at 37 °C and 5 % CO₂ allowing the matrix to solidify and then the media was added to the wells. Plate was placed again to the incubator and structures were allowed to form up to 5 days (Koh et al., 2008). The conditions for the co-culture were modified as mentioned (Stratman et al., 2009). Once formed matrix was collected with loading buffer for WB or fixed with 2 % PFA for 1h for stainings.

4.3. Aortic ring assay and Retina.

Aortas from different animal backgrounds were extracted, cleaned from fat and connective tissue and embedded in a collagen I matrix for 1 h at 37 °C for the collagen to solidify. Optimem media supplemented with 2,5 % FBS and 30 ng/ml VEGF was added to rings and were placed at 37 °C and 8 % CO₂. Media was refreshed every three days. A recent review explained meticulously this protocol (Baker et al., 2012). Tips from sprouts were counted from day 6 up to day 10. Lentiviral infection was performed for 24 h at 37 °C and 8 % CO₂ in 1 ml DMEM containing 10⁵ viral particles for the infection of approximately 30 rings. They were normally processed after infection. After sprouting, the rings were fixed for staining with 4 % PFA for 1 h.

For the retina assay the eyes were processed after fixation for up to 1 h with 4 % PFA, after this processing we followed the protocol published in nature protocols (Pitulescu et al., 2010).

4.4. Quantitative RT- PCR.

Total RNA was extracted using Machinery-Neagel NucleoSpin RNAII, except for muscle and aortic rings that we used the Quiagen RNeasy fibrous tissue RNA extraction kit.

cDNA was synthesised with iScript cDNA Synthesis Kit from BioRad. qPCR reaction was performed in a 7900HT from Applied Biosystems using Fast SYBR green master mix also from Applied Biosystems. The representations showed the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ value using actin as endogenous control and SEM as error bar.

4.5. Lentivirus

pLenti6.2V5-DEST™ Gateway® Vector is a Gateway®-adapted ViraPower under CMV promoter were constructed with Z11 (ADAMTS1 inactive mutant) and ADAMTS1 constructs from human origin, were described previously (Iruela-Arispe et al., 2003). We pre-amplified the information contained in the initial constructs using specific primers for the gateway technology for easy insertion in the expression vector. We co-transfected 293FT virus producing cells using lipofectamin either with LacZ, ADAMTS1 and Z11 constructs in combination with protein coding plasmids pool. All this technology was purchased from Invitrogen.

We serum starved the cells and viruses were collected after 48 h and freeze at -80 °C upon use. We titer them in HT1080 cells obtaining all of them a titer of 10^5 viruses. We tested for expression of the protein and the V5 tag included in the C-terminal region of the proteins.

4.6. Immunoblot analysis.

Conditioned medium was directly analyzed or concentrated with StrataClean resin (Stratagene). Lysates mouse tissues were extracted with RIPA buffer containing 1 mM PMSF, 1 ug/ml aprotinin and 10 ug/ml leupeptin.

These samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Schleicher & Schuel) or PVDF (BioRad) membranes. Membranes were blocked with 5 % low-fat milk and incubated with the following antibodies: monoclonal mouse anti-human ADAMTS1 (AF5867, R&D), polyclonal goat anti-human Nid1 (AF2570, R&D) and Nid2 (AF3385, R&D). After incubation with the appropriated secondary antibodies conjugated to peroxidase, signal was detected with the SuperSignal West Dura Chemiluminescence Kit (Pierce).

4.7. Immunofluorescence.

Immunofluorescence stainings were performed with the following antibodies: polyclonal goat anti-human Nid1 (AF2570, R&D), polyclonal goat anti-human Nid2 (AF3385, R&D), monoclonal rat anti-mouse Nid1 (MAB 1946, Chemicon), polyclonal rabbit anti-human to Collagen IV (AB6586, Abcam), polyclonal rabbit anti-human to CD31 (AB28364, Abcam), polyclonal rabbit anti-human to laminin (L9393, Sigma-Aldrich) and monoclonal mouse anti-SMA (A2547, Sigma-Aldrich). For endothelial staining of rings and retinas we used FITC-BS1Lectin (L9381, Sigma-Aldrich). Fluorescence images were acquired by Zeiss

Axio Imager A.1 and confocal images were captured either with Zeiss LSM 710 or Leica TCS SP5.

4.8. Image analysis and statistics.

ImageJ macro (free software from Image NIH) was used for co-localization analysis. The white dots represent the co-localization points for the endothelial marker and nidogen staining.

Zeiss confocal software acquisition was used for measurements done for kidney co-localization of nidogens and CD31. We selected the vessel area and by the overlapping coefficient given by the program we calculated the media and T-test for group of samples.

A T-test was used to compare the tips numbers media by group for the aortic ring assay. The same T-test was used to compare the media of diameter length in the retinas. Both cases the bar graph represent the media and the error band is represented by the SEM.

Acknowledgments

This work was supported by grants EMER07/055 and PI10/00883 (co-financed by FEDER through PN I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III) and from the CEIC (P10-CTS5865) to JCR-M.

References

- Baker, M., Robinson, S.D., Lechertier, T., Barber, P.R., Tavora, B., D'Amico, G., Jones, D.T., Vojnovic, B., Hodivala-Dilke, K., 2012. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7, 89-104.
- Balasubramani, M., Schreiber, E.M., Candiello, J., Balasubramani, G.K., Kurtz, J., Halfter, W., 2010. Molecular interactions in the retinal basement membrane system: a proteomic approach. *Matrix Biol* 29, 471-483.
- Canals, F., Colome, N., Ferrer, C., Plaza-Calonge Mdel, C., Rodriguez-Manzaneque, J.C., 2006. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* 6 Suppl 1, S28-35.
- Casal, C., Torres-Collado, A.X., Plaza-Calonge Mdel, C., Martino-Echarri, E., Ramon, Y.C.S., Rojo, F., Griffioen, A.W., Rodriguez-Manzaneque, J.C., 2010. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res* 70, 4676-4686.
- del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., Penninger, J., Eichmann, A., 2010. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025-4033.

- Esselens, C., Malapeira, J., Colome, N., Casal, C., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Canals, F., Arribas, J., 2010. The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem* 285, 2463-2473.
- Hatipoglu, O.F., Hirohata, S., Cilek, M.Z., Ogawa, H., Miyoshi, T., Obika, M., Demircan, K., Shinohata, R., Kusachi, S., Ninomiya, Y., 2009. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 284, 16325-16333.
- Iruela-Arispe, M.L., Carpizo, D., Luque, A., 2003. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci* 995, 183-190.
- Kalluri, R., 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 422-433.
- Koh, W., Stratman, A.N., Sacharidou, A., Davis, G.E., 2008. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol* 443, 83-101.
- Kunze, A., Abari, E., Semkova, I., Paulsson, M., Hartmann, U., 2010. Deposition of nidogens and other basement membrane proteins in the young and aging mouse retina. *Ophthalmic Res* 43, 108-112.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., Kalluri, R., 2007. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1121-1129.
- Liu, Y.J., Xu, Y., Yu, Q., 2006. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 25, 2452-2467.
- Lopez-Otin, C., Overall, C.M., 2002. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 509-519.
- Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Van Poznak, C., Fleisher, M., Reiss, M., Massague, J., Kang, Y., 2009. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* 23, 1882-1894.
- Mayer, U., Mann, K., Timpl, R., Murphy, G., 1993. Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur J Biochem* 217, 877-884.
- Miosge, N., Sasaki, T., Timpl, R., 2002. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol* 21, 611-621.
- Nicosia, R.F., Bonanno, E., Smith, M., Yurchenco, P., 1994. Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev Biol* 164, 197-206.
- Pitulescu, M.E., Schmidt, I., Benedito, R., Adams, R.H., 2010. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 5, 1518-1534.
- Reynolds, L.E., Hodivala-Dilke, K.M., 2006. Primary mouse endothelial cell culture for assays of angiogenesis. *Methods Mol Med* 120, 503-509.
- Reynolds, L.E., Watson, A.R., Baker, M., Jones, T.A., D'Amico, G., Robinson, S.D., Joffre, C., Garrido-Urbani, S., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Martino-Echarri, E., Aurrand-Lions, M., Sheer, D., Dagna-Bricarelli, F., Nizetic, D., McCabe, C.J., Turnell, A.S., Kermorgant, S., Imhof, B.A., Adams, R., Fisher, E.M., Tybulewicz, V.L., Hart, I.R., Hodivala-Dilke, K.M., 2010. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature* 465, 813-817.
- Ricciardelli, C., Frewin, K.M., Tan, I.D., Williams, E.D., Opeskin, K., Pritchard, M.A., Ingman, W.V., Russell, D.L., 2011. The ADAMTS1 Protease Gene Is Required for Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Am J Pathol*.
- Rocks, N., Paulissen, G., Quesada-Calvo, F., Munaut, C., Gonzalez, M.L., Gueders, M., Hacha, J., Gilles, C., Foidart, J.M., Noel, A., Cataldo, D.D., 2008. ADAMTS-1

metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res* 68, 9541-9550.

Rodriguez-Manzaneque, J.C., Carpizo, D., Plaza-Calonge Mdel, C., Torres-Collado, A.X., Thai, S.N., Simons, M., Horowitz, A., Iruela-Arispe, M.L., 2009. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 800-810.

Rodriguez-Manzaneque, J.C., Westling, J., Thai, S.N., Luque, A., Knauper, V., Murphy, G., Sandy, J.D., Iruela-Arispe, M.L., 2002. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 501-508.

Sandy, J.D., Westling, J., Kenagy, R.D., Iruela-Arispe, M.L., Verscharen, C., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Zimmerman, D., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Wight, T.N., Clowes, A.W., 2001. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site which is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* 276, 13372-13378.

Schrimpf, C., Xin, C., Campanholle, G., Gill, S.E., Stallcup, W., Lin, S.L., Davis, G.E., Gharib, S.A., Humphreys, B.D., Duffield, J.S., 2012. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*.

Shozu, M., Minami, N., Yokoyama, H., Inoue, M., Kurihara, H., Matsushima, K., Kuno, K., 2005. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol* 35, 343-355.

Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., Hua, J., Lofqvist, C., Hellstrom, A., Smith, L.E., 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2813-2826.

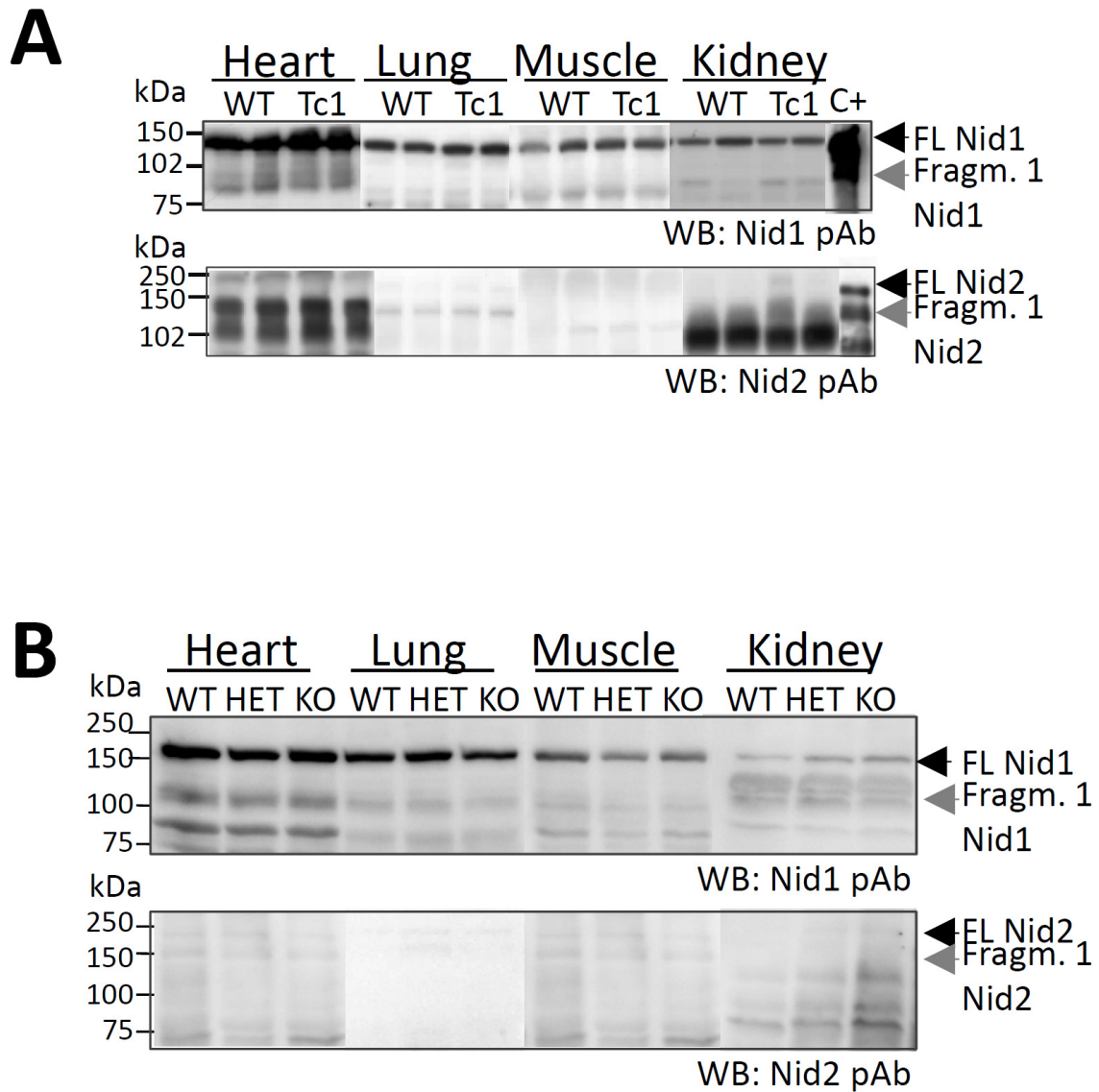
Stenzel, D., Franco, C.A., Estrach, S., Mettouchi, A., Sauvaget, D., Rosewell, I., Schertel, A., Armer, H., Domogatskaya, A., Rodin, S., Tryggvason, K., Collinson, L., Sorokin, L., Gerhardt, H., 2011. Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing Dll4/Notch signalling in vivo. *EMBO Rep* 12, 1135-1143.

Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J., Davis, G.E., 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114, 5091-5101.

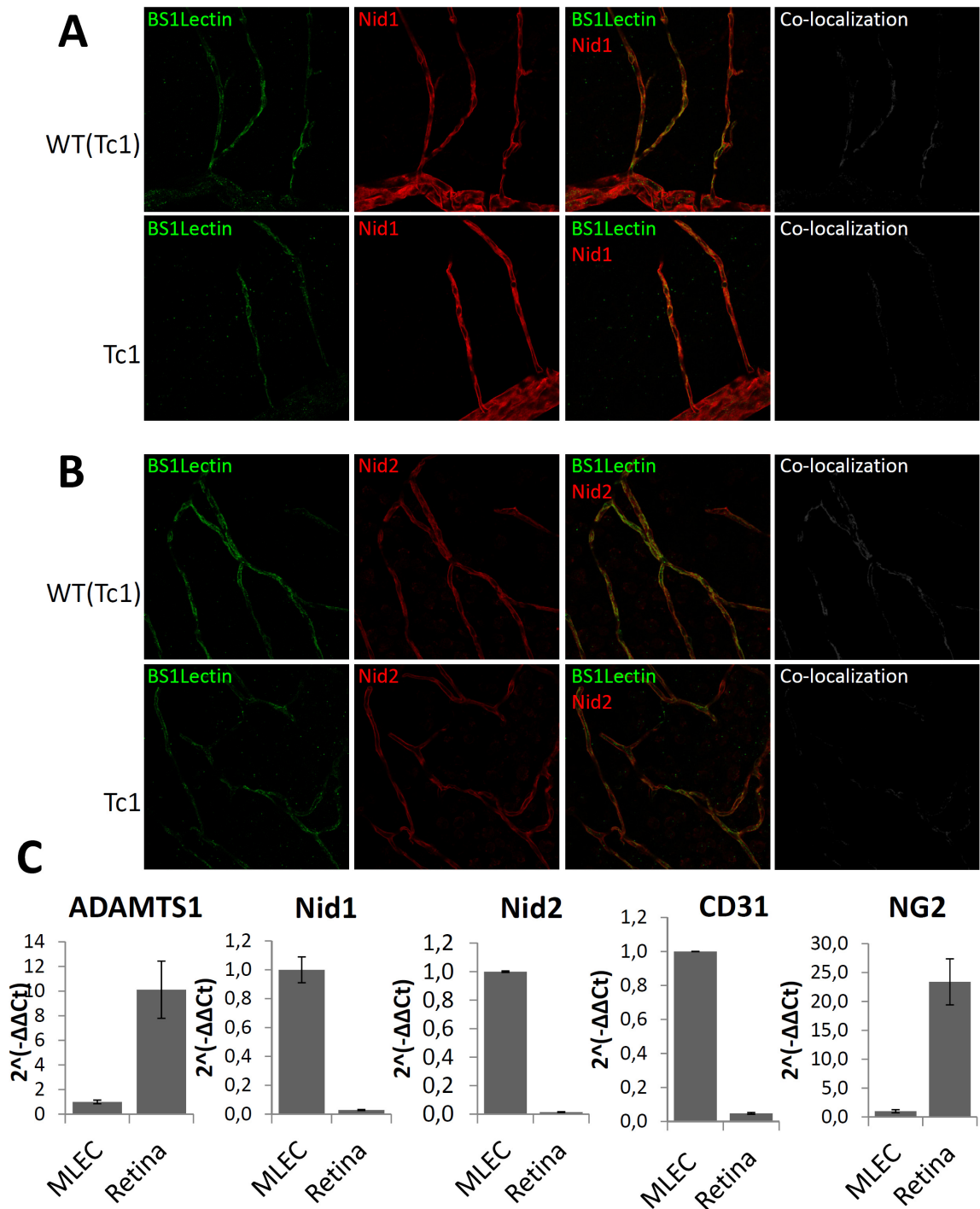
Su, S.C., Mendoza, E.A., Kwak, H.I., Bayless, K.J., 2008. Molecular profile of endothelial invasion of three-dimensional collagen matrices: insights into angiogenic sprout induction in wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C1215-1229.

Torres-Collado, A.X., Kisiel, W., Iruela-Arispe, M.L., Rodriguez-Manzaneque, J.C., 2006. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem* 281, 17827-17837.

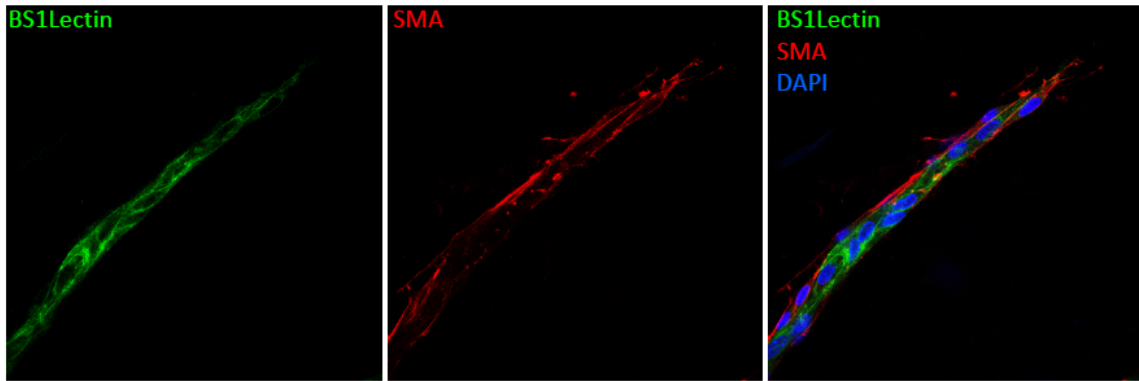
Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M.A., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., Iruela-Arispe, M.L., 1999. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 274, 23349-23357.



Supplementary Figure 1 (A) WB for heart, lung, muscle and kidney of two wt(Tc1) and two Tc1 animals, 1st panel shows Nid1 staining and 2nd staining for Nid2. Black arrow signal to full length (FL) and grey arrow to proteolytic fragment. **(B)** WB for heart, lung, muscle and kidney of wt, het and ko animals for *adamts1*, 1st panel shows Nid1 staining and 2nd staining for Nid2. Black arrow signal to full length (FL) and grey arrow to proteolytic fragment.



Supplementary Figure 2 Immunolocalization of nidogens in Tc1 adult retinas. (A) Confocal images (40x magnification) were acquired in retinas stained for FITC-BS1Lectin (green) and Nid1 (red). White dots represent the co-localization of both FITC-BS1Lectin and Nid1 signals. (B) Confocal images (40x magnification) were acquired in retinas stained for FITC-BS1Lectin (green) and Nid2 (red). White dots represent the co-localization of both FITC-BS1Lectin and Nid2 signals. (C) Quantitative RT-PCR was performed for the comparison of MLECs and retina expression of ADAMTS1, Nid1, Nid2, CD31 and NG2. Graph represents the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ value corrected to mouse actin, the SD represents the error bar.



Supplementary Figure 3 Confocal images (40x magnification) for sprouts from rings stained for BS1Lectin (green) SMA (red) and nuclei stained with DAPI (blue).

Down-regulation of ADAMTS1 in human breast carcinoma and relevance of its proteolytic activity on vascular basement membrane components Nidogen-1 and Nidogen-2.

Estefanía Martino-Echarri¹, Rubén Fernández-Rodríguez¹, Antoni X. Torres-Collado¹, María del Carmen Plaza-Calonge¹, Suyapa Amador¹, Javier Cortés³, Louise E. Reynolds², Kairbaan M. Hodivala-Dilke², and Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque¹

¹GENYO (Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research), Granada, Spain.

²Barts Institute of Cancer, Queen Mary University of London, London, UK.

³Vall d'Hebron Institut d'Oncologia, Barcelona, Spain.

Running Title: ADAMTS1 and Nidogens proteolysis in breast cancer

Keywords (5): ADAMTS1, basement membrane, breast carcinoma, extracellular proteolysis, nidogens.

Financial Support:

This work was supported by grants EMER07/055 and PI10/00883 (co-financed by FEDER through PN I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III) and from the CEIC (P10-CTS5865) to JCR-M.

Corresponding author:

Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque, GENYO, Avda. de la Ilustración, 114, Granada 18007, Spain. Phone: +34 958 715500; Fax: +34 958 637071. E-mail: juancarlos.rodriguez@genyo.es

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Extensive analyses of the expression of ADAMTS proteases during tumor progression disclosed their differential regulation. Significantly, ADAMTS1 gene expression appeared down-regulated in breast carcinoma in comparison with normal tissue. Furthermore, previous reports showing the anti-angiogenic features of this protease suggested its putative contribution as a tumor protective molecule, in line with recent findings for other ADAMTS and MMP proteases. However, most studies did not provide information regarding the identity of substrates implicated for every action. Importantly, here we co-evaluated both the expression of ADAMTS1 and its substrates Nidogen-1 and Nidogen-2, main components of vascular basement membranes. In addition to corroborate a decreased expression of the protease in breast tumor specimens, our studies revealed that the cleavage of both nidogens is partially inhibited in these tumor samples, in accordance to the lower expression of ADAMTS1, and their deposition surrounding vascular structures is significantly altered between healthy and tumor areas, with relevance for maintenance of vessel integrity. In the opposite scenario, with an over-expression of ADAMTS1, we observed increased proteolysis of nidogens and their almost complete removal from vascular structures, accompanied with major morphological alterations and a decreased vessel density. Importantly, the increased levels of ADAMTS1 in our xenograft model led to the complete inhibition of tumor growth, as expected by its putative anti-tumorigenic activity. Our studies reflect the requirement to explore the functional interactions between proteases and specific substrates.

Introduction

Recent findings are supporting the major contribution of post-translational modifications to the complex and dynamic nature of the extracellular milieu. Among these processes, the knowledge of extracellular proteolysis mechanisms has acquired a leading protagonism due to its important implication in development, morphogenesis and tissue repair. Moreover alterations in the expression of proteases has been strongly associated with pathological conditions such as atherosclerosis and tumor progression (1). The requirement of a parallel effort to characterize the repertoire of substrates has provoked initiatives as the Degradome project (2), that deals with the understanding of proteases functions and their intimate relationship with specific targets. Indeed, multiple gene expression studies are highlighting the putative contribution of extracellular proteases for disease progression, although the study of substrates and their proteolytic modifications is limited by the nature of the existing samples, because larger amounts are needed together with the existence of proper biological tools to identify fragments, immunolocalization, etc.

The extracellular protease ADAMTS1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) was first shown to display anti-angiogenic properties (3) and its catalytic activity has been reported on various proteoglycans (4-6), and further extracellular components (7-9). Studies that observe a potential role of ADAMTS1 during tumorigenesis appear controversial. In one side, its angiostatic properties have been recently updated in the Tc1 mouse model of Down's Syndrome (10), and also associated with a new role during tumor plasticity phenomena associated to decreased vessel density (11). In supposed contradiction various reports attribute to ADAMTS1 a relevant action for metastasis (12) and tumor growth (13, 14). Some of these contributions observe the putative role of ADAMTS1 as a modifier of the extracellular media corroborating the necessity to advance in the characterization of functional substrates.

Using different approaches, various members of the MMP and ADAMTS families of proteases have been reported to exert tumor inhibitory actions (15, 16). Importantly, the down-regulation of these genes in different tumors is consistent with such properties. The study by Porter et al. (17) evaluated the expression of all members of ADAMTS family in breast carcinoma compared with normal breast tissue. ADAMTS1 appeared significantly down-regulated in tumor samples, however no additional studies were addressed to know the presence or absence of specific substrates.

In our laboratory we became interested in the study of nidogens as substrates of ADAMTS1 (7). Both Nid1 and Nid2 are main components of BM where they act as a cross-linker among further components laminin, collagen IV, perlecan and fibulins (18). The participation of this dynamic structure during vessel maturation and stabilization suggests its relevance as a target of proteolysis and fundamental as a maintenance factor during tumor progression.

Nidogens are triglobular proteins with different binding capacities to ECM molecules and also with an RGD domain for integrin mediated cellular interaction (19, 20). A revision of the literature and our own observations (*Martino-Echarri et al*, manuscript in preparation) showed that both nidogens are proteolysed in normal tissue and in basal conditions,

suggesting the importance of their basal cleavage for normal function (21, 22). BM abnormalities have been commonly described and associated to the development of neoplasias containing dysfunctional vessels, such as BM thickening, existence of various layers, loose PC attachment (23). Nevertheless, very little is known about the potential roles of nidogens during tumor progression. Some studies showed both up- and down-regulation of nidogens in several tumor types (23-28) however, not further analysis are performed. More recently, studies with the *nid2* knockout mice showed an increased incidence of lung metastasis (29) suggesting the major contribution of these proteins, probably in a balance between full-length protein and proteolytic fragments, for homeostasis and vascular normalization.

Here we studied the correlation between down-regulated levels of ADAMTS1 and a decreased proteolysis of Nid1 and Nid2 in breast carcinomas samples compared with their healthy counterparts. As an opposite scenario we approached a xenograft assay with modified levels of ADAMTS1, with relevant consequences for tumor progression. As mentioned above, the parallel evaluation of protease and substrate, ADAMTS1 and nidogens here, appear as a requirement to better understand tumor biology and for the development of new therapeutic tools.

Materials and Methods

Human breast samples

Human breast carcinoma and non-neoplastic mammary samples (tissue blocks and paraffin sections) were obtained from Anatomical Pathology Department of Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). Some specimens were properly processed for either RNA or Protein extraction.

Cell culture

Parental and modified HEK293T (human embryonic kidney) cells were grown in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin, and 1 % 200 mM L-glutamine. Stable cells overexpressors of ADAMTS1 were previously described (4). For validation and analysis of substrates, conditioned medium was collected after 24 h of incubation in serum-free medium.

Tumor xenograft assays and vessel quantification

Nu/Nu BALB/c mice were s.c. injected in the right flank with 5×10^6 cells in 100 μ l of DMEM. Different proportions of parental and ADAMTS1-overexpressing cells were used for injection of mice as indicated in the main text. Mice weight and tumor size were assessed every 3 days after cell injection. Tumor growth was monitored up to 30 days. At final point, a number of mice were injected with 100 μ l of PE-conjugated CD31 (Cat. 102408, BioLegend) 15 min prior to sacrifice, to approach visualization of vessels according to previous determinations (30) (30). All animals were sacrificed following proper guidelines, and tumors were dissected and processed for further analysis. Vessel density was obtained by quantification of total vessels in whole tumor sections stained for endomucin divided by total squared area by a blinded observer. Graph represents the media of vessel density by groups and SEM as error bar.

Quantitative RT-PCR and statistical analysis

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNAII kit (Macherery-Nagel). cDNA was synthesised with iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). qPCR reaction was performed in a 7900HT (Applied Biosystems) using Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems). qRT-PCR representations showed the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ value using actin as endogenous control and SEM as error bar.

Statistic analysis of human samples data for ADAMTS1 and nidogens expression and blood vessel density was done with the Mann Whitney *U* test (GraphPad 5 Prism).

Immunoblot analysis

Conditioned medium from cells was clarified and concentrated with StrataClean resin (Stratagene) as previously indicated (7). Total protein from tumor samples and cell lysates was extracted with RIPA buffer containing 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Schleicher & Schuel) or PVDF (BioRad) membranes. Membranes were blocked with 5 % low-fat milk and incubated with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-human ADAMTS1 (clone 5D4E11B5, kindly provided by Dr. M.L. Iruela-Arispe), polyclonal rabbit anti-human Nid1 and Nid2 (kindly provided by Dr. T. Sasaki), polyclonal goat anti-human Nid1 (AF2570, R&D) and Nid2 (AF3385, R&D). After incubation with the appropriated secondary peroxidase-conjugated antibodies, signal was detected with the SuperSignal West Dura Chemiluminescence Kit (Pierce). For quantification of nidogens processing in human breast samples, WB images were processed with ImageJ software (NIH). A rectangular area was drawn along the signal of all lanes either for full length or proteolytic fragments. Signal intensity was plotted by area and then the area was measured for each lane. Both full length and proteolytic fragment were measured and % ratio of full length/total and fragment/total was calculated. Significance was approached by T-test statistic analysis. Bar graph represents the media by groups and the SEM the error bar.

Immunofluorescence

Immunofluorescence stainings were performed with the following antibodies: polyclonal goat anti-human Nid1 (AF2570, R&D), polyclonal goat anti-human Nid2 (AF3385, R&D), polyclonal rabbit anti-human Collagen IV (AB6586, Abcam), polyclonal rabbit anti-human CD31 (AB28364, Abcam), polyclonal rabbit anti-human laminin (L9393, Sigma-Aldrich), monoclonal mouse anti-SMA (A2547, Sigma-Aldrich), monoclonal rabbit anti-human PDGFRB ((28E1) 3169, Cell Signalling), and monoclonal rat anti-mouse Endomucin (SC65495, SCBT). Fluorescent images were acquired with an AxioImager A.1 microscope (Zeiss), and confocal images were captured with a LSM710 (Zeiss) or a TCS SP5 (Leica). ImageJ Software (NIH) was used for co-localization analysis.

Results

ADAMTS1 expression appears down-regulated in human breast tumor samples

The consistent down-regulation of ADAMTS1 expression in breast carcinomas with respect to non-neoplastic mammary tissue has been previously reported (17). A deep study of several public microarray databases corroborated this information and remarked the relevance of such down-regulation, showing fold changes down to 18.705 (Finak Breast study), and p -values as $1.33E-40$ (TCGA Breast Study) (Fig. 1A). However these studies do not evaluate the presence and condition of its substrates, complicated by the fact that evaluation of proteolysis requires further assays with protein extracts. Therefore, we approached these analyses in a small set of paired breast carcinoma and sane human samples. First, we reported gene expression of ADAMTS1 by qRT-PCR, confirming a significant down-regulation ($p=0,0066$) in tumor samples compared with healthy tissue (Fig. 1B). In an attempt to characterize a potential role for ADAMTS1 proteolytic activity, we evaluated the expression of both Nid1 and Nid2 as valuable substrates to be considered in this setting, mainly as components of vascular basement membranes. Our studies showed a down-regulation of both genes in tumor specimens (Nid1: $p=0,0022$; Nid2: $p=0,0314$) (Fig. 1B). However, the analysis of the indicated public databases did not showed relevant changes for both nidogens.

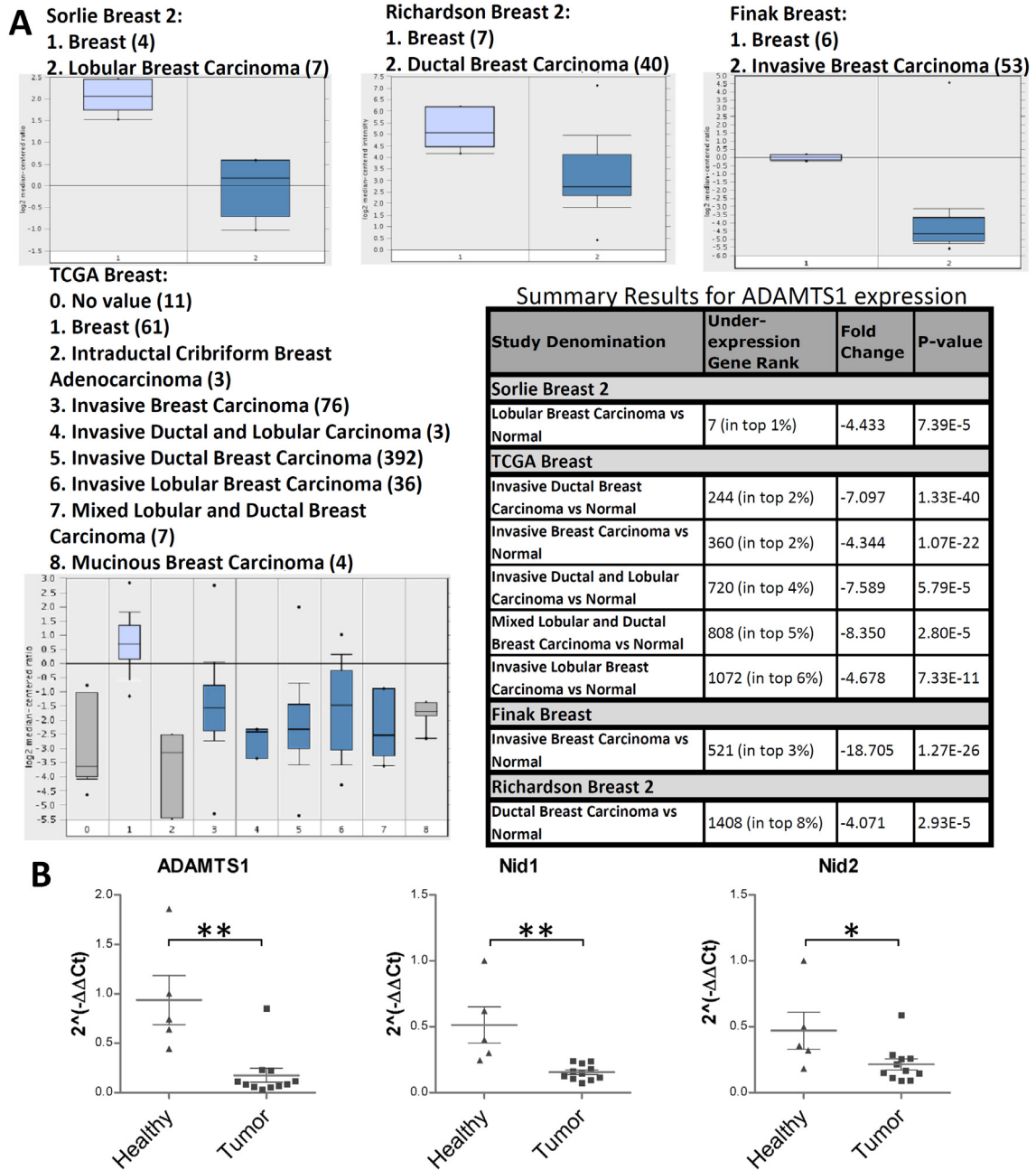


Figure 1. Down-regulation of ADAMTS1 expression in breast cancer. A, Summary of ADAMTS1 gene expression data from four separate studies using clinical samples of different breast carcinomas compared with benign tissue. Table summarizes data from each study, including: Under-expression Gene Rank, Fold Change, t-Test, and P-value (data from Oncomine). B, Independent gene expression analysis, by qPCR, of ADAMTS1 and nidogens in healthy breast tissue (n=5) and breast tumors (n=11) are represented in a dot plot showing the media by groups and error band represented by the standard deviation. P-value for the non-parametric Mann-Whitney U test is included (*, p<0,05 and **, p<0,01).

Nid1 and Nid2 are differently cleaved in tumor samples in comparison with healthy tissue

According to the significant differences of ADAMTS1 expression between tumor and healthy mammary samples, we tested the proteolytic state of both nidogens. Our current studies are demonstrating that Nid1 and Nid2 are cleaved in a basal manner in a variety of organs and tissues (unpublished observations by *Martino-Echarri et al.*). In this line we also found that Nid1 and Nid2 are normally cleaved in healthy mammary tissue, with a similar pattern to the previously determined for ADAMTS1 (7) (Right lanes, Fig. 2A for Nid1, and Fig. 2B for Nid2). In accordance to the lower levels of ADAMTS1, tumor samples displayed a decreased cleavage of both nidogens, manifested by the increased levels of the full-length protein and the decreased proportion of the specific fragments (Figs. 2A-B). To better evaluate these differences, it should be noted that tumor counterparts displayed decreased gene expression of both nidogens (Fig. 1B). The differences in proteolysis are better observed when paired samples were compared side by side (Fig. 2C). Finally, the altered proteolytic rate was quantified and significant differences were found ($p=0,00917$ for Nid1 and $p=0,0371$ for Nid2) (Fig. 2C).

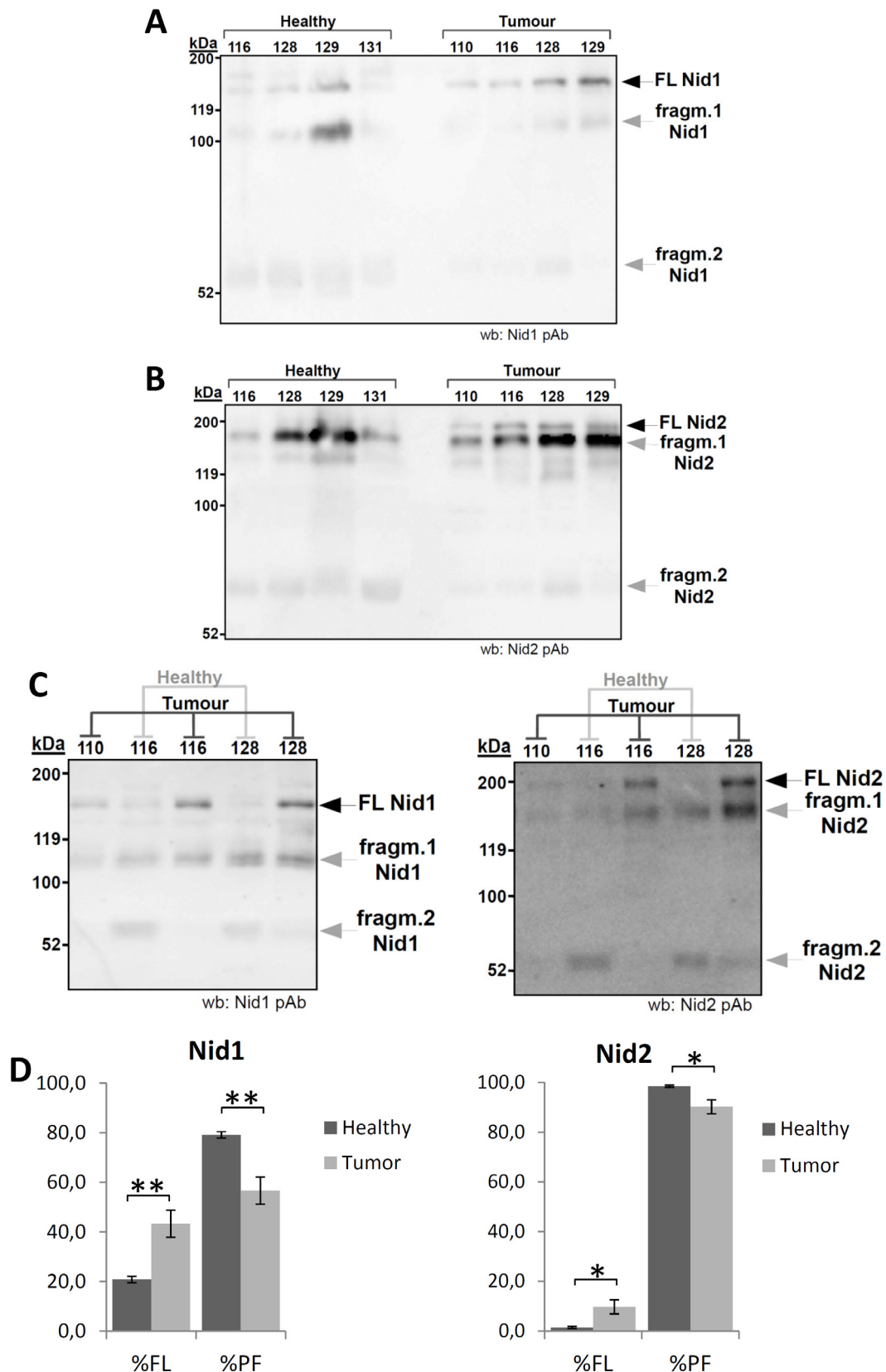


Figure 2. Differential processing of Nid1 and Nid2 in breast tumor and sane samples. A-B, 50 μ g of protein extract from tumor and healthy breast samples were resolved and evaluated by western-blot with a Nid1 antibody (A) and with a Nid2 antibody (B). Black arrows point full length (FL) protein and gray arrows indicate fragments of Nid1 and Nid2 respectively. C, 50 μ g of protein extract of paired healthy and tumor samples were resolved and analyzed by western-blot as indicated for previous panels. D, Graph represents the quantification of WB images. The media by groups (tumors: n=5; healthy tissue: n=4) is calculated and represented in % of full length or fragments (considering %FL+%Frag=100). *P*-values were calculated according to a T-test analysis (*, $p < 0,05$ and **, $p < 0,01$).

Localization of Nid1 and Nid2 in the basement membrane of vessels from tumor and healthy samples

A closer immunoanalysis of the expression of Nid1 and Nid2 was performed to evaluate their contribution in the vasculature of tumor and neighbouring healthy areas. While both nidogens appeared extensively distributed throughout the tissue, we co-stained with the endothelial marker CD31 to identify blood vessels. Our first observation was, in contrast with the gene expression data, that deposition of nidogens associated to vascular structures was significantly increased (Fig. 3A for Nid1, and 3B for Nid2). The analysis of co-localization of nidogen signal with the endothelial marker CD31 was performed with ImageJ software after confocal capture. Image processing provided a new representation with white dots showing such co-localization (Figs. 3A-B). At this point it is important to remark that antibodies used for these evaluations did recognize all forms of nidogens (full-length and fragments), so the comparison of these data with previous protein determinations suggested an increased deposition of nidogens in tumor vessels, probably associated to their altered proteolysis. To confirm the nature of these vessels we performed further analysis for collagen IV, another marker of vascular basement membrane, and SMA that identifies mural cells. These studies did not display significant differences between tumor and healthy associated vessels (Suppl. Fig. 1).

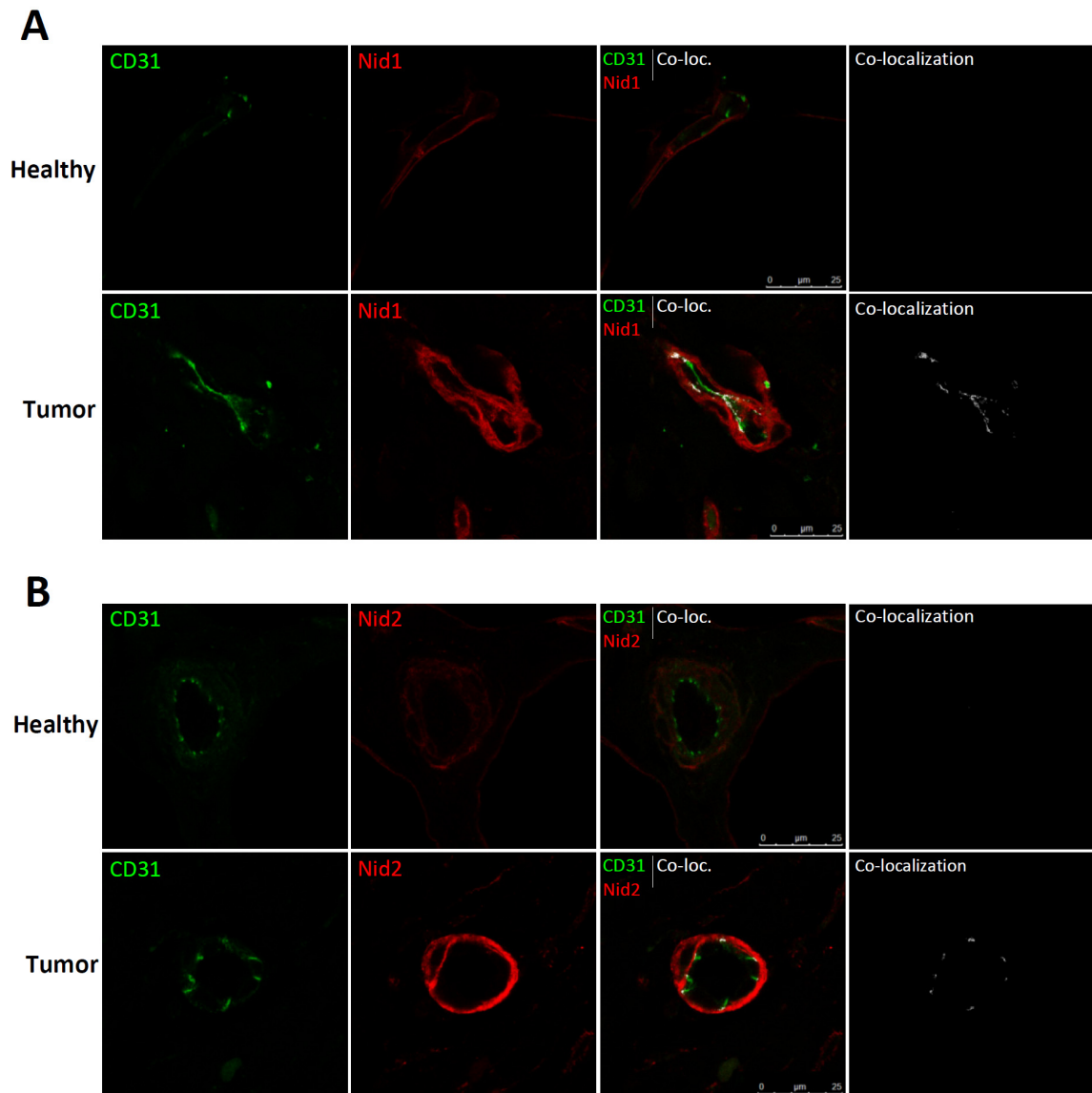


Figure 3. Immunolocalization of nidogens in the vascular basement membrane of healthy and tumor counterparts. A, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CD31 (green) and Nid1 (red) antibodies. Co-localization study was obtained by ImageJ software processing. White dots represent the co-localization of both CD31 and Nid1 signals. B, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CD31 (green) and Nid2 (red) antibodies. Co-localization study was obtained by ImageJ software processing as in A.

Effects of ADAMTS1 in a xenograft model with high levels of Nid1 and Nid2

As the down-regulation of ADAMTS1 in breast tumors appeared as a corroboration of its previously reported anti-tumorigenic contribution, we evaluated here such possibility by xenograft assays. According to our current studies, this inhibitory role could be associated to its capacity to modulate the deposition of nidogens in vascular basement membranes. To evaluate this hypothesis, now we injected HEK293T cells, parental and ADAMTS1-overexpressors, in nude mice. Importantly these cells express high levels of both nidogens, in fact they were the original source for the identification of ADAMTS1 substrates (7), where Nid1 and Nid2 cleavage was first described.

We performed these xenograft assays with varying proportions of parental and ADAMTS1-overexpressor cells, in an attempt to investigate the importance of levels of expression of the protease for tumor progression. Our first relevant observation was that the increased proportion of ADAMTS1 cells provoked a major reduction in the incidence of tumor development (Fig. 4A). A closer macroscopic evaluation of tumors showed noticeable differences, as it was the relevant reduced stiffness of tumors resulting from ADAMTS1-overexpressor cells in comparison with a compact appearance in the parental group (Fig. 4B). In addition, the analysis of vascular parameters as vessel density and morphology, by staining with CD31 endothelial marker, showed remarkable differences. First, tumors derived from ADAMTS1-overexpressor cells showed a decreased vessel density in comparison with parental tumors, in accordance to its recognized anti-angiogenic activity. Even more remarkable was the apparent enlargement of lumen size in the presence of ADAMTS1 (Fig. 4C) as previously observed in a different xenograft tumor model (31). We performed vessel density quantifications for tumor xenograft by a blind observer detecting significant reduction ($p=0,0286$) for ADAMTS1 tumors (Fig. 4D). As an alternative method to visualize vasculature we performed intravenous injections with a PE-conjugated CD31 antibody 15 min prior to mouse sacrifice. These studies confirmed our observations regarding vessel density and changes in morphology (Fig. 4E). Results with this last approach would discern potential functional alterations as permeability although our studies did not show relevant differences. In the analysis of these tumors increase number of PDGFRB cells were detected in the ADAMTS1 xenograft independently from endomucin vessel staining (Suppl. Fig. 2), we are still investigating its meaning and relevance in tumor context.

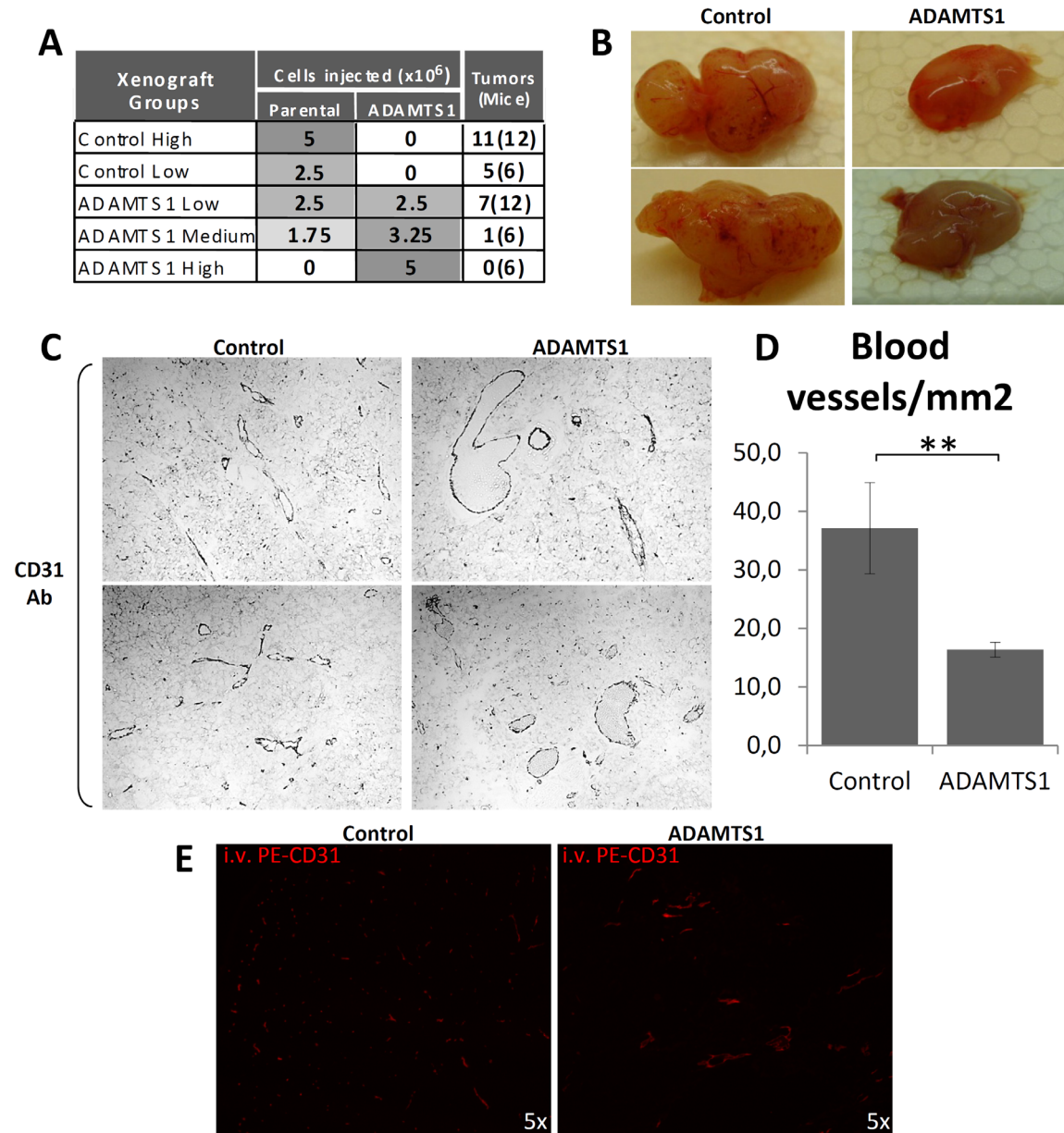
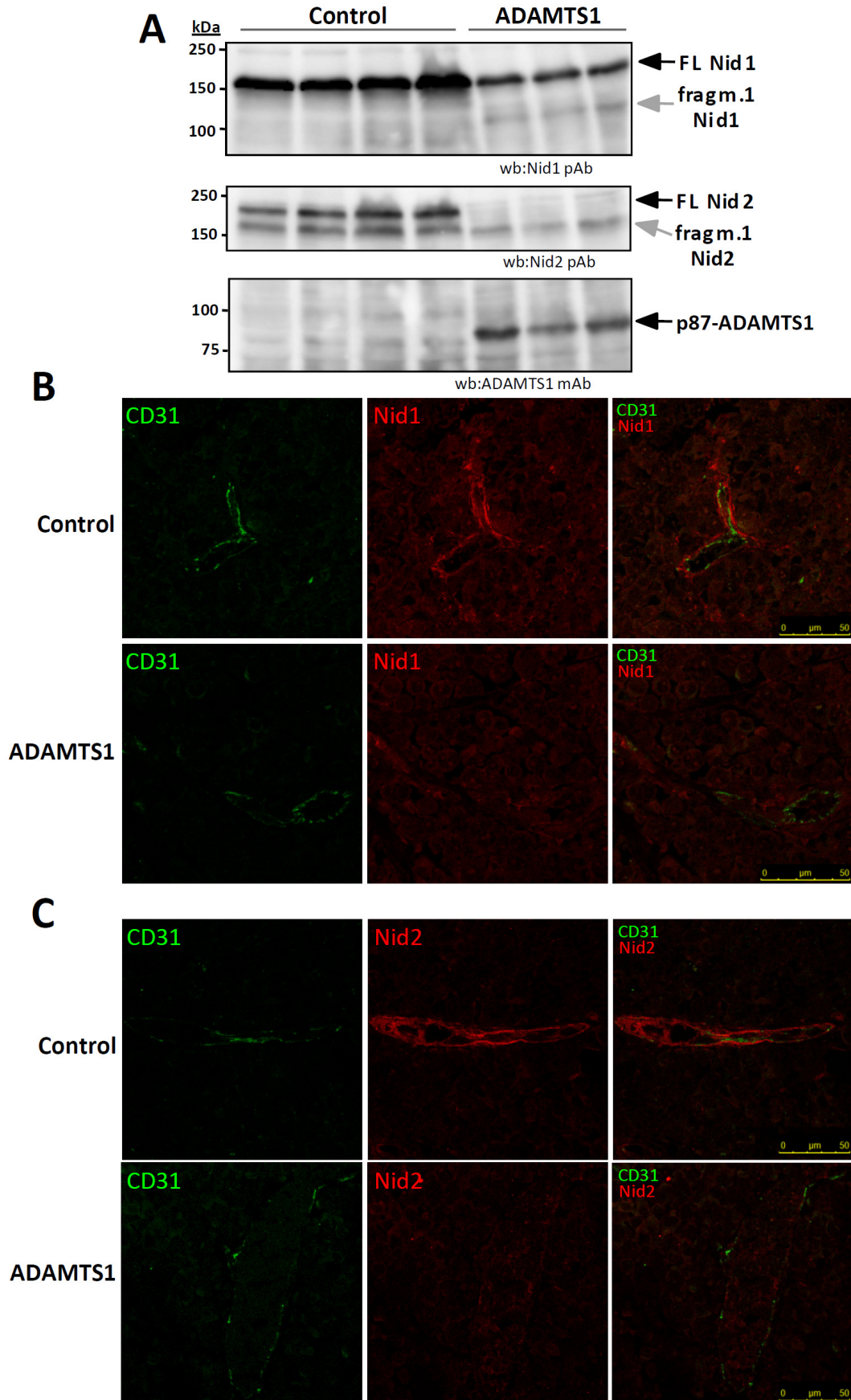


Figure 4. Xenograft assay with parental and ADAMTS1-overexpressing cells in nude mice. A, Table summarizes the number of cells injected per group, and incidence of tumor growth per number of mice injected. Note the different number of parental and ADAMTS1-overexpressing cells for every group. The final column reflects the number of mice with tumors and the total number of mice injected in parenthesis. B, Macroscopic appearance of tumors resulting from control or ADAMTS1-overexpressing groups. C, Microscope images (20x magnification) were acquired from samples immunolabeled with HRP-CD31 antibody to visualize vessels. Images were acquired in greyscale for proper quantification. D, Graph represents blood vessel density quantifications. Tumors showed for control samples correspond to high control cells injection ($n=4$) and low ADAMTS1 proportion ($n=4$) for the ADAMTS1 sample (*, $p<0,05$). E, Microscope images (5x magnification) were acquired from tumor sections from mice properly injected with PE-CD31 antibody for vasculature visualization. Tumors showed correspond to high control cells injection for control sample and medium ADAMTS1 proportion, for the ADAMTS1 sample.

Cleavage of nidogens in the xenograft model with distinct levels of ADAMTS1

In line with our previous determinations we assessed the potential cleavage of nidogens and their localization in the vascular BM. First, the evaluation by western-blot of both nidogens showed that they are more importantly cleaved in tumors generated by ADAMTS1-overexpressor cells (Fig. 5A), in a similar pattern as the described for this protease, here and in former reports (7). Furthermore we evaluated their presence associated to tumor vasculature.

Trying to elucidate if their cleavage performed over nidogens has an effect on their localization, immunofluorescence for Nid1 or Nid2 and CD31 was performed. Increased cleavage in the presence of ADAMTS1 correlated with a reduced signal of Nid1 and Nid2 surrounding the vessels, so its co-localization with CD31 appeared also diminished (Fig. 5B). In addition we evaluated the co-presence of nidogens with basement membrane components collagen IV and laminin, and SMA as a marker of supporting mural cells, in an attempt to better characterize tumor vessel in our xenograft model. These studies did not show relevant differences (Suppl. Fig. 3), although deeper analyses are currently being approached.



Discussion

The results showed here consolidate the contribution of ADAMTS1 as a tumor suppressor molecule. In the context of breast carcinomas this role was previously suggested in conjunction with other members of the ADAMTS family of proteases (17). As a novelty we implicated a potential role to extracellular nidogens and their proteolysis. Importantly our human tumor data included the analysis of posttranslational modifications, such as extracellular proteolysis, with great restrictions given the value of this type of samples. To overcome such limitations, a thoughtful analysis of public databases has become a valuable tool to confirm and consolidate new findings. Here we evaluated the relevance of ADAMTS1 in breast cancer datasets from Oncomine server (www.oncomine.org), revealing up to 4 studies that showed a significant down-regulation of *adamts1* gene expression in breast carcinomas compared with sane tissue (p values from 2.80E-5 to 1.33E-40; some studies included up to 392 samples). While the anti-angiogenic activity of ADAMTS1 has been extensively studied (3, 32, 33), its tumor-protective role has been recently highlighted in the Tc1 mouse model of Down's syndrome (10) related with the reduced incidence of solid tumors in these individuals.

Although the attribution of tumor inhibitory properties to extracellular proteases was originally controversial, several reports consolidated these features to MMP8 (16), ADAMTS12 (15) and ADAMTS15 (34), which down-regulation in different tumor settings was consistent with such anti-tumorigenic role. The decreased expression of these genes, and others, has been associated to silencing by epigenetic mechanisms but also by a predominant expression in stromal fibroblasts. ADAMTS1 has been found mainly localized in the stroma and also its epigenetic deregulation has been reported in colorectal cancer (35). Regarding anti-angiogenic properties, in addition to ADAMTS1, others have reported similar characteristics for ADAMTS2 (36) and ADAMTS8 (3). The analysis of expression levels of these proteases, in the human breast carcinoma study by Porter et al. (17), showed a relevant down-regulation of ADAMTS2, in a similar manner to ADAMTS1, but a deeper evaluation of public datasets did not corroborate these differences as strongly as for ADAMTS1 (data not shown).

To date, studies that consider a co-evaluation of the partnership protease/substrate are minor, with the extra limitations that these studies require larger amounts of clinical samples. In our present study, we evaluated nidogens as known substrates of ADAMTS1 (7) and also by their contribution as major components of vascular basement membranes (19, 20). Multiple abnormalities have been described for BM in tumor vessels compared with normal vasculature (23), such as altered thickness and reduced pericyte coverage with consequences for the maturation of the vessel. Here we observed an increased deposition of both nidogens in tumor vessels of breast carcinoma, in conjunction with their decreased proteolysis. In the other side, the over-expression of a known nidogen-protease, ADAMTS1, provokes the opposite results, an increased proteolysis accompanied by the de-localization of nidogens from the vasculature. These findings suggested that unbalanced proteolysis, by deficit or by excess, play a major role to establish the complete maturation of a vessel. In line with this observations, it is important to highlight that cleavage of nidogens occurs normally under basal or physiological conditions (manuscript in preparation and unpublished data) suggesting that their dynamic functions as a maintenance factor in the basement membrane,

together with laminin and CollIV, are mediated by their cleaved fragments, or by a combination of the intact and the processed protein.

Significantly, the increased levels of ADAMTS1 in our xenograft model led to the complete inhibition of tumor growth, in accordance to its putative anti-tumorigenic activity. Additional xenograft assays have been approached to characterize the actions of ADAMTS1, reporting decreased vessel density (11, 37) and also morphological alterations of the tumor vasculature (31), as we observed here.

As a final argument of discussion, there is an important series of reports that highlighted the pro-metastatic and pro-tumorigenic activity of ADAMTS1. For example, ADAMTS1 was found to be highly expressed in clonal populations of highly metastatic cells to bone (12), and other authors showed that its contribution to tumor development involved an induction of stroma remodelling (14). More recently, the use of a tumor-prone model for mouse mammary carcinoma reported the requirement of *adamts1* gene for invasion and progression (13). While these findings appeared contradictory to our observations, we need to remark that they even added relevance to our main goal of revealing the close presence of substrates and proteases in specific scenarios to better understand their specific role. In our side, our xenograft mouse model is not proper to evaluate metastasis, but our observations of relevant morphological changes of the vasculature in the presence of high levels of ADAMTS1 appeared to be directly related with a dysfunctional vessel, with high relevance to metastatic events. In support of this line of research, a recent manuscript showed that *nid2* knockout mice displayed an increase of lung metastases, although its BM appeared normal (29). These findings also suggest that an excessive proteolysis, as the mediated by ADAMTS1, could provoke a similar phenotype as the entire loss of a protein. In the other side, the different reports pointing to a pro-tumorigenic activity for ADAMTS1 did not consider the presence/absence of nidogens as a target for ADAMTS1. It is our hypothesis that this protease, and others by extension, will function according to its near localization with specific substrates. Consequently, a comprehensive knowledge of the functional relationships between proteases and substrates is needed to fully understand the contribution of proteases for tumor progression.

Acknowledgments

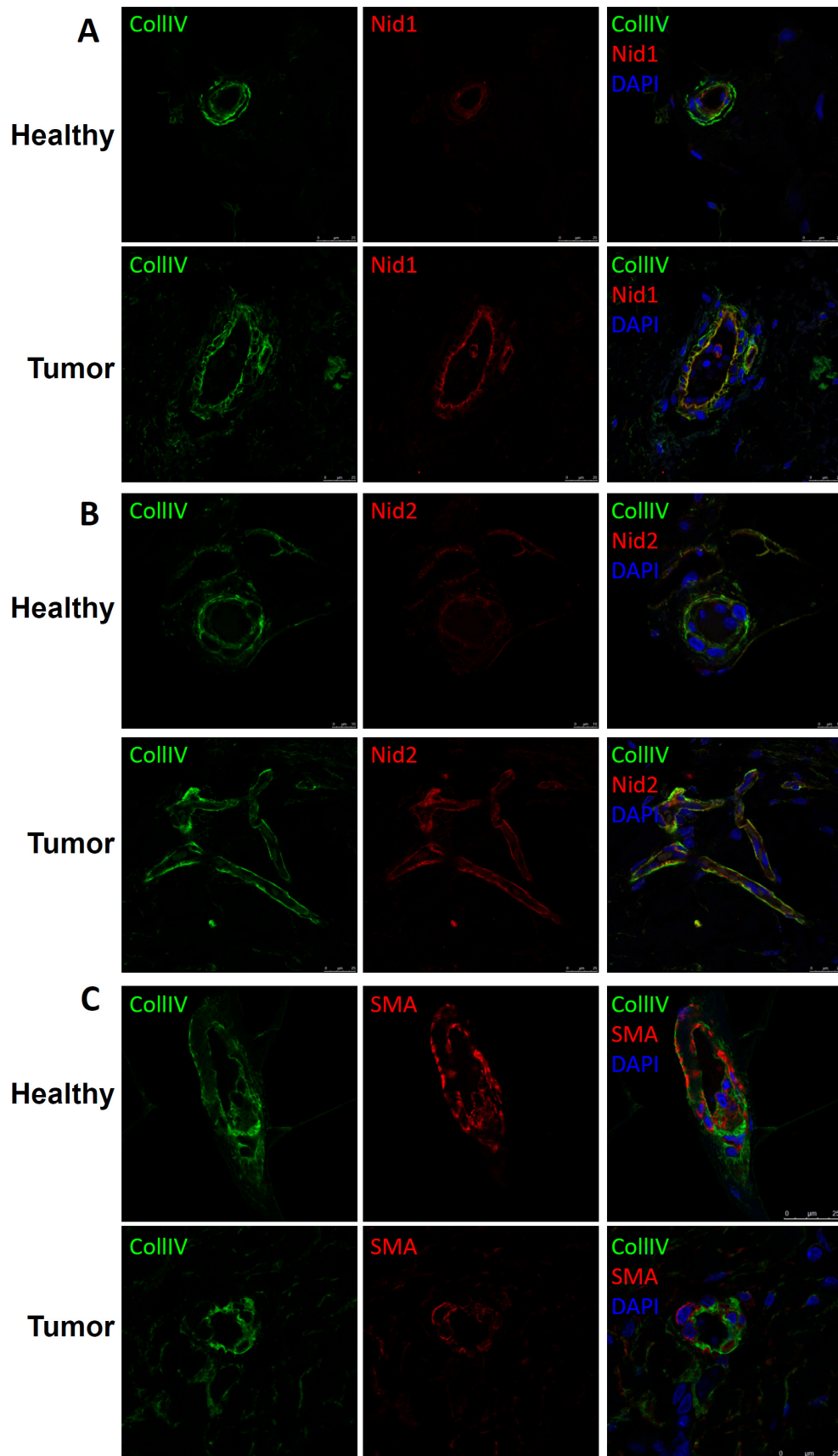
We are grateful to Dr. ML Iruela-Arispe (UCLA, USA) that kindly provided ADAMTS1 antibodies, and Dr. T Sasaki (Max-Planck-Institut für Biochemie, Germany) that kindly provided nidogen antibodies. We thank technical assistance by Raquel Palma and José Jiménez, and further support by Maurizio Scaltriti.

References

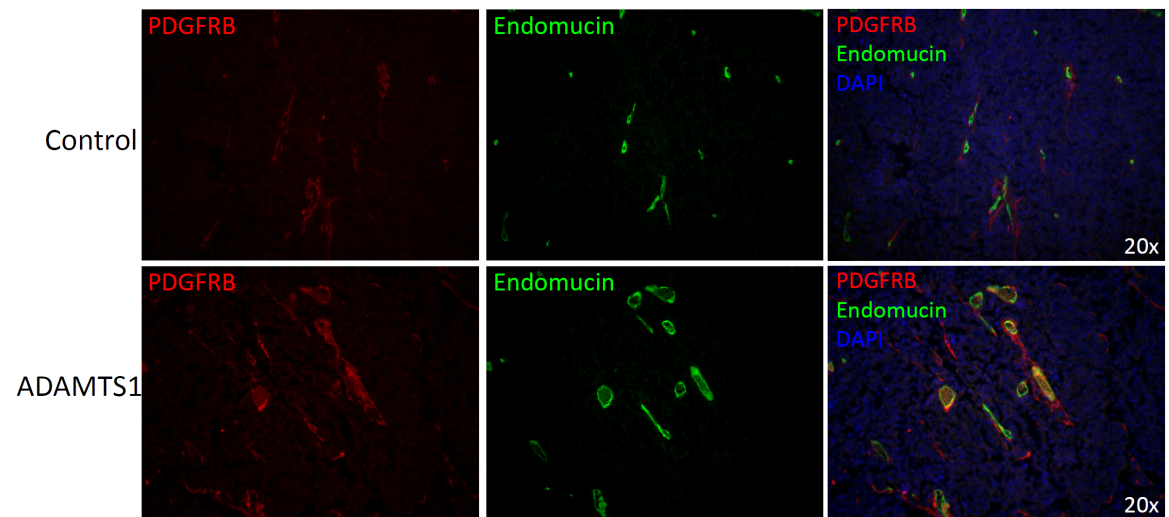
1. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439-42.
2. Lopez-Otin C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:509-19.
3. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angiogenic-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349-57.
4. Rodriguez-Manzaneque JC, Carpizo D, Plaza-Calonge Mdel C, et al. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:800-10.
5. Rodriguez-Manzaneque JC, Westling J, Thai SN, et al. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:501-8.
6. Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site which is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* 2001;276:13372-8.
7. Canals F, Colome N, Ferrer C, et al. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* 2006;6 Suppl 1:S28-35.
8. Esselens C, Malapeira J, Colome N, et al. The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem* 2010;285:2463-73.
9. Torres-Collado AX, Kisiel W, Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzaneque JC. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem* 2006;281:17827-37.
10. Reynolds LE, Watson AR, Baker M, et al. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature* 2010;465:813-7.
11. Casal C, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge Mdel C, et al. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res* 2010;70:4676-86.
12. Lu X, Wang Q, Hu G, et al. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* 2009;23:1882-94.
13. Ricciardelli C, Frewin KM, Tan ID, et al. The ADAMTS1 Protease Gene Is Required for Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Am J Pathol* 2011.
14. Rocks N, Paulissen G, Quesada-Calvo F, et al. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res* 2008;68:9541-50.
15. El Hour M, Moncada-Pazos A, Blacher S, et al. Higher sensitivity of Adamts12-deficient mice to tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2010;29:3025-32.
16. Gutierrez-Fernandez A, Fueyo A, Folgueras AR, et al. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Res* 2008;68:2755-63.
17. Porter S, Scott SD, Sassoon EM, et al. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2429-40.

18. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:422-33.
19. Fox JW, Mayer U, Nischt R, et al. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *Embo J* 1991;10:3137-46.
20. Kohfeldt E, Sasaki T, Gohring W, Timpl R. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* 1998;282:99-109.
21. Kunze A, Abari E, Semkova I, et al. Deposition of nidogens and other basement membrane proteins in the young and aging mouse retina. *Ophthalmic Res* 2010;43:108-12.
22. Miosge N, Sasaki T, Timpl R. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol* 2002;21:611-21.
23. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, et al. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2003;163:1801-15.
24. Kuk C, Gunawardana CG, Soosaipillai A, et al. Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem* 2010;43:355-61.
25. Nan H, Xu M, Zhang J, et al. Genome-wide association study identifies nidogen 1 (NID1) as a susceptibility locus to cutaneous nevi and melanoma risk. *Hum Mol Genet* 2011;20:2673-9.
26. Oivula J, Lohi J, Tani T, et al. Renal cell carcinomas and pancreatic adenocarcinomas produce nidogen in vitro and in vivo. *J Pathol* 1999;187:455-61.
27. Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, et al. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer* 2007;6:17.
28. Valente P, Noonan DM, Ogle RC, Albini A. Altered production of laminin and nidogen by high and low metastatic variants of murine melanoma cells. *Oncol Res* 1996;8:131-8.
29. Mokkapatil S, Bechtel M, Reibetanz M, et al. Absence of the Basement Membrane Component Nidogen 2, but not of Nidogen 1, Results in Increased Lung Metastasis in Mice. *J Histochem Cytochem* 2012.
30. Fokas E, Im JH, Hill S, et al. Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature. *Cancer Res* 2012;72:239-48.
31. Gustavsson H, Tesan T, Jennbacken K, et al. ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. *BMC Cancer* 2010;10:288.
32. Lee NV, Sato M, Annis DS, et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *Embo J* 2006;25:5270-83.
33. Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem* 2003;278:23656-65.
34. Viloria CG, Obaya AJ, Moncada-Pazos A, et al. Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2009;69:4926-34.
35. Lind GE, Kleivi K, Meling GI, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol* 2006;28:259-72.

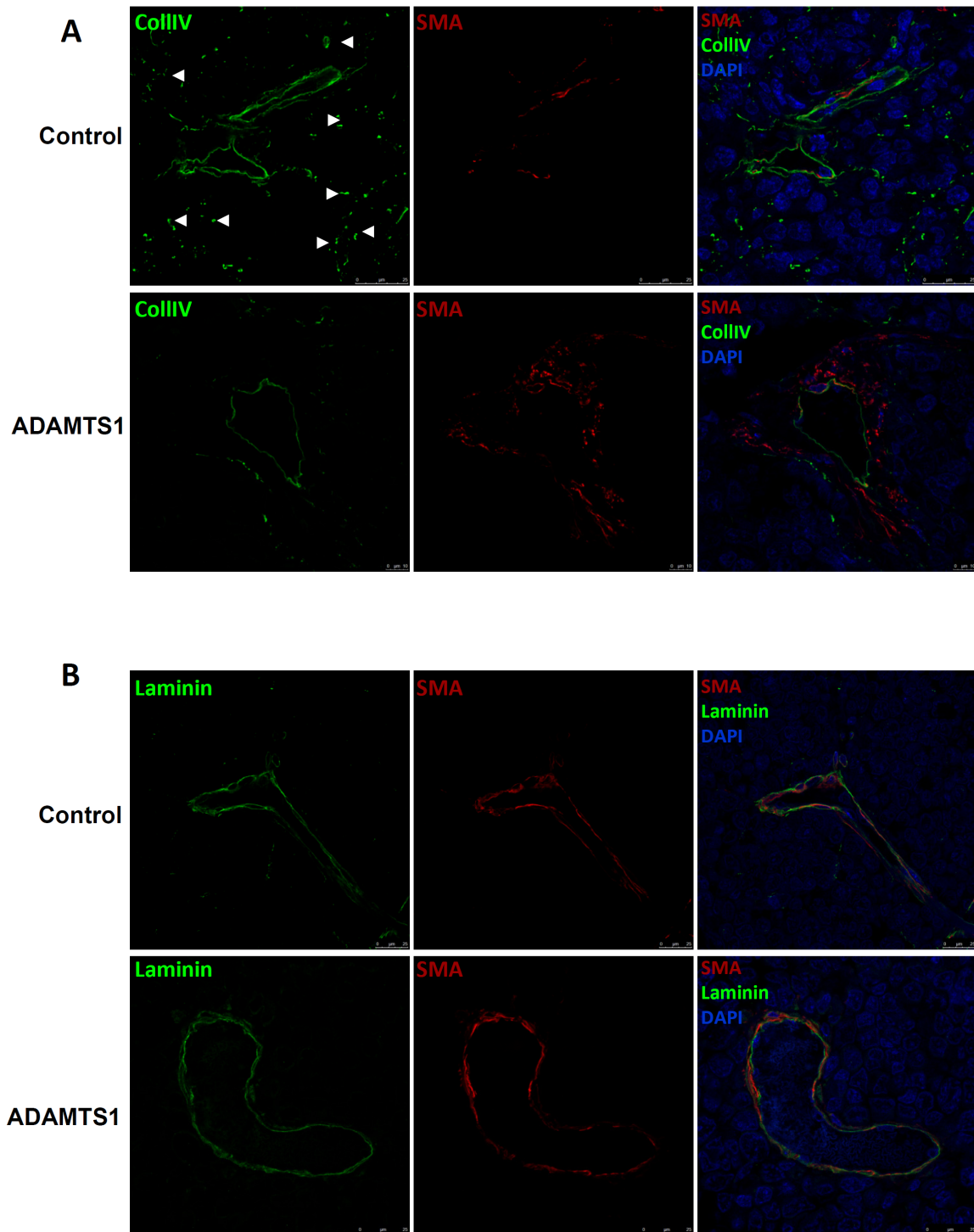
36. Dubail J, Kesteloot F, Deroanne C, et al. ADAMTS-2 functions as anti-angiogenic and anti-tumoral molecule independently of its catalytic activity. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:4213-32.
37. Iruela-Arispe ML, Carpizo D, Luque A. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:183-90.



Supplementary Figure 1 Immunolocalization of basement membrane components of healthy and tumor breast samples. A, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CollIV (green) and Nid1 (red) antibodies, nuclei were stained with DAPI (blue). B, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CollIV (green) and Nid2 (red) antibodies, nuclei were stained with DAPI (blue). C, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CollIV (green) and SMA (red) antibodies, nuclei were stained with DAPI (blue).



Supplementary Figure 2 Immunolocalization of PDGFR positive cells. Images acquired in a florescent microscope (20x magnification) for endomucin (green), PDGFRB (red) and nuclei stained with DAPI (blue) in xenograft tumors.



Supplementary Figure 3 Immunolocalization of basement membrane components on vasculature of tumor xenografts. A, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with CollIV (green) and SMA (red) antibodies, nuclei were stained with DAPI (blue). B, Confocal images (40x magnification) were acquired from samples immunolabelled with laminin (green) and SMA (red) antibodies, nuclei were stained with DAPI (blue).

Re-evaluation of the contribution of IGFBP2 in glioma. Relevance of its proteolysis induced by ADAMTS1 protease.

E Martino-Echarri¹, JJ Bech-Serra², MdelC Plaza-Calonge¹, C Casal¹, N Colomé², J Seoane², F Canals² and JC Rodríguez-Manzaneque¹

¹GENYO (Pfizer-Universidad of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research), Granada, Spain; ²Medical Oncology Research Program, Vall d'Hebron University Hospital Research Institute, Barcelona, Spain.

Correspondence:

Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque, GENYO, Avda. de la Ilustración, 114, 18007, Granada, Spain. E-mail: juancarlos.rodriguez@genyo.es

Running Title: IGFBP2 proteolysis in gliomas

Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 (IGFBP2) has been negatively correlated with progression of many tumour types, acquiring a main protagonism as a strong prognostic marker for high-grade gliomas. IGFBP2 appears as a major modulator of IGFII signalling, however its contribution to glioma progression is still been elucidated. Interestingly, all IGFBPs undergo proteolysis that provokes the bioavailability of IGFs for signalling. However these proteolytic events have not received precise attention. Extracellular proteolysis has been revealed as a basic mechanism of post-translational modifications by regulating multiple processes in development, reproduction and pathological situations. In our proteomic studies to identify substrates of the extracellular protease *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs 1* (ADAMTS1), we reported the finding of IGFBP2 fragments in conjunction with a decrease of the full-length protein. In addition we detected similar proteolytic events in gliomas cells and, more importantly, in all the human gliomas specimens evaluated, supporting the necessity to re-evaluate the contribution of IGFBP2 for glioma progression. Using public databases of gene expression in gliomas, we corroborated the relevance of IGFBP2 as a poor prognosis marker and we also observed a relevant correlation with the expression of ADAMTS1. Finally we showed the contribution of ADAMTS1 for IGFII-mediated IGF1R phosphorylation and cellular migration. Our results urge about the required evaluation of post-translational modifications of IGFBP2 in glioma, and IGFBPs in general, with main consequences regarding therapeutic approaches.

Keywords: ADAMTS1; IGFBP2; glioma; proteomics

Introduction

Recent findings are supporting the major contribution of post-translational modifications to the complex nature of the extracellular milieu. Among these processes, the knowledge of extracellular proteolysis mechanisms has acquired a leading protagonism due to its important implication in development, morphogenesis and tissue repair. Moreover alterations in the expression of proteases has been strongly associated with pathological conditions such as atherosclerosis and tumour progression (Werb, 1997). Exceptional technological progresses are allowing a detailed analysis of the repertoire of proteolytic events in the extracellular milieu, illustrated by initiatives as the Degradome project (Lopez-Otin & Overall, 2002). The knowledge of all proteases requires a parallel effort to characterize the specific substrates. Targets for proteolysis include growth factors, cell surface proteins and matrix components, which functional properties would depend on their integrity or specific fragmentation.

The extracellular protease ADAMTS1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) was first shown to display anti-angiogenic properties (Vazquez et al., 1999) and its catalytic activity has been reported on matrix and transmembrane proteoglycans (Rodriguez-Manzanegue et al., 2009; Rodriguez-Manzanegue et al., 2002; Sandy et al., 2001), and further extracellular components (Canals et al., 2006; Esselens et al., 2010; Torres-Collado et al., 2006). As regards to tumorigenesis, its role appears controversial as various reports attribute to ADAMTS1 a relevant action for metastasis (Liu et al., 2006) and tumour growth (Ricciardelli et al., 2011; Rocks et al., 2008), while its angiostatic capacities have been newly reported (Reynolds et al., 2010) and associated with a new action in events of tumour plasticity (Casal et al., 2010). Nevertheless, the specific contribution of substrates to explain ADAMTS1 actions remains unknown.

The search of these biologically relevant substrates continues as a major focus of attention in the field, therefore proteomic tools are evolving in this direction. In line with our previous approach using DIGE technology (Canals et al., 2006), here we report the use of Isotope-Coded Protein Label (ICPL) for the identification of ADAMTS1 substrates. In addition to the confirmation of some of our previous findings, we identified new putative ADAMTS1 substrates. Of special interest was the finding of several members of the IGFBP family, known to be sensitive to proteolysis (Bunn & Fowlkes, 2003). The regulatory capacities of these molecules for the bioavailability of Insulin-like Growth Factors (IGFs) appeared directly related with their proteolysis, although independent roles during cancer progression have also been reported (Firth & Baxter, 2002). The member IGFBP2 has been correlated with increased malignancy in a variety of tumours as colon, breast, ovary, prostate, but more importantly in brain tumours (Fukushima & Kataoka, 2007). These findings showed some apparent contradictions with the fact that IGFBPs were mainly considered as inhibitory factors of IGF actions, particularly IGFBP2 (Firth & Baxter, 2002). In fact, current therapeutic strategies are addressed to inhibit IGF signalling pathways but not major attention has been directed to IGFBPs as the main binding proteins of these factors, with very few exceptions (Ryan et al., 2009). The consistent findings of IGFBP2 as a prognostic factor in glioma still requires a deeper characterization, and the results reported here provided a new hit to be explored, as it is the proteolysis of IGFBP2 in this tumour context.

Results and discussion

Identification of IGFBP2 as a substrate of ADAMTS1

Protein from conditioned media from HEK293T cells, parental and ADAMTS1-overexpressors, were obtained as for previous proteomic evaluations (Canals et al., 2006). ICPL-based 1D-SDS LC-MS workflow allowed the identification of new putative substrates of ADAMTS1 (Table 1 or table in Figure 1), highlighting the identification of substrates formerly identified by other technologies. Various members of the IGFBP family (IGFBP2, IGFBP4 and IGFBP5) appeared in our analyses, in agreement with the already known proteolysis of these molecules, as a required mechanism for the release of IGFs (Bunn & Fowlkes, 2003). We approached a more profound analysis of IGFBP2 proteolysis. IGFBP2 cleavage was verified in HEK293T cells by Western-blot analysis. As a comparison to ADAMTS1 activity we included in our studies the metalloprotease MMP7, known to cleave IGFBP2 (Nakamura *et al.*, 2005). The over-expression of ADAMTS1 and MMP7 provoked the appearance of a similar small fragment (approx. 10 kDa), detected with an antibody raised against the C-end of IGFBP2 (Figure 2b). This small fragment was always detected at very low levels suggesting its low reactivity and/or instability. According to our proteomic data we expected further fragments, so we tested another antibody raised against the N-end region of IGFBP2. Importantly, this antibody showed the additional expected fragment (approx. 25 kDa), generated in the presence of both ADAMTS1 and MMP7 (Figure 2c, 2nd panel). The observed fragments matched our ICPL results (Figure 1).

The cleavage of IGFBPs in general has been mainly attributed to several MMPs although further proteases also appear to cleave these molecules as ADAMs, PAPP-A, and others (Bunn & Fowlkes, 2003). Regarding IGFBP2, various reports include MMP7 (Miyamoto et al., 2007), MMP9 (Rorive et al., 2008), and MMP1 (Rajah et al., 1996). Here we confirmed the activity of MMP7 and added the contribution of ADAMTS1 using a combination of proteomics and *in vivo* approaches. ICPL appears as a powerful technique allowing the detection of a broad spectrum of different molecular weights.

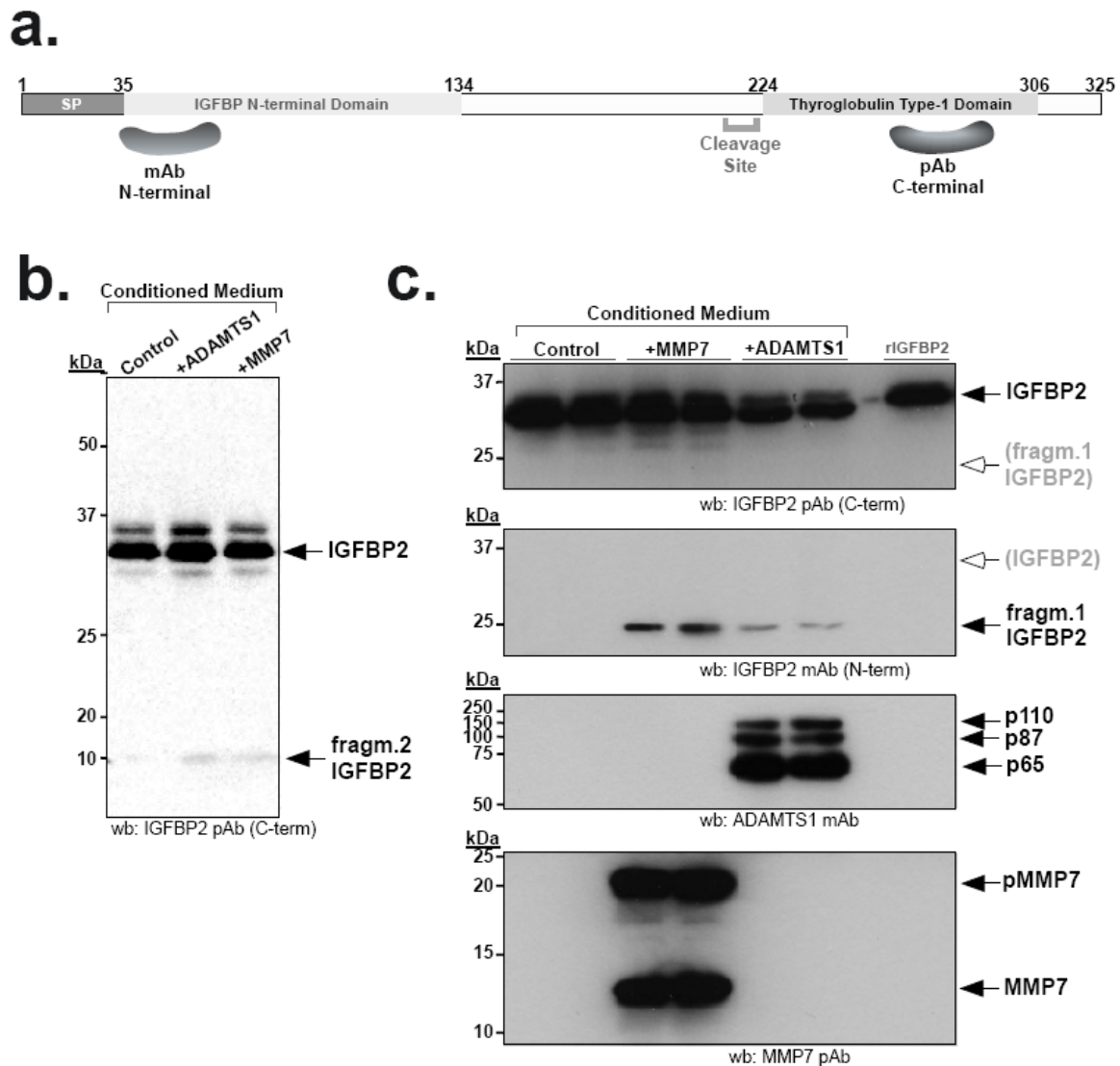


Figure 2. Proteolysis of IGFBP2 in HEK293T cells. (a) Schematic representation of IGFBP2 protein, showing the fragments used for the generation of the antibodies employed in this study (pAb C-terminal, SC-6001 (C-18); mAb N-terminal, SC-25285 (C-10), from Santa Cruz Biotechnology). Aminoacid numbering is according to UniProt Database (P18065). (b-c) 24 h CM from control or transiently transfected cells (with Fugene 6.0) with ADAMTS1 or MMP7 were collected and processed as previously reported (Canals et al., 2006). Western-blot were performed with the indicated antibodies for each panel, including IGFBP2 antibodies, ADAMTS1 mAb (5D4E11B5, kindly provided by M.L. Iruela-Arispe), and MMP7 antibody (IM71, Calbiochem). All images in (c) belong to the same blot re-probed with different antibodies; white arrow/grey letters in 1st and 2nd panels points to the area where the other fragment would appear.

IGFBP2 is endogenously cleaved in glioma

IGFBP2 has been extensively correlated with the progression of gliomas (Elmlinger et al., 2001; Lin et al., 2009; Wang et al., 2003), even its role as an oncogenic factor has been proposed (Dunlap et al., 2007; Moore et al., 2009). However its proteolytic status has not been evaluated in these studies, neither its consequences for the activation of IGFs pathways largely involved in neoplasia progression (Pollak, 2008). According to our interests we decided to investigate IGFBP2 proteolysis in human glioma cancer cell lines and tumour samples. Interestingly, we found that all cells tested showed intact IGFBP2 and a small fragment (approx. 10-15 kDa), and a larger fragment (approx. 25 kDa) was clearly detected in U251 and T98G cells (Figure 3a), sizes

that were in concordance with our results above. Expression of ADAMTS1 was confirmed in all the tested cell lines by PCR (supplemental figure 1a). As the role of ADAMTS1 has been recently described in sarcoma and melanoma cells (EW7 and MUM2B respectively) (Casal et al., 2010), we also analysed IGFBP2 proteolysis in these cells, obtaining similar patterns of proteolysis (supplemental figure 1b). The evaluation of human glioma samples also revealed important findings. While the presence of full-length IGFBP2 was not observed in all tumour samples, it was remarkable that all gliomas showed the cleaved form of IGFBP2 (Figure 3b). To our knowledge this is the first time that the cleavage of IGFBP2 is analyzed in human glioma specimens, which functional consequences need to be deeply addressed. As mentioned, the expression of IGFBP2 has been directly correlated with bad prognosis of gliomas, suggesting its role as a potential oncogenic hit. Our results revealed the necessity to re-evaluate such claims so to highlight the concomitant requirement of proteolysis to display such pro-tumourigenic properties. The influence of these findings for both prognosis and diagnosis will require important efforts. They suggest the necessity to complement basic gene expression analysis with the evaluation of post-translational modifications, such as proteolysis. Current translational and therapeutic advances are focused in the blockade of IGFs pathways, relevant in various neoplasias. Our results highlight the relevant integrity of IGFBPs and the use of specific metalloprotease inhibitors. Importantly, a recent report showed the inhibition of tumour growth by expressing a protease-resistant IGFBP4 form (Ryan et al., 2009).

Expression of IGFBP2 and ADAMTS1 displayed a direct correlation as bad prognostic markers of gliomas

As mentioned above, IGFBP2 expression has been already reported as a prognostic marker for tumour grading of gliomas (Elmlinger et al., 2001; Lin et al., 2009; Wang et al., 2003). The analysis of the National Cancer Institute public database REMBRANDT (REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa) confirmed the relevance of this molecule in gliomas. Here we showed a survival curve of glioma patients according to their IGFBP2 gene expression (Figure 3c), displaying quite significant differences among high and low-expressors (*Log-rank p-value*=6.564E-7, *Up-regul. vs. Down-regul.*; *Log-rank p-value*=1.28E-8, *Up-regul. vs. Interm.*). In a similar manner, this database allowed us to evaluate the survival plot according to expression levels of ADAMTS1 (Figure 3d). Although the differences among high and low-expressors are not as significant as for IGFBP2, they still displayed statistical relevance (*Log-rank p-value*=0.0037019463, *Down-regul. vs. Interm.*) (Data in Figure 3d). 80% of patients showed high levels of IGFBP2 and 62.5% showed intermediate to high levels of ADAMTS1, suggesting that the presence of the protease may affect the integrity of IGFBP2 in a vast number of specimens. The high number of samples in this database (up to 343 glioma patients) emphasizes the robustness of these analyses. In addition, we analyzed the Bredel study (*correlation index*=0.658), reported in oncomine.org (supplemental figure 2). This study distinguishes different grade gliomas and normal brain, displaying the higher levels of both IGFBP2 and ADAMTS1 in glioblastomas. These data suggests that the concurrent expression of IGFBP2 and ADAMTS1 might act as an inducing factor for bad prognosis. Accordingly, the correlation of the expression of both genes appears as a relevant target of further studies to approach new therapies. The implication of the protease ADAMTS1 in glioma progression is preceded by its known proteolytic activity on the proteoglycans brevican and versican (Matthews et al., 2000; Sandy et al., 2001), molecules that have been implicated in the biology of gliomas (Varga et al., 2011; Viapiano et al., 2008). Although in a mammary tumour model, versican cleavage by ADAMTS1 has been reported as mediator of the immune response favouring tumour development (Ricciardelli et al., 2011). Recently ADAMTS1 has been implicated in phenomena of tumour plasticity for the acquisition of endothelial-related features in sarcoma and melanoma (Casal et al., 2010). With apparent links, events of tumour vascularization by endothelial differentiation of glioblastomas cells have also been described as highly relevant (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). Studies regarding a potential contribution of the partnership ADAMTS1/IGFBP2 for these phenomena appeared as important to pursue.

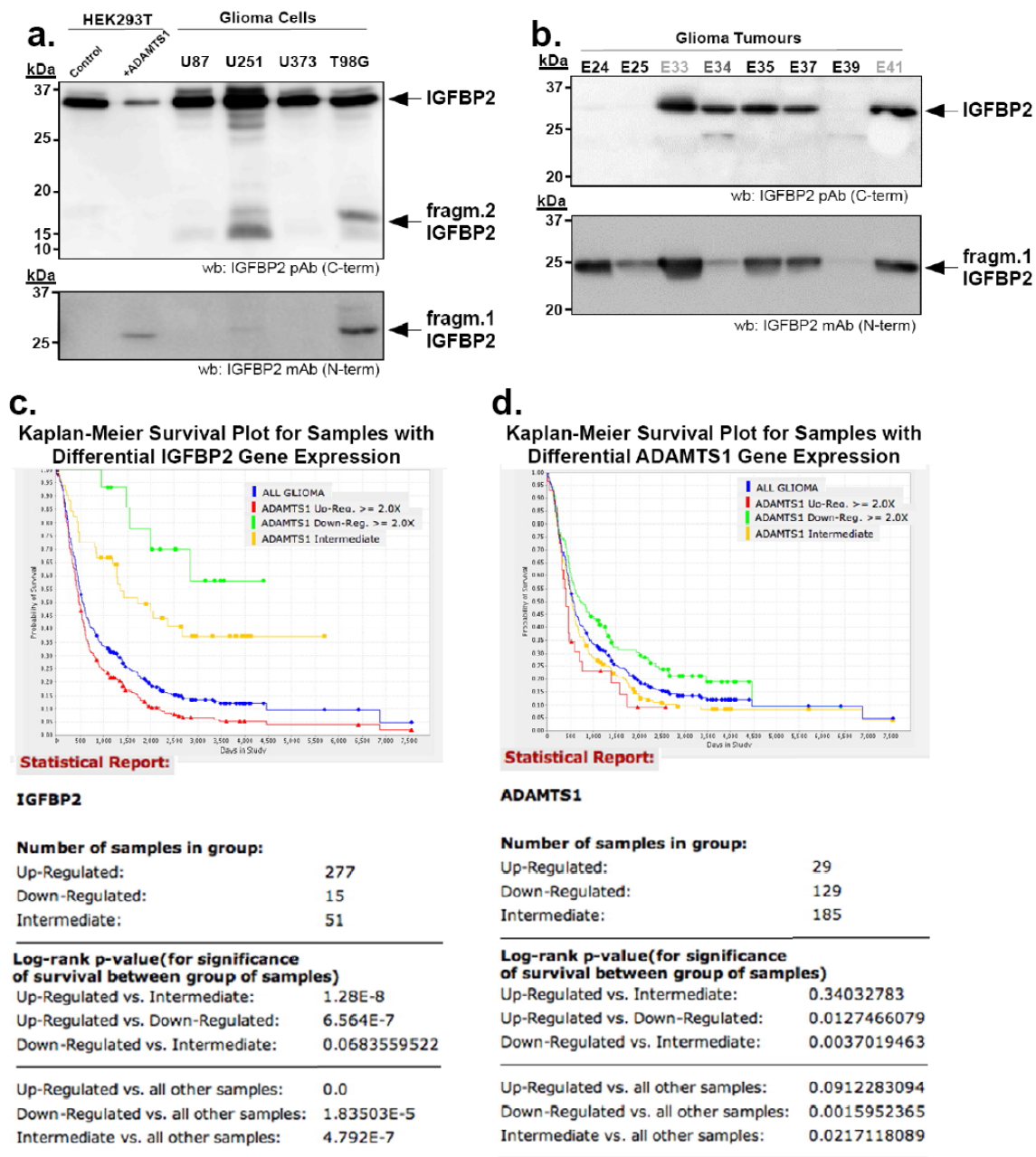


Figure 3. Relevance of IGFBP2 cleavage and ADAMTS1 in gliomas. (a) 24 h CM from glioma (U87, U251, U373 and T98G) and HEK293T cells (control and ADAMTS1-overexpressors) were collected and processed as above. Blots were probed with the indicated antibodies for IGFBP2. (b) 100 ng of protein from human glioma tumours were analysed by Western-blot with both IGFBP2 antibodies. The different samples are: Glioblastoma Multiforme (E24, E25, E35, E37, E39), Anaplastic Oligodendroglioma-Grade III (E34), and Difuse Fibrilar Astrocitoma-Grade II (E33, E41). (c-d) Evaluation of IGFBP2 and ADAMTS1 expression in the REMBRANDT database (343 glioma patients). Representation of Kaplan-Meier Survival Plot for samples with differential expression (>2) of both genes. Colour code means: Blue, all patients; Red, high expressors; Yellow, intermediate expressors; Green, low expressors. Statistical analysis is reported in the figure.

Actions of ADAMTS1 on IGFBP2 affect IGFII signalling

The consequences of IGFBP2 cleavage for the bioavailability of IGFs required further studies. In a cell culture scenario we approached the phosphorylation of the IGF1R under different conditions. We treated 3T3-IGF1R cells (a generous gift from Dr. A. Ullrich) with 24 hours conditioned media from control and ADAMTS1-overexpressor cells, previously incubated for 30 minutes with IGFII. The analysis of IGF1R phosphorylation (pIGF1R) showed increased levels in the presence of ADAMTS1 according to the increased bioavailability of the ligand IGFII (Figure 4a). The quantification of these signals showed significant differences ($p=0.0266$, Student's *t*-test) (Figure 4b). We evaluated the effects of ADAMTS1 for the release of IGFII from IGFBP2. Accordingly, we observed an increase of free IGFII in the presence of ADAMTS1 (supplementary figure 3).

In addition, we performed wound-healing assays of 3T3-IGF1R cells under similar conditions. As showed, the presence of ADAMTS1 provoked a faster closure of the wound (Figure 4c). As a quantitative tool we used the WimScratch platform (www.wimasis.com), an automated image analysis that provides unbiased results. This analysis also reported a significant difference ($p=0.040$) (Figure 4d). These results suggested that IGFII release after cleavage of IGFBP2 is relevant for the activation of IGF1R, with consequences in its phosphorylation status and migratory activity.

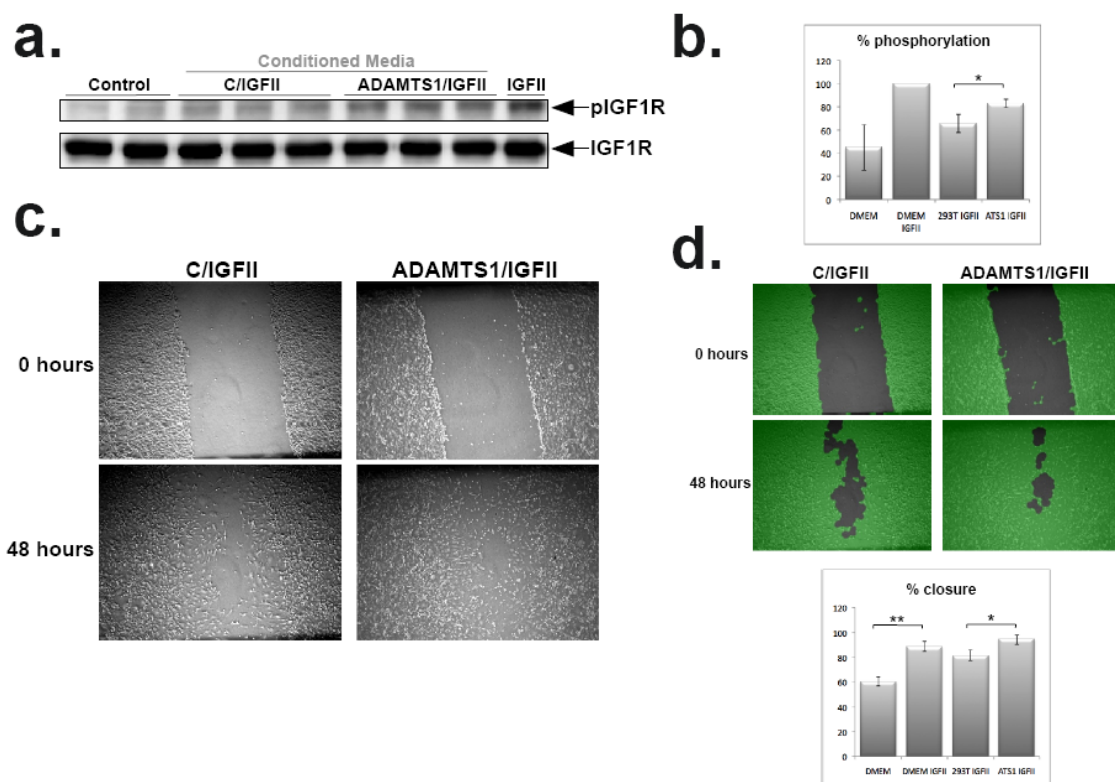


Figure 4. Effects of ADAMTS1 in IGFII signalling. For these assays, CM (from control and ADAMTS1-overexpressor cells) was previously incubated with 5 ng/ml rIGFII (30 minutes) (R&D). **(a)** 3T3-IGF1R mouse fibroblasts (overexpressing IGF1R, kindly provided by Dr. Ullrich) were kept without serum overnight to downregulate basal phosphorylation levels. Then, cells were incubated during 10 min with the specified CM. Cell lysates were harvested with RIPA buffer with protease inhibitors, and resolved for further Western-blotting analysis. Blots were probed with antibodies for the phosphorylated form of IGF1R (PS1009, Calbiochem) or for total protein (SC-713, SCBT). **(b)** Quantification of images was performed using ImageJ software. Graph shows % levels of pIGF1R. **(c)** Wound-healing assay was performed on a monolayer of confluent 3T3-IGF1R cells. Cells were washed twice and incubated with specific CM during 48 h. Pictures were taken at the specified times. **(d)** For proper quantification, images were processed by the WimScratch platform (www.wimasis.com) that provides unbiased results. Pictures in green show the computerized processing of images for further quantification. Graph shows the results of triplicate wells of two-three different experiments. Statistics are the results of T-test analysis (For panels b and d: *, $p<0,05$; **, $p<0,005$).

Extrapolating these results to a glioma context, where proteolysis of IGFBP2 appeared positively regulated, would support an increased bioavailability of IGFII factor with major consequences tumour cell proliferation, migration and invasiveness.

In this report we demonstrated the increasing value of ICPL technology to approach the identification of substrates of proteases in a biological scenario. In addition our results provide new information regarding a potential unknown role for this ADAMTSs family of extracellular proteases that imply the activity of insulin-like growth factors. Our results demonstrate the finding of IGFBP2 cleavage by ADAMTS1 obtained by ICPL. In addition strong endogenous cleavage of IGFBP2 is detectable in different tumour cell lines and in GMB samples. These observations suggest the importance of post-translational modifications over IGFBP2 to determine its function.

In conclusion, our results strongly suggest the necessity to re-evaluate current therapies conducted against IGF signalling in glioma. Although our perspective does not minimize the relevance of IGF-targeted therapies, we proposed that the analysis of IGFBP2 proteolysis will provide major inputs to properly modify or implements current strategies, such as the potential value of specific proteolytic inhibitors or even the use optimized IGF-binding partners to prevent the excessive bioavailability of IGFs to tumour cells. Our result put in evidence that the cleavage status of IGFBP2 would reveal a major switch-point to determine the functional IGF signalling. The capability to maintain IGFBP2 uncleaved will allow the retaining of IGFII so it is not promoting proliferative and invasiveness features of cancer cells. Finally, the most recent perspectives highlighting the near use of personalized medicine are obliged to direct more attention to post-translational modifications.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

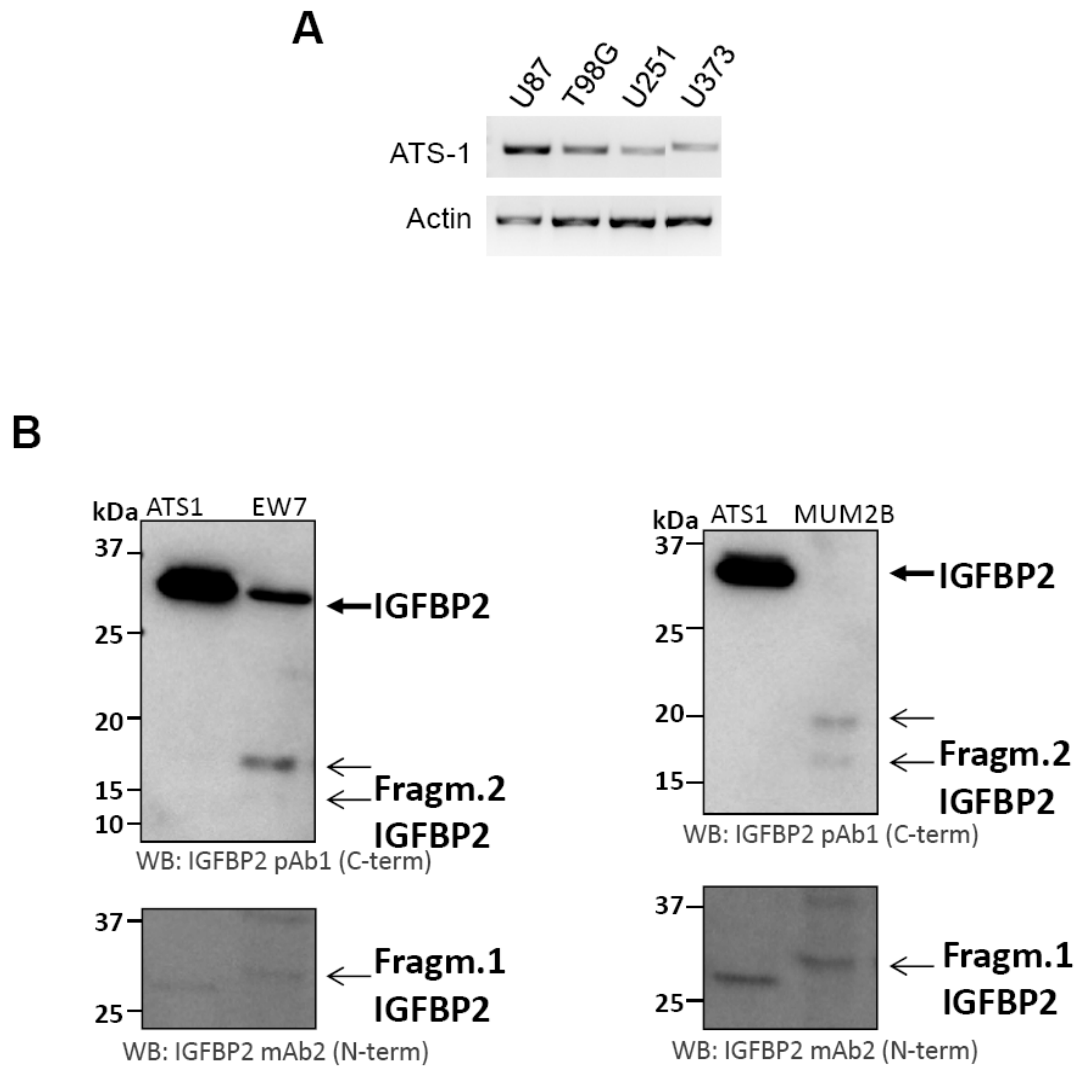
3T3-IGF1R cells were kindly provided by Prof. Axel Ullrich, (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany). ADAMTS1 antibody (clone 5D4E11B5) was a generous gift by M.L. Iruela-Arispe (UCLA, USA).

This work was supported by grants EMER07/055 and PI10/00883 (co-financed by FEDER through PN I+D+i 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III) and from the CEIC (P10-CTS5865) to JCR-M.

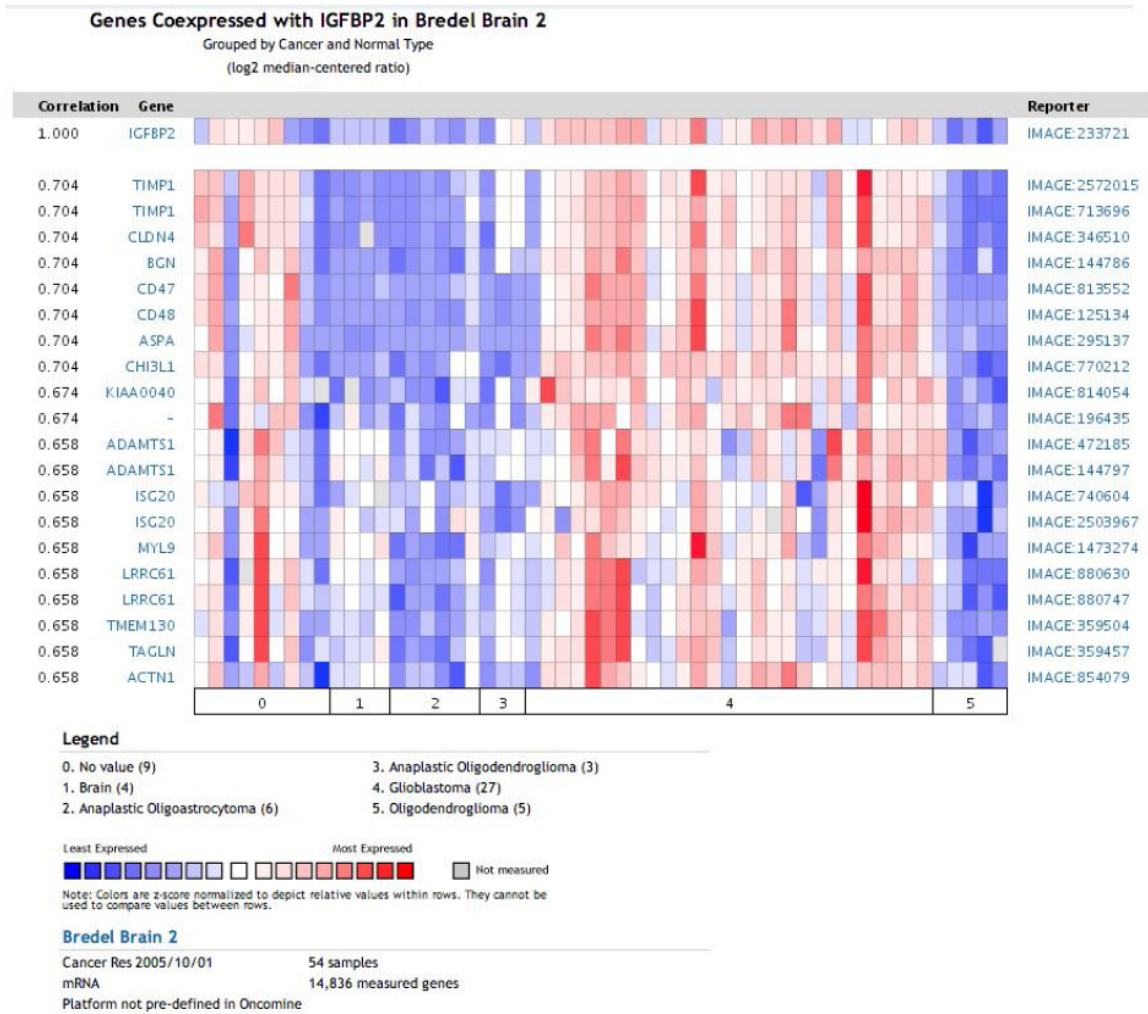
References

- Bunn RC, Fowlkes JL. (2003). Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 176-81.
- Canals F, Colome N, Ferrer C, Plaza-Calonge Mdel C, Rodriguez-Manzaneque JC. (2006). Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics* **6 Suppl 1**: S28-35.
- Casal C, Torres-Collado AX, Plaza-Calonge Mdel C, Martino-Echarri E, Ramon YCS, Rojo F *et al.* (2010). ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res* **70**: 4676-86.
- Dunlap SM, Celestino J, Wang H, Jiang R, Holland EC, Fuller GN *et al.* (2007). Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes glioma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11736-41.
- Elmlinger MW, Deininger MH, Schuett BS, Meyermann R, Duffner F, Grote EH *et al.* (2001). In vivo expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* **142**: 1652-8.
- Esselens C, Malapeira J, Colome N, Casal C, Rodriguez-Manzaneque JC, Canals F *et al.* (2010). The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem* **285**: 2463-73.
- Firth SM, Baxter RC. (2002). Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocr Rev* **23**: 824-854.
- Fukushima T, Kataoka H. (2007). Roles of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in glioblastoma. *Anticancer Res* **27**: 3685-92.
- Lin Y, Jiang T, Zhou K, Xu L, Chen B, Li G *et al.* (2009). Plasma IGFBP-2 levels predict clinical outcomes of patients with high-grade gliomas. *Neuro Oncol* **11**: 468-76.
- Liu YJ, Xu Y, Yu Q. (2006). Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* **25**: 2452-67.
- Lopez-Otin C, Overall CM. (2002). Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 509-19.
- Matthews RT, Gary SC, Zerillo C, Pratta M, Solomon K, Arner EC *et al.* (2000). Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/Brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J. Biol. Chem.* **275**: 22695-22703.
- Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y *et al.* (2007). Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix. *Cancer Sci* **98**: 685-91.
- Moore LM, Holmes KM, Smith SM, Wu Y, Tchougounova E, Uhrbom L *et al.* (2009). IGFBP2 is a candidate biomarker for Ink4a-Arf status and a therapeutic target for high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16675-9.
- Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Ishii G, Hasebe T, Chiba T *et al.* (2005). Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 1011-6.
- Pollak M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* **8**: 915-28.
- Rajah R, Nunn SE, Herrick DJ, Grunstein MM, Cohen P. (1996). Leukotriene D4 induces MMP-1, which functions as an IGFBP protease in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* **271**: L1014-22.
- Reynolds LE, Watson AR, Baker M, Jones TA, D'Amico G, Robinson SD *et al.* (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature* **465**: 813-7.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T *et al.* (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**: 824-8.

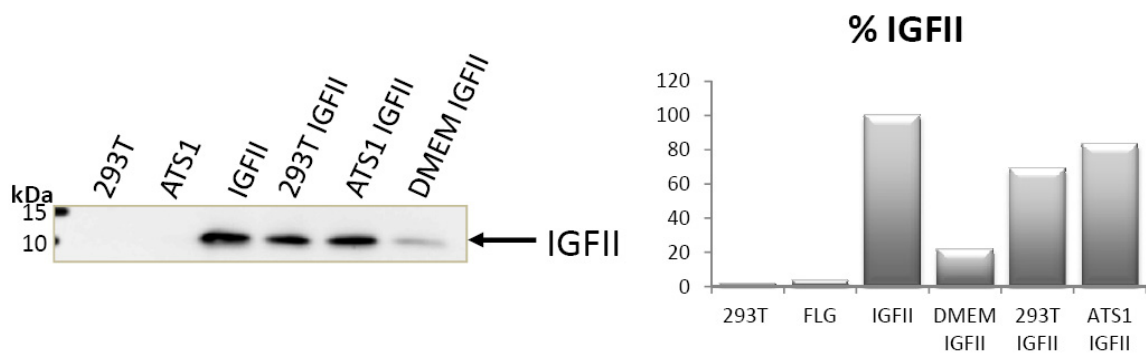
- Ricciardelli C, Frewin KM, Tan ID, Williams ED, Opeskin K, Pritchard MA *et al.* (2011). The ADAMTS1 Protease Gene Is Required for Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Am J Pathol.*
- Rocks N, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Munaut C, Gonzalez ML, Gueders M *et al.* (2008). ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res* **68**: 9541-50.
- Rodriguez-Manzaneque JC, Carpizo D, Plaza-Calonge Mdel C, Torres-Collado AX, Thai SN, Simons M *et al.* (2009). Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 800-10.
- Rodriguez-Manzaneque JC, Westling J, Thai SN, Luque A, Knauper V, Murphy G *et al.* (2002). ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 501-8.
- Rorive S, Berton A, D'Haene N, Takacs CN, Debeir O, Decaestecker C *et al.* (2008). Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas. *Glia* **56**: 1679-90.
- Ryan AJ, Napoletano S, Fitzpatrick PA, Currid CA, O'Sullivan NC, Harmey JH. (2009). Expression of a protease-resistant insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer. *Br J Cancer* **101**: 278-86.
- Sandy JD, Westling J, Kenagy RD, Iruela-Arispe ML, Verscharen C, Rodriguez-Manzaneque JC *et al.* (2001). Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site which is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* **276**: 13372-13378.
- Torres-Collado AX, Kisiel W, Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzaneque JC. (2006). ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem* **281**: 17827-37.
- Varga I, Hutoczi G, Szemcsak CD, Zahuczky G, Toth J, Adamecz Z *et al.* (2011). Brevican, Neurocan, Tenascin-C and Versican are Mainly Responsible for the Invasiveness of Low-Grade Astrocytoma. *Pathol Oncol Res.*
- Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M *et al.* (1999). METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* **274**: 23349-57.
- Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT. (2008). BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol* **88**: 261-72.
- Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH *et al.* (2003). Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* **63**: 4315-21.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A *et al.* (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**: 829-33.
- Werb Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* **91**: 439-442.



Supplementary figure 1. (a) RT-PCR for ADAMTS1 and actin expression in glioma cell lines. (b) WB for 24h CM from EW7 and MUM2B cell lines (sarcoma and melanoma respectively) with C-terminal and N-terminal recognising antibodies for IGFBP2. We used 24h conditioned media from HEK293 ADAMTS1 transfected as positive control.



Supplementary figure 2. OncoPrint (oncoPrint.org) results for Bredel study showing a correlation between IGFBP2 and ADAMTS1 expression in glioma patients (*correlation index=0.658*).



Supplementary figure 3. WB for 24h CM (from control and ADAMTS1-overexpressor cells) previously incubated with 5 ng/ml rIGFII (30 minutes) (R&D). IGFII released in preincubated media in different conditions is detected. Quantification of WB image is performed with ImageJ software by signal intensity translation to area of the signal, % are calculated taking IGFII signal as 100% intensity.

DISCUSIÓN

Los mecanismos de proteólisis extracelular son necesarios para permitir la remodelación del entorno extracelular y la movilización celular para dar respuesta a los estímulos fisiológicos o patológicos. Las metaloproteasas son una familia muy importante de proteasas extracelulares. Esta familia está compuesta a su vez por tres grandes familias: MMPs, ADAMs y ADAMTSs, que principalmente difieren en algunos detalles de su estructura. Nuestro interés se ha centrado en el estudio del primer miembro de las ADAMTSs. ADAMTS1 fue descrita inicialmente como una proteasa relacionada con inflamación (Kuno et al., 1997). Varios ensayos posteriores determinan su importancia en la inhibición de la angiogénesis (Vazquez et al., 1999) y su función protectora del crecimiento tumoral (Reynolds et al., 2010). Con posterioridad, a numerosas proteasas se les han atribuido funciones similares de protector de tumores como MMP8 y ADAMTS12 (El Hour et al., 2010; Gutierrez-Fernandez et al., 2008). Otros ensayos han resaltado la función de ADAMTS1 en el desarrollo metastásico (Liu et al., 2006).

En el afán de explicar y entender en detalle las funciones de las proteasas se originó el proyecto del degradoma (Lopez-Otin and Overall, 2002). Consiste en la determinación de los sustratos de cada proteasa y la descripción de los tejidos y situaciones específicas en que estas se expresan. Mediante el conocimiento global de los sustratos de cada proteasa y el conocimiento de su mapa de expresión será posible definir las funciones específicas o compensatorias de cada proteasa.

Entre los primeros sustratos conocidos de ADAMTS1 figuran los proteoglicanos agregcano, versicano y brevicano. Sin embargo, nuevas dianas están apareciendo para esta proteasa como han sido el sindecano-4, semaforina 3C, y los nidógenos. Estos últimos han captado nuestra atención por ser componentes de las BM que rodean cada capa endotelial. En nuestros resultados se demuestra que su procesamiento por ADAMTS1 modifica su localización en la BM lo que va acompañado de cambios en la morfología vascular que afectan al desarrollo tumoral y potencialmente al desarrollo de metástasis.

Además, en la identificación de nuevos sustratos de ADAMTS1, se ha encontrado el IGFBP2 como un sustrato no descrito previamente. En el estudio de su función en glioma, donde numerosas publicaciones resaltan su importante sobreexpresión, se ha determinado que ADAMTS1 también aparece como un potencial marcador de la mala progresión de la enfermedad. Estos resultados resaltan la implicación de la proteasa y la elevada expresión de su sustrato en gliomas, pudiendo ambas moléculas tener un efecto potenciador de la mala progresión a través de la elevada proteólisis del IGFBP2 observada en muestras de glioma.

1 Efecto antiangiogénico de ADAMTS1

Tras su descubrimiento en relación con inflamación (Kuno et al., 1997), en varios estudios se ha demostrado que la proteasa ADAMTS1 tiene un potente efecto antiangiogénico en varios modelos *in vivo* e *in vitro* (Iruela-Arispe et al., 2003; Vazquez et al., 1999). Incluso se determina que su efecto inhibitor sobre la angiogénesis es más potente que la de otros ya conocidos como TSP1 y endostatina (Luque et al., 2003).

Recientemente, y de manera muy relevante, en el modelo animal Tc1 de DS hemos encontrado ADAMTS1 como uno de los genes importantes para la mediación del efecto antiangiogénico

observado en el ratón. Las observaciones de una menor incidencia de tumores sólidos en personas que presentan DS llevó al estudio del modelo animal Tc1. En la inyección de células tumorales en los ratones Tc1 se observa un menor crecimiento tumoral que parece tener relación directa con una menor densidad vascular. La implicación de ADAMTS1 en este efecto antiangiogénico se desarrolló más específicamente con el ensayo del anillo de aorta. Mediante la extracción y procesamiento de la aorta del ratón y estimulación con factores angiogénicos, nuevos brotes de naturaleza endotelial se generan a partir del tejido de la aorta. El conteo del número de brotes ayuda a determinar si existen diferencias en el potencial angiogénico en diferentes situaciones. Estos anillos pueden someterse a infección con virus, inhibición de la expresión de determinados genes, etc. De hecho, en este trabajo se lleva a cabo la inhibición parcial de la expresión de ADAMTS1 en los anillos de animal Tc1, a niveles del animal wt, consiguiendo revertir el efecto antiangiogénico observado en el animal Tc1. Además de la inhibición de la expresión de ADAMTS1, se observa también un incremento en el número de brotes a partir del anillo del animal het para *adamts1*, indicando de nuevo que ADAMTS1 es una molécula antiangiogénica (Reynolds et al., 2010). Realizamos otro ensayo que consiste en la disección de la retina, que es otro modelo de angiogénesis, en el que se seleccionan retinas de animales de entre el día 3 o día 7 postnatal con diferente fondo genético para observar el desarrollo del plexo vascular. Del mismo modo que para el anillo de aorta, para las retinas del animal Tc1 encontramos un efecto antiangiogénico demostrado a través del retraso en el crecimiento del plexo vascular. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión sostenida de la proteasa ADAMTS1 produce defectos en la migración e invasión de las ECs.

Entre los artículos que intentan elucidar los mecanismos de acción de la proteasa en angiogénesis, una publicación demuestra que ADAMTS1 inhibe la proliferación de ECs mediante el secuestro por unión directa al VEGF-A en su extremo C-terminal, indicando la función antiangiogénica de ADAMTS1 (Luque et al., 2003). En un trabajo previo se observó cómo la capacidad antiangiogénica de ADAMTS1 está mediada en parte por los dominios TSP localizados en el extremo C-terminal (Rodríguez-Manzaneque et al., 2000), lo que se ajusta a la capacidad de secuestro de la proteasa en su extremo C-terminal del VEGF-A. Sin embargo, posteriores publicaciones demuestran que el dominio catalítico también tiene una importante función antiangiogénica en tumores mediante el uso del mutante inactivo de la proteasa (Iruela-Arispe et al., 2003). En nuestros resultados observamos que la sobreexpresión de ADAMTS1 por infección lentiviral en el modelo del anillo de aorta inhibe la formación de brotes. Sin embargo, esta inhibición no ocurre de manera tan potente en presencia del mutante inactivo de ADAMTS1, indicando que su dominio catalítico va a ser determinante para su acción antiangiogénica. Por tanto, nuestras observaciones sugieren que ADAMTS1 realiza su función antiangiogénica a través del procesamiento de sus sustratos.

2 ADAMTS1 como modulador de angiogénesis

En contraste con el efecto antiangiogénico más conocido para ADAMTS1 nuevas publicaciones aportan evidencias de que esta proteasa es necesaria para la movilización de ECs que permitirán la formación de nuevos vasos. Por ejemplo, experimentos con el ensayo de tubulogénesis en colágeno muestran datos en esta dirección. Este ensayo consiste en la formación de una matriz tridimensional de colágeno I sobre la que se siembran ECs, y mediante estimulación con factores

angiogénicos las ECs son capaces de invadir dicha matriz. En uno de los trabajos se describe que la inhibición de la proteasa bloquea la invasión y el crecimiento del brote (Su et al., 2008). Además, en este trabajo muestran cómo las ECs sobreexpresan ADAMTS1 en momentos iniciales del crecimiento del brote siendo a las 6 horas cuando se detecta un incremento mayor en su expresión. En otro ensayo en el que las ECs son sometidas a hipoxia, principal estímulo angiogénico, encuentran que a las 3 horas hay un pico de expresión para ADAMTS1 a partir del cual se reduce de nuevo su expresión (Hatipoglu et al., 2009). En este último trabajo se demuestra cómo la adición exógena de ADAMTS1 a un cultivo de ECs promueve la movilización y migración celular. Ambos trabajos van en la misma línea e indican la necesidad de las ECs de expresar ADAMTS1 para hacer frente a las señales angiogénicas promovidas por hipoxia o mediante estimulación con factores de crecimiento. En nuestros resultados para el ensayo del anillo de aorta del animal *adamts1* ko, se obtiene una disminución muy fuerte en el número de brotes a partir del anillo en comparación con el wt. Estos resultados contrastan con las observaciones obtenidas para los anillos del animal het para *adamts1*, en el que se obtiene un incremento en el número de brotes en comparación con el control. Estas observaciones para el animal ko pueden estar relacionadas con los trabajos que resaltan la función y la necesidad de la expresión de ADAMTS1 para la movilización de las ECs en el proceso de angiogénesis. Por tanto, nuestras observaciones indican que la proteasa es necesaria en la iniciación de los nuevos brotes para la invasión y migración de ECs ante señales proangiogénicas en el ensayo del anillo de aorta. Sin embargo, la expresión sostenida de la proteasa ejerce una función inhibitoria de angiogénesis como es el caso del animal Tc1 o los niveles reducidos de manera sostenida en el animal het, así como los modelos de sobreexpresión de la proteasa.

En un trabajo realizan el aislamiento de ECs a partir de retinas frescas de animales *dll4* het para elucidar los genes implicados en la invasión durante la formación del plexo inicial de la retina. El análisis de los genes de expresión modificados permite detectar el aumento en la expresión de ADAMTS1 en las ECs de retinas del *dll4* het (del Toro et al., 2010). Estos datos sitúan la expresión de ADAMTS1 en las células de la punta, es decir, en el frente invasivo de las ECs. Sin embargo, en nuestras observaciones para las retinas del animal Tc1, ADAMTS1 parece tener una función inhibitoria de la angiogénesis. Estos resultados pueden indicar que el incremento en la presencia de la proteasa, a través del excesivo procesamiento de las proteínas de la BM vascular, produce defectos en la migración e invasión de las ECs. Puede que en el estudio detallado de las retinas de los animales wt, het y ko para *adamts1* arroje más luz sobre el efecto de la proteasa en este modelo de angiogénesis.

En adición, una publicación reciente describe cómo el equilibrio en la expresión de TIMP3 y ADAMTS1 regulará la actividad de los PCs, siendo TIMP3 es el inhibidor endógeno más potente para ADAMTS1 (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002). TIMP3 está expresado a elevadas cantidades de manera basal en PCs, no obstante, los PCs disminuyen la expresión de TIMP3 cuando se activan y al mismo tiempo comienzan a expresar la proteasa ADAMTS1 (Schimpf et al., 2012). En el trabajo mencionado observan también como elevadas cantidades de TIMP3 inhiben totalmente la formación de estructuras tubulares pudiendo indicar que la inhibición total de la proteasa ADAMTS1 está bloqueando la posibilidad de formación de estructuras tubulares por parte de las ECs y los PCs. Este ensayo es una modificación del anterior, en el que en la matriz tridimensional de colágeno I se embeben las ECs con o sin PCs y mediante

estimulación con factores proangiogénicos son capaces de generar estructuras tubulares. Por tanto, esta es otra evidencia de que ADAMTS1 puede jugar un papel esencial en el inicio de la angiogénesis. ADAMTS1 parece ser imprescindible para la formación del plexo inicial de la vasculatura a través de la promoción de la migración y la invasión de ECs.

Estos efectos proangiogénicos observados para ADAMTS1 son adicionales pero no opuestos a los discutidos por su acción antiangiogénica. Ya que en su función proangiogénica se demuestra que ADAMTS1 es un gen de respuesta rápida que reduce drásticamente su expresión unas horas después del inicio del proceso. Estas observaciones indican su efecto estimulador inicial, hasta 6 horas después del inicio de la angiogénesis, pero la expresión sostenida de VEGF ante los estímulos angiogénicos no se verá afectada a largos tiempos, por la expresión inicial de ADAMTS1. Parece que los niveles de expresión de la proteasa ADAMTS1 van a regular de manera dependiente de dosis la angiogénesis; en ausencia de la proteasa la capacidad angiogénica se ve comprometida, en presencia de una copia del gen de la proteasa se incrementa la angiogénesis, en presencia de dos copias del gen la angiogénesis ocurre de manera normal y en presencia de una copia extra del gen, tres copias en total, hay una disminución en la angiogénesis. Estas observaciones demuestran que la proteasa tiene un efecto antiangiogénico consistente pero a su vez es imprescindible para permitir la invasión de ECs que formen los nuevos brotes. Además, en nuestros resultados parece evidente que la proteasa a través de la proteólisis de determinados sustratos específicos va a dirigir el desarrollo tumoral en una u otra dirección.

El animal ko para *adamts1* evidencia defectos en la distribución de la vasculatura en ovario (Shozu et al., 2005) y además son muchas las afecciones en el crecimiento y en el desarrollo de los riñones y ovarios de los animales deficientes (Shindo et al., 2000). Sin embargo, esta ausencia de la proteasa en el animal deficiente no impide la formación de vasos en los tejidos como ocurre en el anillo de aorta. Es posible que la ausencia de ADAMTS1 durante el desarrollo se vea solventada mediante la compensación por otras proteasas con posibles efectos similares. Sin embargo, en estado adulto y en un contexto aislado como supone el anillo de aorta, las compensaciones se verán bloqueadas por lo que somos capaces de determinar grandes diferencias en el número de brotes. En adición a los defectos que detectamos en la formación de brotes en el ensayo del anillo de aorta para el modelo animal del Tc1, mediadas en parte por ADAMTS1 (Reynolds et al., 2010), mostramos también que los animales Tc1 presentan un retraso en el desarrollo de la retina. Es difícilmente demostrable que el incremento en la expresión de ADAMTS1 en el animal Tc1 es el responsable del retraso en la formación del plexo de la retina, aunque basándonos en la demostración para el ensayo de aorta sugiere que ADAMTS1 es uno de los responsables de dicho efecto. Además, en el modelo de retina enriquecido para células de la punta la expresión de ADAMTS1 se ve incrementada indicando que ADAMTS1 es importante en el frente invasivo de la retina y por tanto las modificaciones en su nivel de expresión en el Tc1 pueden ser las responsables del efecto inhibitorio observado (del Toro et al., 2010).

3 ADAMTS1 en cáncer

Como ya hemos comentado, ADAMTS1 muestra una función antitumoral como consecuencia de su efecto inhibitorio de angiogénesis como se demuestra en el modelo del animal Tc1 y en otros ensayos con xenógrafos (Iruela-Arispe et al., 2003; Reynolds et al., 2010). Sin embargo, otras

publicaciones apuntan a que esta proteasa puede tener también una implicación en el desarrollo de metástasis (Lu et al., 2009).

Respecto a este segundo grupo de publicaciones se tiene que destacar un trabajo con xenógrafos sometidos a inyección de células de origen humano de carcinoma de mama, se observa una inducción en la expresión de ADAMTS1 en las células con elevado potencial metastásico (Kang et al., 2003). Estas células que sobreexpresan ADAMTS1 ejercen su función junto con MMP1 a través de la proteólisis del ligando parecido a EGF (Ligando parecido al factor de crecimiento epidérmico, *Epidermal Growth Factor-like ligands*) que dirigirá la metástasis a hueso (Lu et al., 2009). En línea con estas observaciones, en otro trabajo, estudian la expresión de la proteasa en pacientes de cáncer de mama relacionando los niveles de expresión con la peor prognosis de los pacientes. Además, detectan un aumento en la expresión de ADAMTS1 en las metástasis a hueso (Casimiro et al., 2012). Nuestras observaciones en muestras de mama de pacientes muestran que existe una disminución en la expresión de la proteasa en los tumores en comparación con el tejido sano, nuestros resultados parecen opuestos a las que señalan en este último trabajo. Por otro lado, en un modelo espontáneo de carcinoma de mama en el animal ko para *adamts1* observan que la presencia de ADAMTS1 es necesaria en la generación de tumores. Parece que ADAMTS1 a través de la proteólisis de versicano favorece una respuesta inmune favorable al crecimiento del tumor (Ricciardelli et al., 2011). De manera relevante en este, como en el nuestro, se resalta que la acción de la proteasa ADAMTS1 está mediada a través de su función proteolítica de sustratos específicos. Además, en otro trabajo observan como la sobreexpresión de ADAMTS1 en una línea tumoral epitelial promueve el crecimiento tumoral a través de una reacción del estroma mediante el reclutamiento de fibroblastos para remodelación de la ECM (Rocks et al., 2008). En un trabajo se intenta explicar la acción dual de la proteasa a través de su estado proteolítico (Liu et al., 2006). Determinan que la proteasa en su estado intacto tiene efecto prometastásico y los fragmentos tienen actividad antimetastásica.

En nuestros análisis de muestras de mama humanas se detecta una menor expresión de la proteasa ADAMTS1 en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano colindante. Estas observaciones fueron hechas ya con anterioridad mediante en un estudio que incluía el análisis de otros miembros de la familia de las ADAMTSs (Porter et al., 2004). Ambas observaciones sugieren que la proteasa ADAMTS1 tiene una función protectora ante el crecimiento tumoral. Además, nuestro análisis de bases de datos públicas con elevado número de pacientes se corrobora que ADAMTS1 aparece fuertemente inhibida en los tumores de mama en comparación con el tejido sano. Estos resultados aportan más robustez a nuestras observaciones dado el elevado número de pacientes analizados y el uso de datos procedentes de cuatro estudios independientes.

En nuestras observaciones del xenógrafo generado mediante inyección de HEK293T parentales o sobreexpresoras de ADAMTS1 en ratones inmunodeprimidos, la presencia de la proteasa produce una inhibición casi total del desarrollo tumoral corroborando su potencial protector ante el desarrollo de tumores. También, la observación macroscópica de los tumores indica que tienen una consistencia marcadamente diferente con una apariencia más compacta en los controles que en el caso de ADAMTS1. Esas observaciones macroscópicas pueden ser consecuencia del incremento en el diámetro de la vasculatura detectado en los tumores con elevada expresión de ADAMTS1, o también puede estar motivado por alteraciones en la

composición de su ECM. En adición al incremento en el diámetro de los vasos, los tumores presentan una reducción en la densidad vascular sugiriendo defectos en su funcionalidad. Estas alteraciones en la vasculatura han sido descritas con anterioridad y relacionadas con anomalías en la funcionalidad de los vasos que no hemos sido capaces de detectar hasta el momento en nuestras muestras (Goel et al., 2011). A nuestro entender, la función proteolítica de ADAMTS1 sobre los nidógenos causa una deslocalización casi total de los mismos de la membrana basal que puede ser el inductor del ensanchamiento en la luz del vaso y las posibles deficiencias en la funcionalidad de la vasculatura. Observaciones previas, muestran que las membranas basales en los tumores sufren alteraciones que en parte pueden ser las causantes de las modificaciones en la morfología de la vasculatura (Baluk et al., 2003). Apoyando nuestra hipótesis de que el excesivo procesamiento de los nidógenos puede ser el causante de las anomalías en la morfología de la vasculatura. En un trabajo anterior en el que utilizan líneas celulares de cáncer de próstata que sobreexpresan ADAMTS1, detectan una morfología vascular anormal aunque no encuentran diferencias en la densidad vascular o el tamaño o apariencia de los tumores (Gustavsson et al., 2010).

Puede que el estudio detallado de los sustratos específicos de ADAMTS1 en cada tipo tumoral sea determinante para dirigir la función prometastásica o antimetastásica de la proteasa. La hipótesis consiste en que la proteasa a través de la proteólisis de sustratos específicos producirá modificaciones en la morfología vascular que dirigirán la función de ADAMTS1 en una u otra dirección. Esta es una posible explicación para los resultados de algunas publicaciones ya mencionadas en las que ADAMTS1 emerge como un marcador del potencial invasivo hacia hueso de las células metastásicas. En uno de nuestros trabajos en adición a la función dual de la proteasa en tumores se detecta cómo la proteasa induce la formación de estructuras alternativas de vascularización. Este es otro nuevo dato que sugiere que el conocimiento más detallado de la interacción sustrato-proteasa va a ser importante para la determinación de la función concreta de ADAMTS1 en un determinado contexto tumoral.

Recientemente varios estudios han llevado a cabo la determinación de otros fenómenos de neo-vascularización tumoral aparte de los ya conocidos que tienen lugar durante procesos fisiológicos. Uno de estos procesos recibe el nombre de mimetismo vasculogénico en el que las propias células tumorales son capaces de adquirir propiedades endoteliales que les permite formar unas estructuras pseudo-vasculares que toleran el flujo sanguíneo (Hillen and Griffioen, 2007).

En el modelo del xenógrafo sobreexpresor de ADAMTS1 con células tumorales de sarcoma que presentan un fenotipo plástico, obtuvimos una reducción en la densidad vascular. Sin embargo, se detecta un aumento en las estructuras pseudo-vasculares en estos tumores en presencia de ADAMTS1 en comparación con los controles. Las propias células tumorales, con capacidad plástica, en presencia de la proteasa ADAMTS1 expresarán determinadas moléculas que permitirán su transdiferenciación a células con fenotipo endotelial originando estas estructuras vasculogénicas alternativas (Casal et al., 2010). Se ha observado la implicación de ADAMTS1, de manera muy relevante, en el desarrollo de este fenómeno en melanomas y sarcomas. Estos resultados demuestran que ADAMTS1 tiene un papel dual en la vasculogénesis en tumores ya que puede inhibir la angiogénesis potenciando a la vez la formación de mimetismo vascular. Nuestra hipótesis es que dependiendo de la presencia ausencia de los sustratos clave, la

proteasa podrá comportarse de manera diferente, de hecho, las características de las células tumorales dónde ADAMTS1 se esté sobreexpresando pueden ser determinantes para que el efecto de ADAMTS1 colabore en una u otra dirección.

En el estudio del IGFBP2, la nueva diana determinada para la proteasa ADAMTS1, se resalta en la bibliografía su estrecha relación con el desarrollo de gliomas (Fukushima and Kataoka, 2007). Estas evidencias nos llevan a estudiar el potencial efecto de la proteasa ADAMTS1 en glioma. Añadiendo relevancia a nuestros hallazgos, ya existían varias publicaciones en las que relacionan la actividad de la proteasa ADAMTS1 con el procesamiento de los proteoglicanos brevicano y versicano en modelos de estudio de glioma (Matthews et al., 2000; Sandy et al., 2001). En estos estudios determinan la necesidad del procesamiento de brevicano para aumentar la movilidad y la migración de células de glioma. Es decir, la actividad proteolítica de una ADAMTSs, potencialmente ADAMTS1, va a favorecer el desarrollo de gliomas.

Mediante el uso de bases de datos públicas encontramos una relación directa entre la expresión de la proteasa ADAMTS1 en glioma y la mala progresión de la enfermedad. Este hallazgo sugiere que esta proteasa podría tener un efecto protumoral en glioma, y que según nuestra hipótesis de trabajo estaría mediado por la proteólisis del IGFBP2, la consecuente activación de la vía de señalización del IGFII y su efecto positivo sobre el desarrollo de gliomas.

Ya hemos mencionado la implicación de ADAMTS1 en el fenómeno de plasticidad tumoral en la adquisición de propiedades endoteliales en sarcoma y melanoma (Casal et al., 2010). Recientemente, este fenómeno se ha detectado de una manera muy relevante en glioma (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). En las publicaciones citadas, en trabajos con modelos de glioma se ha observado que las CSCs, identificadas principalmente por el marcador CD133+, del tumor pueden adquirir un fenotipo endotelial. Además, los tumores generados con estas subpoblaciones dan lugar a tumores con mayor potencial vasculogénico

Según nuestros resultados, ADAMTS1 aparece como un marcador de la mala progresión en glioma correlacionado con la proteólisis de IGFBP2. Dada su implicación en el desarrollo del mimetismo vasculogénico en sarcoma y melanoma, se puede suponer que ADAMTS1 es parte activa de este evento en gliomas. Estas observaciones dirigirán nuestras perspectivas futuras para intentar determinar la implicación de la proteasa en este fenómeno en gliomas. Además, la determinación del estado proteolítico de los sustratos conocidos hasta el momento para ADAMTS1 y la posible implicación de los mismos en el fenómeno abre nuevas vías de interés.

4 Proteólisis de los Nidógenos

Algunas publicaciones describen cómo los nidógenos en numerosos tejidos de ratón en condiciones normales se encuentran proteolizados de manera basal (Kunze et al., 2010; Miosge et al., 2002). Estas observaciones indican que la proteólisis de los nidógenos ocurre de manera habitual e incluso indicando que el estado proteolítico de los mismos es necesario para su correcta función. Con intención de elucidar el efecto dual de ADAMTS1 en angiogénesis mediante el corte diferencial de sus sustratos, hemos analizado en detalle el estado proteolítico de estos componentes de la BM, Nid1 y Nid2. En un primer acercamiento, el análisis de los diferentes tejidos animales con niveles variables de ADAMTS1 (wt, het y ko para *adamts1*) no

mostró diferencias en el procesamiento de los nidógenos. Estos resultados pueden ser debidos al enmascaramiento de posibles diferencias por la presencia de otras BM además de la vascular. Las BM recubren cada capa epitelial y de tejido graso con lo que en los tejidos habrá más nidógeno que el localizado en torno a la vasculatura en la BM vascular. Por tanto, las posibles diferencias en la proteólisis de los nidógenos en la BM vascular se pueden enmascarar. Sin embargo, encontramos diferencias en la localización de los nidógenos en la BM vascular mediante su colocalización con el marcador endotelial CD31. Existe una correlación inversa entre la expresión de ADAMTS1 y la colocalización de ambos marcadores. Estos resultados indican que la presencia variable de la proteasa tiene un efecto directo sobre la posición de los nidógenos en la BM, que posiblemente vienen generadas por la proteólisis de ADAMTS1 sobre los nidógenos.

Por otro lado es importante destacar los trabajos con retinas murinas. Como ya hemos mencionado anteriormente la retina es un tejido muy vascularizado y en un modelo de ratón en el que se enriquece la proporción de células de la punta con respecto a las del tallo, se detectan los nidógenos como ADAMTS1 incrementados y los Nidógenos aparecen localizados en las células de la punta (del Toro et al., 2010). En nuestros resultados encontramos un incremento en la expresión de ADAMTS1 en las retinas cuando las comparamos con células endoteliales aisladas de pulmón de ratón, indicando también que ADAMTS1 es una proteína muy importante en este tejido, y su alta expresión puede venir dada por la elevada vasculatura que encontramos en dicho tejido. Aunque en el trabajo anterior no muestran el estado proteolítico de los nidógenos, en una publicación se demuestra que los nidógenos aparecen procesados de manera importante (Kunze et al., 2010). Estas observaciones nos llevan a pensar que el corte sobre los nidógenos es necesario para que se depositen correctamente en la BM. Sin embargo, nuestras observaciones de las retinas del animal Tc1 muestran un retraso en la formación del plexo vascular de la retina. En adición, los nidógenos aparecen anormalmente localizados en la BM vascular que se muestra a través de una reducción en su colocalización con el marcador endotelial y una estructura más intermitente en los puntos de colocalización. Estos resultados sugieren que el corte mediado por el exceso de ADAMTS1 desestructura la BM y retrasa el crecimiento vascular en la retina.

En un último modelo que se ha evaluado en este trabajo, el ensayo de tubulogénesis ya introducido, ECs solas o en combinación con PCs, son embebidas en la matriz de colágeno para la formación de estructuras tubulares. En observaciones previas a nuestro trabajo ya se determinaba la necesidad de la interacción entre ECs y PCs para la correcta formación de la BM. Entre las observaciones, detectan elevados niveles de proteólisis de los nidógenos (Stratman et al., 2009). En la reproducción de estos ensayos en nuestro laboratorio fuimos capaces de detectar niveles similares de BM depositada alrededor de las estructuras tubulares. Además en el análisis del estado proteolítico de los nidógenos detectamos mayores niveles de proteólisis de los nidógenos cuando los PCs están presentes y la localización de los nidógenos en la BM vascular es mayor. Estos resultados sugieren que la adición de PCs al ensayo incrementa la expresión de ADAMTS1 que media la proteólisis de los nidógenos incrementando la localización de los nidógenos en la BM vascular. Recientemente una publicación muestra que la expresión de ADAMTS1 y su inhibidor, TIMP3, es importante en los PCs para regular la formación de tubos en el ensayo de colágeno (Schrimpf et al., 2012). TIMP3 se expresa cuando los PCs se encuentran en estado basal formando los vasos, sin embargo, cuando los PCs se activan dejan de expresar TIMP3 e incrementan su expresión de ADAMTS1. Estas observaciones pueden indicar que los PCs

a través de la expresión de ADAMTS1 y TIMP3 regulan el balance proteolítico que sufren los nidógenos para su correcta localización en las BM. Estos resultados apoyan las evidencias de que el procesamiento de los nidógenos es necesario para su correcta localización en la BM.

5 Nidógenos y Cáncer

Existen algunas publicaciones en las que se detectan cambios en la expresión de ambos nidógenos y su detección en suero (Cheng et al., 2012; Kuk et al., 2010). Sin embargo, su estado proteolítico en tumores no ha sido analizado en profundidad. Entre las publicaciones previas las hay que describen aumentos y las hay que detectan disminuciones en la expresión de los nidógenos en tumores. Por ejemplo, en una publicación reciente se analiza el suero de 165 pacientes con carcinoma hepatocelular. Los resultados revelan una disminución en los niveles de Nid2 en suero, correlacionándolos con los niveles de expresión reducidos de Nid2 en el tejido tumoral en estadios avanzados del tumor (Cheng et al., 2012). En nuestro análisis de muestras de mama observamos una disminución de la expresión génica de ambos nidógenos en comparación con el tejido sano. Los resultados de la última publicación mencionada van en línea con nuestras observaciones para cáncer de mama en el que encontramos una reducción en la expresión de Nid1 y Nid2 en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano. Sin embargo, en el análisis paralelo de bases de datos públicas, las observaciones en la reducción de la expresión de Nid1 y Nid2 en tumores en comparación con tejido sano no fueron consistentes, lo que indica que más análisis con mayores tamaños muestrales tienen que llevarse a cabo.

Además mediante el análisis de tumores de mama para el procesamiento de los nidógenos detectamos una proteólisis reducida en el tumor en comparación con el tejido sano. Esta indicación contrasta con la idea de que el tejido tumoral es más dinámico que el tejido normal del organismo sugiriendo una mayor actividad proteolítica en general de los nidógenos. No obstante, esta observación de una menor proteólisis de nidógenos en el tumor va asociada con la menor expresión de la proteasa ADAMTS1, por lo que se puede establecer una correlación entre ambos eventos. Este tipo de análisis del estado proteolítico de proteínas extracelulares no son comunes en el procesamiento rutinario de muestras tumorales por lo que existen reducidas evidencias de eventos similares. En línea con nuestro trabajo, este tipo de análisis han sido realizados también para la proteólisis de Fibulina-1 en la que existe un menor procesamiento de la proteína en el tejido tumoral de muestras de mama humanas (Greene et al., 2003) aunque detectan mayores niveles de expresión de fibulina-1 en el tumor que en el tejido sano. Esta observación puede estar directamente relacionada con las observaciones de nidógenos ya que Fibulina-1 aparece como un cofactor de la proteasa ADAMTS1 (Lee et al., 2005) y se ha descrito su interacción de manera directa con Nid1 en el entorno extracelular (Adam et al., 1997).

En el modelo del xenógrafo con HEK293T en el que sobreexpresamos la proteasa ADAMTS1 detectamos elevados niveles de procesamiento de los nidógenos que se correlacionan con la total ausencia de los nidógenos en la BM vascular. A pesar de que la proteólisis de los nidógenos no parece afectar a la localización de otros componentes de la BM, importantes cambios morfológicos se detectan en la vasculatura en presencia de la proteasa. Las alteraciones detectadas en la vasculatura consisten en el ensanchamiento de la luz del vaso y reducción de la densidad vascular. Estos cambios sugieren que la funcionalidad de la vasculatura se verá comprometida. Para intentar determinar dichas modificaciones realizamos la inyección

intravenosa *in vivo* de un marcador endotelial conjugado con una molécula fluorescente. Sin embargo, no detectamos variaciones en la señal entre la vasculatura de ambos tumores.

De manera muy interesante, en un experimento con el ratón ko para *nid2* se muestra que la ausencia de esta proteína potencia la aparición de metástasis en pulmón, sin detectar diferencias en la formación de la BM o en la morfología de la vasculatura observada. Estas observaciones no suceden de igual modo para el *nid1* ko (Mokkapati et al., 2012). Estos resultados indican que Nid2 aparece como una proteína protectora ante el desarrollo tumoral y que la pérdida en su expresión genera un incremento en el desarrollo tumoral y en las metástasis. Lo que sugiere que es una proteína vital para la integridad vascular, esto podría relacionarse con que la deslocalización de los nidógenos de la BM vascular por incrementos de su procesamiento puede originar una vasculatura más permeable a las células tumorales. En nuestros ensayos del xenógrafo sobreexpresor de ADAMTS1 observamos la deslocalización total de los nidógenos de la vasculatura lo que podría mimetizar en parte el modelo del *nid2* ko llevando a una mayor permeabilidad a células tumorales. Sin embargo, el tipo celular escogido para nuestro xenógrafo, HEK293T, no desarrolla metástasis por lo que será interesante el uso de líneas celulares tumorales con potencial metastásico para observar el posible efecto de la proteasa ADAMTS1 en el desarrollo de metástasis a través del procesamiento de los nidógenos. Además, estas observaciones del desplazamiento de los nidógenos de la BM y la similitud con el modelo del *nid2* ko pueden ir en línea con los artículos que determinan el potencial prometastásico de ADAMTS1 (Liu et al., 2006; Lu et al., 2009).

Según nuestros resultados, los niveles de expresión de ADAMTS1 tienen un efecto directo sobre la correcta localización de los nidógenos en la BM, presumiblemente a través de su proteolisis, tanto en la vasculatura normal como en la tumoral. En cualquier caso, la inducción de ADAMTS1 causa reducciones en la localización de los nidógenos en la BM y, en situaciones opuestas, la reducción en su expresión va acompañada de incrementos en la colocalización de los nidógenos con el marcador endotelial CD31. Por tanto el balance proteolítico de los nidógenos parece tener gran importancia para su correcta ubicación en la BM vascular. Pequeñas modificaciones en los niveles proteolíticos de los mismos pueden provocar que los encontremos en contacto más o menos directo con el marcador endotelial con consecuencias funcionales para la vasculatura.

Todavía queda por elucidar el significado fisiológico del corte y deslocalización de los nidógenos de la BM y su función para los defectos encontrados en la vasculatura tumoral ante la sobreexpresión de ADAMTS1. En la publicación reciente del ko para *nid2* y el incremento en la metástasis y crecimiento tumoral no han sido capaces de detectar diferencias en la formación de las BM vascular (Mokkapati et al., 2012). Sin embargo, es evidente que existe algún tipo de modificación en la BM vascular que permite que las células tumorales se extravasen más fácilmente. Estas posibles alteraciones se han intentado detectar utilizando microscopía electrónica pero no se han encontrado diferencias. Es decir, es posible que las modificaciones estructurales observadas hasta el momento en las BM no sirvan para describir el total de las anomalías que contiene la vasculatura tumoral. El descubrimiento de nuevos mecanismos de detección en el incremento de la permeabilidad vascular ayudará a conocer mejor estas modificaciones y sus efectos.

6 Identificación de nuevos sustratos de ADAMTS1

Además del uso del gel de dos dimensiones marcado con fluorocromos, DIGE, nuestro grupo ha utilizado con posterioridad una nueva aproximación proteómica para la detección de sustratos desconocidos de ADAMTS1. La técnica llamada ICPL consiste en el marcaje isotópico de medios condicionados en presencia o ausencia de la proteasa para generar proteínas con pequeñas modificaciones en los pesos moleculares que permitan diferenciar los péptidos que provienen de un medio en presencia o ausencia de la proteasa. Estas muestras se someten a cromatografía líquida, a espectrometría de masas y posterior análisis de los péptidos encontrados hasta conseguir detectar y acotar los puntos de corte de los posibles sustratos. Con esta nueva técnica conseguimos identificar nuevos sustratos no detectados con anterioridad mediante DIGE. Con el método anterior de detección fuimos capaces de encontrar los nidógenos como dos sustratos putativos de ADAMTS1 que fueron confirmados mediante la sobreexpresión de la proteasa (Canals et al., 2006). Con la nueva técnica, hemos confirmado los nidógenos, pero además, aparecen varios miembros de las IGFBPs como posibles sustratos. Ambas técnicas tienen sus limitaciones ya que el DIGE tiene dificultades para la detección de proteínas con pH extremo y proteínas de bajo peso molecular y el ICPL, sin embargo, presenta dificultades para la detección de modificaciones proteolíticas que conllevan pequeñas variaciones en el tamaño de las proteínas (van Domselaar et al., 2010).

Los IGFBPs son proteínas de unión al ligando IGFII (y del I), mediante su unión prolongan la vida media del factor de crecimiento y bloquean su función señalizadora. La unión entre IGFBP2 e IGFII se rompe mediante proteólisis de los IGFBPs que reduce las interacciones entre ambas proteínas liberando el factor de crecimiento. El IGFII libre activa la migración y proliferación celular a través de su interacción con el IGF1R. Los IGFs son importantes durante el desarrollo junto con las proteínas de unión. Durante la vida adulta su expresión se reduce, sin embargo, se han detectado grandes aumentos en la expresión de ambas proteínas en cáncer lo que colaborará con el crecimiento tumoral (Firth and Baxter, 2002).

7 Proteólisis del IGFBP2 y su función en glioma

Entre los nuevos sustratos de ADAMTS1 identificados mediante ICPL, el IGFBP2 aparecía como el candidato más claro. El IGFBP2 aparece comúnmente cortado en numerosos fluidos biológicos (Firth and Baxter, 2002). Varias metaloproteasas han sido relacionadas con el corte de IGFBP2 y la función de su procesamiento en el desarrollo de diferentes tipos de glioma (Miyamoto et al., 2007; Rorive et al., 2008).

El corte producido sobre el IGFBP2 libera el IGFII lo que incrementa la señalización a través de su receptor aumentando la movilidad y proliferación de las células tumorales. En el análisis de varias líneas celulares de sarcoma, melanoma y glioma encontramos el IGFBP2 proteolizado en importantes proporciones y obteniendo fragmentos con un peso molecular similar a los fragmentos detectados tras el procesamiento por ADAMTS1 y que a su vez son iguales a los obtenidos por MMP7. La proteólisis del IGFBP2 parece un evento común en varios tipos tumorales obteniendo fragmentos similares a los resultantes del procesamiento por ADAMTS1 o MMP7, sugiriendo la posible actividad de estas dos proteasas en este procesamiento y por consiguiente en su implicación en glioma.

En el estudio detallado del procesamiento del IGFBP2 tenemos que destacar la necesidad de recurrir al uso de varios anticuerpos que finalmente nos han permitido visualizar los distintos fragmentos. Este hecho es de especial relevancia ya que tras el análisis de la literatura hemos comprobado que esta combinación no se ha venido usando, por lo que el corte de IGFBP2 ha pasado totalmente desapercibido en múltiples estudios. Más importantes son nuestras observaciones con muestras de glioma humano, que demuestran que el procesamiento del IGFBP2 aparece como un fenómeno muy importante en este tipo tumoral. En adición, nuestros hallazgos demuestran un incremento en el procesamiento del IGFBP2 que media la liberación del IGFII y la fosforilación del IGF1R con el consiguiente efecto en la migración celular. De forma equivalente a estos últimos resultados, son destacables los estudios del procesamiento del IGFBP2 por MMP7 y MMP9 en líneas celulares de glioma, con conclusiones similares (Miyamoto et al., 2007; Rorive et al., 2008). Por tanto, a pesar de los elevados niveles de la proteína de unión el procesamiento de esta generará el incremento en la señalización del IGFII, sugiriendo su potencial efecto positivo para el crecimiento de gliomas.

Mediante el uso de bases de datos públicas hemos corroborado la correlación directa entre la expresión del IGFBP2 y la malignidad tumoral. Similares resultados, aunque sin el mismo nivel de significancia, han sido detectados para la expresión de ADAMTS1 y la mala progresión de la enfermedad. Esto indica que elevados niveles de expresión del IGFBP2 junto con ADAMTS1 pueden tener un efecto aditivo para la mala progresión de la enfermedad. Como posible mecanismo sugerimos que la presencia de la proteasa ADAMTS1 mediará el corte del IGFBP2 liberando el IGFII retenido por la proteína de unión. Estos resultados sugieren el uso de inhibidores de proteólisis para el tratamiento de gliomas en combinación con los tratamientos habituales, pudiendo así potenciar el secuestro del IGFII, que a su vez podría inhibir el crecimiento del tumor. Actualmente los esfuerzos para la generación de inhibidores para el tratamiento de gliomas se centran en el bloqueo de la ruta IGFII a través de IGF1R, estrategia a la que se debería añadir un mecanismo alternativo para el bloqueo en la activación del IGF1R mediante la promoción del secuestro de IGFII por el IGFBP2.

En línea con nuestro trabajo, que pretende demostrar la importancia del corte proteolítico de IGFBP2 en glioma, existe una publicación que basa sus resultados en el IGFBP4. En este estudio, se generó un mutante de la proteína IGFBP4 resistente a proteólisis. En los ensayos con esta proteína resistente a procesamiento, los autores observan que su presencia reduce el crecimiento de tumores (Ryan et al., 2009). Estas observaciones sugerirían que el bloqueo de la proteólisis de los IGFBPs, incluyendo al IGFBP2, podría tener un efecto importante en el bloqueo del crecimiento de gliomas. Además, se observa un incremento de la apoptosis de ECs lo que podría indicar de nuevo una relación entre las IGFBPs y angiogénesis. Tanto este trabajo como el nuestro destacan el posible beneficio del uso de inhibidores de proteólisis en el tratamiento de gliomas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

CONCLUSIONES

1. ADAMTS1 demuestra su efecto modulador de la angiogénesis de manera dependiente de dosis. La actividad de la proteasa es necesaria para la iniciación de la angiogénesis y variaciones en sus niveles normales de expresión manifiestan su efecto antiangiogénico.
2. El balance proteolítico de los nidógenos parece esencial para permitir su correcta localización en la membrana basal vascular. ADAMTS1 modula de manera inversa la localización de los nidógenos en la membrana basal vascular, presumiblemente causado por el procesamiento diferencial de los mismos.
3. ADAMTS1 aparece como una proteasa con capacidad protectora ante el crecimiento tumoral en cáncer de mama y en el modelo del xenógrafo con células embrionarias humanas.
4. La sobreexpresión de ADAMTS1 en tumores disminuye la densidad vascular y modifica la morfología de los vasos. Estos efectos van acompañados del incremento en la proteólisis de los nidógenos y la disminución en su localización en la membrana basal vascular.
5. ADAMTS1 contribuye a que las células tumorales con potencial plástico adquieran propiedades endoteliales que pueden dar lugar a fenómenos de mimetismo vascular.
6. La expresión de ADAMTS1, en conjunción con la de IGFBP2, está directamente relacionada con la mala progresión en gliomas. Esta coexpresión supondría un efecto aditivo mediado por el incremento en la proteólisis de IGFBP2.
7. ADAMTS1 induce la migración celular y la fosforilación del receptor del IGF1R, posiblemente a través de la liberación del IGFII de su unión al IGFBP2.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Profundizar en el análisis del ratón *adamts1* ko para demostrar varios puntos de interés:
 - Estudio del desarrollo de varios tipos tumorales (mama, glioma, etc.)
 - Estudio de fenómenos de plasticidad tumoral.
 - Demostrar la reversibilidad del fenotipo del animal *adamts1* ko mediante adición exógena de ADAMTS1.
- Determinar la contribución de los fragmentos de los nidógenos en angiogénesis y en la formación de la membrana basal.
- Estudiar el efecto en la localización y proteólisis de los nidógenos en la BM vascular mediante el bloqueo de la actividad de ADAMTS1 con TIMP3, u otros inhibidores específicos.
- Profundizar en modelos de xenógrafo con líneas celulares tumorales metastásicas para elucidar si ADAMTS1 y el procesamiento de los nidógenos incrementan la aparición de metastástasis.
- Analizar en profundidad un número elevado de muestras de glioma:
 - Determinación de la implicación de ADAMTS1 e IGFBP2 en la progresión tumoral.
 - Estudiar la implicación de ADAMTS1 y sus sustratos en el fenómeno de mimetismo vascular en glioblastoma.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

1. ADAMTS1 shows its modulatory effect for angiogenesis in a dose dependent manner. ADAMTS1 demonstrates its initial proangiogenic effect and changes on its expression levels mediate its antiangiogenic function.
2. The balance on nidogens proteolysis appears to be essential for their correct localization on vascular basement membrane. ADAMTS1 modulates inversely the deposition of nidogens on vascular basement membrane, presumably due to differential nidogen processing.
3. ADAMTS1 appears as a tumor protective molecule in breast tumors and in the embryonic human kidney xenograft model.
4. ADAMTS1 overexpression in tumors cause decrease vessel density and changes on vessel morphology in parallel to the increased processing of nidogens which delocalizes them from the vascular basement membrane.
5. ADAMTS1 helps plastic tumor cells for the acquisition of endothelial-like properties that could lead to vasculogenic mimicry events.
6. ADAMTS1 expression, together with IGFBP2, is directly related with poor prognosis of glioma patients. Co-expression of both has an additive negative effect due to IGFBP2 processing.
7. ADAMTS1 increases cell migration and IGF1R phosphorylation, possibly mediated by the release of IGFII from its binding to IGFBP2.

FUTURE PERSPECTIVES

- Extensively study the *adamts1* ko mice to demonstrate the following interest:
 - Development of different tumor types (breast, glioma, etc.).
 - Tumor plasticity experiments.
 - Demonstrate the reversibility of *adamts1* ko phenotype by the exogenous addition of ADAMTS1.
- Determine the importance of nidogens fragments for angiogenesis and basement membrane formation.
- Study the effect of ADAMTS1 inhibition by TIMP3, or other specific inhibitor, for the proteolysis and deposition of nidogens in the vascular BM.
- Deeply analyze xenograft models with metastatic cell lines to observe if ADAMTS1 and processing of nidogens increases metastasis occurrence.
- Deeply analyze a broad spectrum of glioma samples:
 - Determine the implication of ADAMTS1 and IGFBP2 in tumor progression.
 - Study the implication of ADAMTS1 and its substrates in vasculogenic mimicry phenomena in glioblastoma.

APÉNDICE

Abreitura	Español	Inglés
4T1	Línea celular tumoral de mama	<i>Mammary tumor cell line</i>
AMD	Degeneración macular asociada al Envejecimiento	<i>Age related macular degeneration</i>
ANG1	Angiopoyetina-1	<i>Angiopoietin-1</i>
ARA	Anillo de aorta	<i>Aortic Ring Assay</i>
BM	Membrana basal	<i>Basement Membrane</i>
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer	<i>Cancer-Associated Fibroblasts</i>
CAM	Membrana corialantoide	<i>Chick chorioallantoic membrane</i>
CD31/PECAM		
CHO	Células de ovario de hámster	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CSCs	Células madre tumorales	<i>Cancer Stem Cells</i>
DLL4	Ligando parecido a delta-4	<i>Delta like ligand 4</i>
DS	Síndrome de Down	<i>Down's Syndrome</i>
E-Cadherin	Cadherina epitelial	<i>Epithelial cadherin</i>
ECM	Matriz extracelular	<i>Extracellular matrix</i>
ECs	Célula endotelial	<i>Endothelial cell</i>
EGF	Ligando parecido al factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal Growth Factor-like ligands</i>
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma murino	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
EMT	Transición de epitelio a mesenquimal	<i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i>
Eng	Endoglina	<i>Endoglin</i>
EPC	Célula progenitora endotelial	<i>Endothelial progenitor cell</i>
EphA2	Receptor de la ephrina A2	<i>Ephrine A2 receptor</i>
ETS-1	Homologo 1 del oncogen de la eritroblastosis aviar	<i>Avian erythroblastosis virus oncogene homolog 1</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	<i>Fibroblast growth factor</i>
GMB	Glioblastoma	<i>Glioblastoma</i>
HBVP	Pericitos humanos de vasculatura cerebral	<i>Human Brain Vascular Pericytes</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	Factor inducible por hipoxia	<i>Hipoxia inducible factor</i>
HS	Heparán sulfatos	<i>Heparan sulfates</i>
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
ICPL	Marcaje isotópico de proteínas	<i>Isotope-coded protein labeling</i>
IGFBPs	Proteína de unión al factor de crecimiento parecido a insulina	<i>Insuline-like Growth Factor Binding Protein 2</i>

IGFR	Los receptores de los factores de crecimiento parecidos a insulina	<i>Insuline –like Growth Factor Receptor</i>
IGFs	Factores de crecimiento parecidos a insulina	<i>Insuline-like Growth Factor</i>
IL	Interleuquina	<i>Interleukin</i>
Ko	Deficiente	<i>Knock out</i>
LC	Cromatografía líquida	<i>Liquid Chromatography</i>
LLC	Carcinoma pulmonar de Lewis	<i>Lewis Lung Carcinoma</i>
MCa-IV	Carcinoma de mama	<i>Mammary Carcinoma</i>
MMP	Metaloproteasa de matriz	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MS	Espectrometría de masas	<i>Mass spectromerty</i>
MSCs	Células mesenquimales	<i>Mesenchymal Stem cells</i>
MT-MMP	MMPs ancladas a la matriz	<i>Matrix Metalloproteinases matrix anchored</i>
NG2	Sulfato de condroitina Proteoglicano 4	<i>Chondroitin sulphate proteoglycan4</i>
Notch	Proteínas transmembrana de la familia Notch	<i>Transmembrane protein Notch family</i>
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas	<i>Non-small-cell lung cáncer</i>
PAS	Ácido periódico Schiff	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PCs	Pericitos	<i>Pericytes</i>
PDGFB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas B	<i>Platlet Derived Growth Factor B</i>
PDGFRβ	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β	<i>Platlet Derived Growth Factor Receptor β</i>
PICS	Identificación proteómica de sitios de corte por proteasas	<i>Proteomic identification of protease cleavage sites</i>
PN	Postnatalmente	<i>Postnathaly</i>
RECK	Inductor reverso, proteína rica en cisteínas con motivos Kazal	<i>Reversion-inducing, cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico	
S1P	Esfingosina 1 fosfato	<i>Sphingosine 1 phosphate</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida sometido a electroforesis desnaturizante	<i>Denaturalizing Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SILAC	Marcaje Isotópico estable mediante amino codificados en el cultivo celular	<i>Stable Isotope Labelling with Aminoacids in Cell culture</i>
SMA	Actina de músculo liso	<i>Smooth Muscle Actin</i>
SNPs	Polimorfismo de un único nucleótido	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TA3	Células de carcinoma de mama	
TAM	Macrófagos asociados al tumor	<i>Tumor Asociated Macrophages</i>
TEM-7	Marcador de endotelio tumoral-7	<i>Tumor endotelial marker-7</i>
TFPI-2	Inhibidor de la señalización del factor tisular	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor-2</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β	<i>Transforming growth factor</i>

TIE2	Tirosina quinasa con dominios parecidos a inmunoglobulinas y EGF 2	<i>Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2</i>
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TSP	Trombospondina	<i>Thrombospondin</i>
VE-cadherina	Cadherina endotelial vascular	<i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vSMC	Células de músculo liso vascular	<i>Smooth Muscle Cells</i>
VWF	Factor vonWillenbrand	<i>VonWillenbrand factor</i>

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, S., W. Gohring, H. Wiedemann, M.L. Chu, R. Timpl, and G. Kostka. 1997. Binding of fibulin-1 to nidogen depends on its C-terminal globular domain and a specific array of calcium-binding epidermal growth factor-like (EG) modules. *J Mol Biol.* 272:226-36.
- Adams, R.H., and K. Alitalo. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:464-78.
- Alexander, C.M., E.W. Howard, M.J. Bissell, and Z. Werb. 1996. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J Cell Biol.* 135:1669-77.
- Aplin, A.C., E. Fogel, P. Zorzi, and R.F. Nicosia. 2008. The aortic ring model of angiogenesis. *Methods Enzymol.* 443:119-36.
- Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M.H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B.R. Johansson, and C. Betsholtz. 2011. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 468:557-61.
- Baker, M., S.D. Robinson, T. Lechertier, P.R. Barber, B. Tavora, G. D'Amico, D.T. Jones, B. Vojnovic, and K. Hodivala-Dilke. 2012. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc.* 7:89-104.
- Baluk, P., S. Morikawa, A. Haskell, M. Mancuso, and D.M. McDonald. 2003. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 163:1801-15.
- Baranowsky, A., S. Mokkalapati, M. Bechtel, J. Krugel, N. Miosge, C. Wickenhauser, N. Smyth, and R. Nischt. 2009. Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. *Matrix Biol.* 29:15-21.
- Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:32-43.
- Canals, F., N. Colome, C. Ferrer, C. Plaza-Calonge Mdel, and J.C. Rodriguez-Manzaneque. 2006. Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis. *Proteomics.* 6 Suppl 1:S28-35.
- Carlin, B., R. Jaffe, B. Bender, and A.E. Chung. 1981. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem.* 256:5209-14.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380:435-439.
- Casal, C., A.X. Torres-Collado, C. Plaza-Calonge Mdel, E. Martino-Echarri, Y.C.S. Ramon, F. Rojo, A.W. Griffioen, and J.C. Rodriguez-Manzaneque. 2010. ADAMTS1 contributes to the acquisition of an endothelial-like phenotype in plastic tumor cells. *Cancer Res.* 70:4676-86.
- Casimiro, S., I. Luis, A. Fernandes, R. Pires, A. Pinto, A.G. Gouveia, A.F. Francisco, J. Portela, L. Correia, and L. Costa. 2012. Analysis of a bone metastasis gene expression signature in patients with bone metastasis from solid tumors. *Clin Exp Metastasis.* 29:155-64.
- Cheng, Y.Y., H. Jin, X. Liu, J.M. Siu, Y.P. Wong, E.K. Ng, J. Yu, W.K. Leung, J.J. Sung, and F.K. Chan. 2008. Fibulin 1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer.* 99:2083-7.
- Cheng, Z.X., X.H. Huang, Q. Wang, J.S. Chen, L.J. Zhang, and X.L. Chen. 2012. Clinical significance of decreased nidogen-2 expression in the tumor tissue and serum of patients with hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 105:71-80.

- Choi, J.E., D.S. Kim, E.J. Kim, M.H. Chae, S.I. Cha, C.H. Kim, S. Jheon, T.H. Jung, and J.Y. Park. 2008. Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 187:80-4.
- Daley, W.P., S.B. Peters, and M. Larsen. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 121:255-64.
- del Toro, R., C. Prahst, T. Mathivet, G. Siegfried, J.S. Kaminker, B. Larrivee, C. Breant, A. Duarte, N. Takakura, A. Fukamizu, J. Penninger, and A. Eichmann. 2010. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* 116:4025-33.
- Dong, L., Y. Chen, M. Lewis, J.C. Hsieh, J. Reing, J.R. Chaillet, C.Y. Howell, M. Melhem, S. Inoue, J.R. Kuzak, K. DeGeest, and A.E. Chung. 2002. Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. *Lab Invest.* 82:1617-30.
- Dreymueller, D., J. Pruessmeyer, E. Groth, and A. Ludwig. 2011. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol.*
- Ebos, J.M., and R.S. Kerbel. 2011. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol.* 8:210-21.
- Edwards DR, Handsley MM, and P. CJ. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29:258-89.
- El Hallani, S., B. Boisselier, F. Peglion, A. Rousseau, C. Colin, A. Idbaih, Y. Marie, K. Mokhtari, J.L. Thomas, A. Eichmann, J.Y. Delattre, A.J. Maniotis, and M. Sanson. 2010. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain.* 133:973-82.
- El Hour, M., A. Moncada-Pazos, S. Blacher, A. Masset, S. Cal, S. Berndt, J. Detilleux, L. Host, A.J. Obaya, C. Maillard, J.M. Foidart, F. Ectors, A. Noel, and C. Lopez-Otin. 2010. Higher sensitivity of Adamts12-deficient mice to tumor growth and angiogenesis. *Oncogene.* 29:3025-32.
- Esselens, C., J. Malapeira, N. Colome, C. Casal, J.C. Rodriguez-Manzaneque, F. Canals, and J. Arribas. 2010. The cleavage of semaphorin 3C induced by ADAMTS1 promotes cell migration. *J Biol Chem.* 285:2463-73.
- Fernandez-Klett, F., N. Offenhauser, U. Dirnagl, J. Priller, and U. Lindauer. 2010. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:22290-5.
- Firth, S.M., and R.C. Baxter. 2002. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocr Rev.* 23:824-854.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-6.
- Fruittiger, M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* 10:77-88.
- Fukushima, T., and H. Kataoka. 2007. Roles of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in glioblastoma. *Anticancer Res.* 27:3685-92.
- Ghajar, C.M., S.C. George, and A.J. Putnam. 2008. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 18:251-78.
- Godard, S., G. Getz, M. Delorenzi, P. Farmer, H. Kobayashi, I. Desbaillets, M. Nozaki, A.C. Diserens, M.F. Hamou, P.Y. Dietrich, L. Regli, R.C. Janzer, P. Bucher, R. Stupp, N. de Tribolet, E. Domany, and M.E. Hegi. 2003. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* 63:6613-25.
- Goel, S., D.G. Duda, L. Xu, L.L. Munn, Y. Boucher, D. Fukumura, and R.K. Jain. 2011. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 91:1071-121.
- Greene, L.M., W.O. Twal, M.J. Duffy, E.W. McDermott, A.D. Hill, N.J. O'Higgins, A.H. McCann, P.A. Dervan, W.S. Argraves, and W.M. Gallagher. 2003. Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer. *Br J Cancer.* 88:871-8.

- Gustavsson, H., T. Tesan, K. Jennbacken, K. Kuno, J.E. Damber, and K. Welen. 2010. ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. *BMC Cancer*. 10:288.
- Gutierrez-Fernandez, A., A. Fueyo, A.R. Folgueras, C. Garabaya, C.J. Pennington, S. Pilgrim, D.R. Edwards, D.L. Holliday, J.L. Jones, P.N. Span, F.C. Sweep, X.S. Puente, and C. Lopez-Otin. 2008. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Res*. 68:2755-63.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-74.
- Hasle, H. 2001. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol*. 2:429-36.
- Hatipoglu, O.F., S. Hirohata, M.Z. Cilek, H. Ogawa, T. Miyoshi, M. Obika, K. Demircan, R. Shinohata, S. Kusachi, and Y. Ninomiya. 2009. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem*. 284:16325-33.
- Hendrix, M.J., E.A. Seftor, A.R. Hess, and R.E. Seftor. 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 3:411-21.
- Herbert, S.P., and D.Y. Stainier. 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:551-64.
- Herman, M.P., G.K. Sukhova, W. Kisiel, D. Foster, M.R. Kehry, P. Libby, and U. Schonbeck. 2001. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest*. 107:1117-26.
- Hillen, F., and A.W. Griffioen. 2007. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 26:489-502.
- Hirano, T., K. Hirose, K. Sakurai, M. Makishima, K. Sasaki, and S. Amano. 2011. Inhibition of Tumor Growth by Antibody to ADAMTS1 in Mouse Xenografts of Breast Cancer. *Anticancer Res*. 31:3839-42.
- Ho, M.S., K. Bose, S. Mokkapatil, R. Nischt, and N. Smyth. 2008. Nidogens-Extracellular matrix linker molecules. *Microsc Res Tech*. 71:387-95.
- Hoeflich, A., R. Reisinger, H. Lahm, W. Kiess, W.F. Blum, H.J. Kolb, M.M. Weber, and E. Wolf. 2001. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res*. 61:8601-10.
- Hofmann, J.J., and M.L. Iruela-Arispe. 2007. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res*. 100:1556-68.
- Hu, L., K.B. Jonsson, H. Andersen, A. Edenro, Y.M. Bohlooly, H. Melhus, and T. Lind. 2011. Over-expression of Adamts1 in mice alters bone mineral density. *J Bone Miner Metab*.
- Iruela-Arispe, M.L., D. Carpizo, and A. Luque. 2003. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci*. 995:183-90.
- Isenberg, B.C., and J.Y. Wong. 2006. Building structure into engineered tissues. *Materials Today*. 9:54-60.
- Jain, R.K. 2002. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 29:3-9.
- Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 9:685-93.
- Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 3:422-33.
- Kang, Y., P.M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S.M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T.A. Guise, and J. Massague. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3:537-49.
- Kang Y, S.P., Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3:537-49.
- Kessenbrock K, Plaks V, and W. Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141:52-67.

- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141:52-67.
- Koh, W., A.N. Stratman, A. Sacharidou, and G.E. Davis. 2008. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol*. 443:83-101.
- Kohfeldt, E., T. Sasaki, W. Gohring, and R. Timpl. 1998. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol*. 282:99-109.
- Kuang, Z., S. Yao, D.W. Keizer, C.C. Wang, L.A. Bach, B.E. Forbes, J.C. Wallace, and R.S. Norton. 2006. Structure, dynamics and heparin binding of the C-terminal domain of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2). *J Mol Biol*. 364:690-704.
- Kuk, C., C.G. Gunawardana, A. Soosaipillai, H. Kobayashi, L. Li, Y. Zheng, and E.P. Diamandis. 2010. Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem*. 43:355-61.
- Kuno, K., K. Bannai, M. Hakozaki, K. Matsushima, and K. Hirose. 2004. The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 319:1327-33.
- Kuno, K., N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura, and K. Matsushima. 1997. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloprotease-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*. 272:556-562.
- Kuno, K., and K. Matsushima. 1998. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem*. 273:13912-13917.
- Kuno, K., Y. Okada, H. Kawashima, H. Nakamura, M. Miyasaka, H. Ohno, and K. Matsushima. 2000. ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Letters*. 478:241-245.
- Kuno, K., Y. Terashima, and K. Matsushima. 1999. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*. 274:18821-18826.
- Kunze, A., E. Abari, I. Semkova, M. Paulsson, and U. Hartmann. 2010. Deposition of nidogens and other basement membrane proteins in the young and aging mouse retina. *Ophthalmic Res*. 43:108-12.
- Lai, K.K., S. Shang, N. Lohia, G.C. Booth, D.J. Mase, N. Fausto, J.S. Campbell, and L. Beretta. 2011. Extracellular matrix dynamics in hepatocarcinogenesis: a comparative proteomics study of PDGFC transgenic and Pten null mouse models. *PLoS Genet*. 7:e1002147.
- LeBleu, V.S., B. Macdonald, and R. Kalluri. 2007. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 232:1121-9.
- Lee, H.K., I.A. Seo, H.K. Park, and H.T. Park. 2006. Identification of the basement membrane protein nidogen as a candidate ligand for tumor endothelial marker 7 in vitro and in vivo. *FEBS Lett*. 580:2253-7.
- Lee, N.V., J.C. Rodriguez-Manzaneque, S.N. Thai, W.O. Twal, A. Luque, K.M. Lyons, W.S. Argraves, and M.L. Iruela-Arispe. 2005. Fibulin-1 acts as a cofactor for the matrix metalloprotease ADAMTS-1. *J Biol Chem*. 280:34796-804.
- Leung, D.W., G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, and N. Ferrara. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 246:1306-9.
- Li, S., P. Liquari, K.K. McKee, D. Harrison, R. Patel, S. Lee, and P.D. Yurchenco. 2005. Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol*. 169:179-89.
- Lind, G.E., K. Kleivi, G.I. Meling, M.R. Teixeira, E. Thiis-Evensen, T.O. Rognum, and R.A. Lothe. 2006. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis. *Cell Oncol*. 28:259-72.
- Liu, Y.J., Y. Xu, and Q. Yu. 2006. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene*. 25:2452-67.

- Lopez-Otin, C., and T. Hunter. 2010. The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. *Nat Rev Cancer*. 10:278-92.
- Lopez-Otin, C., and L.M. Matrisian. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 7:800-8.
- Lopez-Otin, C., and C.M. Overall. 2002. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:509-19.
- Lu, X., Q. Wang, G. Hu, C. Van Poznak, M. Fleisher, M. Reiss, J. Massague, and Y. Kang. 2009. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev*. 23:1882-94.
- Luque, A., D.R. Carpizo, and M.L. Iruela-Arispe. 2003. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem*. 278:23656-65.
- Maniotis, A.J., R. Folberg, A. Hess, E.A. Seftor, L.M. Gardner, J. Pe'er, J.M. Trent, P.S. Meltzer, and M.J. Hendrix. 1999. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 155:739-52.
- Masters, B.R., P.T. So, K.H. Kim, C. Buehler, and E. Gratton. 1999. Multiphoton excitation microscopy, confocal microscopy, and spectroscopy of living cells and tissues; functional metabolic imaging of human skin in vivo. *Methods Enzymol*. 307:513-36.
- Masui T, H.R., Tsuji S, Miyamoto Y, Yasuda S, Ida J, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Arie S, Doi R, Imamura M. 2001. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 7:3437-43.
- Matthews, R.T., S.C. Gary, C. Zerillo, M. Pratta, K. Solomon, E.C. Arner, and S. Hockfield. 2000. Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/Brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J. Biol. Chem*. 275:22695-22703.
- Mayer, U., K. Mann, R. Timpl, and G. Murphy. 1993. Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur J Biochem*. 217:877-84.
- McKee, K.K., D. Harrison, S. Capizzi, and P.D. Yurchenco. 2007. Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem*. 282:21437-47.
- Migita, T., T. Narita, R. Asaka, E. Miyagi, H. Nagano, K. Nomura, M. Matsuura, Y. Satoh, S. Okumura, K. Nakagawa, H. Seimiya, and Y. Ishikawa. 2010. Role of insulin-like growth factor binding protein 2 in lung adenocarcinoma: IGF-independent antiapoptotic effect via caspase-3. *Am J Pathol*. 176:1756-66.
- Miosge, N., T. Sasaki, and R. Timpl. 2002. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol*. 21:611-21.
- Miyamoto, S., M. Nakamura, K. Yano, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, T. Sangai, H. Maeda, Z. Shi-Chuang, T. Chiba, and A. Ochiai. 2007. Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix. *Cancer Sci*. 98:685-91.
- Mokkapat, S., M. Bechtel, M. Reibetanz, N. Miosge, and R. Nischt. 2012. Absence of the Basement Membrane Component Nidogen 2, but not of Nidogen 1, Results in Increased Lung Metastasis in Mice. *J Histochem Cytochem*.
- Mokkapat, S., A. Fleger-Weckmann, M. Bechtel, M. Koch, D. Breitkreutz, U. Mayer, N. Smyth, and R. Nischt. 2010. Basement membrane deposition of nidogen 1 but not nidogen 2 requires the nidogen binding module of the laminin gamma1 chain. *J Biol Chem*. 286:1911-8.
- Murphy, G. 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 8:929-41.
- Murshed, M., N. Smyth, N. Miosge, J. Karolat, T. Krieg, M. Paulsson, and R. Nischt. 2000. The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol*. 20:7007-12.

- Nan, H., M. Xu, J. Zhang, M. Zhang, P. Kraft, A.A. Qureshi, C. Chen, Q. Guo, F.B. Hu, E.B. Rimm, G. Curhan, Y. Song, C.I. Amos, L.E. Wang, J.E. Lee, Q. Wei, D.J. Hunter, and J. Han. 2011. Genome-wide association study identifies nidogen 1 (NID1) as a susceptibility locus to cutaneous nevi and melanoma risk. *Hum Mol Genet.* 20:2673-9.
- Nicosia, R.F., E. Bonanno, M. Smith, and P. Yurchenco. 1994. Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev Biol.* 164:197-206.
- Norden, A.D., J. Drappatz, and P.Y. Wen. 2009. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol.* 5:610-20.
- Nussenbaum, F., and I.M. Herman. 2010. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol.* 2010:132641.
- O'Doherty, A., S. Ruf, C. Mulligan, V. Hildreth, M.L. Errington, S. Cooke, A. Sesay, S. Modino, L. Vanes, D. Hernandez, J.M. Linehan, P.T. Sharpe, S. Brandner, T.V. Bliss, D.J. Henderson, D. Nizetic, V.L. Tybulewicz, and E.M. Fisher. 2005. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science.* 309:2033-7.
- Oivula, J., J. Lohi, T. Tani, L. Kangas, T. Kiviluoto, E. Kivilaakso, R. Butkowski, and I. Virtanen. 1999. Renal cell carcinomas and pancreatic adenocarcinomas produce nidogen in vitro and in vivo. *J Pathol.* 187:455-61.
- Peppiatt, C.M., C. Howarth, P. Mobbs, and D. Attwell. 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 443:700-4.
- Pitulescu, M.E., I. Schmidt, R. Benedito, and R.H. Adams. 2010. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc.* 5:1518-34.
- Pollak, M. 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 8:915-28.
- Porter, S., I.M. Clark, L. Kevorkian, and D.R. Edwards. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 386:15-27.
- Porter, S., S.D. Scott, E.M. Sassoon, M.R. Williams, J.L. Jones, A.C. Girling, R.Y. Ball, and D.R. Edwards. 2004. Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10:2429-40.
- Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 146:873-87.
- Puente, X.S., L.M. Sanchez, C.M. Overall, and C. Lopez-Otin. 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 4:544-58.
- Pujuguet, P., M. Simian, J. Liaw, R. Timpl, Z. Werb, and M.J. Bissell. 2000. Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression. *J Cell Sci.* 113 (Pt 5):849-58.
- Reeves, R.H., N.G. Irving, T.H. Moran, A. Wohn, C. Kitt, S.S. Sisodia, C. Schmidt, R.T. Bronson, and M.T. Davisson. 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet.* 11:177-84.
- Reynolds, L.E., A.R. Watson, M. Baker, T.A. Jones, G. D'Amico, S.D. Robinson, C. Joffre, S. Garrido-Urbani, J.C. Rodriguez-Manzaneque, E. Martino-Echarri, M. Aurrand-Lions, D. Sheer, F. Dagna-Bricarelli, D. Nizetic, C.J. McCabe, A.S. Turnell, S. Kermorgant, B.A. Imhof, R. Adams, E.M. Fisher, V.L. Tybulewicz, I.R. Hart, and K.M. Hodivala-Dilke. 2010. Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature.* 465:813-7.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, M. Biffoni, M. Todaro, G. Invernici, T. Cenci, G. Maira, E.A. Parati, G. Stassi, L.M. Larocca, and R. De Maria. 2010. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 468:824-8.
- Ricciardelli, C., K.M. Frewin, I.D. Tan, E.D. Williams, K. Opeskin, M.A. Pritchard, W.V. Ingman, and D.L. Russell. 2011. The ADAMTS1 Protease Gene Is Required for Mammary Tumor Growth and Metastasis. *Am J Pathol.*
- Rocks, N., G. Paulissen, F. Quesada-Calvo, C. Munaut, M.L. Gonzalez, M. Gueders, J. Hacha, C. Gilles, J.M. Foidart, A. Noel, and D.D. Cataldo. 2008. ADAMTS-1 metalloproteinase

- promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Cancer Res.* 68:9541-50.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., D. Carpizo, C. Plaza-Calonge Mdel, A.X. Torres-Collado, S.N. Thai, M. Simons, A. Horowitz, and M.L. Iruela-Arispe. 2009. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:800-10.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., A.B. Milchanowski, E.K. Dufour, R. Leduc, and M.L. Iruela-Arispe. 2000. Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *J. Biol. Chem.* 275:33471-33479.
- Rodriguez-Manzaneque, J.C., J. Westling, S.N. Thai, A. Luque, V. Knauper, G. Murphy, J.D. Sandy, and M.L. Iruela-Arispe. 2002. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:501-8.
- Rorive, S., A. Berton, N. D'Haene, C.N. Takacs, O. Debeir, C. Decaestecker, and I. Salmon. 2008. Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas. *Glia.* 56:1679-90.
- Rowe, R.G., and S.J. Weiss. 2008. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 18:560-74.
- Rundhaug, J.E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 9:267-85.
- Ryan, A.J., S. Napoletano, P.A. Fitzpatrick, C.A. Currid, N.C. O'Sullivan, and J.H. Harmey. 2009. Expression of a protease-resistant insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer. *Br J Cancer.* 101:278-86.
- Sacharidou, A., A.N. Stratman, and G.E. Davis. 2011. Molecular Mechanisms Controlling Vascular Lumen Formation in Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Cells Tissues Organs.*
- Sandy, J.D., J. Westling, R.D. Kenagy, M.L. Iruela-Arispe, C. Verscharen, J.C. Rodriguez-Manzaneque, D. Zimmerman, J.M. Lemire, J.W. Fischer, T.N. Wight, and A.W. Clowes. 2001. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site which is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* 276:13372-13378.
- Schrimpf, C., C. Xin, G. Campanholle, S.E. Gill, W. Stallcup, S.L. Lin, G.E. Davis, S.A. Gharib, B.D. Humphreys, and J.S. Duffield. 2012. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol.*
- Schymeinsky, J., S. Nedbal, N. Miosge, E. Poschl, C. Rao, D.R. Beier, W.C. Skarnes, R. Timpl, and B.L. Bader. 2002. Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol Cell Biol.* 22:6820-30.
- Shindo, T., H. Kurihara, K. Kuno, H. Yokoyama, T. Wada, Y. Kurihara, T. Imai, Y. Wang, M. Ogata, H. Nishimatsu, N. Moriyama, Y. Oh-hashii, H. Morita, T. Ishikawa, R. Nagai, Y. Yazaki, and K. Matsushima. 2000. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* 105:1345-1352.
- Shiomi, T., V. Lemaitre, J. D'Armiento, and Y. Okada. 2010. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int.* 60:477-96.
- Shozu, M., N. Minami, H. Yokoyama, M. Inoue, H. Kurihara, K. Matsushima, and K. Kuno. 2005. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol.* 35:343-55.
- St Croix, B., C. Rago, V. Velculescu, G. Traverso, K.E. Romans, E. Montgomery, A. Lal, G.J. Riggins, C. Lengauer, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 2000. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science.* 289:1197-202.

- Stahl, A., K.M. Connor, P. Sapieha, J. Chen, R.J. Dennison, N.M. Krah, M.R. Seaward, K.L. Willett, C.M. Aderman, K.I. Guerin, J. Hua, C. Lofqvist, A. Hellstrom, and L.E. Smith. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:2813-26.
- Stratman, A.N., K.M. Malotte, R.D. Mahan, M.J. Davis, and G.E. Davis. 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood.* 114:5091-101.
- Stratman, A.N., A.E. Schwindt, K.M. Malotte, and G.E. Davis. 2010. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood.* 116:4720-30.
- Su, S.C., E.A. Mendoza, H.I. Kwak, and K.J. Bayless. 2008. Molecular profile of endothelial invasion of three-dimensional collagen matrices: insights into angiogenic sprout induction in wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C1215-29.
- Titz, B., S. Dietrich, T. Sadowski, C. Beck, A. Petersen, and R. Sedlacek. 2004. Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell Mol Life Sci.* 61:1826-33.
- Torres-Collado, A.X., W. Kisiel, M.L. Iruela-Arispe, and J.C. Rodriguez-Manzaneque. 2006. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem.* 281:17827-37.
- Ulazzi, L., S. Sabbioni, E. Miotto, A. Veronese, A. Angusti, R. Gafa, S. Manfredini, F. Farinati, T. Sasaki, G. Lanza, and M. Negrini. 2007. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer.* 6:17.
- Valente, P., D.M. Noonan, R.C. Ogle, and A. Albini. 1996. Altered production of laminin and nidogen by high and low metastatic variants of murine melanoma cells. *Oncol Res.* 8:131-8.
- van Domselaar, R., S.A. de Poot, and N. Bovenschen. 2010. Proteomic profiling of proteases: tools for granzyme degradomics. *Expert Rev Proteomics.* 7:347-59.
- van Hinsbergh, V.W., M.A. Engelse, and P.H. Quax. 2006. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:716-28.
- van Hinsbergh, V.W., and P. Koolwijk. 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 78:203-12.
- Vazquez, F., G. Hastings, M.A. Ortega, T.F. Lane, S. Oikemus, M. Lombardo, and M.L. Iruela-Arispe. 1999. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* 274:23349-23357.
- Wagstaff, L., R. Kelwick, J. Decock, and D.R. Edwards. 2011. The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Front Biosci.* 16:1861-72.
- Wang, R., K. Chadalavada, J. Wilshire, U. Kowalik, K.E. Hovinga, A. Geber, B. Fligelman, M. Leversha, C. Brennan, and V. Tabar. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 468:829-33.
- Weis, S.M., and D.A. Cheresh. 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 17:1359-70.
- Xie, L., K. Palmsten, B. MacDonald, M.W. Kieran, S. Potenta, S. Vong, and R. Kalluri. 2008. Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth. *Exp Biol Med (Maywood).* 233:155-62.

ANEXO

PUBLICACIONES

Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome

Louise E. Reynolds¹, Alan R. Watson^{1*}, Marianne Baker^{1*}, Tania A. Jones³, Gabriela D'Amico¹, Stephen D. Robinson¹, Carine Joffre², Sarah Garrido-Urbani⁵, Juan Carlos Rodriguez-Manzaneque⁶, Estefanía Martino-Echarri⁶, Michel Aurrand-Lions⁷, Denise Sheer³, Franca Dagna-Bricarelli⁸, Dean Nizetic⁴, Christopher J. McCabe⁹, Andrew S. Turnell¹⁰, Stephanie Kermorgant², Beat A. Imhof⁵, Ralf Adams¹¹, Elizabeth M. C. Fisher¹², Victor L. J. Tybulewicz¹³, Ian R. Hart² & Kairbaan M. Hodivala-Dilke¹

Down's syndrome (DS) is a genetic disorder caused by full or partial trisomy of human chromosome 21 and presents with many clinical phenotypes including a reduced incidence of solid tumours^{1,2}. Recent work with the Ts65Dn model of DS, which has orthologues of about 50% of the genes on chromosome 21 (Hsa21), has indicated that three copies of the *ETS2* (ref. 3) or DS candidate region 1 (*DSCR1*) genes⁴ (a previously known suppressor of angiogenesis^{5,6}) is sufficient to inhibit tumour growth. Here we use the Tc1 transchromosomal mouse model of DS⁷ to dissect the contribution of extra copies of genes on Hsa21 to tumour angiogenesis. This mouse expresses roughly 81% of Hsa21 genes but not the human *DSCR1* region. We transplanted B16F0 and Lewis lung carcinoma tumour cells into Tc1 mice and showed that growth of these tumours was substantially reduced compared with wild-type littermate controls. Furthermore, tumour angiogenesis was significantly repressed in Tc1 mice. In particular, *in vitro* and *in vivo* angiogenic responses to vascular endothelial growth factor (VEGF) were inhibited. Examination of the genes on the segment of Hsa21 in Tc1 mice identified putative anti-angiogenic genes (*ADAMTS1*^{8,9} and *ERG*¹⁰) and novel endothelial cell-specific genes¹¹, never previously shown to be involved in angiogenesis (*JAM-B*¹² and *PTTG1IP*), that, when overexpressed, are responsible for inhibiting angiogenic responses to VEGF. Three copies of these genes within the stromal compartment reduced tumour angiogenesis, explaining the reduced tumour growth in DS. Furthermore, we expect that, in addition to the candidate genes that we show to be involved in the repression of angiogenesis, the Tc1 mouse model of DS will permit the identification of other endothelium-specific anti-angiogenic targets relevant to a broad spectrum of cancer patients.

DS, or trisomy 21, is responsible for developmental abnormalities, learning disability, cardiovascular defects and dementia¹. As well as these phenotypes, which have been well documented in DS, three independent studies have drawn attention to the fact that malignant solid tumours are under-represented when compared with age-matched and sex-matched individuals from the general population^{1,2}. This phenotype is probably due to 'gene dosage' effects; that

is, an extra copy of Hsa21 leads to higher levels of gene product protecting DS individuals from solid tumour growth.

Orthology to Hsa21 is found on three mouse chromosomes: Mmu16, Mmu17 and Mmu10, with 29 genes found on Hsa21 not being represented in the mouse (Supplementary Fig. 1). Early transgenic mouse models, including the Ts65Dn model, which contains orthologues of up to only 50% of the genes located on Hsa21, have been used to study the reduced solid tumour malignancies³. However, it was not possible to examine the contribution of trisomy 21 specifically to angiogenesis, a process essential for solid tumour growth, in this system because all cells, including the tumour cells and stromal cells, were potentially trisomic. We used the Tc1 mouse model of DS⁷, which has 81% of Hsa21 genes but lacks the duplication of 29 genes including *DSCR1*, to test the effect of this additional segment of chromosome 21 specifically on tumour neovascularization (Supplementary Fig. 1).

To determine whether Tc1 mice were protected from solid tumour growth, we examined the growth of B16F0 and Lewis lung carcinoma (LLC) tumour xenografts. Tumour growth of both B16F0 and LLC was significantly repressed in Tc1 mice in comparison with wild-type controls (Fig. 1a). Additionally, LLC tumour growth kinetics were significantly slower in Tc1 mice, especially at larger tumour sizes, which require neovascularization rather than vessel co-option¹³ (Supplementary Fig. 2). To confirm that this phenotype was not the result of a disproportionate increase of Mmu10, Mmu16 and Mmu17 relative to the ploidy of the tumour cells, we examined the chromosomes in the B16F0 and LLC cell lines. Mmu10, Mmu16 and Mmu17 were found to be correct relative to the ploidy (Supplementary Fig. 3). These observations confirm that three copies of chromosome 21 genes suppress the growth of tumours through reduced tumour neovascularization.

To address specifically the contribution of tumour angiogenesis to this phenotype, we examined the tumour vasculature. The additional Hsa21 fragment in Tc1 mice induced a significant and substantial decrease in tumour blood vessel density in both B16F0 and LLC tumours in comparison with tumours grown in wild-type littermate controls (Fig. 1b). Dextran-fluorescein isothiocyanate (FITC)-perfused

¹Adhesion and Angiogenesis Laboratory, Barts Institute of Cancer, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, John Vane Science Centre, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK. ²Centre for Tumour Biology, Institute of Cancer, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, John Vane Science Centre, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK. ³Neuroscience Centre, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Institute of Cell and Molecular Sciences, 4 Newark Street, London E1 2AD, UK. ⁴Paediatrics Centre, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Institute of Cell and Molecular Sciences, 4 Newark Street, London E1 2AD, UK. ⁵Department of Pathology and Immunology, Centre Medical Universitaire, University of Geneva Medical School (CMU), rue Michel Servet 1, CH-1211 Geneva, Switzerland. ⁶GENYO, Avenida Del Conocimiento, s/n Armilla 18100, Granada, Spain. ⁷INSERM, 27, Boulevard Lei Roure, 13009 Marseille, France. ⁸Human Genetics Institute, Galliere Hospital, Via Volta 10, 16128 Genoa, Italy. ⁹School of Clinical and Experimental Medicine, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK. ¹⁰School of Cancer Sciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK. ¹¹Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Röntgenstrasse 20, D-48149 Münster, Germany. ¹²Department of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG, UK. ¹³Division of Immune Cell Biology, MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, UK.

*These authors contributed equally to this work.

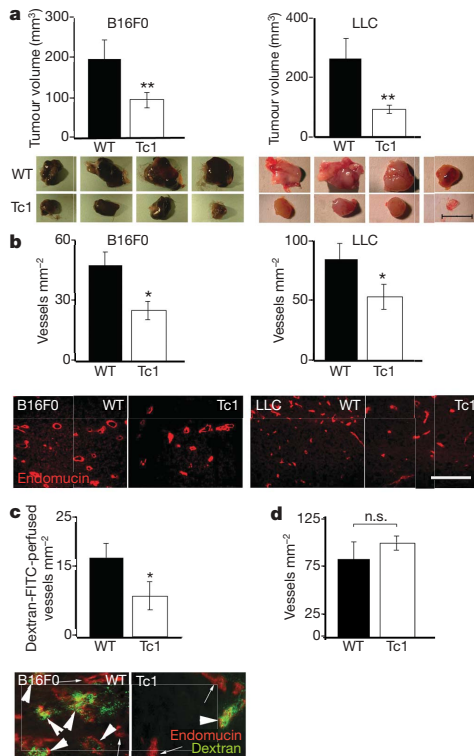


Figure 1 | Tumour angiogenesis is restricted in Tc1 mice. **a**, B16F0 and LLC tumour size was reduced significantly in the Tc1 mice. Representative tumour images are given. $n = 20$ per group. **b**, Blood vessel density was reduced significantly in tumours from Tc1 mice. Representative staining for endomucin in tumour sections is given. $n = 5-10$ per group. **c**, Perfusion of tumour blood vessels in Tc1 mice was reduced in comparison with wild-type (WT) controls. Graph shows the mean number of dextran-FITC-perfused blood vessels. Arrowheads, perfused vessels; arrows, non-perfused vessels. **d**, Blood vessel density was similar in unchallenged skin of WT and Tc1 mice. $n = 5$ per group. Two asterisks, $P < 0.05$; asterisk, $P < 0.01$, n.s., not statistically significant. Scale bars, 10 mm (**a**) and 100 μm (**b**). All values are means and s.e.m.

blood vessel numbers were also decreased in Tc1 mouse tumours (Fig. 1c). In contrast, examination of blood vessel density in unchallenged skin and other organs from wild-type control and Tc1 mice showed no difference between the genotypes (Fig. 1d and Supplementary Fig. 4), suggesting that pathological angiogenesis, but not normal blood vessel density, is negatively affected by the Hsa21 fragment. In addition, the growth of Tc1 endothelial cells was not affected by the additional Hsa21 fragment¹⁴ (Supplementary Fig. 5). Furthermore, the differences in tumour vascularity were not due to differences in immune-cell infiltration between the genotypes (Supplementary Fig. 6), and the contribution of Tc1 bone-marrow-derived cells to tumour growth was not apparent (Supplementary Fig. 7). Taken together, our data from Tc1 mice suggest that it is the presence of an additional copy of a fragment of Hsa21, within blood vessels, that inhibits solid tumour growth and represses tumour angiogenesis.

To assess whether the decreased tumour angiogenesis observed in the Tc1 mice was due to reduced sensitivity to VEGF, we performed *in vivo* growth-factor-induced angiogenesis assays. VEGF-mediated neovascularization was reduced significantly in the Tc1 mice in comparison with littermate controls (Fig. 2a). Treatment with PBS resulted in similar baseline angiogenic responses in both genotypes (data not shown). In addition to the lack of *in vivo* angiogenesis, Tc1 aortic rings were also unresponsive to stimulation with VEGF, in contrast to VEGF-treated wild-type controls. Baseline responses to

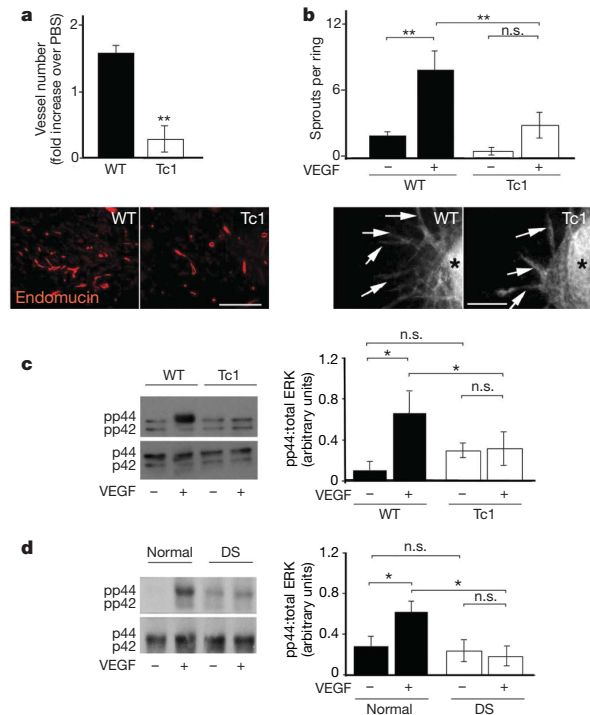


Figure 2 | VEGF-mediated angiogenic responses are inhibited in Tc1 mice. **a**, VEGF-stimulated neovascularization into subcutaneously implanted sponges, quantified by numbers of endomucin-positive blood vessels, was decreased in Tc1 mice in comparison with wild-type (WT) mice. $n = 20$ per group. **b**, VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo* from Tc1 aortic rings was inhibited. Representative images of aortic ring sprouts are given. $n = 6-12$ aortic rings per test. Asterisk, aortic ring; arrows, microvessel sprouts. **c**, Phospho-ERK1 (pp44) was increased in WT but not in Tc1 primary endothelial cells stimulated with VEGF. **d**, Phospho-ERK1 (pp44) was increased in normal human cells stimulated with VEGF but not in DS cells. Asterisk, $P < 0.01$; two asterisks, $P < 0.05$; n.s., not statistically significant. Scale bars, 100 μm (**a**) and 500 μm (**b**). All values are means and s.e.m.

PBS were not affected in the Tc1 aortic rings, indicating further that an additional copy of the fragment of Hsa21 specifically suppresses VEGF-induced neovascularization (Fig. 2b).

Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) is a major pro-angiogenic growth factor receptor¹⁵. VEGF, by means of VEGFR2, induces extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 (p42/p44) phosphorylation and mediates endothelial cell activation during angiogenesis, and inhibition of VEGFR2 or the ERK1/2 pathway reduces VEGF-mediated angiogenic responses¹⁶. ERK1/2 phosphorylation was reduced specifically in response to VEGF, but not basic fibroblast growth factor (bFGF), in Tc1 endothelial cells in comparison with wild-type controls and in VEGF-stimulated primary cells isolated from individuals with DS (Fig. 2c, d, and Supplementary Fig. 8). This specific response to VEGF focused our attention on VEGFR2.

Although other molecules, such as DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A), have been reported to be upstream of ERK signalling¹⁷ and may contribute to the decreased ERK phosphorylation in response to VEGF, we show that surface levels, but not total levels, of VEGFR2 are substantially increased in Tc1 endothelial cells (Supplementary Fig. 9a, b). After stimulation with VEGF, the surface levels of VEGFR2 remain consistently higher on Tc1 endothelial cells than on control cells (Supplementary Fig. 9c). This discrepancy between total VEGFR2 and surface VEGFR2 levels indicates that Tc1 endothelial cells have lower cytoplasmic levels of VEGFR2. Indeed, examination of endothelial cells in culture by

immunofluorescence show that stimulation of wild-type cells with VEGF induced an apparent internalization of phosphorylated VEGFR2 that was not present in Tc1 endothelial cells (Supplementary Fig. 9c). The phosphorylated VEGFR2 in Tc1 endothelial cells seemed to be restricted at the cell surface after stimulation with VEGF. Although beyond the scope of the study, it is tempting to speculate that defects in VEGFR2 subcellular localization are relevant to the repressed angiogenesis in Tc1 mice and provide a novel aspect to the regulation of angiogenesis in DS^{18,19}.

We identified several putative anti-tumorigenic, anti-angiogenic and endothelial-cell-specific genes expressed on Hsa21 in the Tc1 mice likely to be responsible for the decreased angiogenic responses. These included *ETS2*, encoding a transcription factor whose overexpression reduces tumour growth in the Ts65Dn mouse model of DS and in other models^{3,20} but is not yet linked with angiogenesis; *ADAMTS1*, encoding a protease known to inhibit angiogenesis^{8,9,21}; and three endothelial-cell-specific Hsa21 genes (*ERG*, encoding a transcription factor implicated in endothelial tube formation and angiogenesis¹⁰; *JAM-B*, encoding a cell–cell adhesion molecule not yet implicated in angiogenesis or tumorigenesis; and *PTTG1IP*, which is overexpressed in cancers but is also not yet linked to angiogenesis). All mouse transcripts were expressed in Tc1 and wild-type endothelial cells and human transcripts only in the Tc1 endothelial cells (Supplementary Fig. 10a, b). To test whether three copies of any of these candidate genes negatively affected angiogenesis, we first observed the effects of depleting individual human transcripts by RNA-mediated interference (RNAi) on VEGF-mediated microvessel sprouting in aortic ring assays (Fig. 3). Knockdown of the human transcripts and protein in Tc1 endothelial cells was confirmed by RT-PCR and western blot analysis, and no detectable effects on mouse orthologues were observed (Fig. 3a and Supplementary Fig. 11). Wild-type aortic rings stimulated with VEGF showed a significant

increase in microvessel sprouting that was not affected by treatment with scrambled (Scr) short interfering RNA (siRNA) or the human-specific siRNAs against *ETS2*, *ERG*, *ADAMTS1*, *JAM-B* or *PTTG1IP* (Fig. 3b). This was expected, because these aortic rings lacked any human genes and acted as a control. In contrast, Tc1 aortic rings did not show enhanced microvessel sprouting in response to stimulation with VEGF with or without Scr-siRNA transfection (Fig. 3c). However, the use of human-specific siRNAs to deplete one of three copies of *ERG*, *ADAMTS1*, *JAM-B* or *PTTG1IP* transcripts (effectively recreating wild-type copy numbers for each gene) was sufficient to restore VEGF-mediated microvessel sprouting to VEGF-treated wild-type levels. Depletion of one of three copies of *ETS2* did not induce a significant increase in microvessel sprouting in response to VEGF (Fig. 3c), suggesting that vascular *ETS2* is not involved in this response. In contrast, data from ref. 3 suggest that *ETS2* is involved in the growth of spontaneous intestinal tumours in APC^{min} mice. Taken together, these data suggest that the effect of *ETS2* occurs in the non-stromal tumour cell compartment. Indeed, *ETS2* has been reported to be responsible for different biological responses in different cell types^{22–24}. Our data provide an example of how the xenograft model used in the Tc1 mice enables us to dissect the role of genes in the tumour and in the stromal compartment.

To test the gene-dosage effect of the remaining candidate genes further, we used mouse-specific siRNAs to deplete two of three transcript copies in Tc1 aortic rings. Using RT-PCR we showed that mouse-specific siRNAs for the candidate genes *Erg*, *Adamts1*, *Jam-b* and *Pttg1ip* effectively depleted mouse transcripts in Tc1 endothelial cells (Fig. 4a). As in Fig. 3c, VEGF treatment of Tc1 aortic rings that were either untransfected or transfected with Scr-siRNA did not induce an increase in microvessel sprouting over untreated control aortic rings. In contrast, targeting the mouse *Adamts1*, *Jam-b* or *Pttg1ip* transcripts by siRNA promoted VEGF-mediated microvessel sprouting over and above Scr-siRNA-treated controls. Depleting two of three copies of these transcripts (effectively reducing the copy number of each gene from three to one) is sufficient to promote VEGF-mediated microvessel sprouting (Fig. 4b). Taken together, our data show that for *Adamts1*, *Jam-b* and *Pttg1ip* one or two copies of the transcript is sufficient to restore normal levels of VEGF-mediated vessel sprouting, suggesting that a gene dosage effect is mediating the repressed angiogenic phenotype in the Tc1 mice. In contrast, depleting two of three copies of the *Erg* gene did not affect VEGF-mediated vessel sprouting, suggesting that two copies of this transcript are required for normal angiogenic responses.

In addition, an antibody against mouse *JAM-B* was injected into B16F0-tumour-burdened Tc1 mice. Intraperitoneal administration of this antibody increased tumour size and blood vessel density significantly in Tc1 mice in comparison with control-IgG-injected Tc1 controls (Fig. 4c). To provide direct evidence of a gene-dosage effect of *JAM-B* on angiogenesis we compared angiogenesis in wild-type mice (two copies of *JAM-B*) with that in *JAM-B* heterozygous mice (one copy of *JAM-B*). *JAM-B* heterozygous mouse tissue showed roughly half the levels of *JAM-B* (Supplementary Fig. 12). B16F0 tumour size and blood vessel density were increased significantly in *JAM-B* heterozygous mice in comparison with wild-type mice (Fig. 4d, e). Furthermore, aortic rings from *JAM-B* heterozygous mice showed a significant increase in VEGF-mediated aortic vessel sprouting (Fig. 4f). Finally, we compared VEGF-induced angiogenesis *ex vivo* by using aortae isolated from wild-type and *ADAMTS1* heterozygous mice. Once again, our data showed a gene-dosage effect of *ADAMTS1* on angiogenesis and corroborate previous findings in which genetic ablation of *ADAMTS1* enhanced angiogenesis²⁵ (Supplementary Fig. 13). Taken together, these results confirm that one extra copy of the candidate genes on Hsa21 can provide an anti-angiogenic effect.

Our work establishes that three copies of individual genes in the stromal compartment can confer a repressed tumour angiogenic phenotype in the Tc1 mouse model of DS, supporting the notion of a ‘gene-dosage’ effect, for some genes, protecting DS individuals

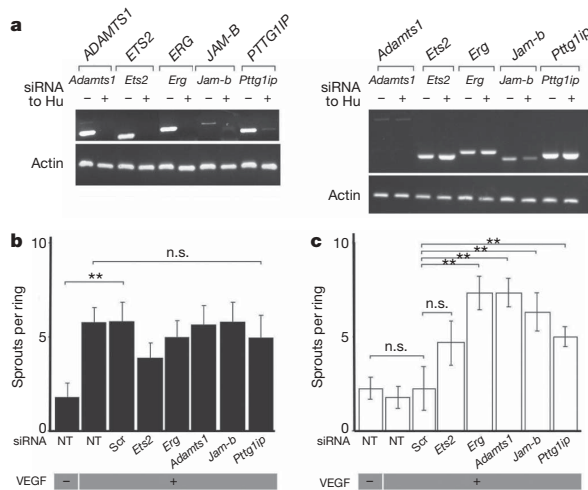


Figure 3 | Reduction of copy number of candidate genes from three to two can rescue the angiogenic defect in Tc1 mice. **a**, siRNA depletion of the candidate human genes inhibited human (Hu) transcript expression levels (left panel) but not mouse transcript expression levels (right panel). **b**, Knockdown of human candidate genes in wild-type aortic tissue has no effect. Non-transfected (NT) wild-type (WT) aortic rings treated with VEGF (+) enhanced microvessel sprouting compared with untreated aortic rings (-). Scr-siRNA or human-specific siRNAs did not alter VEGF-mediated microvessel sprouting. **c**, Knockdown of human candidate genes in Tc1 aortic tissue restores disomy. Non-transfected (NT) and Scr-siRNA-transfected Tc1 aortic rings did not respond to VEGF (+). Transfection with human-specific siRNAs, except *ETS2*, effectively restoring expression of two copies of the genes, increased VEGF-mediated vessel sprouting. $n = 20$ –40 aortic rings per test. Filled bars, WT; open bars, Tc1. Two asterisks, $P < 0.005$; n.s., not statistically significant. All values are means and s.e.m.

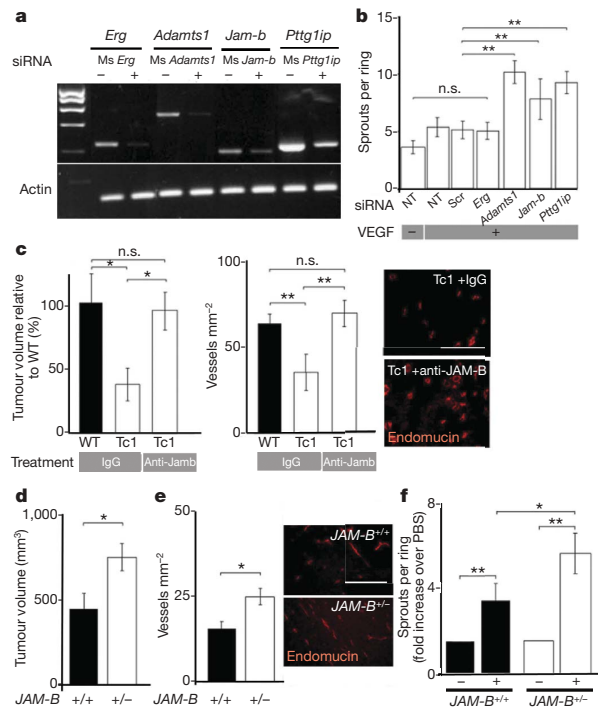


Figure 4 | Reduction of copy number from three to one rescues the angiogenic defect in Tc1 mice. **a**, siRNA depletion of the mouse (Ms) candidate genes inhibited mouse endothelial transcript expression levels. **b**, Knockdown of mouse candidate genes in Tc1 aortic tissue induces monosomy. Non-transfected (NT) and Scr-siRNA-transfected Tc1 aortic rings did not sprout in response to VEGF (+). Transfection with *Adamts1*, *Jam-b* and *Pttg1ip* siRNA, effectively generating one copy of the genes, increased VEGF-mediated vessel sprouting. Transfection with *Erg* siRNA had no effect on VEGF-mediated microvessel sprouting. $n = 20\text{--}40$ aortic rings per test. **c**, Administration of the anti-mouse JAM-B antibody (JB4.2) to tumour-burdened Tc1 mice enhanced tumour growth and blood vessel density. Asterisk, $P < 0.005$; two asterisks, $P < 0.001$; n.s., not statistically significant. **d**, Tumour volume was increased in *JAM-B*^{+/-} mice. Asterisk, $P < 0.05$. **e**, Tumour blood vessel density was increased in *JAM-B*^{+/-} mice. Asterisk, $P < 0.05$. **f**, VEGF-mediated microvessel sprouting was increased in *JAM-B*^{+/-} aortic rings. $n = 24\text{--}68$ aortic rings per genotype per test. Scale bars, 100 μm . Asterisk, $P < 0.05$; two asterisks, $P < 0.005$. All values are means and s.e.m.

from solid tumour growth^{1,2}. In particular, VEGF-mediated angiogenic processes are inhibited by the addition of a fragment of Hsa21 in the Tc1 mice. Our data show that individual depletion of *JAM-B*, *ADAMTS1*, *ERG* or *PTTG1IP*, but not *ETS2*, is sufficient to restore normal angiogenic responses to VEGF. This implies that three copies of *JAM-B*, *ADAMTS1*, *ERG* and *PTTG1IP*, and probably others that we have not tested, need to be present for the overall inhibitory effect. The transchromosomal system used in our study has a unique advantage in allowing species-specific silencing of the third gene copy, leading to a rapid genetic dissection and pinpointing of the causative trisomic genes. Although beyond the scope of the present study, our results imply that *JAM-B*, *ADAMTS1*, *ERG* and *PTTG1IP*, but not *ETS2*, are upstream of a common signalling pathway in the control of angiogenic responses.

Although we see a phenotype in Tc1 mice similar to that described in ref. 4, the mechanisms of this regulation are likely to be different because the *DSCR1* region is triplicated in TS65Dn mice but expressed at normal levels in Tc1 mice. Because of this, changes in *DSCR1*-mediated signalling through calcineurin are unlikely to be affected in Tc1 mice. Indeed, although the overexpression of *DSCR1* has been shown to inhibit tumour angiogenesis, overexpression of

this gene is also thought to contribute to several pathological defects²⁶, suggesting that manipulation of *DSCR1* downstream signalling may have limited anti-angiogenic therapeutic potential. In contrast, our studies not only confirmed the function of known anti-angiogenic genes on Hsa21 but also identified and tested novel endothelium-specific genes that are anti-angiogenic when overexpressed. Our data highlight the importance of *ADAMTS1*, *JAM-B*, *PTTG1IP* and other, potentially novel, genes in controlling tumour angiogenesis. Furthermore, we have identified *JAM-B* and *PTTG1IP* as new anti-angiogenic mediators.

Our study reveals that repression of angiogenesis by the addition of a fragment of Hsa21 in DS models can direct the discovery of new anti-angiogenic targets, which have the potential of being exploited pharmacologically for the development of effective gene therapy for treating cancer.

METHODS SUMMARY

Mice. Tc(Hsa21)1TybEmcf (Tc1) mice were generated by crossing Tc1 females with (129S8 \times B6)F1 males⁷.

In vivo tumour assays. *In vivo* tumour assays and tumour kinetic studies were performed as described previously^{27,28}.

The anti-JAM-B antibody (clone JB4.2) was developed in B. A. Imhof's laboratory and will be described elsewhere. For JAM-B blocking experiments, 100 μg of JB4.2 was injected intraperitoneally every 3 days into tumour-burdened Tc1 and wild-type mice. On day 12, tumours were measured and processed for histological analysis.

Subcutaneous angiogenesis assay. Assays were performed as described previously²⁹. On day 14 the sponges were harvested and fixed for immunostaining for blood vessel examination.

Western blot analysis. Wild-type and Tc1 primary endothelial cells were lysed, and 30–100 μg of protein for each protein sample was loaded onto 8–12% gels and western blot analysis was performed (VEGFR2/phospho-VEGFR2, ERK1/2 and phospho-ERK1/2 were from Cell Signaling Technology). Anti-ADAMTS1 antibody was a gift from L. Iruela-Arispe. Anti-PTTG1IP antibody was raised in rabbits against the human PTTG1IP protein. Anti-JAM-B antibody was provided by B. A. Imhof.

Aortic ring assay. This assay was performed as described previously²⁸. For RNAi studies, aortic rings were transfected with various siRNAs (Dharmacon) before being embedded in collagen.

Blood vessel quantification. Sections of size-matched tumours or sponges were immunostained with rat anti-endothelium (Santa Cruz) antibody to identify blood vessels. The number of blood vessels was counted as described previously²⁸.

Statistical analysis. Statistical significance was calculated with Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Animal regulations. All animals were used in accordance with UK Home Office regulations.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 8 December 2009; accepted 14 April 2010.

- Yang, Q., Rasmussen, S. A. & Friedman, J. M. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* **359**, 1019–1025 (2002).
- Hasle, H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncol.* **2**, 429–436 (2001).
- Sussan, T. E., Yang, A., Li, F., Ostrowski, M. C. & Reeves, R. H. Trisomy represses *Apc*^{Mim}-mediated tumours in mouse models of Down's syndrome. *Nature* **451**, 73–75 (2008).
- Baek, K. H. et al. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor *DSCR1*. *Nature* **459**, 1126–1130 (2009).
- Iizuka, M., Abe, M., Shiiba, K., Sasaki, I. & Sato, Y. Down syndrome candidate region 1, a downstream target of VEGF, participates in endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Vasc. Res.* **41**, 334–344 (2004).
- Minami, T. et al. Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 50537–50554 (2004).
- O'Doherty, A. et al. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* **309**, 2033–2037 (2005).
- Luque, A., Carpizo, D. R. & Iruela-Arispe, M. L. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J. Biol. Chem.* **278**, 23656–23665 (2003).
- Lee, N. V. et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J.* **25**, 5270–5283 (2006).

10. Birdsey, G. M. *et al.* Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* **111**, 3498–3506 (2008).
11. Herbert, J. M., Stekel, D., Sanderson, S., Heath, V. L. & Bicknell, R. A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes. *BMC Genomics* **9**, 153 (2008).
12. Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C. & Imhof, B. A. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 2733–2741 (2001).
13. Holash, J. *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994–1998 (1999).
14. Williams, B. R. *et al.* Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science* **322**, 703–709 (2008).
15. Shalaby, F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62–66 (1995).
16. Reynolds, A. R. *et al.* Elevated FIK1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in β_3 -integrin-deficient mice. *Cancer Res.* **64**, 8643–8650 (2004).
17. Kelly, P. A. & Rahmani, Z. DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PCT2 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3562–3573 (2005).
18. Gampel, A. *et al.* VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* **108**, 2624–2631 (2006).
19. Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C. & Dejana, E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* **174**, 593–604 (2006).
20. Wolvetang, E. J. *et al.* ETS2 overexpression in transgenic models and in Down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 247–255 (2003).
21. Liu, Y. J., Xu, Y. & Yu, Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* **25**, 2452–2467 (2006).
22. Carbone, G. M. *et al.* Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4358–4367 (2004).
23. Yamamoto, H. *et al.* Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev.* **12**, 1315–1326 (1998).
24. Park, J. S. *et al.* A role for both Ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21^{Cip-1/WAF1/mda6} protein levels in primary hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2915–2932 (2000).
25. Shozu, M. *et al.* ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* **35**, 343–355 (2005).
26. Harris, C. D., Ermak, G. & Davies, K. J. Multiple roles of the DSCR1 (*Adapt78* or *RCAN1*) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2477–2486 (2005).
27. Reynolds, A. R. *et al.* Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nature Med.* **15**, 392–400 (2009).
28. Reynolds, L. E. *et al.* Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nature Med.* **8**, 27–34 (2002).
29. Mahadevan, V., Hart, I. R. & Lewis, G. P. Factors influencing blood supply in wound granuloma quantitated by a new *in vivo* technique. *Cancer Res.* **49**, 415–419 (1989).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank G. Saunders, C. Wren, C. Pegrum and A. Slender for their help with animal husbandry; F. Wiseman and T. Broughton for information on gene deletions in the Tc1 mice; and L. Iruela-Arispe for advice on ADAMTS1 mice and antibody gift.

Author Contributions L.E.R. and K.M.H-D. designed the experiments. L.E.R. performed the experiments. A.R.W. performed the bone marrow transplant experiments and stained for Y chromosome and conducted RT-PCR. G.D'A. performed the aortic ring assay. S.D.R. performed the phospho-VEGFR2 western blot analysis. T.A.J. and D.S. performed the tumour cell karyotyping. M.B. assisted with the immunostaining, tumour and sponge harvesting and flow cytometric analysis. C.J. and S.K. conducted flow cytometry and immunofluorescence of cells. B.A.I., R.A. and S.G.-U. supplied the JAM-B antibodies for western blot analysis and JAM-B wild-type and heterozygous mice for *in vivo* and *ex vivo* studies and JAM-B biochemistry in JAM-B heterozygotes. J.C.R.-M. and E.M.-E. provided the ADAMTS1 heterozygous aortae and ADAMTS1 PCR analysis. C.J.M. and A.T. provided the PTTG1IP antibody for western blot analysis. F.D.-B. and D.N. provided the human DS and normal control cells. V.J.T. and E.M.C.F. designed, developed and provided the Tc1 mice. L.E.R., K.M.H-D. and I.R.H. wrote the paper with substantial input from the other authors.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of this article at www.nature.com/nature. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.E.R. (l.reynolds@qmul.ac.uk).

METHODS

Mice. Tc (Hsa21)1TybEmcf (Tc1) mice were generated by crossing Tc1 females with (129S8 × B6)F₁ males⁷. Experiments were performed with male JAM-B heterozygous, Tc1 and wild-type littermate mice aged 2–4 months.

In vivo tumour assays. B16F0 melanoma cells (10⁶) or 5 × 10⁵ LLC cells were injected subcutaneously into the scruff of test and control mice and were measured and processed for histological analysis after 12 or 10 days of growth, respectively, as described previously²⁷. For the LLC tumour kinetic experiment, 5 × 10⁵ LLC cells were injected subcutaneously into the flank of Tc1 and wild-type littermate control mice; tumour volume, *v*, was calculated by palpation (with the formula $v = 0.5(l \times w^2)$, where *l* is tumour length and *w* is tumour width) every 2 days up to day 16.

The anti-JAM-B antibody (clone JB4.2) was developed in B. A. Imhof's laboratory and will be described elsewhere. For JAM-B blocking experiments, 100 μg of JB4.2 was injected intraperitoneally every 3 days into tumour-burdened Tc1 and wild-type mice. On day 12, tumours were measured and processed for histological analysis.

Subcutaneous angiogenesis assay. Assays were performed as described previously²⁹. Sponges were implanted into the flanks of age-matched and sex-matched Tc1 and wild-type littermate control mice and on the following day the sponges were injected directly with either VEGF (10 ng final concentration) or PBS as a control, every 3 days up to 14 days. On day 14 the sponges were harvested and fixed for immunostaining for blood vessel examination.

Western blot analysis. Wild-type and Tc1 primary endothelial cells were plated into 6-cm or 10-cm dishes and grown in MLEC (mouse lung endothelial cell) medium to 70% confluence. The medium was removed and the dishes were washed twice with PBS followed by lysis with RIPA buffer or 1 × modified sample buffer (3% SDS, 60 mM sucrose, 65 mM Tris-HCl pH 6.8). For phosphorylation studies, the cells were incubated for 4 h in serum-free Optimem, after which half of the dishes were treated for 5 min with 30 ng ml⁻¹ VEGF or 30 ng ml⁻¹ bFGF at 37 °C. The remainder were left untreated. The cell lysates were sonicated briefly

and centrifuged, and the supernatant was collected for western blot analysis. Protein (30–100 μg) for each protein sample was loaded onto 8–12% gels and western blot analysis was performed. Membranes were incubated with primary antibody at 4 °C (VEGFR2/phospho-VEGFR2, ERK1/2 and phospho-ERK1/2 all from Cell Signaling Technology). Anti-ADAMTS1 antibody was a gift from L. Iruela-Arispe. Anti-PTTG1IP antibody was raised in rabbits against the human PTTG1IP protein. Anti-JAM-B antibody was provided by B. A. Imhof. Incubation for 1 h with the relevant secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody was followed by chemiluminescence detection of bands.

Aortic ring assay. This assay was performed as described previously^{27,28}. In brief, aortae were isolated from Tc1 and wild-type littermate controls, sliced into rings and serum-starved overnight in Optimem. Aortic rings were embedded in a collagen matrix and cultured in the presence of VEGF (30 ng ml⁻¹), bFGF (30 ng ml⁻¹) or PBS as a negative control or 10% FCS as a positive control. For RNAi studies, aortic rings were transfected with various siRNAs (Dharmacon) before being embedded in collagen. Angiogenic sprouts were counted up to 7 days after embedding. To confirm gene knockdown, whole aortic rings were transfected with RNAi for 48 h. RNA was extracted from the aortae with the Qiagen RNeasy mini kit and reverse transcribed; the resulting complementary DNA was used for RT-PCR analysis.

Blood vessel quantification. Frozen tumour sections or paraffin-fixed sponge sections were immunostained with rat anti-endomucin (Santa Cruz) primary antibody to identify blood vessels. The number of blood vessels was counted in a double-blind manner across entire midline sections of size-matched tumours or sponges^{27,28}. Blood vessel density was calculated as the number of blood vessels per unit area of section.

Statistical analysis. Statistical significance was calculated with Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Animal regulations. All animals were used in accordance with UK Home Office regulations.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Methods

Primary lung endothelial cell isolation

Primary lung endothelial cells were isolated from wild-type and Tc1 mouse lungs as described previously²⁸.

Primary kidney endothelial cell isolation

Since primary mouse lung endothelial cells express very low levels of JAM-B, we isolated primary kidney glomerular endothelial cells to examine JAM-B protein expression levels. Briefly, kidneys were removed from wild-type and Tc1 mice, rinsed in 70 % ethanol followed by Hanks Balanced Salt Solution (HBSS). The kidneys were minced to approx. 1mm³ and digested in 2 % collagenase (type I) at 37 °C for 30 min. The digested tissue was passed through a 70 µm cell strainer using a flattened pestle and rinsed with HBSS. The resulting cell suspension was passed through another cell strainer and the cell suspension was centrifuged at 1, 200 rpm for 5 min. The cell pellet was resuspended in endothelial cell medium and seeded on to pre-coated (0.1% gelatin, 1:100 fibronectin, 1:100 type I collagen) tissue culture flasks. Endothelial cells were sorted from other cell types as previously described²⁸.

Bone marrow transplant

Bone marrow transplant experiments were carried out as described in Brittan M et al (J. Pathol., 2005). Briefly, female, wild-type mice were exposed to two doses of irradiation (500 rads each) to ablate the bone marrow. This was immediately followed by injection of approximately 1 x 10⁶ bone marrow cells from either male, Tc1 mice or male, wild-type mice. After 2 weeks, all mice that received the bone marrow

transplant (BMT) were injected subcutaneously into the scruff with 1x10⁶ B16F0 melanoma cells. Tumours were grown for 12 days, harvested and processed for histology as described.

Preparation of mouse Y chromosome staining in bone marrow smears and tumour sections

Fresh bone marrow smears, from mice that underwent the BMT, were fixed in methanol for 10 min and air dried before rehydrating through graded alcohols to water. Smears were pretreated with 1.0 M sodium thiocyanate (Sigma, UK) for 10 min at 80 °C and washed in PBS followed by further fixation with freshly prepared 4 % paraformaldehyde (Sigma, UK) for 2 min at room temperature. After further washing, smears were dehydrated through alcohols to 100 % ethanol and air-dried. Mouse Y chromosome paint (Cambio, UK) was applied, covered with coverslips and sealed with rubber solution glue. Slides were hybridised by heating to 60 °C for 10 min on a hot block and then placed in a humidified chamber at 37 °C for at least 3 h. Following incubation, coverslips were removed gently and slides rinsed and washed in 0.5 x SSC for 5 min prior to final washing in 3 changes of PBS. Smears were mounted in DAPI-containing mountant (Invitrogen, UK).

Immune cell immunostaining

Frozen tumour sections from wild-type and Tc1 mice were fixed with ice-cold acetone or methanol for 10 min, washed twice with PBS and incubated with blocking buffer (5 % BSA, 5 % goat serum in PBS) for 30 min at room temperature. This was followed by three further washes in PBS and an overnight incubation with the primary antibody (F4/80, 1:100 (Serotec, UK), CD4, 1:100 and CD8, 1:100 (BD Pharmingen,

UK) at 4°C. The following day the sections were washed three times with PBS and incubated with a FITC-conjugated secondary antibody, diluted in blocking buffer, for 1 h at room temperature, washed three times with PBS and mounted.

Human Down Syndrome cell culture

All human material was consented for use in research. The project was ethically approved by the North East London Health Authority. Human foetal primary cells from DS and gestation age-matched normal skin were cultured in RPMI supplemented with 15 % FCS and grown at 37°C, 5 % CO₂. Cells were grown to 70 % confluency and subsequently used for signalling experiments.

Fluorescence *In Situ* Hybridisation

Cells were harvested using standard techniques. Briefly, on reaching 70 % confluence, cells were synchronised with 0.05 µg/ml colcemid for 1 h. Cells were then detached by trypsin, pelleted by centrifugation and incubated in a hypotonic solution, 0.075 M KCl, for 10 min at 37 °C. Cells were then fixed in three changes of fresh 3:1 methanol: acetic acid and dropped onto clean glass slides. For chromosome counting, cells were stained with 0.5 µg/ml DAPI in Citifluor antifade solution and at least 20 metaphase spreads counted for each cell line. Chromosome range was noted, together with the modal number as an indication of cell ploidy.

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) was performed using FITC-labelled paints for chromosomes 10, 16 and 17 (Cambio, UK) following manufacturer's instructions. Cells were counterstained with DAPI (200 ng/ml) and mounted in Citifluor antifade solution. Images were captured with a Zeiss Axiophot microscope equipped for epifluorescence using a cooled CCD-camera (Hamamatsu, Welwyn Garden City,

UK). Image analysis was performed using Smart Capture X software (Digital Scientific, Cambridge, UK).

RNA extraction, cDNA synthesis and RTPCR

Primers for both the mouse and human genes were designed using the Primer3 program (<http://frodo.wi.mit.edu>). To examine transcript expression of both the human and mouse genes, primary lung endothelial cells isolated from wild-type and Tc1 mouse lungs were grown to 60-70% confluency. RNA was extracted using either the Trizol method (according to the manufacturers' instructions) (Invitrogen, UK) or the QIAGEN RNeasy mini kit (QIAGEN, UK). cDNA was synthesised from equal concentrations of RNA isolated from both genotypes (Superscript III RT kit, Invitrogen, UK). For RTPCR analysis of the human genes, the following primers were used: *JAM-B*: 5-TGCTCTGAGTGGAACTGTGG-3, 5-CACCTGGATATCCAACAGA-3; *ADAMTS1*: 5-CCTCTGTCTGTGTGCAAGGA-3, 5-GTGGTCCAGTTGGAATTGT-3; *ETS2*: 5-GCAAAGGTGTGATGAGTCAA-3, 5-CCTCTGCAGATTCACGTTCA-3; *ERG*: 5-AACGAGCGCAGAGTTATCGT-3, 5-GTGAGCCTCTGGAAGTCGTC-3; *PTTG1IP*: 5-GGACAGTCTCTCTCGTCTTGC-3, 5-CAGAGAAAACGCAGGGTTC-3. For RTPCR analysis of the mouse genes, the following primers were used: *Jam-b*: 5-CATCATAGCAACGGTTGTGG-3, 5-TTTGGTTCAGCTCAAAACTG; *Adamts1*: 5-CAGGAAGCATAAGGAAGAAG-3, 5-GCACAGTCTTAGCATCATC-3; *Erg*: 5-CAGTAGCCCGCTTGCTAATC-3, 5-TGCACCTTGGTCATGATGT-3; *Ets2*: 5-CGCCCAAGATATTTCTGTGT-3, 5-TGGAAGATCCCTCCTCTGATTG-3; *Pttg1ip*: 5-AGAAGTACCACCACCCCTTG-3, 5-GTCTCATGGCAGGTTTTGGT-3. For all reactions, except for mouse *Adamts1*, the following conditions were used: 94 °C for 4 min, 30 cycles of 94 °C for

15 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec, followed by 72 °C for 10 min. For mouse *Adams1* the following reaction was used: 95 °C for 5 min, 30 cycles of 95 °C for 60 sec, 62 °C for 60 sec, 72 °C for 60 sec, followed by 72 °C for 10 min. PCR products were run on a 1.8% agarose gel and the bands were visualised under UV light.

For analysis of gene expression in Tc1 and wild-type BM transplanted tumour sections, genomic DNA was isolated. PCR reactions for human *ADAMTS1* and *ETS2* were performed as described above using the same cycle conditions and primers, but the expected product sizes were 350 bp for *ADAMTS1* and 540 bp for *ETS2*. To examine the presence or absence of Y chromosome in B16F0 tumour cells, genomic DNA was extracted and PCR reactions were performed as described in Brittan M et al. (J. Pathol., 2005). Male and female mouse genomic DNA were used as a positive and negative control respectively.

Flow cytometric analysis

Wild-type and Tc1 primary endothelial cells were seeded in 24-well plates and the following day were stimulated with 30 ng/ml VEGF for various times. VEGF stimulation was terminated by placing the cells on ice and rinsing with ice-cold Optitem. On ice, cells were acidified for 10 min with cold Optitem at pH 4.0 containing 1 % bovine serum albumin. Cells were then washed once with ice-cold FACs buffer (PBS containing 1 % heat-inactivated FBS). On ice, cells were then incubated with PE-conjugated VEGFR2 antibody in ice-cold FACs buffer for 45 min, washed three times with FACs buffer and incubated for 5 min in 0.5 ml FACs buffer containing 5 mM EDTA. The cells were scraped and analysed using the FACSCalibur flow cytometer (BD).

Immunofluorescence and confocal microscopy

Wild-type and Tc1 primary endothelial cells were seeded onto coverslips and allowed to attach and grow for 24 h in full endothelial cell growth medium. The cells were serum-starved overnight and half were stimulated for 10 min with 30 ng/ml VEGF. After VEGF-stimulation the cells were rinsed three times with PBS and fixed in 4 % paraformaldehyde for 5 min. Free aldehydes were quenched with 50 mM NH₄Cl in PBS for 10 min. Fixed cells were permeabilised in 0.1 % Triton X-100 in PBS/2 % bovine serum albumin for 15 min. Fixed cells were incubated at room temperature for 1 h with rabbit anti-human phospho-VEGFR2 antibody (Cell Signaling Technology) diluted at 1:100. Cells were rinsed and incubated with a donkey anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alexa-488 (Invitrogen), diluted at 1:1000 for 30 min. Cells were washed three times in PBS and once in water and then mounted in Prolong Gold Antifade reagent containing DAPI (Invitrogen). Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (LSM510, Carl Zeiss Inc.) equipped with a 63/1.4 Plan-Apochromat oil immersion objective. Alexa-488 was excited with the 488-nm line of an argon laser and DAPI with a laser diode 405-nm. Each image represents a single section of 8 µm.

PCR analysis of genomic DNA

For *ADAMTS1* genomic DNA was isolated from tails of new born mice. Wild-type locus was amplified using primers that anneal to the 5'-end (5'-TGCCACACTCACTGCTTAC-3') and the 3'-end of exon 9 (5'-TTAATGGACACCCTGCTTCC-3') of *ADAMTS1* gene. Targeted locus was amplified using primers to the 3'-end of exon 9 and the 5'-PGK-neo cassette sequence

(5'-TATCGCGCTCCCGATTTC-3'). For JAM-B genomic DNA was isolated from tails of newborn mice. Wild-type locus and targeted locus were amplified using primers to the 5' end and 3' end of the exon 5 (5'-AGACCGTGTGAGATGATAGATA-3', 5'-CCGAAGGAAGTGTCTAGTAAT-3') of JAM-B locus.

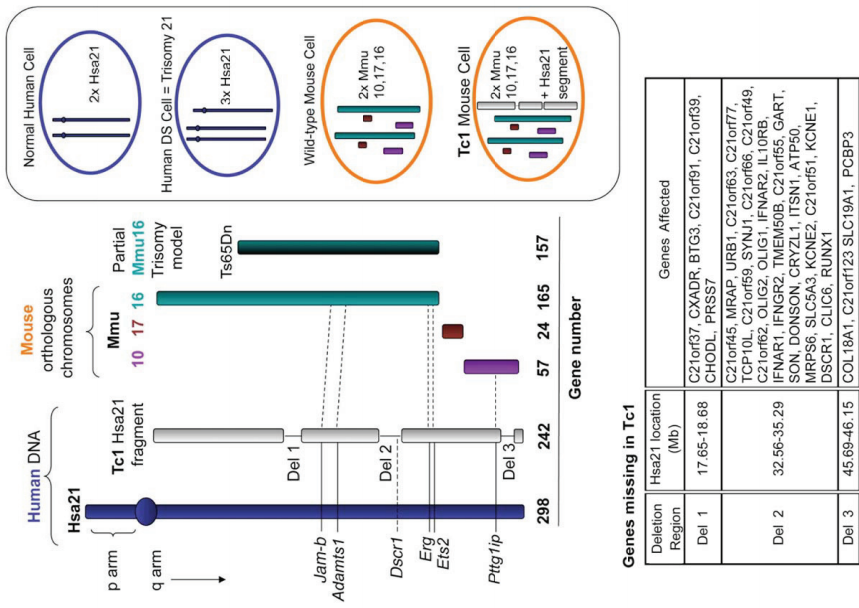
Quantitative RT-PCR for JAM-B

100 mg of frozen mouse was lysed in Trizol using Polytron. The homogenate was mixed with Chloroform and centrifuged at 4°C. The upper phase was then precipitated in isopropanol and centrifuge at 4°C for 30 min. The pellet is washed in 70% ethanol, dried and resuspended in water. 5 mgs of total RNA was reverse-transcribed using Invitrogen Superscript kit. The amount of JAM-B specific mRNA was analysed by quantitative PCR on these cDNA using SYBRGreen master mix (Applied Biosystem) using the following primers, 5'-GGGAAGCGAATGCAAGTAGA-3', 5'-GGCCACATACAGAAATCACG-3'. The mRNA level of JAM-B is normalized to the quantity of tubulin mRNA amplified using the following primers, 5'-GCA GTG CGG CAA CCA GAT-3', 5'-AGT GGG ATC AAT GCC ATG CT-3'.

Immunoprecipitation for JAM-B

100 mg of frozen mouse tissue was lysed in RIPA + protease inhibitor using Polytron. The homogenate was centrifuged twice at 4°C. Protein level was quantified by Bradford reagent (BioRad). 100 mg of protein was immunoprecipitated with a G-sepharose bead coupled anti-JAM-B antibody (JB4.2) overnight in RIPA buffer. The immunoprecipitate is loaded on SDS-PAGE gel and JAM-B protein is detected using a

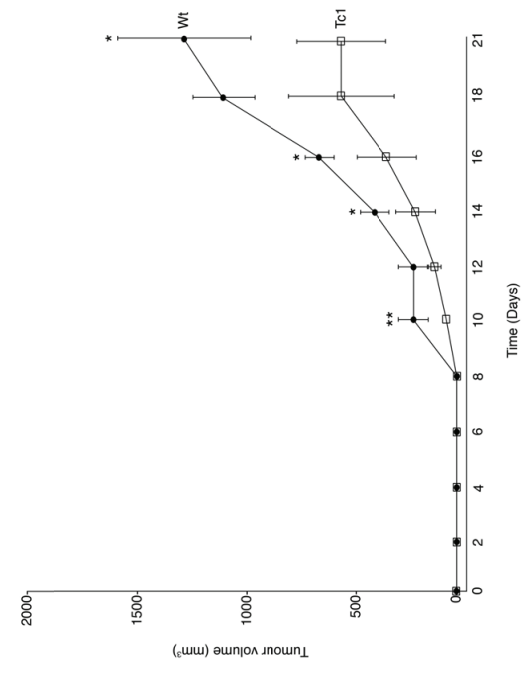
polyclonal anti-JAM-B antibody. Details of anti-JAM-B antibodies will given in a separate publication, in preparation, Garrido-Urbani S et al.



Supplementary Figure 1. Comparison of gene contents of human chromosome 21, human chromosome 21 fragment in the Tc1 mouse and mouse orthologs.

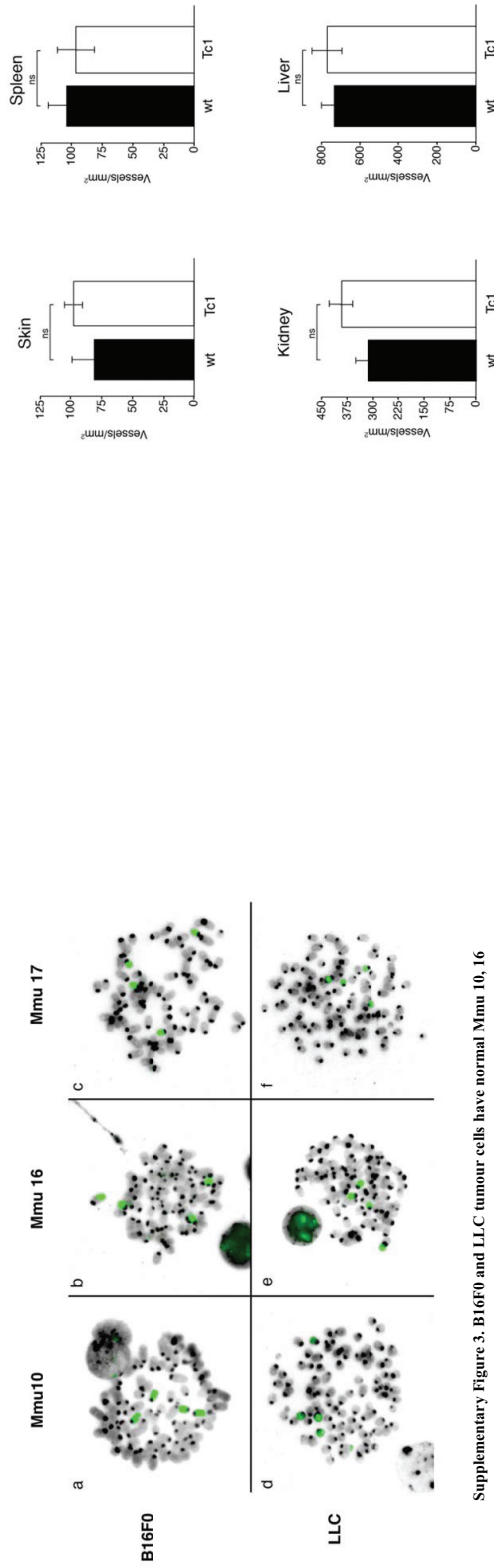
Homo sapiens chromosome 21 (Hsa21) genes are shown relative to the fragment of Hsa21 in the Tc1 mouse and the orthologous *Mus musculus* (Mmu) chromosomes 10, 16 and 17. In addition, representation of the segment of Mmu16 that is found in the Ts65Dn model of DS, is provided. A list of missing genes from the fragment of Hsa21, including *Dscr1*, and the deletion locations in Tc1 mice is provided in the

table. Other genes such as *JAMB*, *ADAMTS1*, *ERG*, *ETS2* and *PTTG1IP* are represented on the fragment of Hsa21 found in Tc1 cells and their corresponding location on the mouse orthologs. Representations of normal and Down Syndrome (DS) cells are also depicted for both species: a normal human cell with two copies of Hsa21; a DS cell with three copies of Hsa21 (trisomy 21); a normal mouse cell with two copies of Mmu10, 17 and 16; and finally a Tc1 mouse cell, which contains the normal complement of mouse chromosomes plus the Tc1 Hsa21 fragment, effectively making it partially trisomic for the three mouse chromosomes orthologous to Hsa21 i.e. a model of DS. Other autosomes and allosomes are omitted for clarity.

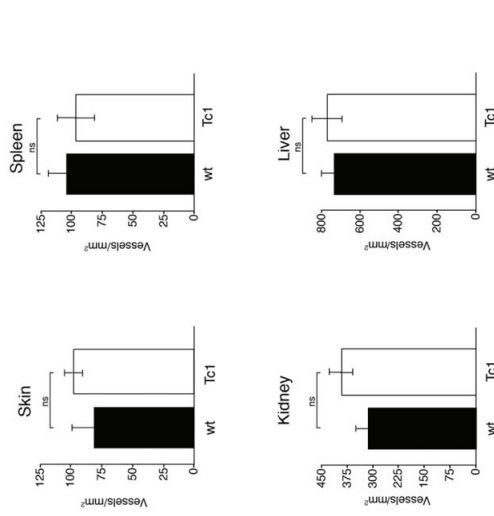


Supplementary Figure 2. LLC tumour growth kinetics is delayed in Tc1 mice.

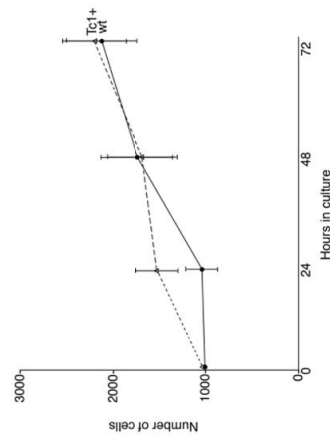
0.5×10^6 LLC tumour cells were injected into the flank of wild-type (wt) and Tc1 mice and the tumour width and length measured every 2 days up to 21 days by palpation. LLC tumour growth was delayed significantly in the Tc1 mice when compared with wild-type mice. Graph represents mean tumour volume (mm³) \pm SEM. Black discs: wild-type, white squares: Tc1. ** $P < 0.005$, * $P < 0.01$.



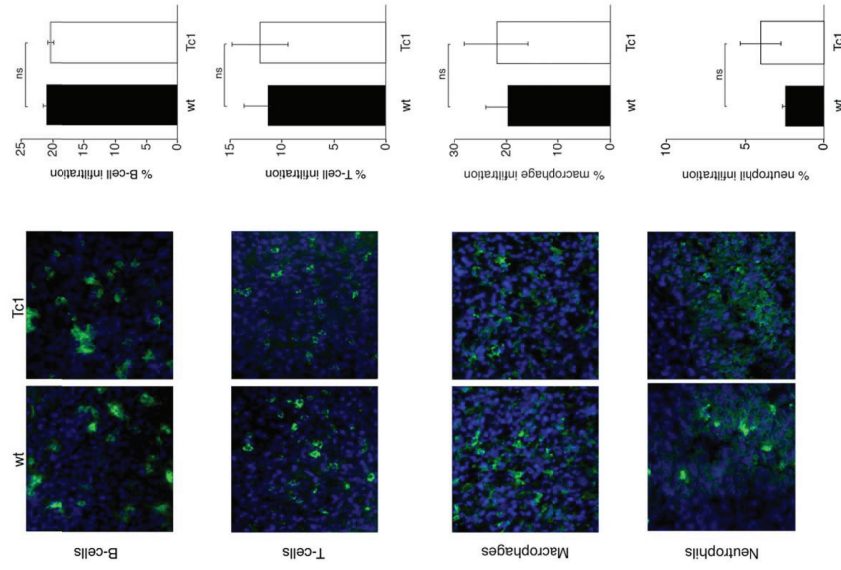
Supplementary Figure 3. B16F0 and LLC tumour cells have normal Mmu 10, 16 and 17 copy numbers. Metaphase spreads of B16F0 (a, b, c) and LLC (d, e, f) tumour cells were analysed by DNA FISH using FITC-labelled painting probes targeted to mouse chromosomes (a, d) Mmu 10, (b, e) 16 and (c, f) 17, highlighted in green. The numbers of copies of Mmu 10, 16 and 17 present in each cell was noted in at least 20 cells. The ploidy level for each cell line was determined by counting the number of chromosomes present in at least 30 metaphase spread, and the modal number calculated as 74 and 94 respectively (data not shown). B16F0 cells (chromosome range 56-92) were considered near tetraploid and LLC cells (chromosome range 65-99) were considered near pentaploid. The copy number for Mmu 10, 16 and 17 in relation to ploidy level was found to be correct for each tumour cell type.



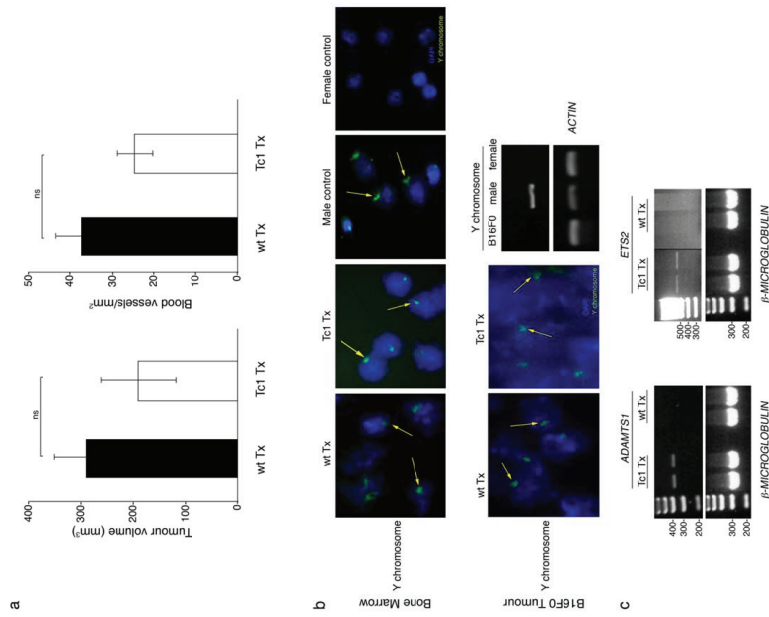
Supplementary Figure 4. Blood vessel density of various tissues is similar between wild-type and Tc1 mice. Unchallenged skin, spleen, kidney and liver paraffin-embedded tissue sections from non-tumour burdened wild-type (wt) and Tc1 mice were immunostained for endomucin and the numbers of blood vessels counted across entire sections. The density of blood vessel infiltration was similar in the various tissues from both genotypes. Values are given as mean vessel numbers/mm² tissue section. SEM, n=4-5 tissue sections per group. Black bars:wild-type, white bars:Tc1; ns=not statistically significant.



Supplementary Figure 5. The addition of a segment of Hsa21 does not affect Tc1 endothelial cell growth. To examine whether the addition of a segment of Hsa21 led to impaired Tc1 endothelial cell growth, we measured cell numbers of both wild-type (wt) and Tc1 primary endothelial cells grown in mouse lung endothelial cell (MLEC) medium, containing 20% FCS, for up to 72 h. No significant difference in the growth rate between the genotypes was observed over the 72 h period. Solid line: wild-type, dashed line: Tc1. Data represent mean number of cells \pm SEM for three independent experiments.

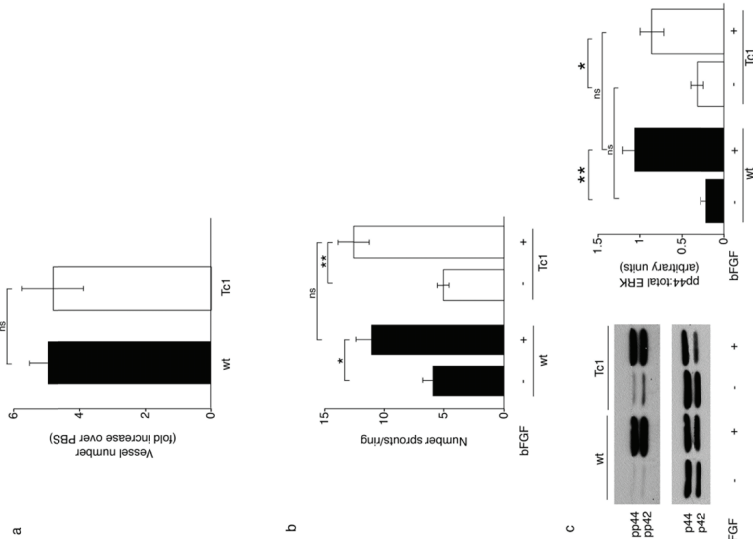


Supplementary Figure 6. Immune cell infiltration into tumours is not affected in Tc1 mice. LLC tumour sections from wild-type (wt) and Tc1 mice were immunostained for the presence of B cells (B220), T cells (CD8), macrophages (F4/80) and neutrophils (Ly6G). The numbers of infiltrating cells in the tumours was quantified. No differences were observed in the numbers of immune cells present in tumours grown in wild-type (wt) and Tc1 mice. Bar charts represent % immune cells relative to total number of cells within tumour sections (mean \pm SEM), n=4 tumour sections per genotype. Black bars: wild-type, white bars: Tc1; ns= not statistically significant.

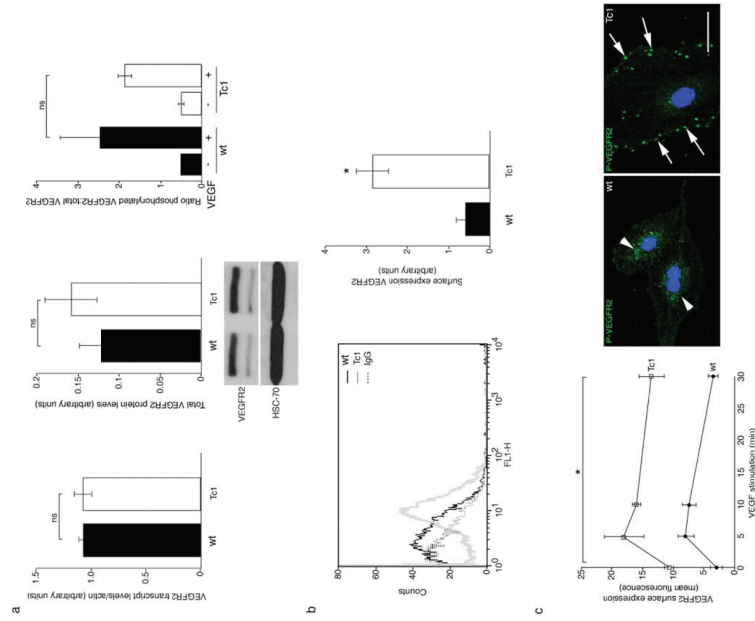


Supplementary Figure 7. Bone marrow derived hematopoietic cells do not contribute to the Tc1 mouse angiogenic phenotype. **a**, B16F0 tumours grown in lethally irradiated wild type recipient mice that had received either a wild-type bone marrow transplant (wt TX) or Tc1 bone marrow transplant (Tc1 TX) were measured after 14 days growth. Tumour growth was not significantly different between the two groups. Examination of blood vessel density of size-matched tumours from wt TX and Tc1 TX also did not show any significant difference. Bar charts represent mean \pm SEM; Black bars: wild-type, white bars: Tc1, ns=not statistically significant. **b**, To confirm that the bone marrow had successfully reconstituted into the mouse, bone marrow smears and B16F0 tumour sections from wt TX and Tc1 TX mice were probed for Y-

chromosome. Y-chromosome was present in wt TX and Tc1 TX mice as well as donor male control bone marrow (male control) (arrows). In contrast, Y-chromosome was absent from female control bone marrow (female control), Y-chromosome was also present in B16F0 tumours grown in wt TX and Tc1 TX mice. PCR analysis of cultured B16F0 cells verified the absence of Y-chromosome in these cells when compared to genomic DNA prepared from male mice. Genomic DNA from female mice showed no Y-chromosome, as a control. Actin was used as a control gene for the presence of DNA. **c**, Confirmation of the reconstitution of Hsa 21 genes in the Tc1 TX mice was performed by isolation of genomic DNA from spleens of wt TX and Tc1 TX mice, followed by PCR for human *ADAMTS1* and *ETS2*. Both human genes were present only in the Tc1 TX mice and not wt TX mice. β -microglobulin was used as a control gene for the presence of DNA.

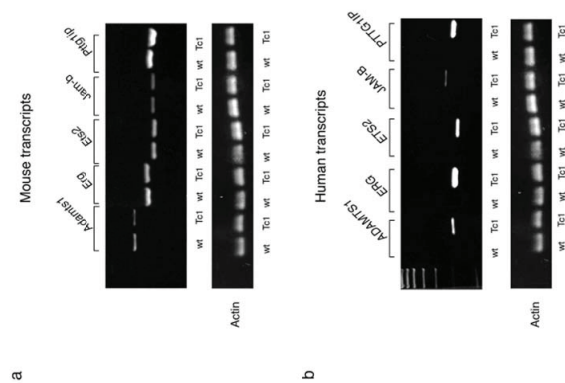


Supplementary Figure 8. bFGF-stimulated angiogenic responses are not affected in the Tc1 mice. *a.* *In vivo* analysis showed no significant differences between bFGF-stimulated angiogenic infiltration of sponges in wild type (wt) and Tc1 mice. Bar chart represents mean numbers of infiltrating blood vessels/mm² of sponge section±SEM. *b.* *Ex vivo* analysis showed no significant differences in numbers of microvessel sprouts after bFGF stimulation in wild type (wt) and Tc1 aortic rings. Bar chart represents mean numbers of sprouts/ring±SEM. *c.* Western blotting for phospho-ERK1/2 (pp44/pp42) revealed that Tc1 and wild-type (wt) control primary endothelial cells responded equally well to bFGF stimulation (+) (30 ng/ml for 5 min) with similar levels of pp44/pp42. Bar chart represents densitometry results (mean±SEM) of relative pp44/pp42 levels from 3 independent experiments. Total ERK1/2 provides relative loading control. Black bars: wild-type, white bars: Tc1. *P<0.001, **P<0.005.

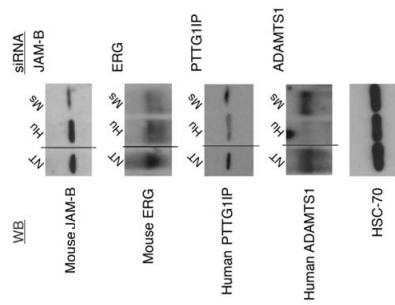


Supplementary Figure 9. Aberrant subcellular localisation of VEGFR2 in Tc1 endothelial cells. *a.* Levels of VEGFR2 transcript, total and phosphorylated-VEGFR2 protein were not significantly different between wild type (wt) and Tc1 endothelial cells. For transcript levels actin was used as the qRT-PCR housekeeping gene. For total VEGFR2 protein, values are given relative to HSC-70. Bar charts represent mean±SEM, n=3 individual cell preparations; ns=not statistically significant. Black bars: wild-type, white bars: Tc1; ns=not statistically significant. *b.* Surface levels of VEGFR2, analysed by flow cytometry, were increased significantly in Tc1 endothelial cells compared with wild-type (wt) endothelial cells grown in complete growth medium. Bar chart represents mean±SEM, n=4 individual cell preparations. Black bars: wild-type, white bars: Tc1. *P<0.006. *c.* Flow cytometric

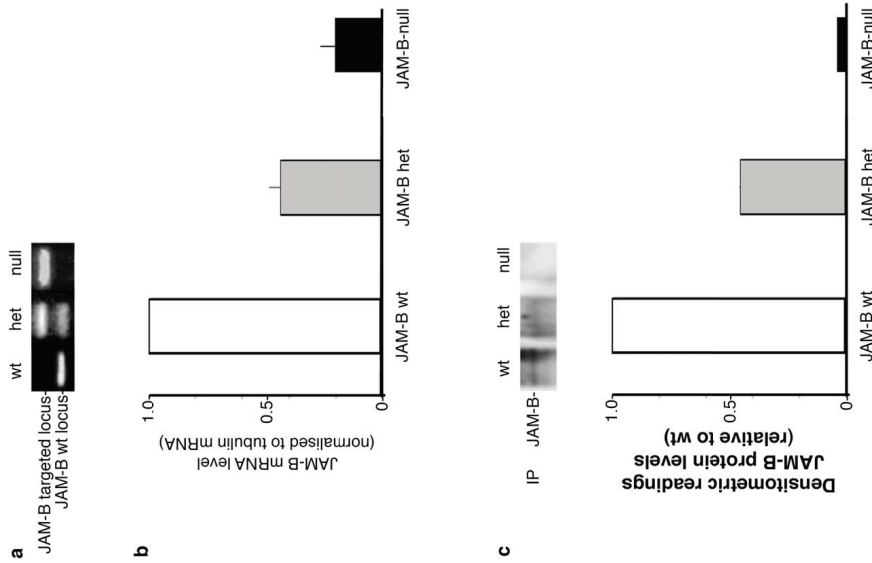
analysis for surface VEGFR2 levels of VEGF-stimulated endothelial cells showed that Tc1 cells had significantly higher levels when compared with wild type (wt) controls. Black discs=wild-type, white boxes=Tc1. * $P=0.0009-0.06$. Representative images of phosphorylated-VEGFR2 localisation in the presence of VEGF stimulation in wild-type (wt) and Tc1 endothelial cells. VEGF-stimulation led to subcellular localisation of phosphorylated VEGFR2 in wild-type endothelial cells. In contrast, phosphorylated VEGFR2 appeared to be restricted nearer the surface in VEGF-stimulated Tc1 endothelial cells. Scale bar in $c=5 \mu\text{m}$.



Supplementary Figure 10. Mouse and human gene expression in wild-type and Tc1 primary endothelial cells. **a**, The transcript levels of mouse *Adamts1*, *Erg*, *Ets2*, *Jam2* and *Pttg1ip* and **b**, human *ADAMTS1*, *ERG*, *ETS2*, *JAM2* and *PTTG1IP* genes were examined by RT-PCR using RNA isolated from wild-type (wt) and Tc1 primary endothelial cells. No difference in the transcript levels of the mouse genes was seen between the genotypes. As expected, the human transcripts were only detected in the Tc1 endothelial cell RNA extracts and not the wild-type (wt) RNA extracts. Actin was used as the loading control.

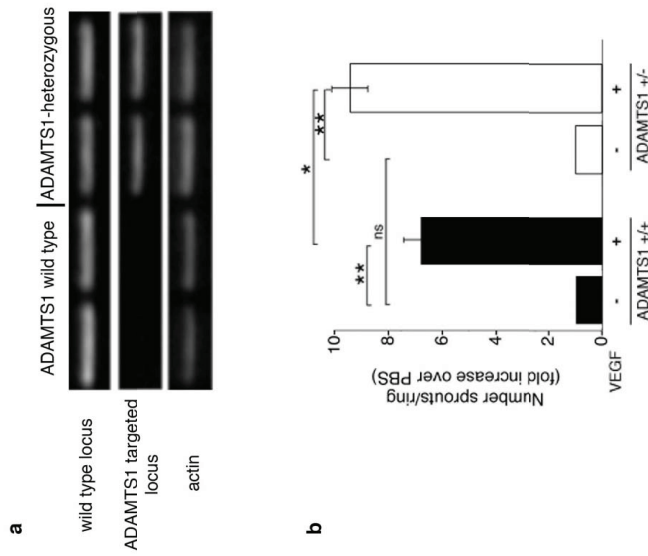


Supplementary Figure 11. Protein expression in endothelial cells and gene expression in aorta is reduced after siRNA treatment. Tc1 primary endothelial cells were transfected with either human (H) siRNA or mouse (M) siRNA to JAM-B, ERG, PTTG1IP or ADAMTS1. Mouse siRNA to JAM-B and ERG reduced mouse protein levels but had no effect on human protein expression. Human siRNA to PTTG1IP and ADAMTS1 reduced human protein levels without affecting mouse protein expression. Controls for all were not treated with siRNA but oligofectamine alone (NT). HSC-70 was used as the control for equal protein loading.



Supplementary Figure 12. JAM-B levels in JAM-B heterozygous mice

a. Genomic PCR of tail-tip DNA from JAM-B-wild type (wt), -heterozygous (het) and -null (null) mice. Upper band represents JAM-B targeted locus and lower band represents wt locus. JAM-B-het display both targeted and wt bands. **b.** Quantitative RT-PCR analysis of mRNA levels in JAM-B-wt, -het and -null tissue. Results are mean mRNA levels normalised to tubulin mRNA levels. Results show that JAM-B hets have approximately half the JAM-B mRNA levels of wt controls. **c.** Immunoprecipitation of JAM-B protein from JAM-B-wt, -het and -null tissue. Densitometric readings reveal that the JAM-B-het tissue has about half the levels of JAM-B protein of wt controls. Graph represents densitometric reading relative to wt.



Supplementary Figure 13. Gene dosage effects of ADAMTS1 using ADAMTS1-heterozygous mice **a.** PCR analysis of genomic tail DNA from two wild type and two ADAMTS1-heterozygous mice shows the presence of the targeted allele in ADAMTS1 heterozygous mice but not wild type mice. Actin acts as a loading control. **b.** ADAMTS1 wild-type (+/+) and heterozygous (+/-) aortic rings were incubated either with (+) or without (-) VEGF. VEGF-mediated vessel sprouting from ADAMTS1 +/- aortic rings was increased significantly when compared with ADAMTS1 +/+ aortic rings. Values are given as the fold increase in mean microvessel sprout numbers per ring at 9 days of culture + SEM, n=24-48 aortic rings per genotype per test. Black bars: +/+; white bars: +/-; *P<0.02, **P<0.005, ns=not statistically significant.

ADAMTS1 Contributes to the Acquisition of an Endothelial-like Phenotype in Plastic Tumor Cells

Carmen Casal¹, Antoni Xavier Torres-Collado², María del Carmen Plaza-Calonge¹, Estefanía Martino-Echarri¹, Santiago Ramón y Cajal³, Federico Rojo⁴, Arjan W. Griffioen⁵, and Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque¹

Abstract

Cancer stem cells have been hypothesized to explain tumor plasticity, including the capability to adopt distinct differentiation commitments. Among the mechanisms of tumor neovascularization, the ability of some malignant cells to mimic an endothelial phenotype has been recognized by a capacity to form matrix-enriched pseudovascular structures. In addition to the expression of genes associated with an endothelial nature, the molecular dynamism of specific microenvironments may also be critical. Here, we report the identification of the extracellular protease ADAMTS1 as a critical molecule for tumor cells to acquire endothelial-like properties. In a fibrosarcoma model, ADAMTS1 increased tumor growth rate in an angiogenesis-independent manner, influencing the tumor cells to display an exclusive endothelial-like gene signature. We documented the relevant expression of ADAMTS1 in aggressive and highly plastic melanoma and Ewing sarcoma cells. Notably, inhibiting ADAMTS1 action compromised the endothelial mimetic attributes observed in this setting. Our findings provide insights into how the tumor microenvironment can elicit endothelial mimicry by tumor cells.

Cancer Res; 70(11); 4676–86. ©2010 AACR.

Introduction

Events of tumor neovascularization are a basic principle during tumor progression. Although the process of angiogenesis has been recognized as the major protagonist, alternative mechanisms have been highlighted in literature (1). Among these specialized mechanisms is the plasticity of some tumor cells to acquire endothelial-like (EL) properties to align and form pseudovascular structures (2). This phenomenon was first described in aggressive melanomas and is called vasculogenic mimicry (VM; ref. 3), due to genotypic and phenotypic characteristics that are reminiscent of embryonic vasculogenesis. Another example of tumor plasticity is the process of cellular differentiation from cancer stem cells (CSC). Thus far, most of the research about CSCs hypothesizes that these cells possess proliferative and

self-renewal potential that is necessary to generate a new emerging tumor. Like normal tissue stem cells, CSCs are expected to display a range of differentiation capabilities, a feature that has not been deeply studied. Importantly, research with various types of sarcoma tumors has revealed their mesenchymal-like differentiation properties. For example, the origin of Ewing sarcomas, the second most frequent bone tumor in young people, has provoked an interesting debate. First named as “endothelioma” of the bone by James Ewing (4), DNA microarray studies later confirmed their endothelial and neural crest-derived origin (5). Indeed, published reports underlined the mesenchymal stem cell features in Ewing tumors and in other bone and soft tissue cancers (6–8).

The role of the microenvironment for tumor plasticity has been studied under various conditions. First, the importance of mechanical and physical properties of the matrix has been reported to play a main role in stem cell commitment (9) and tumorigenesis (10). Second, emerging studies have shown that aggressive tumor cells can be reprogrammed in embryonic microenvironments (11). As for the stem cell niche, its characterization has been limited to cellular components (12) although the role of extracellular factors, including proteases, requires further attention.

ADAMTS1 represents the first described member of the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family of proteases (13). It has been reported to display antiangiogenic properties (14, 15); however, its mechanism of action during tumor progression seems controversial. Protumorigenic and prometastatic roles of ADAMTS1 have been proposed by induction of a

Authors' Affiliations: ¹GENYO (Pfizer-University of Granada-Andalusian Government Centre for Genomics and Oncological Research), Armilla, Granada, Spain; ²Medical Oncology Research Program and ³Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital Research Institute; and ⁴Oncology Service, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain; and ⁵Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

C. Casal and A.X. Torres-Collado contributed equally to this work.

Corresponding Author: Juan Carlos Rodríguez-Manzaneque, GENYO-Centro de Investigación Biomédica, Armilla 18100, Granada, Spain. Phone: 349-582-41000, ext. 20360; Fax: 349-588-19132; E-mail: juanCarlos.rodriguez@genyo.es.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4197

©2010 American Association for Cancer Research.

stromal reaction (16) and by its activity on epidermal growth factor–like ligands (17, 18).

Here, we report that the overexpression of ADAMTS1 in a fibrosarcoma model caused an increased tumor growth rate that is angiogenesis independent. A closer analysis showed a relevant staining of periodic acid-Schiff (PAS)/laminin 5 γ 2–positive loops and an exclusive EL gene signature in tumor cells. We further observed the presence of ADAMTS1 protease in aggressive melanoma and Ewing sarcoma cells, previously characterized by their capacity to mimic vasculogenic-related events. Our studies showed both mesenchymal and EL commitments of Ewing tumor cells. Finally, the inhibition of ADAMTS1 compromised their endothelial mimesis.

Materials and Methods

Cell culture

Human Ewing sarcoma (EW7, SIM/EW27, and RD-ES) and human melanoma (MUM2B, MUM2C, C8161, and C81-61) cell lines (provided by Dr. Griffioen, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands) were cultured in RPMI with 10% fetal bovine serum (FBS), 5 mmol/L L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. Human fibrosarcoma HT1080 cells (from the American Type Culture Collection) were cultured in DMEM with 10% FBS, 5 mmol/L L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂. Full-length human ADAMTS1 used for stable clones was described elsewhere (19). If required, conditioned medium was concentrated with Strataclean Resin (Stratagene). Cell layer was harvested with radioimmunoprecipitation assay buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% NP40, 1 mmol/L EDTA]. For capillary-like formation assays, 25 μ L of Matrigel (BD Biosciences) were spread onto eight-chamber BD Falcon glass culture slides (BD Biosciences) or onto 96-well plate. Cells were seeded at 2.5×10^4 cells per well (high density) in eight-chamber slides and at 5×10^3 cells per well (low density) in 96-well plates, and maintained with RPMI-1% FBS. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) treatments were performed with 1 μ mol/L TIMP1 or TIMP3 (R&D Systems) added to Matrigel before polymerization. For cocultures, either human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC) or EW7 cells were labeled with 20 μ g/mL of Cell Tracker CM-Dil (C7000, Molecular Probes). HUVEC (1.5×10^4) were cocultured with 1.0×10^4 EW7 cells in an eight-chamber culture slide coated with Matrigel. After 24 hours, cells were fixed with 4% formaldehyde and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were captured with an Axiocam MRM digital camera (Zeiss) attached to an AxioImager A1 microscope (Zeiss). For adipogenic and osteogenic differentiation, 1.5×10^5 EW7 cells were seeded in a 12-well plate and incubated with media from StemPro Adipogenesis and Osteogenesis differentiation kits as indicated (Life Technologies Invitrogen). Finally, cells were stained with Oil Red O (Sigma) to visualize lipid vesicles or with 2% Alizarin Red solution (Sigma) to visualize calcium deposits.

In vitro three-dimensional tubulogenesis fibrin gel bead assay

The fibrin gel bead assay was adapted from the described for endothelial cells (20). Here, EW7 sarcoma cells were allowed to attach to Cytodex-3 microcarrier beads (GE Healthcare) by incubation in complete medium for 4 hours at 37°C ($1 \times 10^6/2,500$ beads). Coated beads were suspended in a larger volume of medium and incubated under agitation for 3 days. Finally, beads were embedded in a fibrin matrix (50 beads/mL). Pictures were captured at the indicated times with $\times 5$ and $\times 20$ objectives using an Axiocam ICC3 digital camera (Zeiss) attached to an Axiovert 40CFL microscope (Zeiss).

Generation of ADAMTS1-knockdown cells

Stable shRNA (short hairpin RNA)–mediated knockdown clones were achieved with MISSION vectors (Sigma). Briefly, 293T cells were cotransfected (with FuGENE 6) with lentivirus envelope and gag-pol elements (provided by Dr. Recio, Vall d'Hebron University Hospital Research Institute, Barcelona, Spain) in addition to lentiviral MISSION shADAMTS1 or MISSION nontarget shRNA control vectors. Viruses were used to infect target cells in the presence of 8 μ g/mL polybrene. Different shADAMTS1 clones were selected with 0.5 μ g/mL puromycin.

Tumor xenograft assays

Nu/Nu BALB/c mice (5 per group) were s.c. injected in the right flank with 5×10^6 cells per 200 μ L. Mice weight and tumor size were assessed every 3 days after cell injection. Tumor volumes were calculated by the equation $D^2d^2\pi/6$ in which D is the tumor diameter at its widest and d at its smallest (21). Test subjects were sacrificed after 21 days following proper guidelines.

Immunoblot analysis

Samples were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose and polyvinylidene difluoride membranes. After blocking with 5% low-fat milk, membranes were incubated with the monoclonal antibody mouse anti-human ADAMTS1 [clones 5D4E11B5 and 3E46B4 (provided by Dr. Iruela-Arispe, University of California, Los Angeles, Los Angeles, CA)]. Signal was detected with the SuperSignal WestDura kit (Pierce).

Immunohistochemistry

Antigen retrieval was approached in two different ways: (a) Proteinase K: 20 minutes at 37°C, for VE-cadherin and laminin 5 γ 2 antibodies, and (b) Tris-EDTA (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA; pH 8): 10 minutes at 650 Watt microwave followed by 10 minutes at room temperature for CD31 antibodies. Later, sections were blocked and incubated with the following primary antibodies: polyclonal rat anti-mouse CD31 (9F1; 1:10 dilution), monoclonal mouse anti-human laminin 5 γ 2 (1:100 dilution; Novocastra), polyclonal rabbit anti-FVIII-related antigen (Chemicon), polyclonal rabbit anti-human VE-cadherin (1:100 dilution; Cayman Laboratories), and monoclonal mouse anti-human ADAMTS1 (clone 3E46B4). Final visualization was obtained with the Envision

system (DAKO). PAS staining (Sigma) was done following standardized methods. Microvessel density was determined by the Chalkley morphometry analysis (immunostaining with anti-FVIII-related antigen antibody). For frozen tissue sections, visualization was obtained by incubation with 3,3'-diaminobenzidine. For phalloidin staining, Phalloidin-Texas red was added to fixed and permeabilized cells for 45 minutes and slides were mounted with the Vectashield mounting media with DAPI (Vector).

RNA isolation and reverse transcription-PCR analysis

Total RNA was isolated from cells and tissue sections using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) followed by RNase-free DNase treatment (Macherey-Nagel). cDNA synthesis was done with 1 μ g of total RNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed using EcoTaq DNA polymerase (Byoline) with the specific primers (Supplementary Table S1). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was done using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using 7500 Real-time PCR System with the specific primers (Supplementary Table S2). The expression of each target gene was normalized to the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase or β -actin.

Results

Effects of ADAMTS1 expression in an HT1080 fibrosarcoma model and analysis of neovascularization and related features

To study the role of this protease during tumor progression, HT1080 fibrosarcoma cells were modified to overexpress ADAMTS1 protein (Fig. 1A). The s.c. injection of modified and control cells in nude mice induced the development of

a tumor mass, which was monitored over a period of 21 days. Although initial growth rate was similar for both cases, significant differences were detected at day 10 and at day 21, when the animals were sacrificed. Mice injected with ADAMTS1-HT1080 cells developed significantly larger tumors (final volume, $fv = 2.65 \pm 1.36 \text{ cm}^3$) compared with tumors produced by control cells ($fv = 1.31 \pm 0.44 \text{ cm}^3$; Fig. 1B), differences that were corroborated by the final tumor mass (Fig. 1C).

Detailed histologic and immunohistochemical evaluation of these tumor specimens was approached to observe any changes in blood vessel development. The initial detection of mouse vessels was achieved by staining with the endothelial-specific markers anti-FVIII-related antigen (Fig. 1D) and anti-mouse CD31 (Fig. 2A, a–b). The results showed relevant changes between the two groups. Contrast to the final tumor mass, the density of mouse vessels decreased in ADAMTS1 overexpressors compared with control xenografts (Fig. 1D). In an attempt to reconcile the differences between tumor growth and vessel density, the relevance of alternative mechanisms of neovascularization was evaluated. PAS staining, a known method used in various tumor models, was performed to identify vascular and pseudovascular networks (3). Although positive PAS staining was visualized in all cases, networks resembling the described VM structures were mainly detected in tumors derived from ADAMTS1-overexpressing cells (Fig. 2A, c–d). Because this staining procedure does not provide specific molecular information, immunostaining of the tumors with human laminin 5 γ 2 and VE-cadherin antibodies was performed; these are proteins reported to be overexpressed and important in VM events (22). The laminin 5 γ 2 pattern observed in the tumors derived from ADAMTS1-overexpressing cells was similar to that observed by PAS staining (Fig. 2A, e–f). VE-cadherin was also present in ADAMTS1-overexpressing tumors

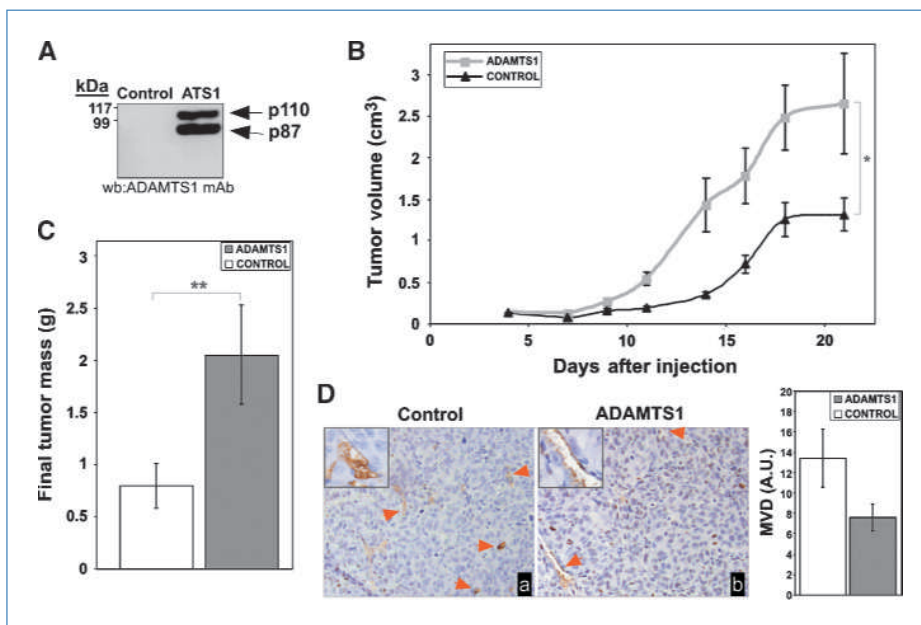


Figure 1. Growth of HT1080 fibrosarcoma tumor xenografts. A, 48-h conditioned medium from a six-well plate (control and ADAMTS1-overexpressing HT1080 cells) was analyzed by Western blot. mAb, monoclonal antibody. B, progression of tumors in HT1080 xenografts. Tumor volume was measured every 3 d until sacrifice. C, representation of final tumor weight of HT1080 xenografts. D, immunolocalization of mouse blood vessels using anti-FVIII-related antigen antibody in control (Da) and ADAMTS1-overexpressing (Db) HT1080 xenografts. Arrows, positive signals. Inset, a magnification representing a single vascular structure. Graph represents microvessel density (MVD) assayed by the Chalkley method. (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.05$, Mann-Whitney U test). A.U., arbitrary units.

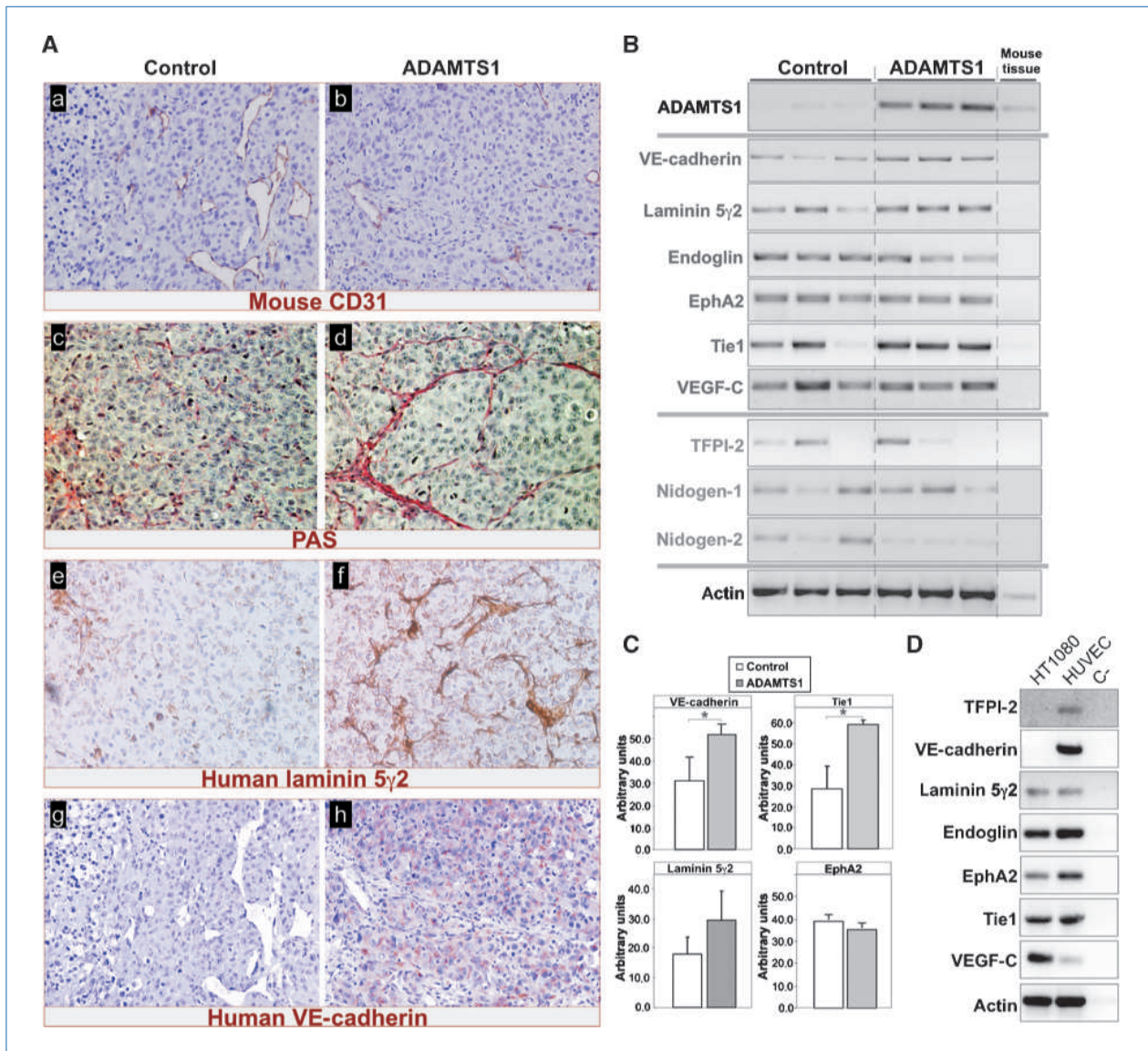


Figure 2. Evidence of an EL phenotype in ADAMTS1-overexpressing HT1080 xenografts. A, a to h, immunodetection in paraffin sections of control (a, c, e, and g) and ADAMTS1-overexpressing (b, d, f, and h) tumors, as follows: a and b, anti-mouse CD31 antibody; c and d, PAS staining; e and f, anti-human laminin 5γ2; and g and h, anti-human VE-cadherin. B, total RNA (0.5 μg) from xenograft samples was subjected to RT-PCR with specific oligos for the human sequences of the indicated genes. Mouse tissue was used as a control for specificity. C, densitometric quantification of *VE-cadherin*, *laminin 5γ2*, *Tie1*, and *EphA2* expression normalized versus actin levels in control and ADAMTS1 xenografts (*, $P < 0.1$, Mann-Whitney U test). D, gene signature of HT1080 cells compared with HUVEC. Total RNA (0.5 μg) was subjected to RT-PCR with specific oligos for the human genes mentioned above.

whereas its expression was practically absent in control samples (Fig. 2A, g–h).

The expression of various genes implicated in the VM phenomenon and ADAMTS1 substrates TFPI-2 and nidogens 1 and 2 was evaluated by RT-PCR. Importantly, all the designed oligonucleotides were specific for human sequences; thus, detected levels will originate from the grafted human cells. Levels of the endothelial-specific genes *VE-cadherin*, *Tie1*, and *laminin 5γ2* were upregulated in ADAMTS1-overexpressing tumors (Fig. 2B and C), supporting our previous results from the staining procedures

(Fig. 2A). Surprisingly, the expression of these endothelial-specific genes was also detected in control tumors (Fig. 2B). To determine the source of this gene expression, we evaluated control HT1080 cells and compared them with endothelial cells (Fig. 2D). With the exception of *VE-cadherin*, RNA levels of all these molecules were detected in HT1080 parental cells, suggesting that this sarcoma-derived cell line already possessed the potential to be driven into an EL lineage. This property was acquired when cells were implanted into the animals in the presence of the protease ADAMTS1.

With regards to the phenomenon of tumor plasticity and the acquisition of an EL phenotype, we decided to analyze several melanoma and sarcoma cellular models that have been already described as positive for these events (2).

Presence of ADAMTS1 in sarcoma and melanoma cells

We explored the presence of ADAMTS1 in several melanoma and Ewing sarcoma cell lines that have already been classified as positive (MUM2B, C8161, and EW7) or negative (MUM2C, C81-61, RD-ES, and SIM) for their capacity to mimic an EL phenotype. Importantly, the expression of endogenous *ADAMTS1* is increased significantly in cells that exhibit EL properties (EL+ cells; Supplementary Fig. S1; Fig. 3A). Additional genes that were analyzed included *lami-*

nin 5γ2 and *TFPI-2*, which have already been shown to be differentially expressed in EL+ cells (23). Protein levels of ADAMTS1 were also evaluated (Fig. 3B). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment was used to upregulate endogenous ADAMTS1 (24). ADAMTS1 protein levels were detected in the conditioned medium of EL+ cell lines, whereas very low or no detectable levels were detected in the nonaggressive cells. To confirm the activity of ADAMTS1, COOH-terminal cleavage of TFPI-2 in those cell lines was analyzed; the results revealed that the cleavage of TFPI-2 did coincide with the endogenous expression of ADAMTS1 (Supplementary Fig. S2).

In addition, we analyzed the expression of *ADAMTS1* in EW7-derived xenografts, a known EL+ tumor type (23), to

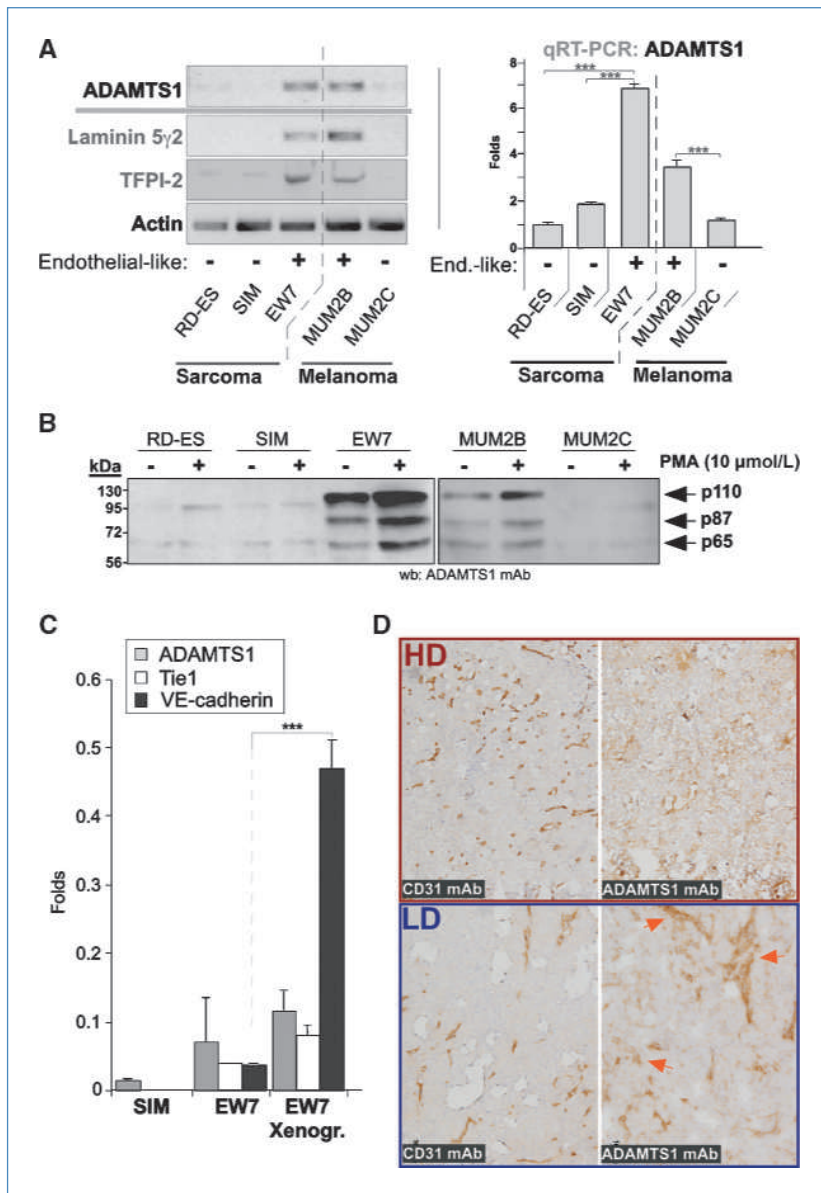
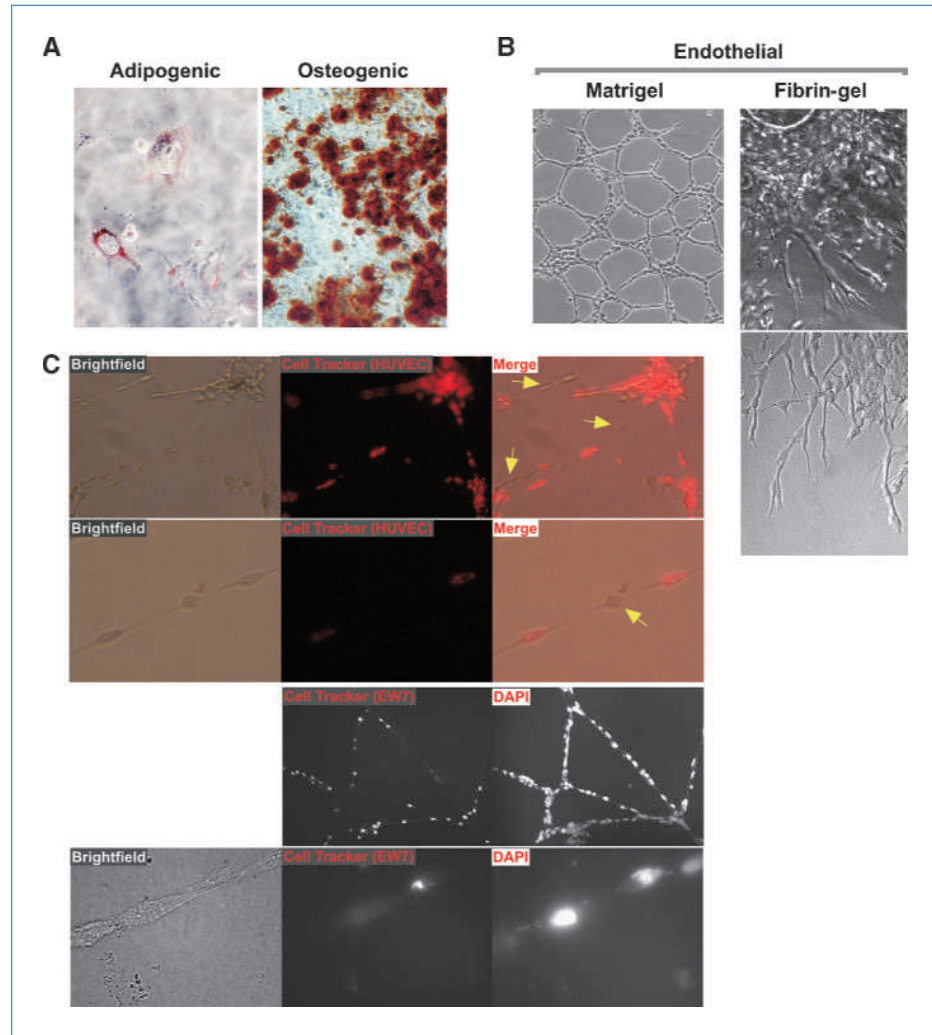


Figure 3. Presence of ADAMTS1 in melanoma and sarcoma cells. A, total RNA (0.5 μg) from sarcoma and melanoma cells was subjected to RT-PCR (left) and qRT-PCR (right) with specific oligos for the indicated genes. EL+ and EL- refers to the ability of these cells to form or not form capillary-like structures, respectively (***, $P < 0.001$, one-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison posttest). B, 48-h conditioned medium from the indicated cells was analyzed by Western blot. As indicated, cells were treated with PMA. Arrows, ADAMTS1 forms. C, total RNA (0.2 μg) from EL+ (EW7) and EL- (SIM) cells and EW7-derived xenograft samples was subjected to qRT-PCR with specific oligos for the indicated genes (***, $P < 0.001$, unpaired t test with Welch's correction). D, cryosections from EW7-derived xenografts were immunostained with antibodies for mouse CD31 and human ADAMTS1. Note the difference of ADAMTS1 pattern between areas with higher vascular density (HD; top) and low vessel density (LD; bottom). Arrows, locations where ADAMTS1 appears to be mainly stored.

Figure 4. Tumor cell plasticity of EW7 sarcoma cells. A, EW7 cells were properly treated to differentiate into an adipogenic and osteogenic lineage. Fixed cells were stained with Oil Red O and Alizarin Red S to visualize the respective phenotypes. B, EL features of EW7 demonstrated by culture in Matrigel and fibrin gel matrices. For the fibrin gel model, two pictures are presented. C, HUVEC and EW7 cells were cocultured in Matrigel. Top, HUVEC were labeled with Cell Tracker. Merge panels show the coexistence of HUVEC and EW7 cells (pointed with yellow arrows) in capillary-like structures. Bottom, EW7 cells were labeled with Cell Tracker and all nuclei were counterstained with DAPI. All images were captured with $\times 5$ and $\times 20$ objectives.



determine the effect of a microenvironment on ADAMTS1. qRT-PCR was performed and compared with EW7 and SIM cell lines. In addition to *ADAMTS1*, endothelial-related markers *Tie1* and *VE-cadherin* were also evaluated as a measure of the progression of this tumor plasticity phenomenon. These analyses confirmed the presence of *ADAMTS1* in xenografts at comparable levels with its basal expression in cell culture (Fig. 3C). Finally, the presence of ADAMTS1 in tumor sections was evaluated by immunohistochemistry. Given the extracellular features of ADAMTS1, its localization *in situ* does not display well-defined patterns. A detailed study of tumor sections revealed distinct areas with various degrees of ADAMTS1 expression. Although those areas with high vessel density, determined by CD31 staining, presented a homogeneous positive signal for ADAMTS1 (Fig. 3D, top), the analysis of zones with a decreased density of CD31+ vessels, which is reminiscent of the reported EL+ events (23), revealed a more restricted pattern of ADAMTS1 staining. This is probably associated with extracellular reservoirs (pointed by arrows in Fig. 3D, bottom).

These results clearly indicated a high intratumor variability, which makes it difficult to track the expression of ADAMTS1 in human tumors. However, review of various public microarray analyses of human sarcomas allowed us to assess the role of protease ADAMTS1 (Supplementary Fig. S3).

Plasticity of sarcoma tumor cells

EW7 cells have a potential mesenchymal origin. This potential was shown by its ability to differentiate into an adipogenic and osteogenic lineage when maintained under proper conditions (Fig. 4A). The ability of these cells to acquire an EL phenotype was assessed through a series of Matrigel experiments (Fig. 4B). In addition, fibrin-based three-dimensional experiments were used to study the formation of endothelial-derived tubules (20). Importantly, formation of multicellular tubular structures by EW7 cells was observed in this assay (Fig. 4B).

To further prove the capacity of EW7 cells to share common properties with endothelial cells, EW7 cells were

cocultured with HUVECs in Matrigel. One of the cell types was stained with a fluorescent cell tracker to distinguish between the two cell types. Close analysis of the resulting capillary-like structures (Fig. 4C) confirmed the ability of EW7 cells to mimic the endothelial phenotype, which is characterized by aligning themselves, even individual cells (pointed with yellow arrows in Fig. 4C), in structures mainly formed by endothelial cells.

Impairment of capillary-like formation by the inhibition of ADAMTS1 and the use of specific metalloproteinase inhibitors

We have shown that overexpression of ADAMTS1 enhanced an EL phenotype in HT1080 fibrosarcoma cells. The next step was to investigate whether downregulation of this protease have an inhibitory effect on the endothelial properties of these cells. Therefore, we inhibited ADAMTS1 expression in EW7 cells by shRNA technology (Fig. 5A) and then evaluated the effect of its absence on the formation of capillary-like structures. At low cellular density (Fig. 5B), a clear delay over time and impairment of formation of structures were observed in cells with inhibited expression of ADAMTS1. However, cultures at high density required a deeper evaluation. Although all cells were apparently capable of forming capillary-like structures, knockdown ADAMTS1 cells displayed a loose appearance at brightfield capture, which was reminiscent of an ameboid-like conformation with no robust cell-cell contacts (Fig. 5C). To better visualize the impaired cell-cell contacts, the distribution of actin stress fibers was evaluated by phalloidin staining. In knockdown cells, actin fibers were accumulated at the border, more obvious at higher magnifications; in contrast, control cells displayed a more dispersed actin distribution (Fig. 5C). Knockdown ADAMTS1 cells appeared detached among themselves and the capillary-like structures that they formed were more fragile and unstable. No alterations were detected for VE-cadherin and laminin 5 γ 2 proteins (Supplementary Fig. S4).

We extended this characterization by the treatment of control cultures in Matrigel with specific protease inhibitors. ADAMTS1 is specifically inhibited by TIMP3 but not by TIMP1 (19). No obvious differences were observed at 4 hours of treatment; however, a 24-hour exposure to TIMP3 induced a clear effect (Fig. 5D). The formation of capillary-like structures was delayed and disrupted.

Finally, we investigated the potential regulation of the EL properties by the protease ADAMTS1 in the fibrin-based tubular assay (as showed in Fig. 4B). Comparative experiments with ADAMTS1-knockdown cells were performed. These experiments were done with low concentrations of serum (1%) to avoid the main proliferative response of these tumor cells, which would mask any differentiation-like process. Primary sprouts were evaluated at 24 hours; its formation was clearly inhibited in ADAMTS1-knockdown cells, as observed under the microscope (Fig. 6A). Quantification of the number of sprouts per bead (Fig. 6B) confirms a strong difference between control and inhibited cells.

Discussion

The current concept of tumor neovascularization is far from the classic view that explained such process solely by the growth of new vessels from preexisting ones (1, 24). In our attempt to contribute to the understanding of the mechanisms of action of ADAMTS1 during tumor progression, we obtained strong evidence that supports its participation in events of tumor plasticity that lead to alternative mechanisms of vascularization.

In the context of a fibrosarcoma model, we observed that although tumor growth was clearly increased in the presence of ADAMTS1, a close evaluation of vascularization revealed the presence of angiogenesis-independent networks. Although the participation of ADAMTS1 during tumor progression seemed controversial in literature, it is certainly striking that our tumor model displayed both a protumorigenic effect and an antiangiogenic response, as revealed by the decreased vascular density in those same tumors.

The analysis of the angiogenesis-independent networks showed similar characteristics to those previously identified in distinct tumor types. In addition to the enrichment with extracellular matrix components, we observed a clear upregulation of key proteins such as laminin 5 γ 2 and VE-cadherin, which is accompanied by a gene signature reminiscent of an endothelial nature. These characteristics were already associated with events of VM in melanoma (2). Surprisingly, our particular genetic characterization of HT1080 fibrosarcoma cells revealed the endogenous presence of endothelial-related genes. As far as we know, this EL phenotype of HT1080 cells has not been studied or reported. However, a plastic behavior of these cells has been described in a proteolytic-dependent manner (25, 26). Our work suggests that ADAMTS1 activity drives HT1080 plasticity to a definitive EL lineage.

After the evaluation of our xenografts and the initial characterization of ADAMTS1 on melanoma and Ewing sarcoma cells, we believed that we were facing an example of VM and tumor plasticity. The ability of tumor cells to differentiate into a specific cellular lineage, EL in our case, recapitulates many of the mechanisms that a normal stem cell undergoes to cause an endothelial cell and, by extension, a vascular structure. According to the nature of ADAMTS1, we can assume that its proteolytic-derived microenvironment modifications represent relevant clues to modulate phenotypic properties of tumor cells. ADAMTS1 exemplifies the capacity of extracellular matrix proteases to alter physical matrix properties; however, more studies are needed to further address this matter. Thus, it is important to identify the substrates of ADAMTS1 in a particular setting. Here, we showed the required coexpression of TFPI-2, which has already been reported as important for VM progression (27), and of the glycoprotein nidogen-1, a basic component of the vascular basement membrane, and identified as promoter of human embryonic stem cells assembly (28).

Although our initial results could be oriented to both melanoma and sarcoma tumor models, we decided to focus in sarcoma whose mesenchymal origin has provoked a relevant

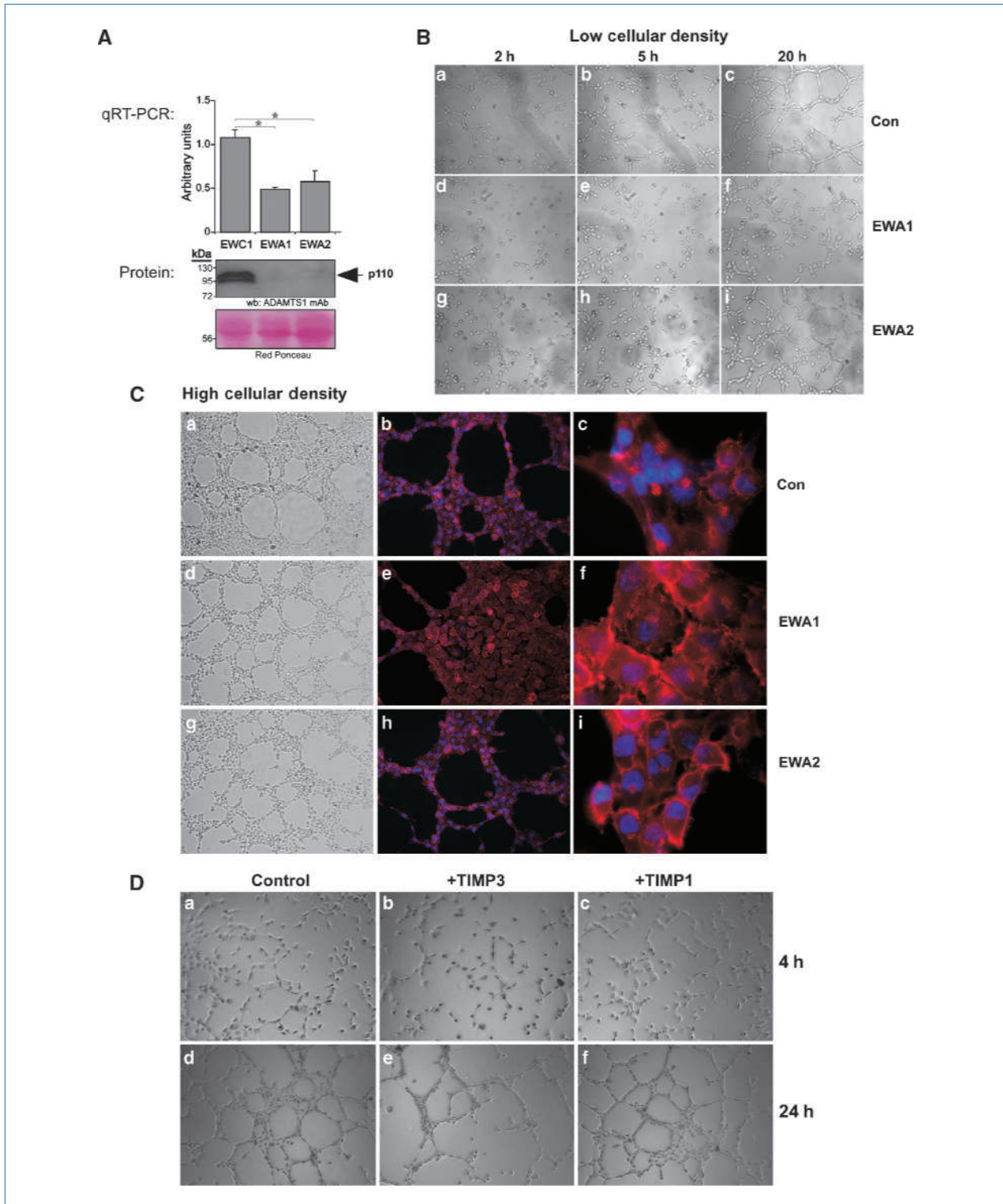


Figure 5. Impairment of capillary-like formation by the inhibition of ADAMTS1 and by specific metalloproteinase inhibitors. A, qRT-PCR and Western blot analysis for ADAMTS1 in control (EWC1) and knockdown-ADAMTS1 (EWA1 and EWA2) EW7 cells (*, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison posttest). B, control and knockdown cells were cultured in Matrigel at low density. Brightfield pictures were taken at indicated time points with a $\times 10$ objective. C, control and knockdown cells were cultured in Matrigel at high density. Cells were stained with phalloidin and DAPI at 18 h. Brightfield images (a, d, and g) were taken at $\times 10$ magnification. Fluorescent images showed phalloidin and DAPI staining at $\times 10$ (b, e, and h) and $\times 100$ (c, f, and i). D, Matrigel assay with EW7 wild-type cells using TIMP3 and TIMP1. Pictures were captured at 4 and 24 h. All images were taken at $\times 10$ magnification.

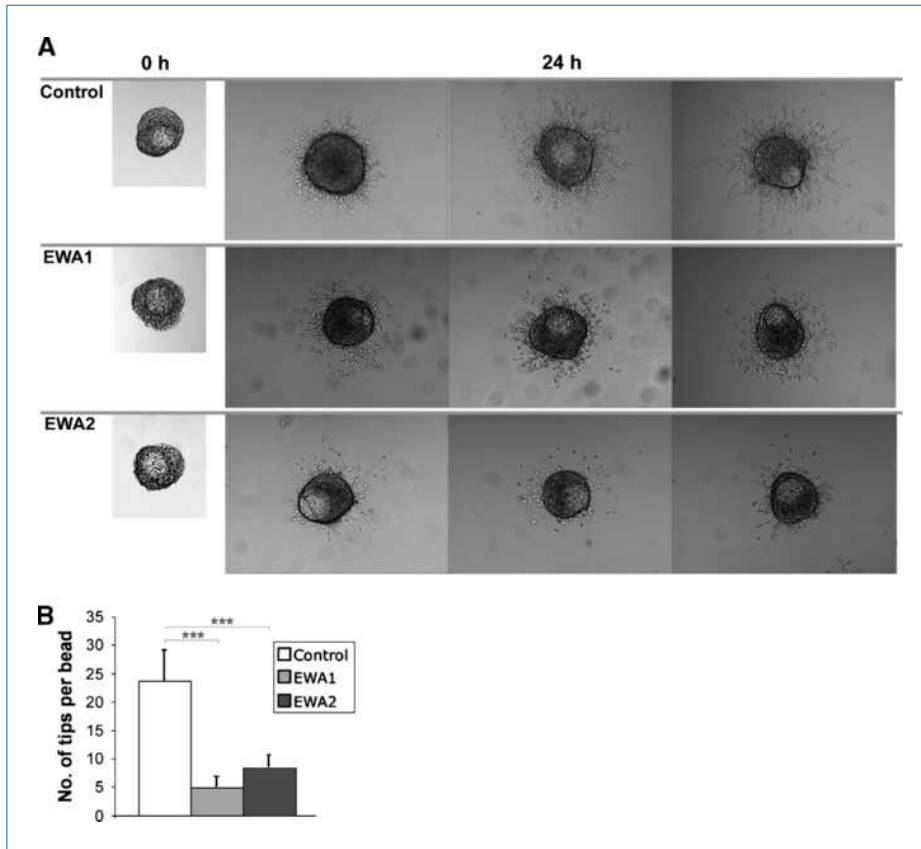


Figure 6. Inhibition of tube formation in the fibrin gel bead assay by downregulation of ADAMTS1. A, beads were coated with control and knockdown-ADAMTS1 EW7 cells. Coated beads were then embedded in fibrin gel and maintained for 24 h. Representative images were taken at 0 and 24 h. B, graphical representation of the quantification of tubular structures at 24 h since the embedding of cells in fibrin gels. For quantification, 12 random beads were pictured from six different experimental wells and cell sprouts were counted for each bead. (***, $P < 10^{-5}$, two-tail Student's *t* test).

debate in relation with CSC hypotheses (6–8, 29). In fact, the capacity of sarcoma cells to differentiate into mesenchymal-derived phenotypes has been shown in literature (30, 31). We were also able to reproduce this feature in our tumor model. An endothelial origin of Ewing tumors has also been proposed (4, 5) and the derivation of an endothelial lineage from mesenchymal progenitors has been shown (32, 33). In this context, it is mandatory to consider the aberrant nature of those tumor cells, whose plastic capabilities are under discussion. For example, van der Shaft and colleagues (23) suggested a hypoxic environment as a leading force that enhances the presence of alternative circulatory networks in Ewing sarcomas. Importantly, ADAMTS1 has been found to be regulated by hypoxia in endothelial cells (34). The convergence of embryonic and tumorigenic pathways has also been highlighted to determine this phenotypic plasticity (11). As for ADAMTS1, its contribution during embryonic development has been reported for myocardial morphogenesis (35) and its genetic deletion results in morphologic defects in various tissues (36). Although this role has not been extensively studied, our current results encourage new approaches to obtain a better perspective of ADAMTS1 activity during morphogenesis and cellular differentiation.

Here, we achieved the characterization of EL properties of EW7 tumor cells in Matrigel assays; moreover, we added

unique information as the coculture approach with nontumorigenic endothelial cells. The evaluation of these assays confirmed the capacity of sarcoma cells to interact directly with endothelial cells and mimic their properties by alignment and formation of capillary-like structures in an apparently arbitrary pattern. These results supported the existence of bona fide functional interactions among endothelial and tumor cells in an *in vivo* context, as previously reported for human melanoma cells in a mouse model of ischemic limbs (37), and it also suggest that the VM phenomenon could consist of hybrid tumor-endothelial structures, with relevant consequences for the best understanding of its functionality (38).

In addition, we investigated the EL capabilities of Ewing tumor cells in the three-dimensional fibrin gel method that has been widely established to study the multistage formation of endothelial tubular structures (20). As noted in the main text, we did not obtain the same degree of success as for endothelial cells. However, it is important to notice that EW7-derived EL structures did not require the addition of fibroblast and/or additional growth factors, suggesting their autonomy, at least during initial stages of tube formation.

More important were our findings that both Matrigel and fibrin gel functional procedures were compromised by the

inhibition of ADAMTS1, as shown by shRNA technology and by treatment with specific protease inhibitors.

The contribution of extracellular proteases during tumor progression has been extensively evaluated. However, the complexity of their actions became evident after the failure of various clinical trials with protease inhibitors. In fact, the characterization of the substrates for every protease is of high significance in the field (39) and, by extension, the design of more specific inhibitors (40).

In conclusion, the dynamism of tumor microenvironment is crucial for the behavior of tumor cells, providing cues for proliferation, migration, and, as supported by this manuscript, differentiation of aberrant cells. Our findings also suggest the existence of functional CSCs, with major consequences for tumor progression contributing to an alternative mechanism of neovascularization, a phenomenon that requires a thoughtful characterization to help improve current therapies.

References

1. Dome B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2007;170:1–15.
2. Hendrix MJ, Sefter EA, Hess AR, Sefter RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:411–21.
3. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739–52.
4. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc N Y Pathol Soc* 1921; 21:17–24.
5. 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.
6. Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I, Ziman M. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Lett* 2009;279:126–36.
7. Matushansky I, Hernando E, Succi ND, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 2007;117:3248–57.
8. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 2007;11:421–9.
9. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677–89.
10. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:108–22.
11. Hendrix MJ, Sefter EA, Sefter RE, et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 2007;7:246–55.
12. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:11–21.
13. Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 2009;284:31493–7.
14. Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem* 2003;278:23656–65.
15. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349–57.
16. Rocks N, Paulissen G, Quesada-Calvo F, et al. ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction *in vivo*. *Cancer Res* 2008;68:9541–50.
17. Liu YJ, Xu Y, Yu Q. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 frag-

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Dr. J.A. Recio (Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) for providing the lentiviral-related tools, Dr. M.L. Iruela-Arispe (University of California, Los Angeles, CA) for the ADAMTS1 antibodies, and Dr. Shelley N. Thai for the English editing.

Grant Support

Ministerio de Ciencia e Innovación-Spain (SAF2006-04019), Instituto de Salud Carlos III (EMER07/055), and Fundació La Marató de TV3 (052510).

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.

Received 11/16/2009; revised 03/19/2010; accepted 03/24/2010; published OnlineFirst 05/18/2010.

- ments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 2006;25:2452–67.
18. Lu X, Wang Q, Hu G, et al. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev* 2009;23:1882–94.
19. Rodriguez-Manzaneque JC, Westling J, Thai SN, et al. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:501–8.
20. Nakatsu MN, Hughes CC. An optimized three-dimensional *in vitro* model for the analysis of angiogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 443:65–82.
21. Matar P, Rojo F, Cassia R, et al. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2004;10: 6487–501.
22. Sood AK, Sefter EA, Fletcher MS, et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001;158:1279–88.
23. van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005;65:11520–8.
24. Auguste P, Lemièrre S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54:53–61.
25. Wolf K, Mazo I, Leung H, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160:267–77.
26. Wolf K, Wu YI, Liu Y, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007;9:893–904.
27. Ruf W, Sefter EA, Petrovan RJ, et al. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003;63:5381–9.
28. Evseenko D, Schenke-Layland K, Dravid G, et al. Identification of the critical extracellular matrix proteins that promote human embryonic stem cell assembly. *Stem Cells Dev* 2009;18:919–28.
29. Riggi N, Cironi L, Provero P, et al. Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res* 2006;66:7016–23.
30. Riggi N, Suva ML, Suva D, et al. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68:2176–85.
31. Suva ML, Riggi N, Stehle JC, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2009;69:1776–81.

32. Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, et al. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 2007;5:826–34.
33. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells* 2004;22:377–84.
34. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, et al. ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 2009;284:16325–33.
35. Stankunas K, Hang CT, Tsun ZY, et al. Endocardial Brg1 represses ADAMTS1 to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell* 2008;14:298–311.
36. Shindo T, Kurihara H, Kuno K, et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest* 2000;105:1345–52.
37. Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, et al. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res* 2002;62:665–8.
38. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol* 2000;156:383–8.
39. Lopez-Otin C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:509–19.
40. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002;2:657–72.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Figure 1. Evaluation of ADAMTS1 in sarcoma, melanoma, and Mesenchymal Stem Cells (MSCs).

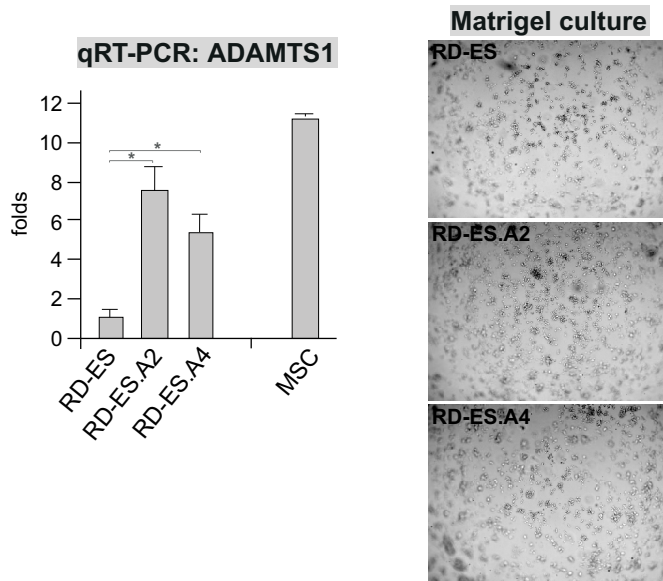
A, Expression of ADAMTS1 in RD-ES and MSCs. As discussed in the manuscript, RD-ES Ewing sarcoma cells are reported as EL- and ADAMTS1-negative cells. In addition to the studies presented in the main text, we also obtained stable RD-ES cells that over-expressed this protease to study the potential acquisition of an endothelial-like phenotype. While the expression of ADAMTS1 was verified by qRT-PCR (left panel), the culture of these cells in Matrigel did not display any endothelial-like properties (right panel) that confirms the requirement of further molecules. High levels of ADAMTS1 were also observed in MSCs.

B, Expression of ADAMTS1 was analyzed in the pairing melanoma cells C8161/C81-61 (EL+/EL- respectively). As control, we compared with Ewing sarcoma cells EW7/RD-ES.

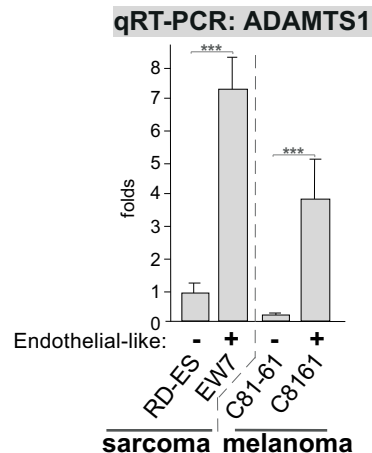
For qRT-PCR, total RNA (0.5 µg) from sarcoma, melanoma, and Mesenchymal Stem cells was subjected to qRT-PCR with specific oligos.

Matrigel culture was approached as indicated in the main text. Pictures were captured with a 5x objective. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, One-way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison post-test).

A ADAMTS1 expression in RD-ES cells and MSCs



B ADAMTS1 expression in C8161 and C81-61 melanoma cells



Supplementary Figure 2. Basal cleavage of TFPI-2 in EL+ cells.

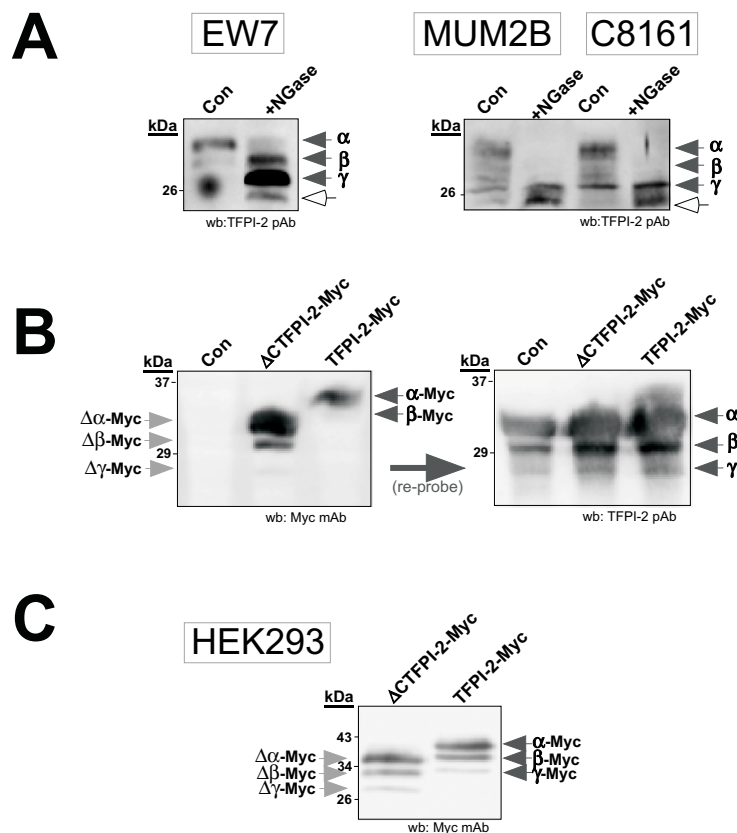
In line with our previous observations, that demonstrated the cleavage of TFPI-2 by ADAMTS1 at its C-terminal end (Torres-Collado et al., J Biol Chem. 2006 281(26):17827), we analyzed the status of TFPI-2 in those cell lines where its expression concurs with the endogenous presence of ADAMTS1.

A, Given the complexity of TFPI-2 isoforms, we performed de-glycosylation treatments with N-glycosidase F, of EW7 conditioned media or ECM from MUM2B and C8161. This treatment provoked an enrichment of the under-glycosylated form (γ TFPI-2) and it allowed the detection of an additional band with lower motility (white arrow), supporting the existence of a catalytic fragment.

B, Further demonstration of this proteolytic event was approached by parallel transient transfections of a TFPI-2-Myc and a C-terminal truncated Δ CTFPI-2-Myc chimeras, both containing a Myc tag at its C-terminal end; this truncated version was shown to be resistant to the action of ADAMTS1 as is showed in our previous results²². In EW7 cells, the detected levels of Myc-positive bands were significantly decreased for the full length TFPI-2-Myc construct, outcome of a proteolytic process, in comparison with the catalytically-resistant Δ CTFPI-2-Myc. Given the existence of important levels of the endogenous TFPI-2 protein, western blot analysis with a TFPI-2 antibody did not show significant differences.

C, Same transfection efficiency of each construct was confirmed in 293T cells that lacked both ADAMTS1 and TFPI-2. Using this cell line, the levels of Myc-positive bands was not altered among the two used constructs.

For ECM collection, cells were detached for 30 min at 37 °C with PBS supplemented with 20 mM EDTA, then rinsed twice with PBS, and finally collected and lysed with RIPA buffer.



Supplementary Figure 3. Evaluation of ADAMTS1 in human sarcomas.

To confirm the relevance of ADAMTS1 in human sarcomas we reviewed the Oncomine database, which provides publicly available data sets on cancer gene expression. Here we showed relevant data from the Bittner Multi-cancer Study and from the Schaefer Sarcoma Study. In addition we included the analysis of ADAMTS1 expression by RT-PCR from a series of human sarcomas.

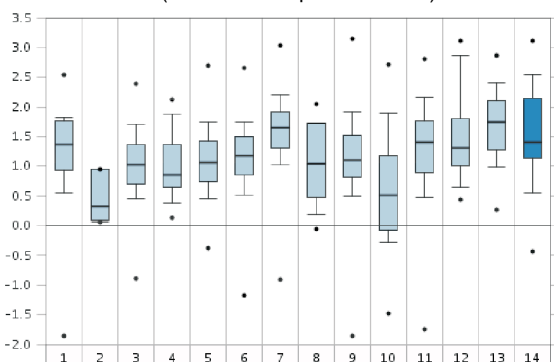
A, Expression of ADAMTS1 in the Bittner Multi-cancer Study. This study includes 1911 various tumor samples (including 42 sarcomas). The analysis by general cancer type reveals a significant over-expression of ADAMTS1 in sarcomas (p-value: 0.005; over-expression Gene Rank: in top 14%). Data and statistics were obtained for www.oncomine.org.

B, Total RNA (0.5 µg) from distinct sarcomas tumors were subjected to RT-PCR with specific oligos for human ADAMTS1, VEGF-C, Tie1, and actin.

C, Expression of ADAMTS1 in sarcomas from the Schaefer study. This study includes 37 Ewing sarcoma samples, including 27 primary tumors (20 non-metastatic and 10 metastatic) and 10 cell lines. The analysis by metastatic stage reveals an over-expression of ADAMTS1 in metastatic samples, in agreement with its role in plasticity phenomena as proposed in this manuscript. Importantly, the evaluation of co-expressed genes showed a significant correlation with distinct genes implicated in the vasculogenic mimicry phenomena. Data and statistics were obtained for www.oncomine.org.

A ADAMTS1 expression in Bittner Multi-Cancer Study

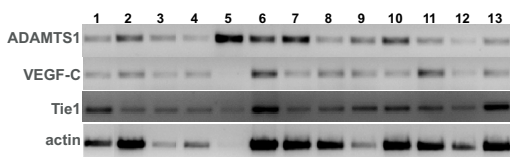
Grouped by Cancer Type (Sarcoma highlighted)
(normalized expression units)



Legend

- | | |
|----------------------------------|----------------------------|
| 1. Bladder Cancer (32) | 8. Liver Cancer (11) |
| 2. Brain and CNS Cancer (4) | 9. Lung Cancer (107) |
| 3. Breast Cancer (328) | 10. Lymphoma (19) |
| 4. Cervical Cancer (35) | 11. Ovarian Cancer (165) |
| 5. Gastrointestinal Cancer (350) | 12. Pancreatic Cancer (19) |
| 6. Head and Neck Cancer (41) | 13. Prostate Cancer (59) |
| 7. Kidney Cancer (246) | 14. Sarcoma (42) |

B



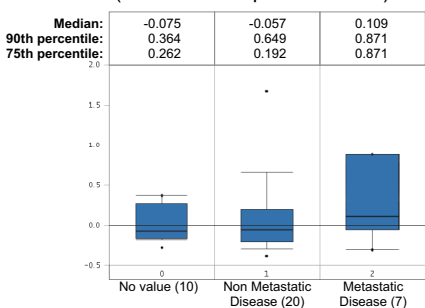
Legend

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 1. Rhabdomyosarcoma | 8. Leiomyosarcoma |
| 2. Leiomyosarcoma | 9. Endometrial Stroma sarcoma |
| 3. Soft Tissue sarcoma | 10. Carcinosarcoma |
| 4. Metastasis of Renal sarcoma | 11. Carcinosarcoma |
| 5. Soft Tissue sarcoma | 12. Leiomyosarcoma |
| 6. Synovial sarcoma | 13. Rhabdomyosarcoma |
| 7. Leiomyosarcoma | |

C

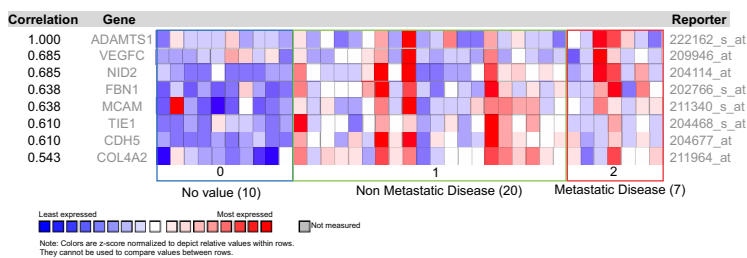
ADAMTS1 expression in Schaefer Sarcoma

Grouped by M Stage (Ewing's Sarcoma)
(normalized expression units)



Co-expression of genes with ADAMTS1 in Schaefer Sarcoma

Grouped by M Stage (Ewing's Sarcoma)
(normalized expression units)



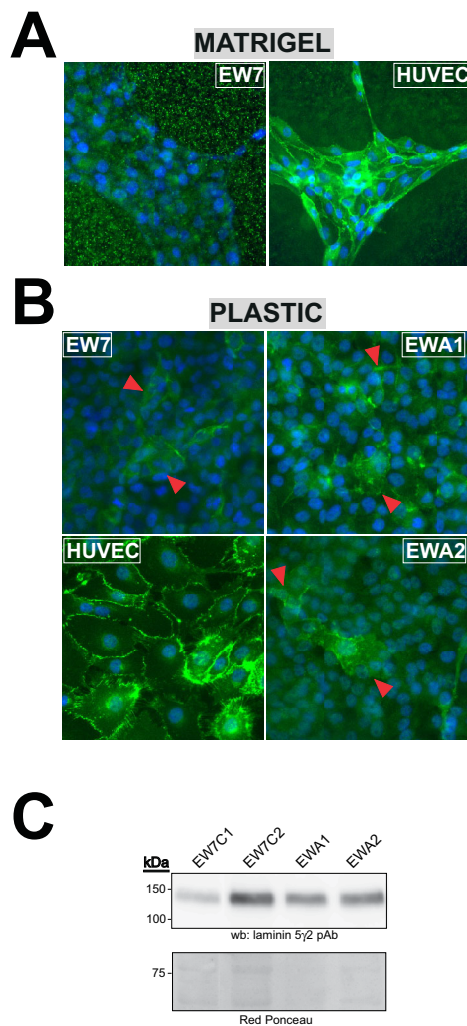
Supplementary Figure 4. Analysis of VE-cadherin and laminin 5 γ 2 in control and ADAMTS1-knockdown EW7 sarcoma cells. As key molecules in events of vasculogenic mimicry, we studied if their expression is altered when ADAMTS1 expression is down-regulated.

A, Immunostaining of VE-cadherin in EW7 cells cultured in Matrigel. No specific signal was observed in these cells. As a positive control we used HUVEC in Matrigel that showed a positive staining in cell-cell contacts.

B, Immunostaining of VE-cadherin in EW7 cells cultured in plastic. A positive VE-cadherin signal was detected in cell-cell contacts, although limited to clumps of very confluent cells (red arrowhead). A similar patched pattern was observed in control and knockdown cells. As a positive control we used HUVEC cultured in plastic.

In **A** and **B**, immunostaining was performed with anti-human VE-cadherin ab (Cayman) and mounting was done in the presence of DAPI to visualize nuclei. Images were captured with a 10x objective.

C, Expression levels of laminin5 γ 2 were evaluated by western-blot. Equal amount of conditioned media from the indicated cells (control cells: EW7C1 and C2; and ADAMTS1-knockdown cells: EWA1 and A2) was collected after 24 h in serum-free medium. Signal was detected with anti-human laminin γ 2 ab (C-20, SCB). Red Ponceau staining is showed as a loading-control.



Supplementary Table 1. Primers used for RT-PCR analyses

Transcript	GenBank Accession No.	Primer sequences
hTFPI-2	NM006528	forward 5'-GTC GAT TCT GCT GCT TTT CC-3' reverse 5'-CGA AGC TTT GGC ATC TTC TT-3'
hADAMTS1	NM006988	forward 5'-ACG AGT GCG CTA CAG ATC CT-3' reverse 5'-GTG GCT CCA GTT GGA ATT-3'
hVE-cadherin	NM001795	forward 5'-CCG GCG CCA AAA GAG AGA-3' reverse 5'-CTG GTT TTC CTT CAG CTG GAA GTG GT-3'
hLaminin 5 γ 2	NM005562	forward 5'-TTT AGC TCA GCC CAA CGA CT-3' reverse 5'-GGC TGA AAT CAG GGT CAC AT-3'
hEndoglin	NM000118	forward 5'-CTCTGCTGCTGAGCTGAATG-3' reverse 5'- GATCTGCATGTTGTGGTTGG-3'
hEphA2	NM004431	forward 5'-AGGAGAGTTTGGGGAGGTGT-3' reverse 5'-GATCTGCATGTTGTGGTTGG-3'
hTie1	NM005424	forward 5'-TCAGACACCTTGCAGACCAG-3' reverse 5'-TGGTCACAGTTAGACAGCAGAGTTTG-3'
hVEGFC	NM005429	forward 5'-AGTCGCGACAAACACCTTCT-3' reverse 5'- CATCCAGCTCCTTGTGGT-3'
hNidogen 1	NM_002508	forward 5'-AGGGTGTCTGGGTGTTTGAG-3' forward 5'-GCTGCTGGTAAAAAGTCTCC-3'
hNidogen 2	NM_007361	forward 5'-GCAGATGCAGGAACCAAAA-3' reverse 5'- GTAACTCCAAGTCTTCTTTACATT-3'
β -actin	NM001101.3	forward 5'-CCT GAC CGA GCG TGG CTA C-3' reverse 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC G-3'

Table 1

Supplementary Table 2. Primers used for qRT-PCR analyses

Transcript	GenBank Accession No.	Primer sequences
hADAMTS1	NM006988	forward 5'-TTT ACA AGC TGC CTT CAC CAC A-3' reverse 5'- TTC ACA CCA TTA AGG CTG GCA CAC-3'
hVE-cadherin	NM001795	forward 5'-TGG TCA CTC TGC AAG ACA TCA A-3' reverse 5'- TCC TCA ACA AAC AGA GAG CCC ACA-3'
hLaminin 5 γ 2	NM005562	forward 5'-TAC CCA GTG TTT CTG CTA TGG GCA-3' reverse 5'-GCT TTG CAG GAG ACC CAT TTC GTT-3'
hEphA2	NM004431	forward 5'- TAC CGA GAT CCA TCC ATC CTG-3' reverse 5'- GGA TGT CTT CAG CAT GCC CTT GTA-3'
hGAPDH	NM002046.3	forward 5'- ATC ACC ATC TTC CAG GAG CGA GA-3' reverse 5'- CAT GGT TCA CAC CCA TGA CGA ACA-3'
β -actin	NM001101.3	forward 5'- CTT CCT TCC TGG GCA TGG AGT-3' reverse 5'- TCT CCT TCT GCA TCC TGT CCG AAT-3'

Table 2

