



Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

Laura María Lagares Tena



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Programa de Doctorado en Biomedicina

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

Doctorando:

Director de la Tesis:

Laura María Lagares Tena

Dr. Òscar Martínez Tirado

Tesis realizada en el Grupo de Investigación en Sarcomas del *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge* (IDIBELL).

Barcelona, 2013

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de una beca predoctoral otorgada por el *Comissionat per a Universitats i Recerca* (CUR) del *Departament d'Innovació, Universitats i Empresa* (DIUE) de la *Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu* y los proyectos financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI08/0289 y PI11/00038).



En memoria del Dr. José Luis López Rodríguez,
Profesor de Genética de la Universidad de Santiago de Compostela.

En memoria de Alba Pérez
y de todos esos niños que no pudieron vencer al bicho.

“ -Ves, Momo -le decía, por ejemplo-, las cosas son así: a veces tienes ante ti una calle larguísima. Te parece tan terriblemente larga, que nunca crees que podrás acabarla.

Miró un rato en silencio a su alrededor; entonces siguió:

-Y entonces te empiezas a dar prisa, cada vez más prisa. Cada vez que levantas la vista, ves que la calle no se hace más corta. Y te esfuerzas más todavía, empiezas a tener miedo, al final estás sin aliento. Y la calle sigue estando por delante. Así no se debe hacer.

Pensó durante un rato. Entonces siguió hablando:

-Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿entiendes? Sólo hay que pensar en el paso siguiente, en la inspiración siguiente, en la siguiente barrida. Nunca nada más que en el siguiente.

Volvió a callar y reflexionar, antes de añadir:

-Entonces es divertido; eso es importante, porque entonces se hace bien la tarea. Y así ha de ser.

Después de una nueva y larga interrupción, siguió:

-De repente se da uno cuenta de que, paso a paso, se ha barrido toda la calle. Uno no se da cuenta cómo ha sido, y no se está sin aliento.

Asintió en silencio y dijo, poniendo punto final:

-Eso es importante. ”

Beppo Barrendero
Momo. Michael Ende

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Óscar Martínez Tirado, el haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su grupo, por su constante ayuda y apoyo. También a todos los integrantes del Grupo de Investigación en Sarcomas, pasados y presentes, y a los integrantes de los demás grupos del COM, por su apoyo profesional y personal. Y, por supuesto, a mi familia y amigos por su apoyo constante.

Sin todos ellos, cada uno en su papel, esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todos.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Sarcoma de Ewing.....	3
1.1.1. Aspectos históricos.....	3
1.1.2. Epidemiología.....	3
1.1.3. Presentación clínica.....	4
1.1.4. Diagnóstico.....	5
1.1.5. Tratamiento.....	7
1.1.5.1. Estudios sobre nuevos tratamientos.....	8
1.1.6. Aspectos genéticos.....	9
1.1.6.1. EWS/FLI1: factor de transcripción aberrante.....	12
1.2. Caveolina-1.....	15
1.2.1. La proteína CAV1.....	15
1.2.2. Caveolas.....	17
1.2.3. CAV1 y progresión tumoral.....	19
1.2.4. CAV1 en el sarcoma de Ewing.....	21
1.3. Proceso metastásico.....	22
2. Objetivos.....	25
3. Materiales y métodos.....	29
3.1. Líneas celulares.....	31
3.1.1. Condiciones de cultivo.....	32
3.1.2. Recuento.....	32
3.1.3. Crio-conservación de líneas celulares.....	32
3.2. Amplificación de plásmidos.....	33
3.3. Transfecciones estables y selección de clones.....	34
3.4. Análisis de expresión proteica.....	34
3.4.1. Obtención de extractos proteicos totales.....	34

3.4.2. Medición de la concentración proteica.....	35
3.4.3. Análisis de expresión por <i>Western Blot</i>	35
3.5. Ensayo de inmunoprecipitación.....	36
3.5.1. Obtención de extractos proteicos totales.....	36
3.5.2. Inmunoprecipitación.....	37
3.6. Análisis de expresión por RT-PCR.....	37
3.7. Inmunofluorescencia.....	38
3.8. Ensayo de la herida (<i>Wound healing assay</i>).....	39
3.9. Ensayo de migración en cámara de Boyden.....	40
3.10. Ensayo Invasión.....	40
3.11. Zimograma.....	41
3.12. Mutagénesis dirigida.....	42
3.13. Ensayos <i>in vivo</i>	42
3.13.1. Mantenimiento de animales.....	42
3.13.2. Ensayo de metástasis experimental.....	43
3.14. Análisis histológico.....	43
3.14.1. Tinción por Hematoxilina/Eosina.....	43
3.14.2. Análisis por Inmunohistoquímica.....	43
3.15. Análisis estadístico.....	44
3.16. Recursos generales y materiales.....	44
3.16.1. Equipos.....	44
3.16.2. Materiales.....	44
3.16.3. Kits.....	45
3.16.4. Reactivos.....	45
4. Resultados.....	49
4.1. CAV1 modula la capacidad del sarcoma de Ewing para metastatizar...51	51

4.2. CAV1 regula la producción de MMP-9 y la actividad de MMP-2 en células de sarcoma de Ewing.....	57
4.3. Mecanismo de regulación de MMP-9.....	61
4.3.1. El tratamiento con un inhibidor específico de la ruta MAPK recapitula parcialmente los efectos producidos por el silenciamiento de CAV1.....	66
4.3.2. El tratamiento con un inhibidor específico de la familia de proteínas RSKs no reproduce los efectos producidos por el silenciamiento de CAV1.....	68
4.3.3. La inhibición de la expresión de RSK1 afecta a la capacidad migratoria pero no a la expresión de MMP-9 en células de sarcoma de Ewing.....	70
4.3.4. El silenciamiento específico de RSK2 produce un aumento en la migración celular y en la actividad de MMP-9.....	75
4.3.5. Posibles factores de transcripción implicados en la regulación de MMP-9 por CAV1.....	79
4.4. Implicación de la Tyr14 de CAV1 en la regulación de la capacidad migratoria e invasiva de las células de sarcoma de Ewing.....	83
4.5. Genes de virulencia metastásica: SPARC.....	86
5. Discusión.....	91
5.1. CAV1 modula la capacidad del sarcoma de Ewing para metastatizar...93	93
5.2. CAV1 regula la producción de MMP-9 y la actividad de MMP-2 en células de sarcoma de Ewing.....	94
5.3. Mecanismo de regulación de MMP-9.....	97
5.3.1. Las proteínas kinasas ERK1/2 están implicadas en la regulación de la migración e invasión dependiente de CAV1 en sarcoma de Ewing	97
5.3.2. CAV1 regula la expresión del receptor RET en la línea celular A673.....	98
5.3.3. El silenciamiento de CAV1 afecta a la fosforilación de la proteína ribosomal S6.....	99
5.3.4. RSK1 y RSK2 actúan de forma diferencial en la regulación de la migración e invasión de células de sarcoma de Ewing	99

5.3.5. Posibles factores de transcripción implicados en la regulación de MMP-9 por CAV1.....	103
5.4. Implicación de la Tyr14 de CAV1 en la regulación de la capacidad migratoria e invasiva de las células de sarcoma de Ewing	106
5.5. Genes de virulencia metastásica: SPARC.....	108
5.6. Resumen.....	111
6. Conclusiones.....	115
7. Bibliografía.....	119
8. Anexo I.....	137
9. Anexo II: artículos publicados.....	141

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sarcoma de Ewing

El sarcoma de Ewing (SE) es un tipo poco frecuente de cáncer de hueso y, en menor extensión, de tejido blando, que afecta fundamentalmente a adolescentes y adultos jóvenes. Este tumor forma parte de la Familia de Tumores del Sarcoma de Ewing (ESFT) compuesta por tumores de células pequeñas como el Sarcoma de Ewing clásico, el tumor de Askin o los tumores neuro-ectodérmicos primitivos (PNET).

1.1.1. Aspectos históricos

El SE fue descrito por primera vez por los cirujanos Lücke y Hildebrand en 1866 y 1890 respectivamente [Hildebrand, 1890; Lücke, 1866]. En 1918, el Dr. Stout describe el caso de un tumor compuesto por células indiferenciadas, redondas y en disposición de rosetas, localizado en el nervio cubital, y lo define como un PNET de tejido blando [Stout, 1918]. Tres años más tarde, el patólogo James Ewing describió un tumor primario de células pequeñas y redondas en el radio de una niña de 14 años, como un endotelioma difuso de hueso [Ewing, 1921]. En 1975 se describe el primer caso de SE extraesquelético [Angervall y Enzinger, 1975] y en 1979 el primer caso de tumor de Askin, similar al PNET, y que se definió como un “tumor maligno de células pequeñas en la región torácico-pulmonar” [Askin y cols., 1979]. No es hasta 1984, que se describe el primer PNET de hueso, también compuesto por células pequeñas y redondas [Jaffe, 1984]. Este mismo año se identificó el evento molecular común en casi todas estas entidades, que sirvió para englobarlas a todas en la entidad ESFT, la translocación $t(11;22)(q24;q12)$ [Aurias y cols., 1984; Turc-Carel y cols., 1984] y, posteriormente, el gen quimérico derivado de esta, EWS-FLI1 [Delattre y cols., 1992 y 1994].

1.1.2. Epidemiología

El SE es el segundo tumor óseo más frecuente en adolescentes y adultos jóvenes después del osteosarcoma. Su incidencia anual es baja, 0.6 por millón en edades inferiores a 5 años, pero aumenta con la llegada de la pubertad alcanzando un máximo de 5 por millón [Ludwig, 2008]. Presenta una ligera predominancia en hombres (1.3-1.5:1) y es más común en caucásicos, siendo prácticamente inexistente en africanos o afro-americanos [Beck y cols., 2012; Iwamoto, 2007; Jawad y cols., 2009].

La tasa de supervivencia de este tipo de tumores es de un 60-70% a los 5 años con enfermedad localizada, de un 30% en los pacientes con metástasis pulmonar y del 10% en pacientes con metástasis ósea o en médula ósea en el momento del diagnóstico

[Esiashvili y cols., 2008; Karosas, 2010]. Sin embargo, en ausencia de quimioterapia, cerca del 90% de los pacientes mueren tras la cirugía radical, lo que sugiere que la gran mayoría de los pacientes presenta micrometástasis en el momento del diagnóstico [Chaturvedi y cols., 2012].

1.1.3. Presentación clínica

La mayoría de los pacientes presentan dolor localizado, intermitente o variable en intensidad, que normalmente se asocia a “crecimiento óseo” o a algún trauma deportivo, lo que suele retrasar el diagnóstico meses o incluso años. Otros síntomas, normalmente relacionados con enfermedad diseminada, son la disnea, alteraciones del hemograma (leucocitosis, elevada tasa de sedimentación eritrocítica) o síntomas que afecten al estado general del paciente (sudores nocturnos, fiebre tumoral de predominio vespertino) [Ludwig, 2008; Potratz y cols., 2012b].

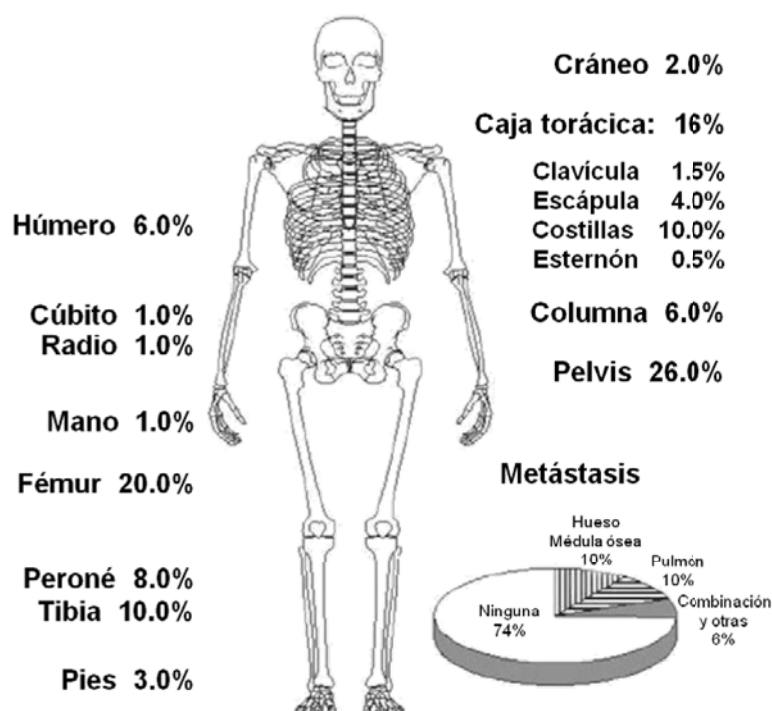


Figura 1. Distribución de la localización de tumores primarios y metástasis de SE en hueso. Datos basados en 1426 pacientes de ensayos clínicos del Intergrupo Europeo de Estudios cooperativos en Sarcoma de Ewing. Imagen modificada de Bersntein y cols., 2006a.

El SE puede presentarse en casi cualquier hueso, siendo más común en la pelvis, con un 26% de los casos, seguido por el fémur (20%), la tibia (18%), la caja torácica (16%), las extremidades superiores (9%) y la columna vertebral (6%) (Fig.1). Cuando se da en

los huesos largos normalmente surge de la diáfisis y puede producir la elevación del periostio, formando el denominado triángulo de Codman o reacciones del periostio en forma de capas de cebolla o de espículas calcificadas [Bernstein y cols., 2006a; Ludwig, 2008; Potratz y cols., 2012b].

El SE se puede dar también en tejidos blandos. Mientras que en la población pediátrica la frecuencia de SE en tejidos blandos es sólo del 15%, siendo la localización más común en el tronco [Raney y cols., 1997], en adultos menores de 40 años llega a alcanzar el 30% de los casos [Applebaum y cols., 2011].

Una característica importante de estos tumores es su gran capacidad para metastatizar, de hecho, aproximadamente un tercio de ellos se presenta con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico, siendo los tejidos más comunes los pulmones y la médula ósea (Fig.1). La metástasis en nódulos linfáticos locales es poco común y normalmente está asociada a enfermedad diseminada [Dorfman y Czerniak, 1995; Karosas, 2010; Raney y cols., 1997].

1.1.4. Diagnóstico

El método principal de diagnóstico es el diagnóstico por imagen (Fig.2). La estrategia inicial ante la sospecha de una lesión ósea es una radiografía en dos planos. Los signos radiográficos del SE son osteolisis y las reacciones del periostio mencionadas anteriormente [Iwamoto, 2007]. Para determinar la localización y extensión exacta del tumor primario es necesario realizar una tomografía computarizada (TC) y/o una resonancia magnética (RMN), lo que permite, además, evaluar el daño a estructuras adyacentes y la extensión a tejidos blandos, lo que es fundamental para la planificación de la cirugía. Para la localización de metástasis pulmonares se realiza una TC torácica. La detección de metástasis esqueléticas distantes se ha realizado históricamente mediante escintigrafía ósea, sin embargo, durante los últimos años se ha extendido el uso de la tomografía por emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa (PET-FDG) [Kaste, 2011].

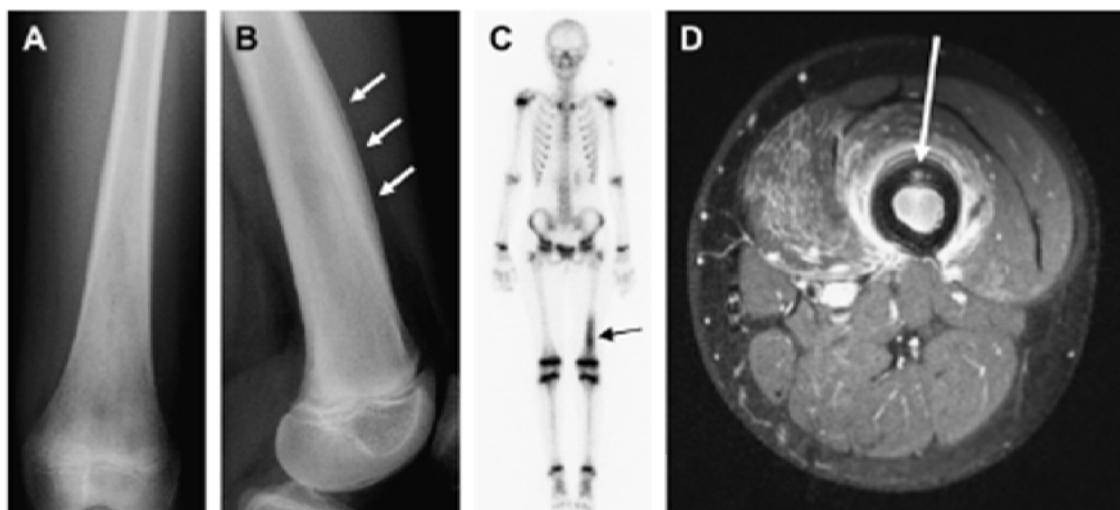


Figura 2. Imagen de una paciente de 13 años con dolor en el muslo izquierdo durante varias semanas y con presunto diagnóstico de SE. Radiografías **A.** antero-posterior y **B.** lateral del fémur izquierdo que muestran una mineralización heterogénea y una reacción en capas del periostio a lo largo de la diáfisis anterior (flechas). **C.** Gammagrafía ósea MDP [99mTc] que muestra el incremento de actividad metabólica en la zona (flecha). **D.** RMN axial con contraste que muestra un pequeño absceso cortical con saturación de grasa (flecha), lo que indica osteomielitis, confirmada posteriormente por biopsia. Imagen extraída de Kaste, 2011.

El diagnóstico definitivo requiere de la realización de una biopsia del tumor primario que permita análisis moleculares e inmunohistoquímicos.

Histológicamente, el SE se caracteriza por presentar células pequeñas con núcleos grandes, con nucléolo ausente y cromatina dispersa, y citoplasma eosinófilo de menor proporción (Fig.3). La disposición celular es densa sin apenas matriz extracelular y carece de un patrón de crecimiento claro. Los marcadores antigénicos típicos son el CD99, presente en el 90% de los tumores, y, dependiendo del nivel de diferenciación neuroectodermal, la enolasa específica neural (NSE), la S-100, el CD57 y la sinaptofisina [Riggi y Stamenkovic, 2007].

Estas características histológicas e inmunofenotípicas se solapan con las de otros tumores pediátricos como el neuroblastoma, el rabdomiosarcoma o el linfoma no Hodgkin, por lo que también se recurre a la detección de las translocaciones específicas de este tumor mediante estudios moleculares por RT-PCR (retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa) y/o FISH (hibridación fluorescente *in situ*) [de Alava, 2007; Meier y cols., 1998; Miettinen, 2006].

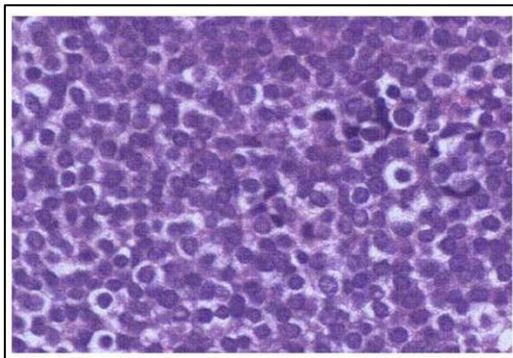


Figura 3. Tinción hematoxilina-eosina que muestra la población uniforme de células redondas pequeñas con un ratio núcleo/citoplasma muy alto típica del SE. Imagen extraída de Iwamoto, 2007.

1.1.5. Tratamiento

El principal criterio para la elección del tratamiento es la presencia o ausencia de enfermedad metastásica (Fig.4). Los casos de enfermedad localizada suelen tratarse con una citoreducción inicial (quimioterapia) seguida por el tratamiento radical, ya sea resección quirúrgica con amplios márgenes negativos o radiación, siendo preferible la primera opción. Después del tratamiento radical se realizan ciclos de quimioterapia adyuvante alternando vincristina, adriamicina y ciclofosfamida (VAC) con ifosfamida y etopósido [Ludwig, 2008; Subbiah y cols., 2009]. En los casos de enfermedad metastásica o recurrente se han probado diferentes combinaciones de quimioterapia en altas dosis sin lograr aumentar significativamente la tasa de supervivencia [Miser y cols., 2004; Saylor y cols., 2001; Hunold y cols., 2006; Wagner y cols., 2004], lo que evidencia la necesidad de nuevas opciones terapéuticas diferentes a aquellas usadas en pacientes con enfermedad localizada.

En pacientes en los que la enfermedad progresa tras la primera línea de tratamiento, se puede optar por un tratamiento de segunda línea con quimioterápicos clásicos, como es el caso de las camptotecinas (irinotecan y topotecan), que muestran una buena actividad tanto como agentes individuales como en combinación con ciclofosfamida o temozolamida [Bernstein y cols., 2006b; Wagner y cols., 2007; Wagner, 2011].

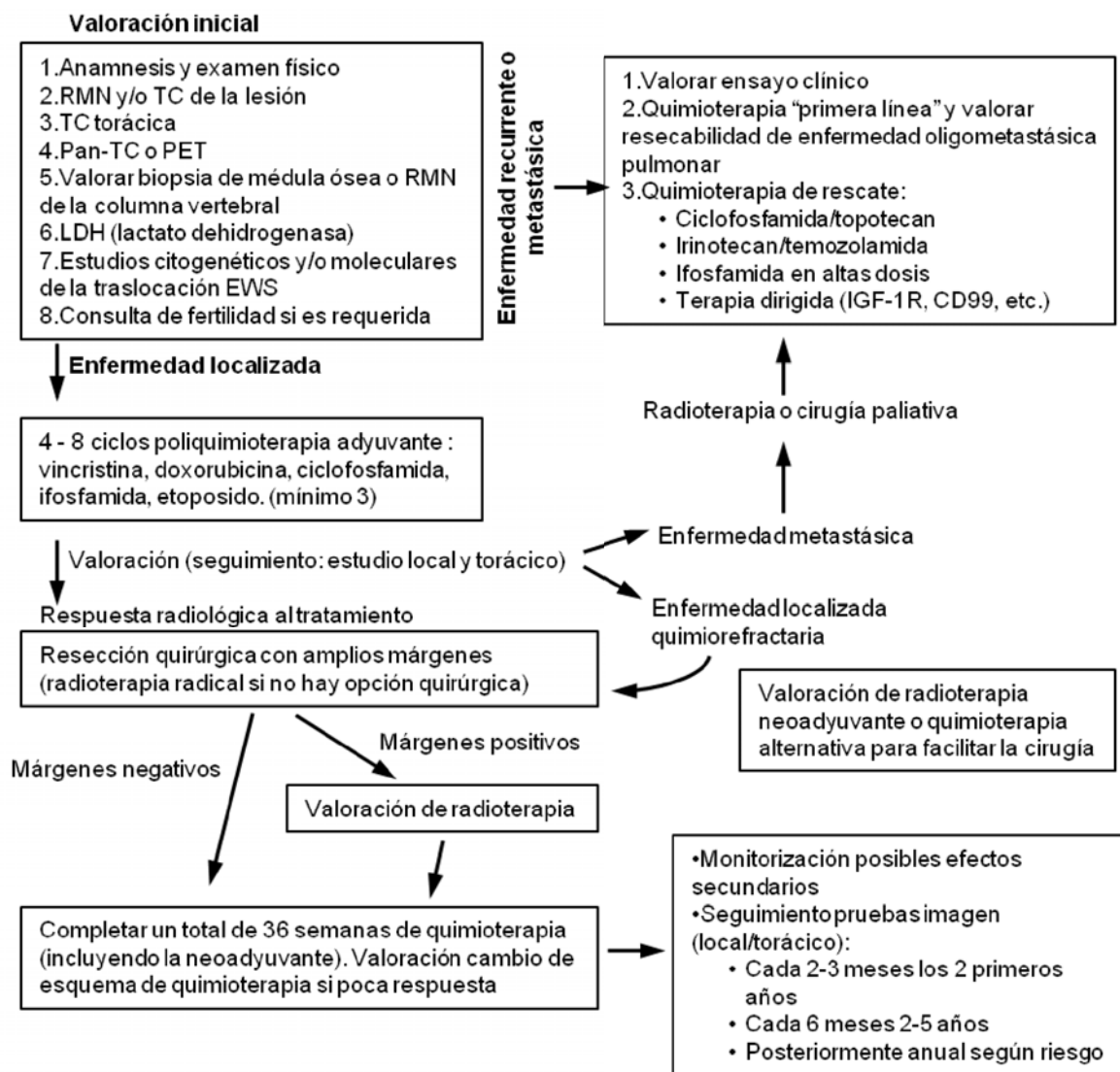


Figura 4. Algoritmo de tratamiento del SE. Modificado de Ludwig, 2008.

1.1.5.1. Estudios sobre nuevos tratamientos

En los últimos años se han llevado a cabo diferentes estudios centrados en tratamientos dirigidos a proteínas diana, tanto en solitario como en combinación con quimioterapias más tradicionales. Una de las rutas más estudiadas como diana terapéutica en el SE es la vía del IGF (*Insulin-like Growth Factor*). Se han realizado diversos ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-IGF-R1 (IGF Receptor 1), como AMG479 (ganitumab) [Tap y cols., 2012; Tolcher y cols., 2009] o el R1507 (robatumumab) [Kurzrock y cols., 2010] en solitario y en combinación con otros inhibidores, como inhibidores de la ruta de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [Naing y cols., 2012]. Sin embargo, el hecho de que los resultados obtenidos con esta clase de inhibidores en tumores más comunes, como el cáncer de páncreas, hayan

resultado por debajo de las expectativas, hace que disminuya el interés de las farmacéuticas por estas drogas y dificulta estudios futuros en cohortes tan pequeñas como las de una enfermedad rara como es el SE. Por otra parte, que unos pacientes con SE avanzado respondan a antagonistas de IGF-R1 y otros no, hace imprescindible el estudio de marcadores de resistencia y predictores de respuesta a este tipo de tratamiento [Olmos y cols., 2010; Potratz y cols., 2012a].

También se han estudiado dianas epigenéticas, ya que se ha descrito que varios complejos proteicos implicados en la regulación de la estructura de la cromatina están alterados en el SE [Lawlor y Thiele, 2012]. Estudios con inhibidores de HDAC (*Histone Deacetylases*) como el vorinostat, han demostrado un efecto dependiente de dosis en la inhibición de la proliferación celular en células del SE [Owen y cols., 2008; Sankar y cols., 2013]. Por otro lado, se ha demostrado que el inhibidor de HDAC, pracinostat, es bien tolerado por pacientes de SE refractario [Zorzi y cols., 2013]. No obstante, se precisan más estudios preclínicos y clínicos para este tipo de inhibidores. Por supuesto, también se ha estudiado la posibilidad de la inhibición de la proteína quimérica EWS/FLI1. A pesar de que el hecho de ser un factor de transcripción dificulta mucho su uso como diana terapéutica, se han identificado diferentes pequeños inhibidores potenciales como la citarabina, la mitramicina o el enantiómero YK-4-2 [Barber-Rotenberg y cols., 2012; Stegmaier y cols., 2007; Grohar y Helman, 2013].

Además de los mencionados, también se está estudiando el efecto de otras terapias en el SE, tales como inhibidores de PARP (*poly ADP ribose polymerase*) [Lee y cols., 2013; Norris y cols., 2013], o la inmunoterapia con células NK (*natural killer*) [Cho y cols., 2010].

1.1.6. Aspectos genéticos

Desde el punto de vista de la genética molecular, los sarcomas se dividen en dos categorías:

- Sarcomas con cariotipos sencillos y alteraciones genéticas simples, siendo la mayoría translocaciones cromosómicas recíprocas. A este grupo pertenecen el SE, el rhabdomyosarcoma alveolar y el sarcoma sinovial entre otros.
- Sarcomas con cariotipos complejos, con alto grado de inestabilidad genómica y que pueden surgir de estados menos agresivos pasando por una serie de etapas de progresión, caracterizadas por un aumento en la complejidad genética. De esta

categoría son el osteosarcoma, el liposarcoma no mixoide y el leiomiomasarcoma [Borden y cols., 2003; Taylor y cols., 2011].

Los mecanismos que dirigen la sarcomagénesis de los tumores de cariotipo sencillo comprenden tres categorías: desregulación transcripcional, debido a la acción de la proteína de fusión, producto de la translocación cromosómica; mutaciones somáticas en genes y rutas de señalización claves; e irregularidades en el número de copias de ADN [Taylor y cols., 2011].

El SE está caracterizado por la presencia de una translocación cromosómica que implica al dominio de activación transcripcional (TAD), del extremo N-terminal de un miembro de la familia TET de proteínas de unión a ARN, y al extremo C-terminal de un miembro de la familia de factores de transcripción ETS (*E26 transformation-specific*). En el 85% de los casos esta translocación es la t(11;22)(q24;q12) que da origen a la proteína de fusión EWS/FLI1. La segunda translocación más frecuente es la t(21;12)(22;12) que origina EWS/ERG (Tabla 1) [Riggi y Stamenkovic, 2007].

Miembro TET	Miembro ETS	Frecuencia (%)
EWS	FLI1	85
EWS	ERG	10
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

Tabla 1. Translocaciones del SE. Modificado de Riggi y Stamenkovic, 2007

Esta proteína de fusión actúa como factor de transcripción aberrante, que contribuye a la patogénesis de SE mediante la modulación de la expresión de diferentes genes diana [Janknecht, 2005; Kauer, 2009; Hancock y Lessnick, 2008].

Sin embargo, el estudio de la patogénesis concreta del SE es complicada debido al desconocimiento actual de la histogénesis específica del mismo. Se han llevado a cabo diversos estudios basados en la introducción exógena de EWS/FLI1 en diferentes modelos celulares. Los primeros estudios se llevaron a cabo en la línea de fibroblastos murinos NIH3T3, lo que ayudó a la identificación de varios genes diana [Braun y cols., 1995; Takahashi y cols., 2003; Zwerner y cols., 2008]. No obstante, hay estudios que ponen en duda la utilidad de estos modelos celulares murinos [Braunreiter y cols., 2006; Hancock y Lessnick, 2008]. Muchos grupos han desarrollado modelos de expresión de EWS/FLI1 en células humanas, de los que destacan dos principales candidatos a ser la célula de origen del SE: las células madre mesenquimales (MSCs, *mesenchymal stem*

cells) y las células madre de la cresta neural (NCSCs, *neural crest stem cells*). El hecho de que los perfiles de expresión génica y los antígenos de superficie de las células de SE sean similares a los que se encuentran normalmente en tejido nervioso y en las NCSCs, respalda el linaje neuroectodermal como posible origen del SE [Staege y cols., 2004; Von Levetzow y cols., 2011]. Por otro lado, dada la localización predominantemente esquelética de los tumores primarios de SE, un progenitor mesenquimal parecería más probable, de hecho cada vez más literatura apoya el origen mesenquimal del SE. Las MSCs, tanto humanas como murinas, toleran la expresión ectópica de EWS/FLI1, además, el perfil de expresión generado al introducir EWS/FLI1 reproduce el observado en líneas celulares derivadas de pacientes y en muestras de tumores primarios [Miyagawa y cols., 2008; Riggi y cols., 2008]. Asimismo, la inhibición de EWS/FLI1 mediante ARN interferente en líneas celulares derivadas de pacientes, origina un perfil genético parecido al de las MSCs [Kauer y cols., 2009; Potikyan y cols., 2008; Tirode y cols., 2007]. Por último, hay que destacar que cada vez hay más evidencias de que las MSCs humanas parecen derivar del neuroepitelio a través de un intermediario de la cresta neural [Takashima y cols., 2007; Mendez-Ferrer y cols., 2010], por lo que la verdadera célula de origen del SE podría, de hecho, provenir de un linaje NCSC-MSC [Monument y cols., 2013].

No obstante, la expresión ectópica de EWS/FLI1 en las MSCs y las NCSCs no ha conseguido recapitular el fenotipo tumoral de SE completamente, lo que evidencia que, además de un entorno celular permisivo con la translocación, es necesaria la existencia de otras rutas y mutaciones que colaboran con ésta en la patogénesis del SE. Algunas de estas rutas son las siguientes:

➤ La ruta de IGF-R1 ha sido estudiada ampliamente en el SE, ya que existe un circuito IGF1/IGF-1R autocrino al estar IGF1 sobre-expresado por ser diana directa de EWS/FLI1 [Cironi y cols., 2008]. Además, EWS/FLI1 inhibe la expresión del regulador negativo de IGF1, IGFBP3 (*IGF-binding protein 3*), por lo que aumenta su biodisponibilidad [Prieur y cols., 2004]. Parece ser que esta activación de la ruta IGF-R1 es imprescindible para la transformación producida por EWS/FLI1 en fibroblastos [Toretzky y cols., 1997] y la inhibición del receptor de IGF1 en células de SE produce un menor crecimiento tumoral, angiogenesis y metástasis *in vivo*, y aumenta la sensibilidad a quimioterapia [Olmos y cols., 2010; Scotlandi y cols., 1998].

➤ Mutaciones en las rutas de Rb (*Retinoblastoma-associated protein*) y p53 también parecen cooperar en la patogénesis del SE, por ejemplo la ciclina D1 está sobreexpresada [Zhang y cols., 2004; Sanchez y cols., 2008] mientras que Rb y p16^{INK4A}

suelen estar mutadas o delecionadas en el SE [Kovar y cols., 1997; Huang y cols., 2005]. Además, mutaciones en p53 o p16^{INK4A} parecen ser marcadores de mal pronóstico [de Alava y cols., 2000; Huang y cols., 2005; Wei y cols., 2000].

➤ También se han descrito alteraciones en el número de copias de genes, es decir, ganancias y/o pérdidas de diferentes regiones de cromosomas o incluso cromosomas enteros. Algunas de estas alteraciones, como la ganancia de 1q [Mackintosh y cols., 2012], han sido relacionadas con peor pronóstico [Toomey y cols., 2010].

1.1.6.1. EWS/FLI1: factor de transcripción aberrante

La translocación más estudiada en el SE, debido a su alta frecuencia, es la que da lugar a la proteína de fusión EWS/FLI1.

La proteína EWS o EWSR1 (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*), al igual que los otros miembros de la familia TET, presenta un dominio RRM/RNP (Arg-Arg-Met/Arg-Asn-Pro) que está implicado en la unión proteína-ARN, con una serie de repeticiones RGG (Arg-Gly-Gly) que promueven esta unión, por lo que se cree que estas proteínas participan en la transcripción y procesamiento del ARN, aunque su función exacta aún no es conocida. Además, presenta, en el extremo N-terminal, el dominio de activación transcripcional (TAD) que es el fragmento que participa en la translocación con *FLI1*. Esta proteína está expresada ubicuamente en células de mamífero con una localización principalmente nuclear [Ordoñez y cols., 2009; Riggi y Stamenkovic, 2007].

El gen *FLI1* fue identificado inicialmente como el sitio de inserción del virus de la leucemia murina de Friend, describiéndose posteriormente lugares próximos de inserción de otros virus. La proteína FLI1 es un factor de transcripción, con una región de transactivación en el extremo N-terminal y un dominio de transactivación en C-terminal (CTA), que contiene una secuencia de unión a ADN del tipo *ets* (*erythroblast transformation specific domain*) altamente conservada. Tiene un papel fundamental en la hematopoyesis y vasculogénesis fisiológica. Su expresión en tejido adulto se limita básicamente a las células hematopoyéticas, aunque también se han detectado niveles de expresión menores en tejidos no hematopoyéticos como el corazón, los pulmones o los ovarios [Ordoñez y cols., 2009; Riggi y Stamenkovic, 2007].

En la translocación t(11;22)(q24;q22) se produce la fusión del TAD del extremo N-terminal de *EWS* y el dominio *ets* de unión a ADN de *FLI1*, originándose el factor de transcripción aberrante *EWS/FLI1*. El potencial de transactivación que aporta *EWS* a la proteína quimérica es superior al presente en la proteína FLI1 original, por lo que el factor

de transcripción resultante de la translocación tiene funciones de activador/represor transcripcional más marcadas.

La fusión se da a nivel de los intrones de los genes y hay diferentes tipos de fusión según el punto de ruptura por el que se produce la translocación (Fig.5) [Sankar y Lessnick, 2011], los tres más frecuentes son:

- Tipo I: el más común. Une los exones 1 a 7 de *EWS* con los exones 6 a 10 de *FLI1*.
- Tipo II: la fusión se da entre el exón 7 de *EWS* y el exón 5 de *FLI1*.
- Tipo III: la fusión se da a nivel del exón 10 de *EWS* y del exón 6 de *FLI1*.

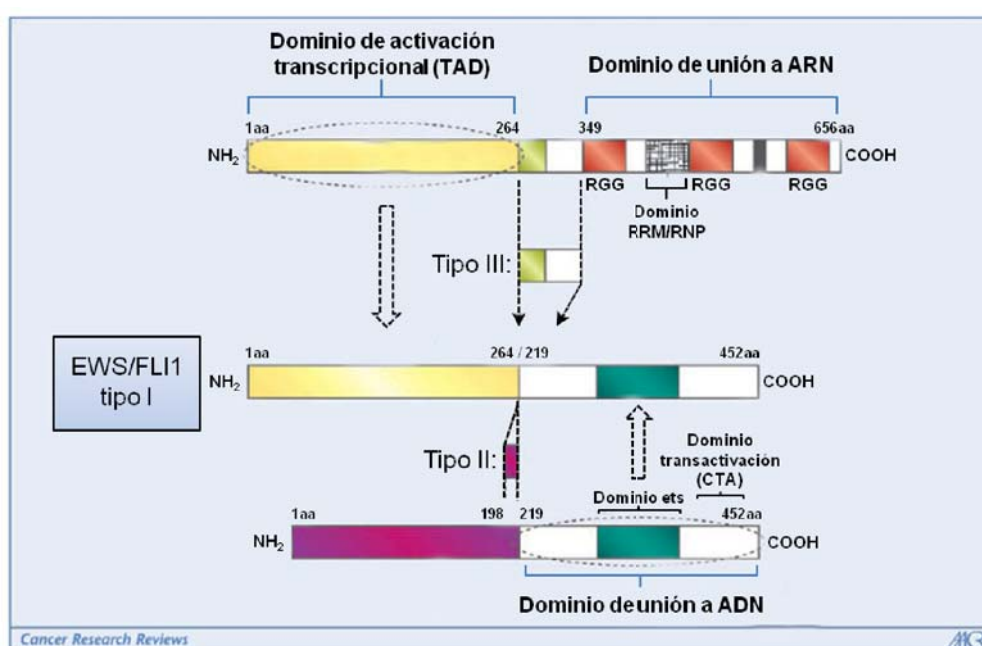


Figura 5. Esquema que muestra los diferentes dominios de las proteínas EWS y FLI1 y el producto de su fusión en el SE, especificando los lugares de ruptura en los diferentes tipos de fusión. Imagen modificada de Ordóñez y cols., 2009.

Análisis realizados con ChIP-chip (inmunoprecipitación de cromatina seguida por *array*) y ChIP-seq (ChIP seguida de secuenciación de nueva generación) han demostrado que EWS/FLI1 se une, a través del dominio *ets* y con alta afinidad, a microsatélites GGAA en la región promotora de varios genes diana, habiendo una correlación entre el número de repeticiones de este microsatélite y la regulación activadora por parte de EWS/FLI1 [Gangwal y cols., 2008; Guillon y cols., 2009]. La diferencia en el número de estas repeticiones también podría explicar diferencias en la susceptibilidad al SE entre diferentes etnias [Beck y cols., 2012]. EWS/FLI1 también se une a motivos *ets* no repetitivos más convencionales, estos sitios están asociados tanto a genes activados

como a genes cuya expresión está inhibida por la proteína de fusión [Boeva y cols., 2010].

EWS/FLI1 regula la expresión de diferentes genes diana, ya sea directamente o indirectamente a través de la regulación de la expresión de factores de transcripción. De este modo EWS/FLI1 controla diferentes rutas características de la tumorigénesis y la progresión tumoral, como son promover la proliferación celular y supervivencia (activando, entre otros, a IGF1, MYC y NKX2.2, *Homeobox protein NK-2 homolog B*) o evitar la inhibición del crecimiento, la senescencia y la apoptosis (inhibiendo p21, p57kip, *Cyclin-dependent kinase inhibitor p57*; TGFBR2, *Transforming growth factor-beta receptor type 2*; e IGFBP3) [Hancock y Lessnick, 2008; Jankneht, 2005; Ordoñez y cols., 2009].

A pesar del gran número de genes diana de EWS/FLI1 descritos actualmente, se sabe muy poco acerca de cuáles de estos genes están implicados en el proceso metastásico [Guan y cols., 2008; Richter y cols., 2009; Wang y cols., 2009]. Uno de estos genes fue descrito por nuestro grupo, caveolina-1 (*CAV1*) [Tirado y cols., 2006], identificándolo como diana transcripcional directa de EWS/FLI1 y determinando además su importancia en la tumorigénesis del SE.

1.2. Caveolina-1

CAV1 pertenece a la familia de las caveolinas, pequeñas proteínas de andamiaje (*scaffolding proteins*) de unos 18-24kDa, conocidas por ser uno de los componentes estructurales fundamentales de las caveolas.

La familia de las caveolinas está compuesta por tres miembros: CAV1 y CAV2, expresadas ubicuamente, y CAV3 que solamente se expresa en músculo estriado. Los tres genes tienen secuencias muy parecidas. Los genes *CAV1* y *CAV2* se localizan muy próximos en la región cromosómica 7q31.1, mientras que *CAV3* está en la región cromosómica 3p25 (Tabla 2) [Williams y Lisanti, 2004].

Gen	Localización cromosómica	Exones	Tamaño exones (bp)	Intrones	Tamaño intrones (kb)	Residuos codificados por exon	Longitud proteica (aminoácidos)	Patrón de expresión
<i>Cav1</i>	7q31.1	1	30	1	1.47	1-10	178	Ubicua: mayores niveles de expresión en adipocitos, endotelio, células de músculo liso y neumocitos tipo I.
		2	165	2	31.8	11-65		
		3	342			66-178		
<i>Cav2</i>	7q31.1	1	150	1	0.33	1-50	162	Co-expresión con CAV1
		2a	188	2	5.76	51-112		
		2b	151			113-162		
<i>Cav3</i>	3p25	1	114	1	?	1-38	151	Específica de músculo, principalmente esquelético y cardíaco.
		2	342			39-151		

Tabla 2. Organización genómica de los genes de caveolina humanos y características de sus productos proteicos. Tabla modificada de Williams y Lisanti, 2004.

1.2.1. La proteína CAV1

Se han identificado dos isoformas de CAV1: la α , que es la más estudiada y es a la que nos referiremos en este trabajo, y la β , que se produce por la traducción a partir de un codón de iniciación interno, por lo que carece de los primeros 31 aminoácidos [Scherer y cols., 1995].

La proteína presenta un dominio N-terminal citosólico (101 aminoácidos), un dominio transmembrana (33 aminoácidos) y un dominio C-terminal (44 aminoácidos) también citosólico. Los monómeros de CAV1 forman complejos oligoméricos de unas 14-16 moléculas. En esta oligomerización interviene un dominio que comprende los aminoácidos del 61 al 101 en el extremo N-terminal [Sargiacomo y cols., 1995].

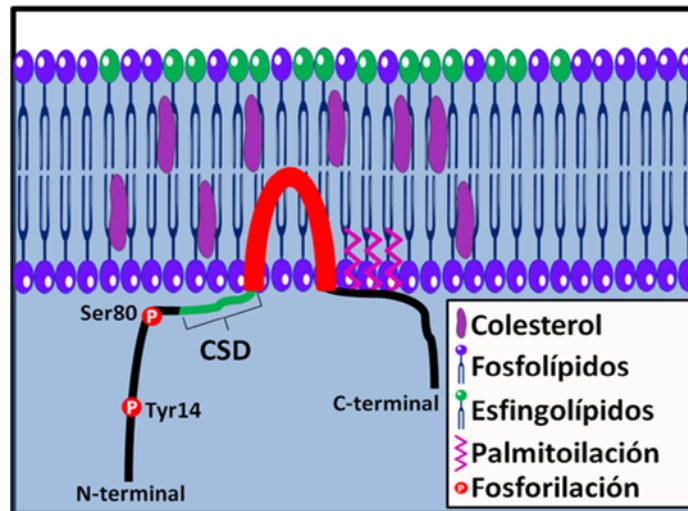


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de CAV1. Se muestran las modificaciones postranscripcionales, los dominios N-terminal, C-terminal y transmembrana (en rojo) y el *Caveolin-Scaffolding Domain* (CSD).

CAV1 sufre diferentes modificaciones postranscripcionales, como son la palmitoilación [Dietzen y cols., 1995] y la fosforilación. Presenta dos residuos principales de fosforilación, la tirosina 14 (Tyr14), fundamental para su actividad [Li y cols., 1996], y la serina 80, implicada en la oligomerización e importante para su asociación a membrana [Schlegel y cols., 2001] (Fig.6). La fosforilación en la Tyr14 por las tirosina-kinasas Src, Fyn o Abl ha sido relacionada con diferentes procesos celulares, como son la mecanotransducción [Gortazar y cols., 2013; Joshi y cols., 2012], la endocitosis [Sánchez y cols., 2009], la migración celular [Joshi y cols., 2008] o la dinámica de las adhesiones focales [Urrea y cols., 2012]. Además facilita el reclutamiento de proteínas con dominio SH2 (*Src Homology 2*), como la molécula adaptadora Grb7 (*Growth factor receptor-bound protein 7*), regulando diferentes rutas de transducción de señales [Lee y cols., 2000].

CAV1 se localiza fundamentalmente en las caveolas, pero también en otras zonas de la membrana plasmática, en el aparato de Golgi y en vesículas derivadas de este. Además, en determinados tipos celulares, se ha descrito una forma secretada [Felicetti y cols., 2009; Freeman y cols., 2012; Sengupta y cols., 2011; Takizawa y cols., 2013].

Las caveolinas poseen un dominio, CSD (*Caveolin Scaffolding Domain*), de unos 20 aminoácidos en la zona próxima a la membrana del dominio N-terminal, que facilita la interacción con otras proteínas que presentan en su secuencia un motivo de unión a caveolina [$\phi X\phi XXXX\phi$, $\phi XXXX\phi XX\phi$ o $\phi X\phi XXXX\phi XX\phi$, donde ϕ es un aminoácido aromático (triptófano, fenilalanina o tirosina) y X es cualquier aminoácido] [Couet y cols., 1997]. Algunas de estas proteínas son la subunidad α de la proteína Gi2 [Couet y cols., 1997], el receptor de insulina [Yamamoto y cols., 1998], la óxido nítrico sintasa endotelial

eNOS [GarciaCardena y cols., 1997], el receptor de PDGF (*platelet-derived growth factor*) [Yamamoto y cols., 1999] y la GTPasa RhoC (*Rho-related GTP-binding protein RhoC*) [Lin y cols., 2005]. La mayoría de estas interacciones son de carácter inhibitorio, por lo que CAV1 interviene en la regulación diversas rutas de señalización. No obstante, estudios recientes utilizando técnicas de bioinformática, ponen en duda la importancia de este motivo de unión a CAV1, ya que esta secuencia no parece estar enriquecida en las proteínas que interaccionan con CAV1, además, su estructura tridimensional en muchas de las proteínas donde se ha identificado parecería dificultar la interacción con CAV1 [Byrne y cols., 2012; Collins y cols., 2012].

1.2.2. Caveolas

Las caveolas son invaginaciones esféricas de la membrana plasmática de unos 50-100nm de diámetro (Fig.7). Su composición lipídica no difiere mucho de los denominados *lipid rafts* (balsas lipídicas). Están enriquecidas en esfingolípidos, especialmente esfingomiolina y los gangliósidos GM3, GD3 y GM1; en colesterol y en fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato [Bastiani y Parton, 2010].

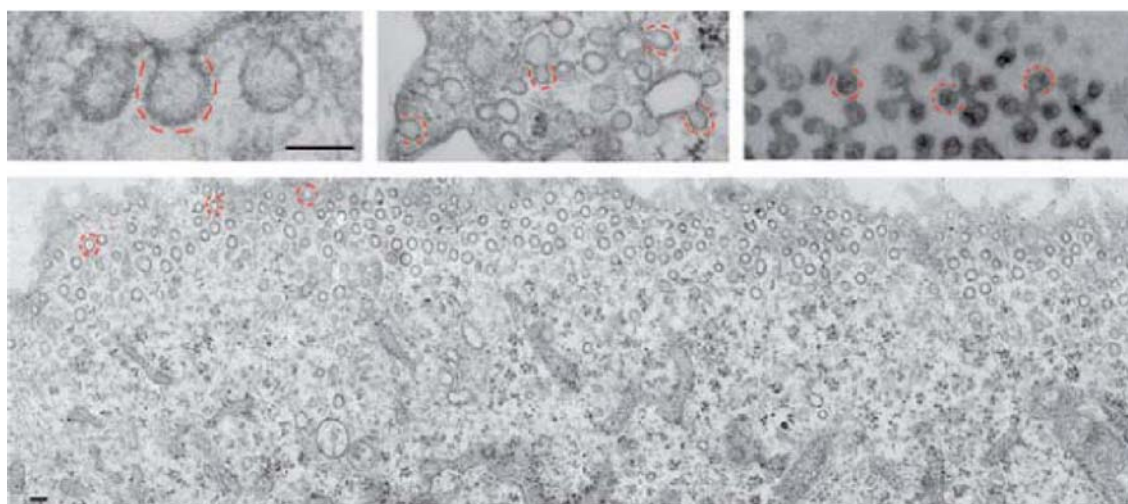


Figura 7. Micro-fotografías electrónicas que muestran la ultra estructura de caveolas en fibroblastos (panel inferior y ampliación en la parte superior izquierda), y las complejas disposiciones de las caveolas en adipocitos en cultivo (panel superior central) y en músculo esquelético (panel superior derecha) Las barras de escala representan 100 nm. Imagen extraída de Parton y del Pozo, 2013.

CAV1 es el único miembro de la familia que es imprescindible para la formación de las caveolas, ya que la supresión de su expresión produce la pérdida de las caveolas en tejidos no musculares [Drab y cols., 2001, Razani y cols., 2001], y su expresión en células

carentes de CAV1 endógena y caveolas produce la creación *de novo* de éstas [Fra y cols., 1995].

Por otro lado, se ha descubierto recientemente el papel fundamental de otra familia de proteínas en la estructura y función de las caveolas, las cavininas [Liu y Pilch, 2008; Hansen y Nichols, 2010]. Hay cuatro miembros en esta familia: cavin-1 o PTRF (*Polymerase I and Transcript Release Factor*), cavin-2 o SDPR (*Serum deprivation-response protein*), cavin-3 o SRBC (*Serum deprivation response factor-related gene product that binds to C-kinase*) y cavin-4 o MURC (*Muscle-related coiled-coil protein*), esta última expresada mayoritariamente en músculo esquelético y cardíaco [Parton y del Pozo, 2013]. Forman complejos heteroligoméricos implicados en la formación y homeostasis de las caveolas. De ellas, cavin-1 es fundamental para la formación de las caveolas, ya que su expresión en células que carecen de cavininas endógenas pero que expresan CAV1 resulta en la formación de caveolas [Hill y cols., 2008]. Las funciones exactas de los otros miembros de la familia aún no están bien definidas, sin embargo se cree que cavin-2 está implicada en la generación de la curvatura en la membrana caveolar [Hansen y cols., 2009], y que cavin-3 afecta a la formación de caveolas endocíticas o caveosomas [McMahon y cols., 2009].

Los complejos de cavininas estabilizan los oligómeros de CAV1 una vez que estos han sido transportados a la membrana plasmática, estabilizando de este modo la estructura de las caveolas (Fig.8) [Parton y del Pozo, 2013].

Las caveolas concentran un gran número de moléculas que juegan un papel importante en diferentes vías de señalización, por lo que intervienen en su regulación mediante la interacción con CAV1, pero también mediante la compartimentalización y segregación espacial de los diferentes componentes. Algunas de estas proteínas son Src tirosina kinasas, H-ras, subunidades de proteína G, isoformas de la proteína kinasa C (Pkc), diversos receptores de tirosina kinasas, etc. [Parton y Simons, 2007, Patel y cols., 2008; Parton y del Pozo, 2013].

Además de las funciones mencionadas, CAV1 y las caveolas están implicadas en diferentes procesos fisiológicos como la endocitosis, la exocitosis, la migración celular, el control del ciclo celular, la polaridad celular y la homeostasis del colesterol [Hansen y Nichols, 2010; Bastiani y Parton, 2010].

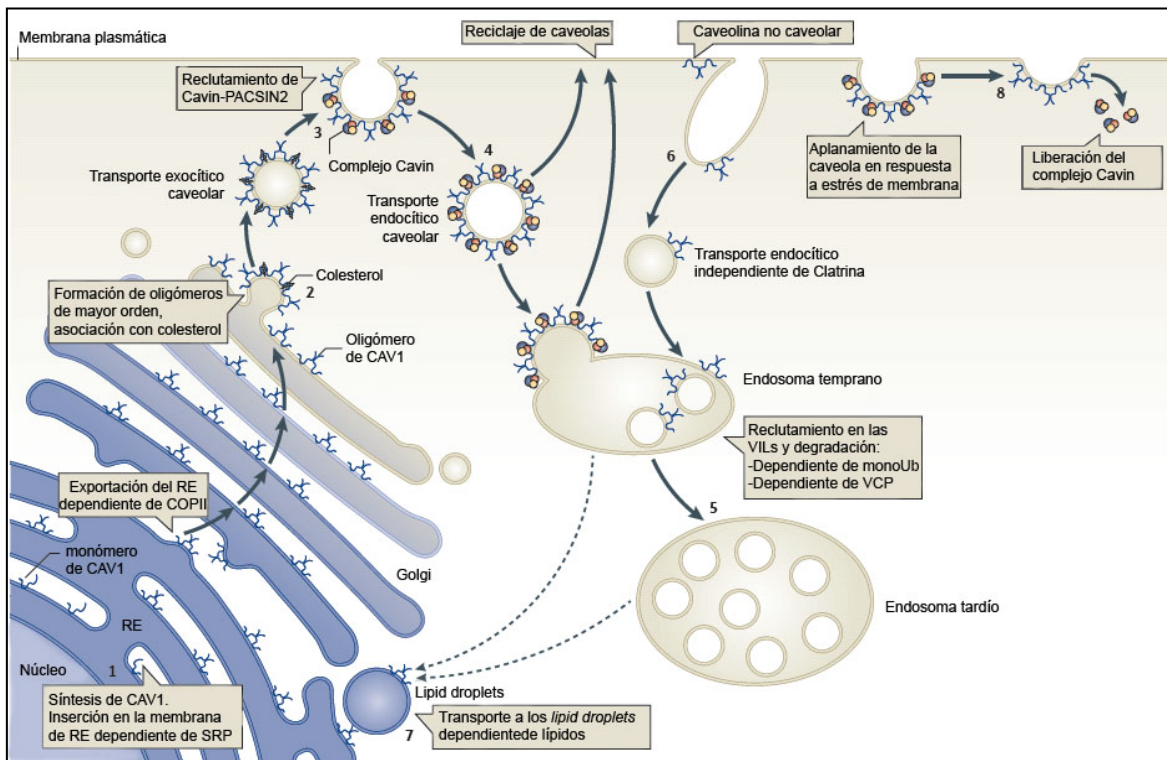


Figura 8. Tráfico de membrana de caveolinas a través de exocitosis y endocitosis. Esquema que muestra el itinerario de CAV1 desde (1) su síntesis en el retículo endoplásmico (RE) y (2) su transporte a través del aparato de Golgi hasta la superficie celular. (3) El complejo Cavin-PACSIN2 (*PKC and casein kinase substrate in neurons 2*) tiene un papel fundamental en la estabilización de la caveola en la membrana plasmática. (4) Mediante endocitosis, las caveolas pueden ser transportadas a endosomas tempranos y ser entonces recicladas a la membrana plasmática o (5) ser transportadas a endosomas tardíos para su degradación. Este proceso es dependiente de la proteína VCP (*Valosin-Containing Protein*) y es necesaria la monoubiquitinación (monoUb) de CAV1. (6) La caveolina no caveolar puede ser internalizada por otras vías endocíticas. (7) Caveolina también puede ser transportada a los *lipid droplets*, aunque la ruta que sigue no está clara (líneas discontinuas). (8) Las cavinas pueden ser liberadas al citoplasma durante el aplanamiento de las caveolas. COPII, *coat protein II*; VIL, vesícula intralumenal; SRP, *signal recognition particle*. Imagen modificada de Parton y del Pozo, 2013.

1.2.3. CAV1 y progresión tumoral

La habilidad de CAV1 para regular diferentes rutas de señalización intracelular tiene una importante implicación en diversos procesos celulares, tanto fisiológicos como patológicos, incluido el de tumorigénesis. Durante las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre el papel de CAV1 en la iniciación y progresión tumoral. De hecho, tanto la pérdida como la sobreexpresión de CAV1 en las células tumorales han sido relacionadas con el desarrollo tumorigénico y la progresión metastásica.

En base a su baja expresión en diferentes tipos de tumores, tales como los de ovario, colon, pulmón y mama, se ha propuesto a CAV1 como supresor tumoral [Quest y cols.,

2008; Sotgia y cols., 2012]. En cáncer de mama se ha demostrado su efecto inhibitor sobre el crecimiento del tumor primario, así como sobre el desarrollo de metástasis cerebrales y pulmonares [Chiu y cols., 2011; Williams y cols., 2004].

Por el contrario, niveles elevados de CAV1 han sido asociados con el aumento de la progresión tumoral y un incremento del potencial metastásico en cáncer de próstata, esófago y vesícula [Burgermeister, 2008]. En el caso del cáncer de próstata, se ha asociado la elevada expresión de CAV1, en células humanas y murinas, con una mayor agresividad y potencial metastásico [Thompson y cols., 1999] y a la proliferación celular dependiente de andrógenos [Bryant y cols., 2011]. Además, se están realizando diversos estudios para valorar su validez como biomarcador, al poder ser detectada en suero sanguíneo en su forma secretada [Corn y Thompson, 2010].

La expresión de CAV1 ha sido relacionada con el pronóstico en diferentes tipos tumorales [Sotgia y cols., 2012]. En células de carcinoma renal, niveles elevados de expresión de CAV1 están significativamente asociados a estadios avanzados y metástasis de nódulo linfático [Horiguchi y cols., 2004; Waalkes y cols., 2011], así como a una menor supervivencia [Phuoc y cols., 2007]. Pacientes de cáncer de próstata con altos niveles de expresión de la proteína presentan una mayor puntuación Gleason, invasión de nódulos linfáticos y una menor supervivencia libre de recidiva tras la cirugía [Yang y cols., 1999].

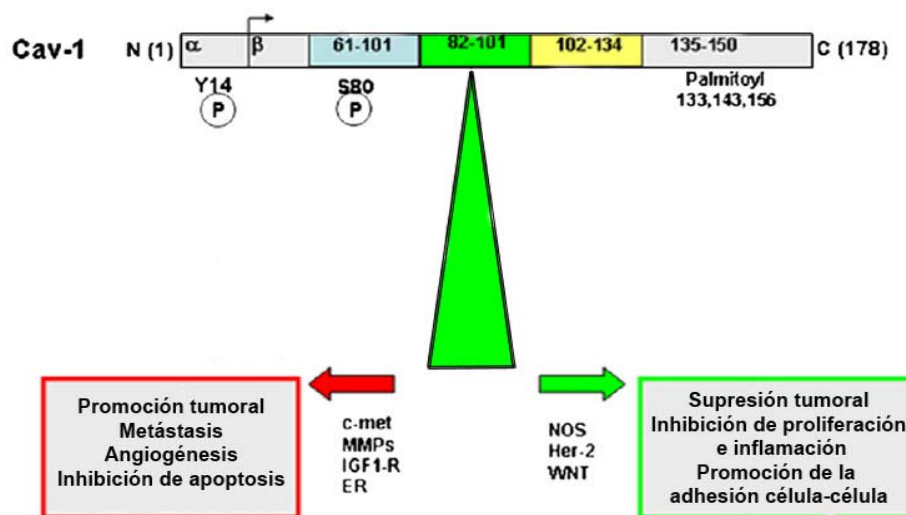


Figura 9. Modelo de la estructura y función de CAV1 en la progresión tumoral. Dependiendo de la proteína con la que interaccione CAV1 a través del CSD, tendrá efectos pro-tumorales o anti-tumorales. Imagen modificada de Burgermeister, 2008.

Este aparente papel dual de CAV1 en la progresión tumoral se podría explicar si se tiene en cuenta que CAV1 es una proteína de andamiaje, por lo que se une a diferentes proteínas. La identidad de estas proteínas y el contexto celular serían los que determinarían el papel supresor o promotor de CAV1 en la progresión tumoral (Fig. 9) [Burgermeister, 2008]. Las diferencias en el contexto celular pueden venir determinadas por la diferencia de tejido, por la diferencia en el estadio de progresión tumoral o por ser células tumorales o células del estroma asociado a los tumores [Sotgia y cols., 2012]. Por ejemplo, tanto en células de cáncer de colon como de melanoma, se ha observado que CAV1 actúa como supresor de tumores en las primeras fases del tumor primario, inhibiendo la expresión de genes que promueven la tumorigénesis, mientras que actúa como promotor de la capacidad migratoria e invasiva de las células metastásicas [Bender y cols., 2000; Lobos-González y cols., 2013].

En la actualidad varios estudios han revelado el potencial de CAV1 tanto como diana terapéutica como marcador de diagnóstico [Enache y cols., 2012; Gratton y cols., 2003; Kuo y cols., 2012].

1.2.4. CAV1 en el sarcoma de Ewing.

CAV1 fue identificada como diana directa del factor de transcripción EWS/FLI1 por nuestro grupo [Tirado y cols., 2006]. Además se describió su importante papel en la tumorigénesis del SE, ya que promueve la proliferación independiente de anclaje *in vitro* y el crecimiento de xenoinjertos *in vivo*, mediante la regulación de la vía Snail→E-cadherina [Tirado y cols., 2006]. En un estudio posterior, se comprobó que los niveles de expresión de CAV1 están relacionados con la resistencia de las células de SE a agentes quimioterápicos, ya que una disminución en su expresión sensibiliza a las células al tratamiento [Tirado y cols., 2010]. Las células de SE producen una forma secretada de CAV1 con efecto autocrino, que parece promover la proliferación celular [Sengupta y cols., 2011].

Asimismo, se ha demostrado su valor como marcador diagnóstico por análisis inmunohistoquímico al estar presente incluso en muestras de pacientes negativas para CD99, el marcador más usado hasta ahora [Lombart-Bosch y cols., 2009].

1.3. El proceso metastásico

El proceso metastásico implica una serie de pasos desde el tumor primario hasta la colonización de otro tejido. Las células metastásicas tienen que superar una serie de barreras físicas para desprenderse del tumor primario, entrar en el torrente sanguíneo, sobrevivir en este, infiltrarse en otro tejido (normalmente específico según el tipo de cáncer) y finalmente colonizarlo y sobrevivir en este nuevo nicho para formar el foco metastásico. En cada uno de estos pasos intervienen una serie de genes que han sido agrupados como genes de iniciación metastásica, genes de progresión metastásica y genes de virulencia metastásica (Fig.10) [Chiang y Massagué, 2008].

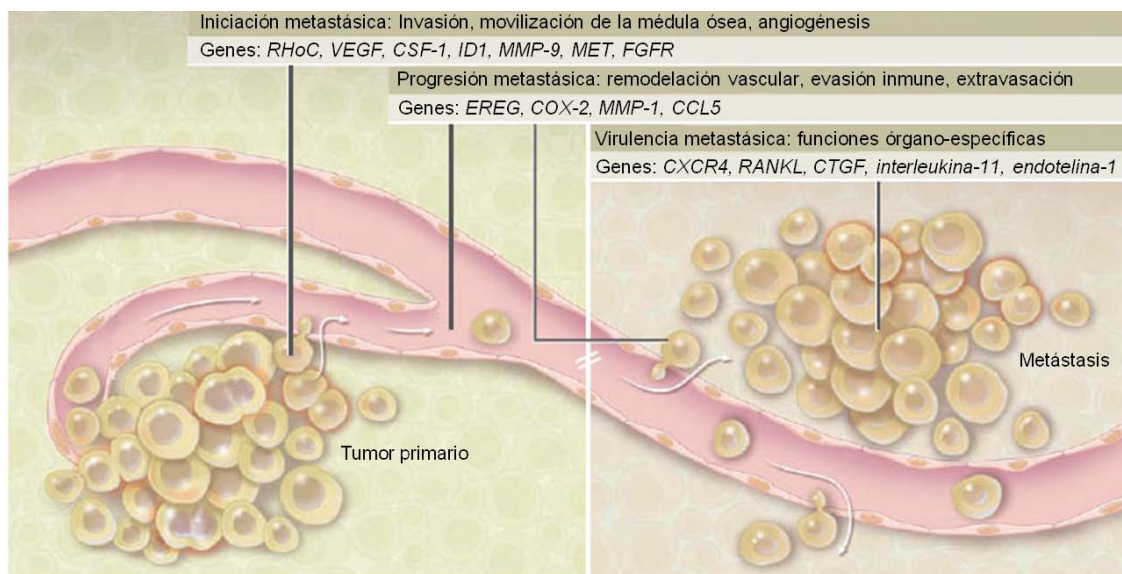


Figura 10. Esquema que representa el proceso metastásico y ejemplos de los genes implicados en las diferentes fases del mismo. VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*; CSF-1, *Colony-stimulating factor 1*; ID1, *Inhibitor of differentiation-1*; MMP-9, *Matrix metalloproteinase 9*; MET, *Tyrosine-protein kinase Met*; FGFR, *Fibroblast growth factor receptor*; EREG, *Epiregulin*; COX-2, *Cyclooxygenase-2*; MMP-1, *Matrix metalloproteinase 1*; CCL5, *C-C motif chemokine 5*; CXCR4, *C-X-C chemokine receptor type 4*; RANKL, *Ligand for the receptor activator of nuclear factor- κ B*; CTGF, *Connective-tissue growth factor*. Imagen modificada de Chiang y Massagué, 2008.

El primer grupo estaría formado por genes que permiten a las células transformadas invadir el tejido circundante y modificar el estroma para facilitar la diseminación, estas funciones también serían beneficiosas una vez las células se hubieran infiltrado en otro tejido. Estos genes pueden promover la movilidad celular o la degradación de la matriz extracelular. Por ejemplo, las metaloproteinasas, proteasas que degradan diferentes componentes de la matriz extracelular, han sido asociadas en diversas ocasiones a la capacidad invasiva de las células tumorales, por lo que promueven la capacidad metastásica de las mismas [Kessenbrock y cols., 2010].

Los genes de progresión metastásica son aquellos que otorgan a las células determinadas ventajas específicas en el tumor primario, pero también en el tejido específico de metástasis. Estos son genes que regulan la remodelación de la vasculatura, como es el caso de *EREG*, *COX-2* y *MMP-1* en cáncer de mama, donde regulan tanto la neoangiogénesis e intravasación en el tumor mamario, cómo la extravasación en el pulmón [Gupta y cols., 2007].

Cada tejido presenta unas características particulares que determinan la capacidad de una célula para colonizarlo, como son el tipo de vasculatura o la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Los genes de virulencia metastásica confieren a la célula ventajas selectivas específicas del tejido a colonizar, por lo que se pueden identificar unos patrones de expresión que determinan la colonización por parte de las células metastásicas de un tejido en concreto [Bos y cols., 2009; Landemaine y cols., 2008; Minn y cols., 2005].

El elevado porcentaje de pacientes con metástasis al momento del diagnóstico y la baja supervivencia de éstos, hace imprescindible el estudio de este proceso en el SE. A CAV1 se le atribuyen funciones en migración celular y está asociada a metástasis en tumores como el melanoma [Fellicetti y cols., 2009]. Teniendo en cuenta que es una diana directa del oncogén EWS/FLI1 y que juega un papel importante en la metástasis, CAV1 podría jugar un papel crucial en este proceso en el SE.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Demostrar que CAV1 juega un papel importante en el desarrollo metastásico del SE.

Objetivos particulares:

1. Confirmar la implicación de CAV1 en el proceso metastásico en el SE.

1.1. Comprobar el efecto de CAV1 en la capacidad migratoria e invasiva de células de SE *in vitro* comparando células con CAV1 silenciada y sus controles.

1.2. Comprobar la capacidad de metastatizar en pulmón en ratones inmunodeprimidos de células de SE comparando células con CAV1 silenciada y sus controles.

2. Determinar el mecanismo por el cual CAV1 regula la capacidad invasiva de las células de SE.

2.1. Comprobar el efecto del CAV1 sobre las proteínas de degradación de matriz extracelular MMP-2 y MMP-9.

2.2. Determinar el mecanismo por el cual CAV1 regula MMP-2 en células de SE.

2.3. Determinar el mecanismo por el cual CAV1 regula MMP-9 en células de SE.

3. Determinar el mecanismo por el cual CAV1 regula la capacidad migratoria de las células de SE.

4. Implicación de la fosforilación de CAV1 en la Tyr14 en los efectos de CAV1 sobre las capacidades migratoria, invasiva y metastásica de las células de SE.

5. Papel de la proteína SPARC en la metástasis pulmonar de células de SE y su relación con CAV1.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares derivadas de SE utilizadas fueron:

A673: Cedida por el Dr. Heinrich Kovar (Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria). Esta línea celular se obtuvo a partir de un tumor primario de una paciente de 15 años diagnosticada con rhabdomyosarcoma, aunque posteriormente se describió como línea de SE, demostrando que contiene la fusión EWS/FLI1 de tipo I [Martinez-Ramirez A y cols., 2003]. Posee una mutación activadora V600E en B-Raf [Davies y cols., 2002] y p53 está mutado [Kovar y cols., 1997; Ottaviano y cols., 2010].

TC252: Cedida por el Dr. Heinrich Kovar (Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria) Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo I. No presenta mutaciones en p53 [Kovar y cols., 1997].

TC71: Comprada a DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Aislada de un tumor en el húmero de un hombre de 22 años. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo I. Mutación puntual sin sentido en p53 [Ottaviano y cols., 2010].

RH1: Cedida por el Dr. Peter Houghton (The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, EUA). Descrita inicialmente como una línea derivada de rhabdomyosarcoma alveolar. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo I [Smith y cols., 2008]. Mutación puntual con cambio de sentido en p53 [Ganjavi y cols., 2005].

STA-ET-1: Cedida por el Dr. Heinrich Kovar (Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria). Línea originada a partir de biopsia de un tumor primario en el húmero no tratado, de una paciente de 13 años. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo I. No presenta mutaciones en p53 [Kovar y cols., 1997; Ottaviano y cols., 2010]

EW7: Cedida por el Dr. Olivier Delattre (Institut Curie, Paris, Francia). Línea derivada de un tumor primario. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo I. No presenta mutaciones en p53. [Sancèau y cols., 2000].

CADO: (CADO-ES) Cedida por el Dr. Heinrich Kovar (Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria). Línea derivada de un derrame pleural de

una paciente de 19 años. Posee una fusión EWS/ERG. No presenta mutaciones en p53 [Kovar y cols., 1997; Ottaviano y cols., 2010].

RD-ES: Comprada a DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Línea celular derivada de un tumor en el húmero de un hombre de 19 años [Ottaviano y cols., 2010]. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo II [Huang y cols., 2011]. Mutación puntual con cambio de sentido en p53 [Kovar y cols., 1997; Ottaviano y cols., 2010]. La línea RDESK fue cedida por el Dr. Heinrich Kovar (Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria).

SK-ES-1: Comprada a DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Línea celular derivada de un tumor óseo de un hombre de 18 años. Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo II. Mutación puntual con cambio de sentido en p53 [Kovar y cols., 1997; Ottaviano y cols., 2010].

A4573: Cedida por el Dr. Santiago Ramón y Cajal (Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España). Posee una fusión EWS/FLI1 de tipo III [Huang y cols., 2011].

3.1.1. Condiciones de cultivo

Todas estas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), previamente inactivado a 55°C, y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S) en un incubador humidificado a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂. Para todos los experimentos se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento, sin llegar a la confluencia y dentro de un margen de 6 pases como máximo desde su descongelación.

3.1.2. Recuento

El recuento de células para determinar el número a sembrar para cada experimento fue llevado a cabo en una cámara de Neubauer, considerando la media del número de células dentro de 4 áreas de contaje.

3.1.3. Crio-conservación de líneas celulares

Las células se mantuvieron crio-conservadas a pases cortos reuniéndolas de manera normal con tripsina y bloqueando la actividad de esta con medio RPMI 1640 suplementado

con 10% FBS y 1% de P/S. Una vez recogidas, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm y el *pellet* se resuspendió en medio de congelación: medio RPMI 1640 suplementado con 50% de FBS y 10% de DMSO.

3.2. Amplificación de plásmidos

Para su amplificación, los plásmidos se transformaron en bacterias *E.coli* competentes y se purificaron en *maxipreps* (*EndoFree® Plasmid Maxi Kit*). Para la transformación se utilizaron tubos de polipropileno fríos en los que se incubaron 50µl de bacterias *E.coli* DH5α con 50 ng del vector a transformar en hielo durante 30 minutos. Se llevó a cabo un choque térmico de 45 segundos en un baño a 42°C y 2 minutos en hielo, tras lo cual se añadieron 250 µl de medio S.O.C. y se incubó 1 hora en agitación (225 rpm) a 37°C. Tras esta incubación inicial se sembraron 100µl del cultivo en placas de LB/Agar con el antibiótico correspondiente preparadas ese mismo día (50-100 µg/ml para ampicilina y 25 µg/ml para kanamicina) y se incubaron toda la noche a 37°C. Se picaron 1-3 colonias de cada placa y se crecieron en 5 ml de medio LB con el antibiótico toda la noche a 37°C. Se utilizaron 3 ml para realizar una *miniprep* (kit *Plasmid DNA Purification*) con la que se comprobó el correcto crecimiento del vector al medir la concentración y pureza con Nanodrop y la identidad del vector por enzimas de restricción. Una vez comprobado, se inocularon con los 2 ml de cultivo restantes, 200 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se crecieron durante toda la noche a 37°C. De este cultivo se realizó la *maxiprep* que se usaría para la transfección en células eucariotas.

Plásmido	Origen	Resistencia
shRNA vector control negativo	SABiosciences #KH00739N	Amp/Neomycin
shRNA anti-CAV1	SABiosciences #KH00739N	Amp/Neomycin
pCDNA3.1	Invitrogen	Amp/Neomycin
pCMV-CAV1 ORF	Origene #RC210274	Kan/Neomycin
pCMV-CAV1-Y14F	Mutagénesis dirigida	Kan/Neomycin
pRS vector	Origene #TR320517	Amp/Puromycin
pRS-shRNA anti-RSK1	Origene #TR320517	Amp/Puromycin
pGeneClip™ Vector shRSK2	SABioscience KH05685	Amp/Neomycin
pSUPERIOR-shRNA anti-SPARC	Minn y cols. 2005	Amp/Puromycin

Tabla 3. Plásmidos utilizados para las transfecciones estables y sus correspondientes resistencias a antibióticos para la selección. Amp: Ampicilina; Kan: Kanamicina.

3.3. Transfecciones estables y selección de clones

Las transfecciones estables se realizaron con liposomas (Lipofectamina o Fugene) siguiendo las instrucciones del fabricante para placa de 12 pocillos. Una vez transcurridas 24 horas, las células fueron pasadas a una placa de 150 mm para poder aislar las colonias, y a las 48 horas se les puso medio de selección con el antibiótico correspondiente según la resistencia del vector transfectado. Las dosis de antibiótico se establecieron previamente mediante una curva de resistencia al antibiótico realizada en cada línea celular a transfectar. La selección tuvo lugar durante 14 días, tras los cuales se aislaron clones individuales de cada transfección y/o se hicieron *pools* de las células transfectadas. La eficiencia de la transfección se estableció mediante un análisis de expresión proteica por *Western blot*.

Línea celular	Antibiótico de selección	
	Neomicina	Puromicina
A673	0.4 mg/mL	0.5 µg/mL
TC71	0.8 mg/mL	
TC252	0.8 mg/mL	

Tabla 4. Dosis de antibióticos utilizada para cada una de las líneas celulares transfectadas establemente, establecidas por curva de resistencia.

En el caso de la transfección con shARN (*short hairpin-ARN*) anti-CAV1, anti-RSK1 y anti-RSK2 se realizó una transfección transiente previa para determinar el más eficiente de los 4 shRNA enviados por la casa comercial. La transfección se realizó en placas de 12 pocillos con Fugene y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recogieron los *pellets* para extracción de proteína a las 60 horas tras la transfección y se comprobó por *Western blot* el shRNA más eficiente en la inhibición.

3.4. Análisis de expresión proteica

3.4.1. Obtención de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos se obtuvieron por lisis celular, utilizando un tampón RIPA al que se le añadieron inhibidores de proteasas y de fosfatasa en el momento de la extracción, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células fueron resuspendidas por pipeteo en un volumen de 40-100 µl (dependiendo del volumen de células a lisar) e incubadas 30 minutos en hielo. A continuación se les sometió a 2 pulsos de sonicación de 7 segundos a amplitud 100% y fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El

sobrenadante conteniendo el extracto proteico total fue alicuotado en tubos *ependorf* de 1.5 ml y guardado a -80°C.

3.4.2. Medición de la concentración proteica

La concentración proteica de los extractos se determinó mediante colorimetría con el kit *BCA™ Protein Assay*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm. La curva de calibración se hizo con diluciones seriadas de albúmina.

3.4.3. Análisis de expresión por *Western Blot*

40µg de extracto proteico total fueron fraccionados en geles de acrilamida-SDS (SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida en los geles separadores fue de 8-15% según el tamaño de las proteínas a analizar, el gel apilador fue del 4% en todos los casos. A las muestras se les añadió tampón de carga (*Laemni Buffer* con 5% de β-mercapto-etanol) y se incubaron durante 10 minutos a 100°C para su desnaturalización. Se cargaron también 8 µl de marcador de peso molecular pre-teñido.

La electroforesis fue llevada a cabo a 120 V constantes durante 80-100 minutos en tampón de electroforesis a temperatura ambiente. Una vez separadas por tamaño durante la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm por transferencia húmeda a 400 mA constantes durante 70 minutos en tampón de transferencia. Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con PBS/Tween 0.1% y bloqueadas en leche al 5% en PBS/Tween 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a una dilución adecuada en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las membranas fueron lavadas con PBS/Tween 0.1% e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a peroxidasa, diluido en la solución de bloqueo. Finalizada la incubación, se llevaron a cabo 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS/Tween 0.1%.

Para la detección de las proteínas marcadas con los anticuerpos, se utilizaron los sistemas de quimioluminiscencia *ECL®* y *ECL™ Prime*, siguiendo las indicaciones de los fabricantes, y se expusieron a películas fotosensibles de autoradiografía. El revelado se llevó a cabo con los líquidos habituales de revelado y fijación fotográfica.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Nº Catálogo	PM (kDa)	Dilución	
				Primario	Secundario
β -actina	Abcam	ab49900	42	1/50000	Mo 1/50000
CAV1	BD Transduction Lab	610059	21-24	1/10000	Rb 1/10000
ERK 1/2	Cell Signaling	4695	42,44	1/2000	Rb 1/5000
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	4376	42,44	1/1000	Rb 1/2000
FLI-1	Santa Cruz	sc-356	48-51	1/500	Rb 1/5000
FRA1	Cell Signaling	5281	40	1/1000	Rb 1/2000
Phospho-FRA1 (Ser265)	Cell Signaling	3880	40	1/1000	Rb 1/2000
MEK1/2	Cell Signaling	4694	45	1/1000	Mo 1/4000
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling	9154	45	1/1000	Rb 1/4000
RSK1	Cell Signaling	9333	90	1/1000	Rb 1/2000
Phospho-RSK1 (Ser380)	Cell Signaling	9341	90	1/1000	Rb 1/2000
Phospho-RSK1 (Thr359/Ser363)	Cell Signaling	9344	90	1/1000	Rb 1/2000
RSK2	Cell Signaling	9340	90	1/1000	Rb 1/2000
Phospho-RSK2 (Ser227)	Cell Signaling	3556	90	1/1000	Rb 1/2000
Phospho-RSK2 (Tyr529)	Cell Signaling	9324	90	1/1000	Rb 1/2000
S6	Cell Signaling	2217	32	1/2000	Rb 1/10000
Phospho-S6 (Ser235/236)	Cell Signaling	4858	32	1/2000	Rb 1/10000
SPARC	Abcam	ab14071	35	1/500	Ck 1/5000
α -Tubulina	Abcam	ab28439	54	1/10000	Mo 1/10000
Phospho-Tyrosine (p-Tyr)	Millipore	05-321		1/1000	Mo 1/2000

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados para *Western blot* y las diluciones utilizadas. Rb: Rabbit; Ck: Chicken; Mo: Mouse.

Anticuerpo Secundario	Casa comercial	Nº Catálogo
HRP-Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen	81-6520
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugated	Invitrogen	G-21234
Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Chicken IgY++ (IgG)(H+L)	Jackson ImmunoResearch	303-035-003

Tabla 6. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para *Western blot*.

3.5. Ensayo de inmunoprecipitación

3.5.1. Obtención de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos totales se obtuvieron por lisis celular utilizando un tampón de inmunoprecipitación (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, e Igepal CA-630 1%; pH 8), al que se le añadieron inhibidores de proteasas y de fosfatasa en el momento de la extracción, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células se resuspendieron en 300 μ l del tampón y tras pasar 3 veces por una jeringuilla de insulina e incubar 30 minutos, en hielo para evitar la degradación de las proteínas, las muestras fueron centrifugadas 30 minutos a

4°C y a 14000 rpm. El sobrenadante conteniendo el extracto proteico total fue alicuotado en tubos *ependorf* de 1.5 ml y guardado a -80°C.

3.5.2. Inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación fueron llevados a cabo utilizando 500 µg de proteína diluida en 500 µl de tampón de inmunoprecipitación. A la dilución se le añadió la IgG control o el anticuerpo correspondiente a la concentración deseada.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Nº Catálogo	Dilución
Ret	Cell Signaling	3223	1/50

Tabla 7. Anticuerpo utilizado para inmunoprecipitación y dilución correspondiente.

Una vez se añadió el anticuerpo correspondiente, la mezcla del extracto proteico y el tampón fue incubada durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras la incubación, se preparó la proteína G, utilizando cuentas (*beads*) magnéticas de proteína G por presentar mayor afinidad hacia los anticuerpos utilizados. Las cuentas de proteína G fueron utilizadas siguiendo las indicaciones del fabricante y aplicando 50 µl de cuentas a cada muestra. Finalizada la inmunoprecipitación, las cuentas fueron resuspendidas en 25 µl de tampón de carga (el utilizado para *Western blot*) y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100°C. Finalmente, el sobrenadante fue separado de las cuentas por centrifugación (10 segundos a 3000 rpm) para posteriormente analizar por *Western blot*.

3.6. Análisis de expresión por RT-PCR

El ARN total se obtuvo utilizando el kit para extracción *Nucleospin® RNA II* siguiendo las indicaciones del fabricante. Los extractos obtenidos se cuantificaron con un Nanodrop. Se realizó la retro-transcripción de 2 µg de ARN total, para obtener los ARN mensajero (ARNm) poli-A, utilizando la enzima *SuperScript*. Una vez obtenido el ADN monocatenario complementario se realizó la amplificación de los ARNm deseados utilizando cebadores específicos (Invitrogen).

Gen	Dirección	Secuencia	Temperatura de hibridación	Tamaño del amplicón
β-actina	Forward	5' - CGG GAC CTG ACT GAC TAC CTC	58 °C	432 bp
	Reverse	5' - CTT CAT TGT GCT GGG TGC		
MMP-2	Forward	5' - GAA GTA TGG GAA CGC CGA TG	65 °C	230 bp
	Reverse	5' - TGC CCT GGA AGC GGA ATG GA		
MMP-9	Forward	5' - GAG GAA TAC CTG TAC CGC TAT G	58 °C	532 bp
	Reverse	5' - CAA ACC GAG TTG GAA CCA C		
TIMP2	Forward	5' - GAT GCA CAT CAC CCT CTG TG	59,5 °C	196 bp
	Reverse	5' - CTG CCC GTT GAT GTT CTT CT		
SPARC	Forward	5' - ACA AAA AAC TGT GTG TGT	60 °C	158 bp
	Reverse	5' - AGC TTG TGG CCC TCT TGG T		

Tabla 8. Cebadores específicos para los genes indicados con las correspondientes temperaturas de hibridación y tamaño del amplicón obtenido.

Los productos de PCR fueron resueltos en geles al 1.5% de agarosa en tampón TAE. Para cada pareja de cebadores se ajustaron los números de ciclos obteniendo un valor estimado semi-cuantitativo de la abundancia de ARNm relativo. Las RT-PCR fueron repetidas 2 veces como mínimo.

3.7. Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en portaobjetos (*Slides Millicell® EZ*) (Fig.11) de 4 pocillos preparados para cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada pocillo se sembraron entre 5×10^4 y 10^5 células para lograr una confluencia aproximada de un 60-70% pasadas las 24 horas. Se retiró el medio de cultivo, se hicieron 3 lavados con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído frío al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. La permeabilización se llevó a cabo con una solución de Triton-TX100 al 0.1-0.2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS, se realizó un bloqueo durante 1 hora en PBS con 10% de suero normal de cabra en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, a la dilución correspondiente, en la solución de bloqueo.

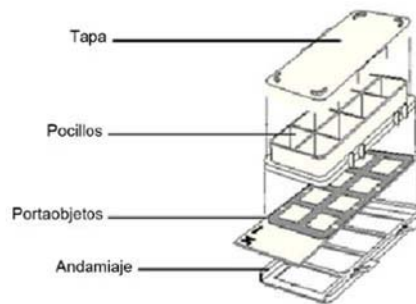


Figura 11. Esquema representativo de un portaobjetos de 8 pocillos. Merck Millipore

Una vez atemperadas las muestras, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora, a la dilución correspondiente, en la solución de bloqueo en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo se llevaron a cabo 2 lavados con PBS y dos lavados con agua destilada. Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje ProLong con DAPI. Se tomaron imágenes al microscopio de fluorescencia y confocal que fueron analizadas mediante el programa *MacBiophotonics Image J 1.47a*.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Nº Catálogo	Dilución
Mouse IgG2a anti-CAV1	BD Transduction Lab	610493	1/25
Rabbit polyclonal to MT1-MMP (MMP-14)	Abcam	ab38971	1/1000
Rabbit IgG anti-NF-κB p65	Cell Signaling	4764	1/25

Tabla 9. Anticuerpos primarios y dilución correspondiente para inmunofluorescencia.

Anticuerpo Secundario	Casa comercial	Nº Catálogo	Dilución
Alexa Fluor®594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	A11012	1/1000
Alexa Fluor®488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A11001	1/150

Tabla 10. Lista de anticuerpos secundarios y su dilución correspondiente utilizados para inmunofluorescencia.

3.8. Ensayo de la herida (*Wound healing assay*)

Para este ensayo de migración *in vitro* se sembraron el mismo número de células en placas de cultivo de 100 mm y se cultivaron hasta confluencia. Tras lavar con medio RPMI 1640, se realizaron estrías en el cultivo con una punta estéril (2-200 µl) de micropipeta. A continuación se volvieron a lavar con medio un par de veces para eliminar todas las células

no adheridas. Se les añadió medio RPMI 1640 suplementado con 2% de FBS y 1% de P/S y se incubaron a 37°C 5% CO₂. Se realizó un seguimiento con control fotográfico de tres campos por cada placa desde el momento inicial (0 horas) hasta las 48-72 horas. Para la cuantificación relativa se trazó una línea en ambos frentes de migración y se midió el tamaño de la herida a los diferentes tiempos, normalizando cada plano a su tiempo inicial.

3.9. Ensayo de migración en cámara de Boyden

Este ensayo se realizó con los *Transwell® Permeable Support* (Corning) que se basa en el sistema de la cámara de Boyden con una membrana de policarbonato de 6.5 mm, con poros de 8 µm de diámetro, por donde pasan las células hacia el pocillo (placa 24-pocillos) que contiene el medio con el quimio-atrayente, en este caso FBS (10%). Se sembraron un número de células adecuado en la parte superior de la cámara (1.5×10^5 - 2×10^5 células) en 150 µl de medio RPMI 1640 sin FBS, dejando en contacto la parte inferior con el medio RPMI 1640 con FBS (500µl).

Tras la incubación a 37°C 5% CO₂ durante 24-48 horas según la línea celular, se recogieron los *Transwells* y se lavaron con PBS. Se limpió la parte interior del *Transwell* con un bastoncillo de algodón y se fijaron las células migradas (parte exterior de la membrana) con etanol al 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se tiñeron con una solución de Cristal Violeta al 2% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Se separaron las membranas de los *Transwells* y se montaron en portaobjetos para ser analizadas a microscopía óptica. Para la cuantificación se hicieron fotos a 5 campos no solapantes de cada membrana y se cuantificó el número de células.

3.10. Ensayo Invasión

Para este ensayo se utilizó el kit *Cell Invasion Assay* (Chemicon) que se basa en el sistema de la cámara de Boyden con una membrana de policarbonato con poros de 8 µm recubierta por la parte interna con *ECMatrix™* (matriz de proteínas derivada del tumor murino Engelbreth Holm-Swarm – EHS) (Fig.12). Se sembraron, siguiendo las instrucciones del fabricante, 1.5×10^5 - 2×10^5 células en la parte superior de la cámara en 150 µl de medio RPMI 1640 sin FBS, dejando en contacto la parte inferior con el medio RPMI 1640 con el 10% de FBS (500 µl). Para la fijación, tinción, montaje y cuantificación se procedió como se ha descrito para el ensayo de migración en cámara de Boyden.



Figura 12. Diagrama representativo de una cámara de Boyden o Transwell para ensayo de invasión.

3.11. Zimograma

El análisis de la actividad de las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) se determinó por zimograma con sustrato de gelatina. Para ello se recogió medio sin FBS (medio condicionado) de cultivos de 24-48 horas que se concentró 1/10, aproximadamente, mediante Centricón de 10 k. Se realizó una electroforesis en condiciones no reductoras, para lo que se mezclaron 30 µl de los medios concentrados con 7.5 µl de tampón de carga 5x y se calentaron durante 10 minutos a 65°C. Las muestras se resolvieron en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 8% con 25% (p/v) de gelatina (precalentada a 37°C para su disolución en una solución madre de 10 mg/ml) en tampón de electroforesis a 180 V constantes durante 80-90 minutos a 4°C. El gel se lavó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución al 2.5% de Tritón X-100 para sustituir el SDS presente en el gel. El gel se incubó toda la noche a 37°C en tampón Colagenasa con 0.2% de Brij35 para la activación de las MMPs. Tras un lavado con agua se tiñó el gel con una solución al 0.1% de *Coomassie blue*, revelando así la degradación de la gelatina en el gel por parte de las MMPs.

Tampón Colagenasa (1x)

25 ml Tris·HCl 50 mM pH 7.6
 5 mM CaCl₂
 0.2 M NaCl
 H₂O

Tampón de carga (5x)

6 ml Tris·HCl 0.5 M pH 6.8
 10% SDS
 0.1% Azul de Bromofenol
 50% Glicerol

3.12. Mutagénesis dirigida

Para obtener el mutante no fosforilable de CAV1 realizamos una mutagénesis dirigida con el kit *QuikChange Site-directed Mutagenesis* siguiendo las instrucciones del fabricante, sobre el vector pCDNA-CAV1.

La mutación Y14F la obtuvimos al cambiar el codón TAC→TTC con los siguientes cebadores complementarios.

Dirección	Secuencia
Forward	5' - CGG AGG GAC ATC TCT <u>I</u> CA CCG TTC CCA TCC GGG
Reverse	5' - CCC GGA TGG GAA CGG TG <u>A</u> AGA GAT GTC CCT CCG

Tabla 11. Secuencia de los cebadores utilizados para realizar la mutagénesis dirigida. Subrayadas las bases correspondientes a la mutación.

3.13. Ensayos *in vivo*

3.13.1. Mantenimiento de animales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones inmunodeprimidos BALB/c^{nu/nu} de la casa Harlan. Todos los animales eran hembras de 6-7 semanas de edad y con un peso medio aproximado de 21 g. Los animales se mantuvieron estabulados en jaulas apiladas en un *rack* individual ventilado tipo IIL (IVC) de la casa Allentown que cumple con la normativa vigente. Los ratones se encontraban con una alimentación y bebida *ad libitum* basada en pienso Teckland irradiado de la casa Harlan y agua filtrada y clorada distribuida de manera automática. El espacio en el que se encontraban los animales presentaba una temperatura de 18-22°C, con una humedad relativa del 60-70% y con ciclos de luz de 12 horas con un cambio gradual de 30 minutos.

La limpieza de las jaulas así como la revisión veterinaria se realizó de manera semanal y cumpliendo la normativa establecida por la AAALAC (*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*). Los procedimientos utilizados se encuentran descritos dentro del protocolo de trabajo del Dr. Martínez Tirado (Procedimiento 5768) autorizado por la DAAM (Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) de la *Generalitat* de Cataluña.

3.13.2. Ensayo de metástasis experimental

Para este ensayo se inocularon 2×10^6 de las células a estudiar resuspendidas en $100 \mu\text{l}$ de medio RPMI 1640 por vía intravenosa (vena de la cola). Se procedió a la eutanasia de los ratones cuando mostraron síntomas de morbilidad (dificultad respiratoria, pérdida de peso). Durante la necropsia se extrajeron los pulmones y se fijaron en paraformaldehído al 4% para su análisis macroscópico e inclusión en parafina.

3.14. Análisis histológico

3.14.1. Tinción por Hematoxilina/Eosina

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído 4%, deshidratadas y embebidas en parafina. Una vez listo el bloque de parafina, se hicieron cortes en el microtomo con un grosor de $3 \mu\text{m}$. Se realizó una tinción por Hematoxilina/Eosina por medio de la cual se apreciaron las metástasis y micrometástasis dentro del tejido pulmonar.

3.14.2. Análisis por Inmunohistoquímica

Los cortes fueron incubados durante toda la noche a 60°C para facilitar la eliminación de parafina en la posterior batería de desparafinado e hidratación (xilol, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% y agua destilada). El desenmascaramiento de los epítomos se llevó a cabo hirviendo las muestras durante 7 minutos a 240°C en tampón citrato a pH 6 preparado al momento (ácido cítrico 1.81 mM, citrato sódico 0.82 mM en 1l agua destilada) en una olla a presión. Una vez atemperadas y lavadas en PBS se procedió a inhibir la actividad peroxidasa endógena con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol durante 15 minutos, tras los cuales se lavaron las muestras con agua corriente y PBS.

Los análisis por inmunohistoquímica fueron llevados a cabo utilizando el kit de Dako y siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el bloqueo se incubaron las muestras durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario deseado.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Nº Catálogo	Dilución
CAV1	BD Transduction Lab	610059	1/1000
MMP-9	Abcam	ab38898	1/100
rpS6	Abcam	ab14071	1/50

Tabla 12. Anticuerpos primarios y diluciones utilizadas para el análisis por inmunohistoquímica.

El revelado se llevó a cabo con diaminobencidina (DAB), exponiendo un tiempo máximo de 10 minutos. Se realizó contra-tinción con hematoxilina y pasaron por la batería de

deshidratación para su montaje con DPX. Las muestras fueron analizadas al microscopio óptico.

3.15. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos por duplicado o triplicado, llevando a cabo el análisis de datos mediante el ANOVA y el *t*-Test (*GraphPad Software*) para determinar las diferencias significativas.

3.16. Recursos generales y materiales

En esta sección quedan mencionados todos los equipos, materiales, kits y reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis.

3.16.1. Equipos

Agitador para tubos de ensayo ECN444-1378 (VWR)
Agitador Titramax 100/101/1000 (Heidolph)
Campana de Flujo Laminar CV-100 (Telstar)
Centrífuga 5804 (Eppendorf)
Incubador HERAcCell 150 (Thermo Scientific)
Máquina de revelado Curix60 (AGFA-Healthcare)
Microcentrífuga Modelo CT15E/CT15RE (VWR)
Microscopio Confocal Invertido DMI6000 (Leica TCS SP5) (láseres: argón, 405 diodo y DPSS561)
Microscopio Invertido Eclipse 80i (Nikon)
Microscopio Invertido universal IX70 (Olympus)
Minicentrífuga Galaxy MiniStar (VWR)
ND-100 Espectrofotómetro (Nanodrop)
Sonicador UP50H Ultrasonic Processor (Hielscher).
Termobloque Analógico (VWR)
Termociclador 2720 (Applied Biosystem)
LI4 Ivis Lumina XR (Caliper)
GS-800™ Calibrated Densitometer (Bio-Rad)

3.16.2. Materiales

Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminescence film (GE)
Centricon – Amicon® Ultra Centrifugal Filters – Ultracel 10k (Millipore)
Criotubos de 1.6 ml (Sartstedt)
Cubeta de electroforesis Mini Protean (Bio-Rad)
Cristales, Mini PROTEAN 1-1.5 mm (Bio-Rad)

Hypercassette™ (Amersham Biosciences)
Jeringuillas de insulina de 1 ml, 25 GA 5/8 pulgadas, 0.5x16 mm
Placa de cultivo celular no pirogénica estéril 100 mm (Corning)
Placas de 12 pocillos para cultivo celular (Corning)
Placas de 24 pocillos para cultivo celular (Falcon)
Placas de 96 pocillos (Kima)
Portaobjetos SuperFrost®Plus (VWR International)
PureProteome™ Protein A and Protein G Magnetic Beads (Millipore)
Slides Millicell® EZ 4 pocillos (Millipore)
Transwell® Permeable Supports (Corning)
Tubos de polipropileno de 14 ml de fondo redondo (Becton-Dickinson)
Tubos de polipropileno de 15 ml y 50 ml (Sarstedt)
Tubos *ependorf* para microcentrifuga 1.5 ml (Daslab)

3.16.3. Kits

BCA™ Protein Assay Kit (Pierce)
Cell Invasion Assay kit (Chemicon)
EndoFree® Plasmid Maxi Kit – EndoFree Plasmid Purification (Qiagen)
Kit para Inmunohistoquímica (Dako):

- Dako Pen (bolígrafo hidrofóbico)
- Diluyente del anticuerpo
- LSAB (Labeled Streptavidin-biotin) + Sistema HRP (Horseradish Peroxidase)
- Diaminobencidina líquida + sustrato

NucleoSpin® Plasmid – Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel)
PathScan® RTK Signalling Antibody Array kit – Chemoluminescent Readout (Cell Signalling)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies)
Total RNA Isolation - Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel)

3.16.4. Reactivos

Medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) 1640 + GlutaMAX™ (Invitrogen)
Suero Fetal Bovino (Invitrogen)
0.05% Tripsina – EDTA 1x (Invitrogen)
Penicilina/Streptomycin (Invitrogen)
FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche)
Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
Geneticina G-418 Sulfato – Neomicina (Invitrogen)
Puromicina (Sigma)
Hygromicina B 50 mg/ml (Invitrogen)
DMSO – Dimethyl sulfóxido (Sigma)

Library Efficiency® DH5α – Chemically Competent Cells (Invitrogen)
S.O.C. – Serum optimal broth with catabolite repression (Invitrogen)
LB – Lennox L Broth (Acumedia)
Agar – Bacto Agar (BD Biosciences)
Kanamycin Sulfate (Sigma-Aldrich)
Ampicillin Sodium Salt (Sigma)

Glycerol, ReagentPlus® >=99.0% (GC) (Sigma-Aldrich)

RIPA Buffer (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (Pierce)

Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1 -3.3%C- (Bio-Rad)

Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) Ultrapure, MB Grade (USB Corporation)

10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) Solution, Molecular Biology Grade (AppliChem)

APS (Ammonium Persulfate) Ultrapure, ACS Reagent Grade (USB Corporation)

TEMED (Tetramethylethylenediamine) Approx. 99% (Sigma)

Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)

2-Mercaptoethanol, electrophoresis purity reagent (Bio-Rad)

Marcador de Peso Molecular - Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad)

Tampón de electroforesis (10x TGS – Tris/Glicine/SDS Buffer, 10x) 1x Solution: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3 (Bio-Rad)

Membrana de nitrocelulosa, 0.2 µm (Bio-Rad)

Tampón de transferencia (10x TG – Tris/Glycine Buffer, 10x) 1x Solution: 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3 Towbin Buffer: mix 100 ml 10xTG, 200 ml methanol. 700 ml

Metanol (Panreac)

PBS Dulbecco 10x sin Ca ni Mg (PAA The cell culture company)

Tween® 20, BioXtra (Sigma-Aldrich)

Leche en Polvo Desnatada (ASTURIANA)

Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)

Formaldehido en Solución 4% (MERCK)

Etanol absoluto para análisis (MERCK)

Xilol (VWR-Prolabo)

Ácido cítrico monohidratado (MERCK)

Citrato sódico tribásico (Sigma-Aldrich)

Hydrogen peroxide solution 30% - H₂O₂ (Sigma)

DPX, medio de montaje (VWR-BDH)

Solución de Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich)

Solución Acuosa de Eosina (Sigma-Aldrich)

Suero de cabra, NGS – Normal Goat Serum (Sigma)

ProLong® Gold antifade reagent with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen)

2-propanol (Panreac)

SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Oligo(dT) Primer (Invitrogen)

10 mM dNTP Mix (Invitrogen)

Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

100 bp DNA Ladder (Invitrogen)

SeaKem LE Agarose (Lonza)

MEK1/2 Inhibitor – U0126 (LC Laboratories)

RSK Inhibitor – SL0101 (CalbioChem)

MMP-2/MMP-9 Inhibitor II 1mg (Calbiochem)

Gelatin from bovine skin, type B (Sigma)

Triton® X-100 (Sigma)

Cloruro cálcico dihidrato – $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merk)

Cloruro sódico – NaCl (Merk)

Brij35 Solution 30% (Sigma)

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

4. RESULTADOS

4.1. CAV1 modula la capacidad del sarcoma de Ewing para metastatizar.

En primer lugar se analizó la expresión de CAV1 en muestras embebidas en parafina de tumores de pacientes de SE con translocaciones conocidas [Lai y cols., 2006]. Aproximadamente el 85% de las muestras fueron positivas para la tinción (Tabla 13 y Fig. 13). A pesar de no encontrar ninguna correlación significativa entre la expresión de CAV1 y el estadio, tamaño o localización tumoral, el 100% de las muestras metastásicas analizadas fue positivo para CAV1 (Tabla 13), lo que sugeriría que la elevada expresión de esta proteína podría promover la metástasis en el SE.

	Estadio		Tamaño tumoral		Localización tumoral	
	Localizado	Metastásico	<8cm	>8cm	Axial	Extremidad
CAV1 (n=41)						
Negativo	2	0	1	1	1	1
Positivo	25	10	12	23	24	11
Nulo/Dudoso	4	0	1	3	2	2

Tabla 13. Resultados de la tinción por inmunohistoquímica para CAV1 de 41 muestras de pacientes de SE embebidas en parafina en un TMA (*tissue microarray*) y su distribución según el estadio, tamaño y localización tumoral.

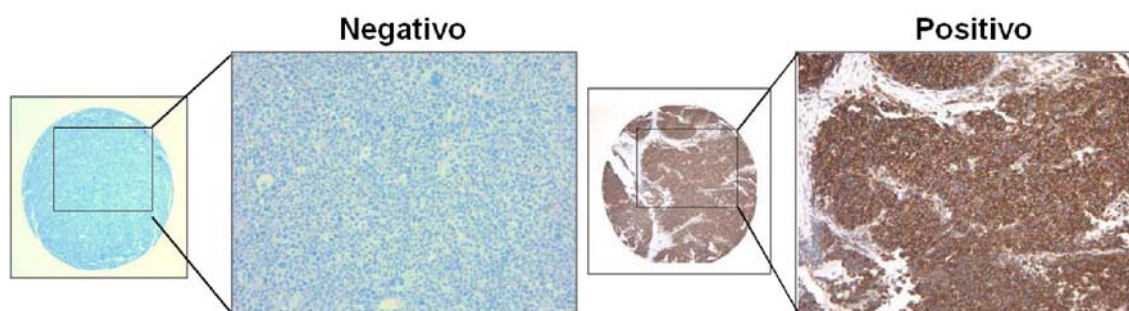


Figura 13. Imágenes de la tinción de CAV1 en muestras de pacientes de SE del TMA que ejemplifican las muestras consideradas como negativas y positivas para CAV1 (40X, recuadro 400X).

Con el fin de evaluar el efecto de CAV1 en el proceso metastásico del SE se estableció un modelo de inhibición de la expresión de CAV1, transfectando establemente un shARN en las líneas celulares derivadas de SE, A673 y T252 (*).

(*) Los experimentos llevados a cabo en esta tesis se han realizado con la línea celular A673 como modelo fundamental. Para corroborar determinados resultados nos hemos apoyado en otras líneas celulares de SE disponibles en el laboratorio.

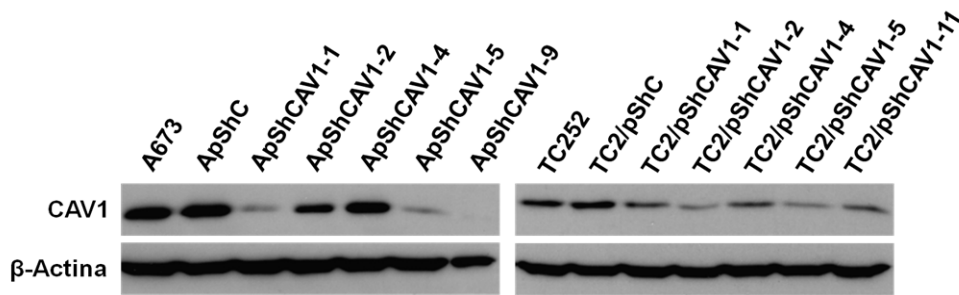


Figura 14. *Western blot* mostrando la inhibición de la expresión de CAV1 en los clones obtenidos tras la transfección estable con un shARN de las líneas A673 y TC252, en comparación con la línea parental y el *pool* de células transfectadas con el vector vacío. Como control de carga se usó β -actina.

Tras la transfección estable y posterior selección con el antibiótico correspondiente, se comprobó la inhibición de la expresión proteica de CAV1 por *Western blot* (Fig. 14). Para los siguientes experimentos se continuó con los clones que mostraron una mayor eficiencia en la inhibición, es decir, los clones ApShCAV1-5 y ApShCAV1-9 para A673, y los clones TC2/pShCAV1-2 y TC2/pShCAV1-5 para TC252. Así como los *pools* de células transfectadas con el vector vacío, ApShC y TC2/pShC, como controles. Además se comprobó que la transfección con el shARN no estaba alterando la expresión del factor de transcripción quimérico EWS/FLI1 (Fig. 15).

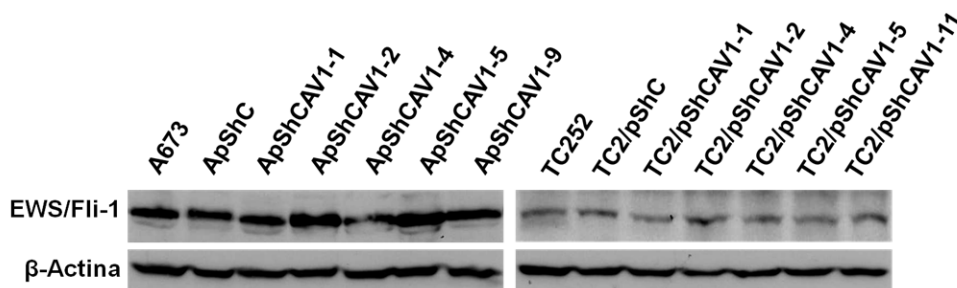


Figura 15. *Western blot* que muestra como la transfección con el shARN anti-CAV1 no produce alteraciones en la expresión de EWS/FLI-1, detectado con un anticuerpo anti-FLI1, ya que las células de SE no lo expresan. Como control de carga se usó β -actina.

Para examinar el efecto del silenciamiento de CAV1 en la capacidad migratoria e invasiva de las células de SE, realizamos una serie de experimentos *in vitro*.

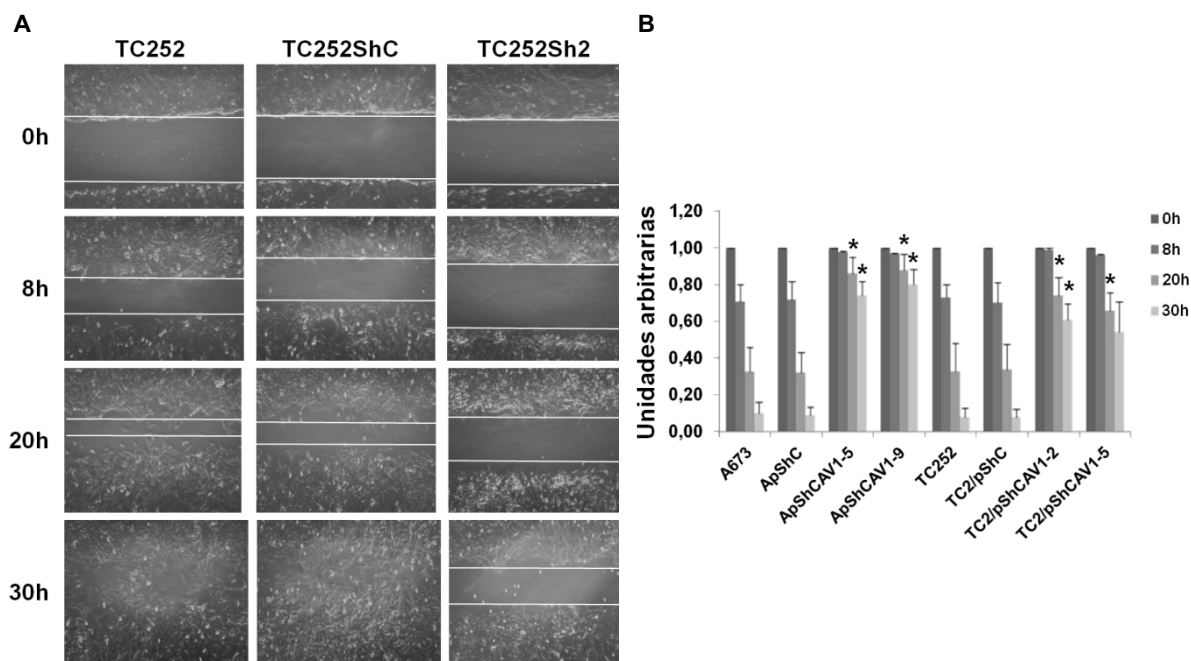


Figura 16 A. Microfotografías a diferentes horas tras la realización de una herida en una monocapa de células del modelo de inhibición de CAV1 en TC252 (100X). **B.** Cuantificación del cierre de la herida de tres experimentos independientes para los modelos de inhibición de CAV1 en A673 y TC252. Se normalizó la anchura de la herida a cada tiempo con la anchura de la herida a tiempo 0h. Unidades arbitrarias. *p<0,01.

Tanto en los experimentos de la herida (Fig. 16) como en los de migración en cámara de Boyden (Fig. 17), se observó una capacidad migratoria significativamente menor en las células con CAV1 silenciada respecto a las células control.

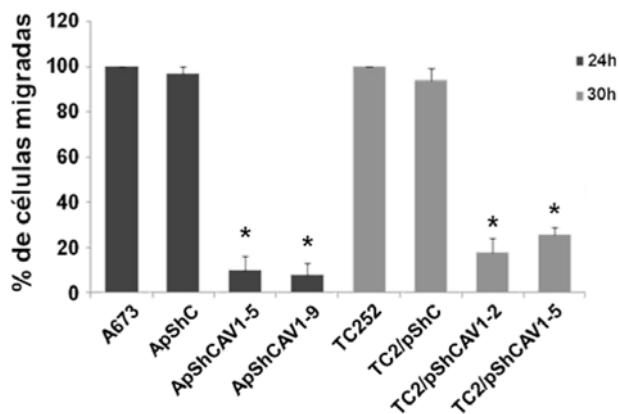


Figura 17. Cuantificación de tres ensayos de migración en cámara de Boyden independientes con ambos modelos de silenciamiento de CAV1. *p<0,01.

Ya que la adquisición de capacidad invasiva por parte de las células tumorales es fundamental para el proceso metastásico, se realizaron experimentos de invasión *in vitro* en cámara de Boyden recubierta con matriz extracelular, que demostraron una menor capacidad invasiva de las células con CAV1 silenciada (Fig. 18).

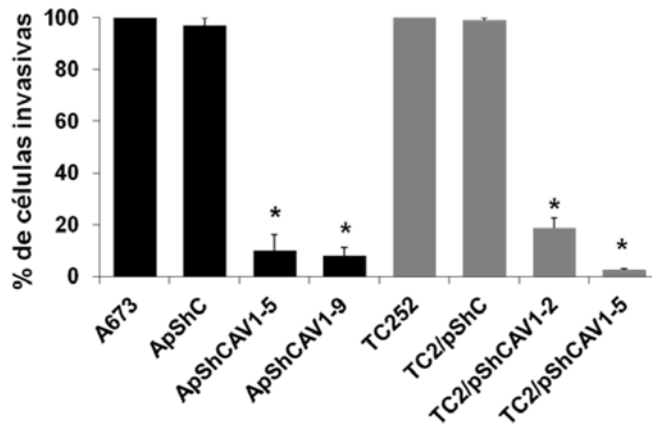


Figura 18. Cuantificación de tres experimentos independientes de ensayo de invasión *in vitro* que muestra la menor capacidad invasiva de las células con CAV1 silenciada. *p<0,01.

En base a los resultados obtenidos *in vitro* se decidió estudiar el efecto de la pérdida de expresión de CAV1 en la capacidad metastásica de las células de SE *in vivo* mediante un modelo de metástasis experimental con el modelo A673. Se inyectaron dos millones de células de cada línea del modelo por vía intravenosa en la cola de ratones inmunodeprimidos BALB/c ^{nu/nu}. Se procedió a la eutanasia de los animales que mostraron signos de morbilidad y, sesenta días tras la inyección, se sacrificó al resto de animales. Hubo una supervivencia significativamente mayor de los ratones inoculados con las células con CAV1 silenciada en comparación con los inoculados con las células control (Fig. 19).

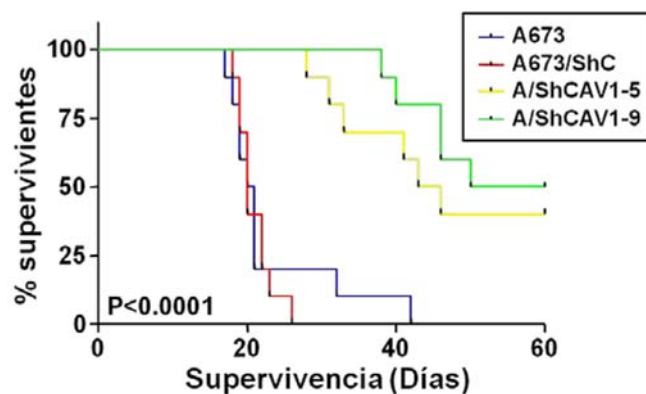


Figura 19. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones *nude* inyectados con células del modelo de inhibición de CAV1 por shARN de A673 (n = 10 para cada línea).

Al realizar la necropsia se comprobó que las células inoculadas solo habían colonizado los pulmones, por lo que se extrajeron, se fijaron y se analizaron macroscópicamente antes de embeberlos en parafina para su posterior análisis por inmunohistoquímica. Al realizar un conteo macroscópico, el número de metástasis pulmonares obtenidas con las células control fue significativamente mayor que con las células con el shARN anti-CAV1 (Fig. 20).

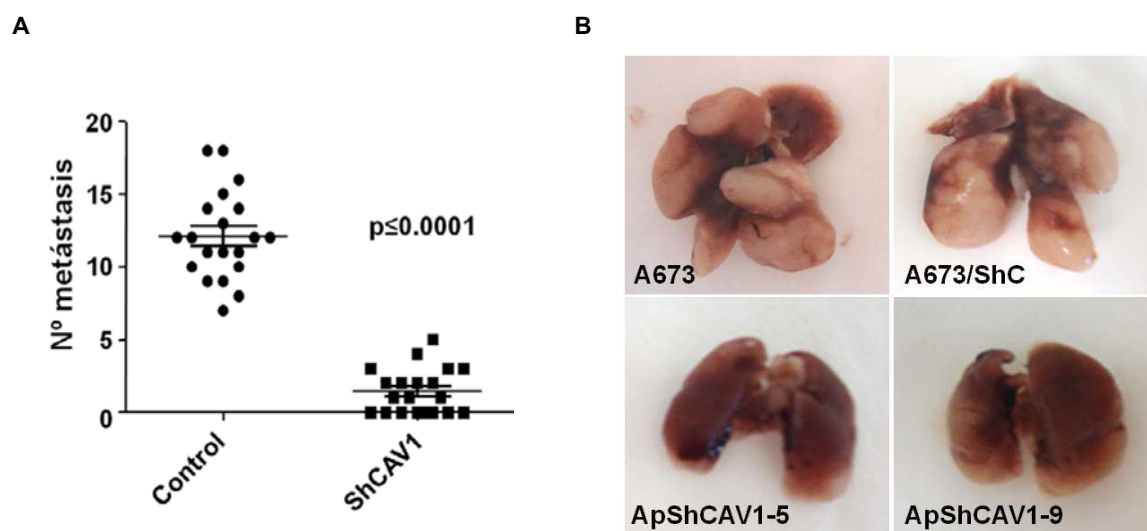


Figura 20 A. Cuantificación de metástasis pulmonares en los ratones inyectados con las células control en comparación con los inyectados con las células con CAV1 silenciada. **B.** Imágenes representativas de los pulmones extraídos de los ratones inyectados con el modelo. Los ratones control fueron sacrificados a la tercera semana mientras que los inyectados con los clones de shCAV1 lo fueron a la octava.

La tinción con hematoxilina y eosina de cortes de parafina de los pulmones extraídos reveló que el número y tamaño de las metástasis resultantes de las células control fue mucho mayor que aquellas producidas por las células con CAV1 silenciada (Fig. 21A). El análisis inmunohistoquímico mostró una expresión muy baja o no detectable de CAV1 en las metástasis pulmonares derivadas de las células ApShCAV1, en ratones sacrificados al final del experimento, en comparación con la tinción positiva de CAV1 en las metástasis derivadas de las células control, en ratones sacrificados en la tercera semana del experimento (Fig. 21B).

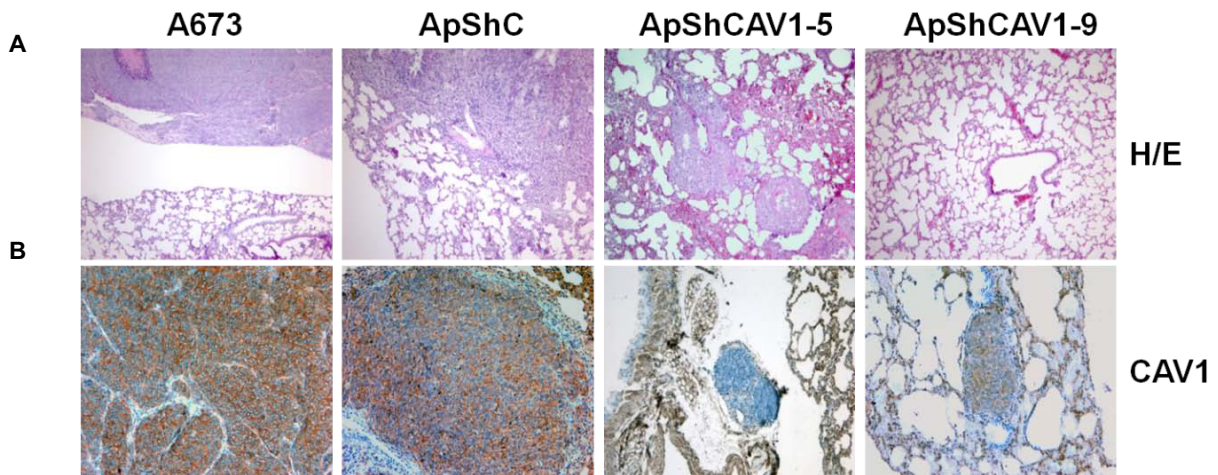


Figura 21 A. Tinción de hematoxilina-eosina de pulmones fijados en parafina (200x). **B.** Tinción de CAV1 en secciones de metástasis pulmonares de ratones inyectados con A673/ShC sacrificados a día 24 e inyectados con ShCAV1 sacrificados a día 60 (100x).

Estos resultados evidencian el papel promotor de CAV1 en la migración e invasión de las células derivadas de SE, así como su importancia para la metástasis pulmonar en el modelo *in vivo*.

4.2. CAV1 regula la producción de MMP-9 y la actividad de MMP-2 en células de sarcoma de Ewing.

Las metaloproteinasas (MMPs) están implicadas en la remodelación de la matriz extracelular y han sido relacionadas con metástasis en diversos estudios [Yilmaz y Christofori, 2010; Chiang y Massagué, 2008]. Concretamente, la MMP-2 y la MMP-9 han sido relacionadas con la agresividad en diferentes tumores, incluidos los sarcomas [Benassi, 2001], por lo que se investigó si existía alguna relación entre éstas y CAV1.

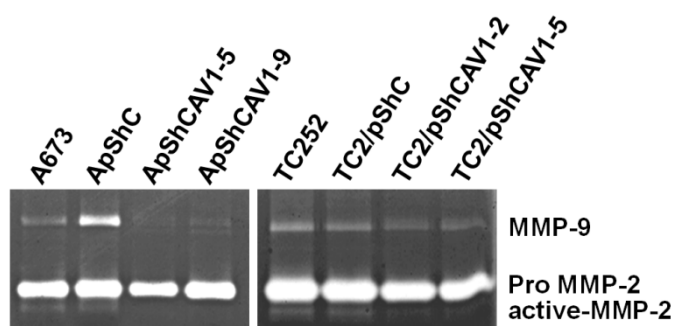


Figura 22. Zimograma de gelatina de medios condicionados que muestra menor actividad de MMP-9 y de la forma más activa de MMP-2 en los clones de baja expresión de CAV1.

Mediante zimograma con sustrato de gelatina, se analizaron medios condicionados de ambos modelos. Todas las líneas presentaron actividad proteolítica de MMP-2 y MMP-9 en sus medios condicionados. Sin embargo, las líneas con baja expresión de CAV1 presentaron una menor actividad proteolítica de MMP-9 y, mientras que los controles muestran una forma de MMP-2 más activa (mayor movilidad electroforética), esta forma es prácticamente indetectable en los medios condicionados de células con CAV1 silenciada (Fig. 22). Estos resultados sugerirían que la expresión de CAV1 es necesaria para la producción de MMP-9 y la activación de MMP-2, y explicarían, al menos en parte, la menor capacidad invasiva de las células con baja expresión de CAV1. Esta menor capacidad invasiva se reprodujo al repetir el experimento de invasión con las células parentales tratadas con el inhibidor específico de MMP-2 y MMP-9 BiPs [*N*-phenylsulfonyl-hydroxamic acid derivative (2*R*-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-*N*-hydroxy-3-phenylpropinamide)] (Fig. 23).

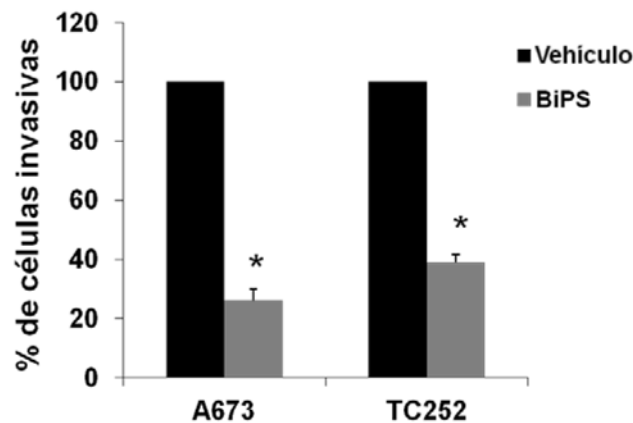


Figura 23. Cuantificación del ensayo de invasión realizado durante 72 horas con las líneas de SE A673 y TC252, en el que se observa una menor capacidad invasiva de las células tratadas con 10 μ M del inhibidor de MMPs, BiPs, respecto a las tratadas con el vehículo (DMSO). * $p < 0,05$.

Además, en el procedimiento *in vivo* de metástasis experimental con el modelo de inhibición de CAV1 en A673, las metástasis pulmonares derivadas de las células ApShCAV1 muestran una expresión menor de MMP-9 por inmunohistoquímica en comparación con las metástasis derivadas de las células control (Fig. 24).

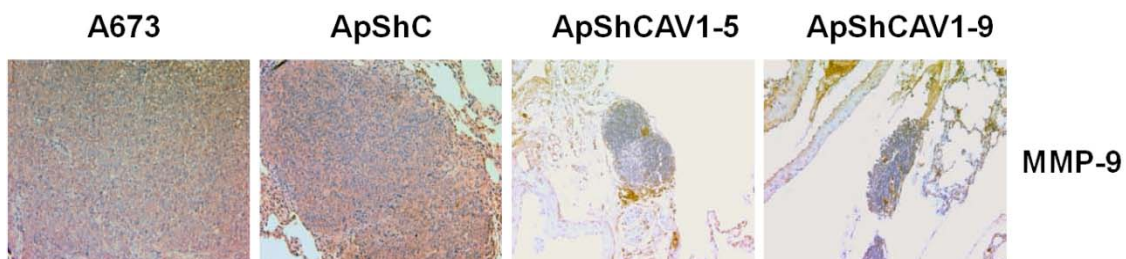


Figura 24. Tinción de MMP-9 en secciones de metástasis pulmonares de ratones inyectados con A673/ShC sacrificados a día 24 e inyectados con ShCAV1 sacrificados a día 60 (100 \times).

Las MMPs pueden estar reguladas a diferentes niveles: transcripcional, post-transcripcional o a nivel de la activación del pro-enzima [Clark, 2008]. Para elucidar si el efecto de CAV1 era sobre la secreción de MMP-9 o sobre su expresión, se analizó por RT-PCR que en los clones con baja expresión de CAV1 disminuía la cantidad de ARNm de MMP-9 (Fig. 25), sugiriendo una regulación a nivel transcripcional.

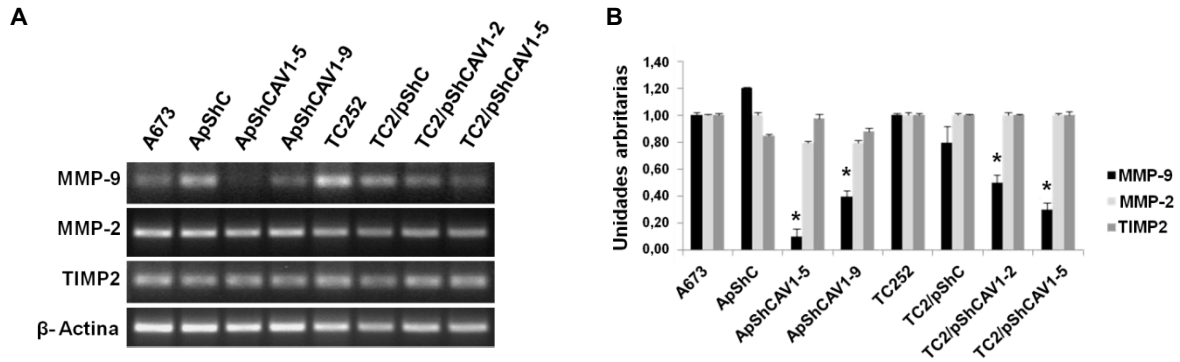


Figura 25 A. PCR semi-cuantitativa y **B.** su respectiva cuantificación, que muestra la menor expresión de MMP-9 por parte de las células con CAV1 silenciada. Sin embargo, no se observan diferencias en los niveles de ARNm de MMP-2 o TIMP2. Como control de carga se usó β -actina. * $p < 0,05$.

Respecto a la activación de la MMP-2, hay dos responsables que podrían estar siendo regulados por CAV1, el inhibidor de MMPs TIMP2 y la metaloproteínasa de membrana MT1-MMP (MMP-14). TIMP2 no presentó niveles de expresión de ARNm alterados en las células con baja expresión de CAV1 (Fig. 25). Sin embargo, por inmunofluorescencia se observó cierto grado de co-localización de CAV1 y MT1-MMP, así como un cambio de la distribución celular de esta última en ausencia de CAV1 (Fig. 26 y 27). Mientras que en presencia de CAV1, MT1-MMP se localiza principalmente en la membrana, en las células con CAV1 silenciada tiene una distribución más homogénea por el citoplasma (Fig. 27). Estos resultados sugerirían que la regulación de la activación de MMP-2 por parte de CAV1 es por medio de la regulación de la actividad de MT1-MMP. CAV1 podría estar implicada en el transporte y localización de ésta en la membrana plasmática y, por lo tanto, en su función.

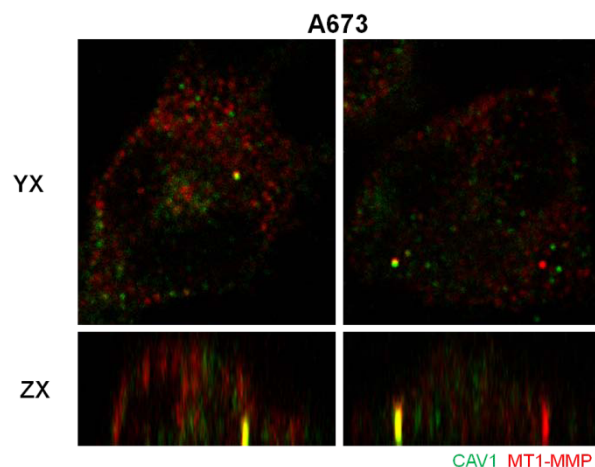


Figura 26. Inmunofluorescencia que muestra la co-localización de MT1-MMP con CAV1 en la línea celular A673. Se muestran el plano XY y el plano ZX (630x).

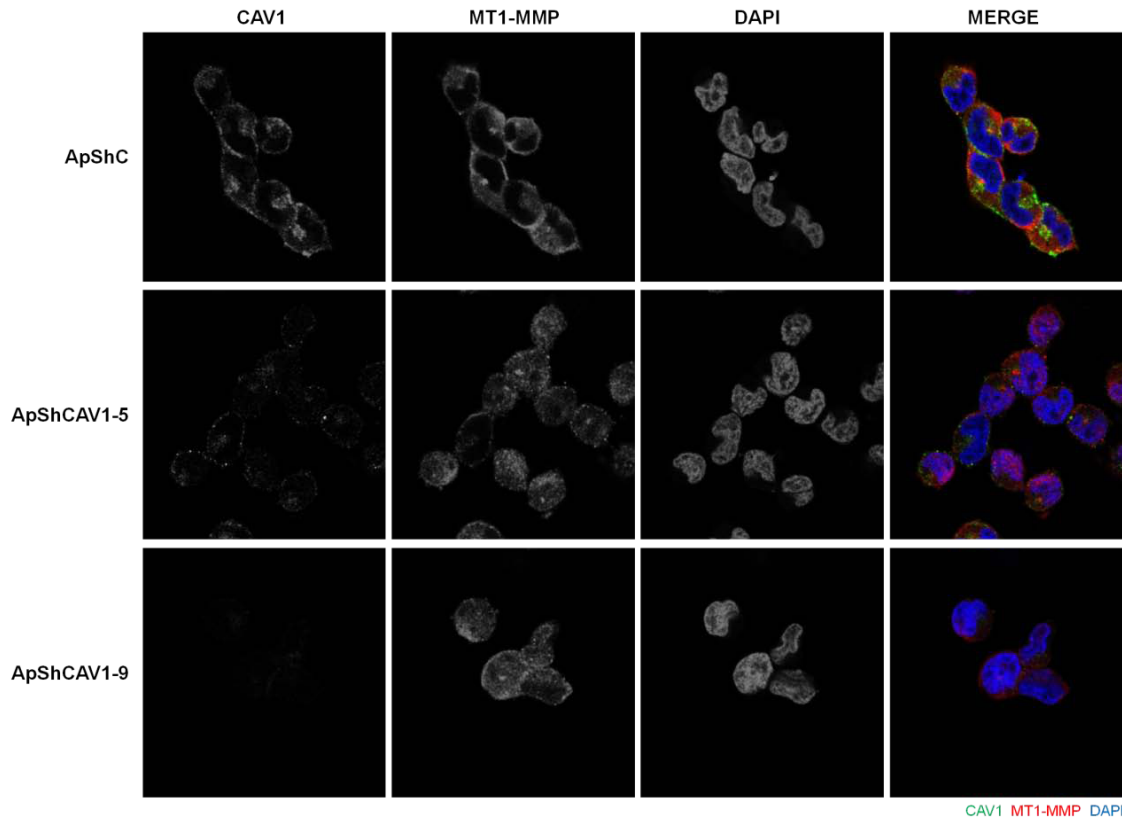


Figura 27. Inmunofluorescencia que muestra la diferencia de localización de MT1-MMP en clones de baja expresión de CAV1 de A673 respecto al control (630x).

Estos resultados sugerirían que CAV1 promueve la capacidad invasiva de las células de SE mediante la regulación de la producción de MMP-9 y la activación de MMP-2.

4.3. Mecanismo de regulación de MMP-9

Una vez descrito el efecto que CAV1 tiene sobre la transcripción de MMP-9, el estudio se centró en investigar el mecanismo concreto por el cual CAV1 regula la expresión de MMP-9. La relación de la vía de las MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) con la expresión de MMP-9 y la regulación de la invasión ha sido sugerida con anterioridad [Beliveau, 2010]. Esta vía resulta una buena candidata, ya que la línea A673 contiene la mutación activadora V599E de B-Raf [Davies y cols., 2002], por lo que esta ruta está alterada. De hecho, la línea A673 presenta una mayor fosforilación de ERK1/2 (*RAS/extracellular signal regulated kinase* 1 y 2) que otras líneas celulares de SE con el mismo tipo de fusión EWS/FLI1 (Fig. 28).

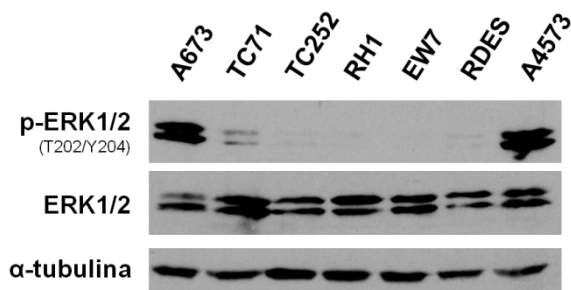


Figura 28. Western blot que muestra los diferentes niveles de expresión y fosforilación de ERK1/2 en diferentes líneas celulares de SE. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Independientemente de la presencia de la mutación en B-Raf, la fosforilación de ERK1/2 se reduce al inhibir la expresión de CAV1 en diferentes líneas de SE (Fig. 29).

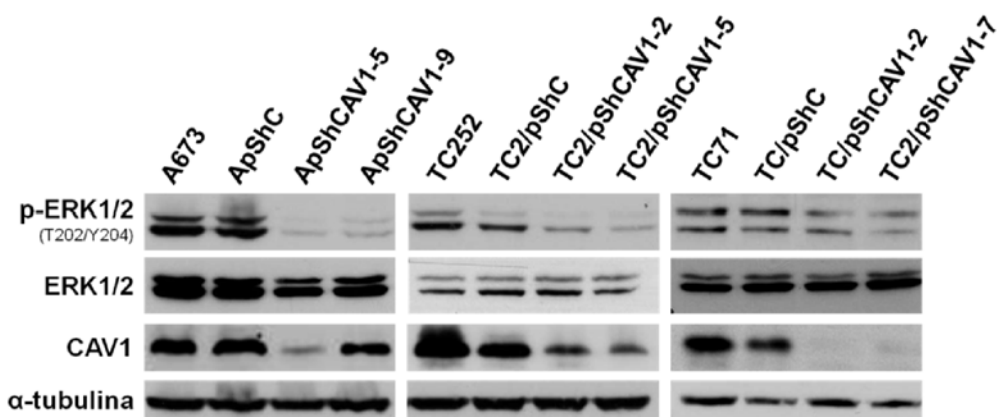


Figura 29. Western blot que muestra cómo se reduce la fosforilación de ERK1/2 al inhibir la expresión de CAV1 en diferentes líneas de SE. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

El responsable directo de la activación de ERK1/2 es MEK1/2 (MAPK/ERK kinasa 1 y 2) por lo que se analizó su estado de activación en nuestros modelos. Como era de esperar, su

fosforilación también se redujo en los clones de baja expresión de CAV1 (Fig. 30). Esto indicaría que CAV1 estaría afectando a alguno de los elementos anteriores en la cascada de señalización.

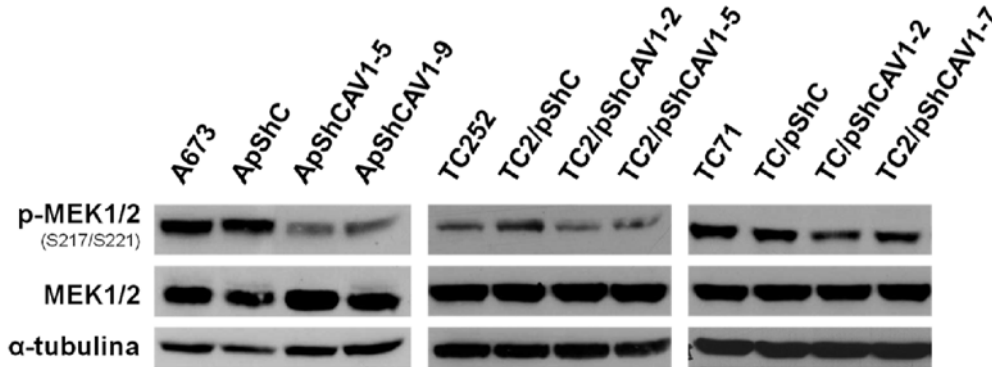


Figura 30. Western blot que muestra la reducción de la fosforilación de MEK1/2, coincidiendo con la reducción de la fosforilación de ERK1/2 en las líneas de baja expresión de CAV1. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

La señalización que activa esta vía de ERK1/2 puede provenir de diferentes receptores de membrana. Con el fin de averiguar el receptor implicado en nuestro modelo se realizó una comparación del perfil de fosforilación del modelo de silenciamiento de CAV1 en A673 mediante un *array* de anticuerpos que reconocían las fosforilaciones de 28 receptores tirosina kinasa y 11 importantes nodos de señalización. Se obtuvieron dos resultados destacables.

Por un lado, se observó que la fosforilación del receptor RET (*REarranged during Transfection*) se reducía en ausencia de expresión de CAV1 (Fig. 31). Este resultado fue validado por inmunoprecipitación (IP) para RET (Fig. 32).

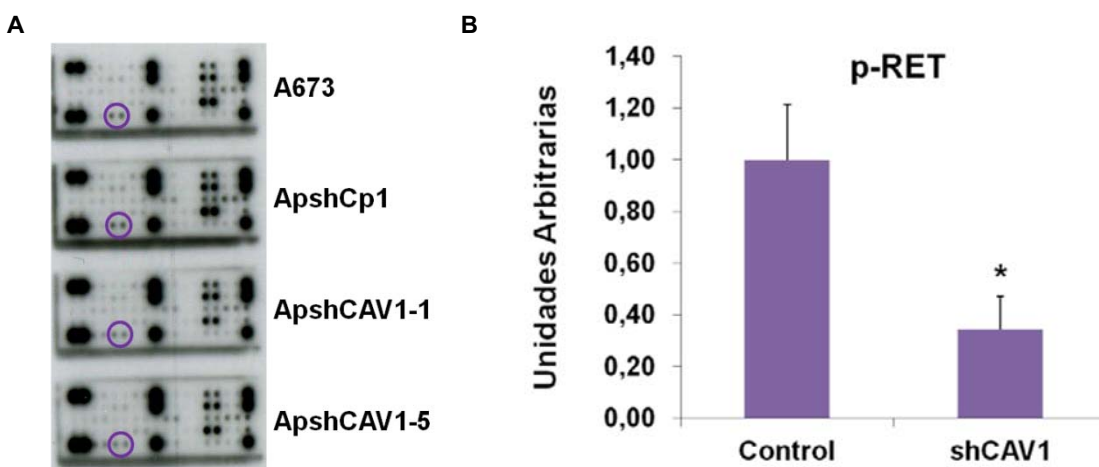


Figura 31 A. Array de anticuerpos realizado con el modelo de inhibición de CAV1 de A673. Los círculos violetas marcan los spots de p-RET. **B.** Cuantificación de los spots de p-RET para los controles y las líneas con shARN anti-CAV1 (shCAV1). * p<0,01.

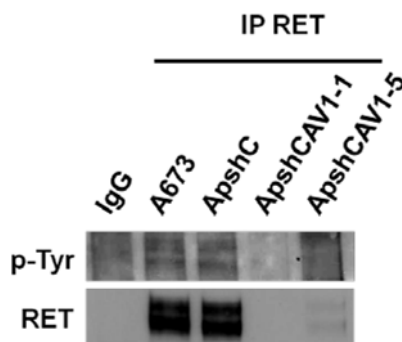


Figura 32. *Western blot* para tirosina fosforilada de la inmunoprecipitación anti-RET en el modelo de silenciamiento de CAV1 de A673. Para verificar la IP se realizó el *Western blot* anti-RET.

Al verificar la IP (Fig. 32) y por *Western blot* (Fig. 33), se observó que la reducción en la fosforilación de RET detectada por el array se trataba en realidad de una reducción de la expresión de la proteína en las células con CAV1 silenciada. Sin embargo, este resultado sólo fue evidente en el modelo de A673 (Fig. 33). Además, la expresión de este receptor es muy variable en las diferentes líneas celulares de SE analizadas por *Western blot* (Fig. 34).

Por este motivo no se profundizó más en el estudio de este receptor en nuestro modelo.

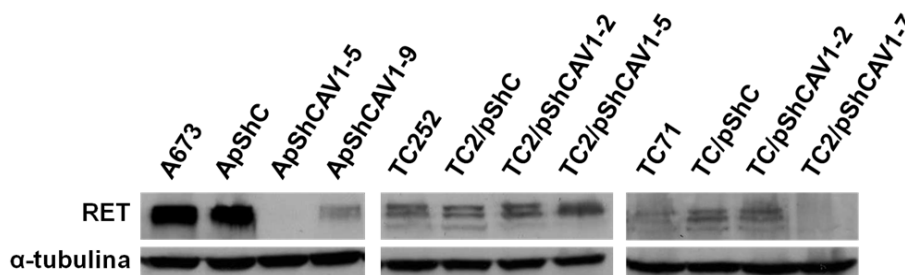


Figura 33. *Western blot* que muestra la inhibición de la expresión de RET en las líneas con CAV1 silenciada del modelo en A673. Este efecto no se observa en los modelos de TC252 y TC71. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

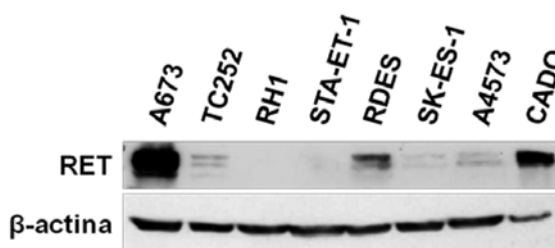


Figura 34. *Western blot* que muestra los diferentes niveles de expresión del receptor RET en diferentes líneas celulares de SE. Como control de carga se usó β-actina.

Por otro lado, también se detectó una menor fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) en ausencia de expresión de CAV1 (Fig. 35). En este caso la validación se realizó por *Western blot* (Fig. 36).

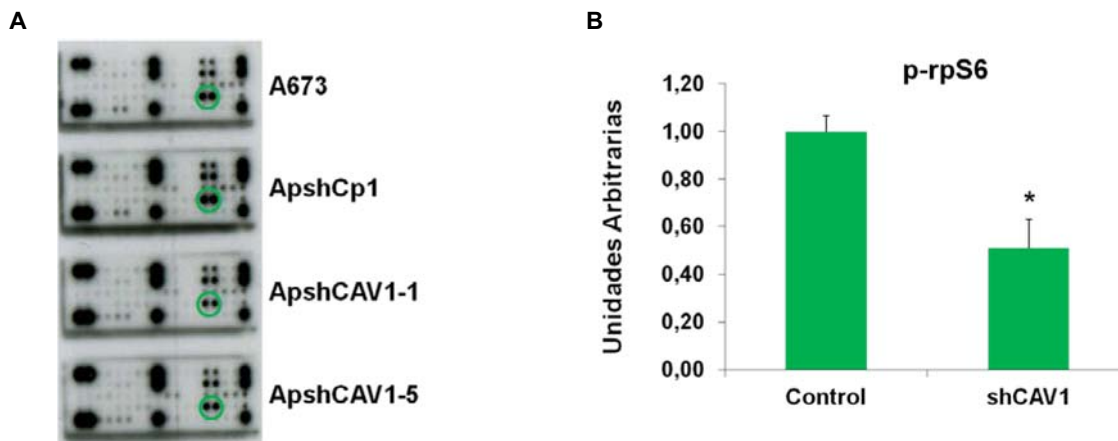


Figura 35. A. Array de anticuerpos realizado con el modelo de inhibición de CAV1 de A673. Los círculos verdes marcan los spots de p-rpS6. **B.** Cuantificación de los spots de p-rpS6 para los controles y las líneas con shARN anti-CAV1 (shCAV1). * $p < 0,001$

Este efecto se observó igualmente en el modelo de silenciamiento de CAV1 en TC252 (Fig. 36).

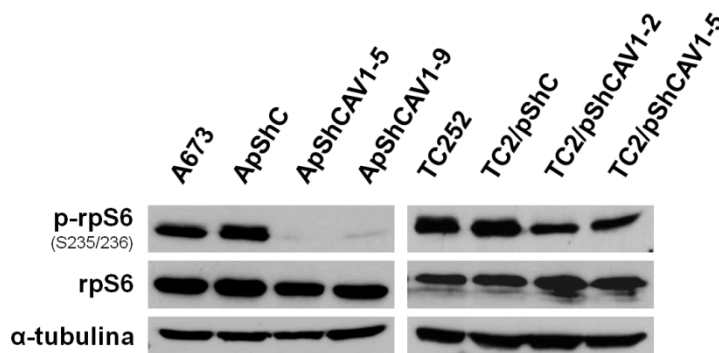


Figura 36. *Western blot* que muestra la inhibición de la fosforilación de rpS6 en las líneas con silenciamiento de CAV1 del modelo de A673 y TC252. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Además, todas las líneas celulares de SE comprobadas expresaban rpS6, aunque mostraban un mayor o menor grado de fosforilación (Fig. 37).

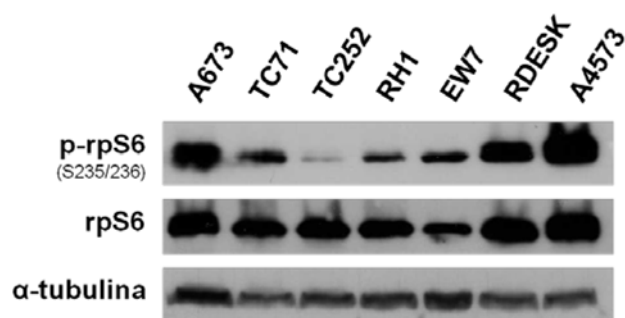


Figura 37. *Western blot* que muestra los diferentes niveles de expresión y fosforilación de rpS6 en diferentes líneas celulares de SE. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

La fosforilación de rpS6 está descrita como dependiente de mTOR, pero también se ha descrito la fosforilación de rpS6 por parte de la p90 ribosomal S6 kinasa-1 y 2 (RSK1 y 2) en la Ser235/236 en respuesta a la activación de la vía Ras/MAPK [Roux y cols., 2007]. RSK1 puede ser fosforilado por ERK1/2 en los residuos Thr359 y Ser363 [Romeo y cols., 2012]. Por este motivo se comprobó el estado de esta kinasa en nuestro modelo.

Las diferentes líneas celulares de SE analizadas mostraron expresión de RSK1 (Fig. 38).

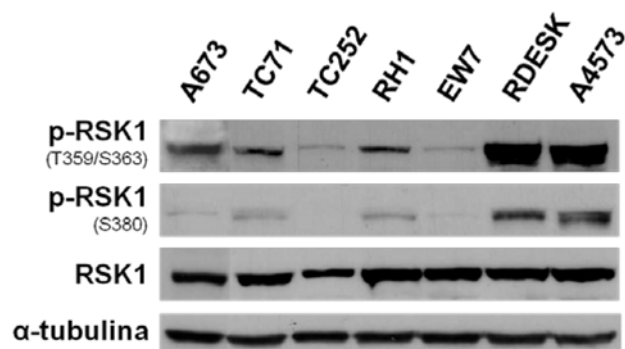


Figura 38. *Western blot* que muestra los diferentes niveles de expresión y fosforilación de RSK1 en diferentes líneas celulares de SE. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Además, las células con silenciamiento de CAV1 mostraron una menor fosforilación de RSK1 (Fig. 39), por lo que RSK1 podría ser la responsable de la fosforilación de rpS6 en nuestro modelo.

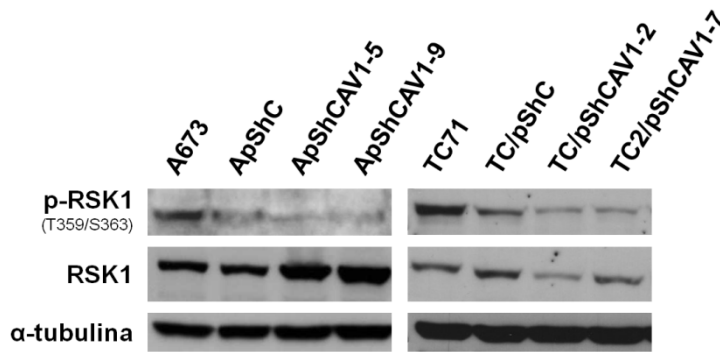


Figura 39. Western blot que muestra la inhibición de la fosforilación de RSK1 en las líneas con CAV1 silenciada del modelo A673 y TC71. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

4.3.1. El tratamiento con un inhibidor específico de la ruta MAPK recapitula parcialmente los efectos producidos por el silenciamiento de CAV1.

Con el objetivo de confirmar que la ruta de las MAPK era la responsable de los efectos que se observaron al inhibir la expresión de CAV1, se inhibió la activación de ERK1/2 mediante un inhibidor específico de MEK1/2, el U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno). Se trataron las líneas A673 y TC71 durante 24 y 48 horas y se comprobó el efecto en la hipotética ruta de activación de MMP-9, así como en la capacidad migratoria de las células. Mediante consulta bibliográfica [Lawlor y cols., 2002; Benini y cols., 2004; Yamamoto y cols., 2009] se decidió utilizar la dosis de 20 μ M para U0126.

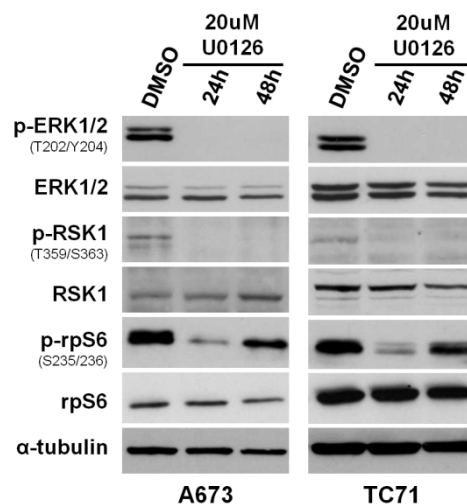


Figura 40. Western blot en el que se muestra la inhibición de la fosforilación de ERK1/2, RSK1 y rpS6 al tratar las líneas celulares A673 y TC71 con el inhibidor de MEK1/2, U0126, durante 24 y 48 horas. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Por *Western blot* se comprobó la inhibición de la activación de ERK1/2 tanto a 24 como a 48 horas. Asimismo, se observó la inhibición de la fosforilación de RSK1 y la consiguiente inhibición de rpS6 (Fig. 40).

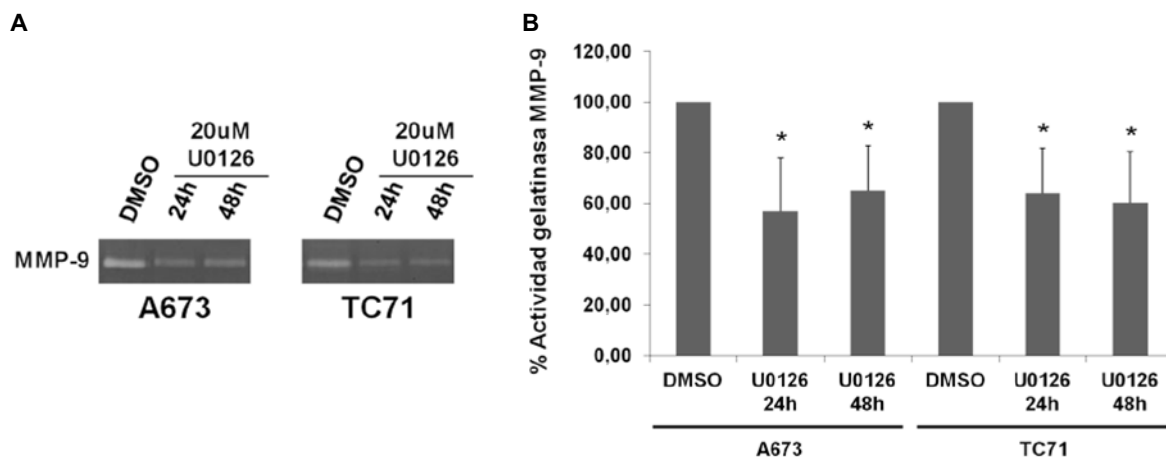


Figura 41 A. Zimograma de gelatina de medios condicionados de células A673 y TC71 tratadas con U0126 durante 24 y 48 horas que muestra la inhibición de la actividad de MMP-9. **B.** Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Tras el tratamiento se recogieron los medios condicionados para comprobar la actividad gelatinasa por zimograma de la MMP-9 secretada por las células. Se observó una inhibición comparable a la obtenida en las células con CAV1 silenciada (Fig. 41).

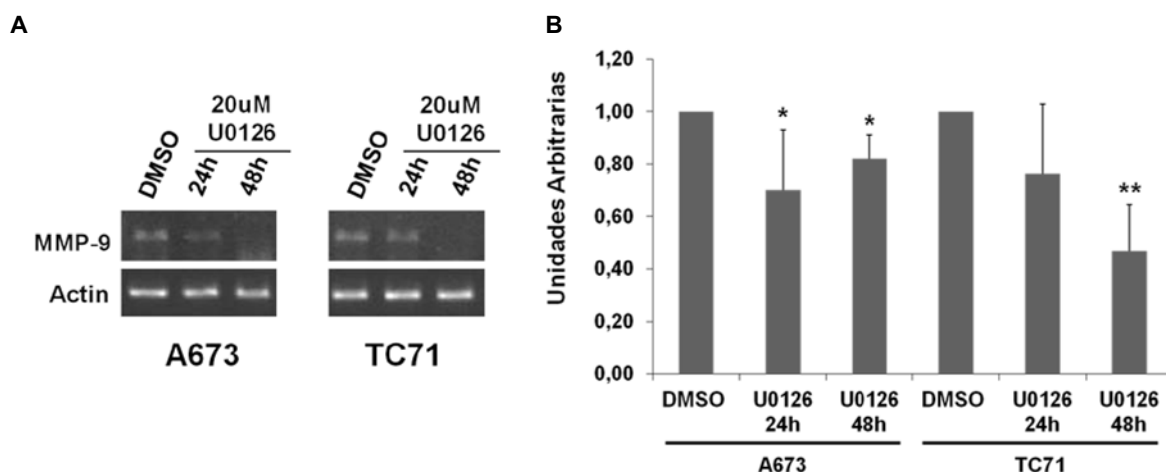


Figura 42 A. RT-PCR de extractos totales de células A673 y TC71 tratadas con U0126 durante 24 y 48 horas que muestra la inhibición de la actividad de MMP-9. Como control de carga se usó β -actina. **B.** Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

La inhibición de ERK1/2 también resultó en una inhibición transcripcional de MMP-9, como se pudo observar mediante RT-PCR (Fig. 42). Sin embargo, la inhibición fue menos pronunciada que en las células con CAV1 silenciada (10-40% frente al, aproximadamente, 80% obtenido con el silenciamiento de CAV1 en A673).

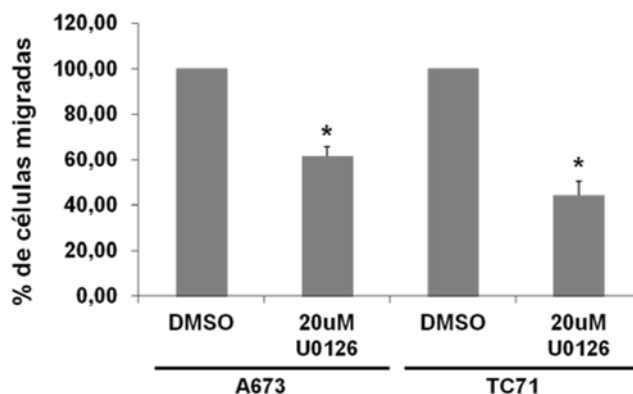


Figura 43. Cuantificación de dos experimentos independientes de migración en cámara de Boyden de células A673 y TC71 tratadas con U0126 durante 24 y 36 horas respectivamente. * $p < 0,01$

La capacidad migratoria fue comprobada mediante ensayo en cámara de Boyden durante 24 horas para A673 y 36 horas para TC71. Se observó una inhibición de un 50% de la migración (Fig. 43) lo que no recapituló completamente la reducción observada en las células con inhibición de CAV1.

Estos resultados sugerirían que la ruta $ERK1/2 \rightarrow RSK1 \rightarrow rpS6$ está implicada en la regulación de la capacidad migratoria y de la expresión de MMP-9 por parte de CAV1 en las líneas celulares de SE.

4.3.2. El tratamiento con un inhibidor específico de la familia de proteínas RSKs no reproduce los efectos producidos por el silenciamiento de CAV1.

Para comprobar el papel de las RSK en la regulación de MMP-9 por CAV1, realizamos una primera aproximación utilizando un inhibidor de las RSKs, el SL0101 [Kaempferol-3-O-(3",4"-di-O-acetil- α -L-rhamnopyranosido)]. Este compuesto interacciona con el dominio N-terminal kinasa de las RSKs inhibiendo su actividad en un modo reversible y competitivo con ATP.

Por *Western blot* de extractos de proteína totales de células de las líneas celulares A673 y TC71 tratadas durante 1 hora con SL0101, no se detectaron cambios en la fosforilación de rpS6 (Fig. 44).

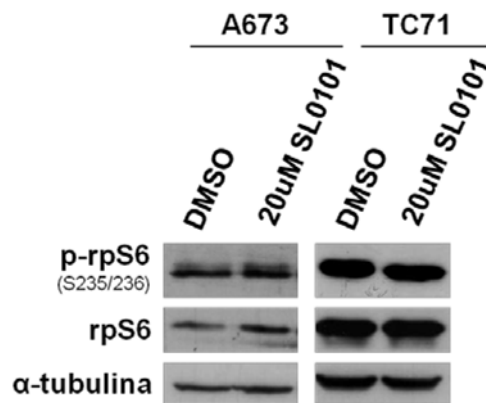


Figura 44. Western blot para rpS6 y su fosforilación en células de las líneas A672 y TC71 tratadas durante 1 hora con el inhibidor de RSK SL0101 (20µM). Como control de carga se utilizó α-tubulina.

Por RT-PCR de extractos totales de células tratadas durante 6 horas con 20µM SL0101 tampoco se detectaron cambios significativos en la expresión de *MMP-9* (Fig. 45).

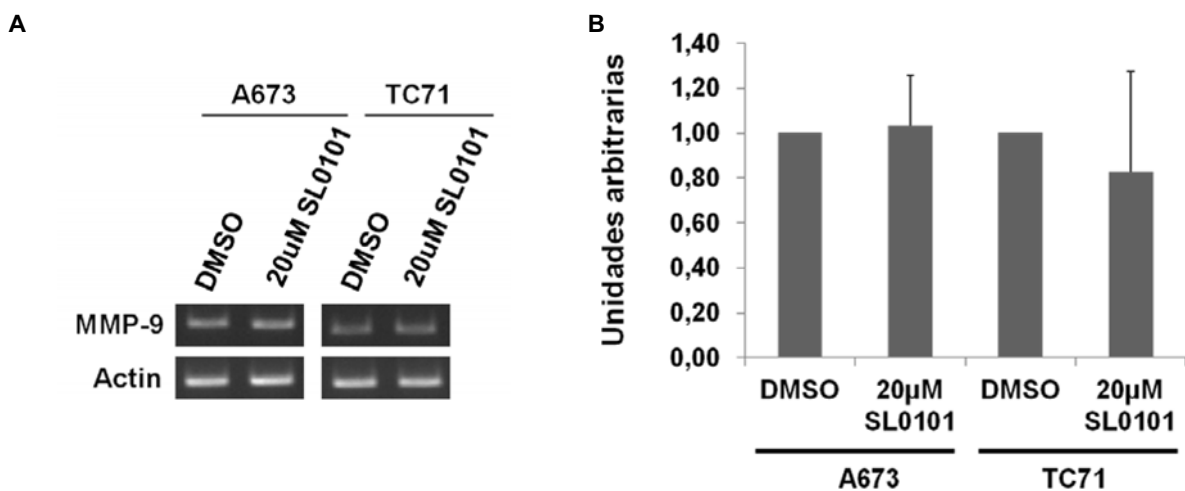


Figura 45 A. RT-PCR y **B.** cuantificación de tres experimentos independientes, que muestra los niveles de ARNm de *MMP-9* al tratar durante 6 horas las líneas A672 y TC71 con el inhibidor de RSK SL0101. Como control de carga se usó β-actina.

Asimismo, al realizar los ensayos de migración en cámara de Boyden tampoco se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas y las tratadas con el vehículo (DMSO) (Fig. 46).

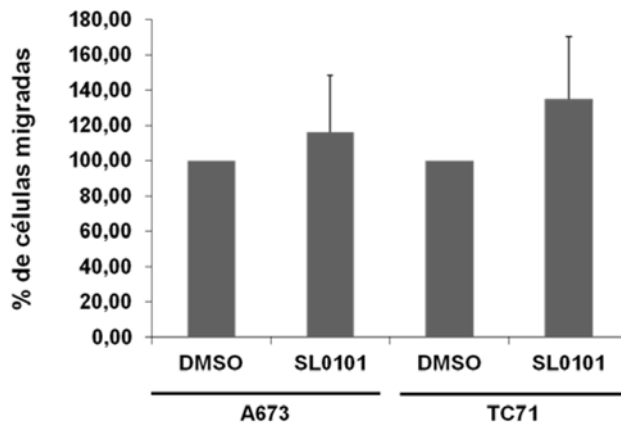


Figura 46. Cuantificación de tres experimentos independientes de migración en cámara de Boyden de células A673 y TC71 tratadas con SL0101 durante 24 y 48 horas respectivamente.

4.3.3. La inhibición de la expresión de RSK1 afecta a la capacidad migratoria pero no a la expresión de MMP-9 en células de sarcoma de Ewing.

El hecho de que el inhibidor SL0101 inhiba todas las isoformas de RSK y que estas proteínas puedan tener funciones solapantes, hacen indispensable un estudio más específico que permita averiguar el papel concreto de RSK1 en la regulación de MMP-9 ejercida por CAV1 en SE. Para ello, se estableció un modelo de inhibición de RSK1 por shARN en la línea celular A673.

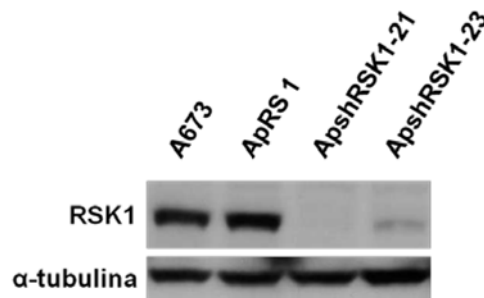


Figura 47. *Western blot* en el que se muestra la inhibición de la expresión de RSK1 y en los clones seleccionados tras la transfección con el shARN anti-RSK1. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Se realizó una transfección estable con un vector pRS-shARN anti-RSK1 y con el vector vacío pRS en la línea A673. Tras la selección con el antibiótico pertinente, se escogieron el clon ApRS 1 como control y los clones ApshRSK1 21 y 23 con silenciamiento de RSK1 (Fig. 47).

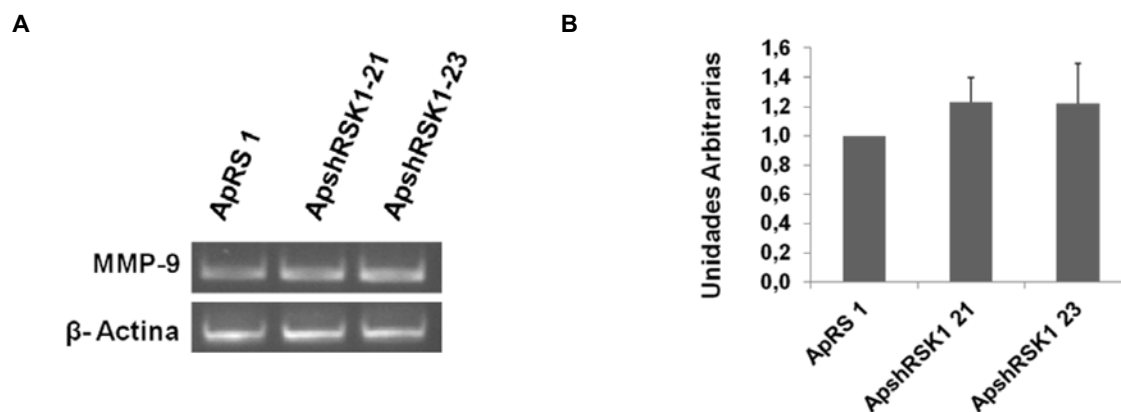


Figura 48 A. RT-PCR de extractos totales del modelo de silenciamiento de RSK1. Como control de carga se usó β -actina. **B.** Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes.

Al comprobar por PCR semi-cuantitativa los niveles de expresión de ARNm de MMP-9, no se encontraron diferencias significativas entre el control y las células con RSK1 silenciada (Fig. 48).

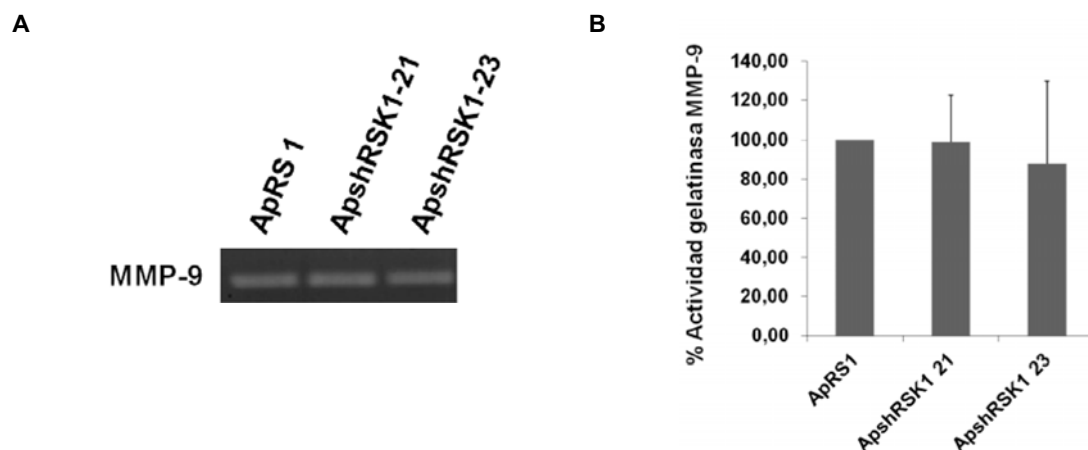


Figura 49 A. Zimograma de gelatina de medios condicionados de células del modelo con RSK1 silenciada. **B.** Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Mediante zimograma de gelatina comprobamos la actividad de la MMP-9. Tampoco se observó variación en las células con silenciamiento de RSK1 (Fig. 49), por lo que no se reproducía el efecto obtenido con las células con CAV1 silenciada.

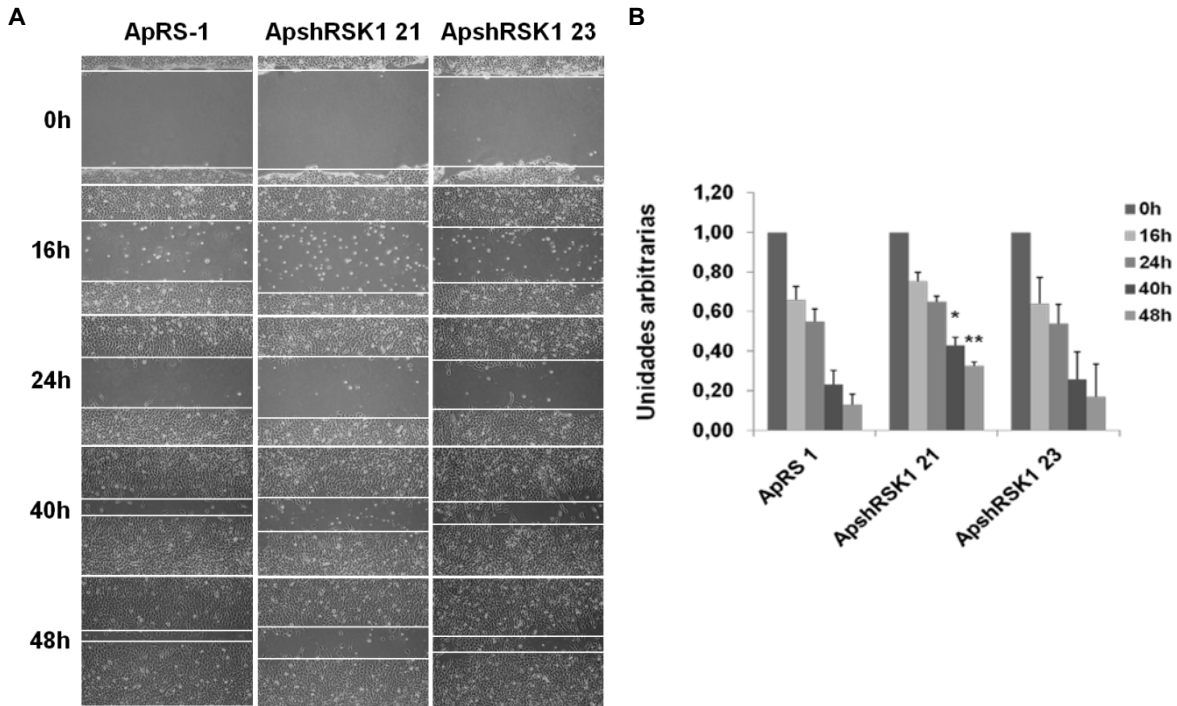


Figura 50 A. Microfotografías a diferentes horas tras la realización de una herida en una monocapa de células del modelo de silenciamiento de RSK1 (100X). **B.** Cuantificación del cierre de la herida de tres experimentos. Se normalizó la anchura de la herida a cada tiempo con la anchura de la herida a tiempo 0h. Unidades arbitrarias. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

La capacidad migratoria se redujo de forma significativa en los clones con silenciamiento de RSK1 respecto al control, tanto en el ensayo de la huella (solo uno de los clones con diferencia significativa) (Fig. 50), como en el ensayo de migración en cámara de Boyden (Fig. 51).

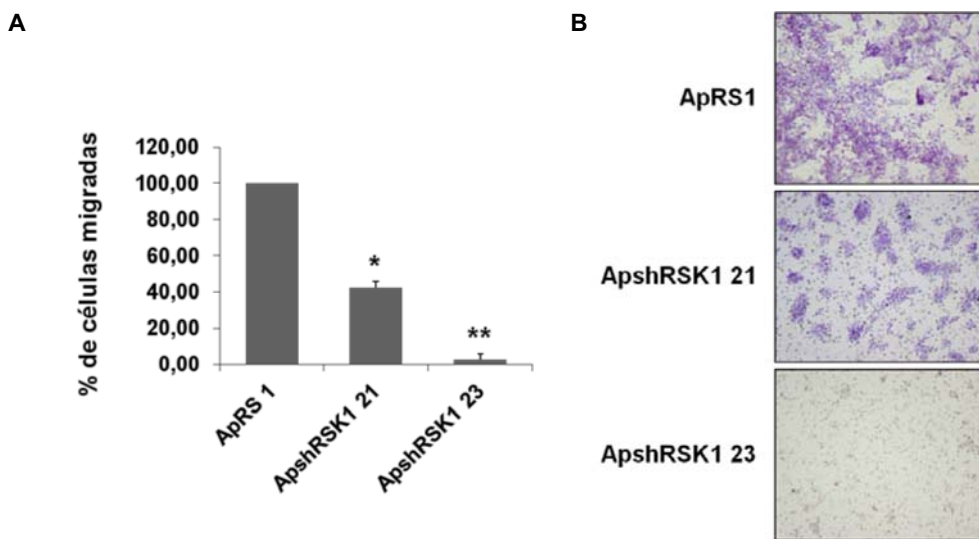


Figura 51 A. Cuantificación de tres experimentos independientes de migración en cámara de Boyden del modelo de silenciamiento de RSK1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ **B.** Microfotografías (100x) mostrando las diferencias de migración entre las células indicadas.

Como se observa en la figura 52, la inhibición de RSK1 no tuvo ningún efecto sobre la fosforilación de ERK1/2, pero tampoco en la fosforilación de rpS6.

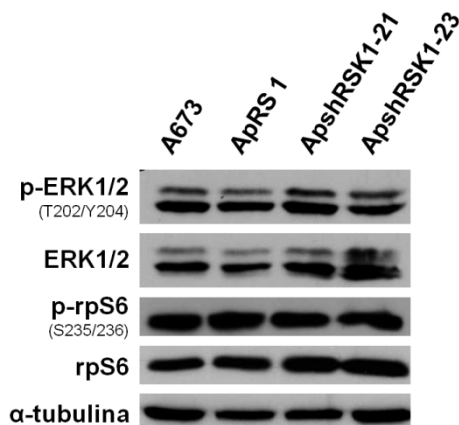


Figura 52. Western blot del modelo de silenciamiento de RSK1 para ERK1/2, rpS6 y sus respectivas fosforilaciones. No se observan cambios significativos. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

Con el fin de comprobar el efecto de la pérdida de expresión de RSK1 en la capacidad metastásica de las células de SE, llevamos a cabo un procedimiento *in vivo* de metástasis experimental con el modelo de silenciamiento de RSK1. Para ello inyectamos dos millones de células de cada línea del modelo por vía intravenosa en la cola de ratones hembra inmunodeprimidos BALB/c ^{nu/nu} de 7 semanas de edad. Se procedió a la eutanasia de los animales que mostraron signos de morbilidad y, cuarenta y dos días tras la inyección, se sacrificó al resto de animales. No hubo diferencias significativas de supervivencia entre los ratones inyectados con las células control (ApRS1) y los inyectados con las células con RSK1 silenciada (ApshRSK1 21 y ApshRSK1 23) (Fig. 53).

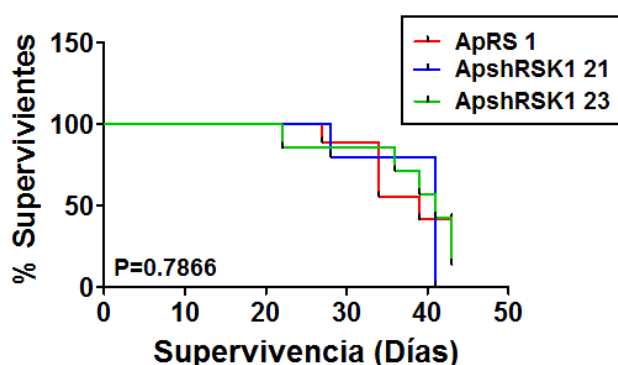


Figura 53. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones *nude* con tumores iniciados por inyección intravenosa de células del modelo de inhibición de RSK1 por shARN de A673.

Al realizar la necropsia se comprobó que todas las líneas celulares inoculadas habían colonizado los pulmones, por lo que se extrajeron, se fijaron y se analizaron macroscópicamente antes de embeberlos en parafina para su posterior análisis por inmunohistoquímica. Al realizar un conteo macroscópico, no se encontraron diferencias significativas entre el número de metástasis pulmonares obtenidas con las células control y las obtenidas con las células con el shARN anti-RSK1 (Fig. 54)

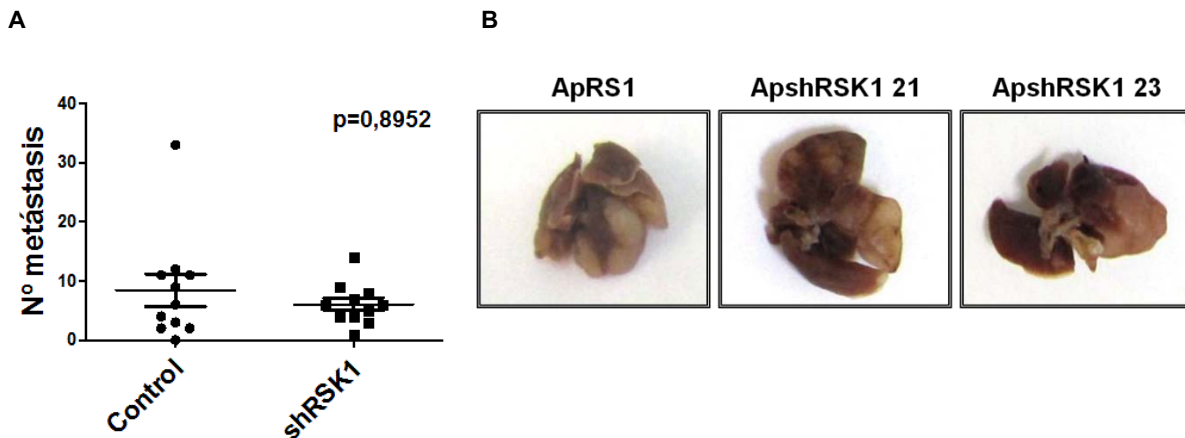


Figura 54. A. Cuantificación de metástasis pulmonares en los ratones inyectados con las células control (ApRS 1) en comparación con los inyectados con las células shRSK1 (ApShRSK1-21 y ApShRSK1-23). **B.** Imágenes representativas de los pulmones extraídos de los ratones inyectados con el modelo.

Con la tinción con hematoxilina y eosina de cortes de parafina de los pulmones extraídos comprobamos que el número y tamaño de las metástasis tampoco mostraban diferencias significativas (Fig. 55A). Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico mostró que todas las metástasis producidas por las diferentes líneas celulares expresaban RSK1 (Fig. 55B).

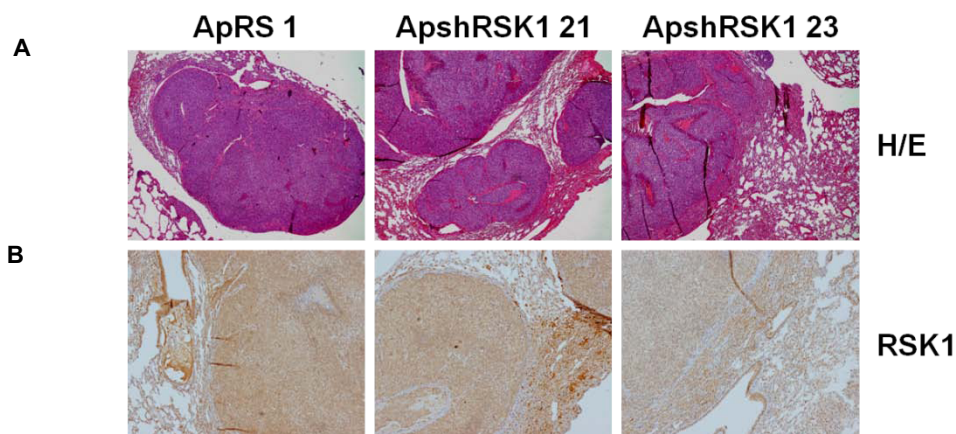


Figura 55 A. Tinción de hematoxilina-eosina de pulmones fijados en parafina (40×). **B.** Tinción de RSK1 en secciones de metástasis pulmonares de ratones inyectados con células control (ApRS 1) o células ApshRSK1 (ApshRSK1 21 y ApshRSK1 23) (100×).

4.3.4. El silenciamiento específico de RSK2 produce un aumento en la migración celular y en la actividad de MMP-9.

Entre los miembros de la familia de las RSKs, RSK2 también ha sido relacionado con los procesos de migración, invasión y metástasis en diferentes tipos tumorales [Doehn y cols., 2009, Kang y cols., 2010] Además, también puede ser regulado por la vía de las ERK1/2 [Romeo y cols., 2012]. Por este motivo, se comprobó el papel de esta proteína en nuestro modelo.

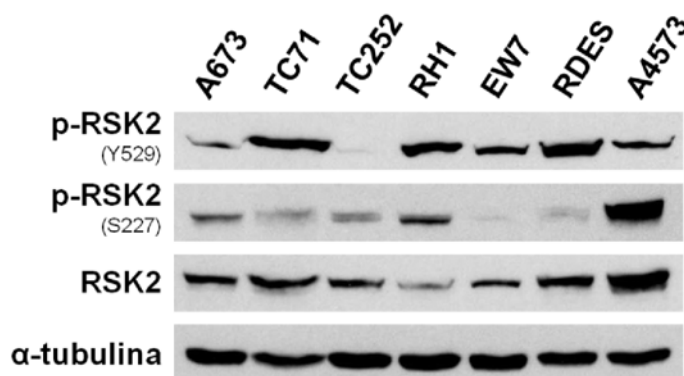


Figura 56. Western blot de diferentes líneas celulares de SE para RSK2 y dos de sus fosforilaciones importantes para su activación. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Las líneas de SE analizadas mostraron diferentes niveles de expresión de RSK2, así como diferentes grados de fosforilación (Fig. 56). También se encontró una disminución en la fosforilación de RSK2 en las líneas de baja expresión de CAV1 del modelo de A673 (Fig. 57).

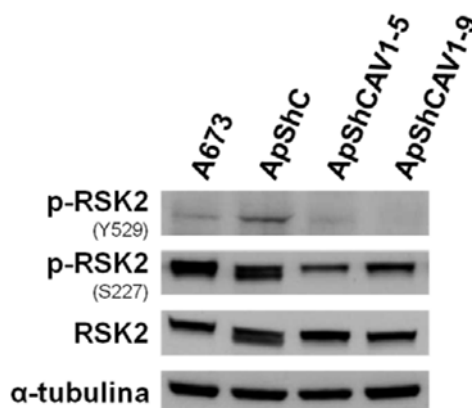


Figura 57. Western blot que muestra la inhibición de la fosforilación de RSK2 en las líneas con silenciamiento de CAV1. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Una vez que se comprobó que el shARN de RSK1 no afectaba a la expresión de RSK2 (Fig. 58), se procedió al establecimiento de un modelo de inhibición de expresión de RSK2 mediante shARN en la línea celular A673 (Fig. 59). Paralelamente se realizó la transfección de este mismo shARN en una de las líneas de baja expresión de RSK1 para obtener el silenciamiento de ambas proteínas (Fig. 59).

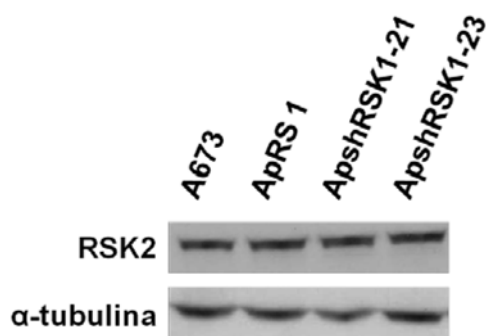


Figura 58. *Western blot* del modelo de silenciamiento de RSK1 para RSK2. No se observan diferencias significativas entre los diferentes clones. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

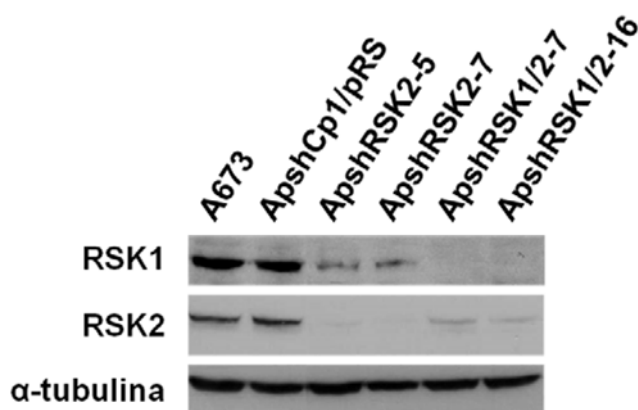


Figura 59. *Western blot* que muestra la inhibición de la expresión de RSK1 y RSK2 en los clones escogidos de las transfecciones con el shARN anti-RSK2 (ApshRSK2-5 y ApshRSK2-7) y con los shARN anti-RSK1 y anti-RSK2 (ApshRSK1/2-7 y ApshRSK1/2-16), respecto a la línea parental(A673) y al control transfectado con los dos vectores vacíos (ApCp1/pRS). Como control de carga se utilizó α-tubulina.

Una vez se obtuvieron los clones de baja expresión de RSK2 y de RSK1/2, se comprobó la expresión (Fig. 60) y la actividad (Fig. 61) de la MMP-9.

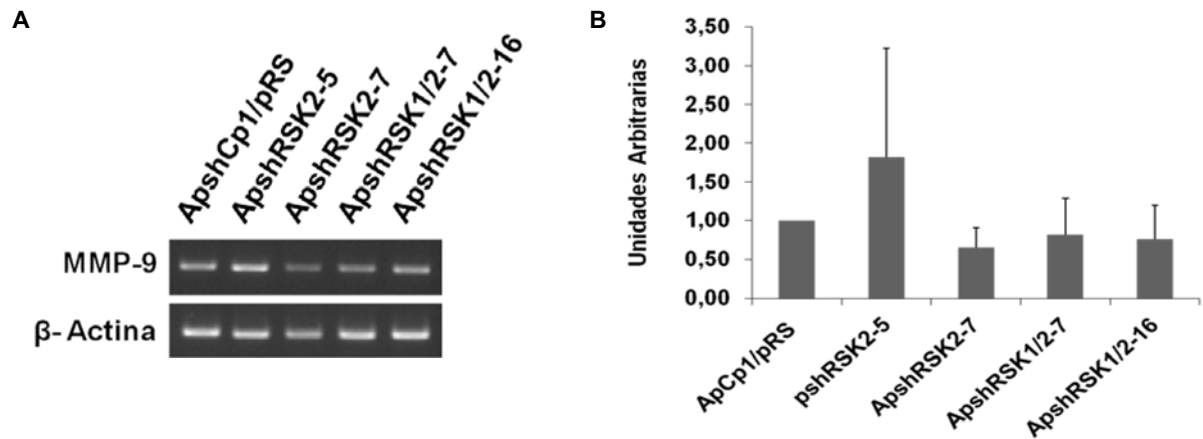


Figura 60 A. RT-PCR de extractos totales de los modelos de silenciamiento de RSK2 y RSK1/2. Como control de carga se utilizó β-actina. B. Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes.

Como se puede observar en la figura 60, el ARNm de MMP-9 no varió significativamente. En la línea ApshRSK2-5 parece haber una tendencia a aumentar, pero este resultado no es concluyente, ya que la otra línea con inhibición de RSK2 no muestra esta tendencia (Fig. 60).

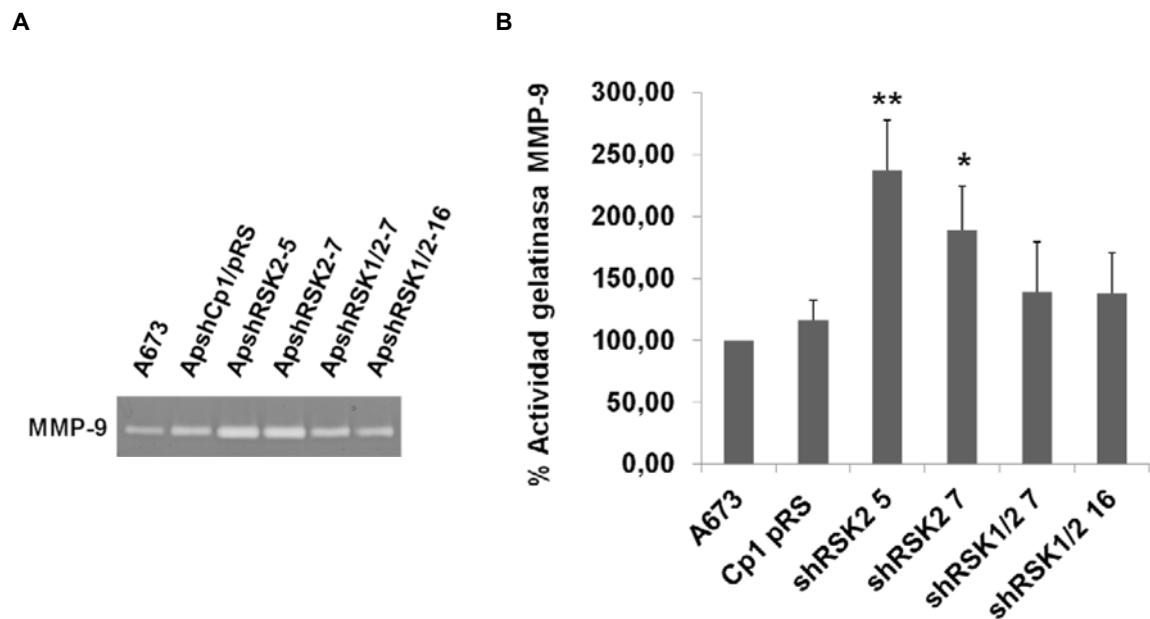


Figura 61 A. Zimograma de gelatina de medios condicionados de células del modelo con silenciamiento de RSK2 y del doble silenciamiento. B. Cuantificación correspondiente a tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

La inhibición de RSK2 resultó en un aumento de la actividad gelatinasa de MMP-9, sin embargo en las líneas celulares con doble inhibición de RSK1 y RSK2 este efecto pareció revertirse (Fig. 61).

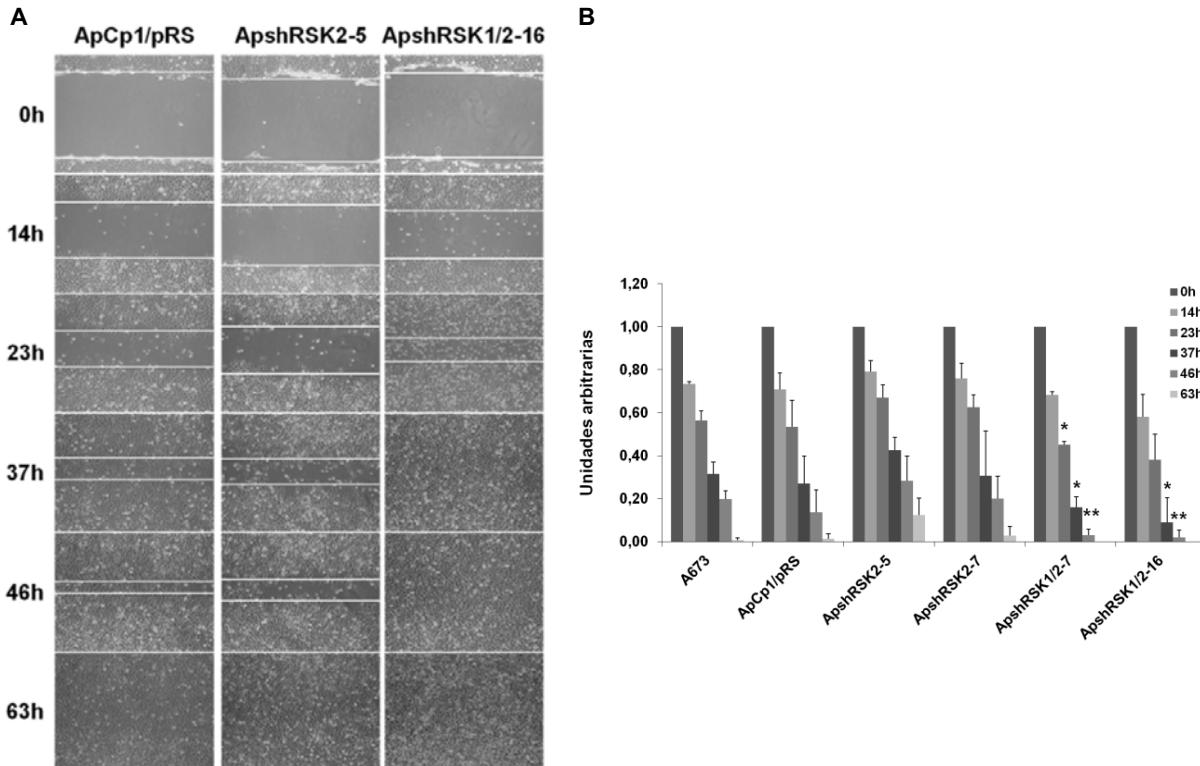


Figura 62 A. Microfotografías a diferentes horas tras la realización de una herida en una monocapa de las líneas indicadas del modelo de silenciamiento de RSK2 y RSK1/2 (100x). **B.** Cuantificación del cierre de la herida de tres experimentos independientes. Se normalizó la anchura de la herida a cada tiempo con la anchura de la herida a tiempo 0h. Unidades arbitrarias. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Al llevar a cabo los experimentos de migración se observó un aumento muy significativo en la capacidad migratoria de las líneas con doble silenciamiento de RSK1 y RSK2 (Fig. 62 y Fig. 63). En el ensayo de migración en cámara de Boyden también se observó una disminución en la migración de las células ApshRSK2-5, sin embargo, el clon ApshRSK2-7 no se comportó del mismo modo (Fig. 63).

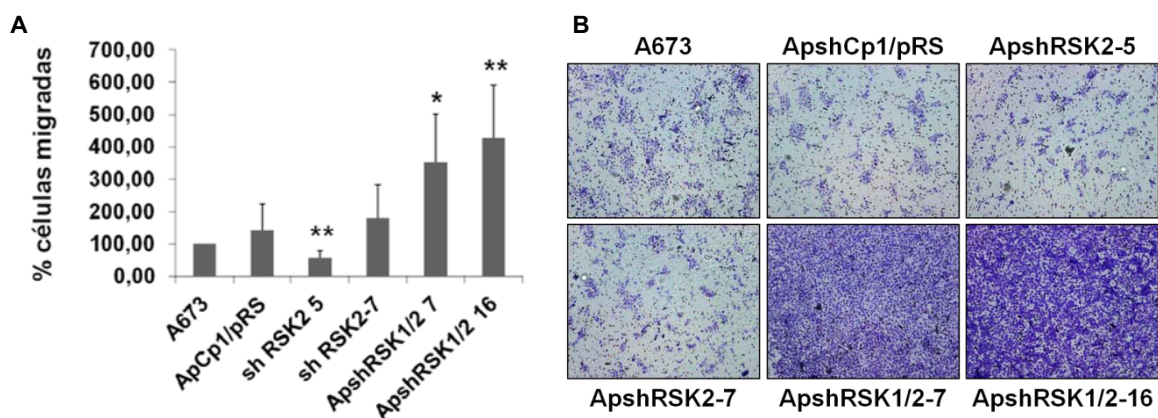


Figura 63 A. Cuantificación de tres experimentos independientes de migración en cámara de Boyden del modelo de silenciamiento de RSK2 y RSK1/2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ **B.** Microfotografías (100x) mostrando las diferencias de migración entre las células indicadas.

Al contrario de lo que ocurría con el silenciamiento de RSK1, el de RSK2, solo o en el modelo de doble silenciamiento, sí conllevaba una reducción en la fosforilación de rpS6, como se observa en la figura 64. Asimismo, se observó un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en los clones con silenciamiento de RSK2 (Fig. 64).

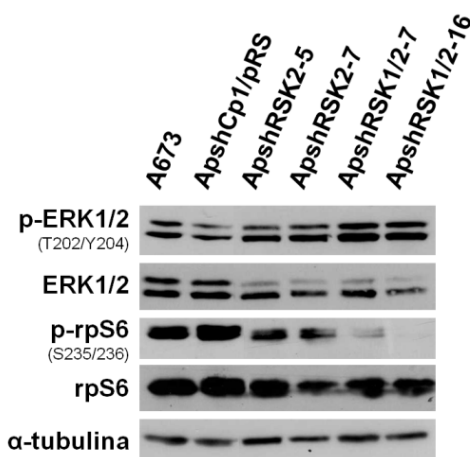


Figura 64. Western blot que muestra la disminución de la fosforilación de rpS6 y un aumento en la activación de ERK1/2 en los clones con RSK2 silenciado. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

4.3.5. Posibles factores de transcripción implicados en la regulación de MMP-9 por CAV1.

Con el objetivo de averiguar el factor o factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de MMP-9 por parte de CAV1 se examinó el estado, en el modelo de CAV1 silenciada, de diferentes factores de los que se sabe están implicados en la regulación del promotor del gen *MMP-9*. El estudio se centró en aquellos factores de transcripción que habían sido relacionados con la vía de las MAPKs.

El promotor de *MMP-9* presenta un lugar de unión a NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [Fanjul-Fernández y cols., 2010], factor de transcripción que puede ser activado por diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de Ras/MEK/ERK [Dhawan y Richmond, 2002; Liu y Wilson, 2012]. Para su actividad como factor de transcripción es necesaria su translocación al núcleo, que puede ser inducida por TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) [Moon y cols., 2004]. Se detectó la translocación de NF- κ B al núcleo mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la subunidad p65, en el modelo de silenciamiento de CAV1 en A673 tras una exposición a 20 ng/ml de TNF α de 30 minutos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los clones de baja expresión de CAV1 y sus respectivos controles (Fig. 65).

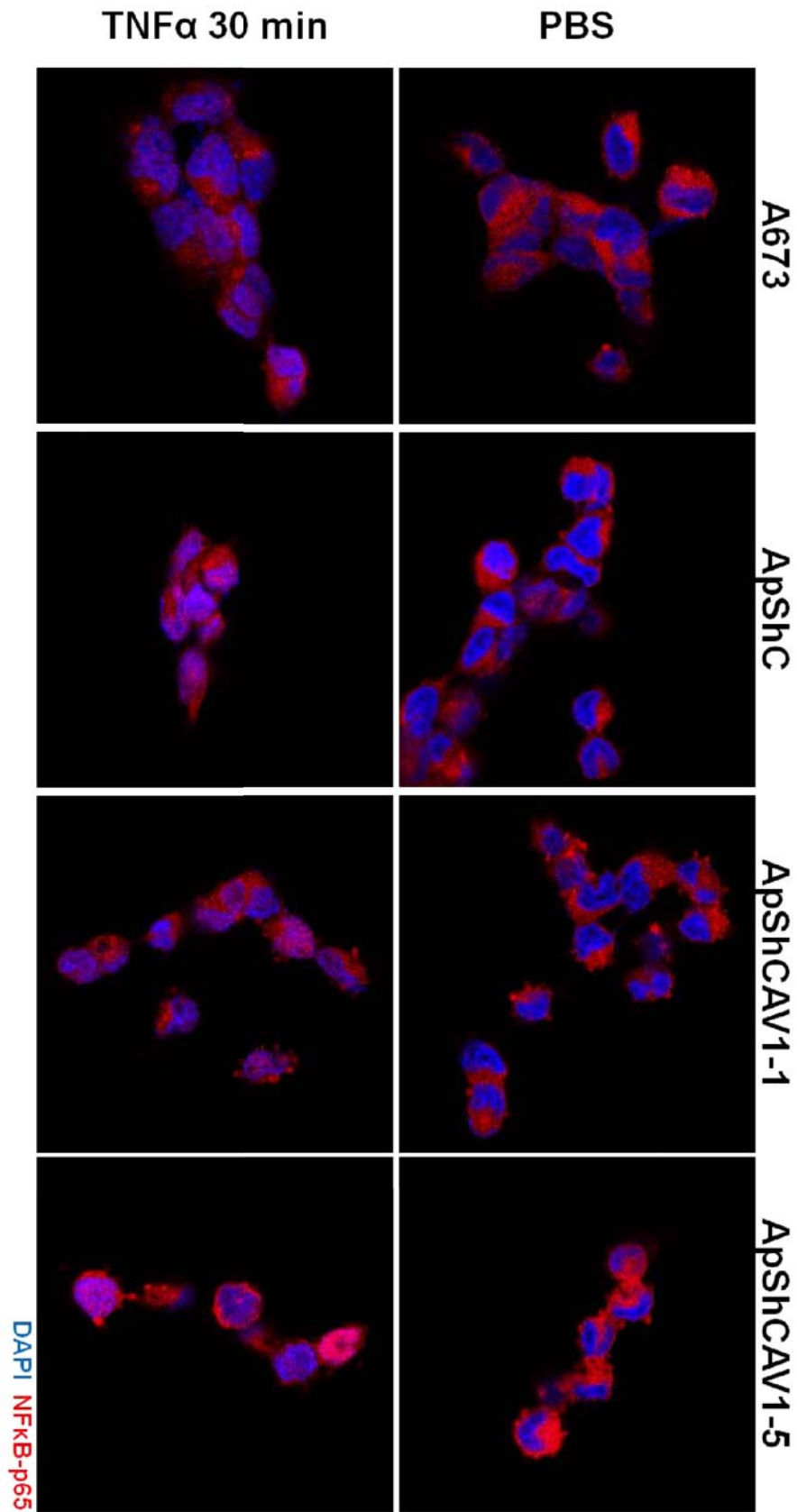


Figura 65. Inmunofluorescencia de la subunidad p65 de NF-κB en células tratadas durante 30 minutos con 20 ng/ml de TNFα. En todas las líneas se observa translocación al núcleo (630x).

Otros factores de transcripción implicados en la regulación de MMP-9 son los pertenecientes a la familia c-Fos, de los cuales se analizó el factor FRA1 (*Fos-related antigen 1*). En el modelo de silenciamiento de CAV1 de A673 la fosforilación de este factor se reduce en los clones silenciados (Fig. 66).

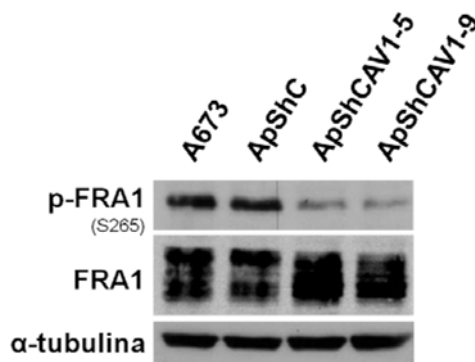


Figura 66. *Western blot* que muestra la disminución de la fosforilación de FRA1 en las líneas con inhibición de CAV1 del modelo A673. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Este resultado sugeriría que FRA1 es el factor de transcripción implicado en la regulación de MMP-9 por parte de CAV1 en nuestro modelo. Sin embargo, en los otros dos modelos de silenciamiento, TC71 y TC252, FRA1 se hallaba infra-expresada por *Western blot* (Fig. 67).

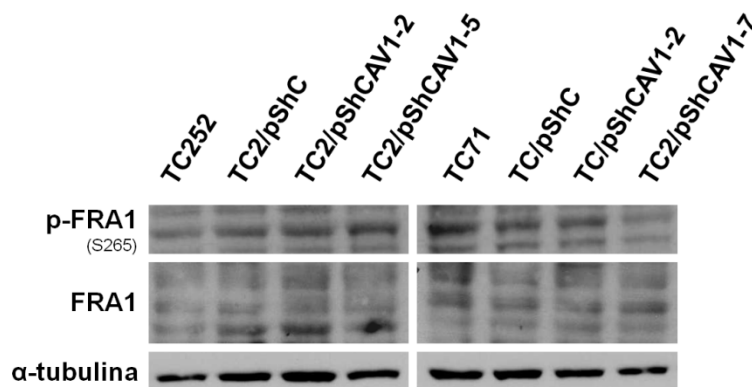


Figura 67. *Western blot* para FRA1 y su fosforilación en los modelos de inhibición de CAV1 en TC252 y TC71. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

Por otro lado, al analizar la expresión de FRA1 en las diferentes líneas celulares de SE disponibles en el laboratorio, se comprobó que su expresión en A673 era mucho más elevada que en el resto de líneas (Fig. 68).

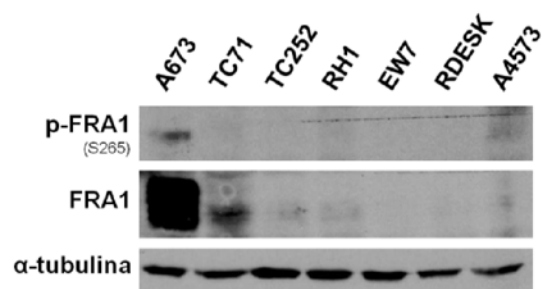


Figura 68. *Western blot* de diferentes líneas celulares de SE para FRA1. Como control de carga se utilizó α -tubulina.

4.4. Implicación de la Tyr14 de CAV1 en la regulación de la capacidad migratoria e invasiva de las células de sarcoma de Ewing.

La fosforilación de CAV1 en la Tyr14 genera un lugar de unión a proteínas con dominio SH2, implicadas en la estimulación de la proliferación celular, y está relacionada con la regulación de la dinámica de las adhesiones focales, proceso muy importante para la migración celular [Joshi y cols., 2008]. Por este motivo, se analizó cuáles de los efectos sobre la capacidad metastásica que se observaron al inhibir la expresión de CAV1 eran dependientes de esta fosforilación. Para ello se utilizó el mutante no fosforilable en la Tyr14, CAV1-Y14F. Esta forma mutante fue producida por mutagénesis dirigida sobre el plásmido pCDNA-CAV1, mutando el codon TAC a TTC, por lo que se muta la Tyr14 por el aminoácido no fosforilable fenilalanina (Fig. 69).

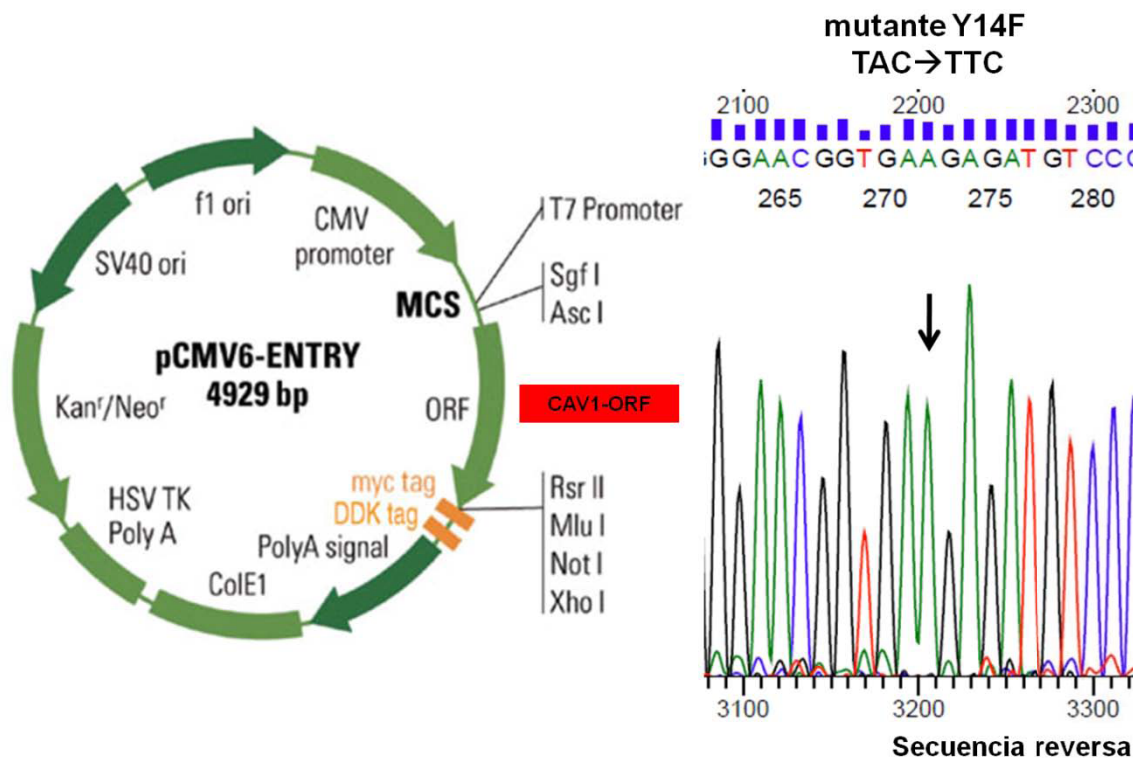


Figura 69. Representación esquemática del plásmido con la secuencia de CAV1-ORF (*open reading frame*) sobre la que se realizó la mutagénesis dirigida para producir el mutante CAV1-Y14F, cuya secuencia se muestra en el panel de la derecha. La flecha indica la mutación.

La línea A673 se transfectó con este plásmido, obteniendo tres clones en los que detectamos mayor presencia de CAV1 exógena mutante (clones 1, 10 y 16) (Fig. 70).

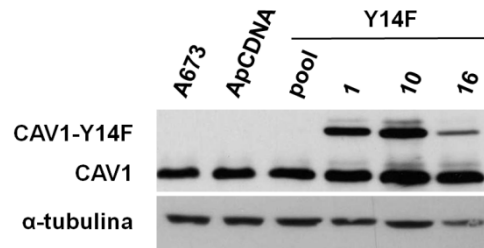


Figura 70. Western blot que muestra los clones de mayor expresión de CAV1-Y14F tras la transfección de A673 (A67-Y14F-1, A67-Y14F-10 y A67-Y14F-16). Se muestra también la CAV1 endógena. Como control de carga se utilizó α-tubulina.

Al realizar el experimento de migración *in vitro* mediante cámara de Boyden se observó una reducción en la capacidad migratoria en las células con expresión de CAV1-Y14F (aproximadamente 60% de inhibición), aunque menor que la obtenida en el modelo de baja expresión de CAV1 (aproximadamente 80% de inhibición) (Fig. 71).

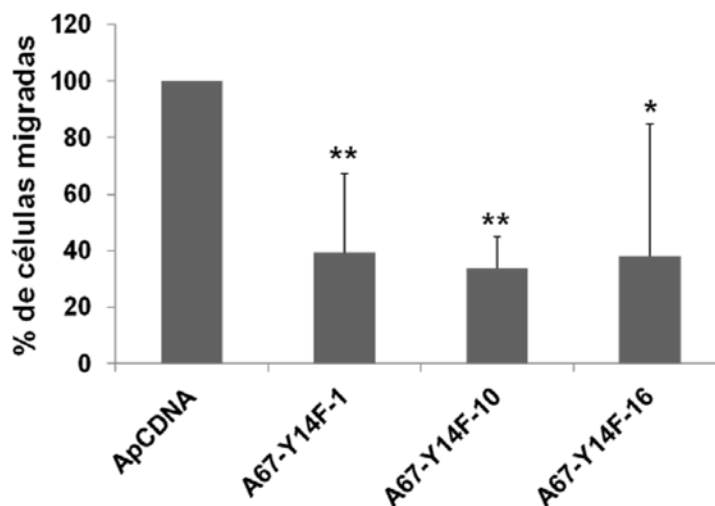


Figura 71. Cuantificación de tres experimentos independientes de migración en cámara de Boyden del modelo A673 con expresión de CAV1-Y14F. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas en la fosforilación de ERK1/2, RSK1 ni rpS6 (Fig. 72A); tampoco en la actividad de MMP-9 por zimografía (Fig. 72B) ni reducción de la expresión de MMP-9 a nivel transcripcional por RT-PCR (Fig. 72C). Asimismo no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la MMP-2 (Fig. 72B). Todo esto sugeriría que esta Tyr está implicada en la regulación de la migración celular, pero no es esencial en el proceso de degradación de la matriz.

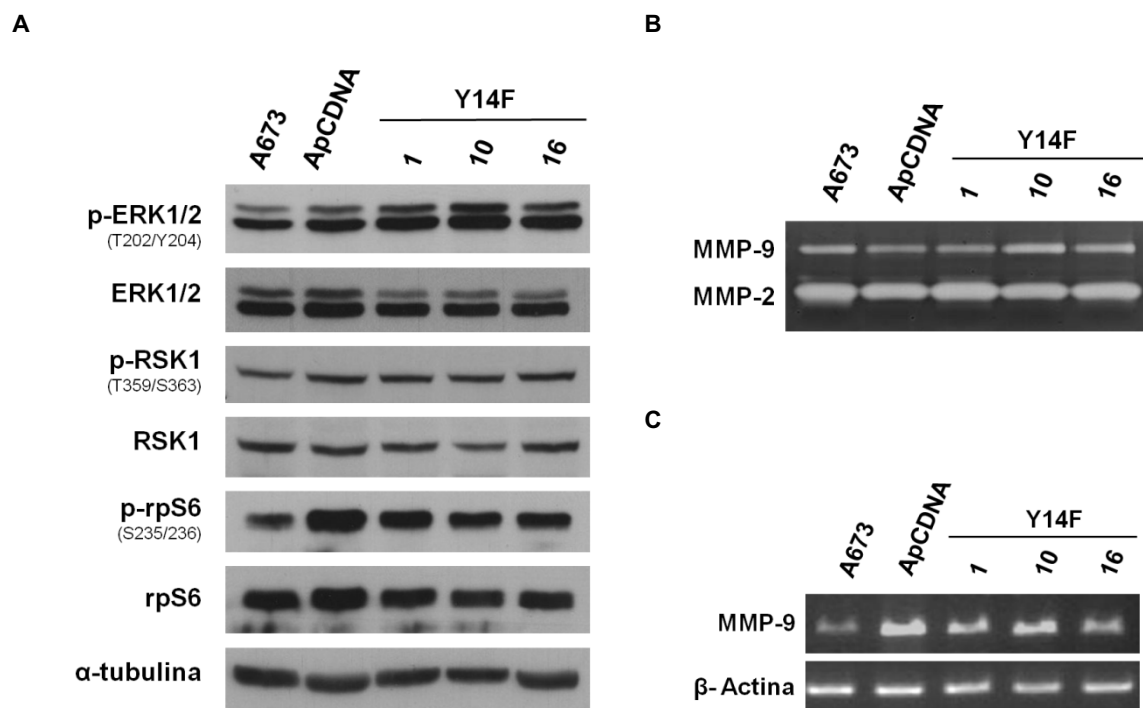


Figura 72 A. Western blot del modelo de expresión de CAV1-Y14F para ERK1/2 y rpS6 y sus respectivas fosforilaciones. No se observan cambios significativos. Como control de carga se utilizó α -tubulina. **B.** Zimograma de gelatina de medios condicionados y **C.** RT-PCR de extractos totales para MMP-9 del modelo de expresión de CAV1-Y14F. Como control de carga se utilizó β -actina.

4.5. Genes de virulencia metastásica: SPARC

Se ha descrito que la especificidad de tejido de las metástasis en diferentes tipos tumorales puede deberse a la expresión de una serie de genes de virulencia metastásica en las células del tumor primario [Nguyen y cols., 2009]. No existen datos relativos a esta clase de genes para SE, sin embargo, se ha descrito a SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) como uno de estos genes determinante de la metástasis pulmonar en cáncer de mama [Minn y cols., 2005]. Ya que el tejido pulmonar es un lugar de preferencia para las metástasis en SE, cabía la posibilidad que tuviera un papel en este proceso y su actividad estuviera regulada por CAV1.

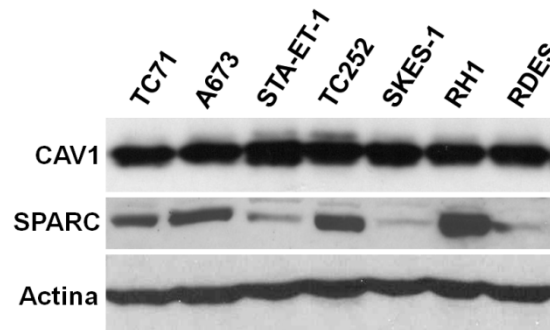


Figura 73. *Western blot* que muestra la expresión de SPARC en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing que sobre-expresan CAV1. Como control de carga se usó β -actina.

Por *Western blot* se comprobaron los diferentes niveles de expresión de SPARC en las diferentes líneas celulares de SE analizadas (Fig. 73). Al analizar sus niveles de expresión por RT-PCR y *Western blot*, se observó que se producía una disminución de la cantidad tanto de proteína (Fig. 74A) como de ARN (Fig. 74B) de SPARC en los clones con baja expresión de CAV1.

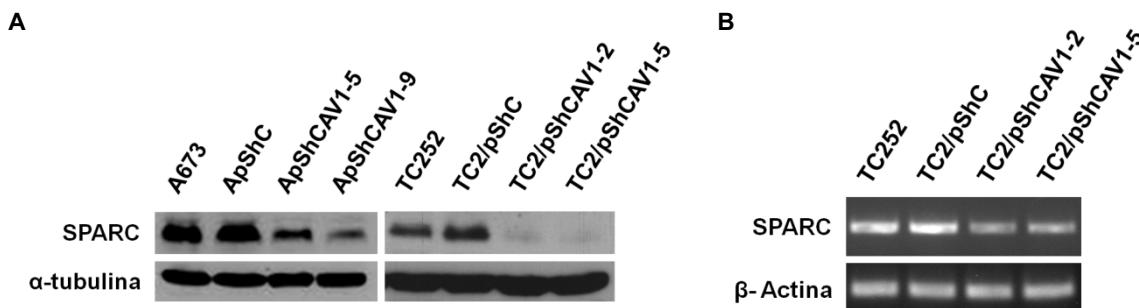


Figura 74 A. *Western blot* del modelo de silenciamiento de CAV1 en A673 y TC252 que muestra la inhibición SPARC en las líneas con CAV1 silenciada. Como control de carga se utilizó α -tubulina. **B.** RT-PCR del modelo de silenciamiento de CAV1 en TC252 que muestra la inhibición de la expresión de ARNm de SPARC. Como control de carga se utilizó β -actina.

Estos resultados corroborarían la relación entre ambas proteínas, por lo que se procedió a estudiar si esta inhibición de SPARC estaba implicada en los efectos de la pérdida de CAV1 sobre la capacidad migratoria, invasiva y metastásica de las células de SE. Para ello se estableció un modelo de silenciamiento de SPARC por transfección estable de shARN en la línea celular A673 (Fig. 75), sin afectar a la expresión de CAV1 (Fig. 76). Los clones 3 y 8 presentaron una mayor inhibición por lo que se usaron para los siguientes experimentos.

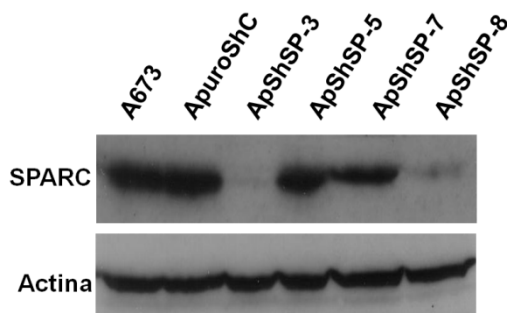


Figura 75. Western blot con los clones obtenidos al inhibir con shARN la expresión de SPARC. Como control de carga se usó β -actina.

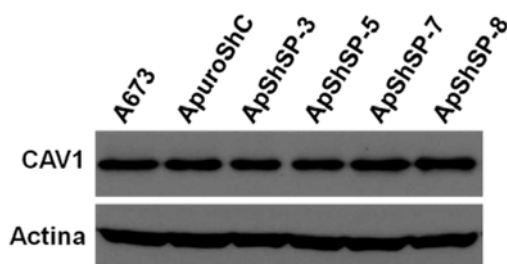


Figura 76. Western blot para CAV1 en clones obtenidos al inhibir con shARN la expresión de SPARC. Como control de carga se usó β -actina.

Para analizar el efecto de la pérdida de expresión de SPARC en la migración, invasión y metástasis de las células SE se repitieron los experimentos realizados con el modelo de silenciamiento de CAV1. Al realizar los experimentos de la herida (Fig. 77A) y de migración en cámara de Boyden (Fig. 77B), se observó una menor capacidad migratoria en los clones de baja expresión de SPARC en comparación con sus controles. El mismo efecto se observó en los experimentos de invasión *in vitro* (Fig. 78), sin embargo, el efecto fue menor que el obtenido con los clones con inhibición de CAV1 ya que en el modelo de silenciamiento de CAV1 se reducía casi un 90% la capacidad invasiva, mientras que con el silenciamiento de SPARC la reducción fue de, aproximadamente, un 50% respecto a los controles.

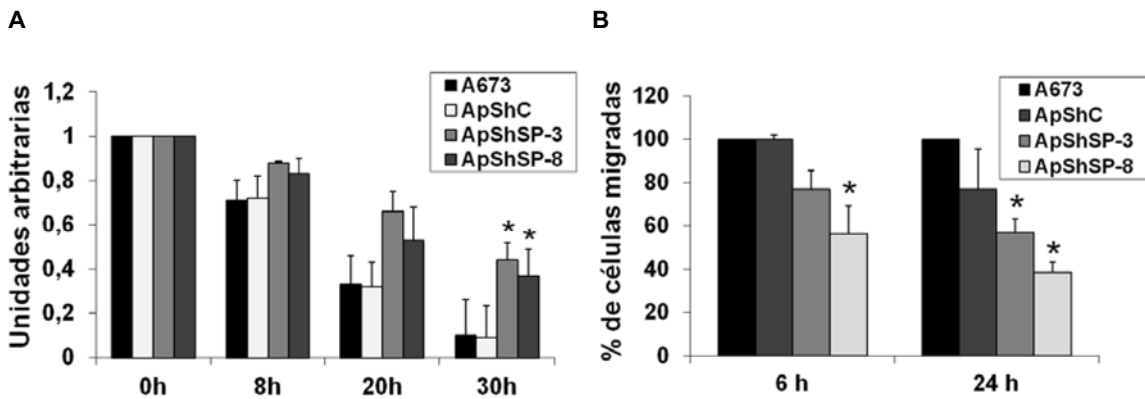


Figura 77 **A.** Cuantificación de tres experimentos independientes de *wound healing* realizados en el modelo de inhibición de SPARC. **B.** Cuantificación de tres experimentos independientes de migración en cámara de Boyden a 6 y 24 horas. * $p < 0.05$

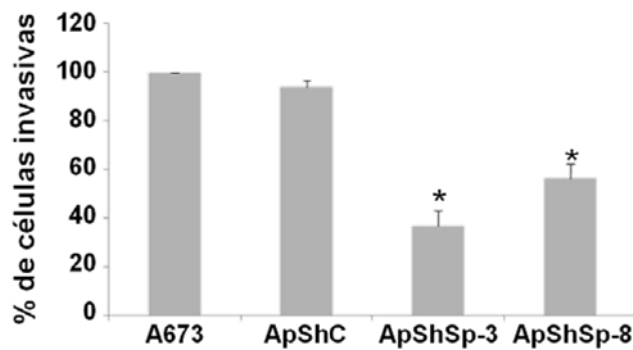


Figura 78. Cuantificación de tres ensayos de invasión en cámara de Boyden. * $p < 0,05$.

Al analizar por zimograma la actividad de las MMP-2 y MMP-9 de medios condicionados del modelo de silenciamiento de SPARC (Fig. 79) se observó que, al igual que en las células con CAV1 silenciada, la activación de MMP-2 disminuía, no obstante, la actividad de MMP-9 no se vio afectada.

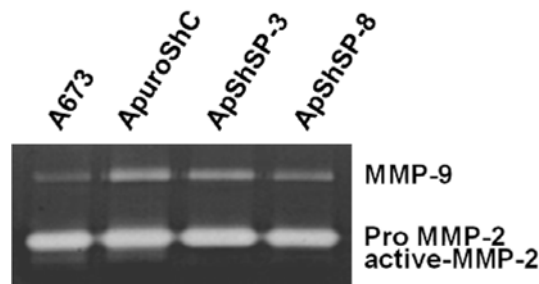


Figura 79. Zimograma con sustrato de gelatina de medios condicionados del modelo de baja expresión de SPARC.

Finalmente, los experimentos de metástasis experimental que se realizaron con el modelo de silenciamiento de SPARC no mostraron colonización de los pulmones en ninguno

de los ratones inyectados con las células con baja expresión (Fig. 80), lo que pondría de manifiesto la importancia de esta proteína de adhesión para el establecimiento de las células metastásicas de SE en este tejido.

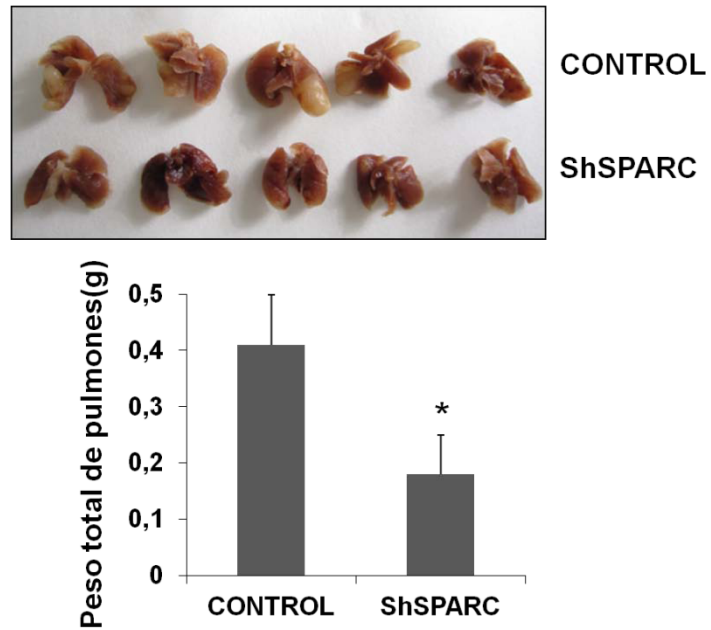


Figura 80. Pulmones extraídos a los 15 días tras la inyección intravenosa de células transfectadas con el vector vacío (control) o con el shARN anti-SPARC y cuantificación del peso de los mismos. * $p < 0,001$

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

5. DISCUSIÓN

5.1. CAV1 modula la capacidad del sarcoma de Ewing para metastatizar.

CAV1 ha sido relacionada tanto con propiedades pro-tumorales como anti-tumorales en diferentes tipos de cáncer [Goetz, 2008]. En el SE, CAV1 ha sido identificada como diana transcripcional directa del factor de transcripción aberrante EWS/FLI1, y presenta un papel importante en su proceso tumorigénico [Tirado y cols., 2006].

A pesar de no haberse hallado correlación clínica entre la expresión de CAV1 y el estadio, tamaño o localización del tumor en el análisis inmunohistoquímico realizado a 43 pacientes, todas las muestras procedentes de pacientes con metástasis al momento del diagnóstico fueron positivas para CAV1, lo que sugeriría la relevancia de esta proteína en el proceso metastásico durante la progresión del SE.

Una característica importante del SE es su elevada tasa metastásica, presentándose un 30% de los pacientes con metástasis al momento del diagnóstico [Karosas, 2010].

Esta tesis se centra en el estudio de los posibles mecanismos por los cuales CAV1 influye en la progresión metastásica del SE.

Durante los pasos iniciales del proceso metastásico las células del tumor primario deben adquirir una serie de capacidades que les permitan la separación del tumor primario, reconocimiento y reorganización de la matriz extracelular, la migración activa a través de esta matriz y la extravasación al torrente sanguíneo [Wells y cols., 2013]. Dos capacidades celulares fundamentales para este proceso metastásico son las de migración e invasión.

Al inhibir la expresión de CAV1 en células de SE, se observó una reducción significativa en la capacidad migratoria e invasiva de estas células *in vitro*. Además, nuestros resultados mostraron una menor capacidad de colonizar los pulmones en el modelo de metástasis experimental *in vivo* de las células de SE con CAV1 silenciada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios similares realizados en cáncer de vejiga [Thomas y cols., 2011] y carcinoma hepatocelular [Tse y cols., 2012]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un papel fundamental de CAV1 en la progresión metastásica del SE mediante la regulación de la migración celular e invasión.

5.2. CAV1 regula la producción de MMP-9 y la actividad de MMP-2 en células de sarcoma de Ewing.

La degradación de la matriz extracelular es un paso imprescindible para la separación de las células metastásicas del tumor primario. Las metaloproteinasas (MMPs) conforman una amplia familia de endoproteinasas dependientes de zinc que son, en conjunto, capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular. Las MMPs pueden clasificarse en colagenasas, gelatinasas, estromelinas y MMPs de membrana según su especificidad de sustrato, estructura primaria y localización celular [Fanjul-Fernández y cols., 2010]. MMP-2 y MMP-9 forman parte de las gelatinasas y son capaces de degradar colágeno de tipo I, IV, VII, X y IX, elastina, fibronectina, vitronectina y laminina [Overall, 2002]. Ambas han sido relacionadas con metástasis en diversos estudios [revisado en Chiang y Massagué, 2008; Yilmaz y Christofori, 2010] y se han descrito como marcadores de agresividad en diferentes tipos tumorales como cáncer de próstata [Castellano y cols., 2008], colon [Dragutinović y cols., 2010], e incluso sarcomas [Benassi y cols., 2001].

Las MMPs pueden estar reguladas a diferentes niveles. A nivel transcripcional se produce una regulación del promotor por parte de diferentes factores de transcripción como los elementos de respuesta a AP-1 (*Activator Protein-1*), NF- κ B o STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) [Fanjul-Fernández y cols., 2010]. También se ha descrito una regulación epigenética mediante metilación, habiéndose definido una correlación inversa entre el grado de metilación del promotor y la expresión de MMP-9 y MMP-2 [Chicoine y cols., 2002; Poplineau y cols., 2013; Shukeir y cols., 2006]. A nivel post-transcripcional, la expresión proteica de las MMPs se puede regular mediante la estabilidad del ARNm en el citoplasma a través de factores trans, que incluyen tanto proteínas de unión a ARN como microARNs, que interactúan con elementos cis situados en diferentes puntos del ARNm [Clark y cols., 2008]. Las MMPs se expresan en forma de zimógenos no activos que son activados mediante la disrupción de la interacción entre uno de sus dominios y el ión de zinc de su sitio activo. Este proceso de activación lo llevan a cabo diferentes proteínas intracelulares o extracelulares mediante proteólisis. Un último nivel de regulación se produce mediante diferentes inhibidores específicos de las MMPs pertenecientes a la familia de las TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) [Kessenbrock y cols., 2010].

En nuestro modelo se detectó una menor actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en medios condicionados de células con CAV1 silenciada respecto a sus controles y el

resultado obtenido sugiere que CAV1 regula estas dos MMPs de manera diferencial. Estos datos podrían explicar, al menos en parte, la menor capacidad de invasión de las células con silenciamiento de CAV1. Obtuvimos el mismo resultado al repetir el experimento de invasión con las células parentales tratadas con un inhibidor específico de MMP-2 y 9.

Por un lado, nuestros resultados muestran una inhibición de la expresión de ARNm de MMP-9, lo que sugeriría una regulación indirecta a nivel transcripcional por parte de CAV1. Esta relación entre la expresión de CAV1 y MMP-9 ya se había descrito en tumores como en cáncer hepatocelular, donde la sobreexpresión de CAV1 produce un aumento en la expresión de *MMP-9* [Tang y cols., 2012]. Sin embargo, en carcinoma pancreático el resultado es el contrario, produciéndose una inhibición de MMP-9 al sobreexpresar CAV1 [Han y Zhu, 2010]. Ya que CAV1 es una proteína de andamiaje, podría estar interviniendo en la activación de una ruta de señalización que regule la expresión de *MMP-9*. Esta vía de señalización ha sido el objeto de estudio principal de esta tesis y se discutirá en el siguiente apartado.

Por otro lado, nuestros resultados revelan una menor activación de MMP-2 en las células con inhibición de CAV1. Se descartó la regulación transcripcional al no hallar diferencias en los niveles de expresión de ARNm de MMP-2 entre las líneas con CAV1 silenciada y las líneas control. Durante el proceso de activación de MMP-2, TIMP2 se une a pro-MMP-2 y a una molécula de la MMP de membrana MT1-MMP permitiendo que otra molécula de MT1-MMP, que forma un dímero con la primera, active catalíticamente a MMP-2 [Kessenbrock y cols., 2010]. Según nuestros resultados, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de ARNm de TIMP2. Sin embargo, encontramos cierto grado de co-localización de CAV1 y MT1-MMP y un cambio de la distribución celular de esta última en ausencia de CAV1. Esto sugeriría que la regulación de la activación de MMP-2 por parte de CAV1 es por medio de la regulación de la actividad de MT1-MMP.

CAV1 ha sido relacionada con la localización de MT1-MMP con anterioridad. En células COS-7 se ha descrito como CAV1 inhibe la actividad de MT1-MMP promoviendo su internalización [Kim y Chung, 2008]. Por el contrario, en células de cáncer de mama se encontró que CAV1 promovía la actividad de MT1-MMP al ser responsable de su localización en los invadopodia durante el proceso de degradación de la matriz extracelular e invasión [Yamaguchi y cols., 2009].

De nuestros resultados podemos deducir que CAV1 promueve la invasión de las células de SE regulando la producción de MMP-9 y la activación de MMP-2.

5.3. Mecanismo de regulación de MMP-9 por CAV1 en el sarcoma de Ewing.

5.3.1. Las proteínas kinasas ERK1/2 está implicada en la regulación de la migración e invasión dependiente de CAV1 en el sarcoma de Ewing.

La vía de señalización de las MAPK-ERK está implicada en procesos celulares como la adhesión celular, la progresión del ciclo celular, la migración celular, la supervivencia, la diferenciación, la proliferación, el metabolismo y la transcripción [Roskoski, 2012]. La regulación de la expresión de MMP-9 por mediación de la vía de ERK1/2 ha sido referida con anterioridad [Beliveau, 2010; Lan y cols., 2012; Liu y Wilson, 2012]. Se ha encontrado activación constitutiva de ERK1/2 en líneas de SE [Silvany y cols., 2000; Zenali y cols., 2009], siendo menor en las líneas con translocación EWS/FLI1 de tipo I que en las de otros tipos.

La activación de la vía de ERK1/2 puede ser iniciada en la membrana plasmática, entre otros, por receptores tirosina kinasa (RTKs), receptores asociados a proteína G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*) o por integrinas. Estos receptores transmiten la señal al reclutar moléculas adaptadoras, como Grb2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*), y factores de intercambio, como SOS (*Son of Sevenless homolog*) que producen la activación de Ras. La forma activada Ras-GTP activa a las proteínas kinasas Raf (A-Raf, B-Raf y C-Raf) reclutándolas en la membrana. Una vez activadas, fosforilan a MEK1/2 que a su vez activa a ERK1/2. Se conocen cerca de 200 sustratos diferentes de ERK1/2, lo que explica la amplia diversidad de procesos celulares en los que está implicada esta vía de señalización [Ramos, 2008; Roskoski, 2012; Wortzel y Seger, 2011].

Nuestros resultados muestran una inhibición en la actividad de las proteínas MEK1/2 y ERK1/2 en las células con CAV1 silenciada. Asimismo, el tratamiento de las líneas A673 y TC71 con el inhibidor específico de MEK1/2, U0126, reproduce, en parte, la inhibición de la expresión de MMP-9 y la inhibición de la capacidad migratoria obtenidos con la inhibición de la expresión de CAV1. Estos resultados evidenciarían la implicación de la vía de ERK1/2 en el efecto pro-metastásico de CAV1 en el SE.

La activación constitutiva de ERK1/2 se ha hallado en un gran número de tipos tumorales [Hoshino y cols., 1999]. Además, ha sido relacionada con metástasis en tumores como el carcinoma hepatocelular [Chen y cols., 2013], el cáncer de pulmón [Lee y cols., 2013] o el cáncer colorrectal [Ai y cols., 2013]. ERK1/2 afectan a la progresión metastásica regulando: 1) la migración celular promoviendo las protrusiones de la

membrana plasmática y la renovación de las adhesiones focales mediante la fosforilación de MLCK (*Myosin-Light-Chain Kinase*), calpaina, FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y paxilina [Huang *et al.*, 2004]; 2) la invasión regulando la expresión de MMPs.

Anteriormente se ha descrito que CAV1 regula la actividad de ERK1/2 en varios tipos tumorales. Se ha observado que el silenciamiento de CAV1 produce una inhibición de la fosforilación de ERK1/2 en células de cáncer de colon [Basu Roy y cols., 2013] y células metastásicas de cáncer pulmonar [Pancotti y cols., 2012]. Sin embargo, en células de carcinoma pancreático, la sobre-expresión de CAV1 produce una disminución en la fosforilación de ERK1/2 [Han y Zhu, 2010].

En nuestro modelo, CAV1 regularía la activación de la vía de ERK1/2, influyendo así en la expresión de MMP-9 y en la capacidad migratoria de células de SE.

5.3.2. CAV1 regula la expresión del receptor RET en la línea celular A673.

El efecto de la activación de la vía de ERK1/2 depende parcialmente del estímulo que la origine, por este motivo, es importante la identificación del receptor del que depende la activación de ERK1/2 en nuestro modelo. Para ello se comprobó, mediante un *array* de anticuerpos, el estado de fosforilación de diferentes RTKs en A673. Así, se observó una menor fosforilación en el receptor RET, sin embargo, al validar este resultado, se observó por IP y *Western blot*, que la inhibición de CAV1 se traduciría en una disminución de la cantidad total de proteína RET, por lo que CAV1 podría estar ejerciendo algún tipo de regulación sobre su expresión.

El receptor RET fue uno de los primeros receptores Tyr-kinasa de los que se descubrió un papel en la neoplasia. Mutaciones en este proto-oncogen están asociadas al cáncer medular tiroideo [Figlioli y cols., 2013]. La activación de RET precisa de la formación de un complejo multimérico con un receptor tipo a de la familia GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) y uno de sus ligandos GFL (*GDNF family ligands*). Estos complejos se forman en los *lipids rafts*, microdominios de membrana ricos en esterol y esfingolípidos cuya regulación está asociada a CAV1. La activación de RET crea lugares de unión a los que se unen diferentes proteínas (SHC, *Src homology 2 domain-containing-transforming protein C*; IRS1 y 2, *Insulin receptor substrate 1 y 2*; FRS2, *Fibroblast growth factor receptor substrate 2*; PKC α , *Protein kinase C alpha type*) capaces de activar diferentes vías de transducción de señales, entre ellas la de ERK1/2 [revisado en Phay y cols., 2010].

El hecho de que la inhibición de CAV1 produzca una inhibición en la expresión de RET, además de que el receptor presenta, según su secuencia aminoacídica, un motivo de unión a CAV1 en su dominio Tyr-kinasa intracelular, evidenciaría una relación entre ambas proteínas que no había sido descrita hasta ahora. Por otro lado, su expresión en las diferentes líneas de SE analizadas, lo haría un buen candidato a ser uno de los receptores que activa la vía por la que CAV1 regula la expresión de MMP-9. Sin embargo, el efecto observado en la línea A673, no fue detectado en los otros modelos de silenciamiento de CAV1 analizados, por lo que no se continuó por esta línea de investigación. Aun así, es necesario un estudio en mayor profundidad de esta posible relación entre CAV1 y RET, así como su posible papel en el proceso metastásico de SE.

5.3.3. El silenciamiento de CAV1 afecta a la fosforilación de la proteína ribosomal S6.

El otro resultado destacable obtenido mediante el *array* de anticuerpos y comprobado por *Western blot* indicó una inhibición de la fosforilación de rpS6 en las líneas con inhibición de CAV1. Esta proteína forma parte de la subunidad ribosomal 40S y está descrita como el principal sustrato de S6K1 (proteína ribosomal S6 kinasa-1), que es una de las dianas de mTOR. Por otro lado, se ha descrito la fosforilación de rp6S por parte de la RSK1 y 2 en la Ser235/236 en respuesta a la activación de la vía Ras/ERK. Esta fosforilación se asocia a la regulación de la afinidad de rpS6 al complejo 7-metilguanosin 5' del ARNm, lo que contribuye al ensamblaje del complejo de iniciación de la traducción [Roux y cols., 2007]. En las células tratadas con el inhibidor de MEK1/2, también se observa una inhibición en la fosforilación de rpS6. Por lo que CAV1 podría estar afectando a la expresión de MMP-9 a nivel de traducción, además de a nivel de transcripción. Todas las líneas de SE comprobadas por *Western blot* expresan rpS6. Por lo que una de las vías por las que CAV1 podría estar regulando MMP-9 implicaría ERK1/2→RSK1/2→rpS6, ya que observamos pérdida de fosforilación de ERK1/2, RSK1, RSK2 y rpS6 en los clones con CAV1 silenciada.

5.3.4. RSK1 y RSK2 actúan de forma diferencial en la regulación de la migración e invasión de células de sarcoma de Ewing.

Como se ha mencionado con anterioridad, la amplia variedad de funciones celulares afectadas por la vía de ERK1/2 se debe a la gran cantidad de sustratos de ERK1/2. Según su localización, los sustratos de ERK1/2 se pueden dividir en sustratos citoplásmicos, como la familia de proteína kinasas RSK o proteínas del citoesqueleto, y

sustratos nucleares, entre los que se encuentran diversos factores de transcripción [Roskoski, 2012].

La familia de RSK (*90kDa ribosomal S6 kinase*) está formada por cuatro miembros, RSK1-4. La expresión de RSK1-3 es ubicua en todos los tejidos, aunque los niveles de cada isoforma varían entre tejidos, mientras que RSK4 presenta unos niveles de expresión mucho más bajos [Lara y cols., 2013]. La estructura de las RSKs es compleja, ya que comprende dos dominios kinasa, una región de unión y un dominio D de unión a ERK1/2. Los dominios kinasa se sitúan en los extremos C-terminal (CTKD, *C-terminal kinase domain*) y N-terminal (NTKD, *N-terminal kinase domain*). El CTKD está implicado en reacciones de autofosforilación, mientras que el NTKD es responsable de la fosforilación de los sustratos. El modelo actual de activación de RSK se inicia con la unión de ERK1/2 inactiva al dominio D en el extremo C-terminal, una vez ERK1/2 es fosforilada y activada, fosforila el CTKD en Thr573 (en RSK1), activándolo, y la Ser380 (en RSK1) en la región de unión, lo que crea un lugar de unión para PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) que se encarga de fosforilar el residuo Ser221 (en RSK1) lo que activa el NTKD. ERK1/2 también puede fosforilar RSK1 en los residuos Thr359 y Ser363 situados en la región de unión [Romeo y cols., 2012].

Las RSKs están implicadas en diferentes funciones celulares como son la proliferación celular, mediante la regulación directa o indirecta (a través de factores de transcripción) de la maquinaria de control del ciclo celular; y la supervivencia celular, mediante la regulación de la transcripción y actividad de proteínas de la familia de BCL2 (*B-cell lymphoma protein-2*) [Lara y cols., 2013; Romeo y cols., 2012]. Además, están implicadas en la regulación de la migración celular, ya que varias vías de señalización parecen converger en las RSKs para ejercer sus efectos pro-migratorios [Smolen y cols., 2010]

Aunque la implicación de cada una de las isoformas de la familia RSK en cáncer aún debe ser esclarecida, estudios iniciales sugieren su importancia en el crecimiento tumoral y en metástasis. La sobre-expresión de RSK1 y RSK2 ha sido descrita en diferentes tipos tumorales, como el cáncer de mama y el de próstata [Clark y cols., 2005; Smith y cols., 2005]. Se ha identificado a RSK1 y RSK2 como los efectores, necesarios y parcialmente suficientes, de la vía Ras-ERK para inducir un fenotipo mesenquimal migratorio e invasivo en células epiteliales [Doehn y cols., 2009]. Asimismo, la expresión de RSK2 aumenta el potencial metastásico en células de cáncer escamoso de cabeza y cuello [Kang y cols., 2010]. Por otro lado, RSK1 ha sido identificado como un regulador clave de la metástasis en cáncer de pulmón [Lara y cols., 2011]. Por todo ello, nos centramos en el papel de

estos dos miembros de la familia de RSK en nuestro modelo. Tratamos dos líneas celulares de SE, A673 y TC71, con un inhibidor específico, SL0101. Este inhibidor es un glicósido flavonoide acetilado que proviene de la planta tropical *Forsteronia refracta* e inhibe el NTKD, de todas las RSKs, de manera reversible y competitiva con el ATP [Maloney y Hecht, 2005; Smith y cols., 2005]. En nuestros resultados no encontramos diferencias significativas ni en la capacidad migratoria de las células tratadas respecto a sus controles, ni en los niveles de expresión de ARNm de MMP-9. La cantidad limitante de fármaco provocó que los volúmenes de trabajo fueran muy pequeños, lo que dificultó la recogida de muestras para realizar el zimograma y comprobar la actividad de MMP-9. Así que, para comprobar, de un modo más concluyente, el papel de RSK1 en la regulación de MMP-9 en SE, se realizó una transfección estable con un shARN anti-RSK1 en la línea celular A673. En esta ocasión, los experimentos de migración *in vitro* sí mostraron diferencias significativas, siendo menor la capacidad migratoria de las células con RSK1 silenciado. Sin embargo, ni la actividad gelatinasa ni los niveles de ARNm de MMP-9 se vieron afectados por la inhibición de RSK1. Estos resultados sugerirían que RSK1 no está implicada en la regulación de MMP-9 a nivel transcripcional, a nivel de traducción o de actividad. Por otro lado, RSK1 sí estaría implicada en el proceso migratorio de las células de SE. Este resultado concuerda con lo descrito por Larrea en líneas celulares de melanoma, en las que RSK1 promueve la movilidad celular al promover la inhibición de RhoA (*Transforming protein RhoA*) [Larrea y cols., 2009]. Por el contrario, en cáncer de pulmón la inhibición de RSK1 produce un aumento en la migración celular [Lara y cols., 2011]. Por lo que parece que RSK1 tiene efectos contrarios en la migración celular dependiendo del tipo celular.

Al realizar el procedimiento de metástasis experimental *in vivo* con el modelo de inhibición de RSK1, no se encontraron diferencias en viabilidad ni colonización de los pulmones entre las células control y las células con RSK1 silenciada. Por inmunohistoquímica de cortes embebidos en parafina de los pulmones extraídos de los ratones se comprobó que las líneas transfectadas con el shARN anti-RSK1 expresaban RSK1 lo que indica que durante el proceso del experimento *in vivo* recuperaron su expresión. Por lo que los resultados de este procedimiento no son concluyentes.

Tal como sucede con RSK1, la fosforilación de RSK2 se reduce en los clones con CAV1 silenciada en A673. Por lo que también se comprobó el efecto de la inhibición de RSK2 en la línea A673. Se establecieron dos modelos de inhibición por shARN anti-RSK2, uno con silenciamiento de RSK2 y otro con doble silenciamiento de RSK1 y RSK2. Se comprobaron los niveles de expresión y actividad de MMP-9, siendo mayores en las

líneas celulares con RSK2 silenciada y presentando cierta tendencia a aumentar en las células con ambas RSK silenciadas. Al comprobar la capacidad migratoria *in vitro* de estas células, no se observaron cambios significativos en las transfectadas con el shARN anti-RSK2, sin embargo, las células con doble silenciamiento presentaron un aumento muy significativo respecto a las células control.

Según lo observado en nuestros resultados, la inhibición de RSK1 disminuye la capacidad migratoria sin afectar a la expresión o actividad de MMP-9. Por otro lado, el silenciamiento de RSK2 produce un aumento en la actividad de MMP-9 que podría explicarse por el aumento que se produce en la fosforilación de ERK1/2. Está descrito que RSK2 fosforila al factor intercambiador de guanina de Ras, SOS, formando lugares de unión a motivos 14-3-3, lo que provoca la unión a proteínas que separa SOS de Grb2, inhibiendo así la ruta de señalización Ras-Raf-MEK-ERK [Saha y cols., 2012], lo que explicaría que al inhibir RSK2 se produzca un incremento en la fosforilación de ERK1/2. Este incremento en la activación de ERK1/2 podría ser la causa del aumento en la migración de las células con doble silenciamiento. Doehn describió RSK como el principal efector de la vía ERK1/2 en el fenotipo móvil de células epiteliales [Doehn y cols., 2009]. Sin embargo, en el caso de las células con RSK1 y 2 silenciadas, ERK1/2 podría estar ejerciendo sus efectos pro-migratorios independientemente de RSK, por ejemplo, ERK1/2 y no RSK activa a MLCK, que está implicada en la renovación de las adhesiones focales y la protrusión de la membrana [Bain y cols., 2007; Huang y cols., 2004]. En las células con solo RSK2 silenciada, la migración no se ve afectada, por lo que se podrían estar produciendo mecanismos compensatorios por parte de RSK1.

Con la doble inhibición se obtiene cierto aumento en la actividad de MMP-9, aunque inferior al obtenido al inhibir solamente RSK2, por lo que se pueden estar activando otros mecanismos de compensación, por ejemplo, por otros miembros de la familia RSK.

Nuestros resultados sugieren un papel anti-metastásico de RSK2 en SE, ya que su inhibición produce un aumento en la migración celular y en la producción de MMP-9. Además, resultados obtenidos en un TMA con muestras embebidas en parafina de pacientes de SE, muestran una correlación entre la supervivencia y una mayor fosforilación de rp-S6 (Ver Anexo I), que, como muestran nuestros resultados, es fosforilada por RSK2, lo que corroboraría el papel de RSK2 como inhibidor de la progresión tumoral del SE.

Como se ha mencionado anteriormente, este efecto anti-metastásico podría deberse a la inhibición de la activación de la vía ERK1/2. Por otro lado, se ha descrito recientemente

la participación directa de RSK2 en la internalización de FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor 1*) y la consiguiente atenuación de la señalización [Nadratowska-Wesolowska y cols., 2013]. En células de cáncer de mama se ha demostrado que la estabilización de FGFR1 en la membrana plasmática produce una mayor activación de la vía de las ERK1/2, mayor expresión de MMP-9 y mayor capacidad invasiva *in vitro* [Suyama y cols., 2002]. Además, la activación de FGFR1 ha sido relacionada con la progresión metastásica en diferentes tipos tumorales, como cáncer de próstata [Yang y cols., 2013] o de vejiga [Cheng y cols., 2013].

El estudio del papel de RSK2, y otros miembros de la familia, en SE necesita de mayor investigación. Es necesaria la comprobación *in vivo* del efecto anti-metastásico de RSK2, así como el estudio del mecanismo concreto por el que realiza este efecto.

5.3.5. Posibles factores de transcripción implicados en la regulación de MMP-9 por CAV1.

La expresión de las MMPs está regulada principalmente a nivel transcripcional, lo que resulta normalmente en niveles basales bajos en condiciones fisiológicas normales. La mayoría de los miembros de la familia comparten elementos cis en la secuencia de sus promotores, lo que permite un control estricto de su expresión según el tipo celular. Como resultado, las MMPs son co-expresadas o co-reprimidas en respuesta a múltiples estímulos, como citoquinas o factores de crecimiento. Esta respuesta a nivel transcripcional se produce varias horas después de la exposición a estos estímulos, lo que sugiere que los promotores de las MMPs están reguladas por vías de señalización de genes de respuesta temprana, que son inducidas poco después de la estimulación celular y no se produce síntesis *de novo* de proteínas. Estos genes de respuesta temprana codifican proteínas de señalización que fosforilan diferentes factores de transcripción que se unirán entonces a los promotores de MMPs. Estas vías de señalización que activan los factores de transcripción incluyen NF- κ B, MAPK, STAT y la familia de proteínas Smad [Fanjul-Fernández y cols., 2010].

La actividad NF- κ B puede estar relacionada con diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de Ras/MEK/ERK [Dhawan y Richmond, 2002; Liu y Wilson, 2012], además, está descrita la presencia de lugares de unión a NF- κ B en la región promotora de MMP-9 [He, 1996]. En estado latente, las moléculas de NF- κ B permanecen secuestradas en el citosol por su inhibidor I κ B (*inhibitor of NF- κ B*). Tras la estimulación de receptores de citoquinas, como los de la superfamilia de receptores de TNF, se activan una serie de cascadas de señalización próximas a la membrana que culminan con la activación de IKK

(I κ B kinase). La fosforilación de I κ B por parte de IKK lleva a la degradación proteasomal de I κ B, liberando así a NF- κ B para su translocación al núcleo fundamental para su actividad como factor de transcripción [Napetschnig y Wu, 2013]. Lee describió la regulación de MMP-9 mediante NF- κ B dependiente de ERK1/2 en células de cáncer de vejiga [Lee y cols., 2012] y en la línea celular de músculo liso HASMC, se identificó la inducción de la expresión de MMP-9 por TNF α , uno de los ligandos de TNFR1, mediante la acción de ERK1/2 sobre NF- κ B [Moon y cols., 2004]. Se comprobó el efecto de TNF α en el modelo de inhibición de CAV1 en A673. No se encontraron diferencias significativas a nivel de translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B entre los clones con inhibición de CAV1, que tienen menor activación de ERK1/2, y las células control. Estos resultados sugerirían que NF- κ B no es el factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de MMP-9 por parte de CAV1 en SE, sin embargo, es necesaria una investigación en mayor profundidad para poder descartarlo definitivamente.

En el promotor de MMP-9 también se han descrito varios sitios AP-1 [Clark y cols., 2008; Fanjul-Fernández y cols., 2010]. A estas regiones se une el complejo AP-1, que puede ser un homodímero de proteínas de la familia Jun o un heterodímero entre un miembro de la familia Jun y otro de la familia Fos. La composición de este complejo determinará la especificidad de los genes a los que regule [Kaminska y cols., 2000]. La familia Fos consta de cuatro miembros: c-Fos, Fos B, Fra-1 y Fra-2. De entre los cuales, Fra-1 ha sido relacionada con la expresión de MMP-9. Se ha descrito que Fra-1 actúa sinérgicamente con STAT3 para activar el promotor de *MMP-9* en células de cáncer de mama [Song y cols., 2008] y de carcinoma nasofaríngeo [Lan y cols., 2012]. Lan describió además que la regulación de *MMP-9* por parte de Fra-1 era dependiente de ERK1/2.

En nuestro modelo se detectó una reducción en la fosforilación de la Ser265 de Fra-1, dependiente de ERK1/2 [Hurd y cols., 2002], en las células con CAV1 silenciada. Sin embargo, este efecto sólo se observó en el modelo de A673. Esta línea celular de SE presenta una mutación activadora en B-Raf [Davies y cols., 2002], lo que podría explicar que se detecten diferencias en la actividad de Fra-1 sin necesidad de estimular la células. En otras líneas de SE, TC71 y TC252, no se observaron estos cambios en la fosforilación y la cantidad total de proteína detectada fue mucho menor. De hecho, la expresión y fosforilación de Fra-1 sólo se detectó por *Western blot* en A673 de entre todas las líneas celulares de SE analizadas. La expresión y activación de las proteínas de la familia c-Fos puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento [Ramachandran y cols., 2010] o citoquinas [Cortez y cols., 2007].

Por lo que sería necesario comprobar la actividad de Fra-1 en los modelos de inhibición de CAV1 en las líneas de SE tras la estimulación con alguno de estos factores. Además de comprobar la expresión y activación de STAT3, así como de otros miembros de las familias Fos y Jun en nuestro modelo.

5.4. Implicación de la Tyr14 de CAV1 en la regulación de la capacidad migratoria e invasiva de las células de sarcoma de Ewing.

La migración celular es un proceso cíclico que implica varios pasos que precisan de una regulación estricta de varias moléculas de señalización. Durante la migración, las células sufren una polarización, durante la que se distingue una parte frontal y una parte trasera de la célula; se generan extensiones de la membrana o protusiones en la dirección de la migración; se produce la adhesión al sustrato mediante adhesiones focales e integrinas, lo que desencadena la activación de varias vías de señalización que regulan la reorganización del citoesqueleto y el tráfico vesicular que ayudan a la traslocación del cuerpo celular; y, finalmente, a la retracción de la parte posterior de la célula [Cell Migration Consortium]. Muchos de estos pasos están regulados por la familia de Rho GTPasas, que incluyen RhoA, Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*), activas en la parte frontal de la célula e implicadas en la formación de las protusiones [O'Connor y Chen, 2013]. Se ha descrito que CAV1 ejerce una regulación sobre esta vía de señalización activando Rho e inhibiendo Rac y Cdc42 [Grande-García y del Pozo, 2008].

La fosforilación de CAV1 en la Tyr14 genera un lugar de unión a proteínas con dominio SH2, implicadas en la estimulación de la proliferación celular, y está relacionada con la regulación de la dinámica de las adhesiones focales, proceso muy importante para la migración celular [Joshi y cols., 2008].

Para comprobar cuáles de los efectos sobre la capacidad metastática que se observaron al inhibir la expresión de CAV1 eran dependientes de esta fosforilación, se utilizó el mutante no fosforilable Y14F. CAV1-Y14F está descrito como dominante negativo al interferir con las funciones normales de CAV1 endógena, además se ha observado que atenúa la invasión de la matriz extracelular y la actividad de las metaloproteinasas en células H1299 de cáncer pulmonar [Shatz y cols., 2010]. En las células A673 transfectadas con CAV1-Y14F se observó una reducción en la capacidad migratoria *in vitro* comparable a la obtenida en el modelo de silenciamiento de CAV1. Resultado que concuerda con lo descrito anteriormente para células de cáncer de colon, en las que se ha descrito la implicación de CAV1 fosforilada en la migración celular dependiente de RhoA [Basu Roy y cols., 2013]. De manera similar, en células metastásicas de cáncer de mama y melanoma, Urra describió el papel fundamental de la CAV1 fosforilada en la direccionalidad y velocidad de la migración, mediante la regulación de la renovación de las adhesiones focales [Urra y cols., 2012]. El mecanismo concreto por el que CAV1 fosforilada regula el proceso de migración en las células de SE necesita

una mayor investigación, para la cual habrá que averiguar el papel que ejercen en nuestro modelo las proteínas de la familia Rho, así como la regulación de integrinas y adhesiones focales por parte de CAV1.

Por otro lado, no se detectó ni disminución en la fosforilación de ERK1/2, RSK1 ni rpS6; ni reducción en la expresión y actividad de MMP-9 en las células transfectadas con CAV1-Y14F. El hecho de que estas células no reproduzcan la totalidad de la inhibición de la migración *in vitro* obtenida al silenciar CAV1, puede deberse a que la vía de las ERK1/2 no está afectada por la expresión del mutante, por lo que las MAPK pueden seguir ejerciendo su papel pro-migratorio.

Está descrito que la fosforilación de la CAV1 en la Tyr 14 podría regular la activación de MMP-2, al ser esta modificación imprescindible para la unión entre MT1-MMP y CAV1 [Labrecque y cols., 2004]. Además la expresión ectópica del mutante CAV1-Y14F en células de cáncer de colon reduce la expresión de MMP-2 [Shatz y cols., 2010]. Sin embargo, en nuestro modelo de expresión del mutante CAV1-Y14F, no se encontraron diferencias en la actividad de MMP-2. Este resultado podría deberse a que la interacción entre CAV1 y MT1-MMP en las células de SE se produjera por un mecanismo diferente al de las células endoteliales, utilizadas en el estudio de Labrecque. No obstante, es necesario comprobar la interacción de CAV1 con MT1-MMP en el modelo de expresión de Y14F para poder verificar el efecto del mutante sobre la activación de MMP-2.

Estos resultados sugerirían que el papel de esta Tyr en el proceso de degradación de la matriz no es esencial en nuestro modelo. Sin embargo, estos resultados aún deben ser verificados por otros métodos, como el ensayo de invasión en cámara de Boyden con matrigel, además de comprobar el efecto *in vivo* de esta mutación no fosforilable en el modelo de metástasis experimental.

En resumen, nuestros resultados sugerirían que el efecto de CAV1 en la capacidad migratoria de las células de SE es, al menos en parte, dependiente de la fosforilación en la Tyr14.

5.5. Genes de virulencia metastásica: SPARC.

Durante el proceso de metástasis las células tumorales tienen que ser capaces de infiltrarse en nuevos tejidos desde el torrente sanguíneo y formar colonias agresivas capaces de sobrevivir en ese nuevo contexto tisular. Para llevar a cabo este cometido, las células expresan una serie de genes que pueden ser definidos como genes de virulencia metastásica. El conjunto de genes de este tipo que expresen las células metastásicas determinará el tejido que colonicen, ya que les confieren ventajas selectivas en el microambiente de ese tejido específico [Nguyen y Massagué, 2007; Nguyen y cols., 2009].

En el caso del SE no hay estudios que determinen los genes responsables de la especificidad tisular de las metástasis. En este proyecto nos centramos en SPARC, ya que se ha identificado como uno de los genes que determinan y dirigen la metástasis del cáncer de mama a pulmón [Gupta y cols., 2005; Minn y cols., 2005], tejido preferencial de metástasis del SE, y ha sido relacionado con la regulación de las MMPs [Clenski y Cohn, 2010].

SPARC, también conocida como osteonectina o BM-40, es una glicoproteína matricelular, es decir, que está relacionada con la matriz extracelular sin ser una proteína estructural de la misma. Se une a colágeno fibrilar y a colágeno IV y tiene un papel importante en el ensamblaje y composición de la matriz extracelular. Además, se ha demostrado que puede regular la actividad de algunas vías de señalización de factores de crecimiento por regulación de sus receptores de membrana [Bradshaw, 2012]. SPARC interacciona con una gran variedad de moléculas, incluyendo proteínas estructurales de la matriz extracelular, factores de crecimiento y receptores de membrana, resultando en un amplio espectro de efectos biológicos [Clenski y Cohn, 2010].

En este trabajo se analizó el posible papel de esta proteína en el proceso metastásico de nuestro modelo. Se detectó una reducción en la cantidad de ARNm de SPARC en los clones de baja expresión de CAV1, lo que sugiere una posible regulación indirecta transcripcional por parte de CAV1. No obstante, aunque CAV1 está sobre-expresada, no todas las líneas celulares de SE analizadas presentaron expresión de SPARC. Esto puede deberse a que la regulación de la expresión de SPARC en células de SE puede ser por diferentes mecanismos. Se han descrito diferentes mecanismos de regulación de la expresión de SPARC, como la metilación del promotor [Nagaraju y El-Rayes, 2013], o la regulación por microARNs [Zhu y cols., 2012].

SPARC ha sido descrita tanto como promotora de la migración celular, como en el caso de células de glioma [McClung y cols., 2012], como inhibidora de la migración celular, como en el caso de meduloblastoma [Bhoopathi y cols., 2011] o de cáncer de próstata [Shin y cols., 2013]. En nuestro modelo, al inhibir la expresión de SPARC se observó una menor capacidad migratoria e invasiva de los clones de baja expresión de SPARC. Sin embargo, el efecto fue menor que en el caso de las líneas con CAV1 silenciada, lo que sugeriría que el efecto de CAV1 en estos procesos es, solo en parte, dependiente de SPARC.

Al analizar la actividad de las MMP-2 y MMP-9 del modelo de inhibición de SPARC se observó que, al igual que en las células con CAV1 silenciada, la activación de MMP-2 disminuía. Ya se habían relacionado previamente altos niveles de SPARC con altos niveles de MMP-2 en cáncer gástrico metastásico [Zhao y cols., 2009]. Por el contrario, la actividad de MMP-9 no se vio afectada en las líneas con inhibición de SPARC, lo que podría explicar el hecho de que estas células invadan mejor que las células con CAV1 silenciada en los experimentos *in vitro*. Hay varios estudios que demuestran una regulación de la expresión de MMP-9 por parte de SPARC, tanto promoviéndola, en el caso del adenocarcinoma pancreático [Arnold y cols., 2009], ameloblastoma [Shen y cols., 2010] o cáncer cervical [Chen y cols., 2012a]; como inhibiéndola, en el caso de meduloblastoma [Bhoopathi y cols., 2010]. Por consiguiente, el efecto de SPARC sobre la expresión y actividad de MMP-9 parece depender del tipo celular. De hecho, el papel de SPARC en la progresión tumoral, al igual que el de CAV1, parece depender del tipo tumoral. Niveles elevados de expresión de SPARC están asociados a mayor progresión tumoral, como en el cáncer ovárico [Chen y cols., 2012b], e indican peor pronóstico en algunos tumores, por ejemplo, el adenocarcinoma pancreático [Neuzillet y cols., 2013] o el cáncer gástrico [Zhao y cols., 2009]. Por el contrario, la pérdida de SPARC promueve la carcinogénesis y metástasis en cáncer de vejiga [Said y cols., 2013].

SPARC ha sido descrita típicamente como una proteína anti-adhesiva (*counter-adhesive*) [Liu y cols., 2009; Rosenblatt y cols., 1997], sin embargo, estudios recientes demuestran que tiene propiedades adhesivas o anti-adhesivas dependiendo del tipo tumoral y de si es secretada por las células tumorales o por las células del estroma [Cheng T y cols., 2013]. En nuestro modelo, SPARC, podría estar ejerciendo un papel imprescindible en la adhesión al epitelio pulmonar de las células metastásicas, ya que nuestros resultados muestran que ninguno de los clones de baja expresión de SPARC fue capaz de colonizar el tejido pulmonar durante el procedimiento de metástasis

experimental *in vivo*. Lo que sugeriría que la expresión de SPARC por parte de las células metastásicas es imprescindible para su asentamiento en el epitelio pulmonar.

En resumen, los resultados de esta tesis sugerirían que SPARC es uno de los responsables del efecto pro-metastásico de CAV1 en SE mediante la regulación de la actividad de MMP-2, necesaria para el proceso de invasión, mediante la regulación de la migración celular y mediante la regulación de la adhesión durante la colonización del tejido pulmonar. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual SPARC ejerce estos efectos requiere de una mayor investigación.

5.6. Resumen

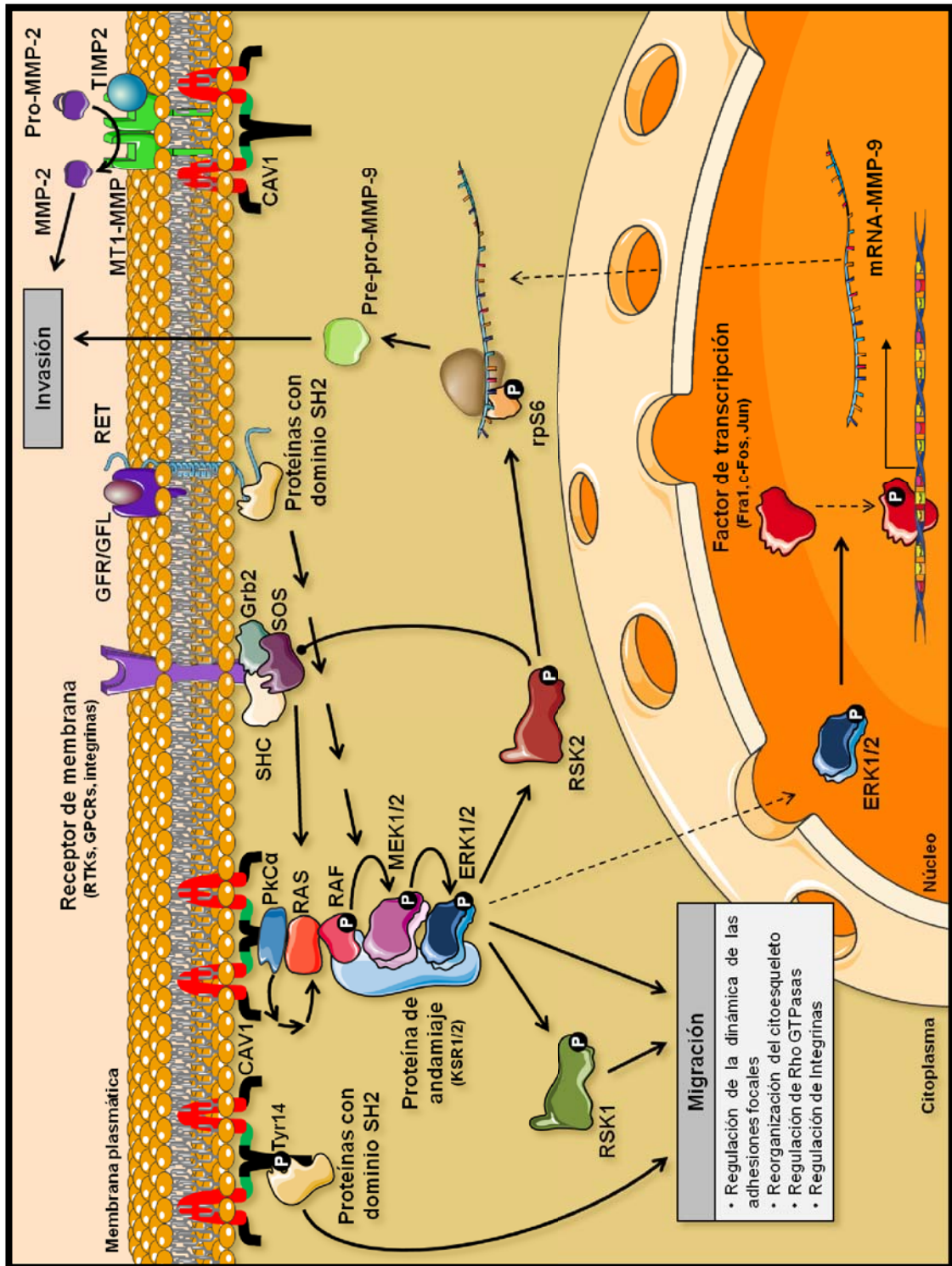


Figura 81. Representación esquemática de algunos de los resultados obtenidos en esta tesis.

Figura elaborada utilizando *Servier Medical Art*.

La habilidad de la vía de señalización de ERK1/2 de inducir efectos diferentes e incluso contradictorios tras diferentes estímulos, evidencia la necesidad de una regulación espacio-temporal. La localización subcelular de los diferentes componentes de la vía es uno de los principales mecanismos por los que la señal se dirige hacia unos substratos y no hacia otros. En esta localización pueden intervenir proteínas de andamiaje como la β -arrestina, que une ERK1/2 a endosomas recubiertos de clatrina, o la IQGAP1 (*IQ domain containing GTPase activating protein*) que une B-Raf, MEK1/2 y ERK1/2 a filamentos de actina [Wortzel y Seger, 2011; Yao y Seger, 2009]. Otra de estas proteínas de andamiaje puede ser CAV1. Según el estudio de Vetterkind, CAV1 podría estar ejerciendo un papel muy importante al unirse a PkC (*Protein kinase C*) y Ras formando un módulo que interactuaría con otro módulo en el que se encuentran Raf-MEK1/2-ERK1/2 [Vetterkind y cols., 2013]. La interacción de CAV1 con PkC α ya había sido descrita por nuestro grupo en células de SE [Tirado y cols., 2010]. En el modelo utilizado por Vetterkind, el módulo de Raf-MEK1/2-ERK1/2 está descrito con la intervención de la proteína de andamiaje IQGAP1. Sin embargo, según los resultados de Vetterkind, la interacción con IQGAP1 anclaría a ERK1/2 a filamentos de actina del citoesqueleto, lo que no permitiría la translocación de ERK1/2 al núcleo, donde activaría factores de transcripción (en nuestro modelo podría ser FRA1) que regulan la expresión de *MMP-9*. En nuestro modelo, esta proteína de andamiaje podría KSR1/2 (*Kinase suppressor of Ras 1/2*). Esta proteína, además de unirse a Raf, MEK1/2 y ERK1/2, parece tener cierta actividad catalítica implicada en la activación de MEK1, además ejerce sus funciones preferentemente en zonas de membrana ricas en colesterol [Roskoski, 2012].

De este modo la CAV1 regularía la vía de las ERK1/2 en SE al establecer la localización de algunos de sus componentes, permitiendo así su activación.

Según nuestros resultados, ERK1/2 estaría regulando la migración celular en SE de dos formas: a través de RSK1, ya que la inhibición de RSK1 lleva a una reducción de la migración *in vitro*; pero también de una forma independiente de RSK1, ya que al silenciar RSK1 y RSK2 se observa un aumento en la capacidad migratoria que suponemos es debido al aumento de la activación de ERK1/2 producido por la pérdida de la inhibición que ejerce RSK2 sobre la ruta. En esta regulación de la migración celular, CAV1, además de actuar a través de la regulación de la vía de ERK1/2, estaría ejerciendo su papel regulatorio de una manera dependiente de la fosforilación de la Tyr14. A esta fosfotirosina se unirían diferentes proteínas con dominio SH2 implicadas en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales y la regulación de la familia de las Rho GTPasas.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que la regulación de la capacidad invasiva de células de SE por parte de CAV1 implica la regulación de la expresión y actividad de las MMP-2 y 9. CAV1 regularía la activación de MMP-2 al regular la localización en membrana de la MT1-MMP, responsable de la activación de MMP-2. Por otro lado, CAV1 regularía la expresión de MMP-9 a través de la regulación de factores de transcripción, como podría ser FRA1, a través de la ruta de ERK1/2. Por otro lado, en nuestro modelo, RSK2, y no RSK1, parece ser el responsable de la fosforilación de rpS6. Al estar rpS6 implicado en la regulación de la iniciación de la traducción de proteínas, podría estar ejerciendo un papel regulatorio de la expresión de MMP-9 a este nivel.

De este modo, CAV1 regularía la progresión metastásica del SE mediante la regulación de la migración y de la invasión (Fig. 81).

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral se puede concluir:

- ❖ CAV1 tiene un papel fundamental en la progresión metastásica del SE al regular la capacidad migratoria e invasiva celular.
- ❖ MMP-2 y MMP-9 están implicadas en la capacidad invasiva de las células de SE.
- ❖ CAV1 regula la actividad de la MMP-2 mediante la interacción con MT1-MMP, responsable directo de la activación de MMP-2.
- ❖ CAV1 regula la expresión de MMP-9 a nivel transcripcional a través de la regulación de la activación de la vía de las ERK1/2.
- ❖ CAV1 regula la migración de células de SE a través de la regulación de ERK1/2 y de RSK1.
- ❖ El silenciamiento de RSK2 en células de SE produce un aumento en la actividad de la MMP-9 y de la capacidad migratoria celular.
- ❖ La fosforilación de CAV1 en la Tyr14 está implicada en la regulación de la migración celular por parte de CAV1, pero no en la regulación que esta ejerce sobre las MMPs.
- ❖ El silenciamiento de CAV1 produce una inhibición en la expresión de SPARC a nivel transcripcional mediante un mecanismo no conocido.
- ❖ La proteína SPARC está implicada en la regulación de la migración celular, de la actividad de MMP-2 y de la capacidad de colonizar el epitelio pulmonar en ratones inmunodeprimidos de las células de SE.
- ❖ El silenciamiento de CAV1 produce una inhibición de la expresión del receptor RET en células de SE por un mecanismo aún no conocido.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ai X, Wu Y, Zhang W, Zhang Z, Jin G et al. Targeting ERK pathway reduces liver metastasis of Smad4-inactivated colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2013. 14(11). [Epub ahead of print].
- Angervall L & Enzinger FM. Extraskelletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer*. 1975. 36, 240-251.
- Applebaum MA, Worch J, Matthay KK, Goldsby R, Neuhaus J et al. Clinical features and outcomes in patients with extraskelletal Ewing sarcoma. *Cancer*. 2011. 117:3027–32.
- Arnold S, Mira E, Muneer S, Korpanty G, Beck AW, et al. Forced expression of MMP-9 rescues the loss of angiogenesis and abrogates metastasis of pancreatic tumors triggered by the absence of host SPARC. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008. 233(7):860-73.
- Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer*. 1979. 43: 2438-51.
- Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, Mazabraud A. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1984. 12: 21-5.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. 2007. 408(3):297-315.
- Barber-Rotenberg JS, Selvanathan SP, Kong Y, Erkizan HV, Snyder TM et al. Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1. *Oncotarget*. 2012. 3(2):172-82.
- Bastiani M & Parton RG. Caveolae at a Glance. *J Cell Sci*. 2010. 123: 3831-36.
- Basu Roy UK, Henkhaus RS, Loupakis F, Cremolini C, Gerner EW, Ignatenko NA. Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2013. 133(1):43-57.
- Beck R, Monument MJ, Watkins WS, Smith R, Boucher KM et al. EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations. *Cancer Genet*. 2012. 205(6):304-12.
- Beliveau A, Mott JD, Lo A, Chen EI, Koller AA et al. RAF-Induced MMP-9 Disrupts Tissue Architecture of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and is Necessary for Tumor Growth in vivo. *Genes Dev*. 2010. 24(24):2800-11.
- Benassi MS, Gamberi G, Magagnoli G, Molendini L, Ragazzini P et al. Metalloproteinase Expression and Prognosis in Soft Tissue Sarcomas. *Ann Oncol* 2001. 12:75-80.
- Bender FC, Reymond MA, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res*. 2000. 60(20):5870-8.
- Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, Strammiello R et al. Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int J Cancer* 2004. 108(3):358-66.

- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A et al. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist*. 2006a. 11(5):503-19.
- Bernstein ML, Devidas M, Lafreniere D, Souid AK, Meyers PA et al. Intensive therapy with growth factor support for patients with Ewing tumor metastatic at diagnosis: Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Phase II Study 9457—a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2006b. 24:152–9.
- Bhoopathi P, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Lakka SS. SPARC mediates Src-induced disruption of actin cytoskeleton via inactivation of small GTPases Rho-Rac-Cdc42. *Cell Signal*. 2011. 23(12):1978-87.
- Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS, Lakka SS. The role of MMP-9 in the anti-angiogenic effect of secreted protein acidic and rich in cysteine. *Br J Cancer*. 2010. 102(3): 530–40.
- Boeva V, Surdez D, Guillon N, Tirode F, Fejes AP et al. De novo motif identification improves the accuracy of predicting transcription factor binding sites in CHIP-Seq data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38(11):e126.
- Borden EC, Baker LH, Bell RS, Bramwell V, Demetri GD et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin. Cancer Res*. 2003. 9:1941-56.
- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009. 459(7249):1005-9.
- Bradshaw AD. Diverse Biological functions of the SPARC family proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012. 44(3):480-8.
- Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May WA, Denny CT. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol*. 1995. 15(8):4623-30.
- Braunreiter CL, Hancock JD, Coffin CM, Boucher KM, Lessnick SL. Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma. *Cell Cycle*. 2006. 5(23):2753-9.
- Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of Caveolin-1 in Cancer Progression. *Cancer Letters* 2008. 268: 187-201.
- Bryant KG, Camacho J, Jasmin JF, Wang C, Addya S et al. Caveolin-1 overexpression enhances androgen-dependent growth and proliferation in the mouse prostate. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011. 43(9):1318-29.
- Byrne DP, Dart C, Rigden DJ. Evaluating caveolin interactions: do proteins interact with the caveolin scaffolding domain through a widespread aromatic residue-rich motif? *PLoS One*. 2012. 7(9):e44879.
- Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F et al. Activation of the Osteopontin/Matrix Metalloproteinase-9 Pathway Correlates with Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res* 2008. 14:7470-80.
- Cell Migration Consortium Gateway. www.cellmigration.org.

- Chaturvedi A, Hoffman LM, Welm AL, Lessnick SL, Beckerle MC. The EWS/FLI Oncogene Drives Changes in Cellular Morphology, Adhesion, and Migration in Ewing Sarcoma. *Genes Cancer*. 2012. 3(2):102-16.
- Chen J, Wang M, Xi B, Xue J, He D et al. SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *PLoS One*. 2012b;7(8):e42413.
- Chen J, Shi D, Liu X, Fang S, Zhang J, Zhao Y. Targeting SPARC by lentivirus-mediated RNA interference inhibits cervical cancer cell growth and metastasis. *BMC Cancer*. 2012a. 12:464.
- Chen K, Zhang S, Ji Y, Li J, An P et al. Baicalein Inhibits the Invasion and Metastatic Capabilities of Hepatocellular Carcinoma Cells via Down-Regulation of the ERK Pathway. *PLoS One*. 2013. 8(9):e72927.
- Cheng T, Roth B, Choi W, Black PC, Dinney C, McConkey DJ. Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting. *PLoS One*. 2013;8(2):e57284.
- Chiang AC & Massagué J. Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med* 2008. 359 (26): 2814-2823.
- Chicoine E, Estève PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. 297(4):765-72.
- Chiu WT, Lee HT, Huang FJ, Aldape KD, Yao J et al. Caveolin-1 upregulation mediates suppression of primary breast tumor growth and brain metastases by Stat3 inhibition. *Cancer Res*. 2011. 71(14):4932-43.
- Chlenski A & Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2010. 21(1):55-65.
- Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2010. 16(15):3901-9.
- Cironi L, Riggi N, Provero P, Wolf N, Suvà ML et al. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLoS ONE*. 2008. 3(7):e2634.
- Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF Jr, Weber MJ, Lannigan DA. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2005. 65: 3108-16.
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. 40(6-7):1362-78.
- Collins BM, Davis MJ, Hancock JF, Parton RG. Structure-based reassessment of the caveolin signaling model: do caveolae regulate signaling through caveolin-protein interactions? *Dev Cell*. 2012. 23(1):11-20.
- Corn PG & Thompson TC. Identification of a novel prostate cancer biomarker, caveolin-1: Implications and potential clinical benefit. *Cancer Manag Res*. 2010. 2:111-22.
- Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007. 293(6):H3356-65.

- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-Scaffolding Domain. Implications for the Interaction of Caveolin with Caveolae-Associated Proteins. *J Biol Chem*. 1997. 272(10):6525-33.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* 2002. 417:949-954.
- de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA et al. Prognosis impact of p53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000. 89:783-92.
- De Alava E. Molecular pathology in sarcomas. *Clin Transl Oncol* 2007. 9(3):130-44.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 1992. 359:162-5.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, et al. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*. 1994. 331:294-9.
- Dhawan P & Richmond A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem*. 2002. 277(10):7920-8.
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues: palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 1995. 270:6838-42.
- Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell* 2009. 35: 511-22.
- Dorfman, H.D. & Czerniak, B. Bone cancers. *Cancer*. 1995. 75:203-10.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M et al.. Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. *Science*. 2001. 293(5539):2449-52.
- Dragutinović VV, Radonjić NV, Petronijević ND, Tatić SB, Dimitrijević IB et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*. 2011. 355(1-2):173-8.
- Enache S, Arsene D, Iosif C, Stoicea M, Grigore A et al. Nestin and caveolin-1 in the diagnosis of GISTs. *Rom J Morphol Embryol*. 2012. 53(1):41-6.
- Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008. 30(6):425-30.
- Ewing J. Diffuse Endothelioma of Bone. *Proc N Y Pathol Soc* 1921. 21:17-24.
- Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010. 1803(1):3-19.
- Felicetti F, Parolini I, Bottero L, Fecchi K, Errico MC et al. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int J Cancer*. 2009.125(7):1514-22.

- Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutat Res*. 2013. 752(1):36-44.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995. 92, 8655–59.
- Freeman MR, Yang W, Di Vizio D. Caveolin-1 and prostate cancer progression. *Adv Exp Med Biol*. 2012. 729:95-110.
- Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105:10149-54.
- Ganjavi H, Gee M, Narendran A, Parkinson N, Krishnamoorthy M et al. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in pediatric soft-tissue sarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther*. 2005. 12(4):397-406.
- García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 1997. 272: 25437-40.
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*. 2008. 27(4):715-35.
- Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/ERKs and β -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2013. 288(12): 8168–75.
- Grande-García A & del Pozo MA. Caveolin-1 in cell polarization and directional migration. *Eur J Cell Biol*. 2008. 87(8-9):641-7.
- Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*. 2003. 4: 31–9.
- Grohar PJ & Helman LJ. Prospects and challenges for the development of new therapies for Ewing sarcoma. *Pharmacol Ther*. 2013. 137(2):216-24.
- Guan H, Zhou Z, Gallick GE, Jia SF, Morales J et al. Targeting Lyn Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Ewing's Sarcoma. *Mol Cancer Ther* 2008. 7:1807-16.
- Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The Oncogenic EWS/FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One*. 2009. 4(3):e4932.
- Gupta GP, Minn AJ, Kang Y, Siegel PM, Serganova I et al. Identifying site-specific metastasis genes and functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005. 70:149-58.
- Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 2007. 446(7137):765-70.
- Han F & Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res*. 2010. 159(1):443-50.

- Hancock JD & Lessnick SL. A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle*. 2008. 7(2):250-6.
- Hansen CG, Bright NA, Howard G, Nichols BJ. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nature Cell Biol*. 2009. 11, 807-814.
- Hansen CG. & Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol*. 2010. 20:177-86.
- He C. Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer Lett*. 1996. 106(2):185-91.
- Hildebrand O. Über das tubuläre Angiosarkom oder Endotheliom des Knochens. *Dtsch Z Chir*. 1890. 31:261-81.
- Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A et al. PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*. 2008. 132:113-24.
- Horiguchi A, Asano T, Asakuma J, Asano T, Sumitomo M, Hayakawa M. Impact of caveolin-1 expression on clinicopathological parameters in renal cell carcinoma. *J. Urol*. 2004. 172:718-22.
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*. 1999. 18(3):813-22.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*. 2004. 117(Pt 20):4619-28.
- Huang HJ, Angelo LS, Rodon J, Sun M, Kuenkele KP et al. R1507, an anti-insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) antibody, and EWS/FLI-1 siRNA in Ewing's sarcoma: convergence at the IGF/IGFR/Akt axis. *PLoS One*. 2011;6(10):e26060.
- Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG et al. Ewing sarcoma with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol*. 2005. 23:548-58.
- Hunold A, Weddeling N, Paulussen M, Ranft A, Liebscher C, Jürgens H. Topotecan and cyclophosphamide in patients with refractory or relapsed Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2006. 47:795-800.
- Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavaré JM. Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem J*. 2002. 368(Pt 2):573-80.
- Iwamoto Y. Diagnosis and Treatment of Ewing's Sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2007. 37(2):79-89.
- Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, Tannery NH, Agostini RM Jr et al. The neuroectodermal tumor of bone. *Am J Surg Pathol*. 1984. 8:885-98.
- Janknecht R. EWS-ETS Oncoproteins: The Linchpins of Ewing Tumors. *Gene*. 2005. 363:1-14.
- Jawad MU, Cheung MC, Min ES, Schneiderbauer MM, Koniaris LG, Scully SP. Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer*. 2009. 115(15):3526-36.

- Joshi B et al. Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2008. 68(20):8210-20.
- Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, Kojic LD, Cox ME et al. Phosphocaveolin-1 is a mechanotransducer that induces caveola biogenesis via Egr1 transcriptional regulation. *J Cell Biol.* 2012. 199(3):425-35.
- Kaminska B, Pyrzynska B, Ciechomska I, Wisniewska M. Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2000. 60(3):395-402.
- Kang S, Elf S, Lythgoe K, Hitosugi T, Taunton J et al. p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Clin Invest* 2010. 120:1165-77.
- Karosas AO. Ewing's Sarcoma. *Am J Health Syst Pharm.* 2010. 67(19):1599-605.
- Kaste SC Imaging pediatric bone sarcomas. *Radiol Clin North Am.* 2011. 49(4):749-65.
- Kauer M, Ban J, Kofler R, Walker B, Davis S et al. A Molecular Function Map of Ewing's Sarcoma. *PLoS ONE* 2009. 4(4):e5415.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010. 141(1):52-67.
- Kim HN & Chung HS. Caveolin-1 inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *BMB Rep.* 2008.41(12):858-62.
- Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P et al. Among genes involved in RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor supresor gene is frecuently lost in Ewing family tumors. *Oncogene.* 1997. 15:2225-32.
- Kuo SR, Tahir SA, Park S, Thompson TC, Coffield S et al. Anti-caveolin-1 antibodies as anti-prostate cancer therapeutics. *Hybridoma (Larchmt).* 2012. 31(2):77-86.
- Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S et al. A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-i receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2010. 16:2458-65.
- Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, Durocher Y, Roghi C et al. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 2004. 279(50):52132-40.
- Lai R, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Liu T, Fuller CE et al. STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol.* 2006. 208: 624-32.
- Lan YY, Hsiao JR, Chang KC, Chang JS, Chen CW et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A promotes invasion of nasopharyngeal carcinoma cells through ERK/Fra-1-mediated induction of matrix metalloproteinase 9. *J Virol.* 2012. 86(12):6656-67.
- Landemaine T, Jackson A, Bellahcène A, Rucci N, Sin S et al. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res.* 2008. 68(15):6092-9.
- Lara R, Mauri FA, Taylor H, Derua R, Shia A et al. An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis. *Oncogene.* 2011. 30(32):3513-21.

- Lara R, Seckl MJ, Pardo OE. The p90 RSK Family Members: Common Functions and Isoform Specificity. *Cancer Res.* 2013. 73(17):5301-8.
- Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D et al. RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(23): 9268-73.
- Lawlor ER, Scheel C, Irving J, Sorensen PH. Anchorage-independent multi-cellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* 2002. 21:307-18
- Lawlor ER & Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res.* 2012. 18:2768-79.
- Lee EJ, Park SS, Kim WJ, Moon SK. IL-5-induced migration via ERK1/2-mediated MMP-9 expression by inducing activation of NF- κ B in HT1376 cells. *Oncol Rep.* 2012. 28(3):1084-90.
- Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM et al. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol.* 2000. 14(11):1750-75.
- Lee HJ, Yoon C, Schmidt B, Park do J, Zhang AY et al. Combining PARP-1 Inhibition and Radiation in Ewing Sarcoma Results in Lethal DNA Damage. *Mol Cancer Ther.* 2013. 12(11):2591-600.
- Lee SH, Jaganath IB, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of Raf-MEK-ERK and Hypoxia pathways by *Phyllanthus* prevents metastasis in human lung (A549) cancer cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2013. 13(1):271. [Epub ahead of print].
- Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The α -isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:3863-68.
- Lin M, DiVito MM, Merajver SD, Boyanapalli M, van Golen KL. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Mol Cancer* 2005. 4: 21.
- Liu A, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE, Goldblum SE. The Counteradhesive Proteins, Thrombospondin 1 and SPARC, open the tyrosine phosphorylation-responsive paracellular pathway in pulmonary vascular endothelia. *Microvasc Res.* 2009. 77(1): 13-20.
- Liu L & Pilch PF. A Critical Role of Cavin (Polymerase I and Transcript Release Factor) in Caveolae Formation and Organization. *J Biol Chem* 2008. 283(7): 4314-22.
- Liu P y Wilson MJ. miR-520c and miR-373 target mTOR and SIRT1, activate the Ras/Raf/MEK/Erk pathway and NF-, with up-regulation of MMP-9 in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2012. 227(2):867-76.
- Llobart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch.* 2009. 455:397-411.
- Lobos-González L, Aguilar L, Diaz J, Diaz N, Urra H et al. E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013. 26(4):555-70.
- Lücke A. Beiträge zur Geschwulstlehre: III. Lympho-sarcom der Achseldrüse: embolische Geschwülste der Lungen; allgemeine Leukämie. *Tod. Virchows Arch.* 1866. 35:524-39.

- Ludwig JA. Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol*. 2008. 20(4):412-8.
- Mackintosh C, Ordóñez JL, García-Domínguez DJ, Sevillano V, Llombart-Bosch A et al. 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene*. 2012. 8;31(10):1287-98.
- Maloney DJ & Hecht SM. Synthesis of a potent and selective inhibitor of p90 Rsk. *Org Lett*. 2005. 7(6):1097-9.
- Martínez-Ramírez A, Rodríguez-Perales S, Meléndez B, Martínez-Delgado B, Urioste M et al. Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet* 2003. 141(2):138-42.
- McClung HM, Golembieski WA, Schultz CR, Jankowski M, Schultz LR, Rempel SA. Deletion of the SPARC acidic domain or EGF-like module reduces SPARC-induced migration and signaling through p38 MAPK/HSP27 in glioma. *Carcinogenesis*. 2012. 33(2):275-84.
- McMahon KA, Zajicek H, Li WP, Peyton MJ, Minna JD et al. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J*. 2009. 28:1001-15.
- Meier VS, Kühne T, Jundt G, Gudat F. Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations. *Diagn Mol Pathol* 1998. 7(1):29-35.
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010. 466:829-34.
- Miettinen M. From morphological to molecular diagnosis of soft tissue tumors. *Adv Exp Med Biol* 2006. 587:99-113.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005. 436(7050):518-24.
- Miser JS, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ et al. Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide – a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2004. 22:2873-76.
- Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B et al. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol. Cell. Biol*. 2008. 28:2125-37.
- Monument MJ, Bernthal NM, Randall RL. Salient features of mesenchymal stem cells-implications for Ewing sarcoma modeling. *Front Oncol*. 2013. 3:24.
- Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol*. 2004. 198(3):417-27.
- Nadratowska-Wesolowska B, Haugsten EM, Zakrzewska M, Jakimowicz P, Zhen Y et al. RSK2 regulates endocytosis of FGF receptor 1 by phosphorylation on serine 789. *Oncogene*. 2013 Oct 21. doi: 10.1038/onc.2013.425. [Epub ahead of print].

- Nagaraju GP & El-Rayes BF. SPARC and DNA methylation: possible diagnostic and therapeutic implications in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* 2013. 328(1):10-7.
- Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong DS, Anderson P et al. Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res.* 2012. 18(9):2625-31.
- Napetschnig J & Wu H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013. 42: 443-68.
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cros J, Faivre S, Hammel P, Raymond E. Stromal expression of SPARC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2013 May 21. [Epub ahead of print].
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009. 9(4):274-84.
- Nguyen DX & Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Rev Genet.* 2007. 8:341-52.
- Norris RE, Adamson PC, Nguyen VT, Fox E. Preclinical evaluation of the PARP inhibitor, olaparib, in combination with cytotoxic chemotherapy in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Sep 4. doi: 10.1002/pbc.24697. [Epub ahead of print]
- O'Connor K & Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases.* 2013 Jun 10;4(3). [Epub ahead of print].
- Olmos D, Tan DS, Jones RL, Judson IR.. Biological rationale and current clinical experience with antiinsulin- like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J.* 2010. 16:183-94.
- Ordóñez JL, Osuna D, Herrero D, de Alava E, Madoz-Gúrpide J. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res.* 2009. 69(18):7140-50.
- Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S et al. Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010. 49(1):40-51.
- Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites, *Mol. Biotechnol.* 2002. 22:51-86.
- Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One.* 2008. 3, e1965.
- Pancotti F, Roncuzzi L, Maggiolini M, Gasperi-Campani A. Caveolin-1 silencing arrests the proliferation of metastatic lung cancer cells through the inhibition of STAT3 signaling. *Cell Signal.* 2012. 24(7):1390-7.
- Parton RG & Simons K. The Multiple Faces of Caveolae. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2007. 8(3):185-94.
- Parton RG & del Pozo MA .Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013. 14(2):98-112.

- Patel HH, Murray F, Insel PA. Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008. 48:359-91.
- Phay JE, Shah MH. Targeting RET Receptor Tyrosine Kinase Activation in Cancer. *Clin Cancer Res* 2010. 16:5936-41.
- Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Yokoi S et al. Immunohistochemical analysis with multiple antibodies in search of prognostic markers for clear cell renal cell carcinoma. *Urology*. 2007. 69(5):843-8.
- Poplineau M, Doliwa C, Schnekenburger M, Antonicelli F, Diederich M et al. Epigenetically induced changes in nuclear textural patterns and gelatinase expression in human fibrosarcoma cells. *Cell Prolif*. 2013. 46(2):127-36.
- Potikyan G, France KA, Carlson MR, Dong J, Nelson SF, Denny CT. Genetically defined EWS/FLI1 model system suggests mesenchymal origin of Ewing's family tumors. *Lab. Invest*. 2008. 88:1291-302.
- Potratz J, Jürgens H, Craft A, Dirksen U. Ewing Sarcoma: Biology-Based Therapeutic Perspectives. *Pediatr Hematol Oncol*. 2012a. 29(1):12-27.
- Potratz J, Dirksen U, Jürgens H, Craft A. Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr Hematol Oncol*. 2012b. 29(1):1-11.
- Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol*. 2004. 24:7275-83.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J. Cell. Mol. Med*. 2008. 12(4):1130-50.
- Ramachandran A, Ranpura SA, Gong EM, Mulone M, Cannon GM Jr, Adam RM. An Akt- and Fra-1-dependent pathway mediates platelet-derived growth factor-induced expression of thrombomodulin, a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Am J Pathol*. 2010. 177(1):119-31.
- Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. 40(12):2707-19.
- Raney RB, Asmar L, Newton WA Jr, Bagwell C, Breneman JC et al. Ewing's sarcoma of soft tissues in childhood: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972 to 1991. *J Clin Oncol*. 1997. 15:574-82.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 2001. 276(41):38121-38.
- Richter GH, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R et al. EZH2 is a Mediator of EWS/FLI1 Driven Tumor Growth and Metastasis Blocking Endothelial and Neuro-ectodermal Differentiation. *PNAS* 2009. 106(13): 5324-29.
- Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P et al. EWS-FLI1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008. 68:2176-85.

- Riggi N & Stamenkovic I. The biology of Ewing sarcoma. *Cancer letters*. 2007. 254:1-10.
- Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F et al. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest*. 2010. 120:668-80.
- Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*. 2012. 441(2):553-69.
- Rosenblatt S, Bassuk JA, Alpers CE, Sage EH, Timpl R, Preissner KT. Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins characterization of the binding of vitronectin to SPARC. *Biochem. J*. 1997. 324:311-19.
- Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, Function and Regulation. *Pharmacol Res*. 2012. 66(2):105-43.
- Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*. 2007. 282(19):14056-64.
- Saha M, Carriere A, Cheerathodi M, Zhang X, Lavoie G et al. RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *Biochem. J*. 2012. 447:159-66.
- Said N, Frierson HF, Sanchez-Carbayo M, Brekken RA, Theodorescu D. Loss of SPARC in bladder cancer enhances carcinogenesis and progression. *J Clin Invest*. 2013. 123(2): 751-66.
- Sancéau J, Hiscott J, Delattre O, Wietzerbin J. IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene*. 2000 Jul 13;19(30):3372-83.
- Sánchez FA, Rana R, Kim DD, Iwahashi T, Zheng R et al. Internalization of eNOS and NO delivery to subcellular targets determine agonist-induced hyperpermeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(16):6849-53.
- Sanchez G, Bittencourt D, Laud K, Barbier J, Delattre O et al. Alteration of cyclin D1 transcript elongation by a mutated transcription factor up-regulates the oncogenic D1b splice isoform in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105:6004-09.
- Sankar S, Bell R, Stephens B, Zhuo R, Sharma S et al. Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma. *Oncogene*. 2013. 32(42):5089-100.
- Sankar S & Lessnick SL. Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet*. 2011. 204:351-65.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. 92:9407-11.
- Saylors RL 3rd, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA et al. Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol* 2001. 19:3463-9.

- Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 1995. 270:16395-401.
- Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2001. 276(6):4398-408.
- Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G et al. Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res*. 1998. 58:4127-31.
- Sengupta A, Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Auto-stimulatory action of secreted caveolin-1 on the proliferation of Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol*. 2011. 38(5):1259-65.
- Shatz M, Lustig G, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 mutants P132L and Y14F are dominant negative regulators of invasion, migration and aggregation in H1299 lung cancer cells. *Exp Cell Res*. 2010. 316(10):1748-62.
- Shen LC, Chen YK, Hsue SS, Shaw SY. Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2010. 39(3):242-9.
- Shin M, Mizokami A, Kim J, Ofude M, Konaka H et al. Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin β 1. *Prostate*. 2013. 73(11):1159-70.
- Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2006. 66(18):9202-10.
- Silvany RE, Eliazer S, Wolff NC, Ilaria RL Jr. Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. *Oncogene*. 2000. 19(39):4523-30.
- Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res*. 2005. 65(3):1027-34.
- Smith MA, Morton CL, Phelps D, Girtman K, Neale G, Houghton PJ. SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr Blood Cancer*. 2008. 50(3):703-6.
- Smolen GA, Zhang J, Zubrowski MJ, Edelman EJ, Luo B et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration. *Genes Dev*. 2010. 24(23): 2654-65.
- Song Y, Qian L, Song S, Chen L, Zhang Y et al. Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. *Mol. Immunol*. 2008. 45, 137-43.
- Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Pestell RG, Pavlides S, Lisanti MP. Caveolin-1 and Cancer Metabolism in the Tumor Microenvironment: Markers, Models, and Mechanisms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2012. 7:423-67.
- Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE 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.

- Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, Chow KT, Peck D et al. Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS Med.* 2007. 4(4):e122.
- Stout AP. A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc*, 1918. 18:2-12.
- Subbiah V, Anderson P, Lazar AJ, Burdett E, Raymond K, Ludwig JA. Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr Treat Options Oncol.* 2009. 10(1-2):126-40.
- Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2002. 2(4):301-14.
- Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M et al. EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 2003. 63(23):8338-44.
- Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007. 129:1377-88.
- Takizawa N, Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Secreted caveolin-1 enhances periodontal inflammation by targeting gingival fibroblasts. *Biomed Res.* 2013. 34(1):1-11.
- Tang Y, Zeng X, He F, Liao Y, Qian N, Toi M. Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer. *Med Oncol.* 2012. 29(2):977-84.
- Tap WD, Demetri G, Barnette P, Desai J, Kavan P et al. Phase II study of ganitumab, a fully human anti-type-1 insulin-like growth factor receptor antibody, in patients with metastatic Ewing family tumors or desmoplastic small round cell tumors. *J Clin Oncol.* 2012. 30(15):1849-56.
- Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2011. 11(8):541-57.
- Thomas S, Overdevest JB, Nitz MD, Williams PD, Owens CR et al. Src and Caveolin-1 Reciprocally Regulate Metastasis via a Common Downstream Signaling Pathway in Bladder Cancer. *Cancer Res* 2011. 71:832-41.
- Thompson TC, Timme TL, Li L, Goltsov A. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis.* 1999. 4(4):233-7.
- Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKC α phosphorylation. *Int J Cancer.* 2010. 126(2):426-36.
- Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* 2006. 66(20): 9937-47.
- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell.* 2007. 11:421-9
- Tolcher AW, Sarantopoulos J, Patnaik A, Papadopoulos K, Lin CC et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1. *J Clin Oncol.* 2009. 27:5800-07.

- Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL. Ewing's sarcoma pathogenesis. *Oncogene*. 2010. 29(32):4504-16.
- Toretzky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ. The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*. 1997. 272:30822-7.
- Tse EY, Ko FC, Tung EK, Chan LK, Lee TK et al. Caveolin-1 overexpression is associated with hepatocellular carcinoma tumourigenesis and metastasis. *J Pathol*. 2012. 226(4):645-53.
- Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet*. 1984. 12:1-19.
- Urra H, Torres VA, Ortiz RJ, Lobos L, Díaz MI et al. Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One*. 2012. 7(4):e33085.
- Vetterkind S, Poythress RH, Lin QQ, Morgan KG. Hierarchical scaffolding of an ERK1/2 activation pathway. *Cell Commun Signal*. 2013. 11(1):65. [Epub ahead of print].
- von Levetzow C, Jiang X, Gwee Y, von Levetzow G, Hung L et al. Modeling initiation of Ewing sarcoma in Human Neural Crest Cells. *PLoS One*. 2011. 6(4):e19305.
- Waalkes S, Eggers H, Blasig H, Atschekzei F, Kramer MW et al. Caveolin 1 mRNA is overexpressed in malignant renal tissue and might serve as a novel diagnostic marker for renal cancer. *Biomark Med*. 2011. 5(2):219-25.
- Wagner LM, Crews KR, Iacono LC, Houghton PJ, Fuller CE et al. Phase I trial of temozolomide and protracted irinotecan in pediatric patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 2004. 10:840-8.
- Wagner LM, McAllister N, Goldsby RE, Rausen AR, McNall-Knapp RY et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007. 48:132-9.
- Wagner L. Camptothecin-based regimens for treatment of Ewing sarcoma: past studies and future directions. *Sarcoma* 2011, 2011:957957.
- Wang YX, Mandal D, Wang S, Hughes D, Pollock RE et al. Inhibiting Platelet-Derived Growth Factor Beta Reduces Ewing's Sarcoma Growth and Metastasis in a Novel Orthotopic Human Xenograft Model. *In Vivo*. 2009. 23(6):903-9.
- Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG et al. Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000. 89:793-99.
- Wells A, Grahovac J, Wheeler S, Ma B, Lauffenburger D. Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends Pharmacol Sci*. 2013. 34(5):283-9.
- Williams TM & Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol*. 2004. 5(3):214.
- Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J et al. Caveolin-1 Gene Disruption Promotes Mammary Tumorigenesis and Dramatically Enhances Lung Metastasis in vivo. Role of Cav-1 In Cell Invasiveness And Matrix Metalloproteinase (MMP-2/9) Secretion. *J Biol Chem*. 2004. 279(49):51630-46.

- Wortzel I & Seger R. The ERK cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*. 2011. 2(3): 195–209.
- Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009. 69(22):8594-602.
- Yamamoto T, Ohno T, Wakahara K, Nagano A, Kawai G et al. Simultaneous inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways augment the sensitivity to actinomycin D in Ewing sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009. 135(8):1125-36.
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr, Ishikawa Y. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem*.1998. 273: 26962-8.
- Yamamoto M, Toya Y, Jensen RA, Ishikawa Y. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res* 1999. 247: 380-8.
- Yang F, Zhang Y, Ressler SJ, Ittmann MM et al. FGFR1 is essential for prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Res*. 2013. 73(12):3716-24.
- Yang G, Truong LD, Wheeler TM, Thompson TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res*. 1999. 59(22):5719-23.
- Yao Z & Seger R. The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *Biofactors*. 2009. 35(5):407-16.
- Yilmaz M & Christofori G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol Cancer Res* 2010. 8(5):629-42.
- Zenali MJ, Zhang PL, Bendel AE, Brown RE. Morphoproteomic confirmation of constitutively activated mTOR, ERK, and NF-kappaB pathways in Ewing family of tumors. *Ann Clin Lab Sci*. 2009. 39(2):160-6.
- Zhang J, Hu S, Schofield DE, Sorensen PH, Triche TJ. Selective usage of D-type cyclins by Ewing's tumors and rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*. 2004. 64:6026-34.
- Zhao ZS, Wang YY, Chu YQ, Ye ZY, Tao HQ. SPARC is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin Cancer Res*. 2010. 16(1):260-8.
- Zhu XC, Dong QZ, Zhang XF, Deng B, Jia HL et al. microRNA-29a suppresses cell proliferation by targeting SPARC in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*. 2012. 30(6):1321-6.
- Zorzi AP, Bernstein M, Samson Y, Wall DA, Desai S et al. A phase I study of histone deacetylase inhibitor, pracinostat (SB939), in pediatric patients with refractory solid tumors: IND203 a trial of the NCIC IND program/C17 pediatric phase I consortium. *Pediatr Blood Cancer*. 2013. 60(11):1868-74.
- Zwerner JP, Joo J, Warner KL, Christensen L, Hu-Lieskovan S et al. The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. *Oncogene*. 2008. 27(23):3282-91.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

Anexo I

	Estadio		Tamaño tumoral		Localización tumoral	
	Localizado	Metastásica	<8cm	>8cm	Axial	Extremidad
p-rpS6 (n=26)						
Negativo	8	6	4	10	9	5
Positivo	10	2	5	7	7	5

Tabla 14. Resultados de la tinción por inmunohistoquímica para p-rpS6 de 26 muestras de pacientes de SE embebidas en parafina en un TMA y su distribución según el estadio, tamaño y localización tumoral. No se halló correlación.

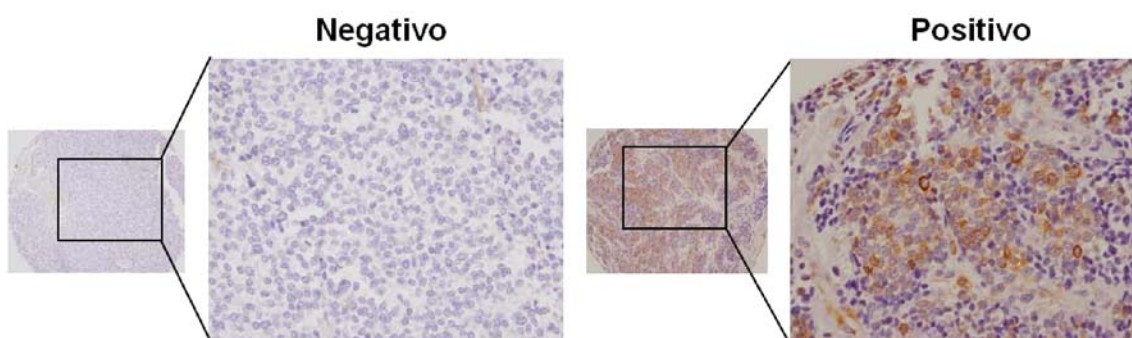


Figura 82. Imágenes de la tinción de p-rpS6 en muestras de pacientes de SE del TMA que ejemplifican las muestras consideradas como negativas y positivas para p-rpS6. (100X, recuadro 400X).

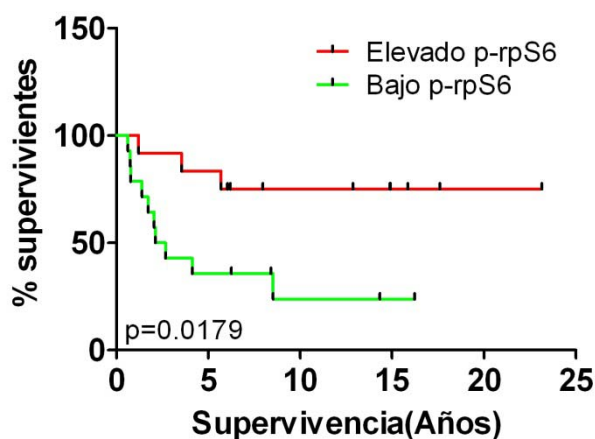


Figura 83. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de pacientes de SE distribuidos según la tinción para p-rpS6 obtenida en el TMA.

Caveolina-1 en la progresión metastásica del Sarcoma de Ewing

Anexo II

Durante el desarrollo de esta tesis, la doctoranda ha participado en la elaboración de dos manuscritos y dos *reviews* que se adjuntan a continuación:

Sáinz-Jaspeado M*, Lagares-Tena L*, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan X, Garcia Del Muro X, Fabra A, Tirado OM. **Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize**. Mol Cancer Res. 2010. 8(11):1489-500. *Estos autores contribuyeron por igual.

Sáinz-Jaspeado M, Martin-Liberal J, Lagares-Tena L, Mateo-Lozano S, Garcia del Muro X, Tirado OM. **Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe?** Oncotarget. 2011. 2(4):305-12.

Martín Liberal J, Lagares-Tena L, Sáinz-Jaspeado M, Mateo-Lozano S, García Del Muro X, Tirado OM. **Targeted therapies in sarcomas: challenging the challenge**. Sarcoma. 2012; 2012:626094.

Sáinz-Jaspeado M, Huertas-Martinez J, Lagares-Tena L, Martin Liberal J, Mateo-Lozano S, de Alava E, de Torres C, Mora J, Del Muro XG, Tirado OM. **EphA2-induced angiogenesis in ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent on caveolin-1**. PLoS One. 2013. 8(8):e71449.

Caveolin-1 Modulates the Ability of Ewing's Sarcoma to Metastasize

Miguel Sáinz-Jaspeado¹, Laura Lagares-Tena¹, Jaime Lasheras¹, Fariba Navid³, Carlos Rodriguez-Galindo³, Silvia Mateo-Lozano², Vicente Notario⁴, Xavier Sanjuan¹, Xavier Garcia del Muro¹, Àngels Fabra¹, and Oscar M. Tirado¹

Abstract

Metastasis is the final stage of tumor progression and is thought to be responsible for up to 90% of deaths associated with solid tumors. Caveolin-1 (CAV1) regulates multiple cancer-associated processes related to malignant tumor progression. In the present study, we tested the hypothesis that CAV1 modulates the metastatic ability of cells from the Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT). First, we analyzed the expression of CAV1 by immunostaining a tissue microarray containing 43 paraffin-embedded ESFT tumors with known EWS translocations. Even though no evidence was found for a significant association between CAV1 expression and stage, size or tumor site, all metastatic samples (10 of 10) had significantly high CAV1 expression, suggesting that high CAV1 content could positively contribute to enhance ESFT metastasis. To determine the effect of CAV1 on the migratory and invasive capabilities of ESFT cells, we knocked down CAV1 expression in TC252 and A673 cells by stably transfecting a previously validated shRNA construct. *In vitro*, migration and invasion assays showed that for both cell lines, CAV1 knocked-down cells migrated and invaded significantly less ($P \leq 0.01$) than control cells. Moreover, control A673 cells introduced into BALB/c nude mice by tail vein injection strongly colonized the lungs. In contrast, animals injected with CAV1 knocked-down cells showed either no incidence of metastasis or developed lung metastases after a significant delay ($P < 0.0001$). Finally, we show that the molecular mechanisms by which CAV1 carries out its key role in regulating ESFT metastasis involve matrix metalloproteinase production and activation as well as the control of the expression of SPARC, a known determinant of lung colonization. *Mol Cancer Res*; 8(11); OF1–12. ©2010 AACR.

Introduction

Metastasis is the final stage in tumor progression and is thought to be responsible for up to 90% of deaths associated with solid tumors. This multifaceted process con-

sists of a series of steps whereby cancer cells enter the circulation, disseminate to distal capillary beds, enter a parenchyma by extravasation, adapt to the new host microenvironment, and eventually grow into lethal tumor colonies in distal organs (1). Much has been learned about the processes that initiate and sustain general tumor growth; however, the mechanisms that enable metastasis remain largely unknown.

The Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT) includes aggressive bone-associated malignancies that affect the pediatric population. ESFT are characterized by early metastases, and metastatic spread is commonly hematogenous. Nearly all patients with ESFT already have micrometastases at diagnosis, resulting in a >95% relapse rate when treated locally and a 40% relapse rate after systemic chemotherapy. Therefore, knowledge of key regulators of circulating or dormant metastatic tumor cells after traditional therapy is needed. Most ESFT harbor a reciprocal translocation, $t(11;22)(q24;q12)$, which links a strong transcriptional activation domain from the EWS to the ETS DNA-binding domain of FLI-1 (2). The *EWS/FLI-1* fusion is required for Ewing's sarcoma oncogenesis, as inhibition of its function results in the loss of transformation of ESFT cells (3–5). Thus, enhancing our current knowledge of EWS/FLI-1 function is critical to understanding ESFT development.

Authors' Affiliations: ¹Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Laboratori d'Oncologia Molecular, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²Nanomedicine Research Program, Molecular Biology and Biochemistry Research Center, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Barcelona, Spain; ³Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; and ⁴Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Department of Radiation Medicine, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington, District of Columbia

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

Current address for J. Lasheras: Departament de Metabolisme i Obesitat, Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

M. Sáinz-Jaspeado and L. Lagares-Tena contributed equally to this work.

Corresponding Author: Oscar M. Tirado, Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals-3^a Planta Gran via s/n Km. 2, 7, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Phone: 34-9326-07402; Fax: 34-9326-07426. E-mail: omartinez@idibell.cat

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0060

©2010 American Association for Cancer Research.

Caveolin-1 (CAV1) was previously identified as a metastasis-associated gene that is a transcriptional target of EWS/FLI-1 as well as an important determinant of ESFT malignant phenotype, tumorigenicity, and resistance to chemotherapy-induced apoptosis of ESFT cells (6, 7). CAV1 is a multifunctional scaffolding protein with multiple binding partners that associates with cell surface caveolae. CAV1 regulates multiple cancer-associated processes including cellular transformation, tumor growth, cell death and survival, multidrug resistance, angiogenesis, cell migration, and metastasis (8). Clinical studies have revealed that CAV1 upregulation is associated with poor prognosis and the occurrence of metastasis in several human cancers (9). Moreover, it was recently reported that CAV1 regulates cell migration and invasion in human breast cancer cells (10).

A better understanding of the complex biology of ESFT may lead to the successful development of biologically targeted therapies. As the regulatory pathways responsible for transformation, growth, and metastasis of ESFT become well defined, the efficacy of therapeutic intervention will improve. Therefore, because the possible involvement of CAV1 in the ability of ESFT to metastasize has not been established to date, we tested the hypothesis that CAV1 modulates the metastatic ability of ESFT cells. Our results show that CAV1 controls migration and invasion in ESFT cells in culture by mechanisms involving the production and activation of metalloproteinases as well as lung colonization in nude mice by regulating SPARC expression levels. These data conclusively show that CAV1 plays a key role in ESFT metastasis.

Materials and Methods

Tissue samples

Forty-three tumor samples were procured from the archives of the St. Jude Children's Research Hospital Pathology Department and referring institutions. A minimum of three representative cores from ESFT tumors were used to construct a tissue microarray (TMA) using a manual arrayer (Beecher Instruments). All tumor samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, and had not undergone decalcification. Cores from various normal paraffin-embedded tissues were scattered in each of the TMA blocks as controls. Samples from two patients in the TMA were lost during immunohistochemical procedures; therefore, Table 1 only shows results from 41 patients.

Immunohistochemistry

Expression of CAV1 in human Ewing's sarcoma and lung metastasis specimens was analyzed using immunohistochemical techniques done essentially as previously described (6, 7). CAV1 was detected with a 1:2,000 dilution of a rabbit polyclonal antibody (from BD Biosciences). Protein expression levels were coded as 0, 1 (low expression), or 2, and 3 (high expression) according to the level of staining (Fig. 1). Matrix metalloproteinase 9

(MMP9) was detected with a 1:100 dilution of a mouse monoclonal antibody (Abcam).

Cell culture and stable transfections

A673 and TC252 cell lines (gifts from Dr. Heinrich Kovar, Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen). All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Exponentially growing cells within two sequential passages were used for all experiments. Cells were transfected using Fugene (Roche) following the protocols of the manufacturer. Transfected cells were selected with neomycin (0.4 mg/mL, ShCAV1; Invitrogen) and with puromycin (0.5 µg/mL, ShSPARC; Sigma; ref. 11) for 14 days, and antibiotic-resistant pools and individual colonies were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (0.2 mg/mL) and puromycin (0.1 µg/mL), respectively.

Reverse transcription-PCR

Total RNA (3 µg), extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Amplifications of SPARC, MMP2, MMP9, TIMP2, and β-actin were carried out using specific primers (Supplementary Table) designed using the Oligo 6.0 software (National Bioscience). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semiquantitative estimate of relative mRNA abundance. Reverse transcription-PCR determinations were carried out at least twice for each relevant transcript.

Western blot

ESFT cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer containing protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/mL aprotinin, and 10 mg/mL leupeptin) and the lysates were centrifuged at 13,000 × g, at 4°C, for 30 minutes. The protein content of the supernatants was determined with the BCA assay system (Pierce). Lysate aliquots (50 µg) were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking with 5% skimmed milk in PBS containing 0.2% Tween 20 at room temperature for 1 hour, membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (CAV1 from BD, SPARC from Abcam, and FLI-1 from Santa Cruz Biotechnology). Blots were then incubated at room temperature for 1 hour with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000) and the peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (Pierce) following the instructions of the manufacturer. Immunodetection of β-actin was used as a loading reference.

Migration assays

Wound-healing assay. Cells cultured to 95% confluence were scratched with a 10-µL pipette tip. Wounds were

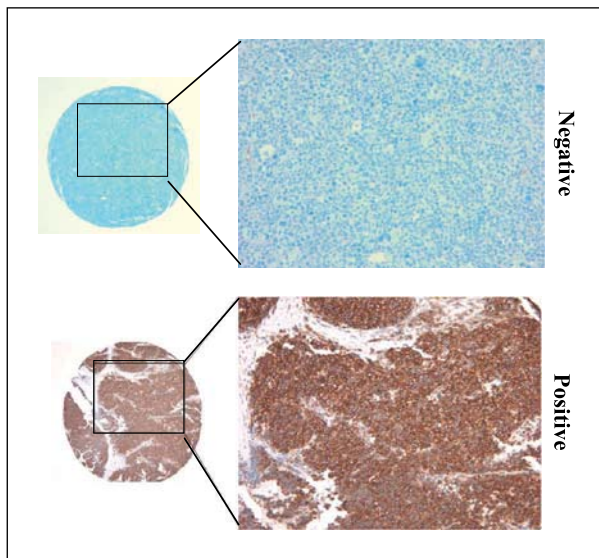


FIGURE 1. Example of negative and positive CAV1 staining of a human ESFT patient sample from the TMA (magnification, $\times 40$; insert, $\times 400$).

photographed immediately and followed by imaging at later time points (the ensuing wound closure was photographed using an OLYMPUS Inverted Microscope). The nude area was measured and the percentage of wound closure was calculated.

Transwell migration assay. Cells (2.0×10^5) in 100 μ L of serum-free medium were added to the top chamber of 8- μ m Costar polycarbonate transwells, while 500 μ L of complete medium was added to the bottom chamber. After allowing migration for various times (37°C, 100% humidity, 5% CO₂ in air), cells on the upper membrane surface were removed and migrant cells on the membrane underside were fixed using 70% ethanol, stained using 0.1% crystal violet solution (Invitrogen), and visualized and counted under the microscope. Data were presented as the average number of migrating cells in eight high-power fields (200 \times). Each experiment was done in triplicate, and then the data were averaged for statistical analysis.

Invasion assays

Matrigel-coated, sterile 8- μ m polycarbonate filters (BD PharMingen) were rehydrated as described above. The lower chambers of the 24-well plate were filled with 0.5 mL of complete medium, then 0.5 mL of serum-free RPMI 1640 containing 2.0×10^5 tumor cells was added to the transwell chambers, and the plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere for 48 hours. Further staining and recording of results was done as mentioned above (see Migration assays). The specific MMP2/9 inhibitor [*N*-phenylsulfonyl-hydroxamic acid derivative (2R-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-*N*-hydroxy-3-phenylpropinamide); 10 μ mol/L] was purchased from Calbiochem.

Gelatin zymography

Metalloproteinase activity was analyzed by gelatin zymography. In brief, conditioned medium was concentrated to one-third of its original volume and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels (10%) containing 120 μ g/mL of gelatin. After electrophoresis, the gel was incubated for 60 minutes in 2.5% Triton X-100 and overnight at 37°C in 50 mmol/L of Tris (pH 8.0)/5 mmol/L CaCl₂. Then, the gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue and destained with 10% isopropanol in 10% acetic acid, and the gelatinolytic activity was identified as transparent bands in the Coomassie brilliant blue-stained background.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Cells were cultured in sterile slides (Lab-Tek Chamber Slide System, NUNC) for 24 hours and fixed with 4% formaldehyde, washed thrice in Dulbecco's PBS (D-PBS), permeabilized in 0.1% Triton for 2 minutes, blocked for 1 hour in blocking buffer (10% goat serum in D-PBS), and incubated with primary antibodies overnight. Cells were then washed thrice in D-PBS for 5 minutes each followed by a 1-hour incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit; Invitrogen). Then, cells were washed twice in D-PBS for 10 minutes and twice in distilled water for 10 minutes, and mounted in ProLong Gold antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen). Photographs were taken with a Leica TCS SP5 spectral confocal microscope (argon, 405 diode and DPSS561 lasers) using a lambda blue 63 \times 1.35 numerical aperture oil objective. Images were analyzed with the MacBiophotonics ImageJ program.

Triton X-114 extraction

Extraction of membrane proteins was done essentially as described previously (12). An equal number of cells ($\sim 1 \times 10^6$) from each cell line tested was cultured in 100-mm dishes for 3 days. Cells were then washed with TBS, incubated for 20 minutes on ice with 2.5% Triton X-114 detergent (Sigma) and scraped. Triton X-114 has the property of separating into aqueous and detergent (hydrophobic) phases at temperatures above 20°C, and amphiphilic integral membrane proteins remain in the detergent phase. Triton X-114 extracts were centrifuged (13,000 $\times g$ for 15 min at 4°C) to remove Triton X-114-insoluble material, incubated at 37°C for 5 minutes and spun at 3,000 $\times g$ for 2 minutes at room temperature to separate the aqueous and the hydrophobic phases. Aliquots (100 μ L) of each hydrophobic phase were stored at -80°C.

Experimental metastasis assay

An *in vivo* experimental metastasis model was established by injection of 2×10^6 A673 cells suspended in 100 μ L of saline into the tail vein of athymic nude mice (BALB/c^{nu/nu}) from Harlan. Animal care and procedures were followed according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Mice were

fed under standard conditions with weight monitoring, sacrificed after manifestation of morbidity, and their lungs were removed for further analysis.

Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance using Student's *t* test and ANOVA. Survival curves were generated by Kaplan-Meier method and compared by using the log rank test. Unless otherwise stated, $P \leq 0.01$ was regarded as significant.

Results

First, we analyzed the expression of CAV1 by immunostaining a TMA containing 43 paraffin-embedded ESFT tumors with known EWS translocations (13). As expected, and in agreement with previous studies, ~85% of the patients expressed CAV1. Clinicopathologic analyses revealed that CAV1 overexpression correlated significantly with metastasis and poor prognosis in several human cancers, including prostate, breast, and lung cancer (14). Although no evidence was found for a significant association between CAV1 expression and stage, size, or tumor site, all metastatic samples (10 of 10) had significantly high CAV1 expression (Table 1), suggesting that high CAV1 content could positively contribute to enhancing ESFT metastasis.

To metastasize, tumor cells need to migrate from the primary site (15). To determine the effect of CAV1 on the migratory and invasive capabilities of ESFT cells, we knocked down CAV1 expression in TC252 and A673 cells (Fig. 2A) by stably transfecting a previously validated shRNA construct (6, 7). EWS/FLI-1 protein levels were unaffected by downregulation of CAV1 (Supplementary Fig. S1), further demonstrating the specificity of the shRNA construct. *In vitro*, wound-healing (Fig. 2B) and transwell migration assays (Fig. 2C) showed that in both cell lines, CAV1 knocked-down cells migrated significantly less ($P \leq 0.01$) than mock- and vector-transfected cells. These results are consistent with previous reports that show the key role of CAV1 regulating the migratory capability of selected metastatic cell lines (10, 16).

As the acquisition of an invasive phenotype by cancer cells is a critical step for tumor progression (15), we also examined the effects of CAV1 downregulation on the invasive ability of

CAV1 knocked-down ESFT cells derived from both cell lines. Relative to control cells, as shown in Fig. 3A, downregulation of CAV1 correlated significantly ($P \leq 0.01$) with a reduction in the invasiveness of A673 and TC252 cells. Early events in cancer cell invasion and metastasis involve the proteolytic degradation of extracellular matrix components. MMP are zinc-containing proteolytic enzymes that cleave extracellular matrix proteins, and play important roles in tumor cell migration and invasion. Along with other family members, MMP9 and MMP2 are able to degrade the main components of the basement membranes and play a key role in metastasis (17). To determine whether ESFT invasion was associated with MMP activation, conditioned media from both model cell cultures were analyzed by zymography with gelatin as the substrate (Fig. 3B). The proteolytic activities of MMP9 and MMP2 were present in conditioned medium from all cell lines. Interestingly, the band detected at 100 kDa (corresponding to the pro-MMP9 precursor form that became active during zymography), was found to be substantially decreased in all CAV1 knocked-down cell lines. Furthermore, a faster migrating gelatinolytic form of MMP2 was present only in the control cells, but was undetectable in CAV1 knocked-down cells, suggesting that CAV1 expression is required for MMP9 production and MMP2 activation. The involvement of MMPs on the invasive ability of Ewing's sarcoma cells was further confirmed by using a known MMP2/9 inhibitor [*N*-phenylsulfonyl-hydroxamic acid derivative (2R-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-*N*-hydroxy-3-phenylpropinamide)], which induced a significant reduction in the invasiveness of A673 and TC252 cells (Supplementary Fig. S2). MMP9 production had been shown to be regulated at the transcriptional level in other tumor types (18). To determine whether the MMP9 decrease was associated with a downregulation of its mRNA levels, we compared the expression of MMP9, MMP2, and TIMP2 in cells derived from both CAV1 silencing models by reverse transcription-PCR. As shown in Fig. 3C, only MMP9 mRNA was downregulated as a consequence of CAV1 knockdown, suggesting that CAV1 regulates MMP9 expression differently from the way it affects other MMPs.

Activation of the secreted pro-MMP2 is mediated by a cell surface complex that consists of a homodimer of membrane type 1-MMP (MT1-MMP) and a single molecule of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2; a natural

Table 1. Summary of TMA data with regard to CAV1 expression (negative versus positive) and clinical features

	Stage		Tumor size		Tumor site	
	Localized	Metastatic	<8 cm	>8 cm	Axial	Ext.
Caveolin (<i>n</i> = 41)						
Negative (0-1)	2	0	1	1	1	1
Positive (2-3)	25	10	12	23	24	11
Null/unsure	4	0	1	3	2	2

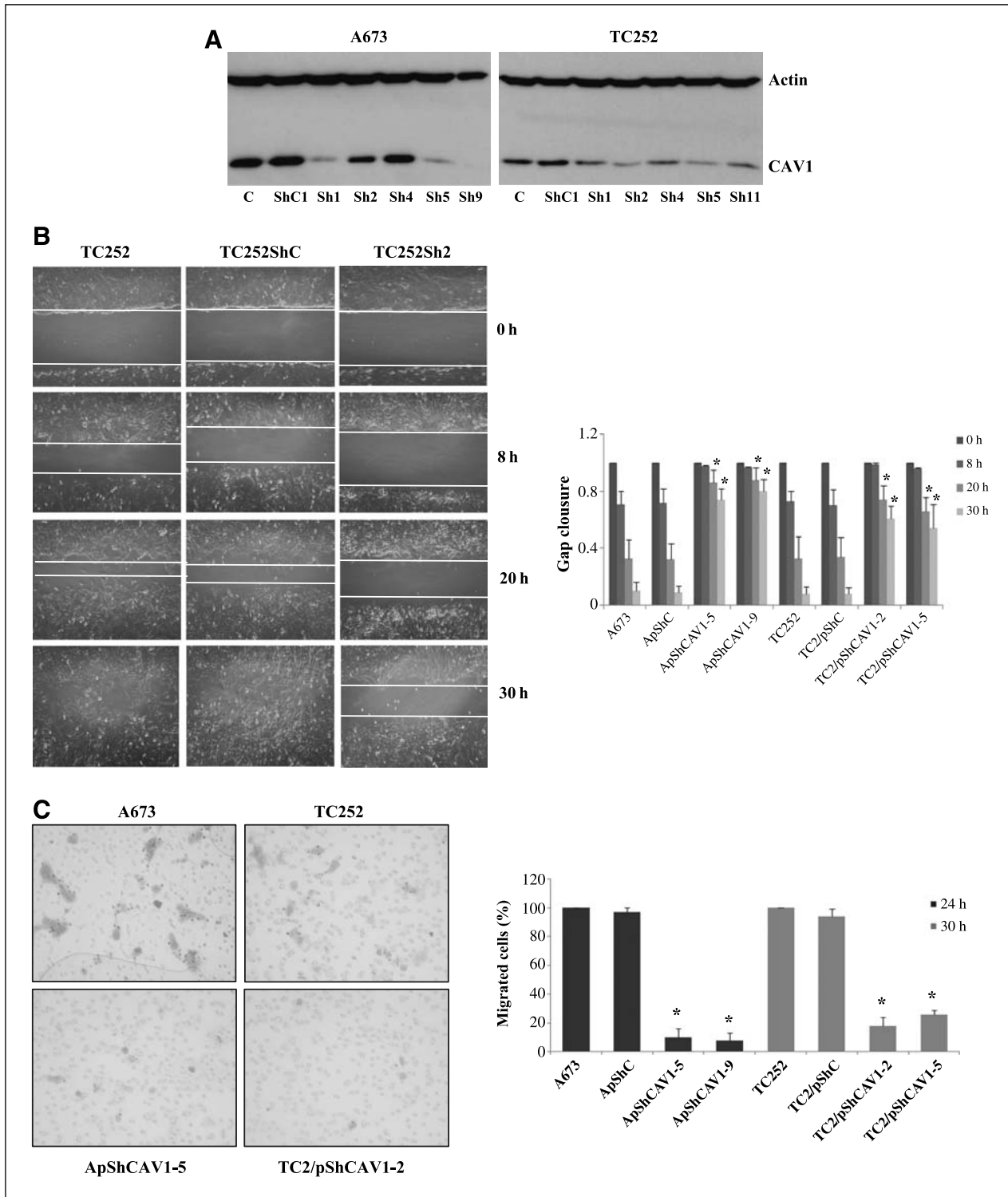


FIGURE 2. CAV1 downregulation reduces the migration of ESFT cells. A, immunoblot showing substantially reduced CAV1 levels in individual clones of A673 and TC252 cells stably expressing CAV1 shRNA compared with untransfected and vector-transfected cells. β -Actin was the loading control. B, wound-healing assay carried out with cells derived from the TC252 CAV1 silencing model. Phase contrast microscope images ($\times 100$) were taken at the indicated times after monolayer scratching (left); quantification of wound-healing assays with A673- and TC252-derived cells (right) with vertical bars representing mean values of gap closure from three independent experiments, each done in triplicate; bars, SD (*, $P \leq 0.01$). C, photomicrographs ($\times 40$) showing differences in transwell migration among the cells indicated (left); quantification of transwell cell migration (right), with vertical bars representing mean percentages of the number of migrated cells from three independent experiments each done in triplicate; bars, SD (*, $P \leq 0.01$).

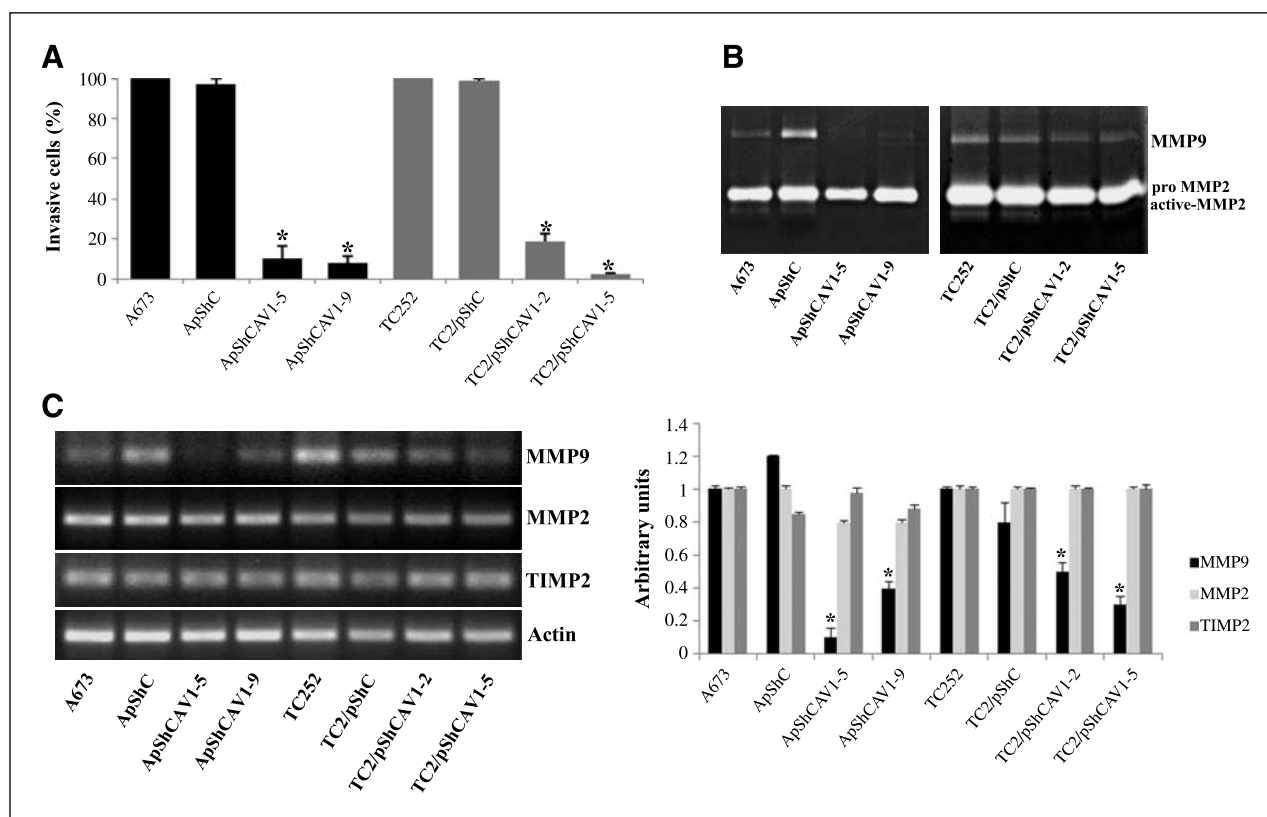


FIGURE 3. CAV1 downregulation reduces the invasive ability of ESFT cells. A, invasion of cells through 8 μ m Matrigel-coated polycarbonate pores was determined using Boyden chamber assays. Vertical bars represent mean percentages of invading cells from three independent experiments each done in triplicate; bars, SD (*, $P \leq 0.01$). B, gelatin zymogram measuring activation of MMP9 and MMP2 related to CAV1 expression in the same cells in A. C, MMP9, MMP2, and TIMP2 mRNA levels were analyzed by semiquantitative reverse transcription-PCR (left). β -Actin was used as the loading reference. Histogram bars (right) represent mean densitometry values from two independent experiments; bars, SD (*, $P \leq 0.05$).

inhibitor of MMPs; refs. 19, 20). Moreover, CAV1 had been shown to be required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation through regulation of MT1-MMP function in human breast cancer cells (21). Ewing's sarcoma cells had been shown to express MT1-MMP (22). Consequently, zymography from isolated membrane extracts (12) in the A673 model showed that membrane-bound MMP2 was mostly observed in control, but barely present in low CAV1 cells (Supplementary Fig. S3), suggestive of MT1-MMP activation in control cells but not in low CAV1 cells. Furthermore, confocal microscopy analysis showed that the decrease of MT1-MMP activity correlated with a diffuse redistribution of this protein in low CAV1 cells (Fig. 4). We were unable to observe wide colocalization between CAV1 and MT1-MMP. However, in control cells, these two proteins colocalized in some structures at the bottom of the cell, suggestive of invadopodia (Supplementary Fig. S4).

Based on the *in vitro* results, we asked whether downregulation of CAV1 in ESFT cells might affect their metastatic potential in an experimental metastasis assay *in vivo*. The cell lines derived from the A673 CAV1 silencing model were injected into the tail vein of BALB/c nude mice. Animals were sacrificed after manifestation of mor-

bidity. In agreement with a previous report using A673 cells as a model of metastasis (23), our parental and vector-transfected A673 cells strongly colonized the lungs. On the contrary, animals injected with CAV1 knocked-down cells either showed essentially no incidence of metastasis to any organ, or showed lung colonization only after a significant delay. Consequently, there were highly significant ($P = 0.0001$) differences in survival among the experimental groups of mice (Fig. 5A). Macroscopically, metastatic foci were quantified showing significant differences between control and low CAV1 cell-derived lungs (Fig. 5B and C). Histologic analysis of paraffin-embedded lungs clearly evidenced several lung metastases in mice injected with control cells in comparison with the lungs of animals injected with A/ShCAV1-5 and A/ShCAV1-9 cells (Fig. 5D). Although previous studies with A673 cells also reported metastasis to sites other than the lungs, only lung metastases developed in our experimental system. This may be explained by their use of a different immunodeficient mouse strain, which has recently been shown to allow ESFT cells to colonize other organs in addition to the lungs (24). Immunohistochemical analyses of paraffin-embedded metastatic lung tumors showed either diminished or no detectable CAV1 expression in A/ShCAV1-derived lung

tumors from mice sacrificed throughout the experiment compared with the highly positive staining of parental or control-derived lung tumors from mice sacrificed during the 3rd week (Fig. 5E). In agreement with the *in vitro* results, MMP9 expression appeared mostly in controls. These results further showed the validity of the shRNA construct used in the present study and strongly support the hypothesis that CAV1 is necessary for ESFT cells to metastasize.

The ability of ESFT cells to enter into the bloodstream (intravasation) and to exit from capillary beds into the parenchyma of an organ (extravasation) might be explained by the regulation that CAV1 exerts over MMPs. However, the ability of these cells to colonize the lungs may also be driven by the so-called metastasis virulence genes (25). Among a subset of these genes, we focused in SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), a matricellular glycoprotein that mediates interactions between cells and their microenvironment as both CAV1 and SPARC

have been found to be determinants of metastasis in basal-like breast carcinomas and melanomas (26, 27). In addition, neither the expression of SPARC in ESFT nor the mechanistic interaction between the SPARC and CAV1 proteins have been reported to date. Therefore, we tested whether SPARC mRNA and protein expression were affected by CAV1 knockdown. Results showed that SPARC mRNA and protein levels were indeed downregulated in CAV1 knockdown cells (Fig. 6A and B), suggesting that CAV1 regulates SPARC expression at the transcriptional level. SPARC has been found to induce migration and invasion in different types of cancer (28). Consequently, to explore whether SPARC collaborated with CAV1 inducing such processes, we knocked down SPARC in A673 cells by stably transfecting a validated (11) specific shRNA construct (Fig. 6C) without affecting CAV1 expression (Supplementary Fig. S5) and analyzed its effects on migration, invasion and lung colonization. Even though wound-healing

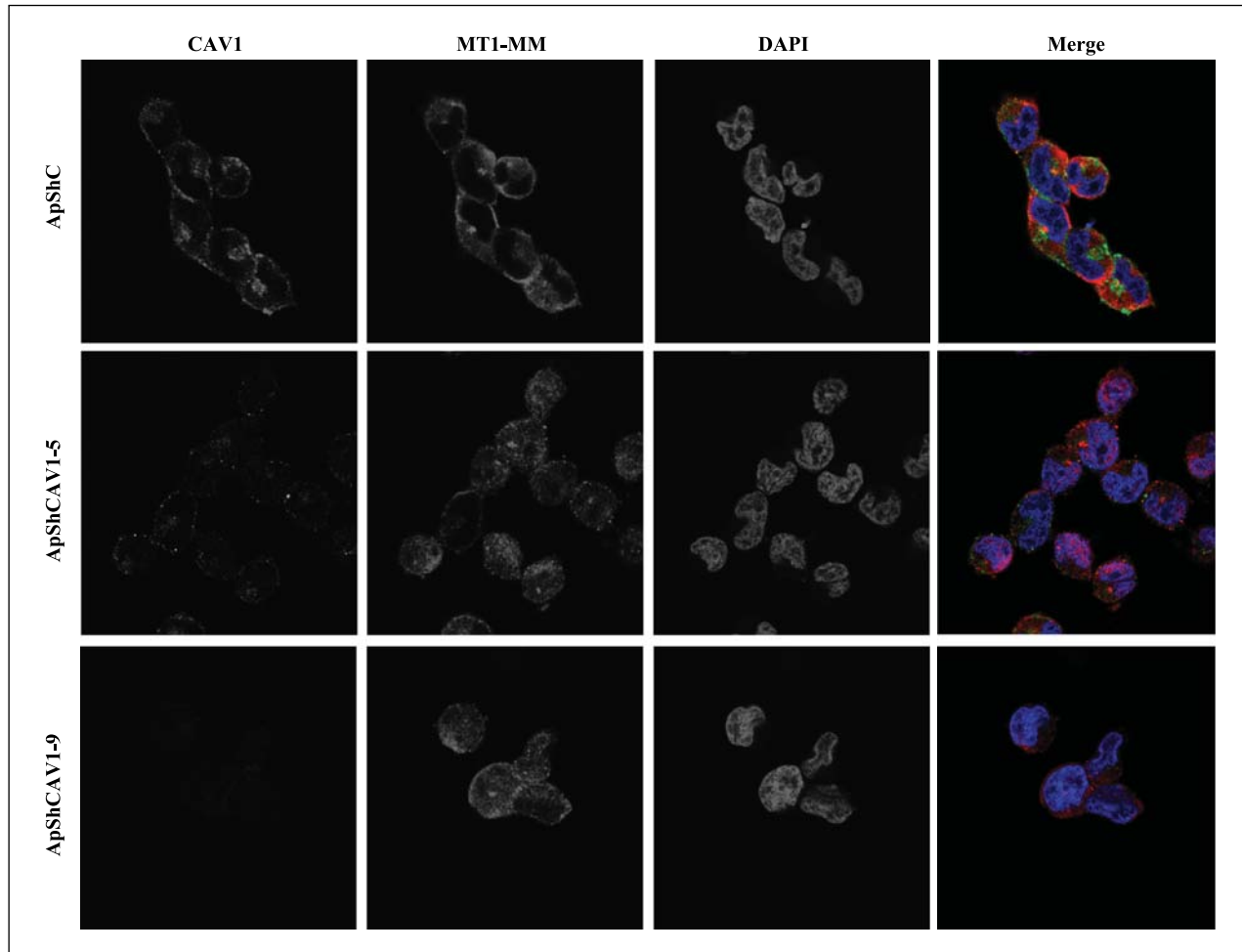


FIGURE 4. Localization of CAV1 and MT1-MMP in cells derived from the A673 CAV1 silencing model. Exponentially growing, A673-derived cells were immunostained with anti-CAV1 antibody using an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (CAV1), anti-MT1-MMP antibody using an Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit secondary antibody (MT1-MMP) or stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole to identify the nuclear compartment. Merging of the three images (Merge) showed the relocation of MT1-MMP from the cell membrane to a more diffusely staining compartment in CAV1 knocked-down cells (magnification, $\times 630$).

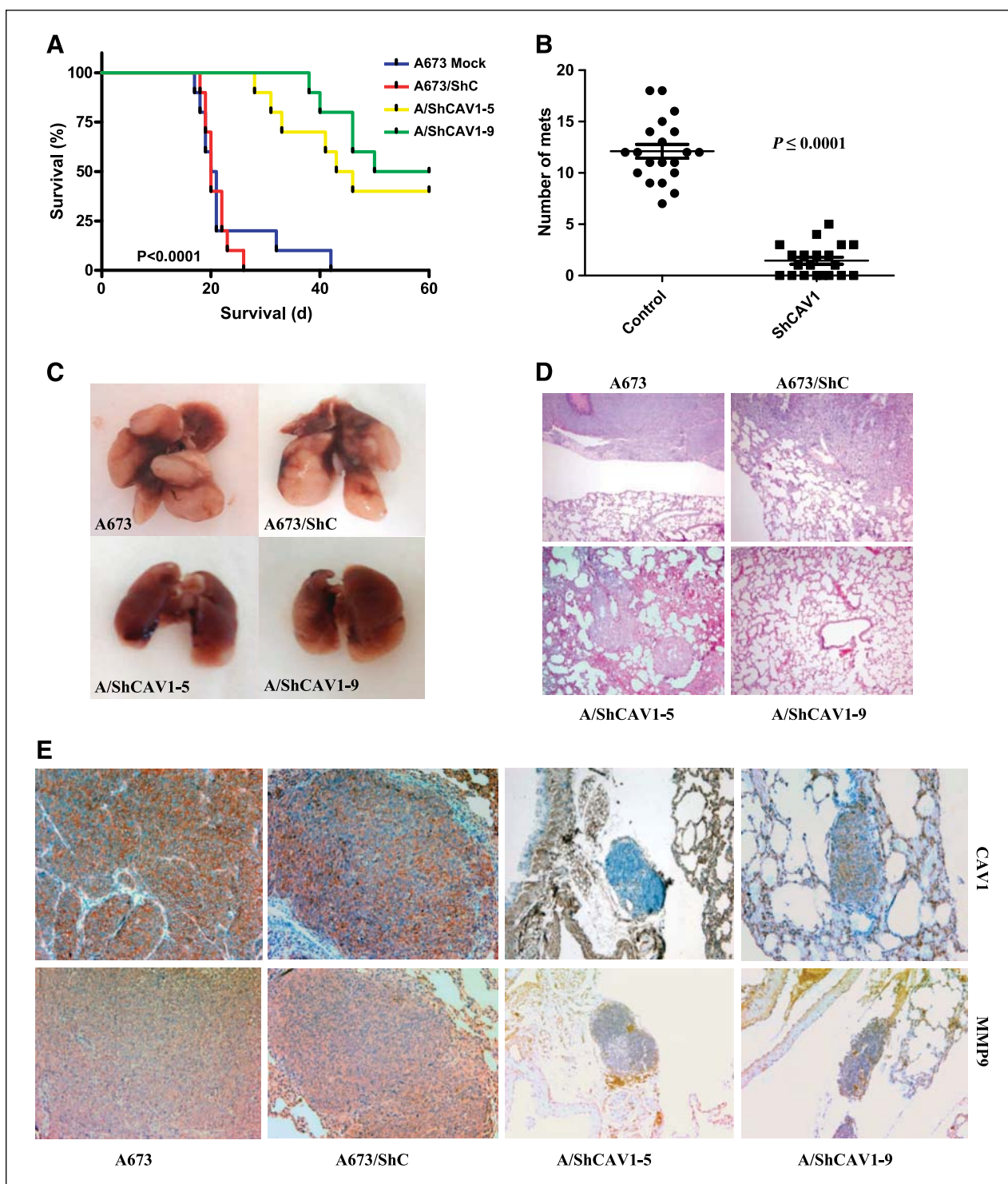


FIGURE 5. CAV1 downregulation reduces metastasis in nude mice. **A**, survival of mice bearing ESFT cells using a mouse lung metastasis model. Kaplan-Meier survival curves of nude mice bearing tumors initiated by injection of mock-transfected A673 cells (A673 Mock), control vector transfected cells (A673/ShC), or CAV1 knocked-down (A/ShCAV1-5 and A/ShCAV1-9) cells ($n = 10$ for each cell line). **B**, quantification of lung metastases derived from control (A673 Mock and A673/ShC) and CAV1 knocked-down (ShCAV1) cells (A/ShCAV1-5 and A/ShCAV1-9). **C**, representative lungs excised from animals injected with A673-derived cells. Control mice were sacrificed during the 3rd wk whereas animals injected with cells expressing shCAV1s were sacrificed during the 8th week. **D**, H&E from corresponding paraffin-embedded lungs ($\times 200$). **E**, CAV1 and MMP9 staining of metastasis on lung sections from mice injected with control vector transfected A673 cells (A673/ShC) sacrificed on day 24 and ShCAV1 transfected cells (A/ShCAV1) sacrificed on day 60 (magnification, $\times 100$).

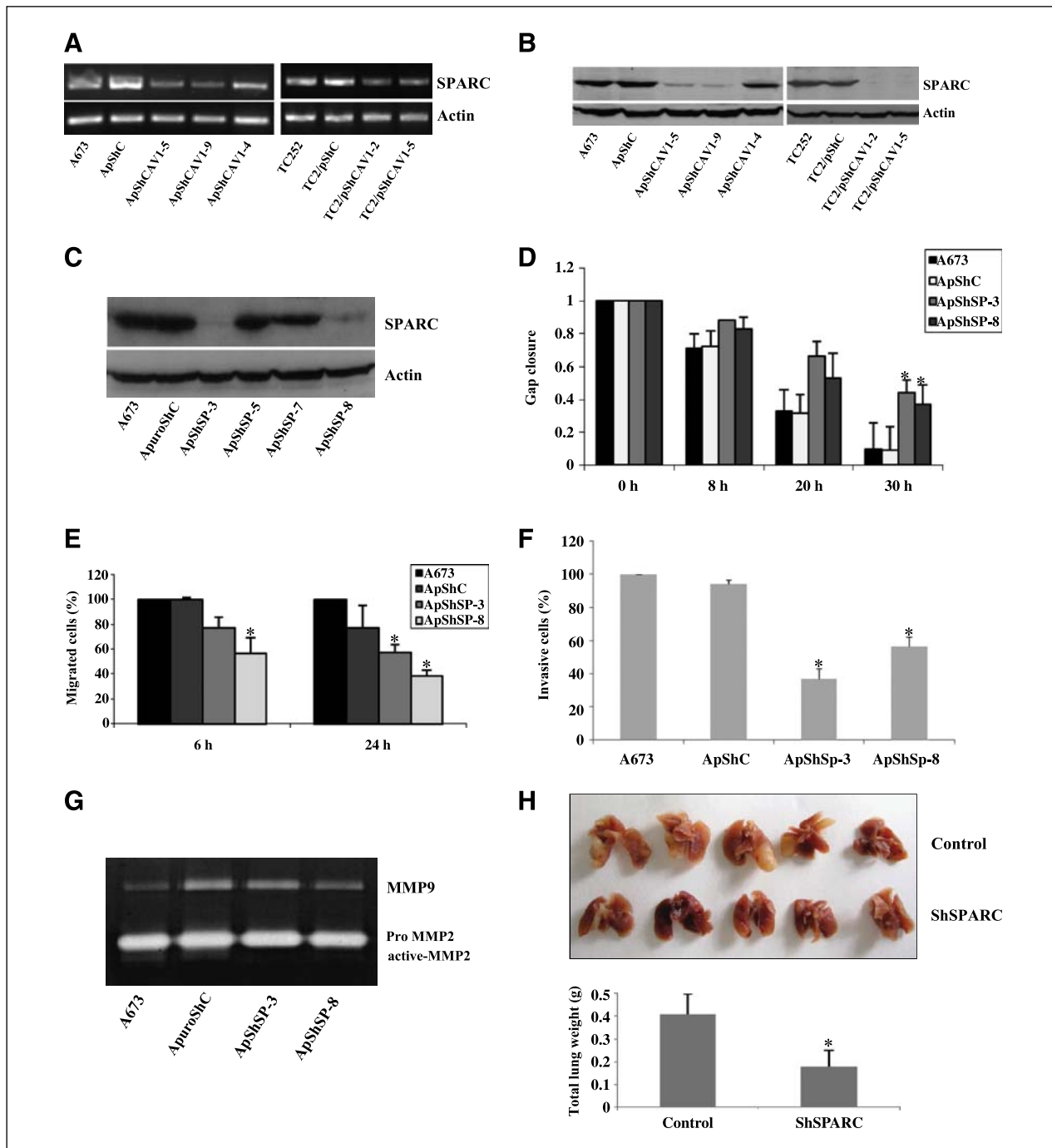


FIGURE 6. SPARC acts downstream of CAV1 to regulate ESFT cell invasiveness. **A**, SPARC mRNA levels were analyzed by semiquantitative reverse transcription-PCR in individual clones of A673 and TC252 cells stably expressing CAV1 shRNAs were compared with those in untransfected cells and in cells transfected with control vector DNA. **B**, SPARC protein levels in cells derived from the A673 and TC252 CAV1 silencing models. **C**, immunoblot showing substantially reduced SPARC levels in individual clones of A673 cells stably expressing SPARC shRNA compared with untransfected cells and cells transfected with control vector DNA. Wherever applicable, β -actin was used as the loading control. **D**, quantification of wound-healing assays, where vertical bars represent mean values of gap closure from three independent experiments each done in triplicate; bars, SD ($^*P \leq 0.05$). **E**, quantification of transwell cell migration where vertical bars represent mean percentages of the number of migrated cells from three independent experiments each done in triplicate; bars, SD ($^*P \leq 0.05$). **F**, invasion of cells through 8 μ m Matrigel-coated polycarbonate pores was determined using Boyden chamber assays. Vertical bars represent mean percentages of invading cells from three independent experiments each done in triplicate; bars, SD ($^*P \leq 0.05$). **G**, gelatin zymogram measuring activation of MMP9 and MMP2 related to SPARC expression in the same cells in **D**. **H**, representative lungs excised after 15 d from mice injected with either cells transfected with control vector and from ShSPARC-transfected cells (top). Quantification of lung weight (bottom) from mice injected with control or SPARC knocked-down cells ($^*P \leq 0.001$).

(Fig. 6D), transwell migration (Fig. 6E), and invasion assays (Fig. 6F) showed that SPARC knocked-down cells migrated and invaded significantly less ($P \leq 0.05$) than control cells, the effect of SPARC downregulation did not recapitulate the extent of the inhibitory effects induced by CAV1 knock-down. Conditioned medium from SPARC knocked-down cell cultures were analyzed by zymography (Fig. 6G). Similar to what happened in CAV1 knocked-down cells, MMP2 activation was undetectable in SPARC knocked-down cells. In contrast, SPARC downregulation did not provoke a decrease of MMP9, suggesting that SPARC knocked-down cells invaded better than CAV1 knocked-down cells in part because MMP9 was unaffected and thus remained active despite the low cellular levels of SPARC. Lastly, experimental metastasis assays showed that in contrast with control cells, SPARC knocked-down cells were unable to colonize the lungs (Fig. 6H), suggesting that SPARC is necessary for lung metastasis by Ewing's sarcoma cells.

Discussion

CAV1 regulates multiple cancer-associated cellular processes and its expression is a marker that predicts poor cancer patient prognosis (14). In our TMA, all metastatic samples had significantly high CAV1 expressions. This is in agreement with several publications reporting that certain genes expressed in primary tumors were also found in metastases from the same patient, suggesting that the metastatic potential of human tumors is encoded in the bulk of the primary tumors (29).

Migrating cells display sequential changes in morphology characterized by protrusion of lamellipodia and filopodia at the leading edge, attachment to the substratum, forward flow of cytosol, focal adhesion loosening, and retraction of the rear of the cell (30). CAV1 drives the formation of plasma membrane caveolae and anchors them to the actin cytoskeleton, modulates cell interaction with the extracellular matrix, pulls together and regulates signaling molecules, and transports cholesterol. Through these functions, CAV1 could play an important role in cell movement by controlling cell membrane composition and membrane surface expansion, polarization of signaling molecules, and/or cytoskeleton remodeling (31). Therefore, our laboratory is currently investigating whether CAV1 controls ESFT cell migration directly, acting on the migrating protrusions or indirectly behaving as functional platforms that regulate the organization, coordination, and activation status of signaling complexes (receptors, transducers, and effectors) involved in cell migration.

Our data represent the first description of CAV1 differently regulating MMP9 and MMP2 to promote invasion in ESFT. The regulation of MMP expression and activity occurs at many levels, including gene transcription, post-transcriptional processing, and proenzyme activation (32). Our results show that CAV1 regulates MMP9 by indirectly modulating its expression at the transcriptional level, while it regulates MMP2 by promoting the activation of its proenzyme form. Intriguingly, CAV1 knockdown induced the

downregulation of MMP9 but not MMP2 or TIMP2. Multiple cytokines and growth factors are able to induce MMP expression, although the tissue specificity of the diverse family members is mainly achieved by the combination of different transcriptional control mechanisms. The integration of multiple signaling pathways facilitates the strict spatio-temporal control of MMP transcriptional activity (33). Therefore, in our model, CAV1 could be regulating specific signaling pathways that affect MMP9 expression independently of other MMPs.

For MMP2 activation, TIMP2 binds to the catalytic domain of one of the MT1-MMP molecules in the dimer and to the HPX domain of pro-MMP2, thereby facilitating cleavage and activation of pro-MMP2 by the second (TIMP2-free) MT1-MMP molecule of the dimer (20). Recently, it was shown that CAV1 is required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation in human breast cancer cells, demonstrating that CAV1 is an essential regulator of MT1-MMP function (21). Accordingly, our results strongly suggest that CAV1 mediates MMP2 activation through regulation of MT1-MMP activity. However, and contrary to our results, CAV1 has been shown to inhibit invasion and MMP expression in pancreatic cancer (34). Also, in breast cancer cell lines, CAV1 has been shown to inhibit invasion, MMP activation, and metastasis *in vivo* (35). These opposite results could be explained because ESFT is not an epithelial cancer as is the case of pancreatic and mammary tumors, indicating that depending on the tissue type, CAV1 may exert opposite functions. In agreement with our results, in melanoma (another mesenchymal tumor), CAV1 promotes invasion by regulating MMP expression (36), underscoring the importance of the tissue of origin as a determinant of protein function.

As in many other tumors, metastatic disease is a poor prognostic factor for overall survival of patients with ESFT. Furthermore, this family of tumors has a great propensity to metastasize to the lungs (37). Accordingly, our experimental metastasis model showed preferential lung colonization of A673 cells in nude mice. Very recently, it has been suggested that the organ specificity of metastatic cells is determined by unique infiltrative and colonization functions which are dependent on specific gene sets (1). There is no data about genes that determine lung colonization in ESFT. Nevertheless, we focused on SPARC because it has been described as a determinant of lung colonization in metastatic breast tumors (11) and it has been shown to induce the production and activation of several MMPs (38).

Similar to MMP9, SPARC mRNA was affected by CAV1 knockdown, suggesting that in ESFT, expression of both genes might be regulated by CAV1. However, not all ESFT cells expressed SPARC (data not shown), this might be explained by the fact that SPARC expression in tumor cells is highly regulated by mechanisms other than transcription (38). Therefore, in some ESFT cells, SPARC expression could be regulated epigenetically, posttranscriptionally, or by miRNAs. In our model, SPARC knockdown resulted in a significant reduction in the migratory and invasive capabilities of A673 cells. However, the effects

induced by SPARC downregulation never recapitulated the extent of the inhibitory actions provoked by CAV1 knockdown, suggesting that CAV1 mediates migration and invasion in part by indirectly regulating the expression of SPARC, but also by regulating other still unidentified proteins. These observations are in agreement with the situation reported in melanomas, in which both proteins have been shown to promote metastatic disease (27, 36). Zymography analysis showed that as in CAV1 knockdown cells, MMP2 activity was reduced as a consequence of SPARC knockdown, in contrast, MMP9 production was unaffected explaining why SPARC knockdown did not induce the same level of invasive inhibition than CAV1 knockdown. Similar to CAV1, the activity of SPARC is context- and cell type-dependent. In fact, SPARC has shown seemingly contradictory effects on tumor progression in both clinical correlative studies and in animal models (39). Therefore, the activity of SPARC related to invasion might be different in ESFT than in other tumor types. Interestingly, compared with control cells, none of SPARC knocked-down cells were able to colonize the lungs, suggesting that SPARC, as an adhesion protein, may indeed be necessary for ESFT cells to adhere to the lung epithelia. Alternatively, the hypothesis that SPARC plays an important role in the fusion of tumor cells with bone marrow-derived cells in the circulation has been proposed a new explanation for its role in metastasis (40). Nevertheless, in ESFT, whether SPARC promotes metastasis through one mechanism or the other requires further investigation.

References

1. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009;9:274–84.
2. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992;359:162–5.
3. Maksimenko A, Malvy A. Oncogene-targeted antisense oligonucleotides for the treatment of Ewing sarcoma. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9:825–30.
4. Kovar H, Ban J, Pospisilova S. Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol* 2003;13:275–81.
5. Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, Notario V. Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:6781–90.
6. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 2006;66:9937–47.
7. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKC α phosphorylation. *Int J Cancer* 2010;126:426–36.
8. Van Golen KL. Is caveolin-1 a viable therapeutic target to reduce cancer metastasis? *Expert Opin Ther Targets* 2006;10:709–21.
9. Burgermeister E, Liscovitch M, Rocken C, Ebert Schmid RM. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett* 2008;268:187–201.
10. Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, et al. Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res* 2008;68:8210–20.
11. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436:518–24.
12. Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1758–64.
13. Lai R, Navid F, Rodriguez-Galindo C, et al. STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol* 2006;208:624–32.
14. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:715–35.
15. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 2007;7:737–49.
16. Ravid D, Chuderland D, Landsman L, Lavie Y, Reich R, Liscovitch M. Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration. *Exp Cell Res* 2008;314:2762–73.
17. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–74.
18. St-Pierre Y, Couillard J, Van Themsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2004;8:473–89.
19. Itoh Y, Takamura A, Ito N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001;20:4782–93.
20. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, DeClerck Y, Cao J. TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. *Exp Cell Res* 2004;293:164–74.
21. Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, Fukami K. Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and

Overall, our study shows that CAV1 plays a key role in regulating the ability of ESFT cells to migrate, invade the extracellular matrix, and colonize distant organs such as the lungs. This is the first study to evaluate the role of CAV1 on ESFT metastasis. Our results add relevance to the key roles that CAV1 plays in ESFT biology by controlling tumorigenicity (6), resistance to chemotherapy-induced apoptosis (7), and metastatic ability.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We acknowledge the efforts of Blanca Luena for her assistance with the *in vivo* metastasis experiments, Catherine Billups in providing outstanding assistance with statistics, and Jemina Moreto, from Cancer Epigenetics and Biology Program (IDIBELL), for her support with confocal images acquisition and processing.

Grant Support

L. Lagares-Tena is funded by the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (CP06/00151; PI080259).

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 02/08/2010; revised 08/30/2010; accepted 08/30/2010.

- extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:8594–602.
22. Yabe H, Fukuma M, Urano F, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:61–71.
 23. Richter GH, Plehm S, Fasan A, et al. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5324–9.
 24. Nanni P, Nicoletti G, Landuzzi L, et al. High metastatic efficiency of human sarcoma cells in Rag2/gc double knockout mice provides a powerful test for antimetastatic targeted therapy. *Eur J Cancer* 2010;46:659–68.
 25. Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007;8:341–52.
 26. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68:989–97.
 27. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, et al. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007;67:3450–60.
 28. Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 2008;11:231–46.
 29. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33:49–54.
 30. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration, a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359–69.
 31. Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO. A role for caveolae in cell migration. *FASEB J* 2004;18:1801–11.
 32. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362–78.
 33. Farjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:3–19.
 34. Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010;159:443–50.
 35. Williams TM, Medina F, Badano I, et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis *in vivo*. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* 2004;279:51630–46.
 36. Felicetti F, Parolini I, Bottero L, et al. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int J Cancer* 2009;125:1514–22.
 37. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 2010;11:184–92.
 38. Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:55–65.
 39. Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 2009;3:255–73.
 40. Pawelek JM, Chakraborty AK. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:377–86.

Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe?

Miguel Sáinz-Jaspeado¹, Juan Martín-Liberal¹, Laura Lagares-Tena¹, Silvia Mateo-Lozano², Xavier García del Muro¹ and Oscar M Tirado¹

¹ Sarcoma Research Group, IDIBELL (Bellvitge Biomedical Research Institute), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

² Nanomedicine Research Program, Molecular Biology and Biochemistry Research Center, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Barcelona, Spain

Correspondence to: Oscar M. Tirado, email: omartinez@idibell.cat

Keywords: Caveolin-1, Sarcomas, Oncogene, Tumor suppressor

Received: March 31, 2011,

Accepted: April 1, 2011,

Published: April 2, 2011

Copyright: © Sáinz-Jaspeado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Sarcomas represent a heterogeneous group of tumors with a complex and difficult reproducible classification. Their pathogenesis is poorly understood and there are few effective treatment options for advanced disease. Caveolin-1 is a multifunctional scaffolding protein with multiple binding partners that regulates multiple cancer-associated processes including cellular transformation, tumor growth, cell death and survival, multidrug resistance, angiogenesis, cell migration and metastasis. However, ambiguous roles have been ascribed to caveolin-1 in signal transduction and cancer, including sarcomas. In particular, evidence indicating that caveolin-1 function is cell context dependent has been repeatedly reported. Caveolin-1 appears to act as a tumor suppressor protein at early stages of cancer progression. In contrast, a growing body of evidence indicates that caveolin-1 is up-regulated in several multidrug-resistant and metastatic cancer cell lines and human tumor specimens. This review is focused on the role of caveolin-1 in several soft tissue and bone sarcomas and discusses the use of this protein as a potential diagnostic and prognostic marker and as a therapeutic target.

INTRODUCTION

Sarcomas constitute a heterogeneous category of neoplasms composed mostly of uncommon tumors of different histology, biology, and outcome. According to its molecular features, soft-tissue and bone sarcomas can be classified in two big groups: associated to specific genetic alterations or without specific molecular patterns [1]. One third of sarcomas have well defined genetic alterations. The identification of these genetic patterns has supposed a revolution since some of them have diagnosis, prognosis and therapeutic implications [2]. They are further divided in two particular categories: sarcomas with specific chromosomal translocations and sarcomas with specific gene mutations [3].

About 15-20% of sarcomas are associated with specific chromosomal translocations involving, most commonly, a member of the TET family (EWS, FUS or TAF15) and a transcription factor. These translocations are thought to happen early in carcinogenesis, promoting some of the processes that finally lead to the appearance

of cancer cells [4]. Single gene mutations in certain group of sarcomas encode proteins leading to tumor formation. Usually, the product derived from the mutated gene is a transmembrane tyrosine kinase receptor constitutively activated in a ligand-independent manner. This activation triggers intracellular pathways that finally lead to carcinogenesis [5].

About two thirds of sarcomas lack specific genetic alterations. Adult sarcomas frequently belong to this group and complex karyotypes are often found instead of chromosomal translocations. In this category of sarcomas, p53 inactivation seems to be an early and common event in carcinogenesis. Anomalies in the retinoblastoma pathway are also frequently found but no specific patterns of abnormalities can be described in this subgroup of tumors [6]. Thus, tumors with the same diagnosis present different molecular patterns and different chromosomal aberrations depending on each case.

CAVEOLIN-1

Caveolin-1 (CAV1) belongs to a family of proteins named caveolins. There are three members: CAV1, 2 and 3, which can form homo- and hetero-oligomeric complexes mediated by domains in the N- and C-terminal domains [7]. CAV1 and 2 are ubiquitously expressed in a variety of cell types such as endothelial cells, pneumocytes, adipocytes and fibroblasts [8]. Expression of CAV2 nearly always mirrors that of CAV1. This may be, in part, due to requirement of CAV1 to transport CAV2 to the plasma membrane where it can be incorporated into caveolae [9]. In contrast, expression of CAV3 is restricted to striated muscle cells and is a component of the sarcoplasmic reticulum of skeletal, cardiac and smooth muscle [10, 11]. CAV1 is the major structural protein in caveolae; small invaginations within the plasma membrane. Caveolae are involved in signal transduction, wherein CAV1 acts as a scaffold to organize multiple molecular complexes regulating a variety of cellular events, for a complete review see [12]. However, CAV1 might be present on flat plasma membrane or/and on different organelles (Figure

1). Whether its role is different at such diverse locations remains to be elucidated. Proteins that associate with CAV1 contain the canonical caveolin-1 binding domain, $\phi x \phi x x x \phi$ or $\phi x x x x \phi x x \phi$ (where $\phi =$ Trp, Phe or Tyr). Interaction with a large majority of these proteins occurs through the caveolin scaffolding domain (CSD) (Figure 1). It is the ability to interact with numerous proteins that makes CAV1 a keystone in signaling by organizing signaling complexes at the inner plasma membrane [12].

CAV1 has been shown to possess an ambiguous role in cancer and to act both as a tumor suppressor or promoter. Both activities had been described for CAV1 in breast, oral, colon, lung, uterus and thyroid cancer. This apparent contradiction may be explained by different interacting partners during cancer progression [13], and it is proposed that *in vivo*, CAV1 plays a tissue and stage specific modulatory role in cancer [14].

CAV1 IN SARCOMAS

Because CAV1 is most abundantly expressed in terminally differentiated mesenchymal cells such as

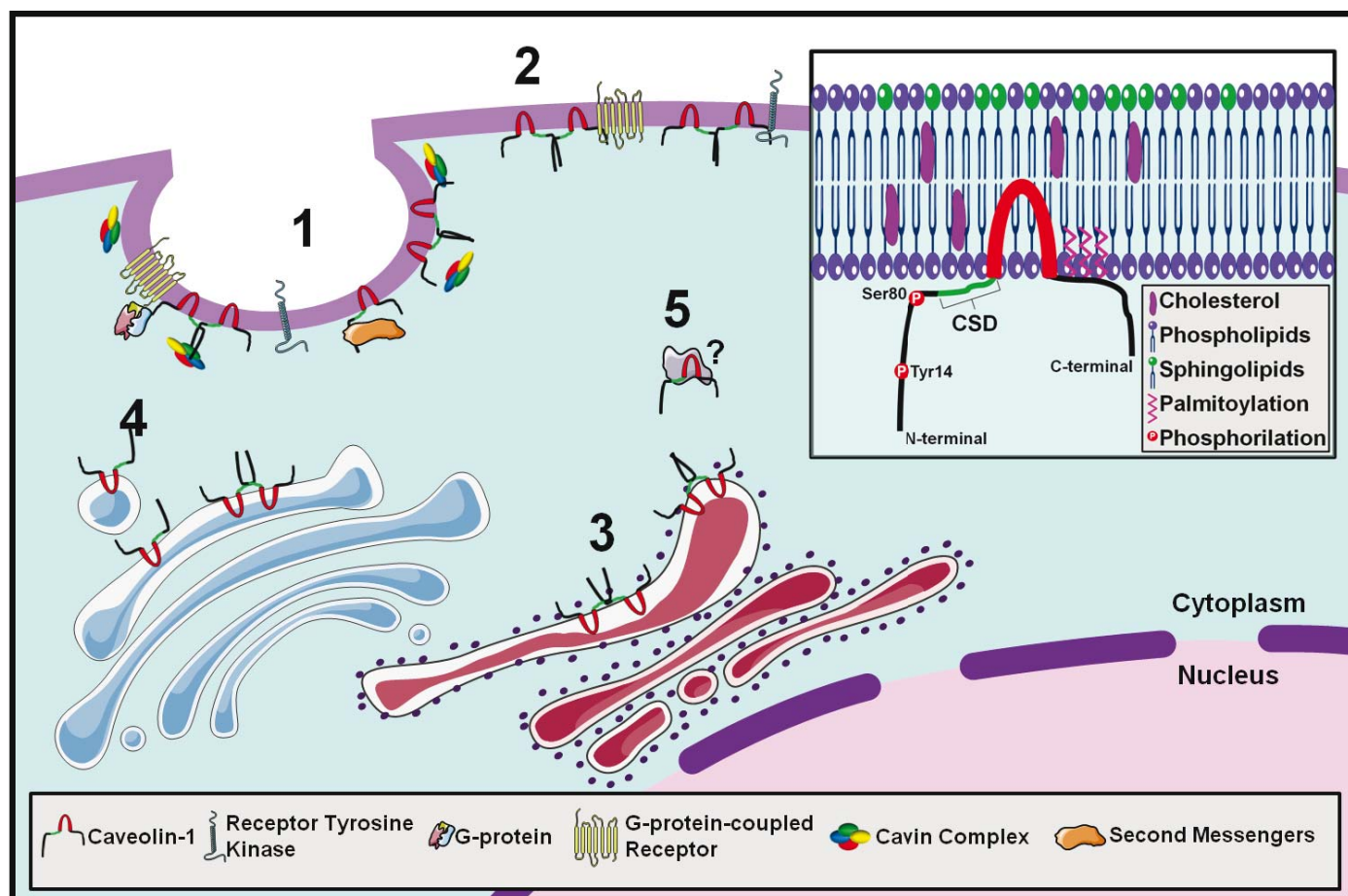


FIGURE 1: CAV1 localization options inside the cell. 1 In caveolae complexed with cavins interacting with tyrosine-kinase or G-protein coupled receptors. 2 Out of caveolae interacting with the same receptors. 3 At the endoplasmic reticulum synthesis of CAV1. 4 From the plasma membrane to the golgi apparatus caveolae-dependent endocytic functions. 5 In the cytoplasm interacting with still unknown proteins. **Inset** Structure and membrane topology of CAV1 showing phosphorylation sites, the caveolin scaffolding domain (CSD), and the transmembrane domain.

smooth muscle cells, adipocytes and endothelial cells, Wiechen et al. investigated whether it was a tumor suppressor in sarcomas [15]. By immunohistochemistry they found that CAV1 expression was high in fibroblasts, smooth muscle cells, adipocytes and endothelial cells with a fine granular membranous and a diffuse cytoplasmic staining pattern. Moreover, levels of CAV1, comparable to normal mesenchymal cells, were retained in all benign mesenchymal tumors, including 5 of 5 fibromatoses, 7 of 7 leiomyomas, 4 of 4 lipomas, and 6 of 6 hemangiomas. CAV1 expression was found to be absent or strongly reduced in 3 of 3 fibrosarcomas, 17 of 20 leiomyosarcomas, 5 of 8 angiosarcomas, 15 of 18 malignant fibrous histiocytomas, and 8 of 8 synovial sarcomas. Therefore it was concluded that CAV1 is a candidate tumor suppressor gene in sarcomas [15]. Accordingly, the analysis of CAV1 in Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) suggested that this protein may also act as a tumor suppressor [16]. The authors showed that in a sample of 108 GISTs patients 86.1% (93 patients) did not express CAV1. However, there was no correlation between the caveolin-1 expression status and any of the clinicopathologic variables, including mitosis and tumor grade. The expression of caveolin-1 was not correlated with other immunohistochemical marker proteins including, c-kit, CD34 and SMA. On the univariate analysis, CAV1 expression was not a significant predictor of the disease-free survival for GIST patients [16]. Other studies focusing in the expression of CAV1 in specific sarcomas have shown that this protein is expressed in the cytoplasm of cells from a variety of mesenchymal benign tumors, including the adipocyte of all types of lipoma and well-differentiated liposarcoma, the myocyte of angiomyolipoma, leiomyoma, and well-differentiated leiomyosarcoma [17]. The immunostaining properties were uniform among the cells of each of these lesions, and gender and age did not influence the results. However, all of the malignant mesenchymal tumors which are poorly differentiated and dedifferentiated, including leiomyosarcoma and liposarcoma, showed

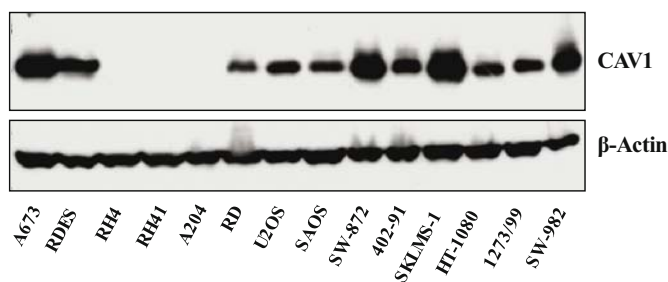


FIGURE 2: Western Blot analysis showing CAV1 expression in different sarcoma cell lines: Ewing Sarcoma (A673, RDES); Alveolar Rhabdomyosarcoma (Rh4, RH41); Embryonal Rhabdomyosarcoma (A204, RD); Osteosarcoma (U2OS, SAOS); Liposarcoma (SW-872); Myxoid Liposarcoma (402-91); Leiomyosarcoma (SKLMS-1); Fibrosarcoma (HT-1080) ; Synovial Sarcoma (1273/99, SW-982).

weak immunoreactivity or failed to stain with CAV1 [17], suggesting that loss of CAV1 might be a necessary step towards a differentiation block typical of malignancy and visible in most soft tissue sarcomas. Interestingly, we have observed high expression of CAV1 in some cell lines representative of these sarcomas, such as leiomyosarcoma and synovial sarcoma (Figure 2). Therefore, whether the expression of CAV1 in these cells correlates with the degree of differentiation and consequently it relates to any function, requires further investigation. Nevertheless, there are some functional studies about CAV1 in specific sarcomas such Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT), Osteosarcoma and Rhabdomyosarcoma trying to figure out the clinical importance of this protein that we will review thereafter:

Ewing's sarcoma family of tumors

ESFT includes aggressive bone-associated malignancies that affect the pediatric population. Nearly all ESFT patients already have micrometastases at diagnosis, resulting in a >95% relapse rate when treated locally and a 40% relapse rate after systemic chemotherapy. Most ESFT harbor a reciprocal translocation, t(11;22)(q24;q12), which links a strong transcriptional activation domain from EWS to the ETS DNA-binding domain of the transcription factor FLI-1 [18]. The *EWS/FLI-1* fusion is required for Ewing's sarcoma oncogenesis, as inhibition of its function results in the loss of transformation of ESFT cells [19-23]. CAV1 was identified as a metastasis-associated gene that is a transcriptional target of EWS/FLI-1 as well as an important determinant of ESFT malignant phenotype and tumorigenicity [24]. Using antisense and short hairpin RNA-mediated gene expression knockdown, array analyses, chromatin immunoprecipitation methods, and reexpression studies, the authors showed that CAV1 is a new direct target of EWS/FLI-1 that is overexpressed in ESFT cell lines and tumor specimens and is necessary for ESFT tumorigenesis. CAV1 knockdown led to up-regulation of Snail and the concomitant loss of E-cadherin expression. Consistently, loss of CAV1 expression inhibited the anchorage-independent growth of EWS cells and markedly reduced the growth of Ewing's sarcoma cell-derived tumors in nude mice xenografts, indicating that CAV1 promotes the malignant phenotype in Ewing's sarcoma carcinogenesis. Reexpression of CAV1 or E-cadherin in CAV1 knockdown Ewing's sarcoma cells rescued the oncogenic phenotype of the original Ewing's sarcoma cells, showing that the CAV1/Snail/E-cadherin pathway plays a central role in the expression of the oncogenic transformation functions of EWS/FLI-1 [24]. Later on, CAV1 with other 3 proteins was considered a differential diagnostic immunomarker for Ewing's sarcoma/PNET in a sample of 415 genetically confirmed cases [25].

Another study from the same authors showed that

CAV1 expression determines the sensitivity of ESFT cells to clinically relevant chemotherapeutic agents [26]. Analyses of endogenous CAV1 levels in several ESFT cells and ectopic CAV1 expression into ESFT cells expressing low endogenous CAV1 showed that the higher the CAV1 levels, the greater their resistance to drug treatment. Moreover, results from antisense- and shRNA-mediated gene expression knockdown and protein re-expression experiments demonstrated that CAV1 increases the resistance of ESFT cells to doxorubicin- and cisplatin-induced apoptosis by a mechanism involving the activating phosphorylation of PKC α . CAV1 knockdown in ESFT cells led to decreased phospho-PKC α levels and a concomitant sensitization to apoptosis, which were reversed by CAV1 re-expression. These results were recapitulated by PKC α knockdown and re-expression in ESFT cells in which CAV1 was previously knocked down, thus demonstrating that phospho-PKC α acts downstream of CAV1 to determine the sensitivity of ESFT cells to chemotherapeutic drugs. These data, along with the finding that CAV1 and phospho-PKC α are co-expressed in approximately 45% of ESFT specimens tested [26], implied that targeting CAV1 and/or PKC α may allow the development of new molecular therapeutic strategies to improve the treatment outcome for patients with ESFT.

Our group has demonstrated that CAV1 controls migration and invasion in ESFT cells in culture by mechanisms involving the production and activation of metalloproteinases as well as lung colonization in nude mice by regulating SPARC expression levels [27], adding relevance to the key roles that CAV1 plays in ESFT biology. Moreover, by ectopic expression of a Myc-tagged CAV1 protein in ESFT cells, as well as the supplementation of culture media with purified CAV1 protein followed by its intracellular localization using immunofluorescence, we showed that ESFT cells secrete CAV1. Likewise, we showed that ESFT cells are able to take up the secreted protein, and that extracellular CAV1 enhances EWS cell proliferation [28]. Whether this secreted CAV1 has roles other than proliferation remains to be elucidated.

Osteosarcoma

Osteosarcoma (OS) is the most common primary tumor of bone, occurring predominantly in the second decade of life. High-dose cytotoxic chemotherapy and surgical resection have improved prognosis, with long-term survival for patients with localized (non-metastatic) disease approaching 70%. At presentation approximately 20% of patients have metastases and almost all patients with recurrent OS have metastatic disease, and cure rates for patients with metastatic or recurrent disease remain poor [29]. CAV1 has been shown to act as an oncosuppressor in human osteosarcoma; its down-regulation is part of osteoblast transformation and

osteosarcoma progression [30]. In the study the authors did a survey of 6-year follow-up that indicated a better overall survival for osteosarcoma expressing a level of CAV1 similar to osteoblasts. Moreover, the majority of primary osteosarcoma showed significantly lower levels of CAV1 than normal osteoblasts suggesting its role as an oncosuppressor. Mechanistically, the authors showed that Met-induced osteoblast transformation was associated with CAV1 down-regulation. *In vitro*, osteosarcoma cell lines forced to overexpress CAV1 showed reduced malignancy with inhibited anchorage-independent growth, migration and invasion. *In vivo*, CAV1 overexpression abrogated the metastatic ability of osteosarcoma cells. They also showed that c-Src and c-Met tyrosine kinases, which are activated in osteosarcoma, co-localized with CAV1 and were inhibited upon CAV1 overexpression [31]. In contrast, in a recent immunohistochemical study of 61 xenotransplanted osteosarcoma tumors it was shown that CAV1 showed immunoreactivity in the majority of the tumors with no significant variation among the subtypes or subsequent passages; even in the majority of the metastatic cases. Nevertheless, the authors could not conclude that CAV1 is a marker either for good or for bad prognosis [31], suggesting that the role of CAV1 in OS requires further investigation.

Rhabdomyosarcoma

Rhabdomyosarcoma, a neoplasm composed of skeletal myoblast-like cells, represents the most common soft tissue sarcoma in children. It can be divided into two major histological subtypes: so-called embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma [32]. The embryonal subtype is the most common and predominates at favorable anatomic sites such as the orbit, other head and neck sites, and the genitourinary tract. The alveolar subtype occurs in both children and adults, and it is more common at extremity sites and carries an overall inferior prognosis [32]. Rhabdomyosarcoma is defined histologically as a small round blue cell tumor which expresses markers of myogenic differentiation, such as MyoD, myogenin, desmin, and actin. These myogenic markers discriminate it from other soft tissue or bone sarcomas, but late markers of myogenic differentiation are absent, and rhabdomyosarcoma cells do not form myotubes or functional muscle units [33]. Alveolar rhabdomyosarcoma is associated in the vast majority of cases with a specific balanced translocation involving chromosomes 2 and 13 [t(2;13)] or, less commonly, 1 and 13 [t(1;13)] [34, 35], each of which encodes a novel fusion protein, PAX3/FOXO1 and PAX7/FOXO1, respectively. In skeletal muscle, CAV1 and Caveolin-3 (CAV3), a member of the caveolin family expressed specifically in muscle tissue, are both expressed. In particular, CAV1 expression is restricted to satellite cells, which represent a pool of quiescent reserve elements; whereas CAV3

is expressed in myoblasts undergoing differentiation and in mature fibers [36, 11], suggesting that a timely coordinated expression of CAV1 and CAV3 contributes to skeletal muscle homeostasis. In rhabdomyosarcomas, CAV3 is considered a sensitive and specific marker of both subtypes [37]. In contrast to other sarcomas, CAV1 has been suggested to be a marker of poor differentiation for rhabdomyosarcomas [38] associating its expression to a better prognostic entity. CAV1 was predominantly expressed in the embryonal subtype and its expression was associated to an immature cell phenotype. On the other hand, most alveolar rhabdomyosarcoma tumors exhibiting advanced degree of maturation had very low levels of CAV1 suggesting that CAV1 might be a tumor suppressor in alveolar rhabdomyosarcomas. However, the number of samples used in this study was very small and further analysis using a bigger sample would be highly desirable.

PERSPECTIVE

In the recent years it has been relatively well agreed that depending on tumor type, CAV1 can have either tumor suppressor or oncogenic effects on a cell. Many proteins contain putative CAV1 binding domains. The effect of CAV1 on tumor phenotype seems to be very heterogeneous and strongly dependent on the molecular partners interacting with this protein [13]. Several important proteins involved in cell transformation and growth have been shown to interact with CAV1 including the molecules that stimulate tumor cell invasion and cytoskeletal rearrangement such as growth factor receptors, protein kinases, heterotrimeric G-proteins and Rho GTPases [39-42]. In general, CAV1 is supposed to concentrate signaling molecules within specialized membrane domains, named caveolae [43, 44]. In several cell lines, despite the high expression levels of CAV1, caveolae are not morphologically distinguishable suggesting a non-caveolar role for CAV1. For example, CAV1 can accumulate at focal adhesions and as reported by several groups, this translocation requires CAV1 phosphorylation at Tyr14. Thus, this might represent a novel example of a caveolae-independent role of CAV1 as a molecular organizer. Also, there is no evidence supporting the existence of caveolae-like invaginations in neurons however, physical organization between CAV1 and several receptors may occur in the context of membrane microdomains [45]. Furthermore, it is now clear that cavins (a new family of proteins that form the cavin complex) (Figure 1) are indispensable for caveolae formation and function [46]. Therefore, the possible loss of cavins in tumor cells opens a new exciting window to explore caveolar and non-caveolar roles of CAV1.

In epithelial tumors the role of CAV1 in sarcomas is very contradictory; this is aggravated by the fact that functional studies are very scarce. However, as demonstrated in some bone and soft tissue sarcomas,

CAV1 may have a key role in their malignant progression. From our point of view it will be of key importance to correlate caveolar and non-caveolar functions with tumor suppressor or oncogenic activities.

Depending on the role assigned to CAV1 in every sarcoma type it will be possible to use different targeting options. In those sarcomas where CAV1 was demonstrated to act as a tumor suppressor, targeted ectopic re-expression or introduction of a CSD would be a feasible option. In fact, re-expression of CAV1 has successfully reduced the tumor growth of breast cancer cells [47] and the invasive capability of pancreatic [48] and breast [49] cancer cells. Delivery of CSD peptides fused to the C-terminus of the *Drosophila antennapedia* (AP) homeodomain internalization sequence to subcutaneously implanted tumors inhibited tumor progression by reducing vascular permeability and mediating an indirect anti-angiogenic effect [50]. On the other hand, direct targeting of CAV1 using antisense and siRNA, or indirectly by chemical inhibition, or lowering cholesterol (disrupts caveolae) may result of great help in the cases where CAV1 acts as an oncogene. Similar to prostate cancer [51] and melanomas [52], our group successfully showed that targeting CAV1 with shRNAs reduced Ewing's sarcoma progression [27]. In multiple myeloma, proteasome inhibitors blocked VEGF-triggered CAV1 phosphorylation and expression resulting in reduced migration and survival [53]. The use of statins to inhibit cholesterol synthesis in glioma cells suppressed CAV1 expression and consequently reduced migration and survival [54]. Whether these drugs may be of use for the treatment of sarcoma patients remains unknown. However, the development of new reagents such as siRNAs, peptide and small-molecule inhibitors will define new avenues for therapies, not only for some sarcomas but for tumors that present CAV1-triggered progression. In addition, as more protein and signaling molecules are found to interact with and regulate CAV1 expression the design of novel therapies for sarcomas will evolve. These therapies may include humanized antibodies, small-molecule inhibitors and targeted siRNAs altogether with improved gene therapy delivery systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Cristina Muñoz-Pinedo from the Cell Death Regulation group at IDIBELL for critical reading of the manuscript. LLT is funded by the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. Work in the Sarcoma Research group is supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (CP06/00151; PI080259) and from Ministerio de sanidad y Consumo (TRA-163).

REFERENCES

1. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Washington, DC: IARC Press. 2002; 120–2.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60: 277-300.
3. Ray-Coquard I, Thiesse P, Ranchère-Vince D, Chauvin F, Bobin JY, Sunyach MP, Carret JP, Mongodin B, Marec-Bérard P, Philip T, Blay JY. Conformity to clinical practice guidelines, multidisciplinary management and outcome of treatment for soft tissue sarcomas. *Ann Oncol.* 2004; 15: 307-15.
4. de Alava E. Molecular pathology in sarcomas. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 130-144
5. Ordóñez JL, Osuna D, García-Domínguez DJ, Amaral AT, Otero-Motta AP, Mackintosh C, Sevillano MV, Barbado MV, Hernández T, de Alava E. The clinical relevance of molecular genetics in soft tissue sarcomas. *Adv Anat Pathol.* 2010; 17: 162-81.
6. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010 Apr 23; 3: 416-28.
7. Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 8: 542-548.
8. Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Lisanti MP. Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3). Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett.* 1998; 429: 330-336.
9. Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Sherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, Lisanti MP. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-1 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem.* 1999; 274: 25718-25725.
10. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 1996; 378: 108-112.
11. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 1996; 271: 2255-2261.
12. Bastiano M, Parton RG. Caveolae at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123: 3831-3836.
13. Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 2008; 268: 187-201.
14. Quest AF, Gitierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1130-1150.
15. Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, Scheider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol.* 2001; 158: 833-839.
16. Kim E-J, Sohn JH, Kim M-K, Chae SW, Lee HS, Cho EY, Kim WH. The loss of expression of caveolin-1 in gastrointestinal stromal tumors. *Korean J Pathol.* 2005; 39: 338-344.
17. Bayer-Garner I, Morgan M, Smoller BR. Caveolin expression is common among benign and malignant smooth muscle and adipocyte neoplasms. *Mod Pathol.* 2002; 15: 1-5.
18. Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Plougastel B, Joubert I, Melot T, Peter M, De Jong P, Roulleau G, Aurias A, Thomas G. Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992; 5: 271-277.
19. Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene.* 2003; 22:9282-9287.
20. Kovar H, Ban J, Pospisilova S. Potentials for RNAi in sarcoma research and therapy: Ewing's sarcoma as a model. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13: 275-81.
21. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 2005; 65: 8984-8992.
22. Mateo-Lozano S, Gokhale PC, Soldatenkov VA, Dritschilo A, Tirado OM, Notario V. Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6781-6790.
23. Toub N, Bertrand JR, Malvy C, Fattal E, Couvreur P. Antisense oligonucleotide nanocapsules efficiently inhibit EWS-Fli1 expression in a Ewing's sarcoma model. *Oligonucleotides.* 2006; 16: 158-168.
24. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Lloret A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 9937-9947.
25. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, Karzeladze A, Savelov N, Petrov S, Alvarado-Cabrero I, Mihaila D, Terrier P, Lopez-Guerrero JA, Picci P. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch.* 2009; 455: 397-411.
26. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation. *Int J Cancer.* 2010; 126: 426-436.
27. Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F,

- Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan X, Garcia del Muro X, Fabra A, Tirado OM. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1489-1500.
28. Sengupta A, Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Auto-stimulatory action of secreted caveolin-1 on the proliferation of Ewing's sarcoma cells. *Int J Oncol*. 2011; 38: 1259-1265.
 29. Lau CC. Molecular classification of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152: 459-465.
 30. Cantiani L, Manara MC, Zucchini C, De Danctis P, Zuntini M, Valvassori L, Serra M, Olivero M, Di Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K. Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signalling. *Cancer Res*. 2007; 67: 7675-7685.
 31. Mayordomo E, Machado I, Giner F, Kresse SH, Myklebost O, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010; 18: 453-461.
 32. Huh WW, Skapek SX. Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment. *Curr Oncol Rep*. 2010; 12: 402-410.
 33. De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Lollini PL, Nanni P. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future Oncol*. 2009; 5: 1449-1475.
 34. Galli N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ 3rd, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 1993; 5: 230-235.
 35. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1994; 54: 2869-2872.
 36. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smoothmuscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*. 1996; 271: 15160-15165.
 37. Fine SW, Lisanti MP, Argani P, Li M. Caveolin-3 is a sensitive and specific marker for rhabdomyosarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13: 231-236.
 38. Rossi S, Poliani PL, Cominelli M, Bozzato A, Vescovi R, Monti E, Fanzani A. Caveolin 1 is a marker of poor differentiation in rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*. 2011; 47: 761-772.
 39. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6727.
 40. Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell*. 2003; 14: 334-347.
 41. Newcomb LF, Mastick CC. Src family kinase-dependent phosphorylation of a 29-kDa caveolin-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290: 1447-1453.
 42. Grande-García A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivieso JM, del Pozo MA. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*. 2007; 177: 683-694.
 43. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem*. 1997; 272: 30429-30438.
 44. Lajoie P, Kojic LD, Nim S, Li L, Dennis JW, Nabi IR. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2009; 185: 381-385.
 45. Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, Compton-Toth B, Roth BL. Caveolin-1 interacts with 5-HT2A serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected Galphaq-coupled protein receptors. *J Biol Chem*. 2004; 279: 34614-34623.
 46. Nabi IR. Cavin fever: regulating caveolae. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 789-791.
 47. Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB, Schnitzer JE. Tumor cell growth inhibition by caveolin-1 re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*. 1998; 16: 1391-1397.
 48. Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res*. 2010; 159: 443-450.
 49. Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL. Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene*. 2004; 23: 7893-7897.
 50. Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL, Fairchild TA, Iwakiri Y, Groszmann R, Claffey KP, Cheng YC, Sessa WC. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*. 2003; 4: 31-39.
 51. Tahir SA, Park S, Thompson TC. Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate and endothelial cells. *Cancer Biol Ther*. 2009; 8: 2286-2296.
 52. Felicetti F, Parolini I, Bottero L, Fecchi K, Errico MC, Raggi C, Biffoni M, Spadaro F, Lisanti MP, Sargiacomo M, Carè A. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int J Cancer*. 2009; 125: 1514-1522.
 53. Podar K, Tai YT, Cole CE, Hideshima T, Sattler M, Hamblin A, Mitsiades N, Schlossman RL, Davies FE, Morgan GJ, Munshi NC, Chauhan D, Anderson KC. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is

targeted by bortezomib. *Cancer Res.* 2004; 64: 7500-7506.

54. Wu H, Jiang H, Lu D, Xiong Y, Qu C, Zhou D, Mahmood A, Chopp M. Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. *Neurosurgery.* 2009; 65: 1087-1096.

Review Article

Targeted Therapies in Sarcomas: Challenging the Challenge

Juan Martín Liberal,¹ Laura Lagares-Tena,¹ Miguel Sáinz-Jaspeado,¹ Silvia Mateo-Lozano,² Xavier García del Muro,¹ and Oscar M. Tirado¹

¹Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL),
L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain

²Nanomedicine Research Program, Molecular Biology and Biochemistry Research Center, CIBBIM-Nanomedicine,
Vall d'Hebron Hospital Research Institute, 08035 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Oscar M. Tirado, omartinez@idibell.cat

Received 7 March 2012; Accepted 27 March 2012

Academic Editor: Peter Choong

Copyright © 2012 Juan Martín Liberal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sarcomas are a heterogeneous group of mesenchymal malignancies that very often lead to death. Nowadays, chemotherapy is the only available treatment for most sarcomas but there are few active drugs and clinical results still remain very poor. Thus, there is an imperious need to find new therapeutic alternatives in order to improve sarcoma patient's outcome. During the last years, there have been described a number of new molecular pathways that have allowed us to know more about cancer biology and tumorigenesis. Sarcomas are one of the tumors in which more advances have been made. Identification of specific chromosomal translocations, some important pathways characterization such as mTOR pathway or the insulin-like growth factor pathway, the stunning development in angiogenesis knowledge, and brand new agents like viruses have lead to the development of new therapeutic options with promising results. This paper makes an exhaustive review of preclinical and clinical evidence of the most recent targeted therapies in sarcomas and provides a future view of treatments that may lead to improve prognosis of patients affected with this disease.

1. Introduction

Sarcomas are a rare and heterogeneous group of malignant tumors of mesenchymal origin. They can occur through all the lifespan and affect patients of all ages, although certain specific subtypes are more frequent in children and young adults. Almost every part of the body may be involved, bone and soft-tissue being the most typical place of arising. Sarcomas are associated with bad prognosis and approximately 50% of all patients develop metastases even if they are diagnosed at early stages. Lungs are the most frequent site of dissemination and metastases are the final cause of death in almost all these patients [1]. These high mortality levels make sarcomas one of the most challenging tumors in oncology.

For most sarcomas, chemotherapy is currently the only available treatment. Unfortunately, a very limited number of useful drugs are active against this disease and responses used to be poor and short. In fact, advanced-stage patients treated

with the most active drugs in this disease (anthracyclines and ifosfamide) achieve only a median survival of around 1 year [2]. Thus, it is necessary to identify new agents to improve therapy for patients affected by this often mortal condition.

In the last years, great advances have been made in the understanding of sarcomas' molecular biology [3]. Consequently, new targeted compounds have been developed and tested in order to improve efficacy and outcome achieved with classic drugs. This paper will extensively review the most relevant pathways in soft tissue and bone sarcomas and the preclinical and clinical experience with the most recent targeted therapies.

2. Angiogenesis

In the last years, angiogenesis has been one of the most studied processes in tumor biology with interesting results. Patients with several malignancies such as renal cancer or

colorectal cancer are currently being treated with angiogenic inhibitors alone or in combination with conventional chemotherapy. These patients achieve significant improvement in overall survival (OS) and/or progression-free survival (PFS) [4]. Sarcomas have been recently added to the group of tumors in which angiogenesis is known to play an important role.

One of the key effectors in angiogenesis is the vascular endothelial growth factor (VEGF). It is well known that the interaction between VEGF and its receptor 2 (VEGF-R2) is the most crucial step in angiogenesis [5–7] and there are some studies that relate VEGF with sarcomas. A study by Potti et al. published in 2004 correlated VEGF serum levels with outcome in patients with sarcoma [8]. 68 out of 273 patients (24.9%) included in the study showed VEGF overexpression. The most common sarcomas in which VEGF overexpression was detected were malignant fibrous histiocytoma (30%), carcinosarcoma (30%), leiomyosarcoma (25%), and dermatofibrosarcoma (20%) but VEGF overexpression had prognostic value only in patients affected with leiomyosarcoma. In addition, this was associated with a shorter survival. Graeven et al. also determined VEGF serum levels in 85 patients with STS before surgery. They found a very strong correlation between tumor grade and VEGF serum levels, the poorest differentiated tumors being the ones with the highest VEGF levels [9]. Another study was designed to assess the correlation between VEGF and tumor grade [10]. Results confirmed that tumor grade correlated with VEGF expression. Furthermore, 78% of patients who died of sarcoma progression had high VEGF levels. However, VEGF expression was not found to be an independent predictor of OS or disease-free survival (DFS). In contrast, a study by Iyoda et al. that correlated VEGF overexpression and survival in patients with soft-tissue sarcomas (STSs) of the thorax found this correlation statistically significant. Thus, patients with absent or faint VEGF expression had higher 5-year DFS than patients with a strong VEGF expression (83.3% versus 13.2%, resp.) [11].

Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is another important player in angiogenesis since it is a transcription factor that acts as an upstream regulator of VEGF. In a 2006 paper by Shintani et al. HIF-1 α expression was determined by immunohistochemistry in a group of 49 specimens of STS. The analysis showed that patients with a strong or moderate expression of HIF-1 α had poorer OS than those with a weak or negative expression [12].

There are many other angiogenesis markers but not all of them are so clearly related with prognosis and survival as VEGF and HIF-1 α in sarcomas. Microvascular density (MVD) is one of them. Thus, in a work by Comandone et al., patients with high MVD had worse OS and DFS than patients with lower MVD [13]. In contrast, 3 other authors reported results that did not confirm this correlation between MVD and prognosis, so the real role of MVD in sarcomas remains unclear [14–16].

2.1. Angiogenic Inhibitors. These previous data provided a rationale for the development of preclinical and clinical studies with angiogenic inhibitors in sarcomas. An increasing

number of these drugs have been developed in the last years and the effects of many of them have been assessed (Figure 1).

2.1.1. Small-Molecule VEGF-R Inhibitors. Sunitinib is a multitargeted tyrosine kinase inhibitor (TKI) active against VEGF-R1, 2, 3, PDGFR and KIT, among others. In 2009, Stacchiotti et al. reported 3 responses and 1 stabilization in a cohort of 5 patients affected with advanced alveolar STS treated with sunitinib [17]. The same year, a phase II trial of sunitinib in the treatment of non-GIST sarcomas was published. A cohort of 53 patients with advanced non-GIST STS received 37.5 mg of sunitinib daily. 10 of these patients (20%) achieved stable disease (SD) for at least 16 weeks and, interestingly, 1 patient affected with desmoplastic round cell tumor (DSRCT) achieved a durable partial response (PR) for 56 weeks [18]. Focusing on 3 specific histologies (leiomyosarcoma, liposarcoma, and malignant fibrous histiocytoma), a phase II study was reported in 2010. In this trial, 48 patients with unresectable or metastatic STS of the histologies mentioned previously were treated daily with 50 mg of sunitinib malate for 4 weeks every 6 weeks. 3 or less prior lines of therapy were allowed. Median PFS and OS for liposarcoma, leiomyosarcoma, and fibrous histiocytoma were 3.9 and 18.6, 4.2 and 10.1, and 2.5 and 13.6 months, respectively. The 3-month progression-free rates (PFRs) in the untreated and pretreated patients with liposarcoma, leiomyosarcoma, and fibrous histiocytoma were 75% and 69.2%, 60%, and 62.5%, and 25% and 44.4%, respectively. The authors concluded that the 3-month PFR of >40% suggests activity for sunitinib at least in liposarcomas and leiomyosarcomas [19]. In contrast to these studies, the Gynecologic Oncology Group conducted a phase II study to assess the efficacy of sunitinib in the treatment of recurrent or persistent uterine leiomyosarcoma with disappointing results: of 25 patients enrolled, just 2 achieved a PR and the median PFS was 1.5 months [20].

Sorafenib is another TKI recently added to the group of drugs with activity in sarcomas. This TKI targets VEGF-R 2 and 3, PDGFR, Raf, and KIT, and several preclinical studies have demonstrated efficacy in different soft-tissue and bone sarcoma cell lines [20–25]. These encouraging preclinical results, together with some case reports of responses in patients with sarcomas treated with sorafenib [26, 27], led to the development of several clinical trials. In 2009, Maki et al. published a phase II trial of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas [28]. A total of 145 patients with different types of sarcomas were enrolled but just the angiosarcoma patients met the response rate (RR) primary end point planned for the study (5 out of 37 patients, 14%). Another study pointed out osteosarcoma as other sarcoma subtype in which sorafenib showed activity. The Italian group conducted a phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard therapy that showed 3 PRs (8%), 2 minor responses (6%), and 12 SDs (34%). Furthermore, median PFS and OS were 4 and 7 months, respectively, demonstrating sorafenib as the first targeted therapy active in osteosarcoma [29]. In order to find other responsive histologies to sorafenib, the Southwest Oncology Group (SWOG) promoted a phase II

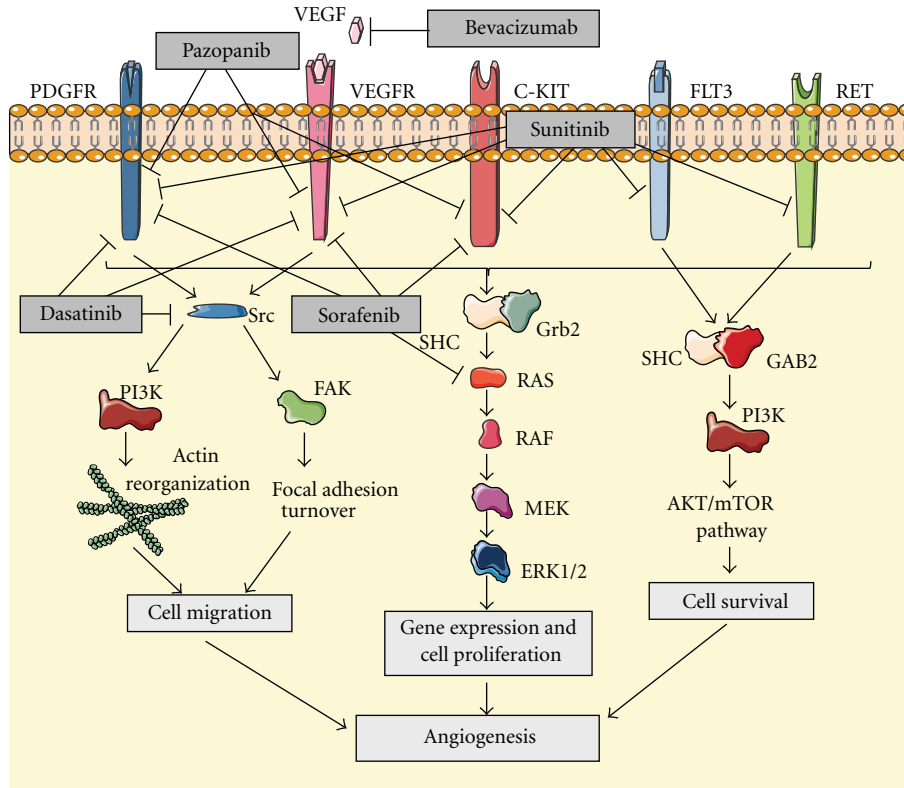


FIGURE 1: Inhibition of angiogenesis by blocking different tumorigenic signaling pathways.

trial testing its activity in advanced vascular sarcoma, high-grade liposarcoma, and leiomyosarcoma [30]. No responses were found and just 6 out of 8 patients with vascular sarcoma achieved clinical benefit. New strategies, such as discontinuation treatment, have also been tested. Thus, Pacey et al. assessed the efficacy of sorafenib in STS in a phase II randomized discontinuation trial [31]. Evidence of activity was found, since some tumor regressions were observed including 1 objective partial response.

Pazopanib is a new TKI that also has effects on angiogenesis by blocking VEGF-R 1, 2, and 3, PDGFR, and KIT. A phase II trial performed by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) in patients with relapsed or refractory advanced STS treated with pazopanib achieved promising results [32]. 142 patients were enrolled and they were classified in 4 different groups: adipocytic STS, leiomyosarcomas, synovial sarcomas, and other STS types. Pazopanib in adipocytic STS patients showed insufficient activity but PFR at 12 weeks in the remaining groups was encouraging: 18 (44%) of 41 patients in the leiomyosarcoma cohort, 18 (49%) of 37 in the synovial sarcomas, and 16 (39%) of 41 in the other STS types. These data led to the first placebo-controlled randomized phase III trial to date with a VEGFR inhibitor (pazopanib) in advanced STS. The results, reported in the 2011 ASCO Annual Meeting, achieved a significant increase in PFS showing the relevance of angiogenesis in sarcomas [33]. Finally, the activity of a new TKI named dasatinib has been assessed in several sarcoma cell lines. This drug blocks VEGF-R2 and PDGFR and has

the unique property of inhibiting the Src family. This latter effect leads to the inhibition of migration and invasion in different sarcoma cell lines *in vitro*, which can lead to further development of clinical trials [34–37].

2.1.2. Anti-VEGF Antibodies. Bevacizumab is the only monoclonal anti-VEGF antibody to date that has been proved to have activity in sarcomas. A set of preclinical studies demonstrated activity in sarcoma models *in vitro* and *in vivo* [38–42]. The experience achieved in a number of other malignancies such as colon, breast, or non-small-cell lung cancer, has shown that the effect of bevacizumab in combination with chemotherapy is higher than as a single agent. This strategy was first assessed in sarcomas by D'Adamo et al. in a phase II trial of doxorubicin and bevacizumab in patients with metastatic STS [43]. There were just 2 partial responses but 11 of 17 patients recruited (65%) achieved stable disease for 4 cycles or more. Interestingly, cardiac toxicity was significantly high and 4 patients developed cardiac toxicity grade 2, 1 patient grade 3, and 1 patient grade 4 despite prophylactic treatment with dexrazoxane. These results suggest the activity of this combination in sarcomas but make necessary finding safer schedules. The efficacy of bevacizumab in combination with other drugs has also been explored in a recently published phase IB trial. In this study, 38 chemotherapy-naive patients with advanced or recurrent STS were treated with a combination of docetaxel, gemcitabine, and bevacizumab [44]. After a median follow-up of 36 months, the overall RR observed was

31.4%. There were 5 complete responses (CRs), 6 PRs, and 18 SDs lasting for a median of 6 months. The combination treatment was considered safe and the highest-grade adverse events found were mostly related to bevacizumab.

3. The Insulin-Like Growth Factor Pathway

The insulin-like growth factor (IGF) system is a well-known complex network that regulates growth and development in superior organisms (Figure 2). The IGF receptor type 1 (IGFR-1) belongs to the family of tyrosine kinase receptors. The binding of its ligand IGF1 causes its phosphorylation and the subsequent activation of the downstream pathway that finally leads to proliferation and inhibition of apoptosis. The relationship between the IGF system and sarcomas is long-time known but the first studies to describe it were merely epidemiological [45]. In the last years, a variety of studies have confirmed this point. Thus, Prieur et al. described in 2004 the binding of EWS/FLI1 to the IGFBP3 promoter and the subsequent inhibition of IGFBP3 and the increase in free IGFR-1 ligand levels, which are related to the development of this malignancy [46]. Other sarcomas such as alveolar soft part sarcoma, leiomyosarcoma, synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, or desmoplastic small round cell tumor have also been described as tumors in which increases in IGFR-1 levels or some of its ligands have been correlated with sarcomagenesis [47–58].

3.1. IGF Pathway Inhibitors. The background described previously has led to the development of several studies that test different strategies to assess the inhibition of the IGF pathway in sarcoma models *in vitro* and *in vivo* [59–67]. The results, especially in rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma, have been encouraging and the clinical development of these drugs is currently being carried out.

3.1.1. Anti-IGFR-1 Antibodies. Among the different strategies developed to inhibit the IGF pathway, the most promising results have been achieved with monoclonal antibodies. There are several phase I studies that assess the safety and efficacy of inhibiting the IGF system in sarcomas with these drugs. Thus, Tolcher et al. published in 2009 an early clinical study with AMG 479, a fully human monoclonal antibody to IGFR-1. 15 out of 53 patients enrolled were sarcoma patients (12 Ewing's sarcoma, 3 others). Interestingly, 1 durable CR and 1 PR were achieved in 2 patients with Ewing's sarcoma [68]. In another phase I study recently published, a cohort of patients with different sarcoma histologies were treated with figitumumab (a fully human monoclonal antibody targeting the IGFR-1). Among 29 patients enrolled, 2 Ewing's sarcoma patients had objective responses (1 CR, 1 PR), 6 Ewing's sarcoma patients, 1 synovial sarcoma, and 1 fibrosarcoma achieved SD [69]. Unfortunately, the clinical development of this drug has been stopped due to disappointing results in other malignancies.

Several phase II trials with anti-IGFR-1 antibodies are currently being conducted. Preliminary data of treatment with IMC-A12 (cixutumumab) in patients with advanced or metastatic STS and Ewing's sarcoma have been reported

in the 2011 ASCO Annual Meeting. The best results were observed in the adipocytic sarcoma arm, with clinical benefit being achieved in 22 out of 37 patients (1 PR, 21 SD). Moreover, the PFS at 12 weeks in this group of patients was 50% [70]. With such promising results, further investigations are warranted.

3.1.2. IGFR-1 TKIs. A number of small molecules that inhibit IGFR-1 by binding to the tyrosine kinase intracellular portion of the receptor are currently in clinical development. No results of efficacy and safety are available yet but there is a body of preclinical data that support this therapeutic approach [71–78]. Reports of clinical outcome in patients treated with these drugs are long awaited and will allow us to confirm the usefulness of this strategy.

4. The Mammalian Target Rapamycin Pathway

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase integrated in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) complex network of signaling. It forms part of 2 multiprotein complexes named mTOR complex 1 and mTOR complex 2 (mTORC1 and mTORC2) and plays a key role in cell growth, proliferation, angiogenesis, and survival (Figure 3). Due to the many functions that mTOR regulates, its abnormal activity leads to a number of malignancies including sarcomas. The upregulation of growth factors or mutations in tyrosine kinase receptors that belongs to the mTOR network have been reported to be involved in the development of various sarcomas [79–84]. Furthermore, deletions of some mTOR pathway tumor suppressors such as tuberous sclerosis complex 1 and 2 (TSC1 and TSC2) and neurofibromatosis type 1 (NF1) are associated with both, benign and malignant mesenchymal tumors [85–88]. Hence, the capital importance of mTOR in tumorigenesis has made the development of mTOR inhibitors an important issue in oncology.

4.1. mTOR Inhibitors. To date, 4 compounds with anti-mTOR activity have reached the clinical setting. All of them belong to a single family of drugs and are derived from an initial molecule called sirolimus (rapamycin). Thus, temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, and the already mentioned sirolimus are nowadays under investigation in sarcomas and other tumors. Sirolimus inhibits mTOR kinase activity by binding to FK506 binding protein (FKBP12), one of the proteins that form mTORC1. This leads to cell cycle arresting in G1 phase and the subsequent inhibition in proliferation and cell growth. Preclinical data suggest activity of sirolimus in some paediatric malignancies including Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma [89, 90]. But, despite preclinical evidences, the only phase II trial with sirolimus in sarcomas to date (combined with ciclofosfamide) has been reported as negative [91]. A pro-drug of sirolimus named temsirolimus has also been tested in treatment of sarcoma. At least 2 papers have reported tumor growth inhibition in murine xenograft models of

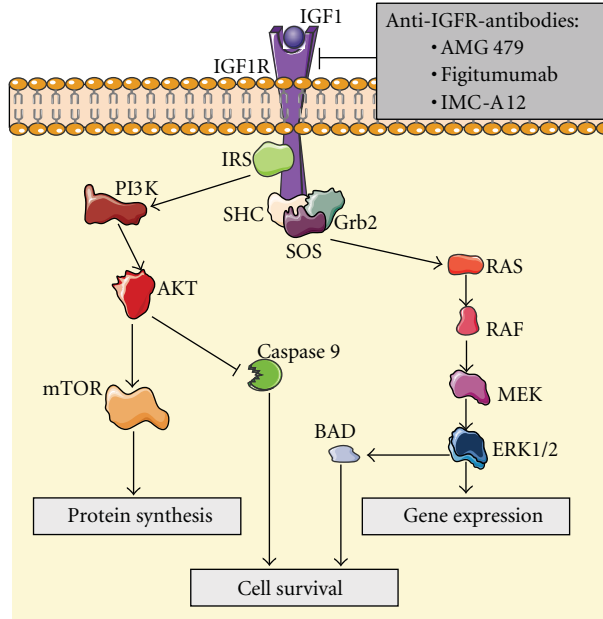


FIGURE 2: The activation of IGFR by ligand binding triggers a signal transduction pathway that causes the activation of mTOR pathway and inhibition of apoptosis, thus promoting cell survival. Anti-IGFR antibodies prevent this effect.

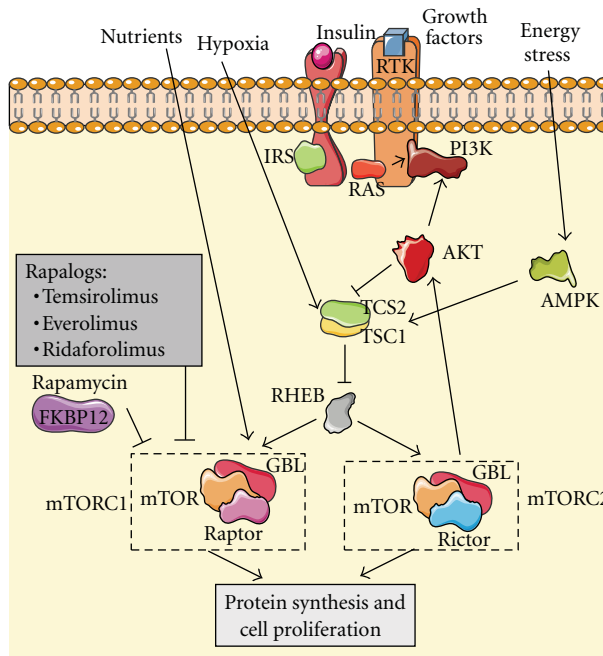


FIGURE 3: AKT activation, among other stimulus, can activate mTOR complexes, mTORC1 and mTORC2, promoting protein synthesis and cell proliferation. Rapamycin and rapalogs are specific inhibitors of mTORC1 but an escape route remains through mTORC2 activity.

rhabdomyosarcoma when treated with temsirolimus [92, 93]. But the first phase II trial published reported disappointing results, with just 2 out of 41 STS patients achieving PR. Thus, the authors concluded that temsirolimus in patients with STS has limited clinical activity and significant toxicity [94]. On the other hand, preliminary results of another phase II trial of temsirolimus in pediatric patients with

neuroblastoma, high-grade glioma, and rhabdomyosarcoma are slightly more encouraging, with 2 PR (1 neuroblastoma, 1 rhabdomyosarcoma) and 11 SD from a total of 52 patients [95]. Everolimus is an orally available mTOR inhibitor developed to be much more soluble than sirolimus. Cell cycle arrest in different tumor models has been observed with everolimus and even prolonged survival in a murine

model of leiomyosarcoma has been reported [96]. The only preliminary data reported to date of a phase II trial of everolimus in STS or bone sarcoma showed a clinical efficacy (CR + PR + SD) of 20% [97]. The last member of the family of rapamycin analogs (also called rapalogs) is ridaforolimus. It has a better pharmacokinetic profile, presenting a more favorable bioavailability than sirolimus. Activity of ridaforolimus alone has been confirmed in cell lines and xenograft models of sarcoma. Moreover, additive inhibitory effects when combined with cytotoxic agents have also been reported [98]. In the clinical setting, a phase II trial by Chawla et al. achieved a 29% clinical benefit in patients with advanced sarcoma treated with intravenous ridaforolimus and a median OS of 40 weeks [99]. Such interesting results led to the only phase III trial to date with an mTOR inhibitor: the SUCCEED trial. This double-blind, placebo-controlled phase III trial randomized sarcoma patients who had achieved CR, PR, or SD after 1, 2, or 3 lines of chemotherapy to receive placebo or ridaforolimus as maintenance treatment. Results recently reported showed a 28% reduction in the risk of progression in ridaforolimus arm compared with placebo arm and a 3.1-week improvement in PFS [100]. Mature OS data are not yet available but everything indicates that ridaforolimus is a promising drug in treatment of sarcomas and further investigations are warranted.

A very rare type of mesenchymal malignant tumor named Perivascular Epithelioid Cell Tumor (PEComa) has been specially related to the mTOR pathway. Dysfunction in tumor suppressors TSC1 and 2 and the subsequent upregulation of mTORC1 seems to be a crucial step in the development of this disease. Thus, responses with sirolimus and temsirolimus have been reported in at least 2 studies [101, 102]. However, another study did not find these positive results, making necessary additional investigations [103].

All 4 rapalogs described previously belong to a first generation of mTOR inhibitors able to inhibit mTORC1 but not mTORC2. mTORC2 seems to be responsible for feedback phosphorylation of Akt in the PI3K/Akt pathway, which could be a possible mechanism of resistance in sarcomas. So, a new generation of mTOR inhibitors with activity against mTORC1 and mTORC2 is under early development in an attempt to block this escape route.

5. Specific Chromosomal Translocations as Therapeutic Targets

About 1/3 of sarcomas are associated with specific chromosomal translocations. These translocations are an early step in carcinogenesis, promoting some of the processes that finally lead to the appearance of sarcomas [104]. Thus, trying to inhibit the effects of these genetic alterations seems to be a reasonable option in fighting sarcomas. Dermatofibrosarcoma protuberans is an example of this group of sarcomas. It is characterized by a t(17; 22) translocation that leads to the overexpression of platelet-derived growth factor B (PDGFB). Imatinib is a TKI with known activity against the receptor

of PDGFB, PDGFR. Because of that, its efficacy has been assessed in dermatofibrosarcoma protuberans with excellent results (46% PR, 25% SD) [105, 106].

Clear cell sarcoma is also associated with a specific chromosomal translocation, t(12; 22)(q13; q12) in most of the cases. One of the consequences of this chromosomal rearrangement is the activation of the hepatocyte growth factor receptor (MET). This activation is involved in invasion and angiogenesis. A response in a clear cell sarcoma patient with the MET inhibitor ARQ197 has recently been reported in a phase II trial, which is especially relevant in this treatment-resistant disease [107].

But probably the most studied translocation-related sarcoma is Ewing's sarcoma. This disease characteristically has a t(11; 22) translocation that leads to expression of the oncogenic fusion protein EWS/FLI1. This chimerical protein is involved in Ewing's sarcoma development since it acts as an oncogenic transcription factor but needs binding to other proteins such as RNA helicase A for its oncogenic function. Recently described YK-4-279, a new compound that blocks RNA helicase A binding to EWS/FLI1, induces apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines and reduces tumor growth in orthotopic xenografts [108]. A clinical trial to assess the efficacy of this new drug is planned.

6. Virotherapy

One of the most innovative approaches in cancer treatment developed in the last years is oncolytic virotherapy. The general basis of this strategy is that the therapeutic virus is capable to recognize specifically tumor cells, replicate into them, and lead to their death without damaging normal cells. A paper recently published in Nature by Breitbach et al. assessed the safety and efficacy of an intravenous delivery of an oncolytic poxvirus in humans. Treatment was generally well tolerated and the only sarcoma patient enrolled (a 55-year-old female with a heavily pretreated advanced leiomyosarcoma) achieved SD by RECIST criteria for >16 weeks [109]. This result is as encouraging for sarcoma treatment as a 2010 study published by Li et al. In that paper, the authors reported marked cytolysis and apoptosis in osteosarcoma cell lines *in vitro* and significant tumor growth suppression in a human osteosarcoma murine xenograft model when treated with a telomerase-specific oncolytic adenovirus [110]. More in-deep preclinical and clinical investigations are needed but virotherapy seems a feasible and reasonable option in future treatments for sarcomas.

7. Combined Targeted Therapies

Although clinical experience with targeted therapies in sarcomas as single treatment is short, there are some published studies with combination of 2 of these drugs. The most studied double-inhibition-targeted therapies are those related with IGFR-1 pathway, with preclinical evidences of activity in sarcoma models [111–113]. Based on these studies, at least 2 phase I trials have been reported, one

TABLE 1: Targets, drugs, and clinical trials. Drugs and their specific targets in sarcoma treatment and clinical trials with their results: positive (+), negative (-), or not published (x).

Target	Drug	Clinical trial		
Vascular endothelial growth factor	Tyrosine kinase inhibitors	Sunitinib	+ Phase II trial: non-GIST sarcoma [18]. + Phase II trial: leiomyosarcoma, liposarcoma, and malignant fibrous histiocytoma. [19].	
		Sorafenib	- Phase II study: treatment of recurrent/persistent uterine leiomyosarcoma [20]. + Phase II trial: patients with metastatic or recurrent sarcomas [28]. + Phase II trial: efficacy of sorafenib in STS [31]. + Phase II trial: relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma [29]. + Phase II trial: advanced vascular sarcoma, high grade liposarcoma and leiomyosarcoma [30].	
	Anti-VEGF antibodies	Pazopanib	+ Phase II trial: patients with relapsed or refractory advanced STS [32]. + Phase III trial: placebo-controlled randomized trial in advanced STS [33].	
		Dasatinib	x No results published.	
	Insulin-like growth factor	Bevacizumab	+ Phase II trial: doxorubicin and bevacizumab in patients with metastatic STS [43]. + Phase IB trial: efficacy of bevacizumab in combination with other drugs [44].	
		Tyrosine kinase inhibitors	Clinical development	
	Mammalian target of rapamycin	Anti-IGFRI antibodies	AMG 479	x No results published. + Phase I trial: response of sarcoma patients to a fully monoclonal antibody to IGFRI-1 [68].
			Figitumumab	- Phase I trial: different sarcoma patients [70].
		mTORC1 tyrosine kinase inhibitors	IMC-A12 (cixutumumab)	+ Phase II trial: patients with advanced or metastatic STS and Ewing Sarcoma [91].
			Sirolimus	- Phase II trial: combination with cyclophosphamide in sarcomas [91].
Hepatocyte growth factor receptor		Temsirolimus	+ Phase II trial: temsirolimus in pediatric patients with neuroblastoma, high-grade glioma, and rhabdomyosarcoma [95].	
		Everolimus	- Phase II trial: treatment in STS patients [94]	
Virus		Everolimus	+ Phase II trial: everolimus in STS or bone sarcoma [97]	
		Ridaforolimus	+ Phase II trial: treatment in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas [99]. + Phase III trial: placebo-controlled randomized sarcoma patient [99].	
Insulin-like growth factor/mammalian target of rapamycin		ARQ197	+ Phase II trial: patients with microph thalimia transcription-family-(MiT-) associated tumors [107].	
		Tumor cell	+ Phase I trial: oncolytic poxvirus in different cancer patients [109].	
Other targets	Tyrosine kinase inhibitors	+ Phase I trial: advanced sarcoma patients and other solid tumors [114].		
	ALK inhibitors	+ Phase I trial: patients with advanced cancer including sarcomas [115].		
Hepatocyte growth factor receptor	Crizotinib	+ Phase I trial: inflammatory myofibroblastic tumor with ALK overexpression [116].		
	Tumor cell	+ Ongoing clinical trials.		
Insulin-like growth factor/mammalian target of rapamycin	Tyrosine kinase inhibitors	+ Ongoing clinical trials.		
	PI3K/mTOR	+ Ongoing clinical trials.		

of them with figitumumab and everolimus in advanced sarcoma patients and the other solid tumors and the other with cixutumumab combined with temsirolimus in Ewing's sarcoma patients that is currently enrolling [114, 115]. Both studies reported good toxicity profiles, making the combination of 2 targeted therapies an attractive and safe option to be developed. Most trials involving the targeted therapies reviewed in this paper are summarized in Table 1.

8. Future Perspectives

An increasing number of new targets in treatment of sarcomas are being identified in the last years. The finding of new important key effectors in sarcomas biology has resulted in a growing development of inhibitor drugs that need to be tested. For instance, increased activity in Hedgehog pathway has recently been reported in certain sarcomas such as rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma [117–121]. Other reports suggest that rhabdomyosarcoma and osteosarcoma aggressiveness seems to be related with Notch signalling pathway [122, 123]. This has led to the conduction of a clinical trial with Hedgehog and Notch inhibitors with no results to date.

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is another protein recently related to sarcomas that is upregulated in approximately 50% of cases of inflammatory myofibroblastic tumor. Interestingly, in a phase I trial with the ALK inhibitor crizotinib, a patient with ALK overexpression related to inflammatory myofibroblastic tumor experienced a durable PR [116].

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors have also shown signs of efficacy in preclinical models of sarcomas [124–128] and several clinical trials are currently ongoing.

PI3K/mTOR dual-inhibitor NVP-BEZ235 that induces G1 cell cycle arrest in sarcomas *in vitro* and *in vivo* [129] has been identified as well as a brand new promising agent.

Other molecules such as MDM2 and protein families BCL-2 and CDKs have been described lately as associated with sarcomas [130–132]. Future investigations with inhibitors are warranted.

9. Conclusions

Despite the low incidence of sarcomas in general population regarding other types of cancer, the finding of new active treatments is essential since it is a rarely curable disease. Hence, a rapidly increasing number of targeted therapies have been developed in the last years with different results. In general, most of these treatments do not achieve significant tumor shrinkage and SD is usually the best response reported. In addition, OS has not been dramatically increased in the majority of these patients, showing the necessity of keep working. In an attempt to improve response rates, one of the strategies that are currently ongoing is the combination treatment with targeted therapies and conventional cytotoxic drugs. Toxicity is an important issue when using this approach and more clinical trials are needed to assess the safety of this therapeutic option. Combinations

of more than one targeted agent are another reasonable choice. The strategy of inhibiting a signalling pathway and simultaneously others that could be possible ways of escape is an attractive alternative still under early development. Phase I trials reported to date with 2 targeted therapies show favourable toxicity profiles, making this strategy a feasible and promising issue to be explored. Different approaches like those, future identification of new pathways and their correspondent inhibitors and the arise of innovative agents such as oncolytic viruses, make the final endpoint of cure sarcomas a goal not so far to be reached.

Acknowledgments

L. Lagares-Tena is funded by the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. Figures were produced using Servier Medical Art. The work in the Sarcoma Research Group is supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (CP06/00151; PI08/0259; PI11/00038) and from the Ministerio de sanidad y Consumo (TRA-163).

References

- [1] A. Italiano, S. Mathoulin-Pelissier, A. Le Cesne et al., "Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma," *Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 1049–1054, 2011.
- [2] P. G. Casali and J. Y. Blay, "ESMO/CONTICANET/EUROBONET Consensus Panel of experts. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Annals of Oncology*, vol. 21, supplement 5, pp. v198–v203, 2010.
- [3] E. Wardelmann, H. U. Schildhaus, S. Merkelbach-Bruse et al., "Soft tissue sarcoma: from molecular diagnosis to selection of treatment. Pathological diagnosis of soft tissue sarcoma amid molecular biology and targeted therapies," *Annals of Oncology*, vol. 21, no. 7, pp. vii265–vii269, 2010.
- [4] R. K. Jain, D. G. Duda, J. W. Clark, and J. S. Loeffler, "Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer," *Nature Clinical Practice Oncology*, vol. 3, no. 1, pp. 24–40, 2006.
- [5] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress," *Endocrine Reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 581–611, 2004.
- [6] N. Ferrara, "VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth," *European Cytokine Network*, vol. 20, no. 4, pp. 158–163, 2009.
- [7] J. A. Nagy, A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak, "VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis," *Annual Review of Pathology*, vol. 2, pp. 251–275, 2007.
- [8] A. Potti, A. K. Ganti, K. Tendulkar et al., "Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in soft tissue sarcomas and the role of overexpression in leiomyosarcoma," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 130, no. 1, pp. 52–56, 2004.
- [9] U. Graeven, N. Andre, E. Achilles, C. Zornig, and W. Schmiegel, "Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 125, no. 10, pp. 577–581, 1999.

- [10] C. Chao, T. Al-Saleem, J. J. Brooks, A. Rogatko, W. G. Kraybill, and B. Eisenberg, "Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 8, no. 3, pp. 260–267, 2001.
- [11] A. Iyoda, K. Hiroshima, M. Baba, T. Fujisawa, T. Yusa, and H. Ohwada, "Expression of vascular endothelial growth factor in thoracic sarcomas," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 71, no. 5, pp. 1635–1639, 2001.
- [12] K. Shintani, A. Matsumine, K. Kusuzaki et al., "Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α as a biomarker of outcome in soft-tissue sarcomas," *Virchows Archiv*, vol. 449, no. 6, pp. 673–681, 2006.
- [13] A. Comandone, A. Boglione, E. Berardengo et al., "Microvessel density (MVD) as a marker of neoangiogenesis: prognostic significance in correlation to grading and stage in adult soft tissue sarcoma (STS) of the extremities. A perspective study," *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 22, abstract 3303, 2003.
- [14] C. C. West, N. J. Brown, D. C. Mangham, R. J. Grimer, and M. W. R. Reed, "Microvessel density does not predict outcome in high grade soft tissue sarcoma," *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 31, no. 10, pp. 1198–1205, 2005.
- [15] N. C. Saenz, M. J. Heslin, V. Adsay et al., "Neovascularity and clinical outcome in high-grade extremity soft tissue sarcomas," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 5, no. 1, pp. 48–53, 1998.
- [16] K. Yudoh, M. Kanamori, K. Ohmori, T. Yasuda, M. Aoki, and T. Kimura, "Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas," *British Journal of Cancer*, vol. 84, no. 12, pp. 1610–1615, 2001.
- [17] S. Stacchiotti, E. Tamborini, A. Marrari et al., "Response to sunitinib malate in advanced alveolar soft part sarcoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 3, pp. 1096–1104, 2009.
- [18] S. George, P. Merriam, R. G. Maki et al., "Multicenter phase II trial of sunitinib in the treatment of nongastrointestinal stromal tumor sarcomas," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 19, pp. 3154–3160, 2009.
- [19] S. T. Mahmood, S. Agresta, C. Vigil et al., "Phase II study of sunitinib malate, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor in patients with relapsed or refractory soft tissue sarcomas. Focus on 3 prevalent histologies: Leiomyosarcoma, liposarcoma, and malignant fibrous histiocytoma," *International Journal of Cancer*, vol. 129, pp. 1963–1969, 2010.
- [20] M. L. Hensley, M. W. Sill, D. R. Scribner et al., "Sunitinib malate in the treatment of recurrent or persistent uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group phase II study," *Gynecologic Oncology*, vol. 115, no. 3, pp. 460–465, 2009.
- [21] X. Lu, X. Tang, W. Guo, T. Ren, and H. Zhao, "Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis of human chondrosarcoma cells by blocking the RAF/ERK/MEK pathway," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 102, no. 7, pp. 821–826, 2010.
- [22] Y. Pignochino, G. Grignani, G. Cavalloni et al., "Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways," *Molecular Cancer*, vol. 8, article 118, 2009.
- [23] W. Maruwge, P. D'Arcy, A. Folini et al., "Sorafenib inhibits tumor growth and vascularization of rhabdomyosarcoma cells by blocking IGF-1R-mediated signaling," *OncoTargets and Therapy*, vol. 1, pp. 67–78, 2008.
- [24] C. L. Peng, W. Guo, T. Ji et al., "Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis in human synovial sarcoma cells via inhibiting the RAF/MEK/ERK signaling pathway," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 8, no. 18, pp. 1729–1736, 2009.
- [25] G. Ambrosini, H. S. Cheema, S. Seelman et al., "Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 890–896, 2008.
- [26] A. Ardavanis, D. Doufexis, P. Kountourakis, and G. Rigatos, "A Kaposi's sarcoma complete clinical response after sorafenib administration," *Annals of Oncology*, vol. 19, no. 9, pp. 1658–1659, 2008.
- [27] U. Basso, A. Brunello, A. Bertuzzi, and A. Santoro, "Sorafenib is active on lung metastases from synovial sarcoma," *Annals of Oncology*, vol. 20, no. 2, pp. 386–387, 2009.
- [28] R. G. Maki, D. R. D'Adamo, M. L. Keohan et al., "Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 19, pp. 3133–3140, 2009.
- [29] G. Grignani, E. Palmerini, P. Dileo et al., "A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study," *Annals of Oncology*, vol. 23, pp. 508–516, 2012.
- [30] M. Von Mehren, C. Rankin, J. R. Goldblum et al., "Phase 2 Southwest Oncology Group-directed intergroup trial (S0505) of sorafenib in advanced soft tissue sarcomas," *Cancer*, vol. 118, pp. 770–776, 2012.
- [31] S. Pacey, M. J. Ratain, K. T. Flaherty et al., "Efficacy and safety of sorafenib in a subset of patients with advanced soft tissue sarcoma from a phase II randomized discontinuation trial," *Investigational New Drugs*, vol. 29, no. 3, pp. 481–488, 2011.
- [32] S. Sleijfer, I. Ray-Coquard, Z. Papai et al., "Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC Study 62043)," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 19, pp. 3126–3132, 2009.
- [33] W. Van-der-Graaf, J. Blay, S. P. Chawla et al., "PALETTE: a randomized, double-blind, phase III trial of pazopanib versus placebo in patients (pts) with soft-tissue sarcoma (STS) whose disease has progressed during or following prior chemotherapy—an EORTC STBSG Global Network Study (EORTC 62072)," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, abstract LBA10002, 2011.
- [34] A. C. Shor, E. A. Keschman, F. Y. Lee et al., "Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on Src kinase for survival," *Cancer Research*, vol. 67, no. 6, pp. 2800–2808, 2007.
- [35] F. Timeus, N. Crescenzo, A. Fandi, A. Doria, L. Foglia, and L. C. di Montezemolo, "In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines," *Oncology Reports*, vol. 19, no. 2, pp. 353–359, 2008.
- [36] P. Hingorani, W. Zhang, R. Gorlick, and E. A. Kolb, "Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma in vitro but not in vivo," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 10, pp. 3416–3422, 2009.
- [37] Y. M. Schrage, I. H. Briare-de Bruijn, N. F. C. C. De Miranda et al., "Kinome profiling of chondrosarcoma reveals Src-pathway activity and dasatinib as option for treatment," *Cancer Research*, vol. 69, no. 15, pp. 6216–6222, 2009.

- [38] S. Dalal, A. M. Berry, C. J. Cullinane et al., "Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma Family," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 6, pp. 2364–2378, 2005.
- [39] A. Ferrario and C. J. Gomer, "Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in a mouse tumor model," *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 25, pp. 251–259, 2006.
- [40] D. T. Vistica, M. Hollingshead, S. D. Borgel et al., "Therapeutic vulnerability of an in vivo model of alveolar soft part sarcoma (ASPS) to antiangiogenic therapy," *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 31, no. 8, pp. 561–570, 2009.
- [41] A. L. Myers, R. F. Williams, C. Y. Ng, J. E. Hartwich, and A. M. Davidoff, "Bevacizumab-induced tumor vessel remodeling in rhabdomyosarcoma xenografts increases the effectiveness of adjuvant ionizing radiation," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 45, no. 6, pp. 1080–1085, 2010.
- [42] Y. Okada, T. Akisue, H. Hara et al., "The effect of bevacizumab on tumour growth of malignant fibrous histiocytoma in an animal model," *Anticancer Research*, vol. 30, no. 9, pp. 3391–3395, 2010.
- [43] D. R. D'Adamo, S. E. Anderson, K. Albritton et al., "Phase II study of doxorubicin and bevacizumab for patients with metastatic soft-tissue sarcomas," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 28, pp. 7135–7142, 2005.
- [44] C. F. Verschraegen, H. Arias-Pulido, S. J. Lee et al., "Phase IB study of the combination of docetaxel, gemcitabine, and bevacizumab in patients with advanced or recurrent soft tissue sarcoma: the Axtell regimen," *Annals of Oncology*, vol. 23, pp. 785–790, 2011.
- [45] R. Gorlick, P. Anderson, I. Andrulis et al., "Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: Meeting Summary," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 15, pp. 5442–5453, 2003.
- [46] A. Prieur, F. Tirode, P. Cohen, and O. Delattre, "EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 16, pp. 7275–7283, 2004.
- [47] J. Khan, M. L. Bittner, L. H. Saal et al., "cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 23, pp. 13264–13269, 1999.
- [48] D. Ayalon, T. Glaser, and H. Werner, "Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression by the PAX3-FKHR oncoprotein," *Growth Hormone and IGF Research*, vol. 11, no. 5, pp. 289–297, 2001.
- [49] E. Karnieli, H. Werner, F. J. Rauscher, L. E. Benjamin, and D. Leroith, "The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 32, pp. 19304–19309, 1996.
- [50] I. Finkeltov, S. Kuhn, T. Glaser et al., "Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression by novel isoforms of the EWS-WT1 fusion protein," *Oncogene*, vol. 21, no. 12, pp. 1890–1898, 2002.
- [51] H. Werner, G. Idelman, M. Rubinstein, P. Pattee, S. R. Nagalla, and C. T. Roberts, "A novel EWS-WT1 gene fusion product in desmoplastic small round cell tumor is a potent transactivator of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) gene," *Cancer Letters*, vol. 247, no. 1-2, pp. 84–90, 2007.
- [52] P. V. Pedone, R. Tirabosco, A. O. Cavazzana et al., "Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors," *Human Molecular Genetics*, vol. 3, no. 7, pp. 1117–1121, 1994.
- [53] H. Scrabble, W. Cavenee, F. Ghavimi, M. Lovell, K. Morgan, and C. Sapienza, "A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 19, pp. 7480–7484, 1989.
- [54] M. Visser, C. Sijmons, J. Bras et al., "Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma," *Oncogene*, vol. 15, no. 11, pp. 1309–1314, 1997.
- [55] S. Zhan, D. N. Shapiro, and L. J. Helman, "Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 1, pp. 445–448, 1994.
- [56] J. Anderson, A. Gordon, K. Pritchard-Jones et al., "Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 26, pp. 275–285, 1999.
- [57] Y. Sun, D. Gao, Y. Liu, J. Huang, S. Lessnick, and S. Tanaka, "IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1," *Oncogene*, vol. 25, no. 7, pp. 1042–1052, 2006.
- [58] D. R. H. De Bruijn, S. V. Allander, A. H. A. Van Dijk et al., "The synovial sarcoma-associated SS18-SSX2 fusion protein induces epigenetic gene (de)regulation," *Cancer Research*, vol. 66, no. 19, pp. 9474–9482, 2006.
- [59] D. N. Shapiro, B. G. Jones, L. H. Shapiro, P. Dias, and P. J. Houghton, "Antisense-mediated reduction in insulin-like growth factor-I receptor expression suppresses the malignant phenotype of a human alveolar rhabdomyosarcoma," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 3, pp. 1235–1242, 1994.
- [60] K. Scotlandi, S. Avnet, S. Benini et al., "Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells," *International Journal of Cancer*, vol. 101, no. 1, pp. 11–16, 2002.
- [61] K. Scotlandi, S. Benini, P. Nanni et al., "Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice," *Cancer Research*, vol. 58, no. 18, pp. 4127–4131, 1998.
- [62] E. Anders Kolb, R. Gorlick, P. J. Houghton et al., "Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program," *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 50, no. 6, pp. 1190–1197, 2008.
- [63] T. Kalebic, M. Tsokos, and L. J. Helman, "In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34(cdc2)," *Cancer Research*, vol. 54, no. 21, pp. 5531–5534, 1994.
- [64] K. Scotlandi, M. C. Manara, G. Nicoletti et al., "Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors," *Cancer Research*, vol. 65, no. 9, pp. 3868–3876, 2005.
- [65] A. S. Martins, C. Mackintosh, D. Herrero Martín et al., "Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 11 I, pp. 3532–3540, 2006.
- [66] M. C. Manara, L. Landuzzi, P. Nanni et al., "Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor-specific inhibitor in Ewing's sarcoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 4, pp. 1322–1330, 2007.

- [67] L. Cao, Y. Yu, I. Darko et al., "Addiction to elevated insulin-like growth factor I receptor and initial modulation of the AKT pathway define the responsiveness of rhabdomyosarcoma to the targeting antibody," *Cancer Research*, vol. 68, no. 19, pp. 8039–8048, 2008.
- [68] A. W. Tolcher, J. Sarantopoulos, A. Patnaik et al., "Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 34, pp. 5800–5807, 2009.
- [69] D. Olmos, S. Postel-Vinay, L. R. Molife et al., "Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase I expansion cohort study," *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 2, pp. 129–135, 2010.
- [70] P. Schoffski, D. Adkins, J. Blay et al., "Phase II trial of anti-IGF-1R antibody cixutumumab in patients with advanced or metastatic soft-tissue sarcoma and Ewing family of tumors," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, abstract 10004, 2011.
- [71] K. Scotlandi, M. C. Manara, G. Nicoletti et al., "Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors," *Cancer Research*, vol. 65, no. 9, pp. 3868–3876, 2005.
- [72] A. S. Martins, C. Mackintosh, D. Herrero Martín et al., "Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 11 I, pp. 3532–3540, 2006.
- [73] M. C. Manara, L. Landuzzi, P. Nanni et al., "Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor-specific inhibitor in Ewing's sarcoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 4, pp. 1322–1330, 2007.
- [74] P. Sabbatini, J. L. Rowand, A. Groy et al., "Antitumor activity of GSK1904529A, a small-molecule inhibitor of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 9, pp. 3058–3067, 2009.
- [75] P. Sabbatini, S. Korenchuk, J. L. Rowand et al., "GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-I receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 10, pp. 2811–2820, 2009.
- [76] F. Huang, A. Greer, W. Hurlburt et al., "The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-I receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors," *Cancer Research*, vol. 69, no. 1, pp. 161–170, 2009.
- [77] N. Friedrichs, J. Kuchler, E. Endl et al., "Insulin-like growth factor-I receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma," *Journal of Pathology*, vol. 216, no. 4, pp. 428–439, 2008.
- [78] Z. Duan, E. Choy, D. Harmon et al., "Insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase inhibitor cyclophosphamide picropodophyllin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 8, pp. 2122–2130, 2009.
- [79] X. Wan and L. J. Helman, "The biology behind mTOR inhibition in sarcoma," *Oncologist*, vol. 12, no. 8, pp. 1007–1018, 2007.
- [80] A. A. Samani, S. Yakar, D. LeRoith, and P. Brodt, "The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights," *Endocrine Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 20–47, 2007.
- [81] Y. Xie, B. Skytting, G. Nilsson, B. Brodin, and O. Larsson, "Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype," *Cancer Research*, vol. 59, no. 15, pp. 3588–3591, 1999.
- [82] L. Girnita, A. Girnita, M. Wang, J. M. Meis-Kindblom, L. G. Kindblom, and O. Larsson, "A link between basic fibroblast growth factor (bFGF) and EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma cells," *Oncogene*, vol. 19, no. 37, pp. 4298–4301, 2000.
- [83] D. P. M. Hughes, D. G. Thomas, T. J. Giordano, L. H. Baker, and K. T. McDonagh, "Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma," *Cancer Research*, vol. 64, no. 6, pp. 2047–2053, 2004.
- [84] R. Ganti, S. X. Skapek, J. Zhang et al., "Expression and genomic status of EGFR and ErbB-2 in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma," *Modern Pathology*, vol. 19, no. 9, pp. 1213–1220, 2006.
- [85] J. R. Sampson, "Therapeutic targeting of mTOR in tuberous sclerosis," *Biochemical Society Transactions*, vol. 37, no. 1, pp. 259–264, 2009.
- [86] S. Umeoka, T. Koyama, Y. Miki, M. Akai, K. Tsutsui, and K. Togashi, "Pictorial review of tuberous sclerosis in various organs," *Radiographics*, vol. 28, no. 7, article e32, 2008.
- [87] K. P. Boyd, B. R. Korf, and A. Theos, "Neurofibromatosis type 1," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 61, no. 1, pp. 1–14, 2009.
- [88] D. Katz, A. Lazar, and D. Lev, "Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST): the clinical implications of cellular signalling pathways," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 11, p. e30, 2009.
- [89] S. Mateo-Lozano, P. C. Gokhale, V. Soldatenkov, A. Dritschilo, O. M. Tirado, and V. Notario, "Combination therapy targeting EWS/FLI-1 oncogene induces apoptosis of Ewing's sarcoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo," *Clinical Cancer Research*, vol. 12, pp. 6781–6790, 2006.
- [90] P. J. Houghton, C. L. Morton, R. Gorlick et al., "Stage 2 combination testing of rapamycin with cytotoxic agents by the pediatric preclinical testing program," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 9, no. 1, pp. 101–112, 2010.
- [91] S. Schuetz, L. Zhao, and R. Chugh, "Results of a phase II trial of sirolimus (S) and cyclophosphamide (C) in advanced sarcoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 29, Abstract 10003, 2011.
- [92] L. Dudkin, M. B. Dilling, P. J. Cheshire et al., "Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition," *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no. 6, pp. 1758–1764, 2001.
- [93] X. Wan, N. Shen, A. Mendoza, C. Khanna, and L. J. Helman, "CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1 α /VEGF signaling," *Neoplasia*, vol. 8, no. 5, pp. 394–401, 2006.
- [94] S. Okuno, H. Bailey, M. R. Mahoney et al., "A phase 2 study of temsirolimus (CCI-779) in patients with soft tissue sarcomas: a study of the mayo phase 2 Consortium (P2C)," *Cancer*, vol. 117, no. 15, pp. 3468–3475, 2011.
- [95] B. Georger, M. W. Kieran, S. Grupp et al., "Phase II study of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma, and rhabdomyosarcoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 15S, abstract 9541, 2010.
- [96] E. Hernandez, E. Charytonowicz, M. E. Dudas et al., "The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 748–753, 2007.

- [97] S. Richter, D. Pink, P. Hohenberger et al., "Multicenter, triplearm, single-stage, phase II trial to determine the efficacy and safety of everolimus (RAD001) in patients with refractory bone or soft tissue sarcomas including GIST," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 15S, abstract 10038, 2010.
- [98] R. M. Squillace, D. Miller, M. Cookson et al., "Antitumor activity of ridaforolimus and potential cell cycle determinants of sensitivity in sarcoma and endometrial cancer models," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 10, pp. 1959–1968, 2011.
- [99] S. P. Chawla, A. P. Staddon, L. H. Baker et al., "Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 1, pp. 78–84, 2012.
- [100] S. P. Chawla, J. Blay, I. L. Ray-Coquard et al., "Results of the phase III, placebo-controlled trial (SUCCEED) evaluating the mTOR inhibitor ridaforolimus (R) as maintenance therapy in advanced sarcoma patients (pts) following clinical benefit from prior standard cytotoxic chemotherapy (CT)," *Annals of Oncology*, vol. 29, abstract 10005, 2011.
- [101] A. J. Wagner, I. Malinowska-Kolodziej, J. A. Morgan et al., "Clinical activity of mTOR inhibition with sirolimus in malignant perivascular epithelioid cell tumors: targeting the pathogenic activation of mTORC1 in tumors," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 5, pp. 835–840, 2010.
- [102] A. Italiano, C. Delcambre, I. Hostein et al., "Treatment with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with malignant PEComa perivascular epithelioid cell tumors (PEComas) are rare," *Annals of Oncology*, vol. 21, no. 5, pp. 1135–1137, 2010.
- [103] V. Subbiah, J. C. Trent, and R. Kurzrock, "Resistance to mammalian target of rapamycin inhibitor therapy in perivascular epithelioid cell tumors," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 24, p. e415, 2010.
- [104] M. Sáinz-Jaspeado, J. Martin-Liberal, L. Lagares-Tena, S. Mateo-Lozano, X. Garcia-del-Muro, and O. M. Tirado, "Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe?" *Oncotarget*, vol. 2, pp. 305–312, 2011.
- [105] G. A. McArthur, G. D. Demetri, A. Van Oosterom et al., "Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: imatinib target exploration consortium study B2225," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 4, pp. 866–873, 2005.
- [106] P. Rutkowski, M. Van Glabbeke, C. J. Rankin et al., "Imatinib mesylate in advanced dermatofibrosarcoma protuberans: pooled analysis of two phase II clinical trials," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 10, pp. 1772–1779, 2010.
- [107] J. D. G. Goldberg, E. Choy, L. Rosen et al., "Preliminary results from a phase II study of ARQ197 in patients with microphthalmia transcription family (MiT)-associated tumors," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, abstract 10502, 2009.
- [108] H. V. Erkizan, Y. Kong, M. Merchant et al., "A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 7, pp. 750–756, 2009.
- [109] C. J. Breitbart, J. Burke, D. Jonker et al., "Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans," *Nature*, vol. 477, pp. 99–102, 2011.
- [110] G. Li, H. Kawashima, A. Ogoose et al., "Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 137, no. 6, pp. 1037–1051, 2011.
- [111] R. T. Kurmasheva, L. Dudkin, C. Billups, L. V. Debelenko, C. L. Morton, and P. J. Houghton, "The insulin-like growth factor-1 receptor-targeting antibody, CP-751,871, suppresses tumor-derived VEGF and synergizes with rapamycin in models of childhood sarcoma," *Cancer Research*, vol. 69, no. 19, pp. 7662–7671, 2009.
- [112] F. Huang, A. Greer, W. Hurlburt et al., "The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors," *Cancer Research*, vol. 69, no. 1, pp. 161–170, 2009.
- [113] A. S. Martins, J. L. Ordoñez, A. García-Sánchez et al., "A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study," *Cancer Research*, vol. 68, no. 15, pp. 6260–6270, 2008.
- [114] R. Quek, Q. Wang, J. A. Morgan et al., "Combination mTOR and IGF-1R inhibition: phase I trial of everolimus and figitumumab in patients with advanced sarcomas and other solid tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 4, pp. 871–879, 2011.
- [115] A. Naing, R. Kurzrock, A. Burger et al., "Phase I trial of cixutumumab combined with temsirolimus in patients with advanced cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, pp. 6052–6060, 2011.
- [116] J. E. Butrynski, D. R. D'Adamo, J. L. Hornick et al., "Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 18, pp. 1727–1733, 2010.
- [117] A. Zibat, E. Missiaglia, A. Rosenberger et al., "Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma," *Oncogene*, vol. 29, no. 48, pp. 6323–6330, 2010.
- [118] M. Hirotsu, T. Setoguchi, H. Sasaki et al., "Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma," *Molecular Cancer*, vol. 9, article 5, 2010.
- [119] T. D. Tiet, S. Hopyan, P. Nadesan et al., "Constitutive Hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation," *American Journal of Pathology*, vol. 168, no. 1, pp. 321–330, 2006.
- [120] J. Joo, L. Christensen, K. Warner et al., "GLI1 is a central mediator of EWS/FLI1 signaling in Ewing Tumors," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 10, Article ID e7608, 2009.
- [121] E. Beauchamp, G. Bulut, O. Abaan et al., "GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 14, pp. 9074–9082, 2009.
- [122] J. Roma, A. Masià, J. Reventós, J. S. De Toledo, and S. Gallego, "Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro," *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 3, pp. 505–513, 2011.
- [123] M. Tanaka, T. Setoguchi, M. Hirotsu et al., "Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation," *British Journal of Cancer*, vol. 100, no. 12, pp. 1957–1965, 2009.
- [124] E. R. Sampson, V. Amin, E. M. Schwarz, R. J. O'Keefe, and R. N. Rosier, "The histone deacetylase inhibitor vorinostat selectively sensitizes fibrosarcoma cells to chemotherapy," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 29, no. 4, pp. 623–632, 2011.
- [125] L. Su, H. Cheng, A. V. Sampaio, T. O. Nielsen, and T. M. Underhill, "EGR1 reactivation by histone deacetylase inhibitors promotes synovial sarcoma cell death through

- the PTEN tumor suppressor,” *Oncogene*, vol. 29, no. 30, pp. 4352–4361, 2010.
- [126] A. Hrzenjak, F. Moïnfar, M. L. Kremser et al., “Histone deacetylase inhibitor vorinostat suppresses the growth of uterine sarcomas in vitro and in vivo,” *Molecular Cancer*, vol. 9, article 49, 2010.
- [127] T. O. Nielsen, A. Nguyen, L. Su, B. Campbell, and N. M. Poulin, “Synergism of heat shock protein 90 and histone deacetylase inhibitors in synovial sarcoma,” *Sarcoma*, vol. 2009, Article ID 794901, 2009.
- [128] J. M. Lubieniecka, D. R. H. De Bruijn, L. Su et al., “Histone deacetylase inhibitors reverse SS18-SSX-mediated polycomb silencing of the tumor suppressor early growth response 1 in synovial sarcoma,” *Cancer Research*, vol. 68, no. 11, pp. 4303–4310, 2008.
- [129] M. C. Manara, G. Nicoletti, D. Zambelli et al., “NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas,” *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 2, pp. 530–540, 2010.
- [130] C. R. Müller, E. B. Paulsen, P. Noordhuis, F. Pedeutour, G. Sæter, and O. Myklebost, “Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A,” *International Journal of Cancer*, vol. 121, no. 1, pp. 199–205, 2007.
- [131] M. S. Brassesco, M. A. Cortez, E. T. Valera et al., “Cryptic SYT/SXX1 fusion gene in high-grade biphasic synovial sarcoma with unique complex rearrangement and extensive BCL2 overexpression,” *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 196, no. 2, pp. 189–193, 2010.
- [132] O. M. Tirado, S. Mateo-Lozano, and V. Notario, “Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing’s sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo,” *Cancer Research*, vol. 65, no. 20, pp. 9320–9327, 2005.

EphA2-Induced Angiogenesis in Ewing Sarcoma Cells Works through bFGF Production and Is Dependent on Caveolin-1

Miguel Sáinz-Jaspeado¹, Juan Huertas-Martinez¹, Laura Lagares-Tena¹, Juan Martín Liberal¹, Silvia Mateo-Lozano², Enrique de Alava³, Carmen de Torres⁴, Jaume Mora⁴, Xavier Garcia del Muro¹, Oscar M. Tirado^{1*}

1 Sarcoma Research Group, Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **2** Nanomedicine Research Program, Molecular Biology and Biochemistry Research Center, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Hospital Research Institute, Barcelona, Spain, **3** Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (University of Salamanca-CSIC), and University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, **4** Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

Abstract

Angiogenesis is the result of the combined activity of the tumor microenvironment and signaling molecules. The angiogenic switch is represented as an imbalance between pro- and anti-angiogenic factors and is a rate-limiting step in the development of tumors. Eph receptor tyrosine kinases and their membrane-anchored ligands, known as ephrins, constitute the largest receptor tyrosine kinase (RTK) subfamily and are considered a major family of pro-angiogenic RTKs. Ewing sarcoma (EWS) is a highly aggressive bone and soft tissue tumor affecting children and young adults. As other solid tumors, EWS are reliant on a functional vascular network for the delivery of nutrients and oxygen and for the removal of waste. Based on the biological roles of EphA2 in promoting angiogenesis, we explored the functional role of this receptor and its relationship with caveolin-1 (CAV1) in EWS angiogenesis. We demonstrated that lack of CAV1 results in a significant reduction in micro vascular density (MVD) on 3 different *in vivo* models. *In vitro*, this phenomenon correlated with inactivation of EphA2 receptor, lack of AKT response and downregulation of bFGF. We also demonstrated that secreted bFGF from EWS cells acted as chemoattractant for endothelial cells. Furthermore, interaction between EphA2 and CAV1 was necessary for the right localization and signaling of the receptor to produce bFGF through AKT and promote migration of endothelial cells. Finally, introduction of a dominant-negative form of EphA2 into EWS cells mostly reproduced the effects occurred by CAV1 silencing, strongly suggesting that the axis EphA2-CAV1 participates in the promotion of endothelial cell migration toward the tumors favoring EWS angiogenesis.

Citation: Sáinz-Jaspeado M, Huertas-Martinez J, Lagares-Tena L, Martín Liberal J, Mateo-Lozano S, et al. (2013) EphA2-Induced Angiogenesis in Ewing Sarcoma Cells Works through bFGF Production and Is Dependent on Caveolin-1. PLoS ONE 8(8): e71449. doi:10.1371/journal.pone.0071449

Editor: Jun Li, Sun Yat-sen University Medical School, China

Received: December 21, 2012; **Accepted:** July 3, 2013; **Published:** August 12, 2013

Copyright: © 2013 Sáinz-Jaspeado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII-FEDER (CP06/00151; PI080259; PI110038; PI110018; RD09/0076/00028; RD06/0020/0059; RD06/0020/1038). LLT is funded by the Comissionat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Empresa (DIUE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: omartinez@idibell.cat

Introduction

Caveolin-1 (CAV1) is an integral membrane protein involved in caveolae biogenesis, cholesterol homeostasis, intracellular trafficking and signal transduction, amongst other functions. The precise role of caveolin-1 in tumorigenesis and whether the protein acts as a tumor suppressor or as an oncogene seems to be cell type and context-dependent [1]. Recently, we identified *CAV1* as a metastasis-associated gene that is a transcriptional target of EWS/FLI1 as well as an important determinant of Ewing sarcoma (EWS) malignant phenotype and tumorigenicity [2]. CAV1 has been shown to generate autocrine and paracrine positive feedback loops by increasing several factors mRNA stability, leading to increased levels of these proteins and increased pro-angiogenic activities [3]. However, this potential role has not been explored yet in EWS.

The process of tumor neovascularization proceeds through the combined output of inductive signals from the entire cellular constituency of the tumor. The concept of the “angiogenic switch,” whereby tumors acquire the ability to grow exponentially and disseminate beyond their primary site, is one of the central components in our understanding of cancer [4]. The new vessels not only help to meet the growing metabolic demands of the tumor by supplying additional nutrients, but also provide potential routes for tumor dissemination and metastasis [5]. During the initial phase, genetic changes and local hypoxia in tumors contribute to increased secretion of soluble angiogenic factors by tumor cells, stromal cells and inflammatory cells. These angiogenic factors include: vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), placental growth factor (PIGF), and others. All these factors

promote the sprouting of new vessels from nearby existing vessels [6].

Eph receptor tyrosine kinases and their membrane-anchored ligands, known as ephrins, constitute the largest receptor tyrosine kinase (RTK) subfamily, including at least 16 receptors and 9 ligands in vertebrates [7]. Based on their binding preference to one or the other class of ephrins, Eph receptors have been subdivided into two subclasses, EphA and EphB. Eph receptors have diverse activities, including widespread effects on the intercellular junctions, cell shape, cell-substrate adhesion, cell movement and angiogenesis [8]. Moreover, the ephrin family is considered to be a major family of pro-angiogenic RTKs. Of these molecules, the EphA2 receptor, initially linked with neuronal migration during embryogenesis [9], is the most thoroughly studied with regard to its role in angiogenesis, and it has been implicated in responses such as endothelial cell migration and vascular assembly as well as regulation of epithelial cell junctions [10].

EWS is a highly aggressive bone and soft tissue tumor affecting children and young adults [11]. Patients most commonly die as a result of the development of metastases [12]. Abnormal vessel growth and function are hallmarks of cancer disease, and they contribute to metastasis and disease progression [13]. EWS, like other solid tumors, are reliant on a functional vascular network for the delivery of nutrients and oxygen and for the removal of waste [14]. Upon clinical presentation, Ewing tumors are highly hemorrhagic and harbor large and friable vessels. Therefore, defining the molecular mechanisms that direct blood vessel formation in EWS is key identifying new therapeutic targets that might prevent vascular development and metastasis.

Based on the biological roles of EphA2 in promoting angiogenesis [15], we explored the functional role of this receptor and its relationship with CAV1 in EWS angiogenesis. We demonstrated that lack of CAV1 results in a significant reduction in micro vascular density (MVD) in 3 different *in vivo* models. *In vitro*, this phenomenon correlated with inactivation of EphA2 receptor and downregulation of bFGF. We also demonstrated that secreted bFGF from EWS cells acted as chemoattractant for endothelial cells. Furthermore, interaction between EphA2 and CAV1 was necessary for the right localization and signaling of the receptor to produce bFGF through AKT. Finally, introduction of a dominant-negative form of EphA2 into EWS cells reproduced most of the effects occurred by CAV1 silencing, strongly suggesting that the axis EphA2-CAV1 participates in the promotion of endothelial cell migration toward the tumors favoring EWS angiogenesis.

Results

Growth Reduction in CAV1 Knocked down Xenografts is a Consequence of Impaired Angiogenesis

To further explore the mechanism by which CAV1 promotes tumor growth in EWS, we knocked down CAV1 expression in RDES, TC71 and SKES1 cells (Figure 1A) as previously described [2,16]. In agreement with previous results [2], CAV1 silencing resulted in significant tumor growth reduction in all three models ($P \leq 0.05$) (Figure 1B). H&E staining showed a reduced number of vessels and a major incidence of necrosis in tumor sections from CAV1 knocked down cells (Figure 1C). Moreover, CD31 staining showed a significant reduction on MVD ($P \leq 0.05$) in CAV1 knocked down tumors (Figure 1D).

Tumor cells secrete factors that promote the growth and the migration of endothelial cells to the tumor [17]. Conditioned media (CM) from CAV1 knocked down cells showed significant reduced capability to promote migration of endothelial cells

($P \leq 0.05$) with no changes in proliferation (Figure 2A–B). Moreover, immunofluorescence of phospho-FAK in endothelial cells grown with CM from control cells showed its localization on sprouts. In contrast, in endothelial cells grown with CM from CAV1 knocked down cells phosphorylated FAK appeared in a more perinuclear location (Figure 2C). Analysis of FAK expression showed higher levels of cleaved FAK in those cells grown with CM from control cells (Figure 2D). These results suggested that CM from CAV1 knocked down cells had reduced levels or lack of a factor that promoted migration of endothelial cells. In order to ascertain which factor or factors may be responsible for such activity, we explored by RT-PCR the expression of several pro-angiogenic factors in different EWS cell lines (Figure S1). Of all pro-angiogenic factors tested, bFGF was the only one reduced upon CAV1 knock down in all three models (Figure 3A and Figure S2). Accordingly, in the TC71 model, protein expression was also reduced from cell extracts and in CM (Figure 3B). Furthermore, CM from parental TC71 cells in the presence of a neutralizing antibody against bFGF showed similar reduced capability promoting endothelial cell migration than CAV1 knocked down cells (Figure 3C). Addition of recombinant bFGF to CM from CAV1 knocked down cells restored endothelial cell migration (Figure 3C) strongly suggesting that bFGF secreted from EWS cells promotes endothelial cell migration.

Proper Localization and Signaling of EphA2 Receptor Depends on CAV1 Interaction

CAV1 has been shown to function as an activator of EphA2 signaling in endothelial cells [18]. Thus, we sought whether EphA2 was expressed in EWS. As shown in figure 4A, EphA2 receptor was widely expressed among EWS cell lines. Also, immunohistochemical analysis of a panel of 28 patients showed high expression of EphA2 in all samples. Moreover, although EWS cells lines showed expression of other members of the Eph receptor family (data not shown), their expression in tumor samples was not observed (Figure S3). Interestingly, CAV1 silencing resulted in a slight, if any, decrease of EphA2 protein expression (Figure 4B), a clear decrease on its phosphorylation (Figure 4C) and a displacement of the receptor from the membrane to the cytosolic fraction of the cell (Figure 4D). Of note, in EWS cells EphA2 receptor was shown to be constitutively phosphorylated (Figure 4C) suggesting that EWS cells express its main ligand ephrin-A1. As shown in Figure S4, EWS cells indeed express this ligand. Based on the results exposed above we explored the possibility that CAV1 was promoting localization and signaling of EphA2 through direct interaction in EWS cells. Consequently, cell lysate from the RDES model was subjected to immunoprecipitation using specific antibodies. As seen in Figure 5A, EphA2 was present in the CAV1 immunoprecipitated samples and vice versa, suggesting that CAV1 interacts with EphA2. No fusion proteins were detected in control immunoprecipitation reactions performed with IgG antibodies (Figure 5A). Accordingly, confocal microscopy analysis showed co-localization of both proteins in the plasma membrane of RDES cells (Figure 5B) and xenografts (Figure S5). In order to further demonstrate the implication of CAV1 in EphA2 signaling we stimulated cells from the RDES and TC71 models with a soluble activating form of ephrin-A1 (ephrin-A1 Fc). Contrary to CAV1 knocked down cells, addition of ephrin-A1 to controls resulted in tyrosine hyper-phosphorylation of EphA2 (Figure 6A). Interestingly, after ephrin stimulation no activation of ERKs was observed in the whole model. However, it resulted in activation of AKT (Figure 6B) and overexpression of bFGF (Figure 6D) in control cells but not in CAV1 knocked down cells, suggesting that the

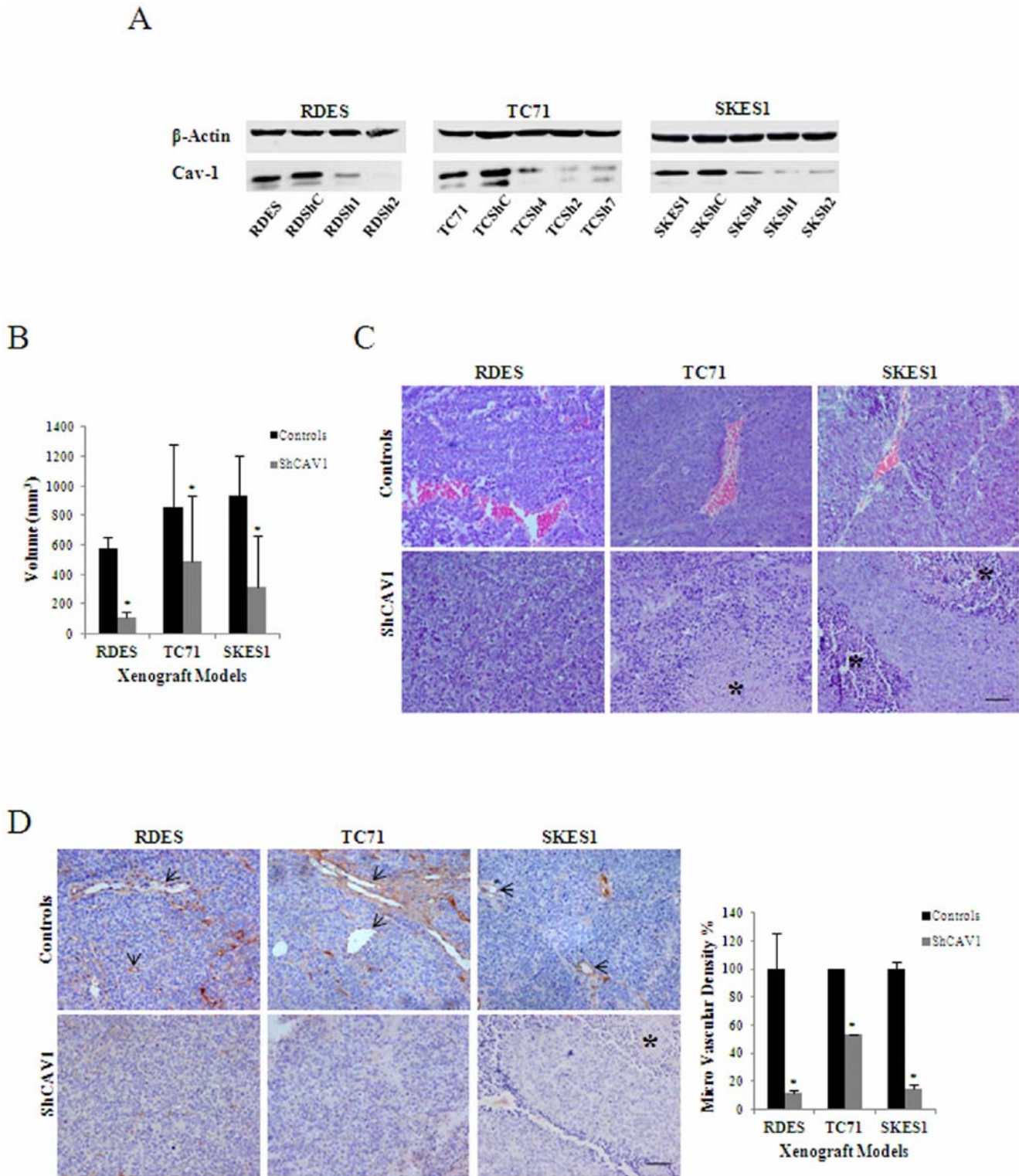


Figure 1. CAV1 silencing reduces vascularization in EWS. A. Immunoblot showing substantially reduced CAV1 levels in selected clones of RDES, TC71 and SKES1 cells stably expressing a CAV1 shRNA compared with untransfected cells and cells transfected with an empty vector. β -Actin was used as loading control. **B.** Mice xenograft volumes comparing tumors from grouped control cells (parental $n=5$; empty vector $n=5$) and 2 CAV1 knocked-down cells ($n=5$ for every clone); bars, SD ($*P\leq 0.05$). **C.** Hematoxylin and Eosin (H&E) staining from corresponding paraffin-embedded tumors. Asterisks indicate necrotic lakes. Scale bar, 50 μ m. **D.** CD31 immunohistochemistry detecting positive blood vessels in paraffin-embedded tumors. Arrows indicate blood vessel staining. Scale bar, 50 μ m. Graph shows MVD comparing all three models and showing the constant reduction of blood vessels in CAV1 knocked-down cells; bars, SD ($*P\leq 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0071449.g001

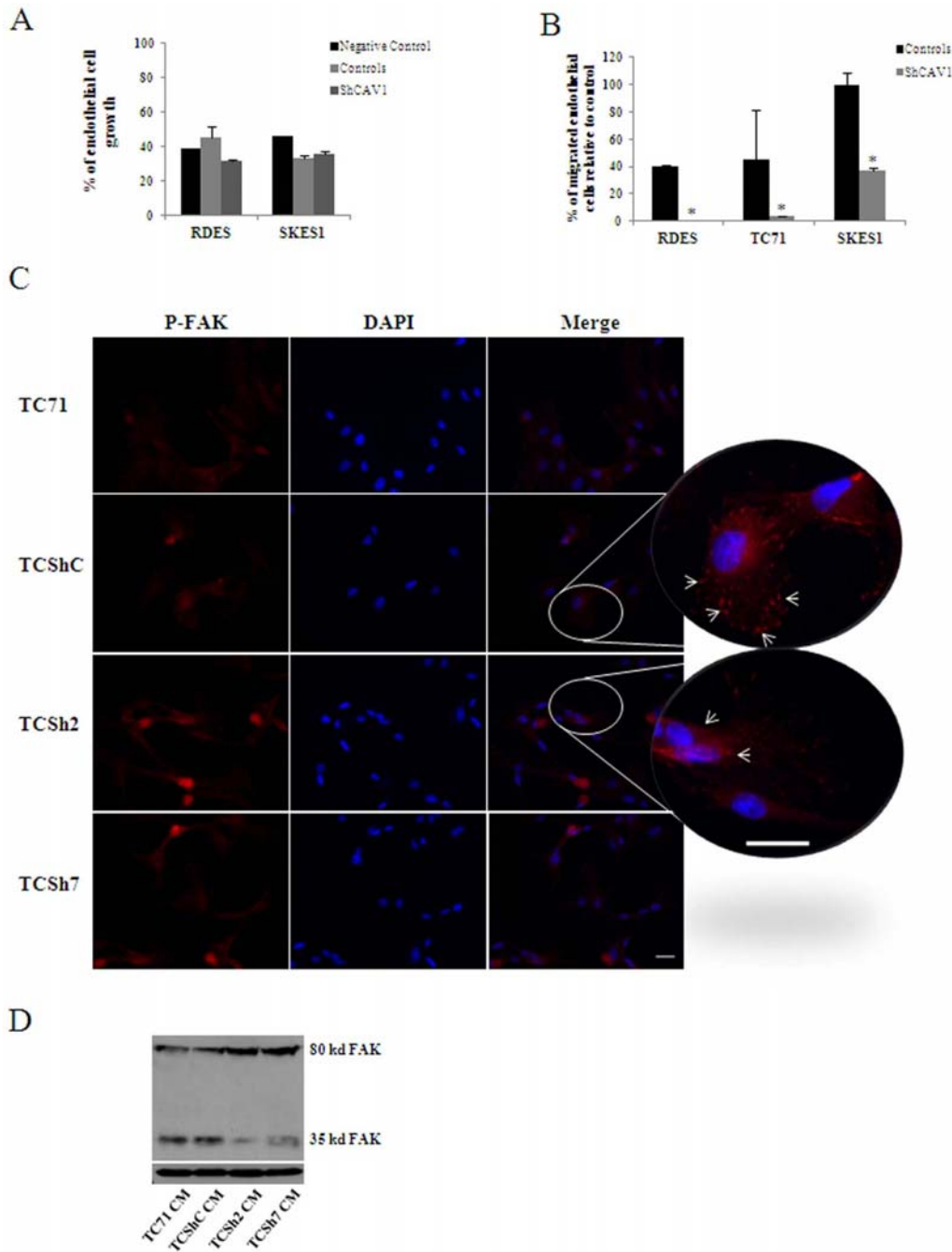
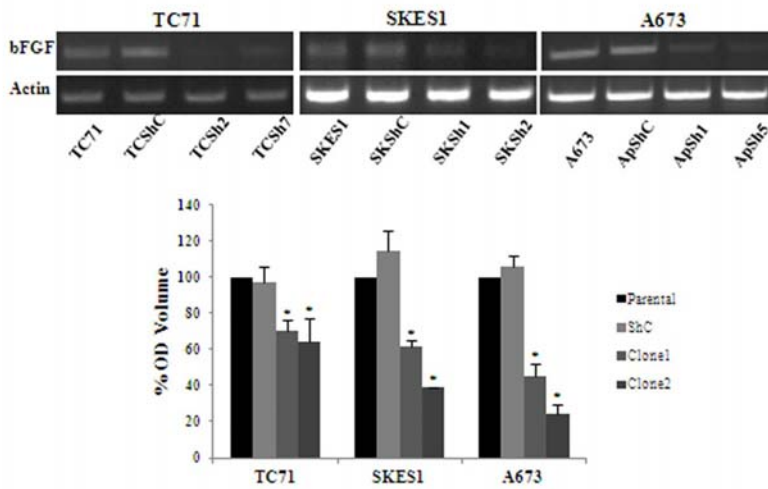


Figure 2. CAV1 silencing results on reduced endothelial cell migration. **A.** Quantification of endothelial cell growth comparing conditioned media (CM) from CAV1 knocked-down models versus RPMI without serum as negative control ($n=3$). **B.** Quantification of endothelial cell migration where CM from RDES and TC71 models was used as chemoattractant for endothelial cells; bars, SD ($*P\leq 0.05$, $n=3$). **C.** Phospho-FAK immunofluorescence. Endothelial cells cultured with CM from TC71 CAV1 knocked-down model, showing a decrease on phospho-FAK sprouts. Scale bar, 20 μm . **D.** FAK expression was analyzed in PAEC cells grown in CM from the TC71 model. Blot shows higher expression of 35 kd cleaved FAK form in cells grown with TC71 control CM than with TC71 Sh CM. doi:10.1371/journal.pone.0071449.g002

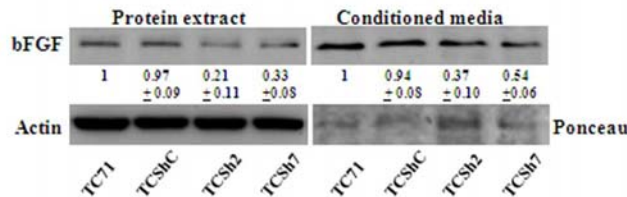
interaction of CAV1 with EphA2 in the presence of the ligand activates AKT signaling to promote bFGF expression. To further demonstrate the implication of AKT in producing bFGF we stimulated TC71 cells with ephrin-A1 in the presence of an AKT inhibitor. Results showed that cells stimulated in the presence of the AKT inhibitor, although showing stimulation of EphA2 (Figure 6C), did not respond inducing more bFGF transcript

(Figure 6E). These results strongly suggest that, indeed, induction of bFGF after ephrin-A1 stimulation occurs through activation of the AKT signaling.

A



B



C

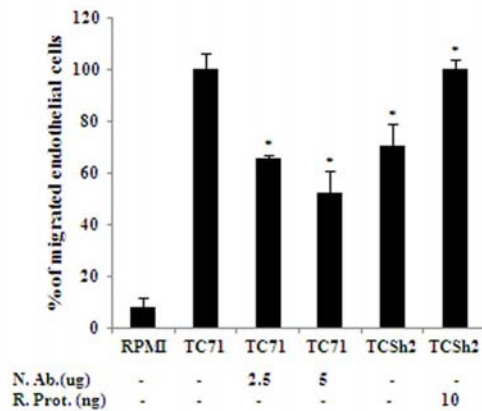


Figure 3. CAV1 silencing results in reduced bFGF transcription and secretion. **A.** bFGF expression was analyzed in CAV1 knocked-down models showing that bFGF expression was affected constantly in all models. The graph shows the quantification of the OD volume determined from the intensity of the bands from the RT-PCR images showing the statistically significant reduction in bFGF in CAV1 knocked-down cells; bars, SD (* $P \leq 0.05$ n=3) **B.** Immunoblot showing bFGF reduction in the TC71 model either in total protein extract or CM. Actin blot and ponceau staining was used as loading control. Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane (n=3) **C.** Quantification of endothelial cell migration. CM was used as chemoattractant for endothelial cells. A neutralizing antibody -N. Ab- (2.5 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$) and a recombinant protein -R. Prot- (10 ng/ml); bars, SD (* $P < 0.002$ - when compared with parental CM - and * $P = 0.0005$ - when compared with clone n=3) were used to block and promote migration respectively. RPMI media alone was used as negative control. doi:10.1371/journal.pone.0071449.g003

Promotion of Angiogenesis through EphA2 is Kinase-dependent

Forward EphA2 signaling is mainly kinase-dependent. Nonetheless, Eph receptors are nonclassical receptor tyrosine kinases because, besides kinase-dependent signaling, ligation of certain members of the Eph family can also trigger kinase-independent responses [19]. Given that CAV1 silencing affected tyrosine

phosphorylation of EphA2, we asked whether disrupting EphA2 kinase-dependent activities by stably transfecting a dominant-negative construct of EphA2 (EphA2-kd) into RDES and TC71 cells would recapitulate the anti-angiogenic effects derived from CAV1 silencing. Similar to CAV1 knocked down cells EphA2-kd cells in both models showed a clear decrease in constitutive EphA2 phosphorylation (Figure 7A) and a displacement of the receptor

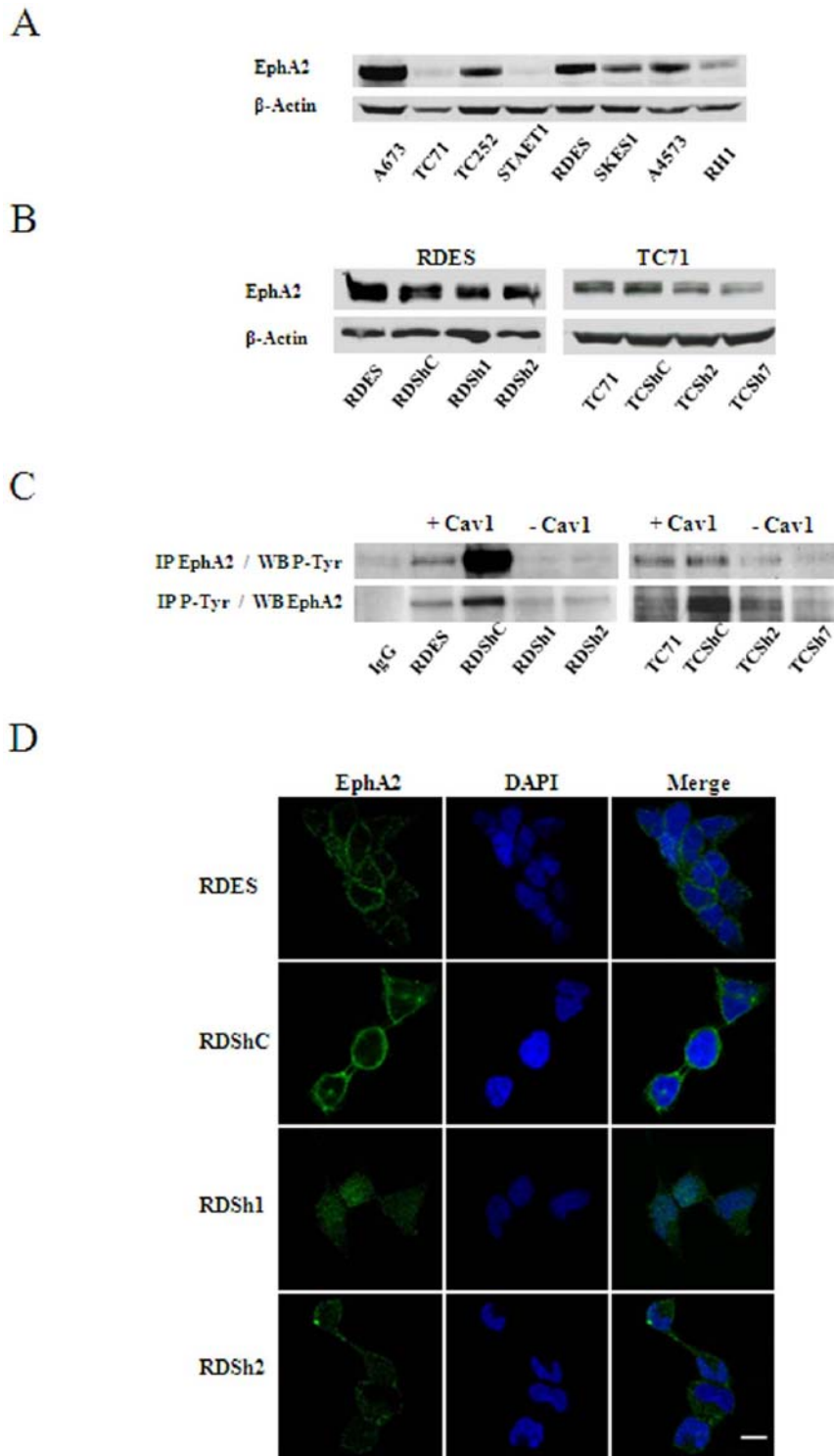
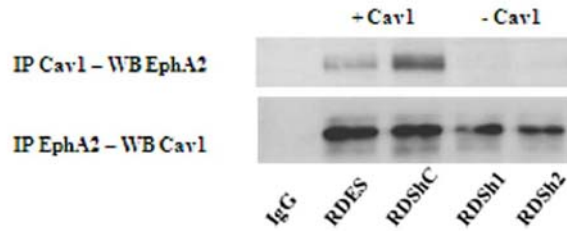


Figure 4. EphA2 receptor is expressed in EWS cells and is constitutively activated. **A.** Immunoblot of EphA2 in EWS cell lines **B.** Immunoblot of EphA2 in CAV1 knocked-down models showing a slight reduction of EphA2 expression in knocked-down cells when compared with parental and control cells. **C.** Immunoprecipitation of EphA2 blotted with phosphotyrosine and immunoprecipitation of phosphotyrosine blotted with EphA2 confirming its constitutive activation. **D.** Immunofluorescence of the RDES model showing EphA2 redistribution in cell cytoplasm as a consequence of CAV1 silencing. DAPI was used to identify the nucleus. Scale bar, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0071449.g004

from the membrane to the cytosolic fraction of RDES cells (Figure 7B). Also, conditioned media from RDES EphA2-kd cells showed significant reduced capability to promote migration of

endothelial cells ($P \leq 0.05$) (Figure 7C). Tumor growth reduction was significant in the RDES EphA2-kd model ($P \leq 0.05$) and considerable (about 50%) although not reaching significance

A



B

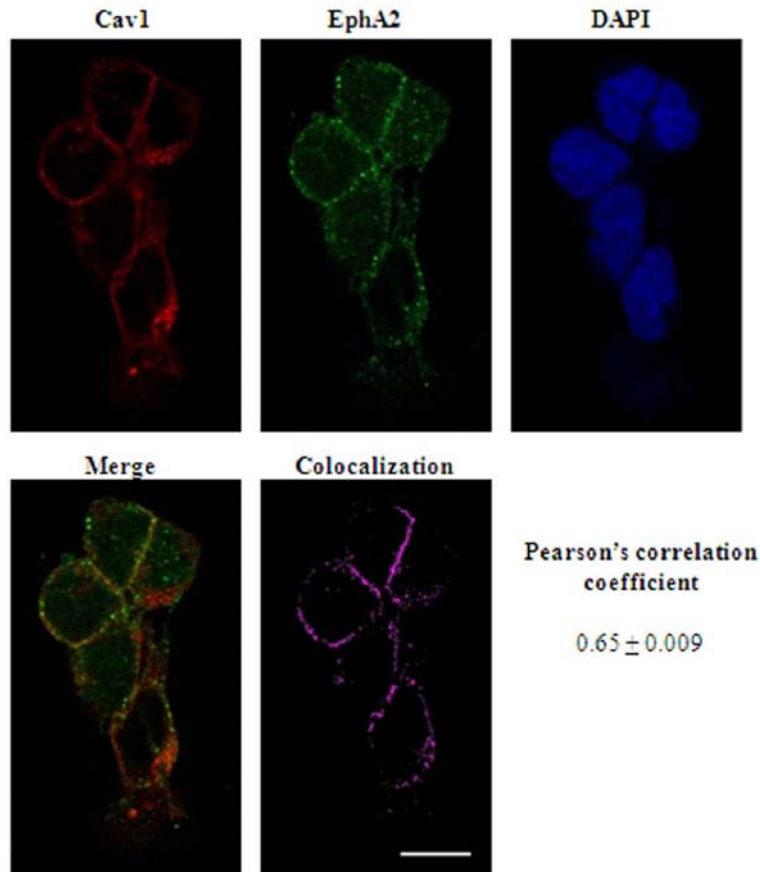


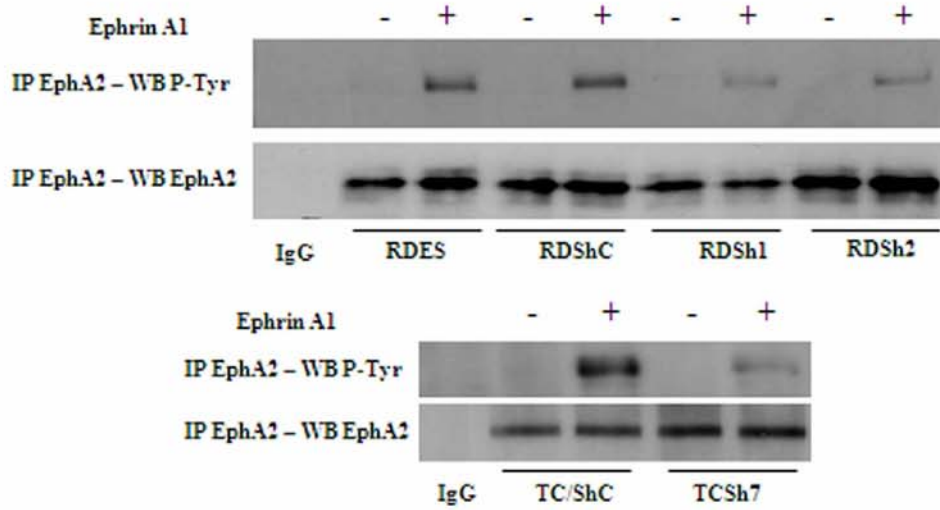
Figure 5. CAV1 interacts with EphA2 receptor. **A.** Co-immunoprecipitation of CAV1 and EphA2 showing their interaction. **B.** Co-immunofluorescence of CAV1 and EphA2 showing co-localization in cell membrane in RDES cells. DAPI was used to identify the nucleus. The grade of co-localization was measured by the Pearson's correlation coefficient (PCC) $PCC = 0.65 \pm 0.009$. Scale bar, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0071449.g005

($P = 0.19$) in the TC71 EphA2-kd model (Figure 7D). Histological analysis of tumor sections however, showed considerable higher amounts of necrosis in EphA2-kd cells from both models (Figure S6). Accordingly, MVD reduction was significant in the RDES model ($P \leq 0.05$) and considerably lower (40%) in the TC71 model (Figure 7E). Lastly, after ephrin stimulation EphA2-kd cells from the TC71 model neither showed AKT activation (Figure 7F) nor overexpression of bFGF (Figure 7G) suggesting that EphA2 kinase-dependent signaling through activation of AKT is necessary for bFGF overexpression and promotion of angiogenesis in EWS tumors.

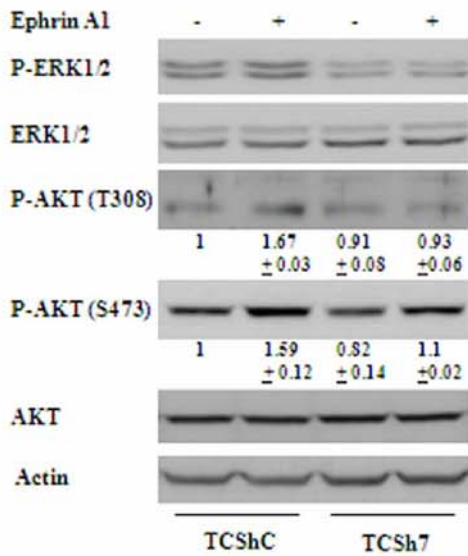
Discussion

Like all solid tumors, EWS require a viable vascular supply for tumor cells to grow beyond the limits of oxygen and nutrient diffusion into tissues [14]. EWS basically rely on a combination of angiogenesis and vasculogenesis [20]. Apart from what is known about the role of vasculogenesis in EWS vascular tumor blood supply [20], little is known about the regulation of angiogenesis sprouting. As shown previously, CAV1 silencing in EWS cells impairs tumor growth in nude mice [2]. Because CAV1 has been shown to contribute to the progress of angiogenesis in different tumor entities [21,22], we sought to determine whether the

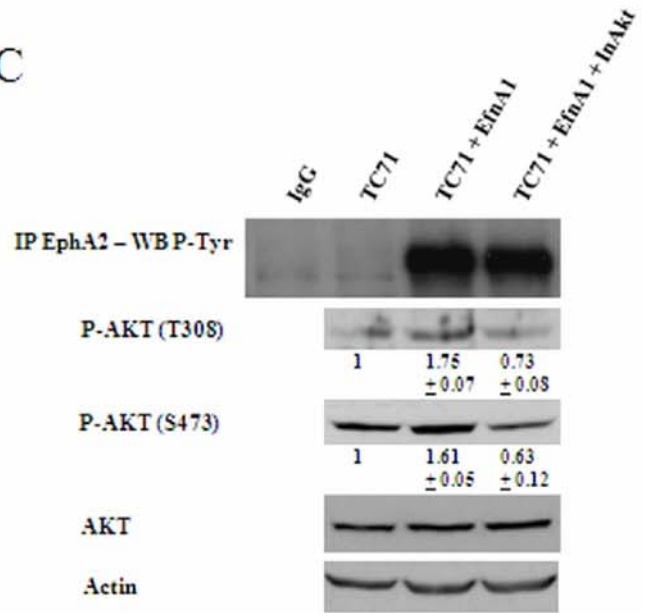
A



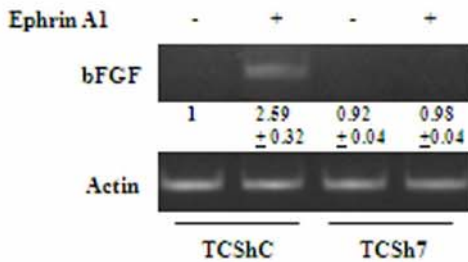
B



C



D



E

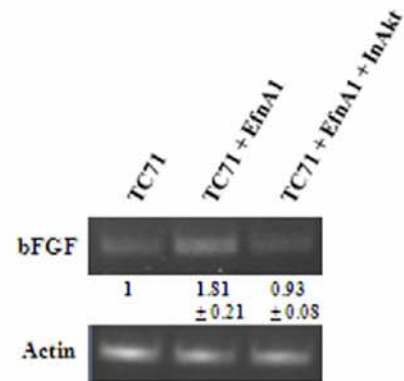


Figure 6. Stimulation of EphA2 promotes bFGF transcription through activation of AKT. **A.** Immunoblot showing higher EphA2 phosphorylation in response to ephrin-A1 stimulation in control cells compared with CAV1 knocked down starved cells. EphA2 blotting was used as control. **B.** Immunoblot showing activation of AKT in control cells and RT-PCR showing higher bFGF transcription after ephrin-A1 stimulation. No significant changes on ERK1/2 phosphorylation are shown. Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane for the phospho-AKTs western analysis (n=5) **C.** Immunoblot showing blockage of AKT activation in TC71 cells stimulated with ephrin-A1 in the presence of an AKT inhibitor (5 μM). Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane (n=5). **D and E.** By RT-PCR bFGF transcript changes are shown. Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane (n=3). doi:10.1371/journal.pone.0071449.g006

impairment of tumor growth correlated with impaired angiogenesis as a consequence of CAV1 silencing and the mechanisms involved. We established three new models of low CAV1 expression in EWS cells. In all three, reduction of tumor growth correlated with a significant decrease of MVD. To our knowledge,

this is the first study demonstrating a direct effect on tumor angiogenesis by knocking down CAV1 in tumor cells.

In order to determine the effects of EWS cell CAV1 silencing on endothelial cells, we used CM from the models and compared, *in vitro*, the proliferative and migratory capacity of endothelial cells.

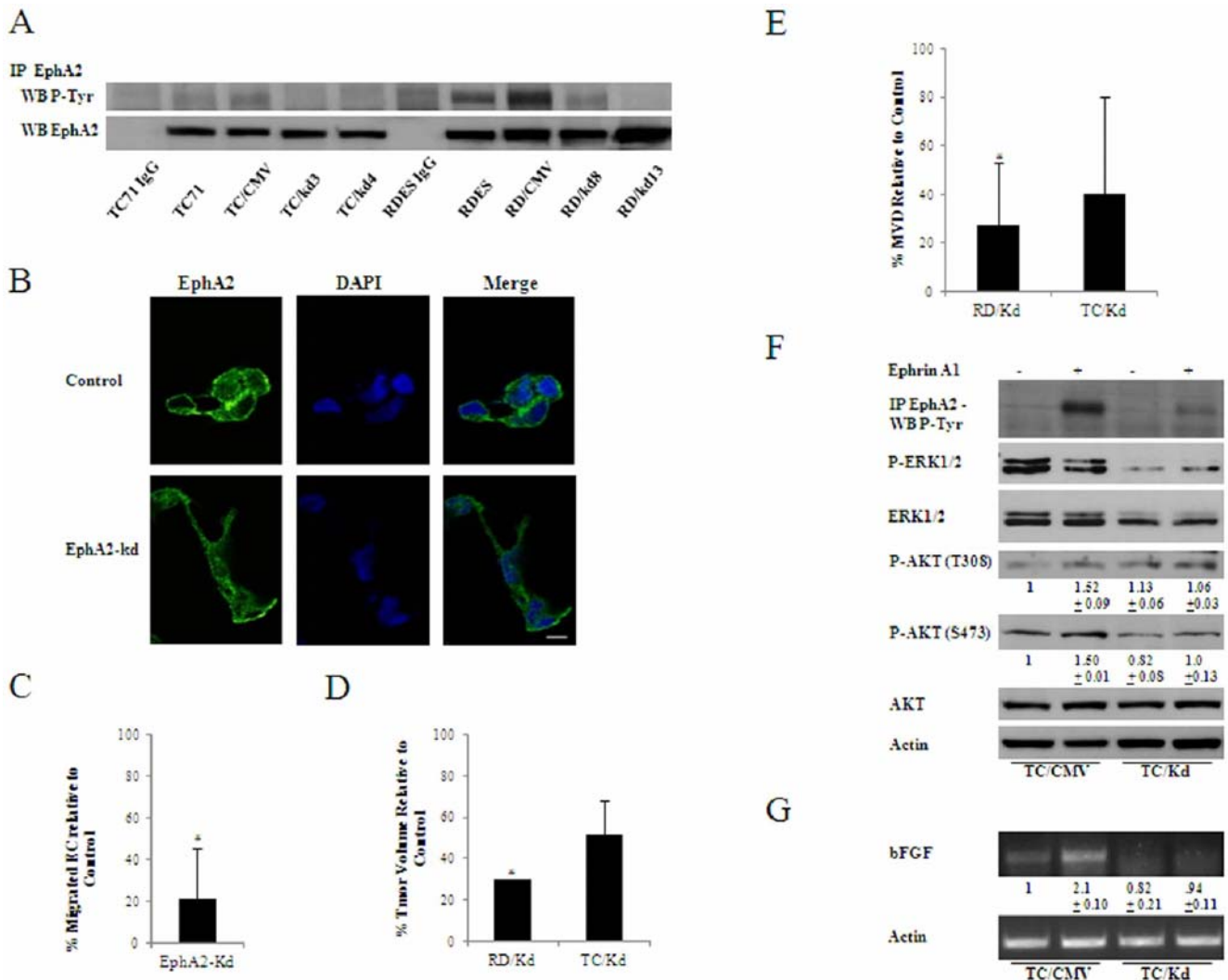


Figure 7. Dominant negative EphA2 recapitulates CAV1 silencing effects on angiogenesis. **A.** Phosphotyrosine immunoblot confirming the dominant negative effects of EphA2-Kd vector in RDES and TC71 cells (RD/CMV and TC/CMV states for empty-vector transfected cells). EphA2 blotting was used as control. **B.** Immunofluorescence of EphA2 showing redistribution in cell cytoplasm as a consequence of EphA2-Kd transfection. Scale bar, 10 μm. **C.** Quantification of transwell cell migration, CM from the EphA2-Kd models was used as chemoattractant for endothelial cells; bars, SD (*P≤0.05 n=3); vertical bars represent mean percentage of migrated endothelial cells relative to control. **D.** Mice xenograft volumes comparing tumors of 2 EphA2-Kd cell clones (n=5 for each clone) relative to grouped controls (parental n=5; empty vector n=5); vertical bars represent mean percentage of tumor volumes relative to controls; bars, SD (*P≤0.05) **E.** MVD comparing both EphA2-Kd models and showing a reduction of blood vessels in selected clones relative to controls; bars, SD (*P≤0.05) **F.** Immunoblot of the TC71 model (Control and EphA2-Kd clone) stimulated with ephrin-A1 showing no changes on the ERK1/2 pathway and activation of AKT. Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane for the phospho-AKTs western analysis (n=5) **G.** RT-PCR showing increased expression of bFGF in control cells compared to EphA2-Kd cells after EphA2 stimulation. Quantitative data measuring relative intensity of the bands is indicated below each lane (n=3). doi:10.1371/journal.pone.0071449.g007

Results showed that CM from knocked down cells had a reduced capability to induce endothelial cell migration without affecting proliferation. Activation of FAK has been shown during endothelial cell migration [23,24]. Moreover, FAK proteolysis has been demonstrated to correlate with adhesion dynamics and migration [25]. Accordingly, activation and higher proteolysis of FAK was observed only in endothelial cells in the presence of control conditioned media. These results suggested that CAV1 silencing negatively affected the expression or production of factors related to endothelial cell migration.

EWS cells express a variety of pro-angiogenic factors [14,20,26]. Analysis of the levels of a group of pro-angiogenic factors released by tumor cells showed that only the expression of the *bFGF* gene was reduced by CAV1 silencing. In agreement with our results, VEGF has been shown to be expressed in EWS cells [27] and to promote vasculogenesis. Furthermore, *VEGF* has been postulated to be an indirect target of EWS/FLI1 [28]. VEGF released from tumor cells is the most important pro-angiogenic factor that stimulates both sprouting and proliferation of endothelial cells. Nevertheless, other factors such as PDGF, FGF and PlGF are also important [29]. One of the most important roles of bFGF is promoting endothelial cell migration [30,31]. This would explain why the major effect observed in endothelial cells as a consequence of CAV1 silencing in tumor cells was reduced migration. Moreover, experiments performed with exogenous bFGF and its neutralizing antibody further supported the importance of bFGF in endothelial cell migration. Importantly, increases in bFGF expression can enhance tumor angiogenesis and promote tumor growth [32]. However, as a complicated multistep process, tumor-associated angiogenesis is implicated in the extensive interplay among cells, soluble factors, and extracellular matrix (ECM) components. Moreover, the “angiogenic switch” via the change of the local balance of pro- and anti-angiogenic factors, is critical for the initiation of tumor angiogenesis [33]. Thus, we cannot rule out the possibility that CAV1 also plays an important role in the regulation of other complicated processes in angiogenesis.

The role of eph receptors and ephrins in tumor angiogenesis is well acknowledged [34]. Expression of several eph receptor and ephrin family members in EWS cells has been shown previously [35]. Ephrin A1, EphA2, EphB3 and EphB4 expression was observed in our panel of EWS cell lines. However, only EphA2 was seen in tumor samples. This is of relevance because ours is the first study demonstrating the expression of EphA2 protein in EWS patient samples. Eph receptors contain a caveolin-binding motif within their kinase domain (WSYGIVMW for EphA2). Moreover, interaction of EphA2 with CAV1 has been shown as key for proper signaling and membrane targeting of the receptor [18]. By a combination of immunoprecipitation and confocal microscopy assays we show that, indeed in EWS cells CAV1 interacts with EphA2. Furthermore and in agreement with previous results [18], CAV1 silencing resulted in delocalization of the receptor and moderate decrease in its expression suggesting some sort of degradation after losing its targeting to the membrane. Degradation of eph receptors, as for other receptors, has been shown after endocytosis following activation [36]. Nonetheless, this might be not the case because constitutive tyrosine phosphorylation of EphA2 in EWS cells is lost after CAV1 silencing. However, whether this mere loss of protein depends on degradation or not, remains to be further determined.

In order to establish a relationship between EphA2 activation and bFGF expression we decided to perform EphA2 stimulation assays with ephrin-A1. As expected [18], CAV1 knocked down cells responded less efficiently to ephrin-A1 stimulation than control cells. EphA2 signaling has been repeatedly shown to occur

through MAPKs [37,38]. AKT signaling has also been shown to be activated as a consequence of EphA2 stimulation in several cell lines [39]. In our model, stimulation of EphA2 by its ligand resulted in an increase of AKT phosphorylation and higher transcription of bFGF. However, no activation of MAPK signaling was observed. Lack of increased bFGF transcription in stimulated cells with the presence of an AKT inhibitor, that inhibits AKT phosphorylation without affecting PI3K, further confirmed the involvement of AKT signaling in bFGF transcription in response to EphA2 stimulation.

EphA2 kinase is frequently up-regulated in several different types of cancer [40]. It is not clear whether EphA2 phosphorylation or its overexpression plays a role in tumor progression. In fact, simply overexpression of the receptor likely will lead to Eph kinase-independent responses [41]. Because CAV1 silencing affected primarily EphA2 tyrosine phosphorylation we focused on kinase-dependent activities. In agreement with studies performed in prostate cancer cells [41], introduction of a dominant negative form of EphA2 into TC71 and RDES recapitulated most of the effects induced by CAV1 silencing. Thus, we observed a decrease of constitutive EphA2 phosphorylation and the consequent displacement of EphA2 receptor from the membrane to the cytosolic fraction in RDES cells. Conditioned media from RDES EphA2-kd cells showed reduced capability to promote migration of endothelial cells. Furthermore, tumor growth reduction was observed in both models showing a great degree of necrosis. Accordingly, MVD reduction was also observed in both models. Lastly, after ephrin stimulation EphA2-kd cells from the TC71 model neither showed AKT activation nor overexpression of bFGF. Overall, our results underscore the critical role of EphA2 kinase-dependent activity promoting EWS angiogenesis.

CAV1 silencing in EWS cells results in loss of tumorigenicity, sensitization to chemotherapy and reduced migratory and invasive capabilities [42]. EphA2 appears to play a role in tumorigenesis in its non-phosphorylated state and possesses ligand-independent kinase activity *in vitro* [43,44]. We did not observe significant changes in the malignant phenotype of cells transfected with the EphA2 dominant-negative construct (data not shown). However, we cannot discard the possibility that in EWS cells EphA2 might play a critical role in their tumorigenic phenotype independently of its kinase activity. Current studies in the laboratory are addressing this issue. Taken together, our results strongly suggest that the axis EphA2-CAV1 cause activation of AKT signaling to produce bFGF, promoting tumor induced endothelial cell migration and favoring EWS angiogenesis.

Materials and Methods

Ethics Statement

Animal care and procedures were followed according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Ethics approval was provided by the locally appointed ethics committee from the Biomedical Research Institut (IDI-BELL), Barcelona, Spain.

Cell Culture, Stable Transfections and Stimulation Assays

A673, TC252 and STAET1 cell lines (gifts from Dr. Heinrich Kovar, Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria [45]); RH1 cell line (gift from Dr. Peter Houghton, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio [46]); RDES, TC71 and SKES1 cell lines (bought from DSMZ, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany); and A4573 cell line (gift from Dr. Santiago Ramón y

Cajal, Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain [2]), all EWS cells, were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen). PAEC cells –Porcine Aortic Endothelial Cells– (gift from Dr. Cristina Costa, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain [47]) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum (Invitrogen) and endothelial mitogen (50 mg/l; Biomedical Technologies Inc.). All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Exponentially growing cells within two sequential passages were used for all experiments. Cells were transfected using Fugene Transfection Reagent (Roche) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the protocols of the manufacturer. Transfected cells were selected with neomycin [0.4 mg/ml or 0.8 mg/ml, ShCAV1 [2,16] and EphA2kd [41] (kindly gifted by Dr. Paola Chiarugi, University of Florence, Florence, Italy), respectively; Invitrogen] for 14 days, and antibiotic-resistant pools and individual colonies were isolated for further analysis and maintained in the presence of neomycin (0.4 mg/ml or 0.8 mg/ml). For studies using soluble ephrinA1, cells were stimulated with 5 µg/ml IgG/Fc or ephrinA1-Fc (R&D Systems) for 20 min. When needed AKT inhibitor IV (Merck Millipore) was used at a concentration of 5 µM.

Immunoprecipitation and Western Blot Analysis

EWS cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA Buffer, Thermo Scientific) containing protease inhibitors (Complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (PhosStop, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) and centrifuged at 13,000×g, at 4°C, for 30 minutes. The protein content of the supernatants was determined with the BCA assay system (Pierce). For immunoprecipitation, cells lysis was made using immunoprecipitation buffer with 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40 and containing protease and phosphatase inhibitors. Magnetic beads coated with Protein G (Millipore) were incubated following manufacturer's protocol with previously incubated 500 µg protein samples with its respective antibody (CAV1 #610059 from BD Biosciences; EcK/EphA2 #05-480 and Phosphotyrosine #05-321 from Millipore, normal mouse IgG #sc-2025 and normal rabbit IgG #sc-2027 from Santa Cruz Biotechnology). After immunoprecipitation, beads were resuspended for denaturing elution in 30 µl of sample buffer. Lysate aliquots (50 µg) and immunoprecipitations were resolved by 8, 10 or 15% SDS-PAGE (depending on the size of the protein that was analyzed) and transferred onto nitrocellulose membranes (0.2 µm, Bio-Rad). After blocking with 5% skimmed milk in Dulbecco's PBS (DPBS) containing 0.1% Tween20 at room temperature for 1 hour, membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (CAV1; EcK/EphA2, FGF/basicFGF #05-118 and Phosphotyrosine from Millipore; FAK #3285, Akt #9272, Phospho-Akt Ser473 #4060 and Phospho-Akt-Thr308 #9275 from Cell Signaling Technology). Blots were then incubated at room temperature for 1 hour with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit and goat anti-mouse) and the peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (Pierce) following the instructions of the manufacturer. Immunodetection of β-actin (#ab49900 from Abcam) was used as a loading reference.

Proliferation Assay

A density of 5×10^4 cells per well was seeded on 12-well-plate overnight in complete culture medium and then treated with RPMI alone (Negative control) or CM from TC71 and RDES models for a 3-day incubation. The cell numbers were measured every 24 hours by the trypan blue exclusion assay.

Transwell Migration Assay

PAEC cells (2.0×10^4) in 100 µL of serum-free medium were added to the top chamber of 8 µm Costar polycarbonate membrane transwell (Transwell Permeable Supports, Corning), while 500 µL of CM from EWS cell models was added to the bottom chamber. CM was obtained by culturing cells for 48 hours in fresh RPMI media without serum. After this time media was centrifuged and filtered to avoid any suspended cells. After allowing migration for various times (37°C, 100% humidity, 5% CO₂ in air), cells on the upper membrane surface were removed and migrant cells on the membrane underside were fixed using 70% ethanol, stained using 0.1% crystal violet solution (Sigma-Aldrich), and visualized and counted under the microscope. Neutralizing antibody against bFGF (Anti-FGF2/basic FGF #05-117) and human recombinant FGF-2/basic (FGF2 #01-106) were from Millipore and were used at mentioned concentrations. Data were presented as the average number of migrating cells in 5 high-power fields (x200). Each experiment was done in triplicate, and then the data were averaged for statistical analysis.

In vivo Studies

Experiments to evaluate the tumor development of CAV1 knocked down models were carried out using immunodeficient female (5–6 weeks old) athymic nude mice purchased from Harlan Laboratories. Mice were injected subcutaneously (s.c) into the right posterior flank with 3×10^6 RDES (n = 20), TC71 (n = 20) and SKES1 (n = 20) low CAV1 models and RDES (n = 10) and TC71 (n = 10) EphA2-kd models in 100 µl of RPMI (Invitrogen). Once tumors reached a mean volume of about 1 cm³ (21 days), mice were euthanized. Tumors were fixed in formaldehyde at 4% and embedded in paraffin. Tumor volumes were calculated by the formula $V = (1/2) a \times b^2$, where *a* is the longest tumor axis, and *b* is the shortest tumor axis. Data are given as mean ± SD. Statistical analysis was done by an unpaired Student's *t* test.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Immunohistochemical techniques were done essentially as previously described [2]. Expression of CAV1 in human EWS and xenografts was analyzed using a rabbit polyclonal antibody (CAV1 #610059). Microvascular density was analyzed using a polyclonal antibody for CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1: PECAM-1) from Abcam (#ab28364). Data were presented as the average number of positive vessels in the whole section of the tumor from all samples comparing the model. EphA2 expression was analyzed using a polyclonal antibody for EphA2 (EphA2 IHC Antibody from Bethyl Laboratories #IHC-00427). For immunofluorescence, EWS cells were cultured in sterile slides (Millicell EZ slide from Millipore) for 24 hours, fixed with 4% formaldehyde for 30 minutes, washed thrice in Dulbecco's PBS (DPBS), permeabilized in 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 2 minutes, blocked for 1 hour in blocking buffer (10% goat serum in DPBS) and incubated with primary antibodies overnight. Cells were then washed thrice in DPBS for 5 minutes each followed by a 1 hour incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit; Invitrogen). Then, cells were washed twice in DPBS for 10

minutes and twice in distilled water for 10 minutes, and mounted in ProLong Gold antifade reagent with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen). Photographs were taken with a Leica TCS SP5 spectral confocal microscope (argon, 405 diode and DPSS561 lasers) using a lambda blue 63×1.35 numerical aperture oil objective. Images were analyzed with the MacBiophotonics Program. CAV1 and EphA2 expression in EWS cells was analyzed by using the same specific antibodies. Expression of Phospho-FAK was detected in PAEC cells using a polyclonal antibody for Phospho-FAK –Tyr397– #3283 from Cell Signaling. PAEC cells, serum depleted for other 16 hours were cultured in conditioned media from the TC71/ShCAV1 model for 48 hours.

Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

Total RNA (2 µg), extracted using the Total RNA Isolation Kit (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel), was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Primers 5'-CGGAATGAGGACTACACCATACATGTG-CAGC-3' (forward) and 5'-AAGCAGCGGTCTT-CATGCTGGTGGATGGGTT-3' (reverse) were used for amplification of *Ephrin-A1* (326 bp); and for *β-Actin* (432 bp), 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3' (forward) and CTTCATTGTGCTGGGTGC (reverse). Amplification of *Ephrin-A1* was adjusted at an annealing temperature of 58°C and 59.5°C for *β-Actin*. Amplifications of *bFGF*, *PDGF-A*, *PDGF-B*, *MK*, *TGFβ* and *VEGF* were carried out using specific primers (Table S1). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction end points fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semi-quantitative estimate of relative mRNA abundance. RT-PCR determinations were carried out thrice for each relevant transcript. Primers were from Invitrogen.

Tissue Samples

28 tumor samples were procured from the archives of the Tumor banks of St. Joan de Deu Hospital (13 patients) and Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (15 patients) Pathology Departments and referring institutions. All tumor samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, and had not undergone decalcification. Associated clinical data were available only for the St. Joan de Deu Hospital. Because all patients showed EphA2 expression no clinical correlations could be made.

Statistical Analysis

Data were analyzed for statistical significance using Student's *t* test. In the case of confocal images pair wise correlations were evaluated by the two-tailed Pearson-test, measuring the strength of the association between two variables. For immunoblot and RT-PCR experiments relative expression of each gene to the reference gene (*Actin*) was calculated measuring each band area after subtracting background using Image J software (IJ 1.46r, NIH, USA). Unless otherwise stated, experiments were performed thrice and $P \leq 0.05$ was regarded as significant.

References

- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR (2008) Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 27: 715–35.
- Sainz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, et al. (2010) Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res* 8: 1489–1500.
- Tahir SA, Yang G, Goltsov AA, Watanabe M, Tabata K, et al. (2008) Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res* 68: 731–9.

Supporting Information

Figure S1 *bFGF* expression in EWS cell lines. Several growth factors (*PDGF-A*, *PDGF-B*, *MK*, *TGFβ1*, *VEGF* and *bFGF*) were analyzed by RT-PCR.

(TIF)

Figure S2 CAV1 silencing reduces *bFGF* expression. Several growth factors (*PDGF-A*, *PDGF-B*, *MK*, *TGFβ1*, *VEGF* and *bFGF*) were analyzed by RT-PCR in CAV1 knocked down models. Results showed that *bFGF* was the only one reduced constantly in all models.

(TIF)

Figure S3 EphA2 protein expression in human tumor samples. Immunohistochemical analysis of positive EWS samples demonstrating the presence of EphA2 (left panel) and the absence of other members of the family (EphB3 and EphB4). EphA2 expression was positive in all tumors and the pattern of expression was observed in both membrane and cytoplasm. Scale bar, 50 µm.

(TIF)

Figure S4 RT-PCR for *ephrin-A1*. EphA2 most common ligand, *ephrin-A1*, is expressed in all EWS cells tested.

(TIF)

Figure S5 Co-expression of CAV1 and EphA2 proteins in mouse xenografts samples. Co-Immunofluorescence of CAV1 and EphA2 showing co-localization in cell membrane in paraffin embedded tissue from mouse xenograft. Scale bar, 20 µm.

(TIF)

Figure S6 Hematoxylin and Eosin (H&E) staining in EphA2-Kd paraffin-embedded xenografts from RDES and TC71 models showing a decrease in tumor volume and an increase of necrosis (*) in EphA2-Kd tumors. Scale bar, 50 µm.

(TIF)

Table S1 Table of primers used in amplification of pro-angiogenic growth factors.

(TIF)

Acknowledgments

We acknowledge Jemina Moreto and Carmen Casal, from Cancer Epigenetics and Biology Program, IDIBELL, for her support with confocal images acquisition and processing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: XGM OMT. Performed the experiments: MSJ JHM LLT JML. Analyzed the data: MSJ LLT SML EDA JM OMT. Contributed reagents/materials/analysis tools: EDA CDT JM. Wrote the paper: MSJ SML XGM OMT. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content: MSJ LLT JML SML EDA CDT JM XGM OMT. Final approval of the version to be published: MSJ LLT JML SML EDA CDT JM XGM OMT.

8. Pasquale EB (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133: 38–52.
9. Ireton RC, Chen J (2005) EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 149–157.
10. Beauchamp A, Debinski W (2012) Ephs and ephrins in cancer: Ephrin-A1 signaling. *Semin Cell Dev Biol* 23: 109–115.
11. Jedlicka P (2010) Ewing Sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 3: 338–347.
12. Balamuth NJ, Womer RB (2010) Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 11: 184–192.
13. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
14. DuBois SG, Marina N, Glade-Bender J (2010) Angiogenesis and vascular targeting in Ewing Sarcoma: a review of preclinical and clinical data. *Cancer* 116: 749–757.
15. Pasquale EB (2010) Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nat Rev Cancer* 10: 165–180.
16. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llort A, et al (2006) Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 66: 9937–9947.
17. Linkous AG, Yazlovitskaya EM (2012) Novel therapeutic approaches for targeting tumor angiogenesis. *Anticancer Res* 32: 1–12.
18. Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, et al. (2006) Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci* 119: 2299–2309.
19. Wang X, Roy PJ, Holland SJ, Zhang LW, Culotti JG, et al. (1999) Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent and –independent functions of the VAB-1 Eph receptor. *Mol Cell* 4: 903–913.
20. Stewart KS, Kleinerman ES (2011) Tumor vessel development and expansion in Ewing's sarcoma: A review of the vasculogenesis process and clinical trials with vascular-targeting agents. *Sarcoma* 2011: 165837.
21. Yang G, Addai J, Wheeler TM, Frolov A, Miles BJ, et al. (2007) Correlative evidence that prostate cancer cell-derived caveolin-1 mediates angiogenesis. *Hum Pathol* 38: 1688–1695.
22. Zhang ZB, Cai L, Zheng SG, Xiong Y, Dong JH (2009) Overexpression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma with metastasis and worse prognosis: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density and unpaired artery. *Pathol Oncol Res* 15: 495–502.
23. Wang S, Yoon YC, Sung MJ, Hur HJ, Park JH (2012) Antiangiogenic properties of cafestol, a coffee diterpene, in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421: 567–571.
24. Kuo MW, Wang CH, Wu HC, Chang SJ, Chuang YJ (2011) Soluble THSD7A is an N-glycoprotein that promotes endothelial cell migration and tube formation in angiogenesis. *PLoS One* 6: e29000.
25. Chan KT, Bennis DA, Huttenlocher A (2010) Regulation of adhesion dynamics by Calpain-mediated proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *J Biol Chem* 285: 11418–11426.
26. Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, Brachwitz K, Wai DH, et al (2008) Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer* 44: 699–709.
27. Lee TH, Bolontrade MF, Worth LL, Guan H, Ellis LM, et al. (2006) Production of VEGF165 by Ewing's sarcoma cells induces vasculogenesis and the incorporation of CD34+ stem cells into the expanding tumor vasculature. *Int J Cancer* 119: 839–846.
28. Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, Yamamoto T, et al. (2010) EWS/Flt-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer* 126: 2790–2798.
29. Weis SM, Cheresh DA (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 17: 1359–1370.
30. Shi C, Lu J, Wu W, Ma F, Georges J, et al. (2011) Endothelial cell-specific molecule 2 (ECSM2) localizes to cell-cell junctions and modulates bFGF-directed cell migration via the ERK-FAK pathway. *PLoS One* 6: e21482.
31. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, et al. (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 159–178.
32. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM (2003) Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 9: 1026–32.
33. Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6: 273–286.
34. Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J (2010) Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol* 2010: 135285.
35. Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, et al. (2001) Classification and diagnostic of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7: 673–679.
36. Pitulescu ME, Adams RH (2010) Eph/ephrin molecules—a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* 24: 2480–2492.
37. Fritsche-Guenther R, Noske A, Ungethüm U, Kuban RJ, Schlag PM, et al. (2010) De novo expression of EphA2 in osteosarcoma modulates activation of the mitogenic signalling pathway. *Histopathology* 57: 836–850.
38. Drake JM, Graham NA, Stoyanova T, Sedghi A, Goldstein AS, et al. (2012) Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1643–1648.
39. Tandon M, Vemula SV, Mittal SK (2011) Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 15: 31–51.
40. Wykosky J, Debinski W (2008) The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res* 6: 1795–1806.
41. Taddei ML, Parri M, Angelucci A, Onnis B, Bianchini F, et al. (2009) Kinase-dependent and –independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol* 174: 1492–1503.
42. Sainz-Jaspeado, Martin-Liberal J, Lagares-Tena L, Mateo-Lozano S, Garcia del Muro X, et al. (2011) Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget* 2: 305–312.
43. Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaikin M, Wang B, Brackenbury R, et al. (1999) E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ* 10: 629–638.
44. Miao H, Li DQ, Mukherjee A, Guo H, Petty A, et al. (2009) EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 16: 9–20.
45. Ban J, Jug G, Mestdagh P, Schwentner R, Kauer M, et al. (2011) Has-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 30: 2173–2178.
46. Smith MA, Morton CL, Phelps D, Girtman K, Neale G, et al. (2008) SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr Blood Cancer* 50: 703–706.
47. Costa C, Bell NK, Stabel TJ, Fodor WL (2004) Use of porcine tumor necrosis factor receptor 1-Ig fusion protein to prolong xenograft survival Xenotransplantation 11: 491–502.