

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

**VERSICÀ, CD44 I ÀCID HIALURÒNIC
EN EL MELANOMA HUMÀ I CANÍ.
IMPLICACIONS FUNCIONALS DEL COMPLEX.**

Montserrat Serra i Muxi



Universitat Autònoma de Barcelona



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

**VERSICÀ, CD44 I ÀCID HIALURÒNIC EN EL MELANOMA HUMÀ I CANÍ.
IMPLICACIONS FUNCIONALS DEL COMPLEX**

Memòria elaborada per
Montserrat Serra i Muxi
Per a optar al grau de
Doctora en Medicina Veterinària

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Anna Bassols i Teixidó i el Dr. Josep Pastor Milán,
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària
de la Universitat Autònoma de Barcelona,
dins del programa de Doctorat de Medicina Veterinària.

Bellaterra, maig de 2004

ANNA BASSOLS I TEIXIDÓ i JOSEP PASTOR I MILÁN Professors Titulars dels Departaments de Bioquímica i Biologia Molecular i Medicina i Cirurgia Animals, respectivament, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEM:

Que MONTSERRAT SERRA I MUXI ha realitzat aquest treball sobre "Versicà, CD44 i àcid hialurònic en el melanoma humà i caní. Implicacions funcionals del complex", sota la nostra direcció en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB.

I perquè consti, a efectes de ser presentat com a memòria per a l'obtenció del grau de Doctora en Medicina Veterinària, signem el present certificat a Bellaterra a 19 de maig de 2004.

Anna Bassols i Teixidó

Josep Pastor i Milán

A l'Àlex
Als meus pares

AGRAÏMENTS

Costa molt expressar amb paraules el que un realment sent. I encara és més difícil poder escriure en unes poques ratlles el que han suposat quasi 5 anys de recerca, en tots els sentits. M'agradaria poder agrair, de la forma més sincera, tot el suport i ajuda que he rebut durant tot aquest temps. Costa molt començar, però som-hi, començo:

A la Dra. Anna Bassols per admetre'm al seu grup i estar sempre tan a prop. Com més coneixes l'Anna, més t'agrada i més l'admires. Vull agrair-te molt sincerament el suport incondicional i l'ajuda, tant personal com professional, rebuts des del setembre de 1999 fins ara i espero que fins sempre. Moltes gràcies per tot, Anna.

Al Dr. Josep Pastor per guiar-me des d'un principi i animar-me en qualsevol moment. Vull agrair-te tota l'ajuda rebuda, sobretot als difícils començaments, i sempre amb el teu bon humor i empena. Gràcies, Josep. I a més, com un rellotge, cada any t'has recordat del meu aniversari!

Al Dr. Joaquim Ariño i la Dra. Fàtima Bosch per la seva ajuda sempre que l'he necessitat. Al Dr. Néstor Gómez per tot el que m'has ensenyat de la ciència i la vida...sobretot de la política! Gràcies per l'ajuda rebuda al laboratori i en els seminaris i, sobretot, gràcies pels teus cigarrets i la bona companyia. I gràcies a l'Anna Vilalta per fer-nos més fàcil la feina i per les seves ganes d'ajudar en tots els sentits.

Fer la tesi t'ofereix la gran oportunitat de conèixer gent amb diferents maneres d'enfocar i viure la ciència. Així he tingut la sort de treballar amb gent a qui vull agrair el seu recolzament i la seva ensenyança.

Vull donar les gràcies a la Dra. Rosa Rabanal, per la seva gran disponibilitat i imprescindible ajuda amb els inacabables talls. I moltíssimes gràcies a la Dra. Àngels Fabra per la inestimable paciència i ajuda que, des d'un principi, m'han donat ella i tota la gent del seu laboratori. Gràcies a totes.

Vull donar les gràcies a tota la gent del laboratori de Tom Wight a Seattle per l'oportunitat d'haver pogut conèixer la ciència des del Pacífic. I haver après tant. I també voldria agrair l'haver pogut conèixer una altra manera de treballar des del sector privat, així com de tota l'ajuda rebuda per part de la gent dels laboratoris Merck. Moltes gràcies al Dr. Piulats i la gent del seu grup, en especial al Dr. Francesc Mitjans i Dr. Jaume Adan.

Moltes gràcies a la gent de Bellvitge per les seves idees i ajut. Gràcies al Dr. Ventura i al Dr. Joan Gil i el seu grup per intentar entendre les meves cèl·lules. I gràcies a la Dra. Esther Castaño per haver fet tan amenes les sessions amb el citòmetre.

Finalment vull agrair l'oportunitat i confiança donada per la gent d'Univet. Moltes gràcies Anna i Pilar, Eva, Carolina, Sílvia i Àlex.

I ara cal agrair, i molt, als de la casa:

Vull agrair tot el que he après de la gent que va formar-se amb l'Anna i que encara he tingut la sort de conèixer. Gràcies al Dr. Manolo Romarís i la Dra. Malika Touab, per la seva ajuda incondicional i la seva sinceritat declarada. Gràcies Joan i Jepi pels bons moments a Salamanca.

Ara sí toca, per fi, parlar del present i futur del nostre estimat 157. Començo per la Cleli, companya incondicionalíssima des d'un principi. Bueno no sé que decir que ya no sepas. Gracias, muchas gracias, por todo lo enseñado y aprendido, por todo lo vivido y compartido. Sobretudo mil gracias por escuchar y aconsejar tan bien... Gracias por hacerme reír, sobretudo cuando estoy cansada (recuerda nuestros ojos en Salamanca...). Per cert, saps que vindré a Mèxic algun dia, oi?

Pels més joves del grup, moltes gràcies pels dos anys viscuts junts (ja podríeu haver nascut abans!), plens de bons moments i moltíssima compenetració. Gràcies per escoltar tant i tan bé. Laia, moltíssimes gràcies per la immensa ajuda i ganas d'ajudar, i no només al lab... Dani, espero que la feina heretada et sigui grata i no canviïs el teu divertidíssim humor. Mery Jou...let's go!! Has de demostrar com els veterinaris sí en sabem, de bioquímica! (eh, Néstor?). Espero que d'aquí poc aneu a Lisboa...sí puc, vindré i així farem la nostra "bombolla"... A tots tres, molta sort.

També agrair la paciència que han tingut amb mi els estudiants que ens han fet més divertits els estius. Gràcies Jessica, Imma, Xavi i Carles.

El departament de bioquímica ha estat sempre ple de vida gràcies als del V0-185, V0-181 i V0-175. A tots i totes, moltes gràcies per l'ajut donat en qualsevol moment. I m'alegro que el trasllat al nou edifici hagi estat ara al final, així he pogut gaudir de la vostra companyia, xerrades polítiques, safareigs varis, esmorzars, sopars i sortides nocturnes...Així doncs, gràcies a tothom: Alba, Ernesto, Ivan, Sergio, Marta, Mireia, Àlex, Joel, Xavis, Vicky, Annes, Ainara, Laia, Maries, Miquels, Assumpció, Lourdes, Fati, Amparo, Ivet, Arianna, Judit, Raquel, Loli, Mercès, Iolanda, Asier, Martí, Maribel, als Carles, Edu, Pedro, Albert, Sylvie, Mónica, Tura, Antonio...

Fer la tesi ajuda a créixer, no només a nivell científic. Cal apreciar, i molt, la sort de tenir gent amb qui poder confiar, gent que m'ha ajudat sempre que ha calgut, amics. Moltes, moltes gràcies Georg, Clara, Nando, Oriol. Milions de gràcies a les incondicionals Maria, Roser i Cons. I també a les Elenes, al Xavi i l'Albert. Moltes gràcies a tots, per tot.

I què dir de la família...sense ells no hauria anat enlloc. Vull donar les gràcies més sinceres als meus pares per confiar tant en mi, per entendre i compartir les meves decisions, per suportar-me en els moments més crítics.... Milions de gràcies, de veritat.

Gràcies també als meus estimadíssims avis, als meus tiets i les meves cosines, les més guapes. Gràcies per tot el recolzament de la Rosa, el Josep, la Núria i el Jordi. I gràcies als més petits de la família, l'Emma, l'Arnau i el Jordi per la il·lusió immensa.

I a tu, Àlex, vull agrair-t'ho tot. Des del començament fins sempre. Sense tu no hauria pogut. Infinites gràcies.

"Reposes i jo reposo en tu, i et penso tendrament, i et veig, i et tinc."

Miquel Martí i Pol.

A tots moltes gràcies.

Pensant en la Nevada. Sense oblidar la Xu.

ABC	Complexe d'Avidina i Biotina
ADAMS	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AEBT	2,2'azinobis 3-etilbenzotiozoline àcid sulfònic
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Albúmina de sèrum boví
CDK	Quinasa ciclina dependent
CS	Condroïtin sulfat
CSPG	Proteoglicà condroitin sulfat
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DSPG	Proteoglicà dermatan sulfat
EDTA	Àcid etilen-diamino-tetraacètic
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERM	Ezrina, radixina, moesina
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	Quinasa d'adhesió focal
FCS	Sèrum fetal boví
bFGF	<i>basic Fibroblast growth factor</i>
GAG	Glicosaminoglicà
GAM	<i>Goat anti-mouse</i>
GAR	<i>Goat anti-rabbit</i>
G-PBS	Glicina-PBS
HA	Àcid Hialurònic
HABP	Proteïna d'unió a l'àcid hialurònic
HAS	Hialuronat sintasa
HE	Hematoxilina-eosina
HSPG	Proteoglicà heparan sulfat
HGF	Factor de creixement de l'hepatòcit
IGF-1	Factor de creixement insulina tipus 1
IHC	Immunohistoquímica
IL-1	Interleuquina-1
KSPG	Proteoglicà keratan sulfat
MAA	Antígens associats a melanoma
MAB	Anticòs monoclonal
MEC	Matriu extracel·lular
Mel-CSPG/MCSP	Proteoglicà condroitin sulfat de melanoma
MMP	Metal·loproteasa de matriu
MT-MMP	<i>Membrane-type MMP</i>
NEM	N-etilmaleimida
NP40	Nonidet-40
PBS	Solució salina de tampó fosfat
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PG	Proteoglicà
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorur
OCT	Tissue-Tek OCT Compound®
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
RGP	Fase de creixement radial (progressió melanoma)
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb presència de SDS
SSC	Tampó citrat sòdic salí
TB	Tampó Tris

TBS	Tampó salí Tris-HCl
TGF- β	Factor de transformació β
TIMP	Inhibidor tissular específic de MMPs
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VGP	Fase de creixement vertical (progressió melanoma)
VS	Versicà

	<u>pàg.</u>
- Agraïments.....	I
- Abreviacions.....	V
- Índex.....	VII
- ANTECEDENTS I OBJECTIUS.....	1
- INTRODUCCIÓ.....	5
1.- El melanoma com a model de progressió tumoral. El melanoma caní <i>versus</i> el melanoma humà.....	7
1.1 Melanoma humà.....	7
1.1.1 Genètica del melanoma.....	10
1.1.2 Classificació del melanoma humà.....	11
1.2 Melanoma caní.....	12
1.2.1 Classificació del melanoma caní.....	12
1.3 Indicadors diagnòstics i pronòstics. Teràpia.....	13
2.- El melanoma com a model per a l'estudi de les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracèl·lular.....	16
2.1 Interaccions cèl·lula-cèl·lula.....	19
2.1.1 Cadherines.....	19
2.1.2 MelCAM/MUC18/CD 146.....	21
2.1.3 Proteoglicans de melanoma: MelCSPG/NG2.....	22
2.2 Interaccions cèl·lula-matriu extracèl·lular.....	23
2.2.1 Els proteoglicans.....	24
- Els proteoglicans de matriu extracèl·lular	26
- El versicà.....	26
2.2.2 L'àcid hialurònic.....	29
- Receptors de l'HA.....	32
- CD44.....	32
2.2.3 Metal·loproteases de matriu i Integrines.....	38
2.2.4 Factors de creixement.....	39
- RESULTATS.....	43
1.- Producció de proteoglicans en tres línies de melanoma caní. Efecte del TGF- β , IGF-1 i HGF.....	45

Article: "Effect of transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-I, and hepatocyte growth factor on proteoglycan production and regulation in canine melanoma cell lines"

Montserrat Serra, Josep Pastor, Clelia Domenzain and Anna Bassols
American Journal of Veterinary Research (2002) 63: 1151-1158

2.- Efectes de l'expressió de la isoforma V3 del versicà sobre el fenotip de les cèl·lules de melanoma i el seu potencial tumorigènic.....	55
2.1 Article: "V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential" (enviat)	
<i>Montserrat Serra, Laia Miquel, Clelia Domenzain, María José Docampo, Angels Fabra, Thomas N. Wight, and Anna Bassols</i>	
2.2 Resultats complementaris. Efectes de l'expressió de la isoforma V3 del versicà sobre el fenotip de les cèl·lules de melanoma humà i caní.....	91
2.2.1 Estudi de l'expressió de molècules de la matriu extracel·lular relacionades amb la progressió del melanoma.....	91
- Cèl·lules de melanoma caní.....	91
- Cèl·lules de melanoma que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà.....	94
2.2.2 Estudis funcionals de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà	99
3.- Expressió de CD44 en tumors melanocítics canins.....	107
Article: "Differential expression of CD44 in Canine Melanocytic Tumours"	
<i>M.Serra, R.M. Rabanal, L.Miquel, C.Domenzain and A. Bassols</i>	
Journal of Comparative Pathology (2004)130: 171-180	
- DISCUSSIÓ.....	119
1.- Expressió de proteoglicans <i>in vitro</i> en tres línies cel·lulars de melanoma caní: CML-1, CML-6M i CML-10c2. Efecte dels factors de creixement TGF- β , IGF-1 i HGF sobre la producció de proteoglicans. Estudi de l'efecte del factor TGF- β sobre la proliferació cel·lular.....	122
1.1 Expressió de proteoglicans <i>in vitro</i> en tres línies cel·lulars de melanoma caní: CMI-1, CML-6M i CML-10c2.....	122
1.2 Efecte dels factors de creixement TGF- β , IGF-1 i HGF sobre la producció de proteoglicans. Estudi de l'efecte del factor TGF- β sobre la proliferació cel·lular.....	128
2.- Efectes de la sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà en melanoma humà i caní: estudis funcionals i potencial tumorigènic. Estudi de l'expressió de MMPs i integrines.....	132
2.1 Efectes de la sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà sobre la proliferació, cicle cel·lular i apoptosi.....	132
2.2 Efectes de la sobreexpressió de V3 sobre la tumorigènesi.....	138
2.3 Efectes de la sobreexpressió de V3 sobre l'adhesió i migració cel·lulars.....	140
2.4 Estudi de l'expressió de MMPs.....	145

2.5 Estudi de l'expressió d' integrines. Estudi de l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$	150
3.- Expressió de CD44 en melanomes canins.....	151
- CONCLUSIONS.....	157
- ANNEX. MATERIALS I MÈTODES.....	161
- BIBLIOGRAFIA.....	171

Antecedents i objectius

El paper de la matriu extracel·lular com a reguladora del comportament cel·lular s'ha començat a estudiar àmpliament en els últims anys, ja que s'hi integren diferents tipus de macromolècules que desenvolupen tasques importants en la proliferació, diferenciació i morfogènesi. Dins d'aquestes molècules trobem els proteoglicans, glicoproteïnes complexes que intervenen en processos d'adhesió, migració i proliferació cel·lular. El nostre grup d'investigació treballa des de fa temps en l'estudi del paper dels proteoglicans en els processos de transformació i diferenciació cel·lular, especialment en cèl·lules i tumors d'origen neuroectodèrmic, així com en la regulació d'aquestes macromolècules per factors extracel·lulars com el factor de transformació β (TGF- β). Últimament, el nostre grup s'ha centrat en el melanoma com a model tumoral a estudiar. En aquest sistema, ha descrit la presència de versicà, un proteoglicà de matriu extracel·lular que s'uneix a l'àcid hialurònic i que s'expressa de forma diferencial en les diferents línies de melanoma humà estudiades, així com en biòpsies de diferents tipus de melanomes i nevus. A més, ha descrit que el versicà està implicat en el control de proliferació, adhesió i migració cel·lulars (Touab et al., 2002; Touab et al., 2003).

Per altra banda, els tumors espontanis en gossos i gats són models apropiats per a l'estudi de la biologia tumoral i per l'assaig d'agents antitumorals, i ofereixen avantatges sobre els tumors induïts a ratolí utilitzant cancerígens químics o virals (Vail i MacEwen, 2000). El melanoma és una neoplàsia força comú en el gos amb una presentació i comportament biològic variables. La nostra comprensió de la patogènesi del melanoma caní a nivell molecular és incompleta. Les dades acumulades de diferents estudis suggereixen que els melanomes canins, de localització oral o digital, s'assemblen als seus respectius humans en molts aspectes, tant histopatològicament com en el seu comportament (metàstasis freqüents i pobra resposta a quimioteràpia i radioteràpia). Per això es considera que el melanoma caní podria ser un bon model d'estudi pel melanoma humà.

Aquest treball s'emmarca, per tant, en l'estudi de les funcions de versicà en el desenvolupament del melanoma caní i humà. El primer objectiu d'aquest treball ha estat la caracterització a nivell molecular de tres línies cel·lulars de melanoma caní, especialment en els aspectes relacionats amb matriu extracel·lular i capacitat invasiva, amb la finalitat d'establir la validesa d'aquestes línies canines com a model per a la recerca oncològica. En aquest sentit, l'estudi de tres línies cel·lulars de melanoma caní: CML-1, CML-6M i CML-10c2, s'ha centrat en els següents objectius concrets:

- 1.- Anàlisi de l'expressió de proteoglicans.
- 2.- Estudi dels efectes dels factors de creixement TGF- β , IGF-1 i HGF sobre la síntesi de proteoglicans.
- 3.- Estudi dels efectes del TGF- β sobre la proliferació cel·lular.

Els resultats obtinguts en línies canines han demostrat que aquestes expressen patrons diferents de proteoglicans, de manera similar al que succeeix en línies de melanoma humà (Touab et al., 2002; Domenzain et al., 2003). Per tant, i basant-nos en el fet que el versicà influeix marcadament sobre el comportament de les cèl·lules de melanoma i està sobreexpressat en tumors melanocítics *in vivo*, s'han centrat els següents objectius del treball:

- 1.- Sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà a dues línies de melanoma humà (SK-mel-1.36-1-5 i Mewo) i dues de melanoma caní (CML-1 i CML-10c2), on una és indiferenciada i expressa les isoformes V0 i V1 de versicà, i l'altra és diferenciada i no expressa cap isoforma de versicà.
- 2.- Anàlisi dels efectes d'aquesta sobreexpressió sobre el creixement, adhesió i migració cel·lulars *in vitro*. Anàlisi del paper del complex format per versicà, àcid hialurònic (HA) i CD44, el principal receptor de superfície cel·lular de l'HA, en aquests efectes funcionals.
- 3.- Estudi del potencial tumorigènic de les diferents línies transfectades en ratolins BALB/c nu/nu.

Per últim, en veure la importància del complex format per versicà, àcid hialurònic i CD44 en el melanoma, i per continuar l'estudi del gos com a model del melanoma humà, els següents objectius concrets han estat:

- 1.- Estudi *in vitro* en dues línies cel·lulars de melanoma caní (CML-1 i CML-10c2) de l'expressió de HA i CD44 i la formació de matriu extracel·lular.
- 2.- Anàlisi immunohistopatològic de CD44 en biòpsies canines de melanoma (malignes *versus* benignes).

Introducció

1.- EL MELANOMA COM A MODEL DE PROGRESSIÓ TUMORAL. EL MELANOMA CANÍ *VERSUS* EL MELANOMA HUMÀ

El **melanoma** és un tumor dels melanòcits o melanoblasts. Els melanoblasts deriven de les cèl·lules de la cresta neural i migren durant el desenvolupament fetal a la pell, mucosa oral i globus ocular. Els melanòcits són cèl·lules dendrítiques, derivades dels melanoblasts, que es troben disperses entre els queratinòcits de la membrana basal de l'epidermis (Fig. 1, revisat per Hsu et al., 2002).

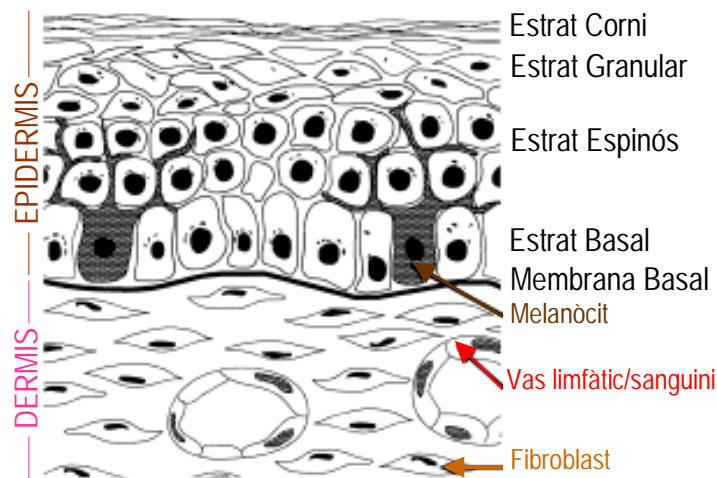


Figura 1. Diagrama de la pell normal humana. L'epidermis conté tres estrats on es troben els queratinòcits. Els melanòcits es troben a la membrana basal, mantenint-se en una relació 1:5-1:10 amb els queratinòcits basals. La dermis consisteix en fibroblasts, vasos sanguinis i limfàtics i nervis en el teixit connectiu dens. Adaptat de Hsu et al., 2002.

Sota condicions fisiològiques normals, els melanòcits i els queratinòcits formen la *epidermal-melanin unit* a l'epidermis. Es troben a la zona de la membrana basal en una relació de 1:5-10. Cada melanòcit arriba amb les seves dendrites a les capes superiors de l'epidermis, transportant els melanosomes que contenen el pigment. Els queratinòcits indiferenciats de la membrana basal regulen el creixement del melanòcit, el número de dendrites i l'expressió de molècules de superfície cel·lular. Aquest equilibri només es trenca durant la transformació a nevus o melanoma.

1.1 MELANOMA HUMÀ

Actualment, el melanoma és, després del càncer de pulmó, el tumor la incidència del qual ha augmentat de forma més alarmant en els últims anys, passant d'una incidència de 1 per cada 1500 persones el 1935, 1 per cada 250 el 1980 i a 1 de cada 75 l'any 2000 (Rigel et al.,

1996). El melanoma és el vuitè tipus de tumor maligne més comú a Estats Units i ha mostrat un ràpid creixement en la seva incidència les dues últimes dècades, sobretot els primers estadis de la malaltia (Meyskens et al., 2004). Afecta a població relativament jove, té una elevada propensió a metastatitzar i respon pobrament als mètodes terapèutics utilitzats. L'augment de la incidència de melanoma en les últimes dècades és degut a una sèrie de factors, com la perllongada exposició solar, l'augment de la radiació UVB-UVC i una major sofisticació dels mètodes de detecció precoç de melanoma. La probabilitat de disseminació de la malaltia és progressivament superior a mesura que incrementa la profunditat del melanoma primari. En un estudi realitzat l'any 2000, la mitjana de supervivència per pacients amb melanoma localitzats (estadis I i II) va ser de 5 anys en el 79% dels casos, mentre que dels pacients que més tard van desenvolupar metàstasi menys del 5% van tenir una supervivència de 2 anys (Karjalainen et al., 2000).

El melanoma evoluciona com un procés de múltiples passos, que inclou una iniciació, promoció, transformació i metàstasi. En els melanomes cutanis humans, el 65% de la iniciació es creu que és secundària a mutacions generades per la radiació solar UVA i UVB. A medicina humana la iniciació a partir de lesions benignes pigmentades contribueix a un petit percentatge dels melanomes malignes. La categoria més important de lesions precursoras és el *nevus displàsic* (Smith et al., 2002). Els iniciadors per altres melanomes (cutanis i no cutanis) no es coneixen, però recentment s'ha descrit un model (Fig. 2) que proposa que l'increment en compostos oxidants és central en la patogènesi de la transformació del melanòcit i la progressió del melanoma.

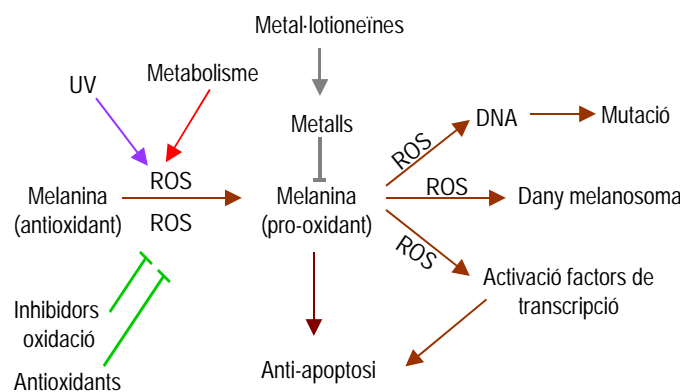


Figura 2. Model de la progressió primerenca de melanoma. L'oxidació de la melanina porta a la generació progressiva a un cicle *redox* intracel·lular que acaba danyant el DNA i els melanosomes, incrementant l'activació de factors de transcripció i l'activació del fenotip antiapoptòtic del melanòcit. ROS: *reactive oxygen species*. Adaptat de Meyskens et al., 2004.

Proposen que la melanina i els seus precursors, amb propietats *redox* i radicals lliures, són etiològicament importants i possiblement unifiquen l'explicació per moltes de les observacions epidemiològiques desconnexes que s'han associat amb el risc de melanoma (Meyskens et al., 2004).

A medicina humana es distingeixen les diferents proliferacions melanocítiques benignes (diferents tipus de nevus) i les diferents fases de progressió del melanoma maligne. Dins dels tumors benignes parlem de **nevus**, tumors cutanis amb o sense pigmentació, que tenen cèl·lules nèviques constituïdes per una proliferació de melanòcits a la unió dermo-epidèrmica (Elder et al., 1981). Els nevus poden classificar-se en tres tipus fonamentals segons el seu aspecte histològic: en *nevus d'unió* (les teques es troben a l'epidermis), *nevus compostos* (presència de teques a la unió dermoepidermis i a la dermis papil·lar) i *nevus intradèrmics* (formació de les teques a la dermis reticular). En els tumors benignes també s'inclou el **nevus displàsic**, el qual és un tumor melanocític adquirit, caracteritzat per una alteració arquitectural i displàsia melanocítica intraepidèrmica, la qual es refereix a la proliferació desordenada associada amb atípia citològica variable (descriu per primer cop per Lynch et al., 1978). La incidència del nevus displàsic varia entre el 5-10%, en la majoria de casos és esporàdic i incrementa el risc de patir melanoma maligne (Crutcher i Sagebiel, 1984). És important considerar en quina fase de nevus es troba degut a la diferència de pronòstic.

Pel que fa al **melanoma maligne**, aquest és conseqüència de la transformació maligna dels melanòcits (desenvolupament *de novo* a partir de melanòcits normals), generalment localitzats a l'epidermis o a la dermis, o a partir de melanòcits alterats, denominats cèl·lules nèviques, en certes lesions precursoras, com per exemple els nevus displàsics (Clark et al., 1984; Herlyn et al., 1987; Albino et al., 1991). Recentment s'està veient que un model multifactorial pot ser necessari per entendre la progressió del melanoma de forma més acurada.

Podem parlar de cinc fases de la progressió tumoral del melanoma segons les característiques clíniques i histopatològiques, tal i com veiem a la Figura 3. Primer trobem, doncs, els nevus comuns adquirits i congènits amb estructura de melanòcits normals, que representen la lesió melanocítica hiperplàsica més primerenca. Després trobem el nevus displàsic, que ja mostra un grau d'atípia estructural important. La presència d'abundants melanòcits en el nevus displàsic es correlaciona amb el risc de patir melanoma i l'evidència suggereix que els nevus displàsics són lesions precursoras de melanoma. Després tenim la fase de creixement radial del melanoma primari (RGP), que és el primer estadi reconegut com a maligne, on les cèl·lules tumorals es troben a l'epidermis o localment invasives, però no tenen la capacitat de ràpid creixement o metàstasi. El seu creixement és pla i la seva direcció de

creixement es realitza dins del radi d'un cercle imperfecte, on les cèl·lules encara no metastatitzen. És la fase on trobem el melanoma *in situ* (Clark, 1991) i el melanoma microinvasiu (Ackerman et al., 1980; Clark et al., 1989). A la fase avançada de creixement vertical (VGP) les cèl·lules tumorals s'infilren com una massa expansiva a la dermis (Clark et al., 1969b; 1989) i teixit subcutani amb el risc associat de disseminació sistèmica. Finalment, les metàstasis representen el pas més avançat de la progressió tumoral. El melanoma maligne es caracteritza per una pronunciada tendència a produir metàstasis. De fet, la disseminació de les cèl·lules tumorals és la principal causa de mortalitat en els pacients amb aquest tumor.

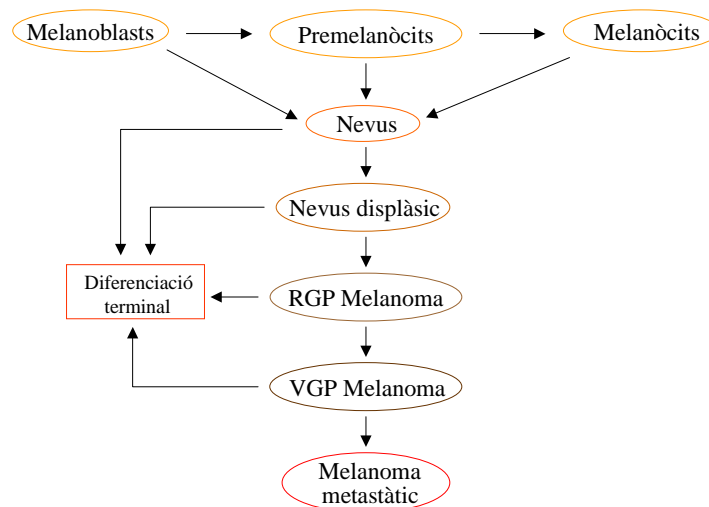


Figura 3. Model d'evolució del melanoma humà. RGP = fase de creixement radial; VGP = fase de creixement vertical. Adaptat de Lázár-Molnár et al., 2000.

- **Genètica del melanoma**

La proliferació de les cèl·lules de melanoma es desregula per dos gens: CDKN2A (p16) i CDKN1A (p21/WAF-1), que són inhibidors de CDKs (quinases dependents de ciclins) i, per tant, inhibidors de cycle cel·lular. La família del gen CDKN1A consisteix en p21, p27 i p57, els quals inhibeixen la majoria de CDKs. El gen CDKN1A no està involucrat en els estadis primerencs del desenvolupament del melanoma, però contribueix al creixement i invasió dels estadis tardans (revisat per Sulaimon i Kitchell, 2003). Per altra banda, el rol de p16 com a supressor en el melanoma humà és inequívoc. p16 és inhibidor de CDK4 i CDK6. La presència de mutacions que comprometen a p16 confereix una susceptibilitat hereditària al melanoma. En un estudi molt recent de melanoma familiar s'ha descrit que l'expressió de p16 estava inversament correlacionada amb la progressió tumoral i era significativament menor en melanomes que en nevus (Ghiorzo et al., 2004). La importància d'alteracions de p16 en la patogènesi del melanoma esporàdic, però, roman controvertida (Herlyn et al., 2002). S'ha vist que poden donar-se

delecions al *locus* de p16 en lesions precursoras primerenques, fins i tot abans de l'establiment d'una histologia aberrant (Tran et al., 2002). Per altra banda, s'ha detectat pèrdua d'expressió associada amb l'estadi invasiu del desenvolupament del tumor (Sparrow et al., 1998; Grover et al., 1998). Tot i això, també s'han detectat delecions en el gen de p16 en un nombre significatiu de nevus benignes i alguns melanòcits aïllats normals. Per tant, no està molt clar el rol d'aquest gen com a causa de la progressió del melanoma humà esporàdic (Wang i Becker, 1996). En un model de ratolins *knockout* de p16 s'ha vist que la pèrdua de funció d'aquest *locus* redueix la latència i incrementa la incidència del desenvolupament de melanoma.

Altres gens que s'estan començant a associar amb el desenvolupament del melanoma són B-RAF i MC1R. Amb el descobriment de l'elevada freqüència de mutacions de B-RAF a neoplasmes melanocítics, sembla ser que l'activació de la via de senyal RAS-RAF-ERK és un altre esdeveniment obligat en el desenvolupament del melanoma (Chin, 2003). S'ha detectat la versió oncogènica de B-RAF a un 70 % dels melanomes humans, però també es troba en un 80% dels nevus benignes. Per tant, tot i que B-RAF pot actuar com un oncogen potent als estadis primerencs del melanoma a través de les vies de senyal MEK i ERK, no és necessari per la senyal en els melanòcits que ja tenen RAS transformat (Wellbrock et al., 2004). Per altra banda, estudis del gen MC1R no només mostren la importància d'aquest gen en la pigmentació del pèl i de la pell, sinó que també l'involucren en la senescència i immunitat (Bataille, 2003).

- **Classificació del melanoma humà**

Dins dels melanomes malignes podem parlar de quatre tipus histològics clàssics, que es classifiquen d'acord amb el seu patró de creixement i etiologies similars així com característiques biològiques, clíniques i de pronòstic. Els quatre tenen les dues fases de creixement (radial i vertical) de duració variable i són:

- Melanoma d'extensió superficial (*Superficial spreading melanoma*): el més comú en caucàsics (70% total de melanomes). No té predilecció per àrees exposades crònicament al sol.
- Melanoma nodular (*Nodular melanoma*): no té fase RGP discernible, predominantment dèrmic i ràpidament progressiu. El segon més comú: 15-30% del total, normalment a pells danyades pel sol crònicament.
- Melanoma lentigo maligne (*Lentigo maligna melanoma*): s'origina del lentigo maligne (lesió precursora, és la RGP *in situ* i pot existir durant anys), que es veu a pells exposades al sol de pacients vells, quan és VGP es considera ja melanoma.

- Melanoma lentiginós acral (*Acral lentiginous melanoma*): a mans i peus (inclosos dits i regions subunguals). El més comú en asiàtics, africans-americans i hispànics.

1.2 MELANOMA CANÍ

Els tumors espontanis en gossos i gats són models apropiats per a l'estudi de la biologia tumoral i per l'assaig d'agents antitumorals, i ofereixen avantatges sobre els tumors induïts a ratolí utilitzant carcinògens químics o virals (Vail i MacEwen, 2000). El melanoma representa un 3% del total de les neoplàsies del gos i fins un 7% de tots els tumors malignes. Els llocs més afectats en el gos són la cavitat oral (56%), llavi (23%), pell (11%) i dits (8%). El melanoma oral és sempre considerat com a maligne, mentre que menys del 5% de les lesions melanocítiques cutànies són malignes. La incidència del melanoma varia en funció de la localització i també de la raça. El melanoma cutani és més freqüent en races amb la pell molt pigmentada i hi ha certes races amb risc incrementat de patir melanoma subungual i d'altres de patir melanoma labial. La raó per la predilecció racial no està molt clara, però pot ser reflexe d'una base genètica i/o de la superior pigmentació d'algunes races (Smith et al., 2002).

La majoria de gossos amb melanoma tenen més de 10 anys d'edat i s'ha descrit una freqüència més elevada en mascles. Això és similar al que passa amb els humans, on la relació mascle/femella del melanoma oral és 2-3:1. En canvi, en el cas de medicina humana el melanoma cutani és estrany en races amb la pell fortament pigmentada. Per altra banda, s'ha estimat que la proporció de melanoma hereditari varia entre el 0.4 i el 12 % a medicina humana (Green, 1982); i s'han detectat certes mutacions en el gen supressor de tumors p16 en casos de melanoma familiar (Ranade et al., 1995). La pèrdua de funció de proteïnes supressores de tumors és un fet comú que pot contribuir a l'origen del melanoma caní. En un estudi recent, s'ha vist que la pèrdua de funció de p16/Rb succeeix en la majoria de les línies cel·lulars de melanoma caní (6/7) i mostres clíniques (22/26) estudiades, i suggereix que la inactivació d'aquesta via és un pas crític en la patogènesi del melanoma benigne i maligne en gossos, com ho és en humans i altres animals (Koenig et al., 2002; Smith et al., 2002).

- **Classificació de melanomes canins**

El terme **nevus**, utilitzat comunament per descriure lesions melanocítiques pigmentades de l'epidermis i dermis en medicina humana, no s'utilitza en dermatopatologia veterinària. El patòleg veterinari no diferencia entre un nevus severament displàsic, un melanoma *in situ* i un

melanoma invasiu primerenc, els quals difereixen en el seu pronòstic. En animals, la transformació maligne a partir de lesions benignes és molt poc comú, i la majoria de melanomes es creu que creixen *de novo* a partir de melanòcits de l'epidermis, dermis, epiteli ocular i epiteli oral (Smith et al., 2002). La classificació que tenim, doncs, en medicina veterinària és (Goldschmidt et al., 1998):

- Melanocitoma (*dermal melanoma, benign melanoma*). La diferenciació amb el melanoma maligne pot ser molt difícil. La presència de cèl·lules o nius de melanòcits neoplàsics a l'epidermis superficial és normalment un indicador de malignitat.
- Melanoacantoma: característiques d'un melanocitoma mixte (amb component dèrmic i epidèrmic) i una neoplàsia epitelial benigne. És estrany.
- Melanoma maligne: el tipus cel·lular no és pronòstic. Hi ha morfologia cel·lular variada des de fusiformes i epiteloides amb pleomorfisme variable. Es poden veure en nius, en feixos, o combinat. Es pot trobar un component intraepidèrmic. Són poc freqüents en la pell amb pèl del gos, si es compara amb els melanocitomes. És bastant comú el subungual (neoplàsia digital comú en el gos).
- Hiperplàsia melanocítica (*lentigo, lentigo simplex*): és una proliferació no-neoplàsica dels melanòcits en l'epidermis, principalment a la làmina basal. No hi ha atípia dels melanòcits.

1.3 INDICADORS DIAGNÒSTICS I PRONÒSTICS. TERÀPIA

A medicina humana trobem paràmetres clínics i histològics relacionats amb el pronòstic del melanoma maligne: nivells d'invasió (I-V; Clark et al., 1969a), gruix del tumor primari (Breslow, 1970), fase de progressió tumoral (Elder et al., 1989), presència d'ulceració (Vollmer, 1989), resposta de l'hoste referida a la presència d'infiltrat limfoide (nombre de limfonodes metastàsics, invasió intralimfàtica i limfòcits infiltrats pel tumor o *TILs*; Kopf et al., 1987), l'índex mitòtic (n°/mm^2 ; Vollmer, 1989), nombre de llocs de metastasis distants, elevada LDH (lactat dehidrogenasa), edat, sexe i regressió.

Pel que fa a l'espècie canina, com a indicadors diferencials de pronòstic podem parlar de la localització i la histologia del tumor. El melanoma és una de les poques neoplàsies en animals on la localització és un important indicador de pronòstic (Fig. 4). En el gos trobem que els de cavitat oral i unions mucocutànies (excepte parpelles) són considerats malignes, mentre que el

33% dels de la base de la unglia són malignes i el 85% dels cutanis són benignes (Bolon et al., 1990; Aronsohn i Carpenter, 1990; Oliver i Wolfe, 1992). En gos la majoria de tumors melanocítics intraoculars són benignes i si es procedeix a l'enucleació es poden curar. No se sap el perquè la localització influeix en el comportament del tumor. De forma interessant, també passa en el cas del melanoma oral a humana: el pronòstic pels d'unions mucocutànies i superfícies mucoses és també greu.

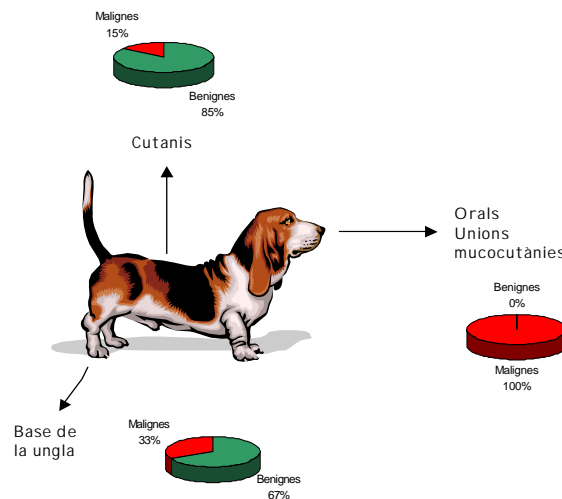


Figura 4. Localització del melanoma en el gos

En els melanomes cutanis i oculars de l'espècie canina ens indiquen pronòstic: l'índex mitòtic (≥ 3 figures mitòtiques/camp de 10X indiquen malignitat) - que és la característica histològica més fiable -, la morfologia de la cèl·lula neoplàsica i la invasió limfàtica o vascular. La mida del tumor, el grau de pigmentació, la intensitat de tinció de l'antigen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), la presència de necrosi, ulceració o inflamació, i l'expressió de p53 són de valor pronòstic limitat en animals. Tècniques més sofisticades com citometria de fluxe per detectar anomalies cromosòmiques no ofereixen avantatges sobre la histologia en la predicció del comportament del tumor. El valor de l'índex de proliferació utilitzant el MIB-1 (anticòs monoclonal per ki-67, que identifica cèl·lules que proliferen) s'està investigant, però no sembla oferir avantatges reals respecte la histologia (revisat per Smith et al., 2002).

El diagnòstic inicial i definitiu de melanoma (en animals) normalment es fa amb avaluació histopatològica, amb la citopatologia com a ajuda anterior o ajudant a la biòpsia. La citopatologia també s'usa per a monitoritzar les metastasis (en humana i animals), on el més freqüent és aspirar els limfonodes regionals. La morfologia del melanoma als llocs metastàtics normalment

és similar al tumor primari, però no sempre. Als llocs distants és freqüentment menys pigmentat. Els melanomes amelanòtics i pobrament diferenciats sovint esquiven un diagnòstic definitiu i, a més, hi ha neoplàsies que poden mimetitzar els melanomes microscòpicament. Com a conseqüència d'aquesta manca de criteris per diagnosticar i pronosticar un melanoma en l'espècie canina, s'ha vist la necessitat de buscar nous factors de pronòstic i d'identificar marcadors de melanoma com s'ha fet a humana, a causa de la dificultat per distingir certes lesions de melanoma maligne. Per això, hi ha mètodes de diagnòstic addicionals:

- Immunohistoquímica: els melanomes humans, canins i felins són vimentina positius i citoqueratina negatius. També són S100 i NSE positius (però també hi ha altres tumors positius a algun dels dos). El melan-A és el test IHC més específic del moment, sobretot si es combina amb S100 (Ramos-Vara et al., 2000). El temps de supervivència és inversament relacionat a la intensitat de tinció S100 en melanomes malignes de la pell facial i cavitat oral en pacients humans i la tinció de S100 també és útil pel diagnòstic de melanomes canins amelanòtics (Koenig et al., 2001). Els anticossos monoclonals són molt utilitzats en medicina humana, sobretot l'HMB-45, el qual no funciona tant bé en gos (Sulaimon et al., 2002). El MAB IBF9 és el primer monoclonal específicament creat per reconèixer l'antigen de melanoma caní, però també reacciona amb altres tipus de neoplàsies (Oliver i Wolfe, 1992; Oliver et al., 1997).
- Microscopi electrònic: per la demostració ultraestructural de melanosomes veritables.
- Hibridació *in situ* (ISH): es tracta d'utilitzar una sonda de DNA complementària al mRNA específic de tirosinasa. És molt específic i una eina potencialment molt bona pel diagnòstic dels melanomes pobrament diferenciats. El principal problema és pràctic, degut a la dificultat de treballar amb el mRNA, ja que és molt fàcilment degradable (Takenouchi et al., 1994; revisat per Smith et al., 2002).

Per tant, no hi ha una única tècnica de diagnòstic capaç de diferenciar benigne *vs* maligne o per predir el temps de supervivència.

Cal destacar la similitud del melanoma caní amb l'humà per la seva resistència a la quimioteràpia, la no influència de pigment melanòtic i el comportament biològic que segueix el tumor, sobretot el melanoma oral. A l'espècie canina els diferents tractaments que es poden seguir són: cirurgia (hi ha recurrències o metàstasis des del 30 fins al 75%) (Bolon et al., 1990; Aronsohn i Carpenter, 1990), quimioteràpia (hi ha menys d'un 15 % de resposta, similar al que

trobem a medicina humana), radioteràpia (hi ha resposta en un 83% dels casos, però la supervivència mitjana és de 8 mesos), cisplatí intralesional (resposta en un 49% dels casos i supervivència d'11 mesos) i immunoestimulants que augmenten la supervivència (L-MTP-PE, vacunes) (revisat per Vail i MacEwen, 2000).

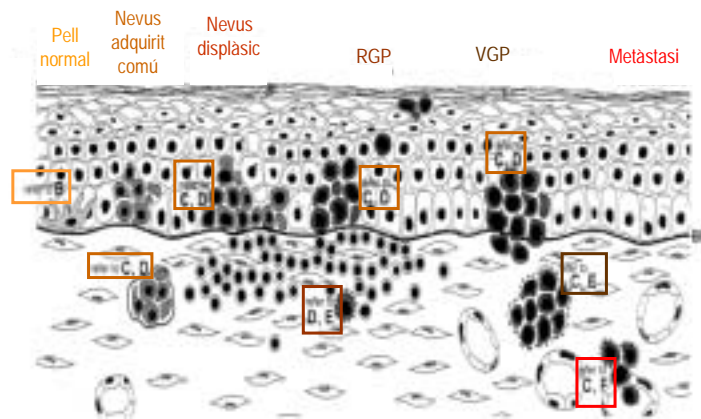
Queda per veure si, a més de la similitud en l'aspecte clínic, el melanoma caní és semblant a l'humà a nivell molecular, ja que el gos pot ser un bon model per a l'estudi de la biologia tumoral en les dues espècies, la importància del sistema immune i la recerca d'alternatives terapèutiques. Les cèl·lules de melanoma en cultiu no són el mateix que els tumors *in vivo*. Teòricament, les línies cel·lulars poden mutar i no posseir les mateixes característiques que el tumor parental. Variacions en condicions ambientals també poden influir el creixement i diferenciació. Tot i això, el cultiu de cèl·lules de melanoma és un model útil per estudiar les característiques moleculars, l'origen i progressió del melanoma.

S'ha de tenir present que els tumors espontanis dels animals de companyia (gos i gat) ofereixen una oportunitat única com a models per estudiar la biologia i terapèutica del càncer humà. Una relativa elevada incidència, el comportament biològic similar, la gran mesura corporal, respostes similars a agents citotòxics i la mitjana de vida força més curta són avantatges que proporciona el model de l'animal de companyia en el cas del melanoma (entre d'altres tipus tumorals) (Vail i MacEwen, 2000).

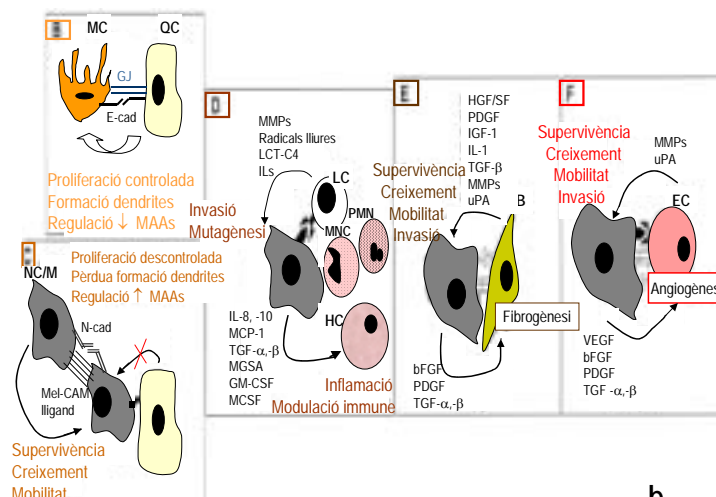
2.- EL MELANOMA COM A MODEL PER A L'ESTUDI DE LES INTERACCIONS CÈL·LULA-CÈL·LULA I CÈL·LULA- MÀTRIU EXTRACEL·LULAR

En els organismes pluricel·lulars l'homeòstasi es regeix per tres formes de comunicació: la comunicació extracel·lular, via factors solubles i adhesió cèl·lula-màtriu extracel·lular; la comunicació intracel·lular, via segons missatgers i xarxes de transducció de senyal; i la comunicació intercel·lular, via adhesió cèl·lula-cèl·lula i comunicació via unions GAP. L'homeòstasi de la pell normal es manté per interaccions dinàmiques entre els melanòcits i el seu microambient compost per queratinòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials i immunocompetents i la màtriu extracel·lular. El melanoma cutani s'ha utilitzat àmpliament com a model d'investigació de la comunicació cel·lular i la interacció tumor-hoste (Fig. 5) (Li and Herlyn, 2000). La pell humana és un òrgan complex format per dues capes, l'epidermis i la dermis, separades per una membrana basal. Els melanòcits productors del pigment melanina es troben en la unió epidermis-dermis, interespaïats cada 5-10 queratinòcits basals, i formen la "unitat epidermis-melanina" (Fitzpatrick et al., 1979). La proliferació dels melanòcits està controlada

estrictament i s'observa rarament sota condicions fisiològiques. La dermis, amb els seus components mesenquimatosos (fibroblasts i vasos sanguinis) proporciona suport mecànic i nutricional, rigidesa i gruix a la pell.



a



b

Figura 5. Alteracions durant el desenvolupament i progressió del melanoma. Progressió i canvis espai-temporals (a) i dinàmica de les interaccions cèl·lula-cèl·lula entre les cèl·lules de pell (b) durant el desenvolupament i progressió del melanoma. Els nevus consisteixen en nius de nevòcits (NC). La progressió posterior dona lloc a les cèl·lules malignes, que creixen només entre o prop de l'epidermis (RGP) o les cèl·lules adquireixen la capacitat d'envair la dermis profunda (VGP). En la pell normal, es manté una homeòstasi tissular entre els queratinòcits (QC) i els melanòcits (MC) gràcies a la comunicació via E-cadherina (E-cad) i les unions gap (GJ) (B). Durant la progressió del melanoma, disminueix l'E-cadherina i augmenta la N-cadherina (N-cad) que produeix la comunicació entre les cèl·lules melanocítiques veïnes (C), els fibroblasts dèrmics (FB, E) i les cèl·lules endotelials (EC, F). L'expressió de MelCAM i els seu lligand afavoreix l'associació física entre les mateixes cèl·lules melanocítiques (C) i amb les cèl·lules hoste que expressen MelCAM, incloent la cèl·lules endotelials vasculars (F), les cèl·lules musculars llises i les cèl·lules T activades (D). Altres abreviacions: BM, membrana basal; M, cèl·lules de melanoma; MNC, cèl·lules mononuclears, monòcits; PMN, cèl·lules polimorfonuclears, neutròfils; LC, limfòcits; HC, histiòcits. Adaptat de Hsu et al., 2002.

Els melanòcits en cultiu presenten diferents característiques fenotípiques: creixen contínuament *in vitro*, adquireixen morfologia bi- o tripolar i l'expressió d'antígens associats a melanoma (MAA), com MelCAM/MUC18/CD 146 (MelCAM: *melanocytic cell adhesion molecule*), la subunitat $\beta 3$ de les integrines, gangliòsids, CSPGs, proteases i receptors de factors de creixement, que no s'expressen en els melanòcits *in situ*. Aquestes diferències fenotípiques entre els melanòcits *in situ* i *in vitro* suggereixen un paper important de les senyals microambientals en el control del fenotip dels melanòcits. De fet, sota co-cultiu amb queratinòcits indiferenciats, els melanòcits tornen a tenir el seu fenotip normal i es mantenen en el *ratio* fisiològic, cosa que suggereix que els queratinòcits controlen com i quan proliferen els melanòcits. A més, l'expressió de MAA per part dels melanòcits en cocultiu es redueix a un nivell indetectable (Taula 1). El contacte directe entre queratinòcits i melanòcits juga un rol important en la conservació de les característiques fenotípiques i el comportament biològic dels melanòcits (Hsu et al., 2002).

	Morfologia	Proliferació	Pigment	MAA
Melanòcits <i>in situ</i>	Multidendrítica	Controlada	+	-
Monocultiu melanòcits	Bi- o tri- polar	Descontrolada	-	+
Co-cultiu melanòcits amb queratinòcits	Multidendrítica	Controlada	+	-

Taula 1. Els queratinòcits indiferenciats controlen el creixement cel·lular, morfologia i expressió d'antígens de superfície dels melanòcits normals. Adaptat de Hsu et al., 2002.

S'ha associat l'expressió d'un elevat nombre de molècules de superfície cel·lular que mitjancien els canvis d'interaccions cèl·lula-cèl·lula amb el desenvolupament del melanoma. Per tant, múltiples interaccions adhesives, més que interaccions individuals, poden jugar rols crítics en la progressió d'aquest tipus de tumor. El pas de la fase radial de poc risc a la fase vertical d'elevat risc es caracteritza per canvis significatius en l'expressió de molècules involucrades en els contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular i en proteases. Aquests canvis impliquen una disminució d'expressió d'E-cadherina i un augment de N-cadherina, un increment en l'expressió de les integrines $\alpha v \beta 3$ i $\alpha 4 \beta 1$ i les molècules d'adhesió MelCAM i ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*), i un increment en l'expressió de diferents proteases (Li i Herlyn, 2000; Herlyn et al., 2002;).

2.1 INTERACCIONS CÈL·LULA-CÈL·LULA

- **Cadherines**

Les cadherines formen una família de glicoproteïnes de superfície cel·lular que funcionen com a molècules d'adhesió cèl·lula-cèl·lula, així com a receptors de senyal per la comunicació inter- i intracel·lular, i donen lloc a la regulació del creixement cel·lular, diferenciació i apoptosi tant en cèl·lules normals com en malignes. Els diferents isotipus s'expressen de manera específica segons el tipus cel·lular, el teixit i el moment del desenvolupament. El perfil d'expressió de molècules de cadherina de les cèl·lules de pell humana és diferent del de pell de ratolí, cosa que en reflexa la diferent organització estructural. A la pell humana normal adulta, l'E-cadherina és expressada a la superfície de totes les cèl·lules epidèrmiques incloent els queratinòcits, melanòcits i les cèl·lules de Langerhans. La N-cadherina a la pell és expressada pels fibroblasts i les cèl·lules endotelials, però no per queratinòcits ni melanòcits. Extracel·lularment les E-cadherines s'associen amb les del mateix tipus, mentre que intracel·lularment, s'uneixen indirectament amb el citoesquelet d'actina a través d'interaccions no-covalents amb les catenines (Li i Herlyn, 2000).

Mentre que les cèl·lules de nevus superficials expressen E-cadherina a les seves membranes de forma homogènia, les cèl·lules de nevus d'unió (*junctional nevi*) tenen expressió heterogènia o difusa pel citoplasma i les cèl·lules de melanoma no n'expressen. La pèrdua d'E-cadherina sembla ser un dels passos crítics en la progressió del melanoma, ja que les cèl·lules melanocítiques poden escapar-se del control dels queratinòcits veïns per envair la dermis. De fet, la restauració funcional de l'expressió d'E-cadherina en cèl·lules de melanoma retarda el creixement cel·lular, redueix la tumorigenicitat *in vivo* i confereix un fenotip melanocític dependent de queratinòcits. A més, es produeix una disminució dels antígens relacionats amb la invasió, com la subunitat de la integrina $\beta 3$ i MelCAM (Hsu et al., 2002).

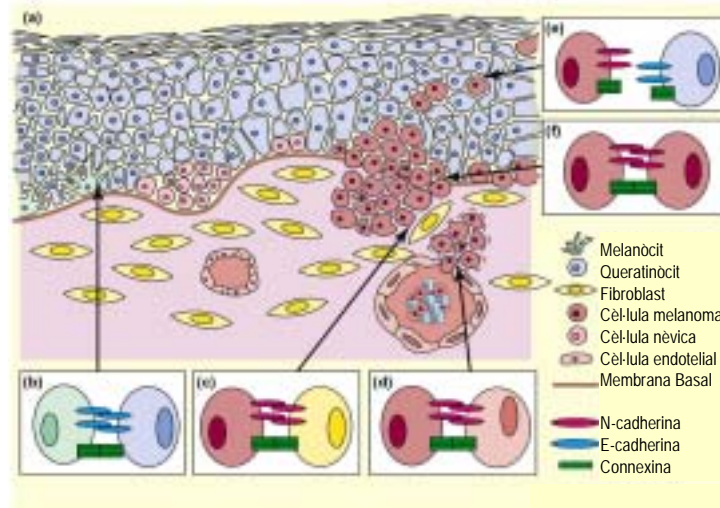


Figura 6. Alteracions de la comunicació intercel·lular durant el desenvolupament del melanoma. (a) estructures humanes de la dermis i epidermis: progressió típica dels estadis de desenvolupament del melanoma d'esquerra (pell normal) a dreta (melanoma metastàtic). (b) melanòcits normals epidermics interaccionen amb els queratinòcits adjacents a través d'E-cadherina i connexines. Un canvi del perfil de cadherina de la E- a la N-cadherina durant el desenvolupament del melanoma allibera les cèl·lules dels queratinòcits epidermics (e) i confereix noves propietats adhesives. Es proposa que les cèl·lules de melanoma formin adhesions mitjançant la N-cadherina i unions GAP mitjançant la connexina amb: (c) fibroblasts que expressen N-cadherina, (d) cèl·lules vasculars endotelials i (f) cèl·lules de melanoma adjacents. La comunicació intercel·lular de les cèl·lules nèviques s'ha de clarificar. Adaptat de Li and Herlyn, 2000.

Per contra, amb la pèrdua gradual d'E-cadherina, les cèl·lules melanocítiques guanyen l'expressió de N-cadherina durant el desenvolupament del melanoma, la qual cosa facilita la formació de grups de cèl·lules i la invasió a la dermis, ja que la N-cadherina produeix l'adhesió de les cèl·lules de melanoma unes amb les altres i amb els fibroblasts i les cèl·lules vasculars endotelials normals (Fig. 6). A més, aquest tipus d'adhesió promou la supervivència cel·lular ja que evita l'apoptosi a través de l'activació de la via antiapoptòtica Akt/PKB, la qual incrementa els nivells intracel·lulars de β -catenina i inactiva la via proapoptòtica Bad (Hsu et al., 2002). Aquest canvi en el perfil de E- a N-isotipus durant la progressió del melanoma s'ha vist tant *in vivo* com *in vitro*, i també s'ha observat en altres processos biològics associats a la TEM (transició epiteli-mesènquima) com la diferenciació i migració cel·lular durant el desenvolupament embrionari, i la invasió cel·lular i la metàstasi durant el desenvolupament del tumor. El canvi en el perfil de cadherines també s'ha observat en altres tipus de tumors, com per exemple les cèl·lules malignes de carcinoma prostàtic humà (Tran et al., 1999).

En un estudi recent, es va veure com les cèl·lules de melanoma altament agressives expressaven VE-cadherina (cadherina exclusiva de cèl·lules endotelials), mentre que no es detectava a les cèl·lules pobrament agressives. Per tant, a més de cridar neovasculatura pel suport nutricional, les cèl·lules de melanoma altament agressives creen una microcirculació al tumor fent-se passar per cèl·lules endotelials ("mimetisme vasculogènic") (Hendrix et al., 2001).

De fet, un nombre de receptors de superfície cel·lular, a més de la VE-cadherina, són compartits entre les cèl·lules de melanoma i les cèl·lules endotelials activades, com es veu a la Taula 2 (Herlyn et al., 2002).

Família	Receptor	Receptor	Comentaris
Integrina		$\alpha v \beta 3$	El marcador d'invasió de melanoma més específic
CAM		MeICAM	Marcador endotelial de tots els vasos
		L1-CAM	Expressió a les cèl·lules endotelials induïda per VEGF
		VCAM	
		ALCAM	Induït per TNF- α /IL-1/INF- α
		ICAM-1	Homotípic i heterotípic
Cadherina		PECAM	
		N-cadherina	També expressió detectada a fibroblasts
		VE-cadherina	
Eph		Eph A2 (ECK)	
Notch		Notch 4	
CD44		Isoformes CD44	Receptor de l'àcid hialurònic (HA)
Receptors de factors creixement		VEGFR-1 i -2, FGFR-1, PDGF-R α 1, IGFR-1, etc.	

Taula 2. Receptors de superfície cel·lular compartits entre les cèl·lules endotelials activades i les cèl·lules de melanoma. Adaptat de Hsu et al., 2002

- **MeICAM/MUC18/CD 146**

MeICAM, també conegut com MUC18 i CD 146, és una molècula d'adhesió heterofíllica cèl·lula-cèl·lula de la superfamília de gens d'immunoglobulines (*immunoglobulin gene superfamily*), l'expressió de la qual es correlaciona amb el gruix del tumor i la disseminació metastàtica. L'expressió de MeICAM es troba primer en els nevus, quan les cèl·lules s'han separat dels queratinòcits epidèrmics i han migrat a la dermis. Amb la progressió, la seva expressió incrementa gradualment, arribant als nivells més elevats en les cèl·lules de melanoma metastàtic. També es detecta la seva expressió en altres tipus cel·lulars en el microambient del melanoma, com les cèl·lules T activades i les endotelials vasculares. Es suggereix que la funció

de MelCAM va més enllà de l'adhesió cel·lular. La supressió de l'expressió de MelCAM inhibeix l'adhesió entre les cèl·lules de melanoma, evita la invasió dèrmica i retarda el creixement cel·lular del tumor *in vivo* (Hsu et al., 2002).

MelCAM expressat per les cèl·lules de melanoma pot actuar com a coreceptor amb la N-cadherina per la formació de les unions GAP. Es pensa que la comunicació intercel·lular mitjançant les unions GAP juga un rol important en el manteniment de la integritat del teixit normal i en el trencament de l'homeòstasi en tumors. Aquestes unions acoblen cèl·lules adjacents i permeten el pas passiu de molècules de baix pes molecular. Les unions GAP són regulades durant diferents processos cel·lulars com la progressió del cicle cel·lular, l'embriogènesi i la tumorigènesi. La pèrdua de les unions GAP o la reducció de la seva permeabilitat podria aïllar les cèl·lules de les senyals reguladores de l'ambient i donar lloc a patrons de creixement anòmals. El rol de les unions GAP a melanoma no està ben entès (Li and Herlyn, 2000). Mentre que els melanòcits són compatibles amb els queratinòcits, les cèl·lules de melanoma tenen capacitat de comunicació entre elles mateixes i amb els fibroblasts dèrmics i les cèl·lules endotelials vasculares. La formació selectiva d'unions GAP heterotípiques entre cèl·lules de la pell està relacionat amb el canvi d'expressió de E- a N-cadherina durant la progressió del melanoma.

- **Proteoglicans de melanoma: Mel-CSPG/NG2**

Les cèl·lules de melanoma humà presenten a nivell de membrana plasmàtica un proteoglicà d'alt pes molecular tipus condroitin sulfat, denominat mel-CSPG o MCSP (*melanoma chondroitin sulfate proteoglycan*), que també es troba present en medis condicionats per cèl·lules de melanoma en cultiu (Ross et al., 1984). Aquest proteoglicà és l'homòleg humà (Pluschke et al., 1996) de NG2, descrit en cèl·lules progenitores neurals de rata (Nishiyama et al., 1991). S'ha descrit que NG2 *in vitro* colocalitza amb CD44 i la integrina $\alpha 4\beta 1$, suggerint que pot modular processos d'unió mediat per aquestes dues molècules. A més, la seva transfecció a cèl·lules de melanoma de ratolí que no n'expressaven produeix un increment de proliferació *in vitro* i tumorigènesi *in vivo*, així com metastasi a pulmó. Segons tots aquests resultats pot concloure's que NG2 és capaç de modular l'adhesió, proliferació i potencial metastàtic de les cèl·lules de melanoma (Burg et al., 1998). Altres estudis mostren que mel-CSPG estimula l'adhesió mediada per la integrina $\alpha 4\beta 1$ i disseminació de cèl·lules de melanoma (Iida et al., 1995). Aquest proteoglicà s'ha identificat com a marcador tumoral específic de melanoma humà i de diferenciació melanocítica i la seva expressió, junt amb la d'altres molècules, permet l'establiment d'un patró segons el grau de diferenciació entre les diferents línies de cèl·lules

pigmentàries (Houghton et al., 1982; Real et al., 1985; Houghton et al., 1987). La seva presència és específica de melanoma, melanòcits fetals, nevus i alguns tumors d'origen neuroectodèrnic, com astrocitoma i neuroblastoma, mentre que està absent en altres tumors i melanòcits adults (Real et al., 1985; Rettig et al., 1986). La seva expressió és regulada pel TGF- β (Heredia et al., 1996a; Heredia et al., 1996b).

2.2.- INTERACCIONS CÈL·LULA-MATRIU EXTRACEL·LULAR

A part de les molècules d'adhesió i els contactes cèl·lula-cèl·lula, també tenen gran importància els contactes cèl·lula-matriu extracel·lular. Com ja hem comentat, en la progressió maligna intervenen, a part dels factors genètics, altres factors relacionats amb canvis en el citoesquelet i en la interacció de les cèl·lules amb el seu entorn (cèl·lules veïnes i matriu extracel·lular) que condueixen a l'adquisició de propietats migratòries i invasores i, a vegades, d'un fenotip metastàtic. Des de fa molt temps es coneix la importància de la **matriu extracel·lular (MEC)** com a reguladora del comportament cel·lular. La MEC és una estructura essencial dels éssers multicel·lulars, ja que sustenta i connecta les cèl·lules d'un teixit. Apareix molt d'hora durant l'embriogènesi i té un paper essencial en el control de l'adhesió, creixement, migració i diferenciació cel·lulars. Té, doncs, una gran importància en l'aparició i progressió dels tumors i en la propagació de les metàstasis. La MEC està formada per un seguit de polisacàrids i proteïnes secretades localment i que donen lloc a una xarxa ben organitzada. La gran diversitat de formes que pot presentar la MEC, cadascuna totalment adaptada als requeriments funcionals de cada teixit en particular, vénen derivades de variacions en composició, quantitats relatives i forma d'organització dels seus components. La cèl·lula produeix aquestes macromolècules extracel·lulars i continua relacionant-se amb els seus propis productes i amb la MEC produïda per altres cèl·lules. A la superfície cel·lular els receptors de la matriu la uneixen amb l'interior de la cèl·lula. El metabolisme, la forma i moltes de les propietats de la cèl·lula estan contínuament relacionades i depenen de la composició i l'organització de la matriu.

Recentment, un aspecte de la MEC que ha anat adquirint importància és la seva funció com a reserva de factors de creixement, de pèptids bioactius i altres molècules actives que es troben presents a la MEC en forma críptica. La remodelació de la MEC i la seva modificació proteolítica pot tenir importants conseqüències funcionals en la cèl·lula tumoral, ja que es produiran canvis en la bioaccessibilitat d'aquestes molècules i factors (Herlyn et al., 2002).

Les proteïnes de la matriu s'han classificat en tres grans classes de macromolècules: col·làgens, glicoproteïnes i proteoglicans. Els col·làgens constitueixen l'esquelet de la MEC i

poden jugar un paper directe en l'adhesió, migració i invasió cel·lular (Chelberg et al., 1989). Les glicoproteïnes (fibronectina, laminina, tenascina i altres proteïnes extracel·lulars no col·làgenes) juguen un paper important en les interaccions en moltes superfícies cel·lulars. Els proteoglicans (PGs) són glicoproteïnes formades per una proteïna nucli amb una o més cadenes de glicosaminoglicans (GAG) unides mitjançant enllaços O-glicosídics (Wight et al., 1991; Hardingham i Fosang, 1992). Glicoproteïnes i PGs poden participar en diverses funcions a través de dominis d'interacció amb receptors específics de la membrana cel·lular, factors solubles o altres molècules extracel·lulars.

S'ha demostrat que la MEC i els seus components controlen el creixement, l'estat de diferenciació, el desenvolupament i la resposta metabòlica de la cèl·lula. Fins ara els dos grans grups de receptors de la superfície cel·lular – integrines (Juliano i Haskill, 1993; Giancotti, 1997; Rosso et al., 2004) i els sindecans (Rapraeger, 1993; Saoncella et al., 1999; Rapraeger, 2000) - s'han identificat com a mediadors de la influència de la MEC sobre la cèl·lula. Però els efectes de la MEC sobre la cèl·lula no poden produir-se en un medi carent d'altres elements que influeixin la biologia cel·lular. S'ha establert la importància dels factors de creixement, citoquines, hormones i el contacte cèl·lula-cèl·lula com a reguladors del fenotip cel·lular. Així podem dir que el control del fenotip cel·lular, tant en el desenvolupament normal, la funció i en les respostes patològiques, es realitza a través d'una complexa interacció entre mediadors solubles i insolubles, en la qual la MEC juga un paper fonamental.

- Els proteoglicans

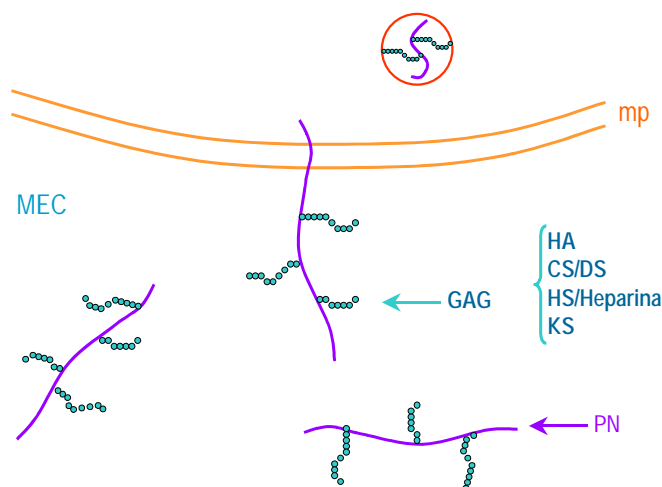


Figura 7. Estructura i tipus de PGs. mp= membrana plasmàtica; MEC: matriu extracel·lular; GAG: cadenes de glicosaminoglicans, segons les quals trobarem: HA (àcid hialurònic), CS/DS (condroitin/dermatàn sulfats), HS (heparan sulfats)/Heparina o KS (keratàn sulfats); PN: proteïna nucli.

- Els proteoglicans de matriu extracel·lular

Els PGs es poden subdividir en tres grans subfamílies:

- Proteoglicans petits o **família SLRP** (*small leucine rich proteins*): està formada per 9 membres que es caracteritzen per la presència d'una proteïna nucli petita i són rics en leucines. Aquesta família comprèn la decorina i el biglicà, entre d'altres.
- **Proteoglicans de la membrana basal**: presents a la membrana basal epitelial i vascular. Són membres d'aquesta família el perlecà, l'agrina i el bamacà.
- **Família dels hialectans**: nom donat per la seva capacitat d'unió a l'àcid hialurònic. A aquesta família (Fig. 9) hi pertanyen el versicà, l'agrecà, el neurocà i el brevicà, que tenen com a característiques comuns els seus tres dominis (revisat per Iozzo, 1998 i Wight, 2002).

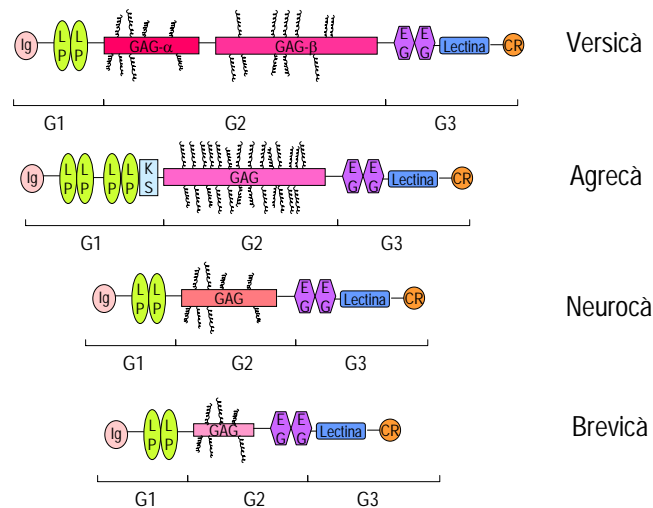


Figura 9. La família dels hialectans. G1, G2 i G3: els tres dominis. EG: motiu EGF-like; CR: CRP.

- El versicà

En aquest treball ens hem centrat en l'estudi del **versicà**, el qual és un CSPG que pertany a la família dels hialectans. El versicà es troba altament expressat en teixits i cèl·lules de ràpid creixement, ja sigui en l'embrió com en teixits tumorals, i s'ha suggerit que juga un rol directe en la proliferació i altres funcions cel·lulars. Fins ara, es coneixen les seqüències completes de versicà humà, murí, boví i de pollastre (originàriament anomenat PG-M). El gen del versicà és anomenat CSPG2 i està regulat per un promotor que té la típica caixa TATA i llocs potencials d'unió per diferents factors de transcripció (AP2, etc.) (Wight, 2002).

La família dels hialectans (Fig. 9) es caracteritza per tenir tres dominis estructurals: la regió amino-terminal (domini G1) que és responsable de la unió a HA; el domini central és on s'uneixen les cadenes GAG i la regió carboxi-terminal (domini globular G3), que s'assembla a la

família de proteïnes selectines i, en el cas del versicà, consisteix en un domini lectina tipus C adjacent a dos dominis tipus *EGF-like* i un mòdul *CRP-like*. Els extrems globulars estan molt altament conservats (molt més que el domini central, d'unió a GAGs) perquè estan involucrats en les interaccions mediades per proteïna amb altres lligands extracel·lulars. El domini globular G3 pot interaccionar amb carbohidrats simples, GAGs i amb altres proteïnes com la fibronectina tipus III i la tenascina (Dours-Zimmermann, 1994; Iozzo 1998; Zimmermann 2000, Wight 2002).

El domini central del versicà està codificat per dos grans exons, susceptibles de *splicing* alternatiu, els quals especifiquen les seqüències d'unió dels condroitin sulfat al versicà. La regió codificada per l'exó 7 s'anomena GAG- α i la regió codificada per l'exó 8 és el subdomini GAG- β . Així doncs, en mamífers trobem el versicà com a quatre possibles isoformes: la més gran conté els dos subdominis GAG- α i GAG- β i és designada com V0; les altres variants són V1 (conté GAG- β), V2 (conté GAG- α) i V3 (no té cap subdomini GAG) (Dours-Zimmermann, 1994). Per tant, variarà el nombre de llocs d'unió potencials pels GAGs: 17-23 per V0, 12-15 per V1, 5-8 per V2 i 0 per V3 (és més una glicoproteïna que no pas un proteoglicà). La isoforma V3 va ser descrita per Zako *et al.* (1995), mitjançant PCR, al còrtex cerebral adult, a la retina, a l'estómac adult i al fetge fetal humà i al cervell del ratolí adult.

Les isoformes de versicà difereixen, doncs, en la mida del domini GAG i, per tant, en el nombre de les cadenes GAG unides covalentment i la distància existent entre els dominis G1 i G3. Aquestes diferències haurien d'afectar la capacitat del versicà per interaccionar amb els seus lligands i, probablement, les seves propietats fisiològiques. Per exemple, la isoforma més petita (V3) té moltes de les propietats d'unió del versicà, però no té cadenes de CS i, per tant, tampoc l'elevada densitat de càrrega ni la grandària de les altres isoformes.

S'ha suggerit que la mida del domini GAG té capacitat reguladora. Així s'ha descrit que pot modular la capacitat inhibidora del creixement axonal del versicà en el sistema nerviós (Schmalfeldt *et al.*, 2000). Recentment, s'ha descrit que cèl·lules musculars llises vasculares que sobreexpressen la isoforma V3 mostren una adhesió incrementada i un potencial per la proliferació i migració menor que les cèl·lules control (Lemire *et al.*, 2002), cosa que fa pensar en la possibilitat que V3 podria exercir els seus efectes a través de canvis en la coberta pericel·lular per competència amb les isoformes més grans de versicà.

A l'espai extracel·lular, els PGs de la família dels hialectans com el versicà interaccionen amb l'HA, un polisacàrid extracel·lular que trobem abundant en els teixits connectius i també en teixits neurals i epitelials (Zimmermann, 2000). Es creu que HA i versicà, junt amb altres glicoproteïnes com la tenascina, formen complexos tridimensionals i constitueixen una xarxa organitzada en l'espai intercel·lular (Yamaguchi, 2000, Fig. 10).

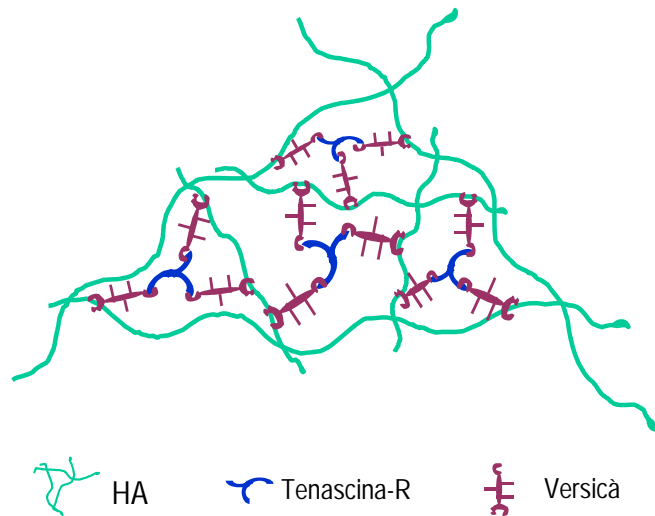


Figura 10. Model dels complexos àcid hialurònic-tenascina-hialectans. Es suggereix que el versicà o altres hialectans juguen un rol central en l'ensamblatge d'una matriu d'HA ordenada. Adaptat de Yamaguchi, 2000.

Aquestes xarxes interaccionarien directament amb la cèl·lula a través de CD44, un dels receptors de l'HA, que mediarà les seves funcions. Canvis en el patró d'expressió d'aquestes molècules o en la seva capacitat d'interacció alteren les relacions cel·lulars normals i, per tant, poden contribuir a la desorganització estructural i funcional, i promouen la proliferació cel·lular i la migració, ambdues característiques de les cèl·lules cancerígenes, així com de l'embriogènesi, inflamació i reparació de ferides (Karjalainen et al., 2000).

La interacció d'hialectans amb l'HA també pot modificar la seva localització i/o distribució sobre la superfície cel·lular tal i com s'ha proposat pels condrocits (Fig. 11).

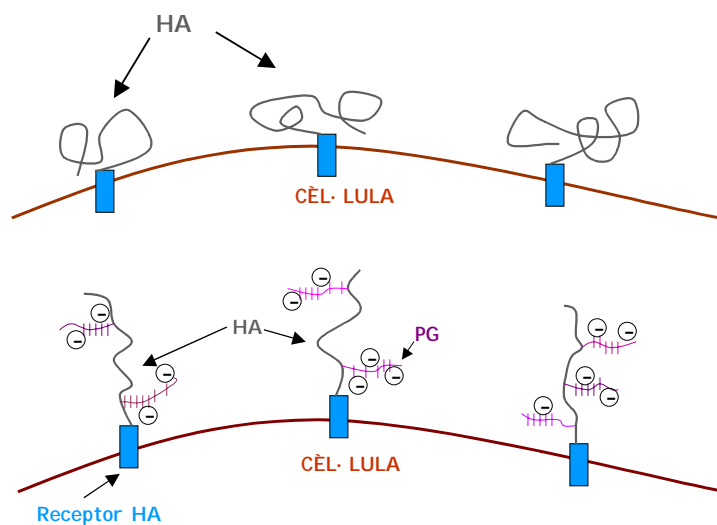


Figura 11. Model de la matriu pericel·lular dels condrocits. Quan l'agrecà interacciona amb l'HA, la repulsió de la càrrega negativa resultant entre les cadenes GAG produeix que els complexos HA-agrecà s'estenguin per sobre de la superfície cel·lular, que es pot visualitzar com a matriu pericel·lular. La relació del versicà amb l'HA hauria de ser la mateixa. Adaptat de Lee et al., 1993.

Recentment el nostre grup ha descrit un increment en la producció de versicà en el melanoma maligne (Touab et al., 2002). Aquesta característica també ha estat descrita en altres tipus tumorals, com en els vasos de tumors de cervell (Paulus et al., 1996), en l'estroma del càncer de pròstata (Ricciardelli et al., 1998; Sakko et al., 2001), tumor mamari (Nara et al., 1997; Brown et al., 1999) i histiocitoma (Isogai et al., 1996). Es creu que l'ambient cel·lular expandit i ric en aigua proporcionat per els complexos versicà/HA probablement deforma l'arquitectura normal de la MEC i facilita el moviment i creixement cel·lular (Knudson, 1996; Toole, 2000; Toole, 2002; Toole i Hascall, 2002).

Per la seva naturalesa altament interactiva, el versicà és important no només pel seu rol biomecànic i estructural, sinó també pel seu rol en la biologia cel·lular, influenciant diferents esdeveniments que formen la base del desenvolupament embrionari i diferents malalties. Es suggereix, per exemple, que el versicà actua com un element de la MEC que interacciona amb les cèl·lules durant les rutes migratòries de la cresta neural (Perisinotto et al., 2000). A la pell, s'ha detectat la seva presència en localitzacions molt determinades, com la zona de proliferació dels queratinòcits a la làmina basal (interfase dermis-epidermis), les beines dels fol·licles pilosos, les glàndules sudorípares, i a la dermis s'associa amb la xarxa elàstica (Zimmermann et al., 1994; Bode-Lesniewska et al., 1996). També s'han vist considerables diferències en la composició i distribució de versicà entre la pell fetal i l'adulta, les quals es corresponen amb els canvis observats en el contingut i distribució de l'àcid hialurònic (Ågren et al., 1997). L'expressió de versicà també està regulada en altres casos com en el desenvolupament del fol·licle pilós, on l'expressió s'activa i desactiva en cada cicle i es correlaciona amb la diferenciació cel·lular (du Cros et al., 1995).

S'ha vist que el versicà s'expressa d'una forma incrementada en les cèl·lules de múscul llis tractades amb el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) i TGF- β (Romaris et al., 1991; Schönherr et al., 1991; Häkkinen et al., 1996). A més, la síntesi de versicà pot ser induïda per un conjunt de factors de creixement (EGF, TGF- β i PDGF), cosa que suggereix que diverses vies de transducció de senyal poden regular la seva expressió (Tiedemann et al., 1997).

- **L'àcid hialurònic**

L'àcid hialurònic (HA) és un membre de la família dels glicosaminoglicans. És un polisacàrid lineal compost per una estructura simple de repeticions d'unitats disacàrides de N-acetilglucosamina i àcid glucurònic (Fig. 12). No té nucli proteic i, per tant, és essencialment no-antigènic. El seu pes molecular és elevat (10^5 - 10^6 Da) i està carregat negativament, cosa que li confereix propietats físiques i interactives inusuals (Knudson, 1996). La biosíntesi de l'HA és

catalitzada per les hialuronat sintasa (HAS) localitzades a la membrana plasmàtica (Weigel et al., 1997). S'han identificat i clonat tres gens per aquests enzims en vertebrats: HAS1, HAS2 i HAS3 (revisat per Toole, 2000).

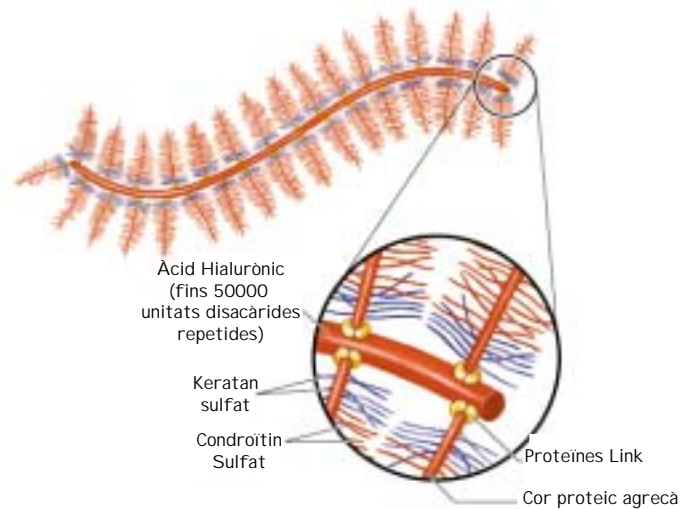


Figura 12. Estructura de la unió de l'àcid hialurònic a PGs.

L'HA es localitza a la matriu extracel·lular, a la superfície cel·lular i dins les cèl·lules. La seva distribució tissular és ubiqua, però sobretot concentrada a les matrius pericel·lulars que envolten les cèl·lules que proliferen i migren. Elevades concentracions d'HA dipositades a la matriu extracel·lular causen que els espais tissulars esdevinguin altament hidratats i s'expandeixin degut a la incrementada pressió osmòtica.

L'HA és important pels seus rols més actius en la proliferació cel·lular, on la seva deposició facilita l'arrodoniment de les cèl·lules mitòtiques i la sobreproducció d'HA per cèl·lules en cultiu s'ha vist que alleugera la inhibició de creixement per contacte normal (Itano et al., 2002). L'HA juga un paper molt important en el desenvolupament, on fa de bastida pel moviment de les cèl·lules que s'estan diferenciant i d'estímul per la transformació a un fenotip mesenquimatós que precedeix la migració cel·lular per formar òrgans; en la curació de ferides, on la seva síntesi accelerada serveix per reclutar limfòcits a la ferida a través de l'acció de receptors específics d'HA. Hi ha la hipòtesi que els nivells elevats d'HA poden proporcionar un entorn "similar a l'embrionari" que facilita la migració de les cèl·lules tumorals (Knudson, 1996). De fet, s'ha vist com la transfecció estable d'una línia cel·lular de melanoma humà amb el cDNA de la hialuronat sintasa produeix un increment en la capacitat de migrar i la formació d'una matriu pericel·lular rica en HA (Ichikawa et al., 1999).

Per últim, cal dir que l'HA també s'ha vist implicat en l'angiogènesi: en funció del seu pes molecular (PM), l'HA inhibeix o estimula la proliferació de la cèl·lula endotelial (el d'elevat PM i

fragments de 10-15 disacàrids promouen la proliferació de cèl·lules endotelials) (Savani et al., 2001). En un estudi de tumor de pròstata (Simpson et al., 2002), es veié que la presència augmentada d'HA era necessària pel creixement eficient del tumor. La sobreproducció d'HA per les cèl·lules tumorals podia ser requerit pel creixement subcutani eficient degut al seu impacte en l'angiogènesi. Es va concloure que el rol de l'HA en la biologia de les cèl·lules tumorals de pròstata era proliferatiu i angiogènic. Com que aquestes funcions són components del comportament agressiu de les cèl·lules tumorals, no sorprèn que l'HA hagi estat implicat en la tumorigènesi i metastasi. De fet, la sobreproducció d'HA és un factor de diagnòstic o pronòstic per diferents tipus de càncer (Simpson et al., 2002).

La distribució de l'HA en els teixits tumorals, però, no és homogènia ja que s'ha vist l'HA associat, sobretot, a cèl·lules de l'estroma i de la vasculatura tumoral. De fet, s'han vist tipus tumorals *in vivo* amb elevada quantitat d'HA i, en canvi, els resultats *in vitro* són més ambigus. Aquests resultats suggereixen que altres cèl·lules en el tumor, com les cèl·lules de teixit connectiu normal adjacent, poden participar en la síntesi d'HA. Aquest suggeriment està corroborat per molts estudis de la localització histològica de l'HA en els teixits tumorals. Un mecanisme suggerit és que les cèl·lules tumorals invasores, o productes segregats per elles, indueixen una estimulació de la síntesi d'HA per les cèl·lules de l'estroma. Aquesta inducció s'ha vist atribuïda a l'alliberament de factors solubles com el bFGF, la isoforma BB del PDGF o el TGF- β , així com a interaccions que requereixen el contacte directe cèl·lula-cèl·lula. Altres mediadors inflamatoris, tals com IL-1 i TNF- α (citoquines solubles secretades per les cèl·lules mononuclears sanguínies o macròfags), també tenen potencial per incrementar la producció d'HA per part dels fibroblasts. L'increment en els nivells d'HA en tumors *in vivo* pot no ser només resultat de l'estimulació de la síntesi d'HA, també el fet que incrementi la cel·lularitat del tumor fa que hi hagi més HA i, a més, el drenatge limfàtic (la ruta fisiològica de neteja de l'HA acumulat en els teixits) acostuma a estar bloquejat en estadis malignes (Knudson, 1996).

L'HA, doncs, contribueix al comportament cel·lular de tres maneres. Les seves propietats físiques úniques influeixen les propietats biomecàniques de les matrius extracel·lulars i pericel·lulars. A més, és un motlle per l'ensamblatge d'altres macromolècules pericel·lulars. I, a més, interactua directament amb receptors de superfície cel·lular, que tradueixen senyals intracel·lulars donant lloc a alteracions en les interaccions del citoesquelet i l'expressió de gens (Toole, 2002). Així, en el cas de la migració, a més de l'efecte hidrodinàmic de l'HA a la matriu extracel·lular, s'ha vist que també juga un rol directe i interactiu mediat pels seus receptors de superfície cel·lular.

- Receptors de l'àcid hialurònic

L'HA exerceix els seus efectes biològics a través de les interaccions amb receptors específics associats a les cèl·lules. Les interaccions de l'HA amb les proteïnes de matriu que uneixen HA i els receptors de superfície cel·lular regulen molts aspectes del comportament cel·lular, com migració, adhesió i diferenciació. Les proteïnes que uneixen HA s'han agrupat com una família anomenada hialadherines (Day i Prestwich, 2002), que inclou les de superfície cel·lular (receptors) (Knudson i Knudson, 1993). La primera hialaderina associada a cèl·lula va ser **RHAMM**, la forma de superfície cel·lular de la qual es designa com CD168. Posteriorment es va identificar el receptor d' HA **CD44**. Els dos fan de mediadors de la senyal de l'HA i participen en la senyal regulada pels factors de creixement, a través de mecanismes diferents (revisat per Turley et al., 2002). S'han identificat altres receptors d'HA com la *metastatina*, la qual és una hialadherina que es troba implicada en la inhibició de tumor i metàstasi (Xu et al., 2003). Recentment s'ha caracteritzat la *IHABP4*, una nova proteïna d'unió a HA intracel·lular, la qual cosa dona la possibilitat que l'HA intracel·lular i les seves proteïnes d'unió puguin jugar un rol important en el comportament cel·lular (Huang et al., 2000). Un altre receptor d'HA que s'ha descrit és la proteïna LYVE-1, un important receptor d'HA dels vasos limfàtics que té un 41 % d'homologia amb CD44. LYVE-1 s'uneix tant a l'HA soluble com a l'immobilitzat (igual que CD44), però LYVE-1 es colocalitza amb l'HA a la llum dels vasos limfàtics i es troba totalment absent dels vasos sanguinis. LYVE-1 és el primer receptor d'HA específic de limfàtics caracteritzat i un marcador molt potent pels vasos limfàtics (Banerji et al., 1999). Els més importants, però, són els dos receptors de superfície cel·lular esmentats anteriorment: CD44 i RHAMM (Savani et al., 2001). **RHAMM** (*receptor for hyaluronan-mediated motility*) és un receptor important perquè funciona primàriament estimulant la resposta locomotora de les cèl·lules tumorals a l'HA soluble (Knudson, 1996). I l'altre receptor és el receptor de superfície cel·lular **CD44**, expressat per moltes cèl·lules neoplàsiques, el qual proveeix un mecanisme a les cèl·lules tumorals per adherir-se directament a l'HA i ser translocades a través de les matrius extracel·lulars riques en HA (revisat per Isacke and Yarwood, 2002).

- CD44

Dins dels canvis moleculars lligats amb la transformació maligne dels melanòcits trobem, entre d'altres, l'expressió alterada de molècules d'adhesió cel·lular, tal com el CD44, que és una proteïna transmembrana tipus I i és membre de la súper família de proteïnes anomenada *Link Module Superfamily*. Aquesta família es va identificar per primer cop en la *link protein* aïllada del cartílag. Les proteïnes d'aquesta família poden estar extensivament glicosilades i, típicament, inclouen addicions de glicosaminoglicans (condroitin, heparan i keratan sulfat) i, per tant,

anomenar-se proteoglicans (Bajorath, 2000). La típica estructura d'aquesta família (*link module*) es troba, en el cas de CD44, en la regió del domini d'unió a HA (Fig. 13) (Day and Prestwich, 2002).

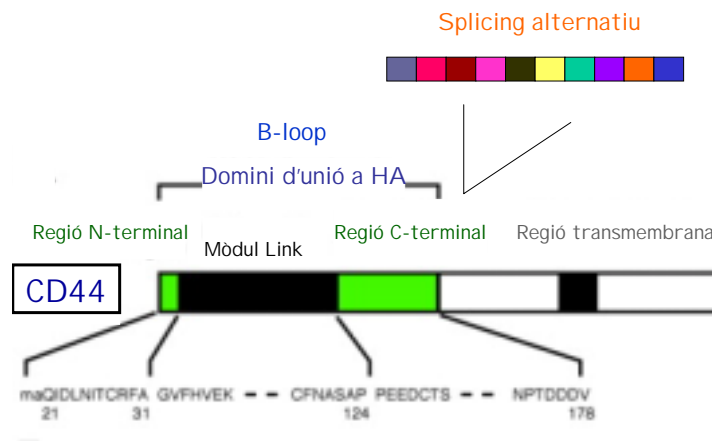


Figura 13. Estructura bàsica del *link module* de CD44. Adaptat de Takeda et al., 2003.

CD44 és el principal receptor de superfície cel·lular per l'àcid hialurònic (HA). És una glicoproteïna el nucli proteic de la qual està composta d'un domini extracel·lular, un de transmembranal i un d'intracel·lular (Goodison et al. 1999; Bajorath, 2000; Turley et al., 2002). El domini extracel·lular s'uneix a l'HA, mentre que el domini citoplasmàtic interacciona selectivament amb proteïnes del citoesquelet com l'anquirina i la família ERM (ezrina-radixina-moesina), i regula senyals específiques a través de múltiples vies, cosa que dona lloc a múltiples funcions com canvis en la proliferació cel·lular, adhesió i migració (Turley et al., 2002).

Hi ha moltes isoformes de CD44, les quals es generen per *splicing* alternatiu d'almenys 10 exons que codifiquen una porció del domini extracel·lular. Els 142 residus amino-terminal del domini extracel·lular formen un *B-loop* que conté les seqüències d'unió a l'HA i són comuns a totes les isoformes de CD44. La resta de la regió extracel·lular, la qual és de longitud i composició variables en funció dels exons que conté, així com del tipus de glicosilació específica, té almenys dues funcions: regular l'habilitat del *B-loop* a unir l'HA (modulant la conformació del receptor) i proveir de llocs d'unió per lligands no relacionats a l'HA. Alguns dels exons variables, com l'exó v3, contenen seqüències que donen lloc a la unió covalent de cadenes de glicosaminoglicans (Yu and Stamenkovic, 1999).

D'entre totes les isoformes de CD44, cal destacar la CD44H, expressada per molts tipus cel·lulars, i que té una elevada afinitat per l'HA, i la CD44E, restringida a algunes cèl·lules

epitelials. Diferents isoformes, com la V6, s'han relacionat a variants metastàtiques de cèl·lules malignes (Koochekpour et al., 1995).

La morfogènesi en condicions fisiològiques i la invasió tumoral en situacions patològiques estan regulades per les adhesions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular. HA i CD44 sovint estan sobreexpressats a llocs de morfogènesi, inflamació i invasió tumoral (Xu and Yu, 2003). El requeriment de la interacció CD44-HA en el desenvolupament de tumors s'ha mostrat mitjançant la supressió de la formació tumoral en presència de CD44 soluble (Ahrens et al., 2001a) o d'anticòs anti-CD44 (Guo et al., 1994). En el cas del melanoma, CD44 ha estat implicat en la migració cel·lular (Faasen et al., 1993; Thomas et al., 1992; Thomas et al., 1993; Knutson et al., 1996; Peck i Isacke, 1996) i en la proliferació *in vitro* (Ahrens et al., 2001b). S'ha vist que l'expressió de CD44 i RHAMM està incrementada durant la progressió del melanoma (Ahrens et al., 2001). CD44 i el seu lligand, l'HA, promouen el creixement i la capacitat metastàtica de les cèl·lules de melanoma *in vitro*, però el seu significat en el melanoma cutani primari encara no està clara.

L'ús de CD44 com a marcador diagnòstic en oncologia humana es va suggerir quan es veié que la seva expressió estava alterada en molts tumors humans. Estudis inicials mostraren que en els teixits tumorals CD44 estava incrementat en relació a l'existent en els corresponents teixits normals (Goodison et al., 1999). La situació *in vivo* en el cas del melanoma és confusa, ja que mentre que s'ha trobat que totes les lesions melanocítiques tenen una expressió forta i uniforme de CD44 (Schaidler et al., 1998), també s'ha vist que la seva expressió disminueix a mesura que incrementa la invasió (Harwood et al., 1996) o es produeix metàstasi (Seelentag et al., 1997) o quan s'associa un mal pronòstic (Karjalainen et al., 2000). També s'ha observat que nivells reduïts de CD44 i HA s'associen amb mal pronòstic en el melanoma cutani d'estadi clínic I (Karjalainen et al., 2000). Per contra, s'ha descrit una elevada expressió de CD44 en pacients amb melanoma associada a un augmentat risc de metàstasi (Dietrich et al., 1997).

Per tant, s'han associat tant alts com baixos nivells d'expressió de CD44 amb el creixement de diferents tumors i pronòstic advers. Així doncs, la regulació del creixement de les cèl·lules tumorals per part del CD44 és molt dependent del *background* cel·lular.

- **Metal·loproteases de matriu i Integrines**

És evident que el recanvi de la MEC és un pas crític en la remodelació tissular que acompanya molts processos fisiològics així com patològics. Hi ha diferents famílies d'enzims que degraden la MEC, de les quals la més extensa són les **metal·loproteases de matriu** (MMPs). Aquesta és una família d'endopeptidases zinc-dependents que estan involucrades en la

degradació de components de la MEC, tant en processos fisiològics com patològics (revisat per Westermarck i Kähäri, 1999; Hofmann et al., 2000c). En adults, podem dir que les MMPs tenen una baixa expressió sota condicions fisiològiques, excepte quan la seva expressió és induïda per la remodelació de la MEC.

Com a mínim s'han caracteritzat 20 MMPs humanes, les quals estan classificades en cinc subgrups diferents: gelatinases, col·lagenases, estromelisinines, MMPs de membrana i altres MMPs (veure Taula 3), en funció de la seva estructura, especificitat de substrat i localització cel·lular (Birkedal-Hansen et al., 1993; Kleiner i Stetler-Stevenson, 1999). La seva acció combinada és capaç de degradar quasi la totalitat dels components macromoleculars de la MEC. L'activitat d'aquests enzims és controlada a diferents nivells biològics, incloent la regulació a nivell transcripcional i l'alliberació de zimògens inactius o proenzims que han de ser activats. En concret, l'equilibri entre les MMPs i els seus inhibidors tissulars específics (TIMPs) és crític en la degradació de la MEC.

TIPUS	ENZIMS	PM (kD)
Col·lagenases	Col·lagenasa-1 (MMP-1)	52/41
	Col·lagenasa-2 (MMP-8)	75/65
	Col·lagenasa-3 (MMP-13)	65/55
Estromelisinines	Estromelisina-1 (MMP-3)	57/45
	Estromelisina-2 (MMP-10)	57/45
	Metal·loelastasa (MMP-12)	53/45,22
	Matrilisina (MMP-7)	28/19
Gelatinases	Gelatinasa-A (MMP-2)	72/67
	Gelatinasa-B (MMP-9)	92/84
<i>Membrane-type MMPs</i>	MT1-MMP (MMP-14)	66
	MT2-MMP (MMP-15)	
	MT3-MMP (MMP-16)	
	MT4-MMP (MMP-17)	
Altres MMPs	Estromelisina-3 (MMP-11)	55/28
	MMP-19	57
	Enamelisina (MMP-20)	

Taula 3. Classificació de les MMPs humanes. Adaptat de Westermarck i Kähäri, 1999.

Els principals enzims que degraden la MEC són la MMP-2 i la MT1-MMP. La MMP-2 (72 kDa gelatinasa o gelatinasa A) és ubíqua en la seva distribució i és expressada per una gran varietat de cèl·lules normals i transformades (Birkedal-Hansen et al., 1993). La seva expressió incrementada, junt amb la de MMP-1 i MMP-9 (92 kDa gelatinasa o gelatinasa B), s'ha relacionat amb fenotip invasiu (Montgomery et al., 1994; revisat per Hofmann et al., 2000c), en particular la presència de MMP-2 activa funcionalment i la seva expressió incrementada s'ha associat amb la progressió de melanoma humà.

Es creu que aquesta MMP-2 és important en el procés metastàtic gràcies a la seva capacitat de degradar la membrana basal, ja que el col·lagen tipus IV n'és un dels principals components i, alhora, és un dels substrats d'aquesta metal·loproteasa. A més del possible rol de determinades MMPs, de forma individual, com a marcadors de la progressió del melanoma, l'expressió de MMP-2 s'ha trobat que es correlaciona amb un pronòstic desfavorable (Väisänen et al., 1998). En altres teixits s'han evidenciat interaccions específiques entre les gelatinases A i B, i alguns CSPGs de matriu extracel·lular. En el cas de la MMP-9, s'ha vist que el 10-15 % del total de proenzim secretat per macròfags està covalentment unit a CSPGs, la qual cosa pot tenir implicacions importants pel transport i regulació de l'activitat de l'enzim (Winberg et al., 2000). Un altre exemple és el cas de CD44, que pot promoure la invasió i disseminació tumoral mitjançant l'ajuda de la localització i retenció de la MMP-9 proteolíticament activa a la superfície de la cèl·lula tumoral (Yu and Stamenkovic, 1999). També s'ha vist que MT3-MMP podria iniciar la seva activitat gelatinolítica en les cèl·lules de melanoma, unint-se a MCSP. Tant MT3-MMP com MCSP són necessaris per la invasió del col·lagen tipus I i la degradació de la gelatina tipus I en una línia cel·lular de melanoma de la fase de creixement vertical (Fig. 14). Els CS podrien mediar l'associació entre els dos cors proteics de la superfície cel·lular. Els autors suggereixen que el CS del PG podrien alterar la localització i/o activitat de la MT3-MMP, però no es pot excloure la contribució del cor proteic de MCSP en la interacció entre MT3-MMP i MCSP. L'elevada expressió de la MT3-MMP podria incrementar la dissolució de les estructures d'adhesió entre els queratinòcits i melanòcits i contribuir a la progressió del tumor en els estadis inicials (Iida et al., 2001). MMP-2 també s'uneix a condroitin sulfats, per tant MCSP podria actuar com a lloc a la superfície cel·lular per MT3-MMP i MMP-2, afavorint l'activació de la proMMP-2. Entendre els mecanismes pels quals els proteoglicans afavoreixen la proteòlisi ajudarà a desenvolupar noves aproximacions per inhibir l'activació de MMP a les cèl·lules de melanoma (Herlyn et al., 2002).

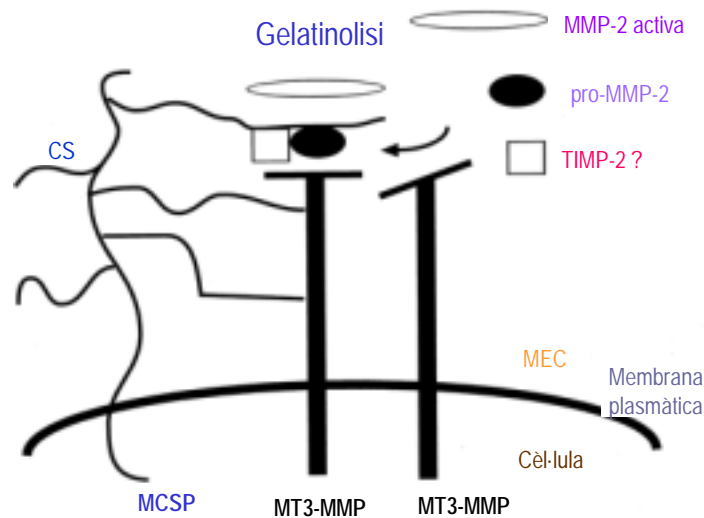


Figura 14. Model de l'activació de MMPs mediada per MCSP en cèl·lules de melanoma. Model de com MCSP podria actuar en l'estimulació de la invasió del melanoma mediada per MT3-MMP. MT3-MMP s'uneix a MCSP via un mecanisme CS-dependent. Es proposa que MCSP pot actuar en l'ensamblatge del complex MT3-MMP, pro-MMP-2 i possiblement TIMP-2 a la superfície cel·lular, amb la conseqüent activació de pro-MMP-2 i l'increment en la invasió tumoral. Adaptat de Herlyn et al., 2002.

Altres exemples de relació de les MMPs amb els proteoglicans serien el cas de la MMP-7 (matrilisina) que està colocalitzada amb proteoglicans tipus heparan sulfat (Yu i Woessner, 2000), i el cas de la metal·loproteasa ADAMTS-1 que és capaç de digerir l'agrecà (Kuno et al., 2000) i la isoforma V1 de versicà, junt amb ADAMTS-4 (Sandy et al., 2001). La MT1-MMP pot actuar com a enzim processador per CD44H, esdeveniment que és crític per l'estimulació de la mobilitat cel·lular, ja que podria permetre a les cèl·lules desadherir-se de la MEC i moure's cap a un altre lloc (Kajita et al., 2001). Molt recentment s'han identificat els llocs de tall de la isoforma CD44H (la isoforma estàndard) per part de la MT1-MMP i també es suggereix que per algun membre de la família ADAMs. Els fragments originats es detectaren en tumors humans i cal estudiar les possibles implicacions biològiques d'aquests diferents fragments (Nakamura et al., 2004). La MT1-MMP i la integrina $\alpha v \beta 3$ estan colocalitzades a la membrana cel·lular de cèl·lules de melanoma, suggerint un rol de la MT1-MMP en activar la unió de la MMP-2 a la integrina (Brooks et al., 1996; revisat per Hofmann et al., 2000). S'ha mostrat com el tractament de cèl·lules de melanoma humà amb un anticòs monoclonal anti-CD44 induïx la regulació de la MMP-2, tant a nivell proteic com de mRNA, que s'associa amb un increment en la migració i invasió (Takahashi et al., 1999).

Un altre exemple és la relació de les MMPs amb HA descrit en cèl·lules tumorals de ratolí, les quals tenen un increment en l'expressió de MMP-9 i MMP-13 després de l'exposició a

fragments petits d'HA (Fieber et al., 2004). Aquesta transcripció de MMP-9 induïda per fragments d'HA és mediada via NF- κ B. Per tant, la degradació d'HA associada a metàstasi en tumors podria promoure la invasió o remodelació de la MEC ja que indueix l'expressió de MMPs. La MMP-9 pot degradar gelatina i el col·lagen tipus IV de membrana basal i també tallar les proformes del TGF- β i IL-1 β (Yu i Stamenkovic, 2000). La MMP-13 també pot digerir la tenascina, el cor proteic de l'agrecà i la fibronectina, així com una àmplia varietat de tipus de col·lagen. Aquestes dades suggereixen que la producció de MMP-9 i MMP-13 en resposta a l'HA fragmentat podria dur a un seguit de conseqüències que són altament rellevants en els processos d'invasió i metàstasi.

Les **integrines** són glicoproteïnes heterodimèriques formades per la unió d'una subunitat α i una β (Fig. 15). Fan de mediadors de les interaccions cèl·lula-matriu extracel·lular i cèl·lula-cèl·lula, importants en processos com la diferenciació cel·lular, la transformació maligna, el reconeixement immunològic i la coagulació sanguínia.

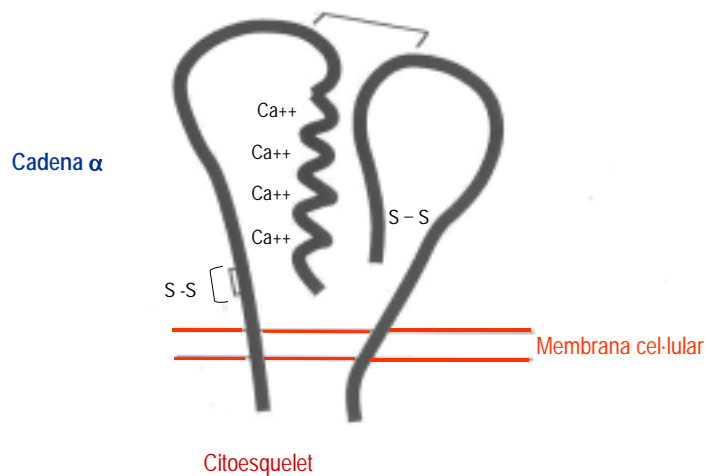


Figura 14. Estructura de les integrines.

El melanoma cutani humà és un atractiu model per a l'estudi del paper de les integrines en la progressió tumoral perquè generalment segueix uns estadis seqüencials definits. A més, el marcador més específic de la transició de les cèl·lules de la fase de creixement radial (més benigne i no metastàtica) a la fase de creixement vertical (maligne i metastàtica) és l'expressió i funció de la integrina α v β 3, sobretot de la subunitat β 3. En la progressió de les cèl·lules de RGP a VGP també incrementa l'expressió de les integrines α 2 β 1, α 3 β 1 i α 4 β 1 (revisat per Meier et al., 1998). Aquesta sobreexpressió d'integrina α v β 3 en l'estadi primerenc del melanoma primari

RGP indueix a la conversió a la fase VGP, presumiblement a través de l'expressió incrementada de MMPs. A més, les dues molècules d'adhesió $\alpha v\beta 3$ i CD44 estan involucrades en el posicionament de les MMPs activades al front d'invasió de les cèl·lules tumorals. Per tant, no només cal la presència de MMPs actives, sinó també la seva correcta localització cel·lular per a l'èxit en la invasió tumoral (Hsu et al., 2002).

Està descrit que l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$ es troba incrementada en cèl·lules endotelials activades respecte a les que estan en repòs (revisat per Piulats i Mitjans, 2000). La MMP-2 pot associar-se a la integrina $\alpha v\beta 3$ a la superfície de les cèl·lules endotelials i, així, promoure la invasió vascular. De fet, s'ha descrit que la MMP-2 no facilita la invasió vascular durant l'angiogènesi si no forma un complexe amb la integrina $\alpha v\beta 3$ a la superfície endotelial (Silletti et al., 2001). Aquests resultats suggereixen que l'expressió coordinada dels dos factors pot ser necessària per la invasió cel·lular del melanoma i la formació de metàstasis (Hofmann et al., 2000a). A més, s'ha vist que l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$ va acompanyada de l'acumulació de MT1-MMP activa i que, per tant, pot estar involucrada en l'activació de la MMP-2 unida a $\alpha v\beta 3$ (Hofmann et al., 2000b).

Altres estudis interessants s'han fet amb la integrina $\alpha 2\beta 1$, que s'ha vist involucrada en la invasió, per part de cèl·lules de melanoma humà, de la membrana basal reconstituïda via un mecanisme dependent del col·lagen tipus IV *in vitro*. Aquesta acció la produeix coordinada amb CD44 i es suggereix que pot col·laborar a promoure l'adhesió cel·lular, migració i invasió de les cèl·lules de melanoma humà (Knutson et al., 1996).

- **Factors de creixement**

Les cèl·lules malignes comparteixen marcadors amb les cèl·lules endotelials, fibroblasts i monòcits, i poden fer funcions diferenciades de cèl·lules de l'estroma. La gran capacitat de les cèl·lules de melanoma per envair òrgans distants i proliferar en un ambient difícil suggereix que les cèl·lules malignes poden interaccionar amb qualsevol estructura. No només digereixen la matriu i hi migren, sinó que, a més, creen un microambient propi amb enzims degradadors de matriu, receptors d'adhesió, receptors de factors de creixement... que tenen fortes activitats biològiques (Herlyn et al., 2002). Per tant, el fenotip agressiu de les cèl·lules de melanoma no s'origina només de les cèl·lules canceroses per elles mateixes sinó que també depèn dels factors de creixement locals, les citoquines, els contactes directes cèl·lula-cèl·lula entre les cèl·lules canceroses i les cèl·lules hostes del voltant. Els factors derivats de les cèl·lules de melanoma, tals com el bFGF (*basic fibroblasts growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), VEGF

(*vascular endothelial growth factor*) i el TGF- β (*transforming growth factor- β*), poden servir com a factors de creixement paracrins, per les cèl·lules de melanoma mateixes, o per estimular la col·laboració dels fibroblasts i les cèl·lules endotelials. Els fibroblasts, per la seva banda, elaboren factors de creixement com el VEGF, l'IGF-1 (*insulin-like growth factor*), HGF/SF, bFGF i TGF- β i MEC per sostenir el creixement del tumor. Els efectes paracrins recíprocs creen un cicle de *feedback* positiu mutu entre les cèl·lules de melanoma i l'estroma. A més, les cèl·lules de melanoma aconsegueixen escapar-se de la destrucció immune de l'hoste i, aparentment, és gràcies a la síntesi local d'immunosupressors, tals com el TGF- β i la IL-10 (Hsu et al., 2002).

El factor de transformació beta (TGF- β) és un dels factors més importants en la regulació del creixement cel·lular i del metabolisme de macromolècules de la matriu extracel·lular (MEC). El TGF- β és el prototip d'una superfamília de factors estructuralment relacionats que afecten a la proliferació i diferenciació cel·lulars. S'han descrit diferents funcions biològiques pel TGF- β que depenen del tipus cel·lular sobre el qual està actuant. Sobre la MEC, el TGF- β és capaç d'induir-ne la producció de varis components i també de TIMPs, inhibidors de la seva degradació. S'han descrit efectes inductors del TGF- β sobre la producció de proteoglicans de la matriu extracel·lular com decorina, biglicà, versicà (Bassols i Massagué, 1988; Breuer et al., 1990; Romaris et al., 1991; Schönherr et al., 1993) i el proteoglicà CD44 a cèl·lules de melanoma de rata (Faassen et al., 1993) o en fibroblasts humans (Romaris et al., 1995). S'ha descrit que l'increment de versicà durant l'aterogènesi pot ser, al menys parcialment, mediat pel TGF- β 1 (Schönherr et al., 1991). També el TGF- β induïx l'aparició de mel-CSPG en el medi en cèl·lules de melanoma humana (Heredia et al., 1996a; 1996b). A part d'induir la síntesi de proteoglicans, també ho fa de molècules com la fibronectina, col·làgens i integrines (Massagué, 1998). En conjunt, l'efecte del TGF- β és el de produir un increment en la MEC.

Per últim, cal dir que les cèl·lules de melanoma expressen també una varietat de receptors de factors de creixement, entre els quals trobem descrits el receptor de TGF- β , el d'IGF-1 i el d'HGF. Aquests factors de creixement poden actuar en una estimulació autocrina i paracrina de les cèl·lules de l'estroma. Alguns d'aquests factors de creixement i receptors poden ser possibles marcadors de progressió: en el cas del TGF- β , s'ha descrit que incrementa en la transició de la fase radial (RGP) a la fase vertical (VFP) (revisat per Meier et al., 1998). També s'ha vist una correlació de l'expressió d'IGF-1 amb diferents estadis de desenvolupament de lesions melanocítiques. Remarcablement, l'expressió incrementada de TGF- β i IGF-1 i el receptor d'EGF (*epidermal growth factor*) sembla correlacionar-se amb la profunditat d'invasió i una freqüència superior de metàstasis en el melanoma maligne (revisat per Slominski et al.,

1998). En el cas de l'HGF, s'ha descrit que és un mitogen de melanòcits humans i, recentment, s'ha vist implicat com un factor important pel desenvolupament i disseminació de melanomes i, per tant, pot jugar un rol en el procés de transformació (Rusciano et al., 1998; Hamoen, et al., 2001).

Resultats

1.- PRODUCCIÓ DE PROTEOGLICANS EN TRES LÍNIES DE MELANOMA CANÍ. EFECTE DEL TGF- β , IGF-1 I HGF

ANTECEDENTS

La MEC juga un paper important en la regulació de processos complexos com la proliferació, adhesió i migració cel·lulars, tots ells involucrats en la progressió tumoral. La producció alterada de proteoglicans s'ha descrit en tumors i cèl·lules transformades i es creu que contribueixen a la producció d'una MEC anòmala. Varis CSPG s'han identificat en les cèl·lules de melanoma, i s'ha proposat que són reguladors essencials en l'adhesió, proliferació i migració cel·lulars. Les hormones i els factors de creixement, com el TGF- β , poden modular la síntesi de PG.

Recentment el nostre grup de recerca ha descrit que les cèl·lules de melanoma humà i els melanomes malignes *in vivo* produeixen versicà, un CSPG d'elevat pes molecular, cosa que es relaciona amb canvis en les propietats biològiques de les cèl·lules com una disminució en l'adhesió i un increment de la seva capacitat per a metastatitzar (Touab et al., 2002).

Els resultats descrits en aquesta secció responen a l'objectiu d'analitzar la producció de PG extracel·lulars en 3 línies de melanoma caní a través de la comparació amb els PG extracel·lulars produïts per les línies de melanoma humà. També s'han estudiat els efectes del TGF- β 1, IGF-I i HGF sobre la producció d'aquests PG.

Article: "Effect of transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-I, and hepatocyte growth factor on proteoglycan production and regulation in canine melanoma cell lines"

Montserrat Serra, Josep Pastor, Clelia Domenzain and Anna Bassols

American Journal of Veterinary Research (2002) 63: 1151-1158

AJVR—01-11-0312R—Serra—7Figs—0Tab—klg—cas

Effect of transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-I, and hepatocyte growth factor on proteoglycan production and regulation in canine melanoma cell lines

Montserrat Serra, DVM; Josep Pastor, DVM, PhD; Clelia Domenzain, MS; Anna Bassols, PhD

Objective—To identify extracellular proteoglycans produced by canine melanoma cell lines and analyze the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and hepatocyte growth factor (HGF) on these proteoglycans.

Sample population—3 canine melanoma cell lines (ie, CML-1, CML-6M, and CML-10c2).

Procedure—Extracellular proteoglycans were analyzed by use of metabolic labeling and western immunoblot analysis. The effect of TGF- β 1 on cell proliferation was determined by incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine.

Results—The CML-1 and CML-6M melanoma cell lines produced 2 main extracellular proteoglycans. One of them was identified as versican, a proteoglycan found in undifferentiated human melanoma cell lines. The CML-10c2 cells produced a small amount of extracellular proteoglycans. Addition of TGF- β 1 (1.25 to 6.25 ng/ml) increased the release of sulfated proteoglycans into the medium. The TGF- β 1 had mainly a posttranslational effect, because it increased the molecular mass of the sulfated bands. Addition of IGF-I (50 ng/ml) slightly increased production of proteoglycans in the CML-6M cell line, whereas HGF (50 ng/ml) did not have any effect on proteoglycan production.

Conclusions and Clinical Relevance—The proteoglycan content and response to TGF- β 1 treatment for CML-1 and CML-6M canine melanoma cell lines are similar to that for undifferentiated human melanoma cell lines. In contrast, CML-10c2 cells produced a low amount of proteoglycans with high molecular weight. Because these extracellular proteoglycans are involved in the control of cell adhesion, proliferation, and migration, they may play an important role in the progression of melanomas in dogs. (*Am J Vet Res* 2002;63:xxx-xxx)

of tumors involves a series of events, including adhesion and migration of tumor cells. Many steps in metastasis of melanomas involve cell-cell or cell-matrix interactions.¹ Therefore, surface molecules that mediate these processes play an important role in regulating dissemination of melanomas, and their degree of expression may alter during the course of tumor progression. **Proteoglycans (PG)** are major components of the ECM, and they play a fundamental role in maintenance of the structure and function of the ECM.^{2,3}

Proteoglycans are glycoproteins bearing sulfated polysaccharide chains with repeating disaccharide units termed **glycosaminoglycans (GAG)**. They are mainly found in the cell surface, within basement membranes, and in the ECM. Composition of the GAG chain differs among PG. This differing composition is the basis for classification of GAG into 4 large families: heparan sulfate and heparin, chondroitin sulfate and dermatan sulfate, keratan sulfate, and hyaluronic acid. The basic structures of these GAG have been summarized elsewhere.^{2,4,5} Heparan sulfate PG and **chondroitin sulfate PG (CSPG)** have been implicated in the control of cell proliferation, differentiation, and modulation of cell adhesion.^{6,7} Altered PG have been described in tumors and transformed cells and are believed to contribute to the abnormal assembly of the ECM in those cells.⁸⁻¹¹

Several CSPG have been identified in melanoma cells, and it has been proposed that they are essential regulators of cell adhesion, proliferation, and migration. Our research group has described finding versican, a PG with a large molecular weight, in human melanoma cell lines and in malignant melanomas in vivo and has related the production of versican by melanoma cells to a change in the biological properties that would decrease adherence of these cells to a tumor and increase their ability to metastasize.¹² Versican belongs to the family of large aggregating PG that also includes aggrecan, the large cartilage-derived PG, and 2 smaller PG expressed in nervous tissues (ie, neurocan and brevican). These PG have 3 structural domains. The N-terminal domain binds hyaluronate, the central domain carries the GAG side chains, and the C-terminal region may interact with simple carbohydrates and GAG and probably with other matrix proteins.³ The central domain of versican consists of 2 large subdomains, designated GAG- α and GAG- β , that are encoded by 2 alternatively spliced exons. There are 4 possible spliced variants of mammalian versican. The largest variant contains GAG- α and GAG- β and is des-

The extracellular matrix (ECM) plays an important role in the regulation of complex processes such as cell proliferation, adhesion, and migration. Metastasis

Received Nov 5, 2001.

Accepted Mar 1, 2002.

From the Departaments de Bioquímica i Biologia Molecular (Serra, Domenzain, Bassols) and Medicina i Cirurgia Animals (Pastor), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

Supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant No. 00/1016) and the Generalitat de Catalunya (grant No. 1999SGR/0100). Dr. Serra and Ms. Domenzain were supported by a fellowship from the Generalitat de Catalunya.

The authors thank Anna Vilalta for technical assistance.

Address correspondence to Dr. Bassols.

ignated V0; the other variants are V1 (contains only GAG- β), V2 (contains only GAG- α), and V3 (lacks both GAG subdomains).¹³ Other CSPG in human melanoma cells are melanoma-specific PG (ie, mel-CSPG)¹⁴⁻¹⁶ and the hyaluronate receptor (ie, CD44).^{17,18}

Hormones and growth factors can modulate the synthesis of PG. Among these agents, **transforming growth factor- β** (TGF- β) is 1 of the most powerful. Transforming growth factor- β is able to induce PG as well as other components of the ECM such as fibronectin, collagens, and integrins.¹⁹ Furthermore, TGF- β affects the PG components of the ECM in diverse ways, depending on the target cell and the type of PG. It is able to induce the production of biglycan, versican, and perlecan at the transcriptional level in some cell types, but it does not affect or may down-regulate the synthesis of the decorin core protein. In addition, TGF- β can have an effect at the posttranslational level, increasing the length or total mass of the chondroitin sulfate chains in biglycan, decorin, versican, syndecan, and CD44; however, TGF- β does not affect heparan sulfate chains.²⁰⁻²⁶

In human melanoma cells, TGF- β 1 is able to induce the synthesis of extracellular PG, including mel-CSPG, at the posttranslational level as a result of increases in the size of the GAG chains.²⁷ The effect of TGF- β 1 is related to the degree of cell differentiation, because the effect on PG release and changes in disaccharide composition and sulfation of GAG chains are more pronounced in undifferentiated cell lines, whereas it does not have an effect in differentiated cells.²⁸

The objective of the study reported here was to analyze the extracellular PG produced by 3 canine melanoma cell lines through comparison with extracellular PG produced by human melanoma cell lines. We also intended to study the effects of TGF- β 1, insulin-like growth factor I (IGF-I), and hepatocyte growth factor (HGF) on production of these PG.

Materials and Methods

Cell cultures—Several cell lines were used in the study. Canine melanoma cell lines CML-1, CML-6M, and CML-10c2² were originally derived from melanoma tumors of dogs.²⁹ Human U251 astrocytoma cells and human melanoma SK-mel-131 (cl 1.36-1-5) and SK-mel-23 cell lines^b were originally derived from melanoma tumors of humans.³⁰

Cells were grown in a humidified atmosphere at 37 C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium^c supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U of penicillin/ml, and 100 μ g of streptomycin/ml. Subconfluent cultures were grown in serum-free medium for 4 hours. Cells then were labeled by incubation for 24 hours with carrier-free [³⁵S]sulfate^d (100 μ Ci/ml) or L-[³⁵S]methionine^e (25 μ Ci/ml). Medium was removed, and a cocktail of protease inhibitors was added (10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 5 mM N-ethylmaleimide, and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride). The product was analyzed by use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 6% or a 3 to 10% gradient polyacrylamide gel,³¹ which was followed by fluorography.

In the case of treatment with growth factors, subconfluent cultures were grown in serum-free medium for 4 hours, and cells then were labeled as described previously, using

concentrations of TGF- β 1^f (range, 1.25 to 6.25 ng/ml), IGF-I^g (50 ng/ml), or HGF^h (50 ng/ml) for 24 hours. The 3 factors were of human origin. Radioactivity in the polyacrylamide gels was analyzed by use of a phosphor imaging system,ⁱ and densitometry was performed by use of image analysis software.^j Statistical analysis was performed by use of an ANOVA, using a statistical software program.^k

Cell proliferation assay—Cells were plated in 96-well tissue culture plates and grown for 48 hours to 50% confluency in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells then were incubated for 4 hours in serum-free medium. Medium was changed again, TGF- β 1 at various concentrations was added to the wells, and the plates were incubated for another 24 hours. Cell proliferation was measured by incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine, using a commercially available kit^l in accordance with the manufacturer's instructions. The response to TGF- β 1 was compared with that of the Mv1Lu mink lung epithelial cell line^m; growth of the mink lung epithelial cell line is strongly inhibited by TGF- β 1.

Enzymatic digestions—Enzymatic digestions were performed at 37 C for 16 hours by use of chondroitinase ABCⁿ (50 mU/ml in a solution of 33 mM sodium acetate and 33 mM Tris-HCl; pH 8.0) or heparitinase^o (10 mU/ml in a solution of 10 mM calcium acetate and 100 mM sodium acetate; pH 7.0). Incubations were terminated by boiling the samples for 5 minutes.

Western blot analysis—Aliquots of conditioned media were digested with chondroitinase ABC as described previously and analyzed in a 3 to 10% gel, using reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes.^p Membranes were placed in a blocking solution consisting of 5% skim milk in Tris buffer saline (TBS)-0.05% Tween 20 and incubated for 1 hour at 25 C. After blocking, membranes were incubated with a polyclonal antibody against versican raised in our laboratory¹² and with monoclonal antibody B5 raised against human mel-CSPG^b in 5% skim milk in TBS for 16 hours, washed, and developed by use of chemiluminescence.^q The antibody against versican recognizes the protein core of the molecule, but it is unable to detect the entire PG. The monoclonal antibody B5 against mel-CSPG also recognizes an epitope in the protein core of the mel-CSPG molecule.³²

Results

Molecular analysis of extracellular PG from canine melanoma cell lines—Newly synthesized PG were metabolically labeled with [³⁵S]sulfate and analyzed by use of gel electrophoresis. The CML-1 and CML-6M cells produced 2 high-molecular-weight PG as the main sulfated extracellular molecules; 1 of them remained at the entrance of the gel, and the other migrated to a location above the 200-kd marker (Fig 1). A third band of lesser intensity and lower molecular mass was also visible for CML-1 and CML-6M cells. Sulfated bands for the CML-1 cells appeared to have a higher molecular mass than corresponding bands for the CML-6M cells. The 3 bands were characterized as CSPG on the basis of results of enzyme digestion, because they were completely degraded after treatment with chondroitinase ABC, whereas they were not affected by heparitinase. The CML-10c2 cells yielded extremely small amounts of sulfated molecules into the extracellular medium.

Western blot analysis of PG produced by canine

melanoma cell lines revealed 2 bands that were recognized by the antiversican antibody (Fig 2). Metabolic labeling experiments revealed that CML-1 and CML-6M cells produced versican, most probably the V0 and V1 isoforms. In contrast, CML-10c2 did not produce any versican isoform. In this aspect, it was similar to the differentiated human SK-mel-23 cell line. A third band recognized by the antibody was evident in canine

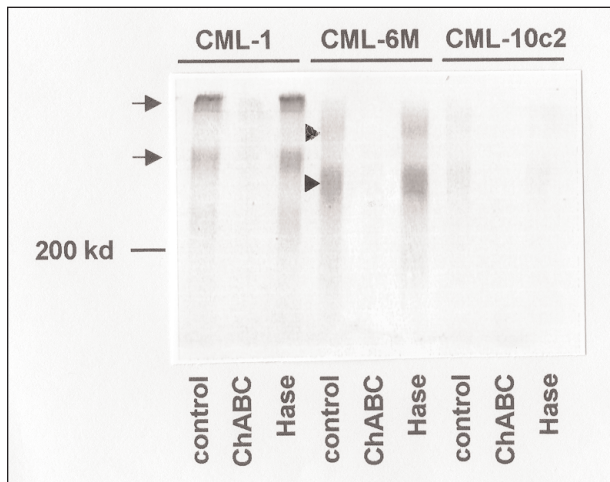


Figure 1—Representative fluorogram revealing proteoglycan (PG) production by canine melanoma cell lines. Subconfluent canine melanoma cell lines (CML-1, CML-6M, and CML-10c2) were metabolically labeled with [³⁵S]sulfate. The conditioned media were used without (control) or with chondroitinase ABC (ChABC) or heparitinase (Hase). Medium corresponding to the same number of cells was analyzed by use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 3 to 10% gel followed by fluorography. Bands of high-molecular-weight PG were evident for CML-1 (arrows) and CML-6M (arrowheads) cells. The experiment was performed 4 times with similar results.

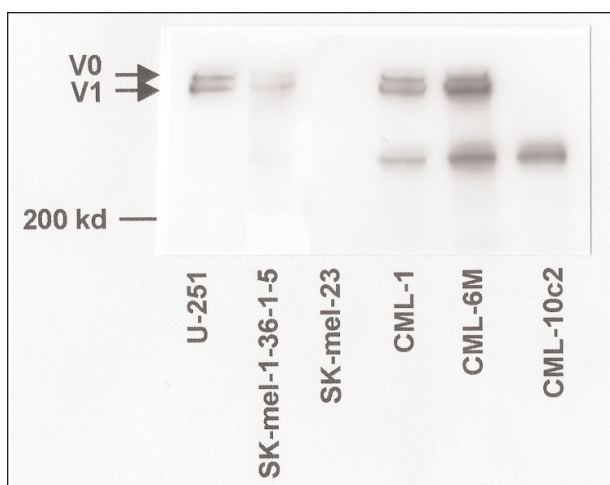


Figure 2—Representative western blot revealing immunologic identification of versican in conditioned medium from cultured canine melanoma cell lines. Conditioned media from subconfluent cultures representing a human astrocytoma cell line (U251), human melanoma cell lines (SK-mel-1.36-1-5 and SK-mel-23), and canine melanoma cell lines (CML-1, CML-6M, and CML-10c2) were treated with chondroitinase ABC and analyzed by use of western blots, using a polyclonal antibody against versican. Two bands corresponding to the V0 and V1 isoforms of versican were identified (arrows). The experiment was performed 3 times with similar results.

melanoma cell lines but not in human cells. Although it was not identified, its molecular weight did not correspond to any versican isoform.

We also tested for melanoma-specific PG (ie, mel-CSPG) by use of western blot analysis with monoclonal antibody B5 raised against human mel-CSPG. We did not identify any bands, probably because of the lack of cross-reactivity of the antibody against the canine molecule.

Effect of TGF- β 1, IGF-1, and HGF on PG production by canine melanoma cell lines—Addition of TGF- β 1 to culture medium increased the release of PG into the extracellular medium for the CML-1 and CML-6M cells (Fig 3). In this case, the stacking gel was used to characterize versican. Use of TGF- β 1 had a double effect, because it increased the intensity of the sulfated bands and also decreased the mobility of the bands through the gel, indicating that the PG molecules had an increase in molecular mass. This increase in molecular mass was more noticeable in the lower molecular weight band, but this possibly was attributable to the fact that it is easier to see a change in this area of the gel. The effect was evident even at 1.25 ng/ml (ie, 50 pM), the lowest TGF- β 1 concentration assayed. The effect was maximal at 2.5 ng/ml and slightly decreased at 6.25 ng/ml. The increase in intensity produced by 2.5 ng of TGF- β 1/ml was calculated by use of densitometry as 1.9-fold for versican and 1.8-fold for the low-molecular-weight band for the CML-1 cells and 4.5-fold for versican and 2.9-fold for the low-molecular-weight band for the CML-6M cells.

Relative intensities of both bands in the 2 cell lines differed significantly ($P = 0.006$). On the contrary, there was not a significant effect of TGF- β 1 on PG production by the CML-10c2 cells.

To ascertain whether the increase in band intensity provoked by TGF- β 1 was attributable to an increase in the protein core, CML-1 cells were metabolically labeled with [³⁵S]methionine and treated with TGF- β 1. Conditioned media were digested with chondroitinase

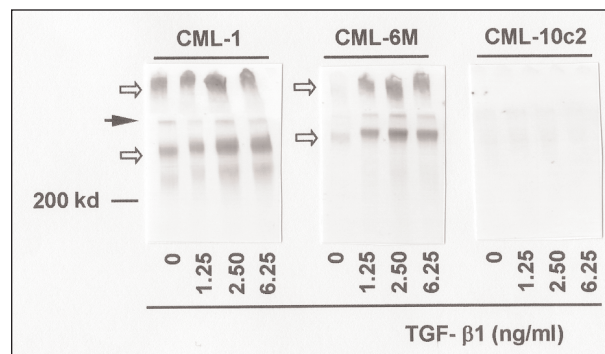


Figure 3—Representative fluorogram revealing the effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on the extracellular PG produced by canine melanoma cell lines. Subconfluent CML-1, CML-6M, and CML-10c2 cells were labeled with [³⁵S]sulfate with various concentrations of TGF- β 1. The conditioned media corresponding to the same number of cells was analyzed by use of SDS-PAGE in a 3 to 10% gel followed by fluorography. Notice the main PG bands (open arrows). The top of the running gel is indicated (solid arrow). The experiment was performed 3 times with similar results.

ABC to degrade chondroitin sulfate chains, and the protein core from versican (V0 and V1 isoforms) was determined after SDS-PAGE and fluorography (Fig 4). There was not a significant difference in the amount of protein core after treatment with TGF- β 1, indicating that the increase in intensity was probably the result of an increase in the GAG chains, at least in the case of versican. This fact also indicated that the action of

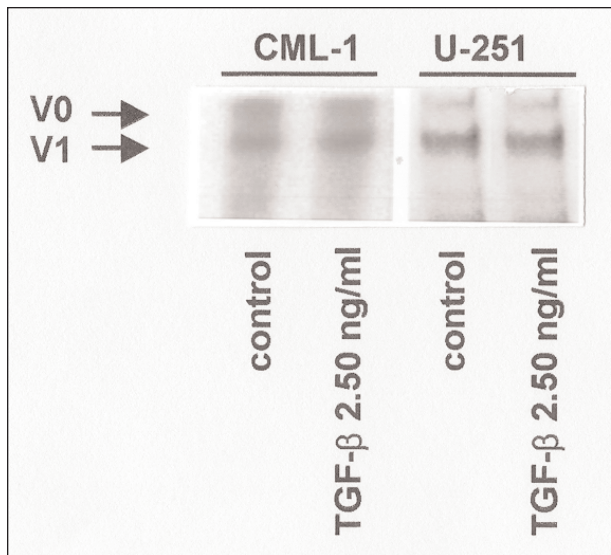


Figure 4—Representative fluorogram revealing the effect of TGF- β 1 on the core protein of versican from CML-1 cells. Conditioned media from control and TGF- β 1-treated CML-1 cells labeled with [35 S]methionine were digested by use of chondroitinase ABC and analyzed by SDS-PAGE in a 3 to 10% gel followed by fluorography. Notice the 2 bands corresponding to the V0 and V1 isoforms of versican (arrows). Cells of a human astrocytoma cell line (U251) were treated in an identical manner and served as an internal control sample. The experiment was performed 3 times with similar results.

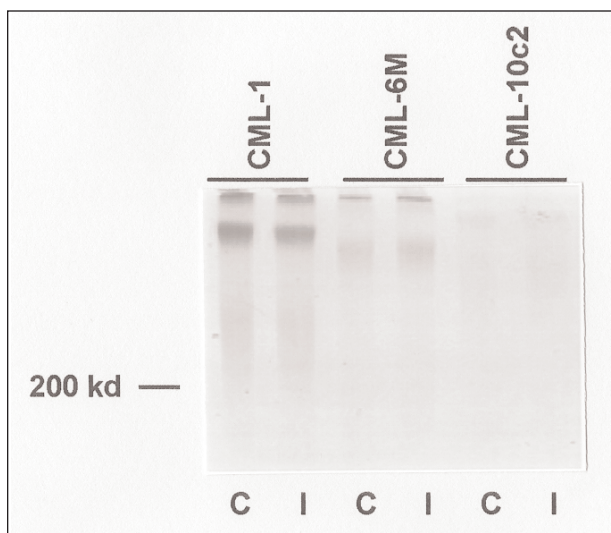


Figure 5—Representative fluorogram revealing the effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on extracellular PG produced by canine melanoma cell lines. Subconfluent CML-1, CML-6M, and CML-10c2 cells were labeled with [35 S]sulfate with (I) or without (C) 50 ng of IGF-I/ml. The conditioned media corresponding to the same number of cells was analyzed by use of SDS-PAGE in a 3 to 10% gel followed by fluorography. The experiment was performed 3 times with similar results.

TGF- β 1 was not attributable to a general effect on protein synthesis.

The 3 canine melanoma cell lines were treated with IGF-I and HGF and simultaneously labeled with [35 S]sulfate. The IGF-I had a slight but significant stimulatory effect on the 3 cell lines (CML-1, 1.03-fold for versican and 1.32-fold for the low-molecular-weight band; CML-6M, 1.09-fold for versican and 1.32-fold

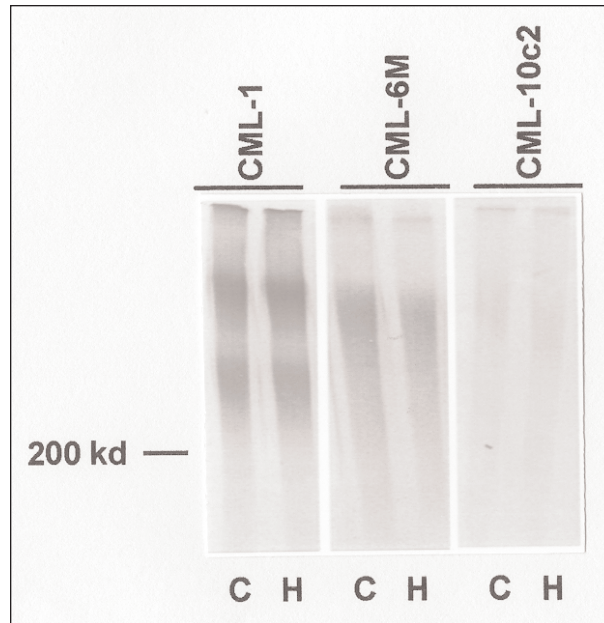


Figure 6—Representative fluorogram revealing the effect of hepatocyte growth factor (HGF) on extracellular PG produced by canine melanoma cell lines. Subconfluent CML-1, CML-6M, and CML-10c2 cells were labeled with [35 S] sulfate with (H) or without (C) 50 ng of HGF/ml. The conditioned media corresponding to the same number of cells was analyzed by use of SDS-PAGE in a 3 to 10% gel followed by fluorography. The experiment was performed 3 times with similar results.

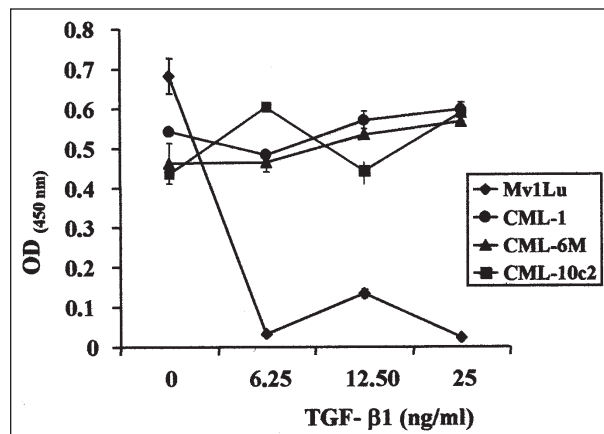


Figure 7—Representative graph depicting the effect of TGF- β 1 on the proliferation of canine melanoma cell lines. Cells of CML-1, CML-6M, and CML-10c2 and mink lung epithelial (Mv1Lu) cells were seeded in 96-well tissue culture plates containing serum-free medium. Various concentrations of TGF- β 1 were added, and plates were incubated for 24 hours. Cell proliferation was evaluated by determining the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine. Values reported are mean \pm SEM of triplicate determinations. The experiment was performed 4 times with similar results. OD_{450nm} = Optical density measured at a wavelength of 450 nm.

for the low-molecular-weight band; CML-10c2, 1.23-fold for versican and 1.29-fold for the low-molecular-weight band; Fig 5 and 6). This increase was not attributable to an increase in cell number, because IGF-I did not alter the number of cells in these conditions (data not shown). Treatment with HGF did not have any effect on PG production in any of the 3 canine melanoma cell lines.

Effect of TGF- β 1 on proliferation of canine melanoma cell lines—The effect of TGF- β 1 on cell proliferation was analyzed in all 3 canine melanoma cell lines and in Mv1Lu cells, which were used as a control population. The TGF- β 1 potently inhibited the growth of Mv1Lu cells, as expected, whereas none of the canine melanoma cell lines was significantly affected by TGF- β 1 treatment (Fig 7). Total number of cells was not altered after TGF- β 1 treatment for the same conditions (data not shown), which indicated that TGF- β 1 did not affect proliferation or apoptosis in these canine melanoma cell lines.

Discussion

Several CSPG have been involved in melanoma cell behavior, and it has been proposed that they are essential regulators of cell adhesion, proliferation, and migration. Versican has been identified in human melanoma cell lines and in malignant melanomas, and it is able to decrease cell adhesion and increase cell proliferation in human melanomas.¹² Versican is also produced by a number of malignant conditions in humans such as histiocytoma,³³ breast cancer,³⁴ prostate cancer,³⁵ and some nonepithelial neoplasms.³⁶ The results reported here indicated that versican is also produced by canine melanoma cell lines.

In the study reported here, we found that some canine melanoma cell lines produced versican (CML-1 and CML-6M), whereas other cell lines did not produce this PG (CML-10c2). In the case of human cells, the expression of versican has a close relationship to the degree of cell differentiation, because it is expressed in undifferentiated cell lines but is not detected in differentiated cell lines. It is tempting to speculate that the CML-10c2 cell line represents a more differentiated phenotype of melanoma cells. Nevertheless, we do not have sufficient data to confirm this assertion, and a more detailed molecular characterization of these cell lines must be performed. The versican isoforms produced by the CML-1 and CML-6M cells were the V0 and V1 isoforms, similar to the isoforms produced by human melanoma cell lines¹² and several types of brain tumors in humans.³⁷ We did not detect indications of a possible differential role of versican isoforms, although it is feasible that the difference in size of the GAG domain (V0 > V1 > V2 and totally lacking in V3) could modulate the biological and binding properties of versican. Such modulation has been suggested for the nervous system, where versican is able to inhibit axonal growth.³⁸

Versican probably has a role in biological functions of melanoma cells. Purified versican is able to increase the proliferation rate of undifferentiated human melanoma cells.¹² Other *in vitro* results also support a

role for versican in cell proliferation, because cells transfected with a minigene containing the terminal domains of versican grow more rapidly.^{39,40} Furthermore, versican is up-regulated in keratinocytes grown in proliferation-promoting conditions, whereas versican is down-regulated in culture conditions promoting keratinocyte differentiation.⁴¹ *In vivo*, versican is abundant throughout the entire dermis early during the fetal period in humans, a period in which proliferation occurs at a high rate; however, versican disappears progressively from the lower half of the dermis during the fetal period.⁴²

In addition to increasing cell proliferation, versican has an antiadhesive effect, similar to that of many CSPG, probably as a result of the chondroitin sulfate chains.⁴³ We have documented that versican is an antiadhesive substrate for human melanoma cells grown in various ECM components such as fibronectin and collagen I.¹² Versican is excluded from focal contacts of cultured fibroblasts, suggesting that it could inhibit cell adhesion by repressing formation of focal contacts.⁴¹ The detection of versican correlates with the production of hyaluronate in melanomas.^{44,45} Because versican and hyaluronate interact through the N-terminal domain of versican, they could create versican-hyaluronate-rich matrices that would form an expanded and hydrophilic environment deforming the normally compact architecture of ECM and facilitating cell movement. These molecular changes in the ECM could then contribute to the higher mobility of undifferentiated melanoma cells and the increased ability to migrate and develop metastatic lesions.

The other extracellular PG identified in melanomas of humans is melanoma-specific PG (ie, mel-CSPG). This membrane CSPG consists of a 250-kd glycoprotein core with several GAG chains that make up a complete PG of 400 to 1,000 kd.¹⁶ It is released into the medium as a result of proteolytic cleavage of membrane forms.^{27,46} Furthermore, mel-CSPG supposedly has several important roles in regulating melanoma cell adhesion, proliferation, and migration.⁴⁷⁻⁵⁰ The CML-1 and CML-6M cells produced versican and another CSPG of high molecular mass (approx 400 kd), which possibly corresponds to the canine version of mel-CSPG. Unfortunately, the antibody against human mel-CSPG (ie, monoclonal antibody B5) did not recognize any band for the canine melanoma cells, probably indicating a lack of cross-reactivity between the molecules of these 2 species.

Although CML-1 and CML-6M cells produced a similar set of extracellular PG, a general difference was observed in the molecular mass of these molecules, because all of them had a higher molecular mass for CML-1 than for CML-6M. This probably was attributable to a difference in the length or number of GAG chains, at least in the case of versican, because the protein core is the same for both cell lines. The CML-1 and CML-6M cells also appeared to have differing relative amounts of PG, and these differences could have a role in the particular behavior of these melanoma cell lines.

Melanoma cells produce a large number of growth factors and cytokines that enable them to grow autonomously and confer competence to enable them

to metastasize.³¹ On the other hand, the structure and composition of PG, as well as other components of the ECM, are under the control of growth and differentiation factors. Transforming growth factor- β 1 exerts a negative influence on cell proliferation of normal melanocytes, but advanced-stage melanoma cells become resistant to the antiproliferative effect of TGF- β 1.³² The canine melanoma cell lines examined in the study reported here were not susceptible to the growth-inhibitory properties of TGF- β 1, although they were still able to respond to TGF- β 1 treatment. This fact indicates that these canine melanoma cells do express functional TGF- β receptors, similar to the situation described for human cells.^{31,32} It is recognized that unresponsiveness to TGF- β may be heterogeneous in terms of its biological effects and that several mechanisms may cause this phenomenon. For example, lack of expression of the gene coding for the receptor (mostly the TGF β R2 gene) as a result of genetic or epigenetic events can be the cause of unresponsiveness, although many times tumor cells appear to express functional receptors.³³ This is the case for canine melanoma cells, because they still respond to TGF- β 1 by producing increasing amounts of PG. A mutation in a component of the signal transduction machinery or in the transcriptional machinery of the cells could be the cause of this differential effect of TGF- β 1. In this sense, lack of p15 or overexpression of c-Myc renders the cells resistant to the growth inhibitory activity of TGF- β .³⁴ Clearly, additional studies should be conducted to clarify this issue in canine melanoma cells.

In addition to its effects on cell proliferation, TGF- β is unique because of its potency as an inducer of PG and other ECM molecules. This potent effect has been associated with the ability of TGF- β to influence cell growth and differentiation.¹⁹ In the case of CML-1 and CML-6M cells, TGF- β 1 induces the production of extracellular CSPG, versican, and, probably, mel-CSPG, similar to its effects in undifferentiated human melanoma cell lines.^{27,28} This induction is observed as an increase in the intensity of the sulfated band as well as in the molecular mass of the molecule, and it is probably the result of an increase in the length or number of GAG chains, at least for CML-1 cells, because it does not affect the amount of the protein core after metabolic labeling with [³⁵S]methionine. Increased amounts of secreted PG are not attributable to an increase in cell number, because TGF- β 1 does not have any effect on proliferation of canine melanoma cells. This result is not unexpected, because the effects of TGF- β primarily vary with the target cell and type of PG. Thus, it could affect posttranslational processing of GAG chains by increasing the length or varying the disaccharide composition and degree of sulfation of the GAG chains, or it could affect transcription of the core protein.²⁰⁻²⁶

In addition to TGF- β 1, we analyzed the effects of IGF-I and HGF on PG production. Both growth factors are active on melanocyte or melanoma cells. Thus, IGF-I is an essential mitogen for normal melanocytes, nevus cells, and early primary melanoma cells in vitro, and it is chemotactic for melanoma cells.^{51,55-57} On the other hand, HGF is a mitogen for human melanocytes

and has been implicated as an important factor for the development and dissemination of melanomas.^{58,59} It has been reported⁶⁰⁻⁶² that IGF-I is able to induce PG synthesis in several cell types, but it has only a slight stimulatory effect on CML-6M cells. Hepatocyte growth factor is able to interact with heparan PG and dermatan sulfate PG, which serve as coreceptors, and this interaction is critical for HGF activity.⁶³ Analysis of results of the study reported here indicated that HGF did not have any effect on PG production by canine melanoma cells.

Extracellular PG produced by canine melanoma cell lines such as CML-1 and CML-6M are versican and another CSPG similar to mel-CSPG, and this result is similar to that observed in undifferentiated human melanoma cell lines such as SK-mel-1.36-1-5 or SK-mel-3.44.^{27,28} Transforming growth factor- β 1 increases PG production in the extracellular medium and increases the molecular mass of these macromolecules, similar to the situation in human cells. Furthermore, CML-10c2 had an extremely low amount of high-molecular-weight PG and did not respond to TGF- β 1; in these aspects, it was more similar to the differentiated human melanoma cell line SK-mel-23. Analysis of these results indicated that canine cell lines could be a good cellular system to study the molecular characteristics of melanomas and the role of PG in the tumorigenic process. Furthermore, these findings could have important implications on the identification of malignant phenotypes in canine melanomas.

^aCourtesy of MacEwen EG, Department of Medical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, Wis.

^bCourtesy of Real FX, Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain.

^cRPMI 1640 medium, Gibco BRL/Life Technologies, Rockville, Md.

^dCarrier-free [³⁵S]sulfate, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

^ePromix, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

^fTransforming growth factor- β 1, Collaborative Research, Bedford, Mass.

^gInsulin-like growth factor I, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo.

^hHepatocyte growth factor, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo.

ⁱFujiX BAS1000, Fujifilm Medical Systems Inc, Tokyo, Japan.

^jPC-BAS image analysis software, Fujifilm Medical Systems Inc, Tokyo, Japan.

^kSAS, version 8.0, SAS Institute Inc, Cary, NC.

^lCell proliferation ELISA BrdU colorimetric assay, Roche, Indianapolis, Ind.

^mCourtesy of Ventura F, Facultat de Medicina, Hospital de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Spain.

ⁿChondroitinase ABC, Seikagaku Corp, Tokyo, Japan.

^oHeparitinase, Seikagaku Corp, Tokyo, Japan.

^pImmobilon-P, Millipore Corp, Bedford, Mass.

^qECL System, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.

References

1. Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, et al. Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* 1998;3: D1005-D1010.
2. Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991;60:443-475.
3. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-652.
4. Calabro A, Plaas A, Misura RJ, et al. Structure and biosynthesis of chondroitin sulfate and hyaluronan. In: Iozzo RV, ed. *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. New York: Marcel Dekker Inc, 2000;5-26.

5. Gallagher JT, Lyon M. Heparan sulfate: molecular structure and interactions with growth factors and morphogens. In: Iozzo RV, ed. *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. New York: Marcel Dekker Inc, 2000;27–60.
6. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;6:861–870.
7. Lander AD, Selleck SB. The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. *J Cell Biol* 2000;148:227–232.
8. Iozzo RV, Wight TN. Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by human colon and colon carcinoma. *J Biol Chem* 1982;257:11135–11144.
9. Knudson W, Subbaiah S, Pauli BU. Proteoglycan synthesis by normal and neoplastic human transitional epithelial cells. *J Cell Biochem* 1990;43:265–279.
10. Timar J, Ladanyi A, Lapis K, et al. Differential expression of proteoglycans on the surface of human melanoma cells characterized by altered experimental metastatic potential. *Am J Pathol* 1992;141:467–474.
11. Molist A, Romaris M, Lindahl U, et al. Changes in glycosaminoglycan structure and composition of the main heparan sulphate proteoglycan from human colon carcinoma cells (perlecan) during cell differentiation. *Eur J Biochem* 1998;254:371–377.
12. Touab M, Villena J, Barranco C, et al. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 2002;160:549–557.
13. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR. A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem* 1994;269:32992–32998.
14. Harper JR, Bumol TF, Reisfeld RA. Characterization of monoclonal antibody 155.8 and partial characterization of its proteoglycan antigen on human melanoma cells. *J Biol Chem* 1984;132:2096–2104.
15. Harper JR, Reisfeld RA. Cell-associated proteoglycans in human malignant melanoma. In: Wight TN, Mecham RP, eds. *Biology of proteoglycans*. Orlando, Fla: Academic Press Inc, 1987;345–366.
16. Pluschke G, Vanek M, Evans A, et al. Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9710–9715.
17. van Muijen GN, Danen EH, Veerkamp JH, et al. Glycoconjugate profile and CD44 expression in human melanoma cell lines with different metastatic capacity. *Int J Cancer* 1995;61:241–248.
18. Manten-Horst E, Danen EH, Smit L, et al. Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int J Cancer* 1995;64:182–188.
19. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597–641.
20. Rapraeger A. Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J Cell Biol* 1989;109:2509–2518.
21. Dodge GR, Kovalszky I, Hassell JR, et al. Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1990;265:18023–18029.
22. Breuer B, Schmidt G, Kresse H. Non-uniform influence of transforming growth factor-beta on the biosynthesis of different forms of small chondroitin sulphate/dermatan sulphate proteoglycan. *Biochem J* 1990;269:551–554.
23. Romaris M, Heredia A, Molist A, et al. Differential effect of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis in human embryonic lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1991;1093:229–233.
24. Schönherr E, Järveläinen HT, Sandell LJ et al. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1991;266:17640–17647.
25. Schönherr E, Järveläinen HT, Kinsella MG, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1026–1036.
26. Romaris M, Bassols A, David G. Effect of transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor on the expression of cell surface proteoglycans in human lung fibroblasts. Enhanced glycanation and fibronectin-binding of CD44 proteoglycan, and down-regulation of glypican. *Biochem J* 1995;310:73–81.
27. Heredia A, Villena J, Romaris M, et al. Transforming growth factor beta 1 increases the synthesis and shedding of the melanoma-specific proteoglycan in human melanoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1996;333:198–206.
28. Heredia A, Villena J, Romaris M, et al. The effect of TGF-beta 1 on cell proliferation and proteoglycan production in human melanoma cells depends on the degree of cell differentiation. *Cancer Lett* 1996;109:39–47.
29. Wolfe LG, Oliver JL, Smith BB, et al. Biologic characterization of canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res* 1987;48:1642–1648.
30. Houghton AN, Real FX, Davis LJ, et al. Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med* 1987;164:812–829.
31. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
32. Real FX, Houghton AN, Albino AP, et al. Surface antigens of melanomas and melanocytes defined by mouse monoclonal antibodies: specificity analysis and comparison of antigen expression in cultured cells and tissues. *Cancer Res* 1985;45:4401–4411.
33. Isogai Z, Shinomura T, Yamakawa N, et al. 2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Cancer Res* 1996;56:3902–3908.
34. Nara Y, Kato Y, Torii Y, et al. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem J* 1997;29:21–30.
35. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, et al. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:963–971.
36. Ohiwa N, Fukata S, Fukatsu T, et al. Immunohistochemical localization of proteoglycans in non-epithelial tumor tissues. *Connect Tissue* 1991;22:11–19.
37. Paulus W, Baur I, Dours-Zimmermann MT, et al. Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:528–533.
38. Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, et al. Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci* 2000;113:807–816.
39. Zhang Y, Cao L, Yang BL, et al. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via the epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 1998;273:21342–21351.
40. Yang BL, Zhang Y, Cao L, et al. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 1999;72:210–220.
41. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M, et al. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 1994;124:817–825.
42. Sorrell JM, Carrino DA, Baber MA, et al. Versican in human fetal skin development. *Anat Embryol* 1999;199:45–56.
43. Yamagata M, Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci* 1994;107:2581–2590.
44. Knudson W. Tumor-associated hyaluronan: providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996;148:1721–1726.
45. Turley EA, Tretiak M. Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1985;45:5098–5105.
46. Ross AH, Cossu G, Herlyn M, et al. Isolation and chemical characterization of a melanoma-associated proteoglycan antigen. *Arch Biochem Biophys* 1983;225:370–383.
47. Iida J, Meijne AM, Spiro RC, et al. Spreading and focal contact formation of human melanoma cells in response to the stimulation of both melanoma-associated proteoglycan (NG2) and alpha 4 beta 1 integrin. *Cancer Res* 1995;55:2177–2185.
48. Iida J, Meijne AML, Oegema TRJ, et al. A role of chon-

droitin sulfate glycosaminoglycan binding site in $\alpha 4\beta 1$ integrin-mediated melanoma cell adhesion. *J Biol Chem* 1998;273:5955–5962.

49. Eisenmann KM, McCarthy JB, Simpson MA, et al. Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol* 1999;1:507–513.

50. Burg MA, Grako KA, Stallcup WB. Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. *J Cell Physiol* 1998;177:299–312.

51. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Toth S, et al. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000;12:547–554.

52. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, et al. Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res* 1994;54:575–581.

53. Osada H, Tatematsu Y, Masuda A, et al. Heterogeneous transforming growth factor (TGF)- β unresponsiveness and loss of TGF- β receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2001;61:8331–8339.

54. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117–129.

55. Graeven U, Herlyn M. In vitro growth patterns of normal human melanocytes and melanocytes from different stages of melanoma progression. *J Immunother* 1992;12:199–202.

56. Furlanetto RW, Harwell SE, Baggs RB. Effects of insulin-like

growth factor receptor inhibition on human melanomas in culture and in athymic mice. *Cancer Res* 1993;53:2522–2526.

57. Slominski A, Wortsman J, Nickoloff B, et al. Molecular pathology of malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* 1998;110:788–794.

58. Otsuka T, Takayama H, Sharp R, et al. c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res* 1998;58:5157–5167.

59. Hamoen KE, Borel-Rinkes IH, Morgan JR. Hepatocyte growth factor and melanoma: gene transfer studies in human melanocytes. *Melanoma Res* 2001;11:89–97.

60. van der Kraan PM, Vitters EL, Postma NS, et al. Maintenance of the synthesis of large proteoglycans in anatomically intact murine articular cartilage by steroids and insulin-like growth factor I. *Ann Rheum Dis* 1993;52:734–741.

61. Thiebot B, Bichoual L, Langris M, et al. IGF-1 stimulates synthesis of undersulfated proteoglycans and of hyaluronic acid by peritubular cells from immature rat testis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1358:127–141.

62. Emoto N, Onose H, Yamada H, et al. Growth factors increase pericellular proteoglycans independently of their mitogenic effects on A10 rat vascular smooth muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:47–54.

63. Deakin JA, Lyon M. Differential regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor by cell surface proteoglycans and free glycosaminoglycan chains. *J Cell Sci* 1999;112:1999–2009.

2.- EFECTES DE L'EXPRESSION DE LA ISOFORMA V3 DEL VERSICÀ SOBRE EL FENOTIP DE LES CÈL·LULES DE MELANOMA I EL SEU POTENCIAL TUMORIGÈNIC.

ANTECEDENTS

L'expressió incrementada de versicà a la MEC juga un rol en el creixement, adhesió i migració tumorals. Varis tipus de cèl·lules tumorals produeixen versicà. Recentment, el nostre grup ha descrit una marcada producció de versicà en el melanoma maligne i, a més, que les cèl·lules de melanoma sintetitzen quantitats alterades de les isoformes V0 i V1 de versicà, cosa que contribueix a les propietats anormals d'aquestes cèl·lules, ja que, *in vitro*, augmenta la proliferació i disminueix l'adhesió (Touab et al., 2002). També s'ha vist l'expressió diferencial de les isoformes V0 i V1 a les línies cel·lulars de melanoma caní en funció de la seva agressivitat (Serra et al., 2002).

Els resultats descrits a aquesta secció responen a l'objectiu de sobreexpressar a cèl·lules de melanoma humà i caní la isoforma curta de versicà V3, a la qual li manquen les cadenes GAG, per tal d'estudiar la possible reversió del fenotip maligne de les cèl·lules de melanoma, amb els següents objectius concrets:

- 1.- Sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà a dues línies de melanoma humà (SK-mel-1.36-1-5 i Mewo) i dues de melanoma caní (CML-1 i CML-10c2), on una és indiferenciada i expressa les isoformes V0 i V1 de versicà, i l'altra és diferenciada i no expressa cap isoforma de versicà.
- 2.- Anàlisi dels efectes d'aquesta sobreexpressió sobre el creixement, adhesió i migració cel·lulars *in vitro*. Anàlisi del paper del complex format per versicà, àcid hialurònic (HA) i CD44 en aquests efectes funcionals.
- 3.- Estudi del potencial tumorigènic de les diferents línies transfectades en ratolins BALB/c nu/nu.

Article: "V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential"

Montserrat Serra, Laia Miquel, Clelia Domenzain, María José Docampo, Angels Fabra, Thomas N. Wight, and Anna Bassols

Enviat a publicar.

**V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and
their tumorigenic potential**

Montserrat Serra¹, Laia Miquel¹, Clelia Domenzain¹, María José Docampo¹, Angels
Fabra², Thomas N. Wight³, and Anna Bassols¹

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.
Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra. Spain.

²Institut de Recerca Oncològica
L'Hospitalet de Llobregat
Spain

³The Hope Heart Institute
Seattle, WA, USA

Corresponding author:

Anna Bassols
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra
Spain
Phone #: 34-93-581 10 42
FAX #: 34-93-581 20 06
e-mail: anna.bassols@uab.es

ABSTRACT

Versican is a large chondroitin sulfate proteoglycan produced by several tumor cell types, including malignant melanoma. The expression of increased amounts of versican in the extracellular matrix may play a role in tumor cell growth, adhesion and migration. In the present work, we have expressed the V3 isoform of versican in human and canine melanoma cell lines. Retroviral overexpression of V3 did not change the morphology of any of the cell lines but markedly reduces cell growth in the V3 versican expressing melanoma cells. The V3-overexpressing melanoma cells retain their diminished growth potential *in vivo*, since primary tumors arising from these cell lines growth more slowly than their vector only counterparts. This effect was accompanied by increases in cell adhesion on hyaluronan and an enhanced ability to migrate on hyaluronan-coated transwell chambers. This enhanced migration is blocked when cells are preincubated with soluble hyaluronan, or anti-CD44 antibodies, suggesting that V3 acts by altering the hyaluronan-CD44 interaction. Hyaluronan content and CD44 expression are not altered in V3-overexpressing cells compared to vector-transduced cells. Our results show that V3 overproduction modulates the *in vitro* behavior of human and canine melanoma cell lines and reduces their tumorigenicity *in vivo*.

Keywords: versican, melanoma, proteoglycan, hyaluronan, tumorigenesis.

INTRODUCTION

Versican is a large chondroitin sulfate proteoglycan belonging to the hyalectan family, named from its ability to bind hyaluronan. Versican is highly expressed in fast growing tissues and cells, such as during embryogenesis and in many tumors, and it has been suggested that it plays a direct role in cell proliferation and other cell functions.¹ Versican, as well as the other members of the hyalectan family, has three structural domains: the N-terminal region (G1 domain) is responsible for binding hyaluronan: the central domain carries the glycosaminoglycan chains and the C-terminal globular region (G3 domain) interacts with simple carbohydrates and glycosaminoglycans and with other proteins such as tenascin.²⁻⁵ The central domain of versican consists of two large subdomains, designated GAG- α and GAG- β that are encoded by two alternatively spliced exons. In mammals, versican appears as four possible spliced variants: V0 is the largest one and contains both GAG- α and GAG- β subdomains; V1 contains GAG- β , V2 contains GAG- α and V3 lacks any GAG subdomain.^{2,6} Versican isoforms differ in the size of the GAG subdomain and, subsequently, in the number of covalently bound GAG chains and the existing distance between G1 and G3 subdomains. For example, the smallest splice variant V3 consists only of the amino and carboxy-terminal globular domains of versican and, therefore, retains many of the binding properties of versican, but lacks chondroitin sulfate chains and, in consequence, the high charge density and size of the large versican isoforms. However, little is known about the differential regulation of these isoforms or whether they play different roles in the extracellular matrix.

Our group has recently described a marked production of versican in malignant melanoma.⁷ This characteristic has also been described in other tumor types, such as in vessels of brain tumors,⁸ stroma of prostate cancer,^{9,10} breast cancer,¹¹⁻¹³ and histiocytoma.¹⁴ These changes have been postulated to contribute to the proliferative and

migratory state of the tumor cells. For example, versican has been described to have a direct positive effect on melanoma cell proliferation and a negative effect on melanoma cell adhesion when added to cultured cells,⁷ whereas a mini-versican construct promoted NIH3T3 fibroblasts and astrocytoma cell proliferation, probably through the EGF-like motifs in the G3 domain,^{15,16} as well as the G1 or G3 independently expressed in sarcoma cells.¹⁷ Recently, vascular smooth muscle cells overexpressing the V3 isoform have been described as having increased adhesion and diminished potential for proliferation and migration than control cells,¹⁸ raising the possibility that V3 could exert its effects through changes in the pericellular coat by competing with the larger chondroitin sulfate-bearing V0 and V1 isoforms of versican.

Since our previous work has shown that melanoma cells synthesize altered amounts of the chondroitin sulfate-containing V0 / V1 isoforms of versican, that contribute to the abnormal properties of melanoma tumor cells, we have asked whether overexpressing the short V3 isoform of versican that lacks chondroitin sulfate chains could reverse the malignant phenotype of melanoma cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human melanoma cell lines SK-mel-131 (cl 1.36-1-5) and Mewo originally derived from human melanomas by Houghton *et al.*¹⁹ were obtained from Dr. F. X. Real (I.M.I.M., Barcelona, Spain). CML-1 and CML-10c2 canine melanoma cell lines were obtained from Dr. E. G. MacEwen (University of Wisconsin, U.S.A.).^{20,21} Cells were grown in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from GibcoBRL/Life Technologies, Rockville, MD).

Antibodies

The polyclonal anti-versican antibody was raised in our laboratory.⁷ Anti-human CD44 (J173) was purchased from Becton and Dickinson (Franklin Lakes, NJ) and used for functional studies. Anti-human CD44 used for western blot and immunocytochemistry was kindly provided by Dr. R. Vilella (Hospital Clinic de Barcelona, Spain). The rat monoclonal anti-canine CD44 antibody was kindly provided by Dr. S. Alldinger (Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany).²² The antibodies against p21 and Cyclin D1 were kindly provided by Dr. J. Gil (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona). The antibody against p27 was kindly provided by Dr. F. Ventura (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona).

Retroviral vector construction and infection

The retroviral vector containing the V3 gene (LV3SN) as well as the empty control vector (LXSN) were prepared as previously described.²³ Both vectors were used to infect

human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines using PA317 cells as described.¹⁸

Total RNA was extracted with RNeasy isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) from subconfluent cells. For Northern blot experiments, 15 µg of total RNA were separated by 1% agarose-formaldehyde gel electrophoresis and subsequently transferred onto Hybond-XL membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The C10 probe labeled with [alpha-³²P]dCTP recognizing all four versican isoforms was used.²⁴

Western blot analysis.

For versican analysis, the conditioned media were removed and a cocktail of protease inhibitors was added (10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 5 mM N-ethylmaleimide, 1 mg/ml pepstatin A, 0.5 mg/ml leupeptin and 1 mM PMSF (all from Sigma, St. Louis, MO)). When indicated, enzymatic digestions were performed at 37°C for 16 hours with chondroitinase ABC (Seikagaku, Tokyo, Japan) in 50 mU/ml in 33 mM sodium acetate, 33 mM Tris-HCl pH 8.0. The incubations were terminated by boiling the samples for 5 min. In the case of CD44, cell extracts were prepared by lysing the cells in 1% NP40, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 in the presence of protease inhibitors. For p21, p27 and cyclin D1, cells extracts were prepared by lysing the cells in 2% SDS, 10% glycerol, 80 mM Tris-HCl pH 6.8. **The amount of protein applied to the gels was normalized after Bradford quantification.**

Samples were analyzed in a 6% or a 3-10% polyacrylamide gradient gel, as described by Laemmli.²⁵ After electrophoresis, proteins were transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore Corp. Bedford, MA). The blot was placed in a blocking solution consisting of 5% skim milk in Tris Buffer Saline (TBS) and incubated for 2 h at 4°C. The membranes were incubated with the primary antibody in 5% skim milk in TBS for 16 h, washed and visualized by chemiluminescence (ECL System, Amersham, Uppsala,

Sweden). The antibody recognized the protein core of versican, but it was unable to detect the whole chondroitin sulfate-bearing proteoglycan form in western blot as well as in immunocytochemistry.⁷

Proliferation, adhesion and migration assays

For proliferation studies, cells were seeded by triplicate in 24-well plates at a density of 5000 cells/well and cultured for 5 days in 0.5 ml of medium supplemented with 10% FCS. At the indicated times, cells were released by trypsinization and counted with a Neubauer chamber. FACS analysis of the cell cycle was performed after synchronization of the cells by serum deprivation using a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

For cell adhesion assays, Nunc 96 well-plates were coated with or without 50 μ l hyaluronan (5 mg/ml, Sigma) for 16 hours at room temperature, and washed for several times with serum-free DMEM medium. Melanoma cells were counted and radiolabeled with 50 μ Ci ⁵¹Cr (Amersham, Uppsala, Sweden) per 5×10^6 cells for 2 hours at room temperature. After labeling, cells were centrifuged, washed two times with serum-free DMEM-0.1% BSA, and seeded at a density of 1.5×10^5 cells/well and incubated overnight at 37°C. The medium was removed, wells were rinsed twice with serum-free DMEM-0.1% BSA, and the cells were lysed by treatment with 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 minutes. Finally, the wells were carefully washed with a cotton swab, and the radioactivity counted.

For migration studies, Transwell chambers (6,5 mm diameter; 8 μ m pore size polycarbonate membrane) obtained from Corning (Corning, NY) were used. Membranes were coated with 150 μ l hyaluronan for 16 hours at room temperature, and washed twice with serum-free DMEM. Cells were counted and labeled with ⁵¹Cr as described above, and placed in the upper chamber at a density of 10^6 cells/well, whereas the lower chamber was loaded with 0.25 ml medium conditioned by NIH3T3 fibroblasts. Cells were allowed to

migrate overnight at 37°C. The lower chambers and the transwells were treated with trypsin for 10 minutes, the cells were lysed by treatment with 0.1% Triton X-100 in PBS and were finally collected with a cotton swab and the radioactivity counted. At the indicated cases, cells were preincubated with 5mg/ml hyaluronan for 1 hour before plating. In CD44-blocking experiments, cells were preincubated with 40 µg/ml of the J173 anti-CD44 antibody^{26,27} for 1 hour before plating. The same concentration of the antibody was added to the lower transwell compartment during the migration assay. An irrelevant mouse IgG of the same isotype at the same concentration was used as control.

Immunocytochemistry

Cells were grown in coverslips, rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After rinsing four times with PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and nonspecific binding sites were blocked for 20 min with 1% BSA / 0.02% goat serum. Cells were then incubated overnight with the primary antibody at 4°C. Subsequently, cells were washed four times with PBS and incubated with a secondary antibody labeled with FITC (versican; Roche, Indianapolis, IN) or TRITC (CD44; Roche, Indianapolis, IN). Nuclei were visualized by incubating the coverslips with Hoetsch (0,1 mg/ml) for 3 min. Cultures were studied with a Nikon Eclipse E800 epifluorescence microscope and photographed with an integrated camera system.

ELISA-like assay for hyaluronan determination

Hyaluronan determination by ELISA was determined by the method described by Underhill *et al.*²⁸ with some modifications. Microtiter 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 20 µg/ml HA conjugated to BSA in PBS. After incubation for 2

hours at 4°C, the plates were washed with PBS and blocked with 10% calf serum in PBS. Standard hyaluronan (50-1000 ng/ml, Sigma) and conditioned media were mixed with 0.65 µg biotinylated hyaluronic acid binding protein (b-HABP; Seikagaku, Tokyo, Japan) in 10% calf serum-PBS and incubated for 3-6 h at 4°C. The blocking solution was removed from the plates and 80 µl of the mixture sample/b-HABP was added to triplicate wells. Incubation was carried out overnight at 4°C. Plates were washed four times with PBS and 0.16 µg of horseradish streptavidin-labeled peroxidase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) in 10 % calf serum-PBS were added to the wells, incubated at 4°C for 90 min, and washed with PBS. The substrate solution was prepared just before use by dissolving 15 mg 2,2'azinobis 3-ethylbenzothiozoline sulphonic acid (AEBT, Sigma, St. Louis, MO) in 30 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 4.2) and adding 30 µl of 30% H₂O₂. The plates were incubated with the substrate at room temperature until sufficient colour developed (~ 20-30 min). The absorbances were read at 405 nm, and a semi-log standard curve was used to calculate hyaluronan concentrations.

Tumor growth in nude mice

LXSN and LV3SN cells (1 x 10⁶ cells in 100 µl of PBS) were injected intradermally into the flank of BALB/C *nu/nu* nude mice (a total of four animals per cell line, two injection sites per animal). Animals were monitored by visual inspection until the tumor size was ≥0.5 cm. At that time, the animals were sacrificed, tumors were excised, and eventually processed for necropsy. Primary cutaneous tumors were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax. Sections (4µm) were cut and stained by routine methods with haematoxylin and eosin (HE) for histopathological evaluation.

RESULTS

V3 overexpression in human and canine melanoma cell lines

All four LV3SN-transduced melanoma cell lines (human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo, and canine CML-1 and CML-10c2) expressed an RNA of the appropriate size (approximately 6 kb) for the retrovirally encoded V3/neoR message (Fig. 1A). mRNA transcripts for V3 were not detected in any of the LXSN control cell lines. The results of the northern blot also confirmed that SK-mel-1-36-1-5 and CML-1 endogenously express V0 and V1 isoforms, whereas Mewo and CML-10c2 do not express any large versican isoform^{7,21}.

The production of endogenous V0 and V1 isoforms, and the ratio between both isoforms, were not modified by the overexpression of V3 isoform neither in the cell lines producing endogenous versican (SK-mel-1-36-1-5 and CML-1) nor in cell lines lacking this proteoglycan (Mewo and CML-10c2), as assessed by northern blot (Fig. 1) or by western blot (Fig. 2A). **The slight differences observed in the figures between LX and V3 cells were not repetitive and should be considered as not significant.** Since versican interacts with hyaluronan in the extracellular space through its G1 motif, and CD44 is the main receptor for hyaluronan, we analyzed whether V3 overexpression was able to modify the production of hyaluronan and / or CD44 in any of these cell lines. HA was determined by ELISA using biotinylated hyaluronic acid binding protein (b-HABP). Table 1 and Figure 2B,C show the results obtained in these experiments: all cell lines secrete hyaluronan to the extracellular medium and contain CD44 in their cell membrane. The amount of hyaluronan was different depending on the cell line (Table 1). **CD44 is mostly located in the cell membrane, although its distribution is not homogeneous in the cell periphery.** V3 overexpression did not **significantly** change the production of hyaluronan by the transduced cell lines nor the

amount and cellular localization of CD44 assayed by western blot (Fig. 2B) or immunofluorescence (Fig. 2C).

Functional analysis of the V3-transduced human and canine melanoma cell lines

LV3SN cells grew more slowly than the corresponding LXS cells and achieved different cell densities by 5 days (Fig. 3). This difference in cell number is not associated with a subdiploid peak in flow cytometry (not shown), indicating that the apoptosis rate was not modified. The growth suppression effect was accompanied by a concurrent induction of endogenous p21 levels in all tested cell lines, excepting Mewo melanoma cells, which apparently bear a mutation on the p21 gene, that apparently renders this protein undetectable by western blot (Fig. 4). **The increase on p21 levels was slight but consistent in the three cell lines.** The levels of p27 and Cyclin D1 did not change significantly (Fig. 4). Although p21 could not be detected in Mewo cells, a cell cycle analysis performed in synchronized cells allowed to detect a delay in the cell cycle duration, that could explain, at least partially, the growth inhibitory effect (Fig 4). Furthermore, to assess whether the growth-inhibitory effect was caused by secreted V3 isoform, conditioned media from SK-mel-1.36-1-5 LV3SN and Mewo LV3SN were collected and added to SK-mel-1.36-1-5 and Mewo cell cultures. As shown in Figure 5, cells growing in a LV3SN-conditioned medium growth more slowly than cells growing in a LXS-conditioned medium, indicating that V3 is, at least partially, acting extracellularly.

Tumorigenicity of V3-overexpressing melanoma cells

All cell lines gave origin to primary tumors when injected intradermally into nude mice. In all cases, excepting in SK-mel-1.36-1-5 cells, tumor growth from LV3SN cells was

slower than from LXS cells (Fig. 6), indicating that V3 overexpression was able to limit the tumorigenic potential of melanoma cells *in vivo*. The morphology of the tumor cells after hematoxylin-eosin staining when they were excised at a volume of 0,5 cm³ was similar in LXS and LV3SN tumors in all the cases. Inflammatory infiltration was virtually absent from all the tumors, ruling out inflammation as a cause of the differences in tumor size. Tumors arising from LXS and LV3SN Mewo cells were the only ones showing a small degree of inflammatory component, but no differences were observed between control and V3-overexpressing tumors.

Cell adhesion and migration of V3-overexpressing melanoma cells

Cell adhesion on hyaluronan-coated dishes was measured after radiolabeling the cell cultures with ⁵¹Cr. In all four cell lines, a moderate but significant increase in cell adhesion in LV3SN cells was observed ranging from 122 to 137% versus LXS control cells (Fig. 7). Furthermore, the overexpression of V3 isoform caused a significant increase in migration on hyaluronan-coated dishes in all the assayed cell lines ranging from 130 to 160% versus LXS control cells (Fig. 8A). Interestingly, this increase was abolished when cells were preincubated with soluble hyaluronan (5 mg/ml) for 1 hour before plating (Fig. 8A). Furthermore, the increase in migration observed in LV3SN Mewo cells was abolished when cells were preincubated with the J173 anti-CD44 antibody to block the binding sites of this receptor (Fig. 8B). Similar results were obtained with SK-mel-1-36-1-5 cells (not shown). The CD44-mediated pathway is an important regulator of migration in SK-mel-1-36-1-5 and Mewo melanoma cell lines, since migration is decreased by approximately 50% in LXS and LV3SN cells when previously incubated with the anti-CD44 antibody (not shown).

DISCUSSION

We have expressed the V3 isoform of versican in human and canine melanoma cell lines which differ in their endogenous production of native large isoforms V0 and V1 to assess the effects of this molecule in tumor cells. Versican expression has been related to the malignant properties of melanoma and other tumor cells, since it has a positive effect on cell proliferation and a negative effect on cell adhesion.^{7,15,16,29} The large chondroitin sulfate-containing V0 and V1 isoforms are predominant in tumor as well as embryonic tissues,³⁰ and their effects have been related to the protein core or to the glycosaminoglycan chains covalently bound to the central domain of versican. Since the large isoforms of versican have been related to the malignant phenotype, our goal was to analyze whether V3 expression could reverse the malignant phenotype. V3 is the shortest versican isoform, bearing both G1 and G3 terminal domains but lacking the central glycosaminoglycan-bearing domain.

The most striking feature of V3-overexpressing melanoma cells is their limited ability to grow in culture. This diminished growth potential is observed in all four cell lines. This effect has also been shown in arterial smooth muscle cells (ASMCs),³¹ where it has been suggested that the reduced proliferation may be secondary to the positive effects of V3 on cell adhesion, since cell attachment to the substrate must be reduced to proliferate, or secondary to changes in the elastin deposition.³² In ASMCs, the positive effect of V3 on cell adhesion was very significant, with cells appearing more spread and with larger areas of close contact between cells and the coverslip. In this case, an important mechanism for the increase in adhesion would be the competition with the large, antiadhesive V0 and V1 versican isoforms in pericellular coats.³¹ Nevertheless, in melanoma cells, and in contrast to ASMCs, the increase in cell adhesion is moderate and not likely to be causative for the growth inhibitory effect. Furthermore, no visible differences neither in pericellular matrix

assembly at the morphological level (erythrocyte exclusion assay; not shown) nor in the production of large, endogenous versican V0/V1 isoforms could be observed in any of the cell lines. It is of interest that V3-overexpressing cells show an increase in the levels of endogenous p21, the inhibitor of cyclin-dependent kinases, which leads to a delay in the cell cycle. We have not found any difference in basal apoptotic rate between control and V3-overexpressing cells, although a resistance to apoptosis induced by oxidative stress or cytotoxic drugs has been described in astrocytoma cells transfected with the G3 domain of versican³³ or in sarcoma cells overexpressing the G1 domain,¹⁷ respectively. The mechanism by which V3 induces the expression of p21 will need to be investigated.

In contrast to our results in melanoma cells, it has been described that NIH 3T3 fibroblasts expressing a recombinant minigene comprising the G1 and G3 domains and 15% of the CS domain show an increase in cell proliferation. Expression of G3 alone and addition of purified G3 gene product to NIH3T3 and chicken fibroblasts also enhances cell growth.¹⁵ The authors propose that this is an EGF-like domain-mediated effect. In our case, the effect is the opposite, since proliferation is strongly inhibited in V3-overexpressing melanoma cells. A possible explanation for this difference is the presence in the versican minigene constructed by Zhang *et al.*¹⁵ of a limited amount of chondroitin sulfate chains, lacking in our system. It is possible, as suggested by these authors, that V3 acts through its EGF-like domains interacting with the EGF receptor, and that the presence or absence of chondroitin sulfate chains may modulate this interaction. In our system, we suggest a direct blocking of the EGF receptor by the G3 domain of V3, which would result in the inhibition of the mitogenic signal transduction pathway. This hypothesis would explain why the antiproliferative effect is more potent in cells lacking the endogenous V0/V1 isoforms than in cells harboring the large isoforms, since in the case of coexistence of several versican isoforms, the larger ones would interfere with the G3 / EGF receptor interaction. It has been reported that overexpression of the G1 domain also promotes cell

proliferation probably mediated through the immobilization of hyaluronic acid in the proximity of the cell.¹⁷ In our case, this effect, if exists, would be in any case surpassed by the growth inhibitory action produced by other domains of the molecule. Other explanations are indeed possible, as a different stoichiometry or quantitative amounts between versican isoforms or other molecular differences between ASMCs, fibroblasts and melanoma cells. In this sense, it has been described that the recombinant G3 and G1 domains of versican are able to modulate the secretion of endogenous versican.^{16,34} Nevertheless, the production of endogenous versican is not altered by V3-overexpression in melanoma cells, neither in cell lines expressing endogenous V0/V1 isoforms nor in cell lines lacking these isoforms.

The V3-overexpressing melanoma cells retain their diminished growth potential *in vivo*, since primary tumors arising from these cell lines grow more slowly than their LXS_N counterparts. An exception to this behavior are SK-mel-1.36-1-5 cells, where there are no difference in tumor growth between LXS_N and LV3SN cells. A possible explanation is the undifferentiated phenotype of this cell line,¹⁹ which would make them able to grow in an autocrine manner. Mewo cells are more differentiated, and possibly more dependent on external signals for growth. Our results differ from those reported by Cattaruzza et al.,¹⁷ who find that G1-overexpressing sarcoma cells formed larger tumors probably through a hyaluronan-mediated mechanism. In our case, the presence of G3 linked to the G1 domain apparently blocks this hypothetical immobilization of hyaluronan. A growth-promoting effect mediated by an increase in angiogenesis has been described by Zheng et al.³⁵ in tumors formed from astrocytoma cells overexpressing the G3 domain of versican. The tumor-inhibitory effect of the V3 construct here described is similar to that caused by the overexpression in astrocytoma cells of a G3 mutant lacking two EGF-like motifs,³⁶ although the mechanism should differ since the authors describe important changes in adhesion, migration and apoptosis in mutant cells, not found in our cell system. These

discrepancies indicate that the combined or independent expression of versican domains could dramatically change their functional effects. Another consideration of physiological importance is localization of tumors. We have used an organ-specific model for melanoma cells, that are injected intradermally and therefore grow in a natural microenvironment, allowing the paracrine effects of other cell types on tumor development.

Besides the negative effect on cell proliferation, we have observed an increase in cell adhesion on hyaluronan-coated dishes. This proadhesive effect may be due, in the case of SK-mel-1.36-1-5 and CML-1 cell lines, to a competitive effect with the large, antiadhesive endogenously expressed isoforms, as suggested by Lemire *et al.*,¹⁸ for smooth muscle cells. Another possibility, which would also explain the behavior of Mewo and CML-10c2 cell lines, that lack endogenous versican, is that the presence of a versican isoform lacking chondroitin sulfate chains would alter the interaction between hyaluronan and its receptor CD44 at the cell surface.

In the case of migration on *transwell* chambers, V3-overexpressing melanoma cells show an increase in the ability to migrate through hyaluronan-coated membranes. Cell migration is decreased by about an 50% when cells are treated with an anti-CD44 blocking antibody, according to the idea that the CD44-mediated pathway is an important regulator of migration in these cell lines, as well as has been described in other human and murine melanoma cells.^{37,38} Interestingly, the increase observed in V3-overexpressing cells compared to control cells is blocked when cells are preincubated with soluble hyaluronan or with the anti-CD44 antibody, indicating that the increase in migration is a hyaluronan-mediated effect exerted through its membrane receptor CD44. At this respect, it is widely accepted that hyaluronan promotes migration,²⁶ through its action creating a suitable hydrated milieu, as well as initiating signaling pathways that promote cell movement. Hyaluronan production is associated with an increase in cell proliferation and motility in several cell types including melanoma, and this is a CD44-mediated effect.³⁹⁻⁴²

Nevertheless, in our case, the effects induced by V3 overexpression are not caused by a change in the expression of CD44, nor in the amount of hyaluronan produced by the cells, indicating that a change in the interaction of CD44 and HA should be induced by the presence of V3.

In conclusion, our results suggest that V3 overexpression acts on cell adhesion and migration by interfering directly or indirectly with the hyaluronan-CD44 interaction, whereas the effect on cell proliferation should be mediated mainly through a cell adhesion-independent mechanism. V3 overexpression can exert its action partly through a competitive action with endogenous V0/V1, but a direct effect independent of these isoforms should exist, as some effects can be observed in V0/V1 lacking cell lines. In any case, our results show that the coexistence of several versican isoforms may modulate their activity, and that it is possible to alter melanoma cell behavior by modifying the extracellular matrix structure and composition, thus raising new possibilities for the management of tumor cell growth.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Susanne Alldinger (Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany) and Dr. R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona, Spain) for providing the anti-CD44 antibodies, Dr. F.X. Real (I.M.I.M., Barcelona, Spain) for providing the human cell lines, Dr. J. Pastor (Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) for providing the canine cell lines, Dr. J. Gil (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain) for the antibodies against p21 and cyclinD1 and help for cell cycle analysis, Dr. F. Ventura (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain) for the antibody against p27, and Ms. Anna Vilalta for her excellent technical assistance. This work was supported by grant SAF2003-08750 and 2001SGR00193 from the Generalitat de Catalunya (to A.B.), SAF2002-87 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (to A.F.) and NIH grant # 18645 (to T.N.W.). M.S. and C.D. were supported by a fellowship from the Generalitat de Catalunya, M.J.D. was supported by a fellowship from the Spanish Ministerio de Educación.

Table 1.

Hyaluronan production by control and versican V3-overexpressing melanoma cells. Hyaluronan was determined by ELISA in conditioned media from control and V3-overexpressing melanoma cells

Cell line	Hyaluronan (ng/ml)
SK-mel-1-36-1-5 LXS	31.3 ± 2.8
SK-mel-1-36-1-5 LV3SN	29.9 ± 4.2
Mewo LXS	815.8 ± 112.8
Mewo LV3SN	861.3 ± 139.4
CML-1 LXS	2747.8 ± 671.6
CML-1 LV3SN	3135.8 ± 1716.8
CML-10c2 LXS	564.9 ± 55.5
CML-10c2 LV3SN	498.8 ± 88.1

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Versican expression in control LXS_N and transduced LV3SN human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo, and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines, detected by Northern blot. Versican isoforms presents in vector-alone (LX) and V3 (V3) transduced melanoma cell lines were detected with a probe (C10) recognizing all versican isoforms.

Figure 2. *A*, versican expression in control LXS_N and transduced LV3SN human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo, and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines detected by western blot with the antibody against versican raised in our laboratory. *B*, CD44 expression in control LXS_N and transduced LV3SN melanoma cell lines detected by Western blot with an anti-canine CD44 antibody. *C*, CD44 expression in LXS_N and transduced LV3SN Mewo melanoma cells detected by immunocytochemistry.

Figure 3. Growth curves for LXS_N (■) and LV3SN (○) transduced melanoma cells. Human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cells were seeded by triplicate at a density of 5000 cells/well in 24-well plates and cultured for the indicated times. Cells were trypsinized and counted with a Neubauer chamber. One representative experiment out of three is shown.

Figure 4. *A*, p21, p27 and cyclin D1 levels in LXS_N and LV3SN melanoma cells. Cell extracts were prepared from subconfluent cultures from control LXS_N and transduced LV3SN human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo, and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines. Equal amounts of protein extracts were separated on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies against p21, p27 and cyclinD1. The data presented are representative of three independent experiments. *B*, FACS analysis of the cell cycle from

control LXS_N (upper panel) and transduced LV3_{SN} (lower panel) human Mewo melanoma cells.

Figure 5. Proliferation of parental human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo melanoma cells in the presence of conditioned medium from LXS_N (■) and LV3_{SN} (○) transduced cells. Cells were seeded by triplicate at a density of 5000 cells/well in 24-well plates and cultured for the indicated times. Cells were trypsinized and counted with a Neubauer chamber. One representative experiment out of three is shown.

Figure 6. Effect of V3 overexpression on tumor growth rate *in vivo*. Tumors formed in mice injected intradermally with LXS_N and LV3_{SN} transduced cells. *A*, The time required in days for getting a volume of approximately 0.5 cm³ is represented. *B*, hematoxylin-eosin staining of primary tumors arising from LXS_N (top) and LV3_{SN} (bottom) Mewo cells.

Figure 7. Adhesion of LXS_N and LV3_{SN} transduced human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines. 96-well-plates were coated with hyaluronan (5 mg/ml) for 16 hours at room temperature and washed for several times with serum-free DMEM. Melanoma cells were counted and radiolabeled with 50 µCi ⁵¹Cr / 5 x 10⁶ cells for 2 hours at room temperature. After labeling, cells were centrifuged, washed, seeded at a density of 1.5 x 10⁵ cells/well by quadruplicate and incubated overnight at 37°C. The medium was removed, wells were washed and the cells were lysed by treatment with 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 minutes. Finally, the wells were carefully washed with a cotton swab, and the radioactivity counted. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001. One representative experiment out of three is shown.

Figure 8. Migration of LXS_N and LV3_{SN} transduced human SK-mel-1.36-1-5 and Mewo and canine CML-1 and CML-10c2 melanoma cell lines on hyaluronan. *A*, Transwell membranes were coated with hyaluronan (5 mg/ml) for 16 hours at room temperature, and washed twice with serum-free DMEM. Melanoma cells were counted and radiolabeled with 50 μ Ci ^{51}Cr / 5×10^6 cells for 2 hours at room temperature. After labeling, cells were centrifuged, washed, and placed by triplicate in the upper chamber at a density of 10^6 cells/well, whereas the lower chamber was loaded with 0.25 ml medium conditioned by NIH3T3 fibroblasts. Cells were allowed to migrate overnight at 37°C. The lower chambers and the transwells were treated with trypsin for 10 minutes, cells were lysed by treatment with 0.1% Triton X-100 in PBS and were finally collected with a cotton swab and the radioactivity counted. When indicated, cells were preincubated with 5mg/ml hyaluronan for 1 hour before plating on transwell membranes. *B*, Mewo melanoma cells were preincubated with the J173 anti-CD44 antibody (40 μ g/ml) or with an irrelevant IgG as control for 1 hour before plating. The same concentration of the antibody was added to the lower transwell compartment during the migration assay. Cell migration was measured as described in *A*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ with respect to control LXS_N cells. One representative experiment out of three is shown (abbreviations: Mel-6 = SK-mel-1.36-1-5).

REFERENCES

1. Wight TN, Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:617-23.
2. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR, A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem* 1994; 269:32992-8.
3. Iozzo RV, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:609-52.
4. ZIMMERMANN DR, Versican, In: R. Iozzo (ed.) , *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*, pp. 327-341, Marcel Dekker, Inc., New York, (2000).
5. Matsumoto K, Shionyu M, Go M, Shimizu K, Shinomura T, Kimata K, Watanabe H, Distinct interaction of versican/Pg-M with hyaluronan and link protein. *J Biol Chem* 2003; 278:41205-12.
6. Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M, Kimata K, Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 1995; 270:958-65.
7. Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A, Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 2002; 160:549-57.

8. Paulus W, Baur I, Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR, Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:528-33.
9. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, Horsfall DJ, Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:963-71.
10. Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Tilley WD, LeBaron RG, Horsfall DJ, Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta1. *Cancer Res* 2001; 61:926-30.
11. Nara Y, Kato Y, Torii Y, Tsuji Y, Nakagaki S, Goto S, Isobe H, Nakashima N, Takeuchi J, Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem J* 1997; 29:21-30.
12. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van De WL, Iruela-Arispe ML, Yeo TK, Tognazzi K, Dvorak HF, Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1041-56.
13. Ricciardelli C, Brooks JH, Suwivat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA, Seshadri R, LeBaron RG, Horsfall DJ, Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1054-60.

14. Isogai Z, Shinomura T, Yamakawa N, Takeuchi J, Tsuji T, Heinegard D, Kimata K, 2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Cancer Res* 1996; 56:3902-8.
15. Zhang Y, Cao L, Yang BL, Yang BB, The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 1998; 273:21342-51.
16. Wu Y, Zhang Y, Cao L, Chen L, Lee V, Zheng PS, Kiani C, Adams ME, Ang LC, Paiwand F, Yang BB, Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. *J Biol Chem* 2001; 276:14178-86.
17. Cattaruzza S, Schiappacassi M, Kimata K, Colombatti A, Perris R, The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 2004; 18:779-81.
18. Lemire JM, Merrilees MJ, Braun KR, Wight TN, Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. *J Cell Physiol* 2002; 190:38-45.
19. Houghton AN, Real FX, Davis LJ, Cordon-Cardo C, Old LJ, Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. *J Exp Med* 1987; 165:812-29.
20. Wolfe LG, Oliver JL, Smith BB, Toivio-Kinnucan MA, Powers RD, Brawner WR, Henderson RA, Hankes GH, Biologic characterization of canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res* 1987; 48:1642-8.

21. Serra M, Pastor J, Domenzain C, Bassols A, Effect of transforming growth factor-beta1, insulin-like growth factor-I, and hepatocyte growth factor on proteoglycan production and regulation in canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res* 2002; 63:1151-8.
22. Alldinger S, Baumgartner W, Kremmer E, Fonfara S, Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. *Zentralbl Veterinarmed A* 1999; 46:19-32.
23. Fischer JW, Kinsella MG, Hasenstab D, Clowes AW, Wight TN, Cell-mediated transfer of proteoglycan genes. *Methods Mol Biol* 2001; 171:261-9.
24. Lemire JM, Braun KR, Maurel P, Kaplan ED, Schwartz SM, Wight TN, Versican/PG-M isoforms in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1630-9.
25. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
26. Koochekpour S, Pilkington GJ, Merzak A, Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells in vitro. *Int J Cancer* 1995; 63:450-4.
27. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM, Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276:36770-8.
28. Underhill CB, Nguyen HA, Shizari M, Culty M, CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Dev Biol* 1993; 155:324-36.

29. Yamagata M, Kimata K, Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 9):2581-90.
30. Perissinotto D, Iacopetti P, Bellina I, Doliana R, Colombatti A, Pettway Z, Bronner-Fraser M, Shinomura T, Kimata K, Morgelin M, Lofberg J, Perris R, Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. *Development* 2000; 127:2823-42.
31. Lemire JM, Merrilees MJ, Braun KR, Wight TN, Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. *J Cell Physiol* 2002; 190:38-45.
32. Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y, Wight TN, Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *Am J Pathol* 2004; 164:119-31.
33. Wu Y, Chen L, Zheng PS, Yang BB, beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. *J Biol Chem* 2002; 277:12294-301.
34. Yang BL, Cao L, Kiani C, Lee V, Zhang Y, Adams ME, Yang BB, Tandem repeats are involved in G1 domain inhibition of versican expression and secretion and the G3 domain enhances glycosaminoglycan modification and product secretion via the complement-binding protein-like motif. *J Biol Chem* 2000; 275:21255-61.

35. Zheng PS, Wen J, Ang LC, Sheng W, Vilorio-Petit A, Wang Y, Wu Y, Kerbel RS, Yang BB, Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 2004; 18:754-6.
36. Wu Y, Chen L, Cao L, Sheng W, Yang BB, Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and β 1-integrin. *J Cell Sci* 2004; 117:2227-37.
37. Faassen AE, Schragar JA, Klein DJ, Oegema TR, Couchman JR, McCarthy JB, A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 1992; 116:521-31.
38. Knudson W, Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* 1996; 148:1721-6.
39. Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I, CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992; 118:971-7.
40. Ichikawa T, Itano N, Sawai T, Kimata K, Koganehira Y, Saida T, Taniguchi S, Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1999; 113:935-9.
41. Ahrens T, Assmann V, Fieber C, Termeer C, Herrlich P, Hofmann M, Simon JC, CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol* 2001; 116:93-101.

42. Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K, Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:3609-14.