

2.2 RESULTATS COMPLEMENTARIS. EFECTES DE L'EXPRESSION DE LA ISOFORMA V3 SOBRE EL FENOTIP DE LES CÈL·LULES DE MELANOMA HUMÀ I CANÍ

ANTECEDENTS

Els resultats d'aquesta secció responen a l'objectiu general de continuar estudiant les cèl·lules de melanoma caní, així com les de melanoma humà i caní que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà. Així doncs, els resultats presentats en aquesta secció complementen els resultats presentats a l'article i responen tant a l'estudi de l'expressió diferencial d'altres molècules de MEC involucrades en la progressió del melanoma, com dels possibles mecanismes involucrats en els efectes funcionals observats en les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà.

RESULTATS

1.- ESTUDI DE L'EXPRESSION DE MOLÈCULES DE LA MATRIU EXTRACEL·LULAR RELACIONADES AMB LA PROGRESSIÓ DEL MELANOMA

1.1 Cèl·lules de melanoma caní

Estudi de l'expressió de metal·loproteases de matriu a les línies cel·lulars de melanoma caní

Un objectiu del present treball fou estudiar la presència de metal·loproteases de matriu en les línies cel·lulars de melanoma caní CML-1, CML-6M i CML-10c2, mitjançant zimografia en gelatina i *northern blot*, tal i com es descriu en l'annex de Materials i Mètodes. La zimografia directament estudia l'activitat de les MMPs: mitjançant gels SDS-PAGE impregnats de substrats com gelatina es separen les diferents MMPs. La tinció dels gels amb un colorant de proteïnes deixa bandes clares on les MMPs han degradat el substrat. Mitjançant *northern blot* analitzem els nivells de mRNA de MMPs individuals. Ja que les MMPs s'activen post-traduccionament per un mecanisme proteolític, ambdós tipus d'estudis es complementen.

En primer lloc, es van realitzar zimogrames de medis condicionats, ja que es tracta d'enzims majoritàriament secretats al medi. Aquest assaig, realitzat a partir de cèl·lules al 80% de confluència va revelar la presència d'una banda clara d'activitat gelatinolítica amb un pes molecular aparent de 62 kDa, la qual va migrar de manera similar a la MMP-2 activa de les cèl·lules utilitzades com a control positiu, les MXT.C1.1 (metàstasi a pulmó d'un adenocarcinoma mamari de ratolí), com podem veure a la Figura 16. Altres bandes, molt més dèbils,

s'observaren en les mostres i probablement representen complexos proteics o productes de proteòlisi; aquestes bandes no s'avaluaren.

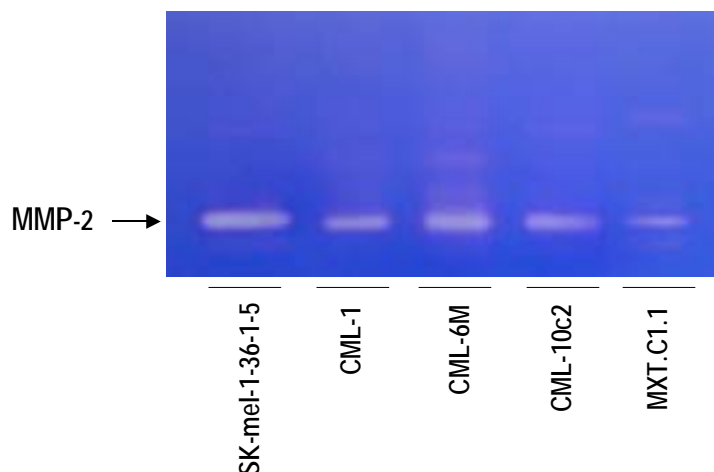


Figura 16. Activitat gelatinolítica de les línies cel·lulars de melanoma caní. Zimograma realitzat amb medis condicionats de les tres línies cel·lulars de melanoma caní CML-1, CML-6M i CML-10c2 (10 µg de proteïna) i de la línia d'adenocarcinoma de mama de ratolí MXT.C1.1 utilitzada com a control positiu (6 µg de proteïna) en un 80% de confluència.

Els zimogrames dels medis condicionats obtinguts de cèl·lules menys confluents (un 50 % de confluència aproximadament) van revelar la presència de dues bandes d'activitat gelatinolítica amb pesos moleculars aparents de 88 i 62 kDa, respectivament. La banda més prominent fou a l'alçada dels 62 kDa, com veiem a la Figura 17, que correspon a la MMP-2. La banda de pes molecular més alt correspon probablement a activitat MMP-9. La línia cel·lular CML-1 és l'única que presenta activitat MMP-9.

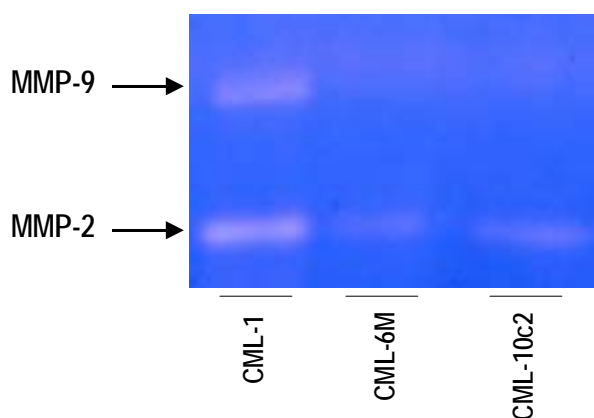


Figura 17. Activitat gelatinolítica de les línies cel·lulars de melanoma caní. Zimograma realitzat amb medis condicionats de les tres línies cel·lulars de melanoma caní CML-1, CML-6M i CML-10c2 (3.5 µg de proteïna total) en un 50% de confluència.

Es realitzaren també diversos zimogrames dels extractes cel·lulars obtinguts com es descriu en Materials i Mètodes. En aquest cas es volia evidenciar l'existència d'enzim, en concret de la MMP-2, associat a membrana cel·lular. Els resultats dels diferents zimogrames, però, no mostraren evidència d'activitat gelatinolítica en cap de les tres línies cel·lulars de melanoma caní.

Es va continuar investigant l'expressió de la metal·loproteasa MMP-2 en les nostres línies canines de melanoma mitjançant *northern blot*, com es descriu a la secció annexa de Materials i Mètodes. L'RNA total de cada mostra fou separat en un gel desnaturalitzant de l'1.1 % d'agarosa i, posteriorment, el gel es transferí a una membrana de nylon. Els *blots* obtinguts s'hibridaren amb una sonda de MMP-2 humana marcada amb [α^{32} -P]dCTP. Els mateixos *blots* van ser deshibridats i, posteriorment, hibridats amb una sonda de GAPDH per a la normalització en quantitat de RNA.

Aquests assaigs van concloure que l'activitat gelatinolítica present a les zimografies corresponia a l'activitat de la MMP-2, ja que es va determinar un únic transcrit d'unes 3 kb tal com es veu a la Figura 18, corresponent a la MMP-2.

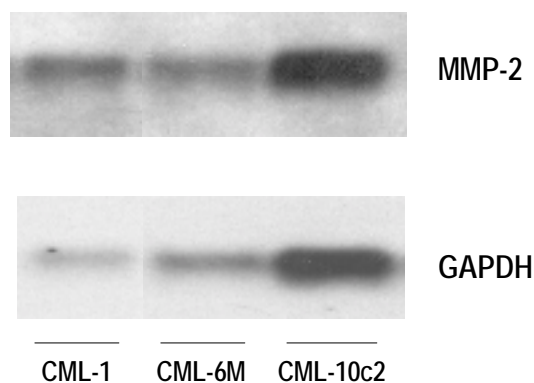


Figura 18. Nivells de mRNA de MMP-2 en les tres línies cel·lulars de melanoma caní. El RNA de les tres línies de melanoma caní CML-1, CML-6M i CML-10c2 es va sotmetre a *northern blot* per avaluar l'expressió de MMP-2. Posteriorment, la mateixa membrana es va hibridar amb la sonda GAPDH, com a control.

L'activitat gelatinolítica i els nivells de mRNA de MMP-2 es van quantificar per densitometria i normalitzar respecte els nivells de GAPDH. En el zimograma de cèl·lules més confluents veiem una activitat gelatinolítica de MMP-2 similar entre les tres línies, mentre que en el zimograma de cèl·lules menys confluents veiem una major activitat MMP-2 de la línia CML-1, 3 vegades superior que les línies CML-6M i CML-10c2. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el *northern blot*, on veiem que els nivells de mRNA de CML-1 és 2.6 vegades superior que la de CML-6M, la qual és similar als nivells de mRNA de CML-10c2.

Estudi de l'expressió de la subunitat αv de les integrines a les línies cel·lulars de melanoma caní

Un altre objectiu va ser caracteritzar si les cèl·lules de melanoma caní estudiades expressaven la integrina $\alpha v \beta 3$. Per dur a terme aquesta tasca vam estudiar mitjançant immunocitoquímica amb l'anticòs monoclonal 17E6, el qual marca la subunitat αv humana, a les tres línies cel·lulars de melanoma caní, tal com es descriu a 'apartat Materials i Mètodes.

Només la línia cel·lular CML-1 va donar un marcatge positiu per aquest anticòs, mentre que les altres dues línies cel·lulars de melanoma caní CML-6M i CML-10c2 van donar un resultat negatiu per l'anticòs 17E6 (resultats no mostrats). El marcatge amb faloïdina ens permet visualitzar el citoesquelet. Com veiem a la Figura 19 hi ha un marcatge difús per la cèl·lula (es marca tota la membrana cel·lular), que és més intens en els contactes focals, tot i que menys evident del que s'esperava.

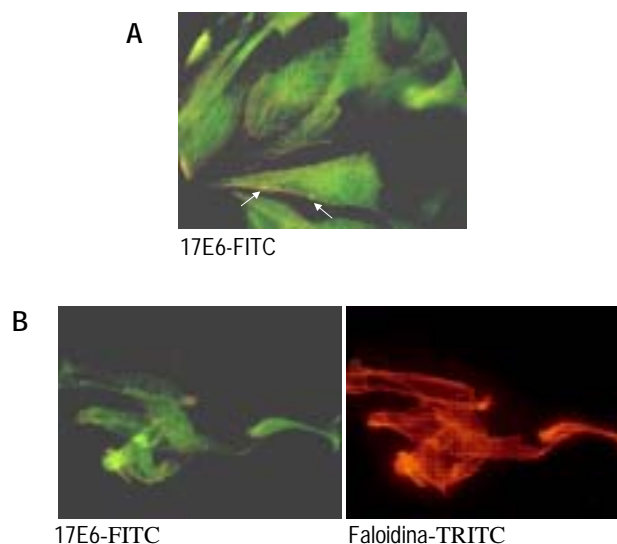


Figura 19. Expressió de la subunitat αv a la línia cel·lular de melanoma caní CML-1 mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs monoclonal 17E6. **19A.** Tinció positiva de les cèl·lules CML-1 amb l'anticòs 17E6, i marca de contactes focals (fletxes). X 1000. **19B.** Tinció de les cèl·lules CML-1: a l'esquerra amb l'anticòs 17E6 i a la dreta amb faloïdina, marcant el citoesquelet.

1.2 Cèl·lules de melanoma que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà

Expressió de la isoforma V3 de versicà a les cèl·lules de melanoma

A més de valorar l'expressió del mRNA de V3 mitjançant *northern blot*, també es va voler veure la presència de V3 a nivell proteic. L'anticòs produït al nostre laboratori, però, no va reconèixer V3 a nivell de *western blot*. Per això es van realitzar les immunocitoquímiques de V3 a les 4 línies cel·lulars de melanoma (Fig. 20). Es va observar una tinció positiva en totes les línies que sobreexpressaven V3, mentre que només es va observar marca a les SK-mel-1.36-1-5 i

CML-1 LXS_N, que són les que expressen versicà endogen (isoformes V0/V1), mentre que les Mewo i CML-10c2 LXS_N foren negatives.

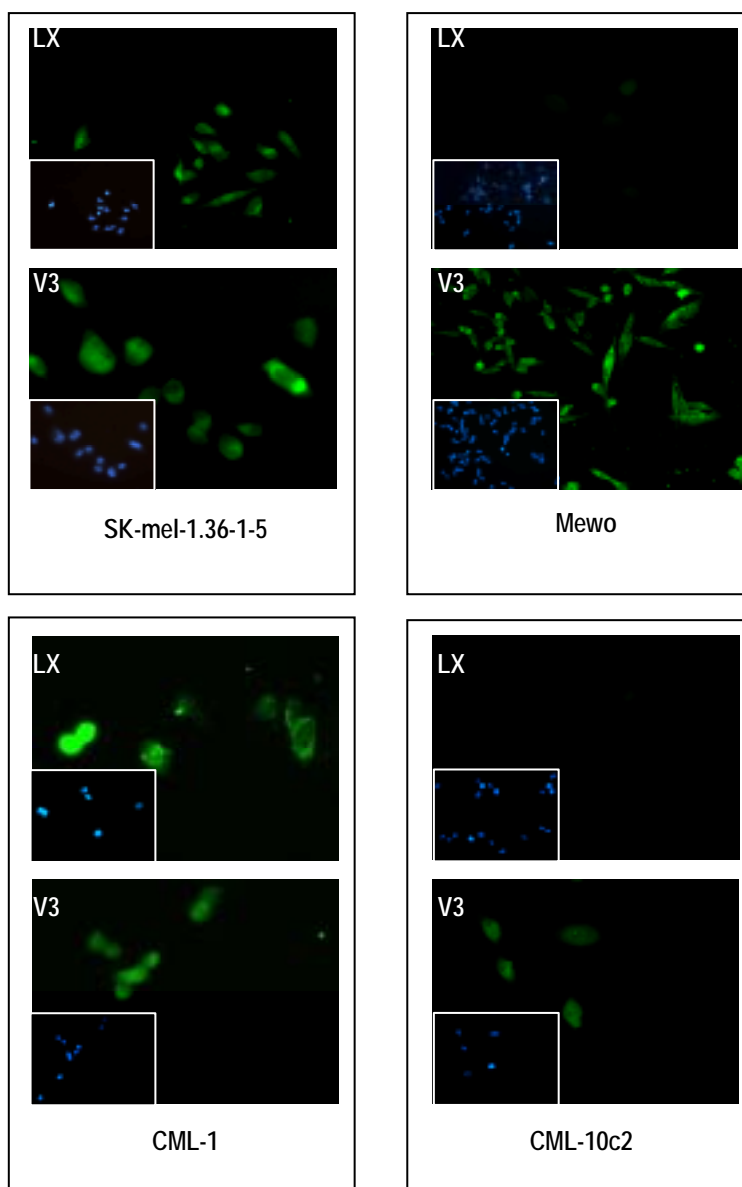


Figura 20. Expressió de la isoforma V3 de versicà a les línies cel·lulars de melanoma humà SK-mel-1.36-1-5 i Mewo i de melanoma caní CML-1 i CML-10c2 mitjançant immunofluorescència. S'observa marcatge positiu a les cèl·lules LXS_N i LV3SN de SK-mel-1.36-1-5 i CML-1, mentre que només s'observa positivitat en les cèl·lules LV3SN de Mewo i CML-10c2. La viabilitat cel·lular es valora amb la tinció dels nuclis amb Hoetsch (quadre petit). LX= LXS_N, V3= LV3SN.

Estudi de l'expressió de metal·loproteases de matriu a les línies cel·lulars de melanoma que sobreexpressen V3

Per continuar amb l'estudi de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressaven la isoforma V3 de versicà, es va pensar que seria interessant analitzar-ne la possible expressió diferencial de les gelatinases MMP-2 i MMP-9 respecte les cèl·lules controls. Amb aquest objectiu es van fer zimografies de gelatina i *northern blot*. Els zimogrames de medis condicionats

es van realitzar a partir de cultius subconfluent i van revelar una banda d'activitat gelatinolítica amb un pes molecular aparent de 62 kDa a totes les línies cel·lulars testades, lleugerament més intensa en les cèl·lules que sobreexpressaven V3, com es pot apreciar a les Figures 21 i 22. Aquesta diferència sobretot s'apreciava a les cèl·lules canines CML-10c2 (Fig. 23), les quals també les vam fer créixer sobre substrat d'HA (5 mg/ml) per veure si s'afectava l'activitat de MMP-2. Com s'aprecia a la Figura 23 no es veuen diferències apreciables entre les cèl·lules crescudes sobre recobriment d'HA i les que no.

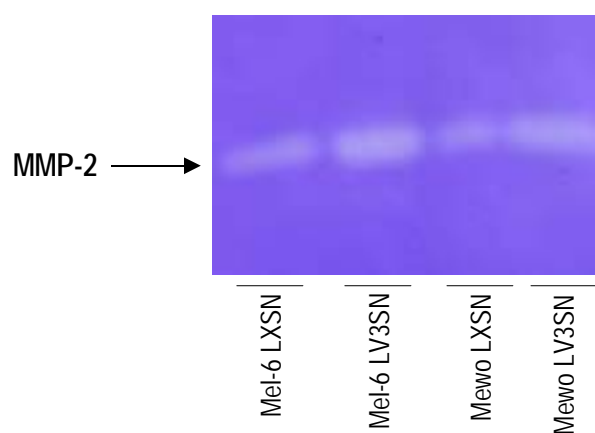


Figura 21. Activitat gelatinolítica de les línies cel·lulars de melanoma humà que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà. Zimograma realitzat amb medis condicionats de cultius subconfluent (10 µg de proteïna) de les dues línies cel·lulars de melanoma humà SK-mel-1.36-5 (abreviat com Mel-6 a la figura) i Mewo que expressen el vector sol (LXS) o amb la isoforma V3 de versicà (LV3).

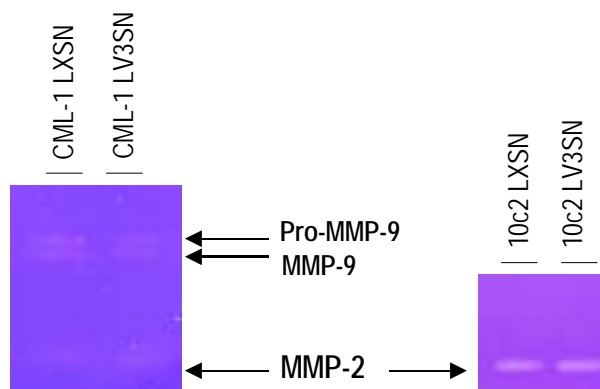


Figura 22. Activitat gelatinolítica de les línies cel·lulars de melanoma caní que sobreexpressen la isoforma V3. Zimograma realitzat amb medis condicionats de cultius al 50% de confluència (10 µg de proteïna) de les dues línies cel·lulars de melanoma caní CML-1 i CML-10c2 que expressen el vector sol (LXS) o amb la isoforma V3 de versicà (LV3).

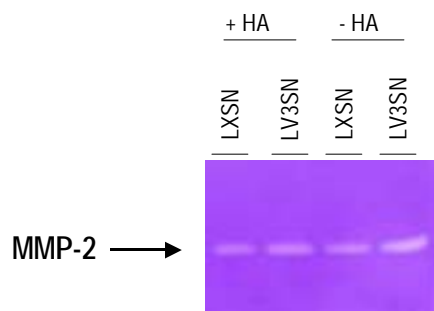


Figura 23. Activitat gelatinolítica de la línia de melanoma caní CML-10c2 transfectada amb la isoforma V3. Zimograma realitzat amb medis condicionats (10 μ g de proteïna) de les cèl·lules CML-10c2 transfectades amb el vector sol (LXSNS) o amb la isoforma V3 de versicà (LV3SN) i crescudes en presència de recobriments d'HA (5 mg/ml) i sense.

Per confirmar si aquesta diferència d'activitat MMP-2 es devia a una diferència en l'expressió de mRNA es va continuar l'anàlisi mitjançant *northern blot*. Es va hibridar amb una sonda de MMP-2 humana marcada amb [α^{32} -P]dCTP i es va determinar un únic transcrit de 3 kb aproximadament, tal com es veu a la Figura 24. Com es pot apreciar, els nivells de mRNA de MMP-2 són més alts a les cèl·lules que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà que a les respectives controls.

Es van quantificar aquestes diferències mitjançant densitometria i normalitzar respecte a la banda 28S de rRNA. En el cas de la línia cel·lular SK-mel-1.36-1-5 i Mewo l'activitat gelatinolítica era 1.25-1.3 vegades superior en les cèl·lules que sobreexpressaven V3 respecte les control. Pel que fa a les cèl·lules canines, s'observà que en el cas de CML-1 semblava no haver-hi diferències significatives entre les cèl·lules control i les transfectades amb V3, mentre que sí s'observaven en el cas de la línia CML-10c2. S'observà una activitat gelatinolítica 1.6 vegades superior en la línia cel·lular CML-10c2 LV3SN respecte les control i una expressió de mRNA fins a 2.7 vegades superior.

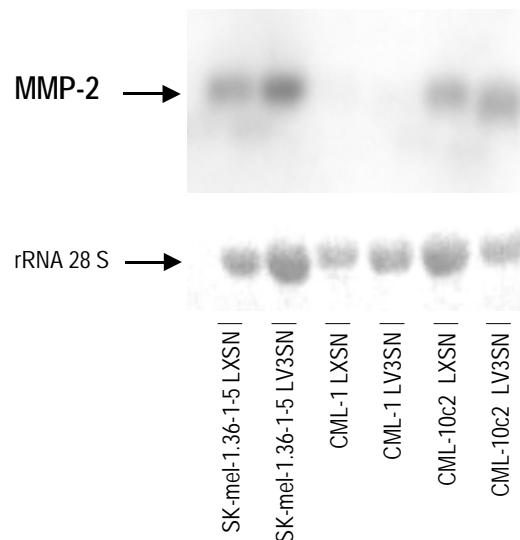


Figura 24. Nivells de mRNA de MMP-2 en les línies cel·lulars de melanoma humà i caní que sobreexpressen V3. El RNA de les dues línies de melanoma caní CML-1 i CML-10c2 i la línia de melanoma humà SK-mel-1.36-1-5 que sobreexpressen la isoforma V3 (LV3SN) o tenen el vector sol (LXSNS) es va sotmetre a *northern blot* per avaluar l'expressió de MMP-2.

En els zimogrames de medis condicionats de cultius en un 50% de confluència es va revelar la presència de dues bandes d'activitat gelatinolítica amb pesos moleculars aparents de 88 i 62 kDa, respectivament (Fig. 22). On s'aprecià la banda de pes molecular més alt, probablement corresponent a la MMP-9, fou a la línia cel·lular de melanoma caní CML-1, tot i que no s'apreciaren diferències significatives d'activitat entre les cèl·lules que sobreexpressaven V3 i les controls.

Estudi de l'expressió de diferents subunitats α i β de les integrines a les línies cel·lulars de melanoma LXSNS i LV3SN

En veure les diferències obtingudes en la migració cel·lular de les cèl·lules que sobreexpressaven V3 respecte les controls, es pensà en possibles mecanismes causals, a part de la via de CD44. Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió de diverses integrines mitjançant la citometria de flux. L'anàlisi es realitzà utilitzant diferents anticossos que reconeixen diferents subunitats i els resultats es recullen a les taules 4 i 5.

La utilització de l'anticòs P4C10 (subunitat β 1 de les integrines) ens permeté veure com les cèl·lules SK-mel-1.36-1-5 transfectades amb la isoforma V3 expressaven nivells més alts de la subunitat β 1 que els corresponents controls (Taula 4). Per contra, la resta de línies cel·lulars analitzades no mostraren diferències significatives. Es va utilitzar la línia SK-mel-1.36-1-5, que era l'única que mostrava diferències en el marcatge de P4C10, per analitzar altres marcadors d'integrines, que foren el 17E6 (α V), el LM609 (α V β 3), el P1F6 (α V β 5), l' α V β 6, l'AP3 (β 3) i

l'11D1 ($\beta 5$), però no es van detectar diferències significatives entre la línia LXS_N i la LV3_{SN} (Taula 5).

Línia cel·lular	LXS _N	LV3 _{SN}
SK-mel-1.36-1-5	194 (± 39.6)	255 (± 23.3)
Mewo	140 (± 38.9)	123 (± 22.6)
CML-1	102 (± 25.5)	124 (± 20.6)
CML-10c2	119 (± 21.4)	104 (± 16.6)

Taula 4. Nivells d'integrina $\beta 1$ en cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3. Anàlisi amb citometria de flux. L'anticòs utilitzat va ser el P4C10 (10 $\mu\text{g/ml}$). Resultat de la mitjana de 3 experiments analitzats \pm SD.

Integrina (marcador)	SK-mel-1.36-1-5 LXS _N	SK-mel-1.36-1-5 LV3 _{SN}
αV (17E6)	46.7 (± 8.4)	54.25 (± 8.7)
$\alpha v\beta 3$ (LM609)	35 (± 6)	40.85 (± 6.1)
$\alpha v\beta 5$ (P1F6)	3.7 (± 0.7)	5.4 (± 0.9)
$\alpha v\beta 6$	1.5 (± 0.27)	1.34 (± 0.24)
$\beta 3$ (AP3)	29.3 (± 5.3)	31 (± 5)
$\beta 5$ (11D1)	1.47 (± 0.26)	1.34 (± 0.2)

Taula 5. Nivells de diferents subunitats d'integrines en la línia cel·lular SK-mel-1.36-1-5. Anàlisi amb citometria de flux. Resultat de la mitjana de 3 experiments analitzats \pm SD. Els diferents anticòssos s'utilitzaren a la concentració de 10 $\mu\text{g/ml}$.

2.- ESTUDIS FUNCIONALS DE LES CÈL·LULES DE MELANOMA QUE SOBREEXPRESSEN LA ISOFORMA V3 DE VERSICÀ

2.1 Migració sobre col·lagen en les cèl·lules de melanoma humà LV3_{SN}

En obtenir una expressió incrementada de la subunitat $\beta 1$ de la integrina a les cèl·lules SK-mel-1.36-1-5 que sobreexpressaven V3 respecte les control, es va pensar en analitzar la migració d'aquestes cèl·lules sobre un altre substrat com el col·lagen tipus I reconegut per aquesta família d'integrines. La sobreexpressió de V3 va causar una disminució en la migració sobre el col·lagen de 2.4 vegades respecte les control (Fig. 25A). Les cèl·lules que havien migrat, marcades amb calceïna, es van poder visualitzar amb el microscopi de fluorescència (Fig. 25B).

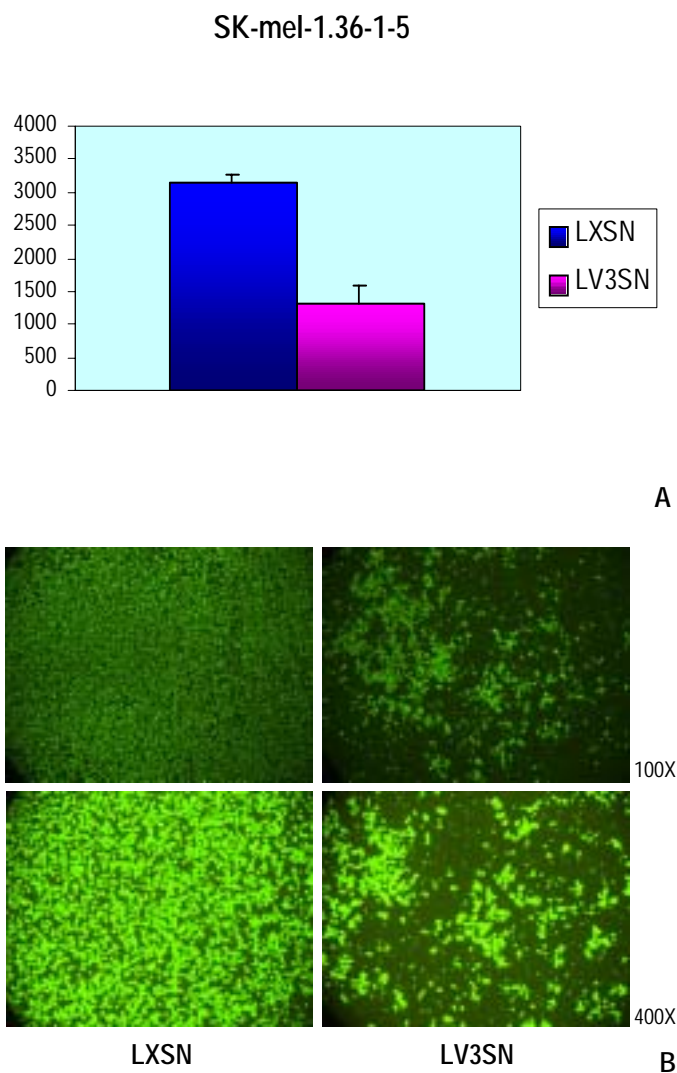


Figura 25. Migració de les cèl·lules SK-mel-1.36-1-5 sobre col·lagen. Les cèl·lules es van plaquejar en pous tipus *transwells* sobre col·lagen tipus I (15 $\mu\text{g/ml}$) a una concentració de 5×10^4 cèl·lules/pou i es van incubar *overnight* amb 50 ng/ml de rhHGF en el compartiment inferior com a factor migratori. Posteriorment es marcaren amb calceïna (0.1mM) i es féu la lectura al CytoFluor 2350 (Millipore®) a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i una lectura d'emissió de 530 nm. **25A.** Resultats de 4 experiments i la seva desviació estàndard. **25B.** Posteriorment es van visualitzar al microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800®.

2.2 Possibles causes del retard en la proliferació de les cèl·lules que sobreexpressen V3

Els resultats presentats a l'article mostraven que la disminució de la proliferació es correlacionava amb un increment dels nivells de p21, un inhibidor de cicle cel·lular. Malgrat això, les diferències en p21 observades no semblaven explicar les diferències en les corbes de creixement i, a més, en el cas de les Mewo, p21 estava mutada i possiblement no funcional. Per tant, es va pensar que el retard observat en les corbes de creixement no fos causat per una menor proliferació, sinó per una major apoptosi de les cèl·lules que sobreexpressaven V3.

Per aquest motiu es realitzaren noves corbes de creixement tenint en compte les cèl·lules que morien i, per tant, es trobaven en el medi de cultiu, no adherides. Vam agafar com a model d'estudi la línia cel·lular Mewo, ja que era la que mostrava una major diferència en les corbes de creixement. Com veiem a la Figura 26 sí que s'aprecia un major percentatge de cèl·lules mortes a les cèl·lules que sobreexpressaven V3, però no és suficient per explicar les grans diferències que observem en les corbes de creixement, ja que les mitjanes de cèl·lules mortes respecte les vives són de 0.5% a les cèl·lules LXSN *versus* 1.2% a les LV3SN .

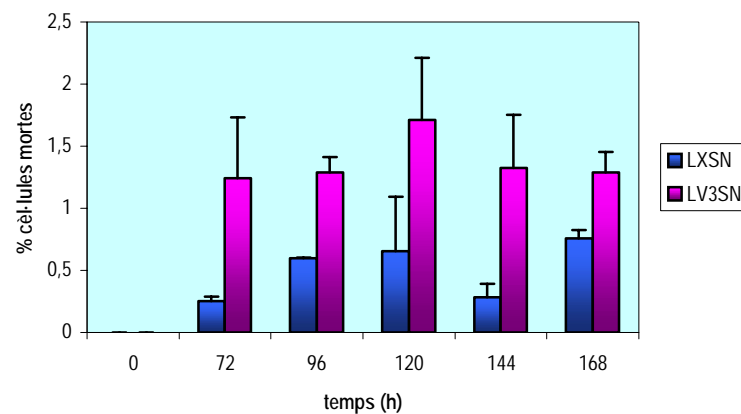
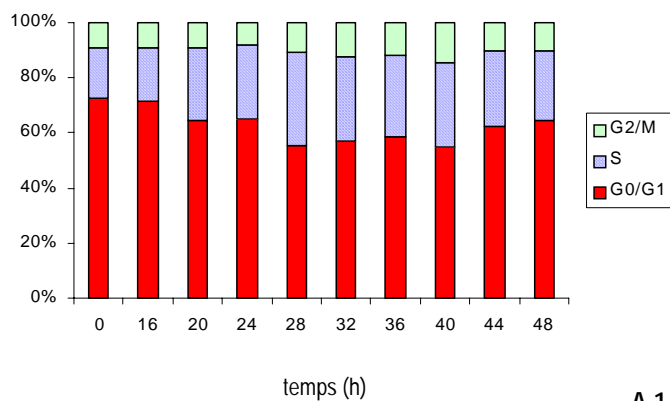


Figura 26. Estudi de l'apoptosi en cèl·lules Mewo que sobreexpressen V3. Recompte de les cèl·lules mortes (recollides en el medi de cultiu) respecte les vives (%) en una corba de creixement de la línia cel·lular Mewo. Mitjana de tres experiments \pm SD.

El següent pas fou pensar que es produïa un retard en el cicle cel·lular. Per aquest motiu s'estudià el cicle cel·lular amb citometria de flux. Les cèl·lules es van sincronitzar, deixant-les en un percentatge elevat en fase de G0/G1, per poder comparar la progressió del cicle. S'analitzaren totes les línies cel·lulars sense que s'apreciessin diferències significatives, excepte en el cas de la línia cel·lular Mewo, en la qual es va observar un lleuger retard en el cicle de les cèl·lules V3 respecte les controls (Fig. 27). El retard s'aprecià a l'entrada del segon cicle i ens féu pensar que era un retard petit, però acumulatiu. A partir de les 48 hores, però, ja no es pot continuar analitzant degudament el cicle cel·lular mitjançant citometria perquè les cèl·lules ja no estan sincronitzades i, per tant, no es poden comparar.

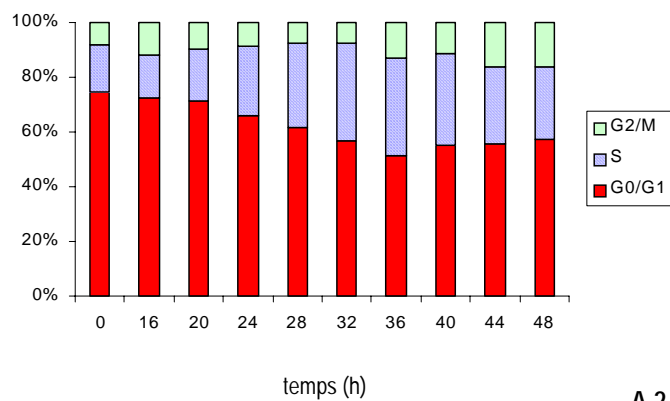
Amb l'anàlisi per citometria de flux també es pot apreciar si les cèl·lules entren en apoptosi o no. En el nostre cas no s'aprecià cap pic subdiploid que ens ho indiqués, amb la qual cosa descartàvem definitivament que les cèl·lules que sobreexpressaven V3 patissin una apoptosi incrementada, almenys de manera significativa.

Mewo LXSXN

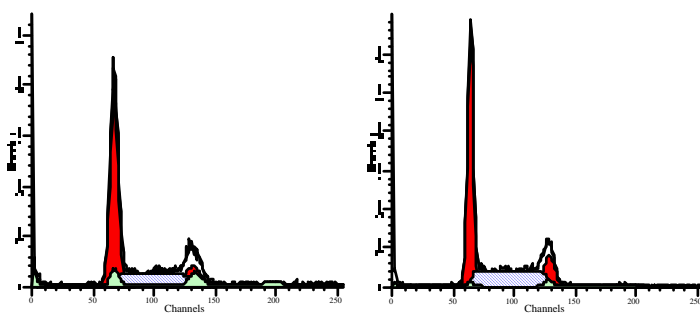


A.1

Mewo LV3SN



A.2



LXSXN

LV3SN

B

Figura 27. Anàlisi del cicle cel·lular amb citometria de flux en cèl·lules que sobreexpressen V3. A.1, A.2. Evolució del cicle cel·lular a les línies cel·lulars Mewo LXSXN i LV3SN, respectivament. B. Esquema de l'estat del DNA a les 36 hores d'inici del cicle cel·lular a la línia cel·lular Mewo. G0/G1: pic vermell; S: zona ratllada; G2/M: zona verda.

2.3 Estudis de tumorigènesi en ratolins. Anàlisi dels tumors primaris

Com s'ha descrit en el segon article, un dels efectes més notables de l'expressió de V3 és incrementar significativament el període de latència d'aparició dels tumors després de la injecció intradèrmica (ID) de les cèl·lules que sobreexpressen V3 en ratolins. A part d'analitzar histopatològicament els tumors primaris (Fig. 28) produïts per la injecció ID de les cèl·lules que sobreexpressaven V3 i les controls i confirmar que es tractaven de melanomes, es va començar a fer l'estudi immunohistoquímic amb alguns marcadors del nostre interès.



Figura 28. Ratolí mascle BALB/c nu/nu amb 2 tumors primaris intradèrmics. Tumors originats de la inoculació ID amb la línia cel·lular CML-1 LXS_N.

En aquest sentit, el primer que vam analitzar fou l'expressió de versicà en els tumors primaris. Per aquest motiu vam fer la immunodetecció utilitzant l'anticòs anti-versicà obtingut al nostre laboratori (Touab et al., 2002). En el cas de les línies cel·lulars de melanoma humà observàrem un marcatge pericel·lular molt marcat en el cas de les SK-mel-1.36-5, tant a les controls com a les que sobreexpressaven V3 (Fig. 29), mentre que en el cas de les Mewo no es detectà cap marca a les controls i una marca molt lleugera pericel·lular a les que sobreexpressaven V3. Aquests resultats demostren que els tumors són originats per les línies de melanoma i, a més, expressen el versicà transfectat. L'anticòs no va reconèixer el versicà produït per les cèl·lules canines (CML-1 i CML-10c2) i, per tant, no vam poder estudiar els tumors originats per aquestes línies.

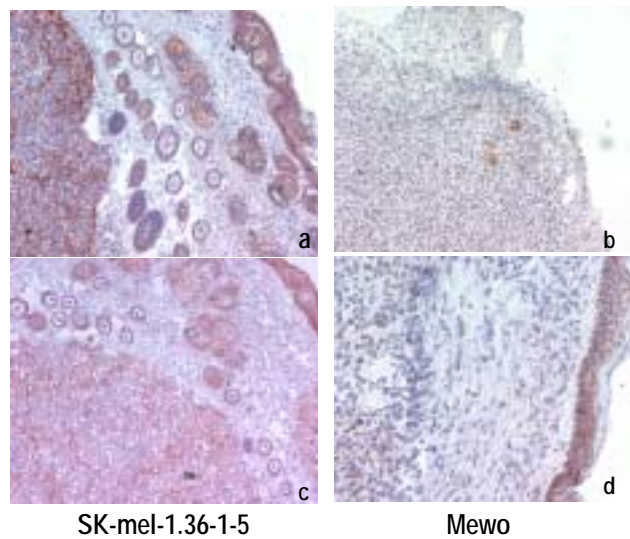


Figura 29. Immunohistoquímica de versicà dels tumors primaris originats per les línies cel·lulars SK-mel-1.36-1-5 i Mewo. Immunohistoquímiques realitzades en talls de criostat de 4 μ m. a i b: LXSNe; c i d: LV3SN. Fotos a, b i c: 100X; d: 200X.

El següent a estudiar mitjançant la immunohistoquímica fou la presència d'HA, com es descriu a Materials i Mètodes. En aquest cas, vam veure que totes les línies cel·lulars estudiades expressaven HA a l'espai extracel·lular amb possibles diferències entre les control i les que sobreexpressaven V3, sobretot en el cas de les línies cel·lulars SK-mel-1.36-1-5 i CML-10c2 (Fig. 30).

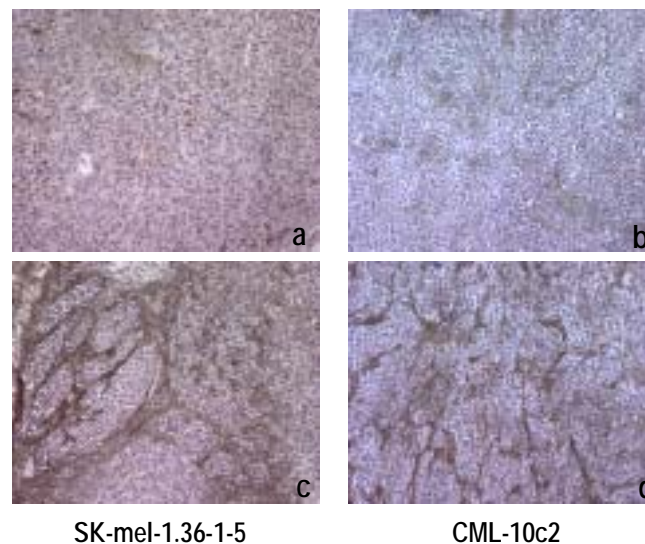


Figura 30. Immunohistoquímica d'HA dels tumors primaris originats per les línies cel·lulars SK-mel-1.36-1-5 i CML-10c2. Immunohistoquímiques realitzades en talls de criostat de 4 μ m. a i b: LXSNe, c i d: LV3SN. Fotos: 100X.

En el cas de SK-mel-1.36-1-5 LXSNe es veia marca per sota l'epiteli, en disposició fibril·lar i al tumor hi havia marca, dèbil, per zones concretes, que envoltava nius de cèl·lules. En canvi, en el cas de LV3SN era similar a l'anterior, però semblava que hi havia més marca, també

disposada com en forma de fibres que envoltaven nusos de cèl·lules. Pel que fa a la línia canina CML-10c2 es veia també una marca més intensa a LV3SN que a les controls. En general, a tots els tumors semblava que hi havia més marca d'HA per la perifèria del tumor (semblant al que passava amb CD44).

Per últim, s'estudià l'expressió de CD44 amb l'anticòs caní (Serra et al., 2004) als tumors originats per les línies cel·lulars de melanoma caní, CML-1 i CML-10c2. Es veié un patró de tinció similar a l'observat en l'estudi de biòpsies de melanomes canins (Fig. 31), és a dir amb la tinció més intensa a la part més externa del tumor. En canvi, no es van apreciar diferències significatives entre les cèl·lules control i les que sobreexpressaven V3. Els teixits de l'hoste són negatius a aquest anticòs.

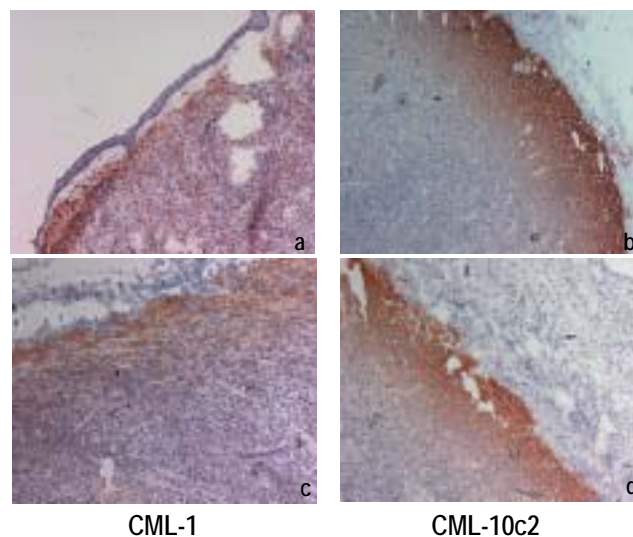


Figura 31. Immunohistoquímica de CD44 dels tumors primaris originats per les línies cel·lulars canines CML-1 i CML-10c2. Immunohistoquímiques realitzades en talls de criostat de 4 μ m. a i b: LXS, c i d: LV3SN. Fotos: 100X.

En aquests ratolins, quan es detectava l'aparició d'un tumor intradèrmic de 0.5 cm de volum s'extirpava el tumor mitjançant cirurgia. Llavors els animals es mantenien fins que s'observava l'aparició de metàstasis espontànies. En l'anàlisi d'aquestes metàstasis espontànies s'observà que hi havia molts tumors d'origen limfoproliferatiu. El fet d'haver utilitzat un vector retroviral per la transfecció de les cèl·lules és probablement la causa d'aquest tipus de neoplàsies. El que sí s'aprecià, i de forma significativa, fou que les cèl·lules que sobreexpressaven la isoforma V3 de versicà de les línies cel·lulars Mewo (melanoma humà) i CML-10c2 (melanoma caní) produïen metàstasis importants al pulmó (principal lloc de metàstasi dels melanomes) (Fig. 32), mentre que no es veïen en els controls respectius (Taula 6). Calen, però, més estudis per valorar el significat d'aquests resultats.

Línia cel·lular	Metàstasi a pulmó
SK-mel-1.36-1-5 LXS	0/6
SK-mel-1.36-1-5 LV3SN	0/6
Mewo LXS	0/4
Mewo LV3SN	2/4
CML-1 LXS	0/6
CML-1 LV3SN	0/6
CML-10c2 LXS	0/6
CML-10c2 LV3SN	2/6

Taula 6. Nombre d'animals afectats de metàstasi a pulmó.



Figura 32. Metàstasi espontània en un pulmó d'un ratolí injectat ID amb les cèl·lules CML-10c2 LV3SN. Aquesta metàstasi sorgí després d'haver extirpat el tumor primari.

3.- EXPRESSIÓ DE CD44 EN TUMORS MELANOCÍTICS CANINS.

ANTECEDENTS

CD44 és el principal receptor de superfície cel·lular de l'HA i sovint s'ha vist sobreexpressat en les cèl·lules tumorals. La transducció de senyals s'activa per la interacció HA-CD44. El versicà s'uneix a l'àcid hialurònic formant matrius pericel·lulars tridimensionals que envolten les cèl·lules. Recentment el nostre grup de recerca ha descrit que les cèl·lules de melanoma caní expressen versicà de forma diferencial (Serra et al., 2002). En el cas del melanoma humà *in vivo*, hi ha conflicte en les dades bibliogràfiques.

Els resultats descrits en aquesta secció responen a l'objectiu d'analitzar conjuntament l'expressió de CD44, versicà i hialurònic en 2 línies de melanoma caní. Així mateix, es vol estudiar l'expressió diferencial de CD44 en biòpsies canines de melanoma, benignes i malignes.

Article: "Differential expression of CD44 in Canine Melanocytic Tumours"

M. Serra, R. M. Rabanal, L. Miquel, C. Domenzain and A. Bassols

Journal of Comparative Pathology (2004) 130: 171-180



Differential Expression of CD44 in Canine Melanocytic Tumours

M. Serra, R. M. Rabanal*, L. Miquel, C. Domenzain and A. Bassols

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular and *Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain*

Summary

CD44, the main cell surface receptor for hyaluronan (HA), is often overexpressed in tumour cells, and its presence has been related to cell proliferation and migration. Many of the functions of CD44 are mediated through its interaction with hyaluronan. This study investigated the expression of CD44 in CML-1 and CML-10c2 canine melanoma cell lines and melanoma biopsies, and the production of hyaluronan and versican by the canine melanoma cell lines. Versican is an extracellular proteoglycan that binds hyaluronan, forming a tridimensional pericellular coat surrounding the cells. Both canine melanoma cell lines expressed CD44 and produced HA, but only CML-1 produced versican. Cells expressing all three components (CD44, HA and versican) formed abundant extracellular matrices as demonstrated by a particle exclusion assay. CD44 was present within benign and malignant melanomas, but its expression was more intense in malignant melanomas ($P < 0.01$). In high CD44-expressing tumours, CD44 tended to be present in the periphery of malignant melanomas, whereas its expression was homogeneous in benign melanomas.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: CD44; dog; hyaluronan; melanoma; tumour; versican

Introduction

Melanoma is relatively common in dogs, accounting for 3% of all neoplasms and up to 7% of all malignant tumours. The most frequently affected sites are the oral cavity (56%), lip (23%), skin (11%) and digit (8%) (Smith *et al.*, 2002). Canine oral melanomas are virtually always considered malignant, whereas more than 95% of cutaneous melanocytic lesions are benign (Smith *et al.*, 2002). Molecular changes linked with malignant transformation of melanocytes include altered expression of cell adhesion molecules, such as CD44.

CD44 is the main cell surface receptor for hyaluronan (HA). It is a glycoprotein with a protein core composed of an extracellular, a transmembrane and an intracellular domain (Goodison *et al.*, 1999; Bajorath, 2000; Turley *et al.*, 2002).

The extracellular domain binds hyaluronan, a ubiquitous component of the extracellular matrix, whereas the cytoplasmic domain selectively interacts with cytoskeletal proteins such as ankyrin and the ERM (ezrin/radixin/moesin) family, and regulates specific signalling through several pathways leading to the concomitant onset of multiple functions such as changes in cell proliferation, adhesion and migration (Turley *et al.*, 2002). Many functions of CD44 are mediated through its interaction with its ligand hyaluronan. In the extracellular space, hyaluronan interacts with proteoglycans from the hyaluronan family such as versican (Zimmermann, 2000). It is believed that hyaluronan and versican, together with other glycoproteins such as tenascin, form tridimensional complexes that constitute an organized lattice in the intercellular space (Yamaguchi, 2000). Changes in the pattern of expression of these molecules are

Correspondence to: A. Bassols.

0021-9975/\$ - see front matter

doi: 10.1016/j.jcpa.2003.10.006

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

likely to (1) disrupt normal cell interactions and thus contribute to structural and functional disorganization, and (2) promote cell proliferation and migration. These features are all characteristics of cancer cells.

In the case of melanoma, CD44 has been implicated in cell migration (Faassen *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1992, 1993; Knutson *et al.*, 1996; Peck and Isacke, 1996) and proliferation *in vitro* (Ahrens *et al.*, 2001). Tumour cell lines with raised concentrations of CD44 are capable of forming particularly aggressive tumours in animals (Birch *et al.*, 1991), largely due to the ability of CD44 to mediate cell attachment to HA (Bartolazzi *et al.*, 1994). The importance of CD44–HA interaction in tumour development has been shown by the suppression of tumour formation in the presence of soluble CD44 (Ahrens *et al.*, 2001) or anti-CD44 antibody (Guo *et al.*, 1994).

The use of CD44 as a diagnostic marker in human oncology was first suggested when it was shown that CD44 expression was greatly altered in several human tumours. Initial studies showed that tumour tissues contained a high number of CD44 molecules as compared with those present in corresponding normal tissues (Goodison *et al.*, 1999). However, the situation in respect of melanoma is confusing, since some workers have found that all human melanocytic lesions show strong uniform expression of CD44 (Schaidler *et al.*, 1998), whereas others have found a decreased expression of CD44 with increasing invasiveness (Harwood *et al.*, 1996) or metastasis (Seelentag *et al.*, 1997), or associated with a poor prognosis (Karjalainen *et al.*, 2000). In contrast, high CD44 expression by human melanomas was associated with an increased metastatic risk, according to Dietrich *et al.* (1997).

Recently, the characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody was reported by Alldinger *et al.* (1999). The aims of the present study were to investigate (1) the presence of CD44, hyaluronan and versican in canine melanoma cell lines with this specific monoclonal antibody, and (2) the presence of CD44 in canine melanocytic lesions, to assess its significance as a marker of malignancy in such lesions.

Materials and Methods

Cell Lines and Cell Culture

Canine melanoma cell lines CML-1 and CML-10c2 were originally derived from an oral and a cutaneous canine melanoma respectively (Wolfe *et al.*, 1987). Cells were grown in a humidified

atmosphere at 37°C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with fetal calf serum 10%, penicillin 100 U/ml, and streptomycin 100 µg/ml (Gibco BRL/Life Technologies, Rockville, MD, USA). The medium conditioned by the cells was then collected, and a cocktail of protease inhibitors (10 mM ethylene diamine tetraacetic acid [EDTA], 5 mM benzamidine, 5 mM *N*-ethylmaleimide, and 1 mM phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride [PMSF] [Sigma, St Louis, MO, USA]) was added to avoid proteolytic degradation.

Immunocytochemistry

Cells were grown on coverslips, rinsed with phosphate-buffered-saline (PBS) containing 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4, and fixed with a solution of paraformaldehyde 3% containing saccharose 2% for 20 min at room temperature. After rinsing with PBS, cells were made permeable by treatment with Triton X-100 0.1% in PBS for 10 min at room temperature and nonspecific binding sites were blocked by treatment for 20 min with a mixture of bovine serum albumin (BSA) 1% and goat serum 20% for versican or BSA 1% and rabbit serum 20% for CD44 detection. Cells were then incubated overnight at 4°C with rat monoclonal anti-CD44 antibody (1 in 200 in PBS; kindly provided by Dr S. Alldinger, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany) or polyclonal anti-versican antibody raised in our laboratory (1 in 100 in PBS) (Touab *et al.*, 2002). Subsequently, cells were washed four times with PBS and incubated with an anti-rat IgG antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1 in 320 in PBS; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) or anti-rabbit-FITC antibody (1 in 30 in PBS; Roche, Indianapolis, IN, USA), respectively, as secondary antibody. Nuclei were “visualized” by incubating the coverslips with the selective DNA-binding dye Hoetsch 33342 (bis benzamidine; 0.1 mg/ml) for 3 min. This dye also serves as a marker for cell viability since it binds DNA only from live cells. Cultures were studied with a Nikon Eclipse E800 epifluorescence microscope and photographed with an integrated camera system.

Western Blot Analysis

Cell extracts for CD44 determination were prepared by lysing CML-1 or CML-10c2 subconfluent cell cultures in Tris–HCl buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) (TBS) supplemented with Nonidet P40 (NP40) 1%, 10 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 1 mM PMSF. After shaking for 15 min

on ice the sample was centrifuged and the supernate analysed by sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). In the case of versican, aliquots of media conditioned by the growth of CML-1 or CML-10c2 subconfluent cell cultures were digested with chondroitinase ABC (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) (50 mU/ml in a solution containing 33 mM sodium acetate and 33 mM Tris-HCl, pH 8.0). The incubations were terminated by boiling the samples for 5 min. Samples were run in a 10% polyacrylamide-SDS gel in the case of CD44 or in a 3–10% gradient gel in the case of versican, under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P; Millipore Corp, Bedford, MA, USA). Membranes were placed in a blocking solution consisting of skimmed milk 5% in TBS and Tween-20 0.05% and incubated for 1 h at room temperature. After blocking, membranes were incubated with the anti-CD44 antibody (1 in 100) or the anti-versican antibody (1 in 1000) in skimmed milk 5% in TBS for 16 h at 4°C, washed, incubated with a secondary peroxidase-labelled antibody and developed by means of chemiluminescence (ECL System; Amersham Pharmacia Biotech).

Competitive Elisa Assay for Hyaluronan Determination

The method of Underhill *et al.* (1993) with some modifications was used. Microtitre plates (96-well) (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with HA conjugated to BSA 20 µg/ml, in PBS. After incubation for 2 h at 4°C, the plates were washed with PBS and blocked with calf serum 10% in PBS. Standard hyaluronan (50–1000 ng/ml; Sigma) and conditioned media were mixed with biotinylated hyaluronic acid binding protein (b-HABP) 0.65 µg 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 HA/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-labelled peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in PBS containing calf serum 10% was added to the wells before incubation at 4°C for 90 min and washing with PBS. The substrate solution was prepared just before use by dissolving 15 mg of 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline sulphonic acid (AEBT; Sigma) 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 colour developed (c. 20–30 min).

The absorbances were read at 405 nm, and a semi-log standard curve was used to calculate hyaluronan concentrations.

Demonstration of Pericellular Matrix

This was accomplished by means of a particle-exclusion assay as described by Evanko *et al.* (2001). Canine red blood cells were fixed in 10% formalin, washed, suspended in PBS (10⁸ cells/ml), introduced into sparse (50% confluence) cultures of CML-1 or CML-10c2 cells and allowed to settle for 15 min before photographing. In the case of cells producing a pericellular matrix, the red blood cells were sterically excluded from the HA/versican cell coat, which delineated a clear zone between the melanoma cells and the erythrocytes adjacent to cell margins. In the case of cells lacking a pericellular coat, red blood cells appeared immediately adjacent to the melanoma cells.

Immunohistochemistry

A total of 28 melanocytic tumours was studied, including 11 benign melanocytic lesions and 17 malignant melanomas. Sixteen of the 17 malignant melanomas were within the oral cavity, and the other was cutaneous. Nine of the 11 benign melanomas were of cutaneous origin, one being situated in the vulva and the other in the sclerocornea. Slides and paraffin wax blocks were selected from the archives of the Pathology Department at the Facultat de Veterinària (UAB).

Sections (4 µm) were cut from the paraffin wax blocks. After blocking the nonspecific sites with goat serum 20% in TBS for 30 min, the sections were incubated with the CD44 antibody (1 in 100 in TBS) at 4°C overnight (Alldinger *et al.*, 1999). After washing several times, they were then incubated with a secondary antibody, (biotin-labelled goat anti-rat IgG; Amersham Pharmacia Biotech), at a 1 in 400 dilution in TBS for 1 h at room temperature. Avidin-biotin and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) were used as the detection system. In negative controls, preimmune rat serum was used instead of the CD44 monoclonal antibody. The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin.

The sections were examined "double-blindly" by two observers (RR, MS) and the intensity of labelling of CD44-positive neoplastic cells was evaluated as follows: -, none; +, very mild; ++, mild; +++, moderate; +++++, intense.

Statistical analyses were performed by the Wilcoxon Rank Sum test and the SAS[®] statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Presence of CD44 in Canine Melanoma Cell Lines

Cell extracts from subconfluent cultures of CML-1 and CML-10c2 canine melanoma cell lines were prepared and analysed by the Western blot technique with monoclonal antibody against canine CD44. The results (Fig. 1A) show that both cell lines produced CD44. The pattern consisted of a single band of *c.* 80 kDa. The cellular location of CD44 was analysed immunocytochemically with

the same antibody. As seen in Fig. 1B, CD44 appeared to be confined mainly to the cell surface. The expression of CD44 was similar in both cell lines.

Production of Hyaluronan and Versican by Canine Melanoma Cell Lines

Since CD44 is the main receptor for hyaluronan, and versican is another ligand for this large polysaccharide, the next step was to determine

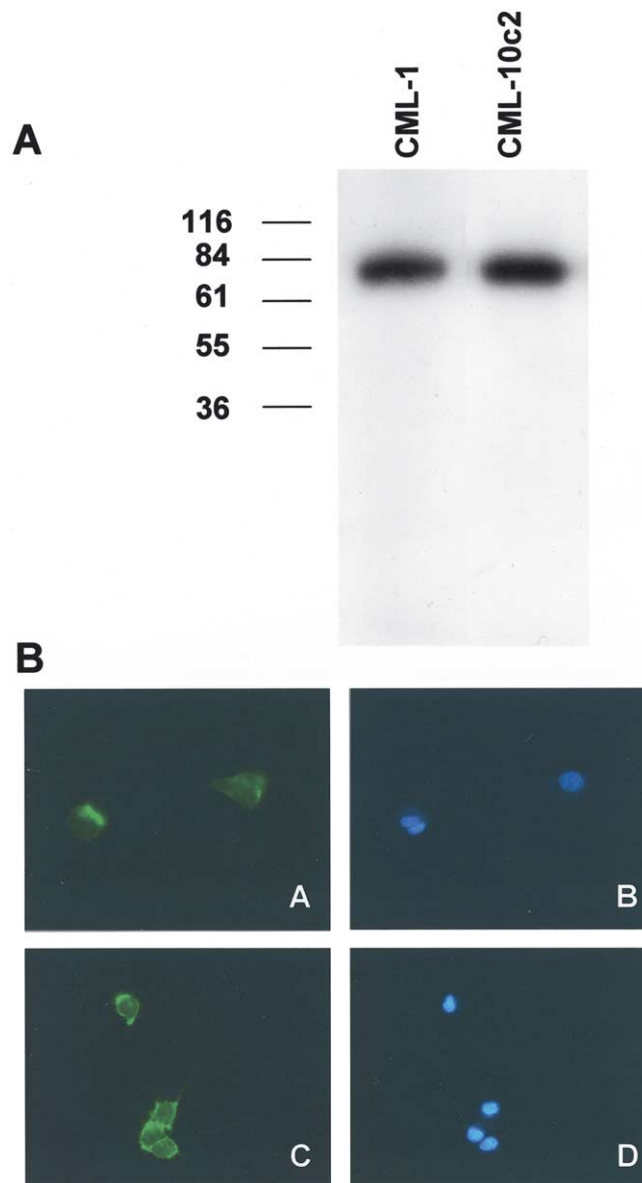


Fig. 1. Identification of CD44 in canine melanoma cell lines. (A) Western blot with monoclonal anti-CD44 antibody; cell extracts from subconfluent CML-1 and CML-10c2 canine melanoma cells show a *c.* 80-kDa band reacting positively with the antibody. Molecular weight markers are shown diagrammatically on the left. (B) CD44 immunocytochemistry in subconfluent CML-1 (A,B) and CML-10c2 (C,D) melanoma cells. CD44 is found mainly at specific regions at the cell surface (A,C). Cell viability was assessed by staining the nuclei with Hoetsch stain (B,D). $\times 400$.

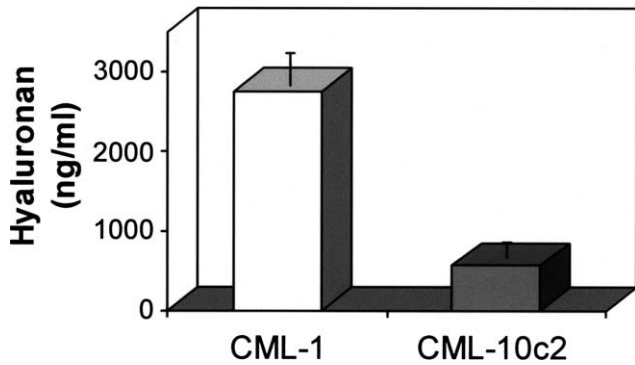


Fig. 2. Hyaluronan concentration in the conditioned growth medium of CML-1 canine melanoma cells is five times higher than in that of CML-10c2 cells. HA determination was performed by ELISA.

whether the cell lines used in this study produced any of these molecules. HA expression was detected by competition ELISA with biotinylated hyaluronic acid binding protein (b-HABP). Fig. 2 shows the results obtained in these experiments. Both cell lines produced hyaluronan, but approximately five times more HA was detected in medium conditioned by CML-1 than in that conditioned by CML-10c2.

The presence of versican in conditioned medium was determined by Western blotting with an antibody raised in our laboratory. The results (Fig. 3A) showed that CML-1 but not CML-10c2 cells expressed the V0 and V1 isoforms of versican. An unidentified third band recognized by the antibody

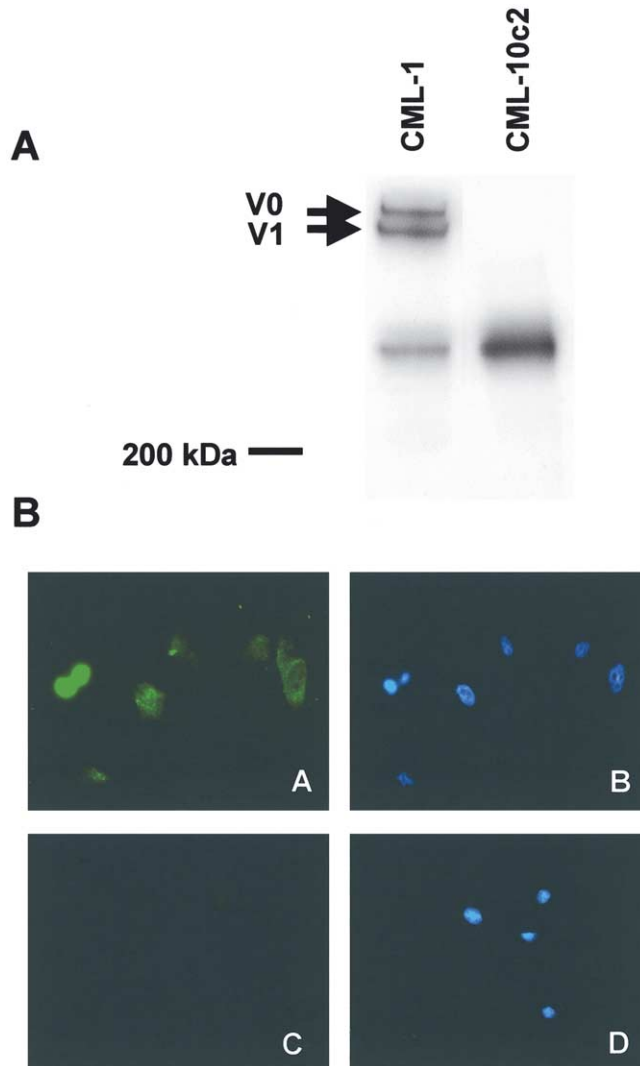


Fig. 3. Identification of versican in canine melanoma cell lines. (A) Western blot with the polyclonal anti-versican antibody; conditioned growth medium from subconfluent CML-1 canine melanoma cells, treated with chondroitinase ABC, shows a pattern of two bands corresponding to the V0 and V1 isoforms of versican. CML-10c2 cells lack versican. (B) Versican immunocytochemistry. Versican has a diffuse cytoplasmic pattern of expression in CML-1 melanoma cells (A), whereas it is absent from CML-10c2 cells (C). Cell viability was assessed by staining the nuclei with Hoetsch stain (B,D). $\times 400$.

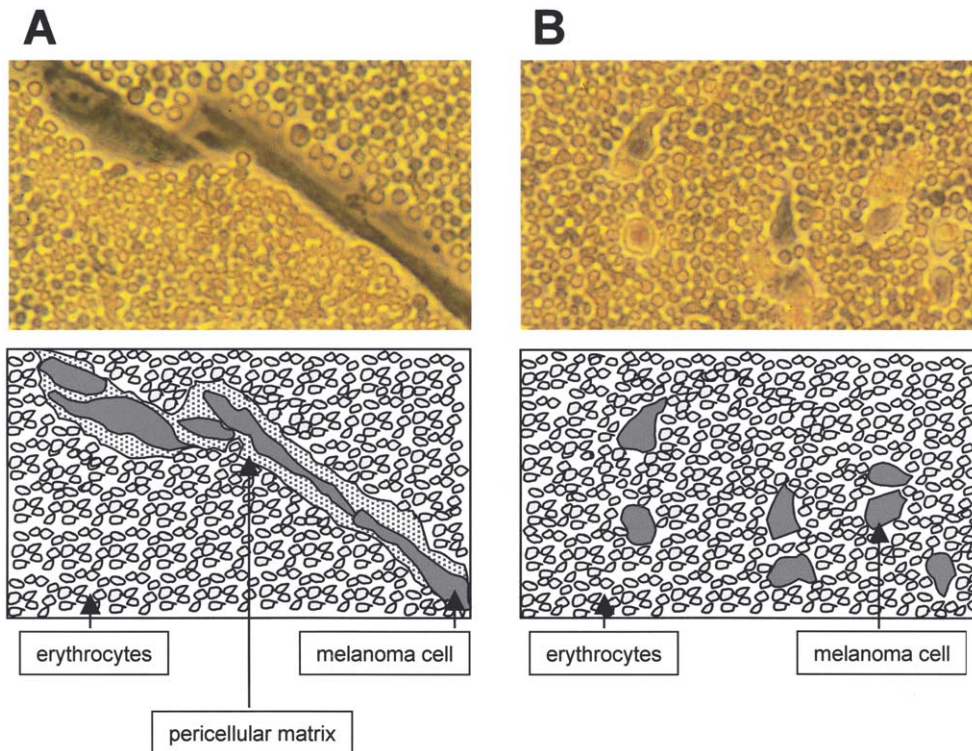


Fig. 4. Pericellular matrix formation by CML-1 and CML-10c2 canine melanoma cell lines. (A) CML-1 cells exclude erythrocytes from the upper surface and from the margins, indicating the presence of a pericellular coat. (B) CML-10c2 cells allow the red blood cells to settle adjacent to the membrane, indicating the absence of a cell coat. $\times 400$. The diagram below, which indicates the components in each figure, is shown for clarity.

was also observed, but its molecular weight did not correspond to any versican isoform. These results accorded with our previous results (Serra *et al.*, 2002). Results similar to those obtained by Western blotting were obtained immunocytochemically; the precursor or metabolized versican molecules were demonstrated inside the cell (Fig. 3B), since the antibody recognizes only the protein part of the molecule, rather than the entire proteoglycan form.

Pericellular Matrix Produced by Canine Melanoma Cell Lines

The HA-based pericellular matrix produced by CML-1 and CML-10c2 cell lines was demonstrated by means of a particle exclusion assay. As seen in Fig. 4, CML-1 cells excluded red blood cells from the immediate vicinity of their upper surfaces and margins, indicating the existence of a coat surrounding the cells. CML-10c2 cells did not show this feature; this was consistent with a reduced cell coat, which allowed red blood cells to settle immediately adjacent to the cell margins.

Presence of CD44 in Benign and Malignant Canine Melanomas

Immunohistochemical examination of melanocytic lesions revealed a significant difference ($P < 0.01$) between benign and malignant melanomas in terms of CD44 expression. As seen in Table 1, 36% of benign melanomas did not express CD44, while in the remainder, CD44 expression ranged from very mild to moderate (Fig. 5A, B). All but one malignant melanoma expressed CD44 (Fig. 5C–F). CD44 was confined to the cell membranes (Fig. 5C, D) and was clearly expressed in neoplastic cells arranged in nests (Fig. 5E, F).

Table 1
CD44 expression in canine melanocytic tumours

Tumours	Number (and %) of tumours in which CD44 expression was graded				
	-	+	++	+++	++++
Benign (n = 11)	4 (36)	2 (18)	1 (9)	4 (36)	0 (0)
Malignant (n = 17)	1 (6)	3 (17)	1 (6)	4 (24)	8 (47)

- , None; +, very weak; ++, weak; +++, moderate; +++++, intense.

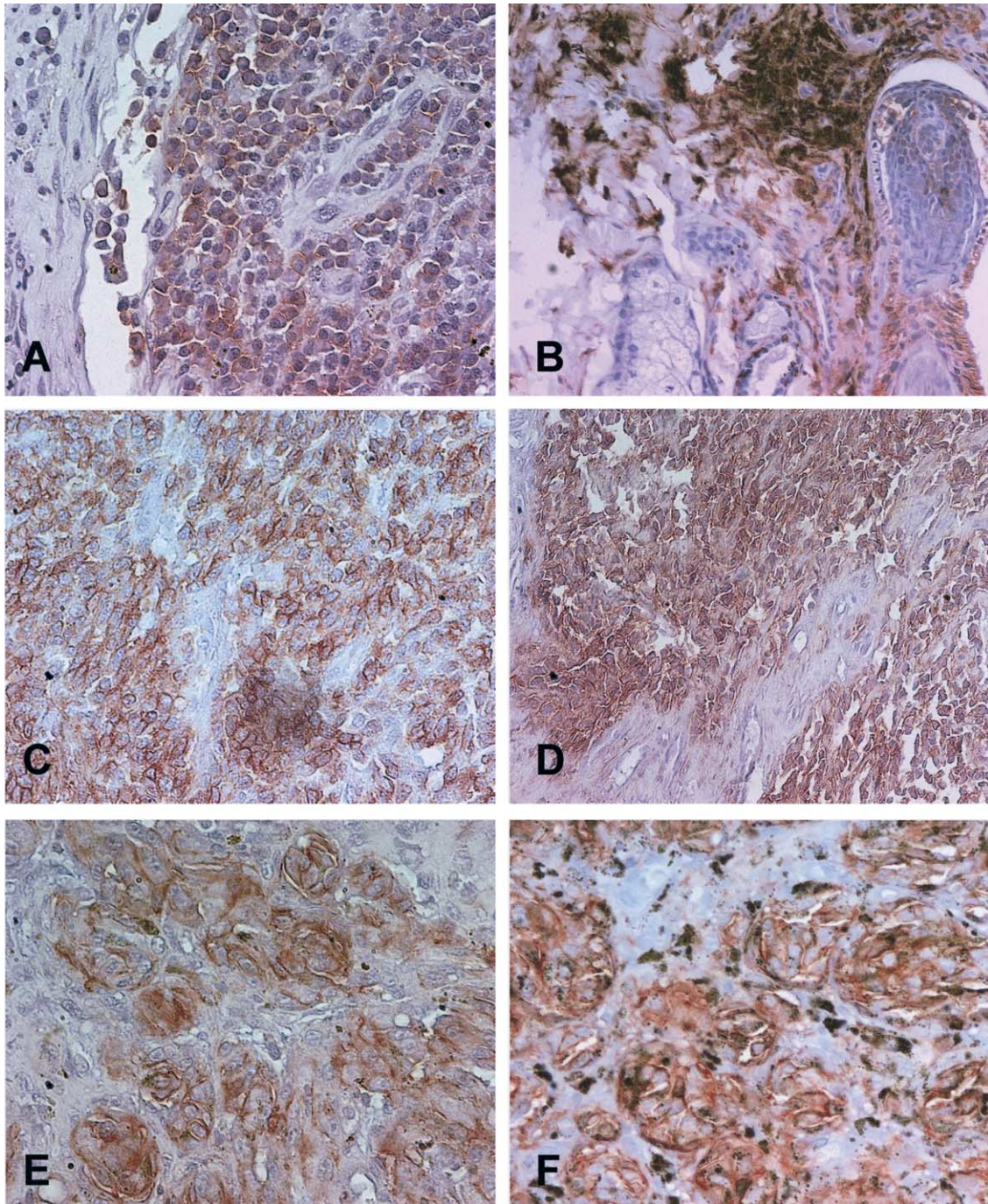


Fig. 5. Immunodetection of CD44 in benign (A, B) and malignant melanomas (C–F). CD44 immunoreactivity is lower in melanocytomas (A, score ++; B, score +++) than in malignant melanomas (C–F [oral], score ++++). Expression of CD44 at the cell membrane (C, D) and in nests of neoplastic cells (E, F) is shown. ABC method, Mayer's haematoxylin counterstain. A, C, D, E, F: $\times 400$. B: $\times 200$.

Intratumoral CD44 expression also differed between benign and malignant melanomas, benign and malignant lesions scored as moderate or intense showing different patterns of CD44 expression (Fig. 6A). Thus, benign CD44-expressing melanomas showed a uniform homogeneous pattern inside the lesion; in

malignant melanomas, however, the expression of CD44 tended to be more intense at the periphery of the tumour. The rest of the tumours showed a random distribution of the antigen. Examples of the homogeneous and peripheral patterns of CD44 expression are shown in Fig. 6B.

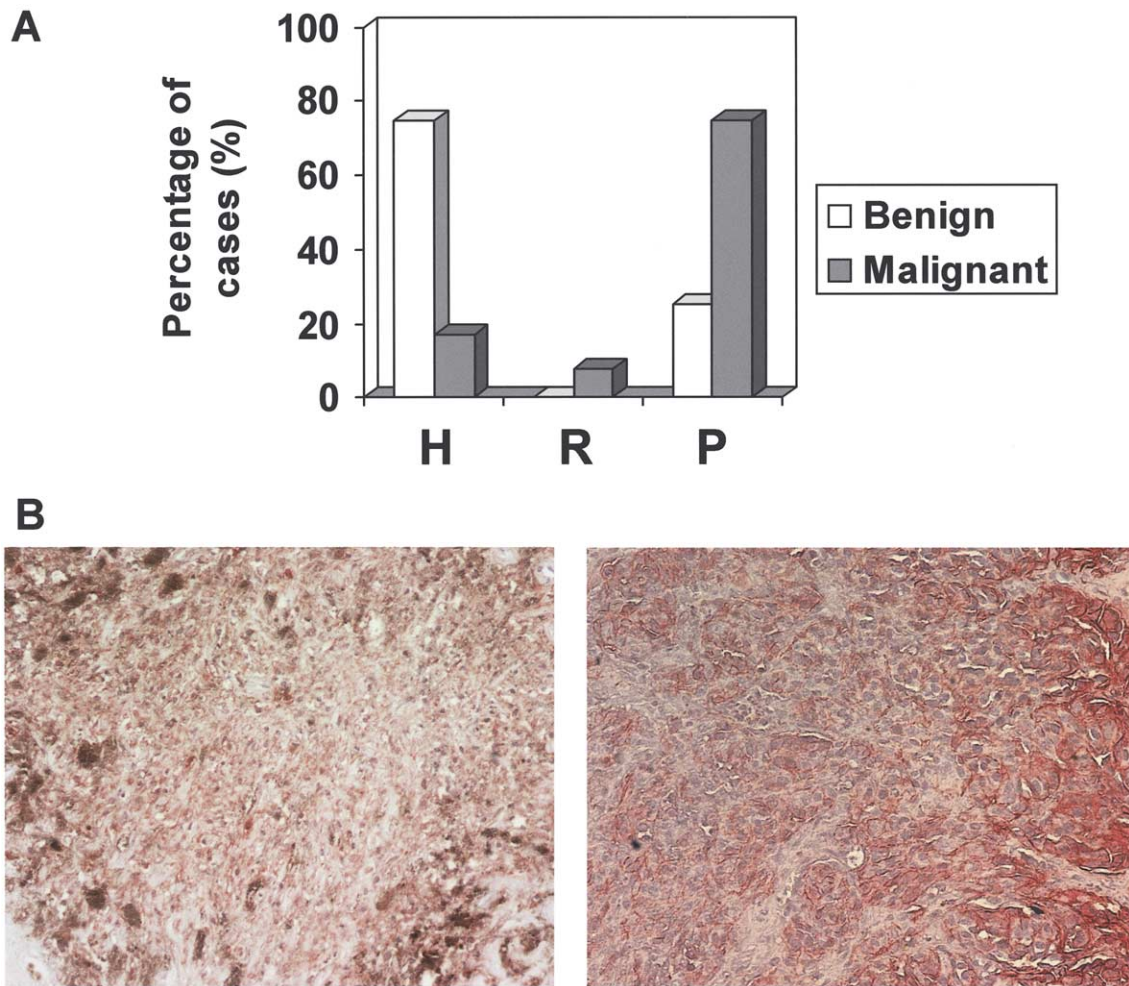


Fig. 6. (A) The distribution of CD44 expression from benign lesions scored as moderate (score +++) was mainly homogeneous (H) in the tumours (75%), whereas in malignant melanomas scored as moderate or intense (score +++ or ++++) expression was mainly concentrated at the periphery (P) of the tumours (75%). In the rest of positive tumours (score +++ or ++++), CD44 was distributed with a random (R) pattern. (B) *Left*: Melanocytoma with moderate expression of CD44 (score +++) localized uniformly in the tumour. *Right*: Malignant melanoma with intense expression of CD44 (score ++++) localized mainly in the periphery of the tumour. ABC method, Mayer's haematoxylin counterstain. $\times 200$.

Discussion

CD44 and its ligand hyaluronan are implicated in human and murine melanoma cell proliferation and migration (Faassen *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1992, 1993; Knutson *et al.*, 1996; Peck and Isacke, 1996; Ahrens *et al.*, 2001). CD44 was expressed in the two canine melanoma cell lines used in this study as a cell membrane-bound protein of around 80 kDa. In many species, CD44 is found in several isoforms formed by alternative splicing of 10 variant exons (Goodison *et al.*, 1999; Bajorath, 2000). Although nothing is known about canine isoforms, extrapolation from human data suggests that the isoform found in canine melanoma cell lines corresponds to the standard form of CD44, i.e., the isoform that does not carry any of

the variant exons. This is similar to what is found in human melanoma cell lines (East *et al.*, 1993; Manten-Horst *et al.*, 1995; Goebeler *et al.*, 1996).

Hyaluronan is a large polysaccharide that forms a tridimensional lattice in the extracellular medium. This extracellular coat is formed by hyaluronan, versican and other glycoproteins such as tenascin (Yamaguchi, 2000), and constitutes the scaffold that surrounds the cells and maintains the equilibrium between adhesion and migration ability. Membrane-bound CD44 receives the information provided by this lattice and signals to the cell machinery (Turley *et al.*, 2002), triggering proliferation and migration (Thomas *et al.*, 1992; Ahrens *et al.*, 2001). Our results showed that CML-1 cells express CD44, produce high amounts of HA and express versican, whereas CML-10c2 cells

display a similar surface expression of CD44, produce HA in lower amounts, and do not express versican. Moreover, a particle exclusion assay demonstrated a pericellular coat in CML-1 but not CML-10c2 cells. These results support the hypothesis that all three components (CD44, HA and versican) are needed to sustain a pericellular matrix. This may have functional consequences since our previous work with human melanoma cell lines demonstrated that versican was capable of increasing cell proliferation and decreasing cell adhesion *in vitro* (Touab *et al.*, 2002), and thus may contribute to the aggressive behaviour of melanoma cells.

Dietrich *et al.* (1997) found an association between high CD44 surface expression on human primary cutaneous melanomas and increased metastatic risk, whereas Karjalainen *et al.* (2000) found that CD44 was decreased in metastatic melanomas. The present study showed that CD44 expression was higher in canine malignant melanomas than in melanocytomas. This difference between canine and human patients may be due to the fact that canine malignant melanomas are usually localized in the oral mucosa (16 out of 17 in the present study), whereas malignant melanomas in man are mainly of cutaneous origin, the incidence of human oral melanoma being only 1–2% (Smith *et al.*, 2002). In our panel of tissues, only one of the malignant lesions was localized in the skin, and in this tumour CD44 expression was scored as ++++. The environment of the oral mucosa is different from that of the skin, especially with regard to the hyaluronan content (Tammi *et al.*, 1990), and this may explain some of the differences between human and canine CD44 expression.

A noteworthy finding was the different CD44 distribution within benign and malignant lesions. Amongst tumours with a comparatively high CD44 expression, the benign ones showed homogeneous expression in all regions of the tumour (three of four cases), whereas nine of 12 malignant tumours showed CD44 expression that was strikingly intense in the periphery of the lesion. The results suggest that this distribution is related to external areas of proliferation in the tumour and that CD44 expression may be one factor supporting tumour cell proliferation.

Acknowledgments

We thank Dr Susanne Alldinger (Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany) for providing the anti-CD44 antibody, Dr Josep Pastor (Facultat de

Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) for providing the cell lines, Dr Jesús Giraldo (Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain) for his help with the statistical analysis and Ms Anna Vilalta for excellent technical assistance. This work was supported by grant 00/1016 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and 2001SGR00193 from the Generalitat de Catalunya. M.S. and C.D. were supported by a fellowship from the Generalitat de Catalunya.

References

- Ahrens, T., Sleeman, J. P., Schempp, C. M., Howells, N., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P. and Simon, J. C. (2001). Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene*, **20**, 3399–3408.
- Alldinger, S., Baumgartner, W., Kremmer, E. and Fonfara, S. (1999). Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. *Journal of Veterinary Medicine A*, **46**, 19–32.
- Bajorath, J. (2000). Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins*, **39**, 103–111.
- Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. and Stamenkovic, I. (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *Journal of Experimental Medicine*, **180**, 53–66.
- Birch, M., Mitchell, S. and Hart, I. R. (1991). Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Research*, **51**, 6660–6667.
- Dietrich, A., Tanczos, E., Vanscheidt, W., Schopf, E. and Simon, J. C. (1997). High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *European Journal of Cancer*, **33**, 926–930.
- East, J. A., Mitchell, S. D. and Hart, I. R. (1993). Expression and function of the CD44 glycoprotein in melanoma cell lines. *Melanoma Research*, **3**, 341–346.
- Evanko, S. P., Johnson, P. Y., Braun, K. R., Underhill, C. B., Dudhia, J. and Wight, T. N. (2001). Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **394**, 29–38.
- Faassen, A. E., Schrage, J. A., Klein, D. J., Oegema, T. R., Couchman, J. R. and McCarthy, J. B. (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *Journal of Cell Biology*, **116**, 521–531.
- Goebeler, M., Kaufmann, D., Brocker, E. B. and Klein, C. E. (1996). Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with

- functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *Journal of Cell Science*, **109**, 1957–1964.
- Goodison, S., Urquidi, V. and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology*, **52**, 189–196.
- Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M. and Sy, M. S. (1994). Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Research*, **54**, 1561–1565.
- Harwood, C. A., Greenm, M. A. and Cook, M. G. (1996). CD44 expression in melanocytic lesions: a marker of malignant progression? *British Journal of Dermatology*, **135**, 876–882.
- Karjalainen, J. M., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Eskelinen, M. J., Agren, U. M., Parkkinen, J. J., Alhava, E. M. and Kosma, V. M. (2000). Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *American Journal of Pathology*, **157**, 957–965.
- Knutson, J. R., Iida, J., Fields, G. B. and McCarthy, J. B. (1996). CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Molecular Biology of the Cell*, **7**, 383–396.
- Manten-Horst, E., Danen, E. H., Smit, L., Snoek, M., Le Poole, I. C., Van Muijen, G. N., Pals, S. T. and Ruiter, D. J. (1995). Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *International Journal of Cancer*, **64**, 182–188.
- Peck, D. and Isacke, C. M. (1996). CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Current Biology*, **6**, 884–890.
- Schaidler, H., Soyer, H. P., Heider, K. H., Hofmann-Wellenhof, R., Zatloukal, K., Smolle, J. and Kerl, H. (1998). CD44 and variants in melanocytic skin neoplasms. *Journal of Cutaneous Pathology*, **25**, 199–203.
- Seelentag, W. K., Boni, R., Gunthert, U., Futo, E., Burg, G., Heitz, P. U. and Roth, J. (1997). Expression of CD44 isoforms and beta 1,6-branched oligosaccharides in human malignant melanoma is correlated with tumor progression but not with metastatic potential. *Journal of Cutaneous Pathology*, **24**, 206–211.
- Serra, M., Pastor, J., Domenzain, C. and Bassols, A. (2002). 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. *American Journal of Veterinary Research*, **63**, 1151–1158.
- Smith, S. H., Goldschmidt, M. H. and McManus, P. M. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, **39**, 651–678.
- Tammi, R., Tammi, M., Hakkinen, L. and Larjava, H. (1990). Histochemical localization of hyaluronate in human oral epithelium using a specific hyaluronate-binding probe. *Archives of Oral Biology*, **35**, 219–224.
- Thomas, L., Byers, H. R., Vink, J. and Stamenkovic, I. (1992). CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *Journal of Cell Biology*, **118**, 971–977.
- Thomas, L., Etoh, T., Stamenkovic, I., Mihm, M. C. Jr and Byers, H. R. (1993). Migration of human melanoma cells on hyaluronate is related to CD44 expression. *Journal of Investigative Dermatology*, **100**, 115–120.
- Touab, M., Villena, J., Barranco, C., Arumi-Uria, M. and Bassols, A. (2002). Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *American Journal of Pathology*, **160**, 549–557.
- Turley, E. A., Noble, P. W. and Bourguignon, L. Y. (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 4589–4592.
- Underhill, C. B., Nguyen, H. A., Shizari, M. and Culty, M. (1993). CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Developmental Biology*, **155**, 324–336.
- Wolfe, L. G., Oliver, J. L. and Smith, B. B. (1987). Biologic characterization of canine melanoma cell lines. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 1642–1648.
- Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Science*, **57**, 276–289.
- Zimmermann, D. R. (2000). Versican. In: *Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions*, R. V. Iozzo, Ed., Marcel Dekker, New York, pp. 327–341.

[Received, April 9th, 2003]
 [Accepted, October 30th, 2003]

Discussió

Un dels objectius inicials del projecte va ser caracteritzar el model caní a nivell cel·lular i molecular per tal d'avaluar les seves similituds amb el melanoma humà i, per tant, la utilitat del gos com a model experimental.

En aquest sentit es va començar per la caracterització de tres línies cel·lulars de melanoma caní, centrant-nos en l'estudi de PGs i efectes de factors de creixement, molècules totes elles implicades en els fenòmens d'invasió i metàstasi. Per això es van utilitzar tres línies de melanoma caní: CML-1, CML-6M i CML-10c2. D'aquest primer objectiu en sorgí el primer article.

En veure l'expressió diferencial de versicà, tant en les cèl·lules de melanoma caní estudiades com en cèl·lules de melanoma humà prèviament, i tenint en compte els resultats previs del laboratori que demostraven el paper del versicà com a inductor de la proliferació i inhibidor de l'adhesió en melanoma (Touab et al., 2002), el següent objectiu va ser la sobreexpressió a cèl·lules humanes i canines de melanoma de la isoforma curta de versicà V3, a la qual li manquen les cadenes GAG, i estudiar la possible reversió del fenotip maligne de les cèl·lules de melanoma estudiades. D'aquest objectiu en sortí el segon article (enviat).

Per últim, per continuar l'estudi del gos com a model del melanoma humà i veient els resultats obtinguts en relació amb versicà, CD44 i HA, es va decidir estudiar aquest complex tant en les cèl·lules canines *in vitro* com en biòpsies de melanoma caní *in vivo*. D'aquest darrer objectiu en sorgí el tercer article.

Seguint aquestes premisses, la discussió dels nostres resultats s'estructura en tres apartats:

1. Expressió de proteoglicans *in vitro* 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.
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.
3. Expressió de CD44 en melanomes canins.

1. Expressió de proteoglicans *in vitro* 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

Expressió de proteoglicans *in vitro* en tres línies cel·lulars de melanoma caní: CML-1, CML-6M i CML-10c2

Els tumors espontanis en els animals de companyia ofereixen una oportunitat única com a models per a l'estudi de la biologia tumoral humana, així com la seva possible terapèutica. El melanoma es troba dins dels tipus tumorals més interessants en aquestes espècies gràcies a la seva relativa elevada incidència, a un comportament biològic similar, respostes als agents citotòxics comparables i una curta vida, així com una mida corporal relativament gran. El model de l'animal de companyia i en el cas del melanoma, concretament del gos, pot proporcionar poblacions útils per provar l'eficàcia i toxicitat de noves teràpies (Vail i MacEwen, 2000).

La disponibilitat de línies cel·lulars de melanoma caní pot proporcionar un útil sistema *in vitro*, una font important d'investigació dels mecanismes de melanogènesi i d'estudi de característiques patològiques i immunològiques d'aquest tumor, tal com han proporcionat les línies cel·lulars de melanoma humanes i murines establertes. A més, no hi ha bons models de melanoma en els animals de laboratori més comuns com la rata i el ratolí. En aquest sentit, Wolfe *et al.* (1987) van establir i caracteritzar parcialment vuit línies cel·lulars canines de melanoma derivades de melanomes espontanis. El nostre treball ha tingut com a primer objectiu ampliar la caracterització de tres d'aquestes línies cel·lulars.

La línia CML-1 va ser establerta a partir d'un melanoma oral primari, per tant d'un melanoma maligne. Aquesta línia es caracteritza per tenir una forma fusiforme, una baixa relació nucli/citoplasma i un nucli ovalat-allargat, i uns límits citoplasmàtics ben definits. La línia cel·lular CML-6M deriva d'una lesió metastàtica a limfonode amb un origen primari cutani a tòrax, per tant també prové d'un melanoma maligne. Es caracteritza per una forma epitelioida (poligonal) amb una relació nucli/citoplasma elevat, el nucli es rodó-ovalat i conté un o dos nuclèols prominents, i els límits citoplasmàtics no estan ben definits. En el seu origen és pigmentada, però només es detecta en els cultius primaris i primers passatges, mentre que a partir del 5è passatge ja es troben totes les cèl·lules amelanòtiques. Aquesta línia cel·lular és altament metastàtica, ja que produï metàstasis experimentals en el 50% dels ratolins inoculats (Wolfe *et al.*, 1987). La línia cel·lular CML-10c2 es va establir com a un clon en agar tou derivat de la CML-6M (Oliver i Wolfe, 1992). És, doncs, una línia cel·lular derivada d'un melanoma maligne, de forma epitelioida, no

pigmentada i amb una elevada relació nucli/citoplasma. En l'establiment d'aquestes línies es definiren les característiques morfològiques i els patrons de creixement estables des del passatge 40 fins el 120, marge entre el qual ens hem mantingut en tots els estudis realitzats en les tres línies cel·lulars estudiades (normalment entre el passatge 40 i el 80).

Diferents proteoglicans tipus condroitin sulfat (CSPG) influeixen en el comportament de la cèl·lula de melanoma i s'han proposat com a reguladors essencials de l'adhesió, proliferació i migració. S'ha descrit un augment dels CSPGs durant la transició dels melanòcits normals a nevus (Meier et al., 1998). L'expressió de proteoglicans s'ha relacionat freqüentment al desenvolupament de tumors malignes (revisat per Iozzo, 1988). El versicà s'ha identificat en línies cel·lulars de melanoma humà indiferenciades i en melanomes malignes, i és responsable de disminuir l'adhesió cel·lular i incrementar la proliferació cel·lular en les línies de melanoma humà (Touab et al., 2002). També es troba incrementat en altres tipus tumorals com càncer de mama (Nara et al., 1997), histiocitoma (Isogai et al., 1996) i càncer de pròstata (Ricciardelli et al., 1997; Ricciardelli et al., 1998).

El marcatge mitjançant [³⁵S]-sulfat proporciona una mesura directa de la massa de GAGs sintetitzada durant el període de marcatge, ja que el [³⁵S] s'incorpora a les cadenes sulfatades (revisat per Calabro et al., 2000). A les línies cel·lulars CML-1 i CML-6M es va identificar una banda tipus CSPGs (només obtinguérem digestió mitjançant la condroitinasa ABC) amb un elevat pes molecular, situada a la interfase entre el gel separador i el gel concentrador. Quan les mostres marcades amb [³⁵S]-metionina es van tractar amb condroitinasa ABC s'identificava una proteïna nucli formada per dues bandes de diferent pes molecular, superiors a 400 kDa. Al laboratori, ja s'havia detectat un PG de característiques molt similars expressat per la línia d'astrocitoma humà U-251 i diverses línies de melanoma humà en estat de diferenciació primerenca. Aquest PG d'alt pes molecular es va identificar com a versicà (Touab et al., 2002). Per confirmar la identitat d'aquest proteoglicà d'alt pes molecular en les nostres línies cel·lulars canines s'usà l'anticòs policlonal preparat en el nostre laboratori (ja prèviament comparat amb anticossos contra versicà proporcionats pel Dr. D. R. Zimmermann, Universitat de Zurich, Suïssa). Aquest anticòs va reconèixer aquestes dues bandes en les línies cel·lulars CML-1 i CML-6M, demostrant la presència de versicà en aquestes cèl·lules. També s'havia vist prèviament al laboratori la presència de versicà en cultius de cèl·lules de melanoma humà mitjançant immunocitoquímica usant el mateix anticòs. Els pesos moleculars aproximats calculats per a les dues bandes del cor proteic en l'electroforesi mitjançant SDS-PAGE, després de la digestió amb condroitinasa ABC, són de 550 i 500 kDa, que corresponen a les isoformes V0 i V1, respectivament (revisat per Zimmermann, 2000). La isoforma més abundant tant en

CML-1 com CML-6M és V1, de manera similar a diverses línies de melanoma humana indiferenciades. En canvi, la línia cel·lular CML-10c2 no expressa cap isoforma de versicà. L'absència d'expressió de versicà de CML-10c2 s'assimila a l'absència d'expressió que trobem en les cèl·lules diferenciades de melanoma humana.

Per tant, els nostres resultats *in vitro* mostren que les dues línies cel·lulars canines de melanoma maligne CML-1 i CML-6M expressen les isoformes V0 i V1 de versicà i, per tant, possiblement tindrien caràcter de cèl·lules indiferenciades. Recentment el nostre grup ha descrit que la regulació de l'expressió de versicà es correlaciona amb el grau de diferenciació de les cèl·lules de melanoma humana, estant absent en les cèl·lules diferenciades, mentre que és abundant en les cèl·lules indiferenciades (Domenzain et al., 2003). L'absència de versicà en la línia cel·lular CML-10c2 suggereix que aquestes cèl·lules tenen un grau de diferenciació més avançat, possiblement adquirit en el seu procés d'establiment (recordem que deriven de la línia cel·lular CML-6M). De totes maneres, no tenim suficients dades d'aquestes línies canines per confirmar aquesta hipòtesi i caldria fer una caracterització molecular més àmplia. Les isoformes produïdes per CML-1 i CML-6M són V0 i V1, de manera similar a les isoformes produïdes en diferents tipus de tumors cerebrals humans (Paulus et al., 1996; Touab et al., 2002).

El versicà pertany a la família dels hialectans, la qual també inclou l'agrecà, neurocà i brevicà. Són proteoglicans tipus condroitin sulfat presents a la matriu extracel·lular, i que es caracteritzen per formar complexes amb l'àcid hialurònic. El versicà és probablement el membre més versàtil de la família d'acord amb la seva estructura i distribució tissular. Fins avui es coneixen les seqüències del versicà humana (Dours-Zimmermann i Zimmermann, 1994), de ratolí (Ito et al., 1995), boví (Schmalfeldt et al., 1998) i de pollastre, conegut com PG-M (Shinomura et al., 1993). Tal com es detalla en la introducció, s'han identificat diverses isoformes de versicà provinents de processos de *splicing alternatiu* que generen quatre variants al versicà humana, boví i de ratolí (Zako et al., 1995; Zako et al., 1997). Les diferències entre les variants per *splicing* es troben en la porció central del cor proteic. En la isoforma V0 del versicà trobem dos segments portadors de condroitin sulfats, anomenats GAG- α i GAG- β , mentre que a les isoformes més petites V1 i V2 falta el domini GAG- α o GAG- β , respectivament. Cap dels mòduls portadors de glicosaminoglicans es troben en la isoforma V3 del versicà (Fig. 33).

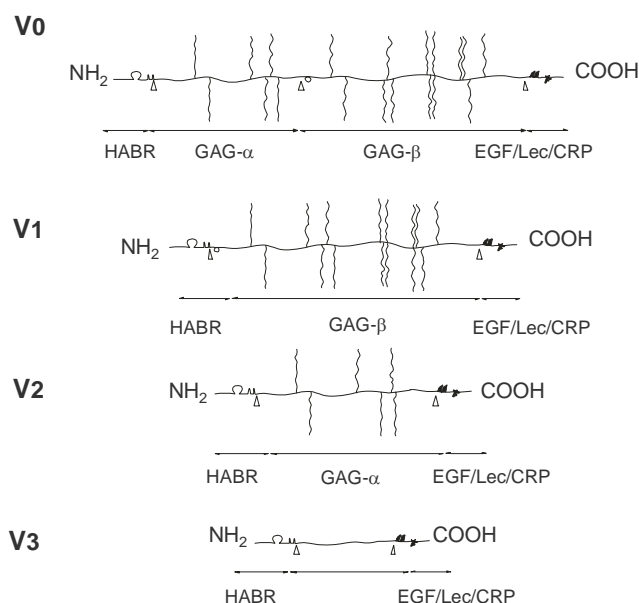


Figura 33. Les diferents isoformes del versicà.

No és estrany trobar versicà (isoformes V0 i V1) a les cèl·lules de melanoma ja que hem de recordar que les cèl·lules pigmentades procedeixen de la cresta neural i, per tant, tenen un origen neuroectodèrmic (Crelin, 1974). Proposem, doncs, que en el cas de les cèl·lules de melanoma l'expressió de versicà és indicatiu d'un procés de desdiferenciació dels melanòcits en la seva progressió a melanoma. Resultats obtinguts recentment en el nostre grup han descrit com les cèl·lules de melanoma humana expressen versicà (V0 i V1), mentre que deixen d'expressar-ne quan es diferencien *in vitro* (Domenzain et al., 2003). De fet, les isoformes V0 i V1 són expressades transitòriament per un elevat nombre de teixits en estat proliferatiu durant el desenvolupament embrionari (Kimata et al., 1986) i la isoforma V0 és la més abundant durant el moviment de les cèl·lules de la cresta neural (Perissinotto et al., 2000). De tota manera, això no vol dir que no es trobi versicà en els teixits adults, ja que sobretot es troba versicà (V1 és la isoforma prevalent en teixits adults humans i murins) en teixits connectius d'òrgans interns i en teixits de múscul llis, sobretot als vasos sanguinis (Cattaruzza et al., 2002). A la pell es troba versicà a la dermis i capa basal de l'epidermis.

Les funcions suggerides dels proteoglicans agregadors van des de suport estructural de matrius riques en hialurònic a rols moduladors en l'adhesió cel·lular, migració i proliferació. També s'ha descrit que el versicà indueix un augment de proliferació i migració cel·lular, mentre que produeix una disminució de l'adhesió cel·lular (Touab et al., 2002). Aquests resultats

obtinguts al nostre laboratori suggereixen que el versicà podria estar implicat en el procés de desdiferenciació de les cèl·lules de melanoma en relació amb el melanòcit, cosa que podria facilitar la no adhesió de les cèl·lules tumorals i promoure'n el seu creixement, contribuint a una malignitat superior dels melanomes indiferenciats.

De fet, resultats similars s'han descrit en altres tipus cel·lulars, ja que Yamagata *et al.* (1989) van demostrar que les isoformes V0 i V1 interfereixen amb l'adhesió de vèries cèl·lules al col·lagen I, fibronectina i laminina, inhibició mediada aparentment per les cadenes de glicosaminoglicans. Les isoformes del versicà també poden participar en el control de la proliferació cel·lular com es suggereix per l'expressió incrementada durant la proliferació de fibroblasts dèrmics i queratinòcits (Zimmermann *et al.*, 1994). L'increment de versicà a la matriu tumoral sembla tenir dues possibles raons: un mecanisme de l'hoste formant barreres de dipòsits de versicà a les cèl·lules tumorals invasores, o aquestes matrius riques en versicà proporcionen un ambient favorable pel creixement tumoral i la locomoció (revisat per Zimmermann, 2000). En el cas de càncer de pròstata es suggereix que el rol del versicà pot ser desestabilitzar els contactes focals de les cèl·lules (Ricciardelli *et al.*, 1997; Ricciardelli *et al.*, 1998).

En el cas del melanoma, la detecció de versicà es correlaciona amb la producció d'HA (Turley i Tretiak, 1985; Knudson *et al.*, 1996). El versicà interacciona amb l'HA a través del seu domini N-terminal i, per tant, el complex versicà-HA pot formar matrius riques en HA que produirien un ambient dilatat i hidrofílic que deformaria la MEC compacta i facilitaria el moviment cel·lular. Aquests canvis moleculars a la MEC podrien contribuir a l'elevada mobilitat de les cèl·lules indiferenciades de melanoma i incrementar la capacitat de migrar i desenvolupar lesions metastàtiques.

Al nostre laboratori s'ha descrit, mitjançant la immunohistoquímica, que el versicà podria servir de marcador pel melanoma, ja que s'han detectat diferències d'expressió entre diferents lesions melanocítiques humanes i el versicà podria servir d'ajuda pel diagnòstic correcte d'aquest tipus de lesions, sobretot participant en el reconeixement i gradació dels nevus melanocítics displàsics (Touab *et al.*, 2002). En el cas del melanoma caní es va observar que, tot i haver-hi reacció amb les mostres canines en el cas del *western blot*, es donava una manca de reactivitat de l'anticòs amb les mostres canines de melanoma en la immunohistoquímica. Per tant, no s'ha pogut detectar el versicà en els melanomes canins *in vivo* fins el moment. També s'ha descrit al nostre laboratori que l'expressió de versicà es correlaciona amb el grau d'atípia dels nevus displàsics (Touab *et al.*, 2003). Aquests resultats estan d'acord amb la hipòtesi que el versicà pot contribuir a les propietats anòmales de les cèl·lules melanòtiques transformades. Els efectes del

versicà sobre adhesió i proliferació poden contribuir a la capacitat de les cèl·lules dels nevus displàsics a proliferar més ràpidament.

L'altre PG extracel·lular identificat en el melanoma humà és mel-CSPG (*melanoma-specific PG*). Aquest CSPG de membrana consisteix en un cor glicoproteic de 250 kDa (Ross et al., 1984) amb diverses cadenes GAG que fan un PG complet d'un pes molecular que varia de 400 a 1000 kDa (Fig. 34). És alliberat al medi com a resultat d'un trencament proteolític de la forma de membrana (Heredia et al., 1996).

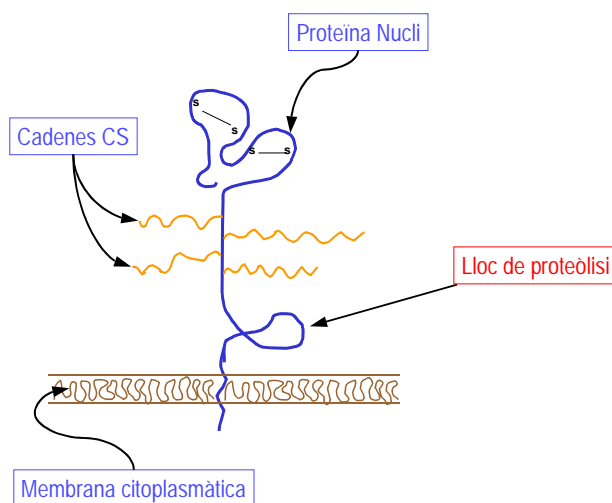


Figura 34. Estructura del Mel-CSPG. A la figura s'indica el lloc de proteòlisi que s'alliberarà al medi.

El mel-CSPG ha estat involucrat en la regulació de l'adhesió, proliferació i migració de les cèl·lules de melanoma (Iida et al., 1995; Iida et al., 1998; Burg et al., 1998; Eisenmann et al., 1999;). Amb el marcatge mitjançant $[^{35}\text{S}]$ -sulfat es va veure com el patró de proteoglicans extracel·lulars fou similar entre les línies cel·lulars CML-1 i CML-6M, mentre que es veié un marcatge metabòlic molt dèbil en el cas de CML-10c2. En el cas de CML-1 i CML-6M es va detectar el versicà i, a més, un altre PG d'elevat pes molecular, d'aproximadament 400 kDa. Aquesta banda s'identificà provisionalment com l'homòleg caní de mel-CSPG, tot i que no es pogué identificar mitjançant *western blot* probablement perquè l'anticòs B5 utilitzat és monoclonal i no té reactivitat creuada amb la molècula d'origen caní, mentre que sí s'havia demostrat al laboratori que reconeixia mel-CSPG humà (Heredia et al., 1996a; 1996b). Aparentment, la línia cel·lular CML-10c2 tampoc expressa mel-CSPG, de manera similar a les línies de melanoma humà diferenciades, mentre que CML-1 i CML-6M sí que probablement l'expressen, com les línies humanes indiferenciades.

Tot i que CML-1 i CML-6M produïen un patró similar de PGs extracel·lulars, es va observar una diferència general en el pes molecular d'aquestes molècules, ja que tenien un pes molecular més elevat en CML-1 que en CML-6M. Probablement aquest fet s'atribueix a la diferència en la llargada o nombre de cadenes GAG, almenys en el cas del versicà, ja que el cor proteic és el mateix per ambdues línies cel·lulars. També sembla que CML-1 i CML-6M difereixin en la quantitat relativa de PGs, i aquestes diferències podrien tenir un paper en el comportament cel·lular de cadascuna d'elles.

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

Les cèl·lules de melanoma produeixen un elevat nombre de factors de creixement i citokines i dels seus receptors que els permeten créixer de forma autònoma i metastatitzar (Lázar-Molnár et al., 2000). Per altra banda, l'estructura i composició de PGs i altres components de la MEC estan sota el control dels factors de creixement i factors de diferenciació. 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 indueix l'apoptosi en melanòcits normals però, en canvi, no ho produeix en cèl·lules de nevus i de melanoma, (Alanko i Saksela, 2000).

El TGF- β 1 no va provocar cap efecte significatiu sobre la proliferació cel·lular en cap de les tres línies cel·lulars de melanoma caní, mentre que el factor disminuïa de manera molt significativa la proliferació de la línia cel·lular Mv1Lu, utilitzada com a control positiu. Tot i que generalment el factor actua com a inhibidor de la proliferació cel·lular, en alguns casos s'ha descrit la inducció d'aquesta per part del TGF- β . Prèviament al nostre laboratori s'havia descrit que varies línies de melanoma humà diferien en la seva resposta a TGF- β , ja que algunes eren inhibides i altres no responien al factor. També s'ha descrit que tant TGF- β 1 com TGF- β 2 no afectaven a la proliferació de les cèl·lules de melanoma SK-mel24. Per altra banda, s'ha vist com la proliferació de cèl·lules de melanoma primari podia inhibir-se pel TGF- β , mentre que en estadis més agressius es perdia aquesta resposta (Heredia et al., 1996; Teti et al., 1997; Shellman et al., 2000). En tot cas, la manca d'efecte del TGF- β 1 observada en el nostre cas no és deguda a mutacions en els receptors, ja que les cèl·lules són capaces de respondre al factor quant a la síntesi de PGs. En el cas de la línia cel·lular de melanoma humà SK-mel-23, la proliferació tampoc s'inhibia amb el tractament amb TGF- β i el problema tampoc era degut a l'absència de receptors (Heredia et al., 1996). La manca de resposta al TGF- β pot ser causada

per diferents mecanismes. Una mutació en algun component de la via de transducció de senyal o de transcripció podria ser la causa d'aquest efecte diferencial de TGF- β 1. En aquest sentit, la manca de p15 o la sobreexpressió de c-Myc provoca que les cèl·lules siguin resistents a la inhibició de creixement del TGF- β (Derynck et al., 2001). En aquest sentit caldrien estudis addicionals per clarificar què és el que succeeix en les cèl·lules de melanoma caní.

A més dels efectes sobre la proliferació cel·lular, TGF- β és un potent inductor de PGs i altres molècules de la MEC, com la fibronectina, col·làgens i integrines (Massagué, 1998). Amb la finalitat d'aprofundir en els efectes del TGF- β hem estudiat la influència del factor sobre la síntesi de proteoglicans en les tres línies de melanoma caní. El TGF- β indueix la producció de proteoglicans en les línies cel·lulars CML-1 i CML-6M, mentre que no s'ha vist efecte en la línia CML-10c2, la qual té una expressió de proteoglicans molt dèbil. Aquest efecte és similar al descrit prèviament al nostre laboratori en cèl·lules de melanoma humà (Heredia et al., 1996a; 1996b), així com en línies cel·lulars humanes d'astrocitoma i neuroblastoma. En aquests estudis es veia un increment màxim a la dosi de 100 pM TGF- β de la síntesi de mel-CSPG i l'efecte del factor depenia del grau de diferenciació cel·lular en les línies cel·lulars de melanoma humà. En el nostre cas, veiem un increment significatiu en les dues línies cel·lulars de melanoma caní malignes CML-1 i CML-6M, mentre que no es veu efecte en la línia cel·lular CML-10c2 (anteriorment ja proposada com a més diferenciada), tot i que no es pot avaluar bé degut al poc marcatge de proteoglicans obtingut. En el cas de les SK-mel-23 (cèl·lules de melanoma humà diferenciades) només hi havia PGs de pes molecular baix i no de pes molecular alt, cosa que també s'intueix en el cas de CML-10c2.

En els nostres resultats veiem que l'increment de producció de proteoglicans en les línies CML-1 i CML-6M es veu tant al proteoglicà d'elevat pes molecular (versicà) com a la resta de proteoglicans marcats i es deu a l'augment del nombre i/o longitud de les cadenes de GAGs, ja que no es veu cap canvi en el nucli proteic dels proteoglicans després del marcatge amb [³⁵S]-metionina. El factor no activa la transcripció de versicà, sinó que l'increment en la incorporació del precursor radioactiu [³⁵S]-sulfat és degut a un efecte del TGF- β 1 a nivell post-traducciona que modifica el processament de les cadenes de GAGs, on s'incorporen aquests precursors, com ja s'ha descrit per altres proteoglicans de tipus condroitin sulfat (Romarís et al., 1991, 1995; Heredia et al., 1996). El versicà també és induït per TGF- β 1 en cèl·lules humanes (Kähäri, et al., 1991; Heredia et al., 1996a).

S'ha descrit que el TGF- β pot actuar a nivell post-traducciona sobre la longitud de les cadenes de GAGs (Bassols i Massagué, 1988; Faassen et al., 1993), el nombre de cadenes de

GAG (Romarís et al., 1995) i/o el patró de sulfatació d'aquestes cadenes (Schönherr et al., 1993). L'increment en la incorporació de [³⁵S]-sulfat també podria ser degut a un increment en el nombre de cèl·lules o a la disminució de la velocitat de degradació del proteoglicà, o una combinació de vèries d'aquestes possibilitats. Podem descartar l'increment del nombre de cèl·lules, ja que el TGF- β 1 no produeix cap efecte significatiu en les nostres línies cel·lulars. És difícil definir el significat fisiològic d'un augment de les cadenes de GAGs, ja sigui degut a un major nombre de cadenes o a la seva elongació. Les interaccions entre proteoglicans i altres molècules es produeixen en molts casos a nivell precisament dels GAGs. Per tant, és lògic suposar que canvis en les cadenes de GAGs, com els observats en el nostre cas, poden modificar aquestes interaccions. I cal recordar que canvis en la matriu extracel·lular poden influir en la resposta cel·lular.

La resistència als efectes inhibidors de proliferació del TGF- β és característic del melanoma humà i la seva producció està incrementada amb la progressió del melanoma. El TGF- β incrementa en la transició de la fase radial (RGP) a la fase vertical (VFP) del melanoma humà (revisat per Meier et al., 1998). El TGF- β 1 produït per les cèl·lules de melanoma activa als fibroblasts a produir matriu entre el tumor i pel seu voltant. Per tant, una funció important del TGF- β 1 en el melanoma és la de remodelar l'estroma del tumor, el qual proporciona la bastida i una estimulació positiva *feedback* cap al tumor (Berking et al., 2001). Una situació similar s'ha descrit en el càncer de pròstata (Sakko et al., 2001). Els nostres resultats demostren que també hi haurà un efecte autocrí sobre la producció de MEC per part de les pròpies cèl·lules de melanoma. Així, doncs, veiem que el TGF- β en el cas del melanoma caní produiria un efecte positiu en el desenvolupament tumoral, ja que produiria un increment en la síntesi de PGs per part de les cèl·lules tumorals, la qual cosa remodelaria la MEC, la qual també es veuria remodelada per l'estimulació de l'estroma tumoral per part de l'increment del TGF- β produït per les cèl·lules de melanoma caní. Caldria mesurar la quantitat de TGF- β que produeixen les cèl·lules de melanoma caní. Així mateix, les cèl·lules del melanoma no respondrien a l'efecte inhibitori de creixement del TGF- β . No cal oblidar les complexes interaccions entre el TGF- β en l'entorn tumoral. Recentment s'ha descrit una disminució autocrina de l'E-cadherina i una sobreexpressió d'integrines i MMP-9 mediades pel TGF- β , que facilita la migració de les cèl·lules de melanoma i incrementa l'adhesió a l'endoteli. La supressió immune i els efectes angiogènics del TGF- β poden també contribuir a les metàstasis del melanoma ja que permetrien escapar a les cèl·lules del sistema immune i, a més, donaria suport a les necessitats nutricionals pel creixement cel·lular (revisat per Hsu et al., 2002).

En el nostre treball també vam incloure l'efecte de dos factors més sobre la producció de proteoglicans: l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) i l'HGF (*hepatocyte growth factor*). En el cas de l'IGF-1 vam veure un increment significatiu en la producció de proteoglicans de les línies cel·lulars de melanoma caní, tot i que l'augment era molt poc apreciable. El factor IGF-1 ha estat descrit com a estimulador de la síntesi de PGs en diferents tipus cel·lulars. Per exemple, s'ha vist que la incorporació de [³⁵S]-sulfat en l'agrecà és estimulada per IGF-1 en cultius de condrocits (van der Kraan et al., 1993). També s'ha descrit un augment de la síntesi de proteoglicans, degut a un increment del procés de glicosilació, així com un increment en la síntesi d'àcid hialurònic induït pel IGF-1 en cèl·lules peritubulars de testicles immadurs de rata (Thiébot et al., 1997). Cal destacar el rol del factor IGF-1 i els seu receptor en la regulació del creixement del melanoma. Totes les cèl·lules melanocítiques expressen el receptor per IGF-1 i la seva abundància incrementa amb la progressió tumoral, però les cèl·lules de melanoma no produeixen IGF-1 (revisat a Slominski et al., 1998). L'IGF-1 incrementa la supervivència, migració i creixement de cèl·lules de lesions primerenques, però no de tumors primaris en fases avançades o metastàtiques (Satyamoorthy et al., 2001), malgrat és una senyal general de supervivència anti-apoptòtica (revisat per Hanahan i Weinberg, 2000).

Els melanòcits expressen el receptor d'HGF: el protooncogen *c-met*. L'HGF és un mitogen de melanòcits humans i, recentment, s'ha vist implicat com un factor important pel desenvolupament i disseminació de melanomes. L'activació autocrina de *c-met* induïx el desenvolupament del melanoma maligne i l'adquisició del fenotip metastàtic (Otsuka et al., 1998; Rusciano et al., 1998; Hamoen, et al., 2001). Quan s'indueix l'activació autocrina d'HGF, disminueix l'E-cadherina en els melanòcits i línies cel·lulars de melanoma. Per tant, l'HGF autocrí desacobla els melanomes dels queratinòcits i, per tant, allibera les cèl·lules de melanoma del control dels queratinòcits i permet la disseminació del tumor (Li et al., 2001). En canvi, el tractament amb HGF no va provocar cap efecte sobre la producció de PGs a les cèl·lules de melanoma caní, tot i que està descrit el seu receptor en melanòcits i cèl·lules de melanoma (Rusciano et al., 1998).

Per tant, els PGs extracel·lulars produïts per les cèl·lules de melanoma caní CML-1 i CML-6M són el versicà i un altre CSPG similar al mel-CSPG, de forma similar a les cèl·lules de melanoma humà indiferenciades. El TGF- β 1 incrementa la producció de PG extracel·lulars al medi i el pes molecular d'aquestes macromolècules, de manera semblant al que succeeix en les cèl·lules de melanoma humà indiferenciades. En canvi, la línia cel·lular CML-10c2 produeix una baixa quantitat de PGs d'elevat pes molecular i no respon al TGF- β 1, de forma semblant al que succeeix en les línies cel·lulars de melanoma humà diferenciades. Per tant, les línies cel·lulars

canines podrien ser un bon sistema cel·lular per estudiar les característiques moleculars dels melanomes i el paper dels PGs en el procés tumorigènic.

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

Efectes de la sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà sobre la proliferació, cicle cel·lular i apoptosi

Per sobreexpressar la isoforma V3 de versicà a dues línies de melanoma humà i dues de melanoma caní es va utilitzar un sistema retroviral, que ja havia estat descrit anteriorment per la sobreexpressió de versicà i altres proteoglicans. El vector retroviral utilitzat es va desenvolupar en el laboratori d'A.D. Miller (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA) (Fig. 35). Els proteoglicans són molècules grans i es va veure com els vectors retrovirals era el sistema més adequat per la seva sobreexpressió (Fischer et al., 2001). Les avantatges d'utilitzar el sistema retroviral són l'elevada eficiència d'infecció i que el gen transduït s'incorpora ràpidament dins del genoma de les cèl·lules hoste que s'estan dividint, per tant assegurant l'expressió estable del gen. A més, en un recent estudi ja havien utilitzat aquest mateix sistema per veure els efectes que produïa la sobreexpressió de V3 en cèl·lules arterials de múscul llis (Lemire et al., 2002).

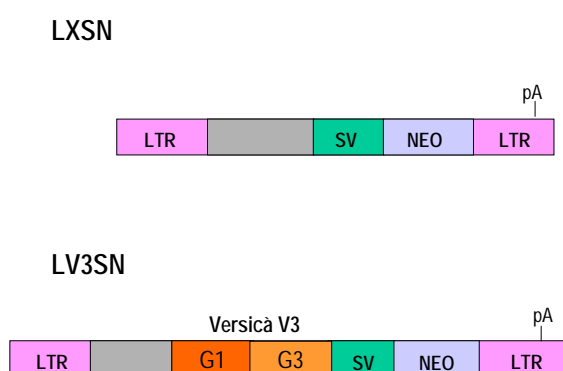


Figura 35. Descripció esquemàtica dels vectors retrovirals LXSNI i LV3SN.

Les cèl·lules de melanoma humà i caní tenen una expressió diferencial de les isoformes V0 i V1 de versicà, la qual està relacionada amb el grau de diferenciació cel·lular (Domenzain et al., 2003). L'expressió de versicà està associada amb un fenotip cel·lular proliferatiu i sovint es

troba en teixits que mostren una elevada proliferació, tant en el desenvolupament embrionari com en una varietat de tumors: mama, cervell, pròstata i melanoma (revisat per Wight, 2002). Els efectes de versicà s'han correlacionat amb el cor proteic o a les cadenes GAG i la concentració de versicà associada a la superfície cel·lular és un factor crític, ja que la seva pèrdua s'associa amb la disminució de la proliferació cel·lular. Per tant, es va sobreexpressar la isoforma V3 de versicà en línies humanes i canines de melanoma que diferissin en l'expressió endògena de V0 i V1. La hipòtesi inicial era que la sobreexpressió de la isoforma petita V3 podria competir amb les isoformes grans V0, V1 i revertir el fenotip maligne de les cèl·lules de melanoma. Aquest canvi fenotípic dependria de l'expressió endògena de les isoformes grans de versicà. Per aquest motiu, es va sobreexpressar la isoforma V3 de versicà a les línies indiferenciades SK-mel-1.36-1-5, humana, i CML-1, canina, perquè ambdues expressaven de forma endògena les isoformes V0 i V1 de versicà. També es va sobreexpressar la isoforma V3 de versicà a la línia cel·lular diferenciada de melanoma humà Mewo i a la línia cel·lular de melanoma caní CML-10c2, les quals no expressaven cap isoforma de versicà de forma endògena.

El resultat més sorprenent de les quatre línies cel·lulars de melanoma, tant canines com humanes, que sobreexpressen la isoforma V3 és la seva major lentitud en el creixement en cultiu. Aquest efecte també s'havia descrit en les cèl·lules de múscul llis arterials, on s'observava que la sobreexpressió de V3 alterava dramàticament el fenotip d'aquestes cèl·lules ja que també n'incrementava l'adhesió, en disminuïa la migració i incrementava l'expressió de tropoelastina (Lemire et al., 2002; Merrilees et al., 2002). Aquest resultat estava d'acord amb la nostra hipòtesi ja que es revertia aquesta característica del fenotip maligne, però s'observava en totes les línies, tant les que expressaven V0/V1 com les que no. Això implicava que l'efecte antiproliferatiu no podia ser degut únicament a una competència amb les isoformes V0/V1 pro-proliferatives. Per tant, suggeriríem que la interacció de versicà a través dels dominis *EGF-like* del domini G3 de V3 amb el receptor de l'EGF podria estar alterada en les cèl·lules que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà i, per tant, es veuria una inhibició de la via de senyal de transducció mitogènica (Fig. 36). A més, aquesta hipòtesi explicaria la diferència d'inhibició de la proliferació entre les cèl·lules que expressen les isoformes de versicà V0 i V1 de forma endògena i les que no. Tant les Mewo com les CML-10c2 (que no expressen versicà endogen) mostren una inhibició de la proliferació més marcada que les SK-mel-1.36-1-5 i les CML-1, respectivament, que sí expressen les isoformes V0 i V1 de versicà, les quals podrien competir amb la isoforma V3 per la interacció amb el receptor d'EGF.

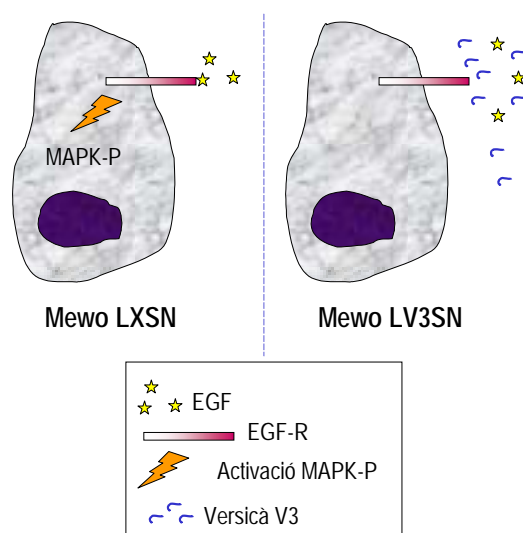


Figura 36. Model de la disminució en la proliferació cel·lular en la línia cel·lular Mewo LV3SN. Possible interacció de versicà (a través dels dominis *EGF-like* del domini G3) amb el receptor de l'EGF en les cèl·lules Mewo que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà i, per tant, es veuria una inhibició de la via de senyal de transducció mitogènica.

Els nostres resultats semblen estar en contradicció amb els descrits en fibroblasts, on el versicà estimula la proliferació a través dels dominis G1 i G3. Es proposava que quan es sobreexpressava el minigen G1-G3, el domini G1 estimulava la proliferació disminuint l'adhesió (per poder proliferar cal que l'adhesió cel·lular al substrat disminueixi), mentre que l'expressió del domini G3 sol també incrementava la proliferació, però la delecció dels seus dos motius *EGF-like* reduïa la funció del versicà en l'estimulació de la proliferació cel·lular (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1999). S'han descrit resultats similars on el constructe G3 de versicà promovia el creixement d'una línia cel·lular d'astrocitoma, mentre que el constructe on s'havien deletat els motius *EGF-like* ($G3\Delta EGF$) tenia un efecte dominant negatiu en la proliferació cel·lular de les cèl·lules de glioma, cosa que demostrava que la proliferació es promovia a través del domini G3. A més, l'expressió de $G3\Delta EGF$ inhibia la secreció del versicà endogen (Wu et al., 2001). En el nostre cas, però, la sobreexpressió de V3 no altera la secreció del versicà endogen. Molt recentment s'ha descrit que les cèl·lules d'astrocitoma que expressen aquest $G3\Delta EGF$ han perdut la característica de transformació cel·lular i tumorigènesi *in vitro* i *in vivo* (Wu et al., 2004a).

En el nostre cas, les cèl·lules de melanoma LV3SN es comporten de manera contrària, ja que la proliferació es veu fortament inhibida. Una possible explicació per aquesta diferència seria que els minigens dissenyats per Zhang *et al.* (1998; 1999) contenien una quantitat limitada de cadenes CS, les quals no es troben en el nostre sistema, ja que V3 està formada únicament pel domini G1 i G3. La presència o absència de cadenes CS podria modular la interacció de

versicà amb el receptor d'EGF. Pel que fa al cas de les cèl·lules arterials de múscul llis, on la sobreexpressió de V3 causava una disminució de la proliferació, es suggeria que V3, a través del domini G1 (d'unió a HA), podia competir i desplaçar les isoformes més grans de versicà, que contenen CS, i, així, incrementar l'adhesió i disminuir la proliferació i la migració, com s'havia descrit (Lemire et al., 2002; Merrilees et al., 2002). Recentment, però, s'ha descrit que la proliferació de fibroblasts que sobreexpressen V3 s'afecta per la deposició d'elastina insoluble. La formació de la fibra elàstica i la proliferació cel·lular estan inversament correlacionades (Hinek et al., 2004). Per tant, en aquest cas l'efecte antiproliferatiu de V3 pot ser indirecte a través de l'elastina.

Aquestes diferències observades sobre la proliferació entre els diferents sistemes cel·lulars que sobreexpressen V3 o G3 poden ser degudes a altres causes com, per exemple, diferents quantitats d'isoformes de versicà o altres molècules de la MEC en cada sistema cel·lular. La producció de versicà endogen de les cèl·lules de melanoma no es veu modificada per la sobreexpressió de la isoforma V3 ni en les línies cel·lulars que expressen V0 i V1, SK-mel-1.36-1-5 i CML-1, ni en les línies cel·lulars que no n'expressen, Mewo i CML-10c2. Aquests resultats estan d'acord amb estudis en cèl·lules de leiomioma transfectades de manera estable amb el domini G1 o G3, on es veu que la sobreproducció dels dominis G1 o G3 no sembla influenciar la secreció del versicà endogen. Aquestes cèl·lules, però, mostren una elevada taxa de proliferació respecte les respectives controls (Cattaruzza et al., 2004).

El versicà, doncs, podria regular la proliferació per diversos mecanismes: interacció directa amb un receptor de factor de creixement i per interferència amb l'adhesió cel·lular. En el cas de les cèl·lules de múscul llis arterials, el mecanisme que predominaria seria l'increment en l'adhesió cel·lular de les cèl·lules que sobreexpressen V3, possiblement per competència amb les isoformes antiadhesives V0 i V1 en les matrius pericel·lulars (Lemire et al., 2002). En canvi, en el nostre sistema de melanoma l'increment en l'adhesió cel·lular és moderat i no sembla ser el causant de la disminució en la proliferació de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3. A més, tampoc es veuen canvis substancials en la matriu pericel·lular a nivell morfològic.

És interessant que les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3 mostrin un increment en els nivells endògens de p21, un inhibidor de les quinases ciclina-dependents (CDKs), que podria portar a un retard en el cicle cel·lular. Molt recentment, s'ha descrit una elevada proporció de cèl·lules a la fase G0/G1 en les anàlisis de cicle de cèl·lules nervioses transfectades amb les isoformes V1 i V2 de versicà, en les quals la proteïna ciclina A es troba disminuïda mentre que l'inhibidor de quinases tipus ciclina p27 està sobreexpressat (Wu et al.,

2004a). Els inhibidors de CDKs semblen tenir una importància rellevant en l'origen i progressió del melanoma, almenys en estudis genètics (veure Introducció).

S'han descrit perfils d'expressió que distingeixen els diferents estadis de progressió del melanoma. La majoria d'alteracions detectades estan lligades al control de cycle cel·lular en la transició G1/S. Les cèl·lules de melanoma progressen, com fan altres tumors agressius, a través de la desregulació dels mecanismes que controlen la proliferació i escapant de la mort cel·lular programada. En un estudi molt recent la majoria de les proteïnes reguladores de cycle que s'han trobat desregulades estan involucrades en el control de la transició G1/S, incloent la ciclina D1, D3, E, CDK2, p16, p27 i p21. Un dels canvis més forts es dona en la proteïna ciclina D1, que no s'expressa en els nevus i és expressada en el 48% dels melanomes en fase radial (Alonso et al., 2004). En el nostre sistema, es descartaria la ciclina D1 com a possible causa de les diferències de proliferació observades, ja que els nivells d'expressió de la ciclina D1 entre les línies transfectades amb la isoforma V3 de versicà i les controls són similars.

Es pensà en una alteració del cycle cel·lular com a possible causa del retard en el creixement cel·lular. En les anàlisis de cycle cel·lular no es trobaren diferències significatives en les diferents línies cel·lulars transfectades, excepte en el cas de Mewo, on les transfectades amb V3 semblaven mostrar un lleuger retard en el cycle. El retard s'aprecià a l'entrada del segon cycle i ens va suggerir que era un retard petit, però acumulatiu. A partir de les 48 hores, però, ja no es pot continuar analitzant degudament el cycle cel·lular mitjançant citometria de flux perquè les cèl·lules es desincronitzen i no es poden comparar. La sobreexpressió de p21 explicaria el retard en cycle cel·lular, però precisament en el cas de la línia cel·lular Mewo, trobem la p21 mutada, amb la qual cosa l'anticòs no la reconeix i, per tant, no podem conèixer els nivells d'expressió de les LV3SN respecte les controls.

Per últim, per veure si el retard observat en les corbes de creixement era degut a un augment de l'apoptosi, en comptes d'una disminució de la proliferació, es van comptar els percentatges de cèl·lules mortes respecte les vives, en els assajos de proliferació. Es van veure diferències significatives entre les cèl·lules que sobreexpressaven V3 (tenien un percentatge de cèl·lules mortes superior) respecte les controls. Però aquests percentatges de cèl·lules mortes, tot i ser superiors, eren de valors molt baixos (de l'ordre de l'1.5%) per poder explicar l'important retard en el creixement que s'observava a les cèl·lules que sobreexpressaven V3. Tampoc vam trobar pics subdiploids en l'anàlisi de cycle cel·lular amb citometria de flux de les cèl·lules transfectades. Molt recentment s'ha mostrat que la sobreexpressió del domini G1, però no del domini G3, confereix resistència a l'apoptosi induïda per citotòxics en cèl·lules de leiomioma (Cattaruzza et al., 2004). Els autors suggereixen que l'efecte promotor de la

proliferació i anti-apoptòtic mediat per la unió CD44-HA podria ser modulada per la mobilització de l'HA a la proximitat de la membrana cel·lular via el domini G1. En canvi, s'ha descrit recentment que l'expressió de la isoforma V2 induïx apoptosi en cèl·lules neuronals (Wu et al., 2004b) i que cèl·lules d'astrocitoma que expressen el constructe mutat G3ΔEGF també mostren un important increment en l'apoptosi (Wu et al., 2004a).

Una altra possible explicació per les diferències de proliferació observades podria ser per l'expressió diferencial de cadherines entre les línies control i les transfectades amb V3. La N-cadherina media l'agregació homotípica entre les cèl·lules de melanoma així com l'adhesió heterotípica de les cèl·lules de melanoma als fibroblasts dèrmics i les cèl·lules endotelials vasculares. La interacció intercel·lular mitjançant N-cadherina promou la supervivència cel·lular independent de l'ancoratge, ja que activa Akt/PKB, la qual inactiva la proteïna proapoptòtica Bad i estabilitza moderadament la proteïna antiapoptòtica β -catenina. A més a més, promou la migració de les cèl·lules de melanoma sobre fibroblasts dèrmics per un mecanisme diferent del que regula la proliferació. Per tant, el canvi d'E- a N-cadherina durant el desenvolupament del melanoma no només allibera els melanòcits del control dels queratinòcits sinó que proporciona creixement i possibles avantatges metastàtiques a les cèl·lules de melanoma (Li et al., 2001b). Al laboratori s'ha començat a mirar la possible expressió diferencial d'E-cadherina, sense obtenir resultats satisfactoris. De totes maneres, estudis referents a la possible expressió diferencial de N-cadherina s'haurien de dur a terme en aquestes cèl·lules que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà per aclarir si les cadherines poden tenir algun efecte sobre la proliferació diferencial d'aquestes cèl·lules.

L'associació incrementada d'HA a la matriu pericel·lular de les cèl·lules que sobreexpressen V3 podria ser una altra possible explicació del retard en el seu creixement, ja que s'ha descrit un potencial efecte autocrí en cèl·lules de sarcoma que sobreexpressen el domini G1 de versicà, el qual proporcionaria un equilibri entre la immobilització d'HA a la MEC en proximitat a les cèl·lules i la unió d'HA al seu receptor de superfície cel·lular CD44, provocant, així, un augment en la proliferació cel·lular (Cattaruzza et al., 2004). En el nostre cas, però, no hem observat diferències en l'expressió d'HA de les cèl·lules LV3SN respecte les controls. A més a més, estudis de la matriu pericel·lular, mitjançant l'assaig d'exclusió de partícules, tampoc van mostrar diferències entre les cèl·lules control i les que sobreexpressaven V3, tot i que la nostra hipòtesi inicial era que si hi havia sobreexpressió de versicà es podria alterar la matriu pericel·lular via la interacció amb HA (Fig. 37).

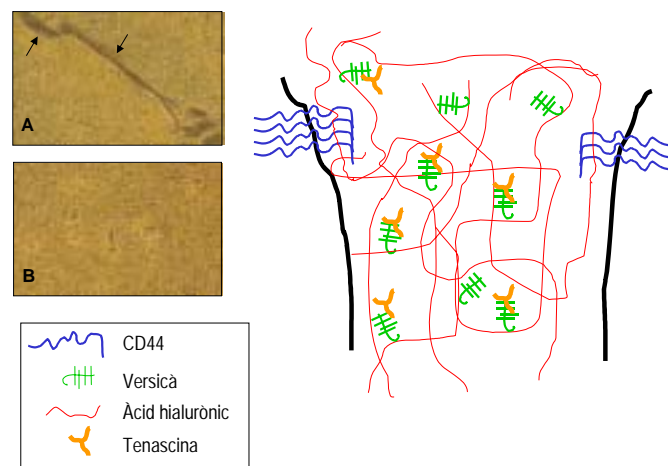


Figura 37. Model de formació de la matriu pericel·lular en les línies cel·lulars de melanoma. Esquema de la interacció entre el complex de MEC format pel versicà endogen-HA-tenascina i el CD44 de superfície cel·lular. Fotos de la matriu pericel·lular de CML-1 (visible) i de les CML-10c2 (no visible).

Efectes de la sobreexpressió de V3 sobre la tumorigènesi

Les cèl·lules que sobreexpressen V3 també van mostrar un retard en el potencial de creixement *in vivo*, ja que les latències dels seus tumors primaris foren més llargues que les seves respectives controls, transfectades amb el vector LXS_N sol. La línia cel·lular SK-mel-1.36-1-5 va ser, però, l'excepció, ja que no es van veure diferències significatives en el creixement dels tumors primaris entre els ratolins injectats amb les cèl·lules LV3SN i les LXS_N. El fet de tenir un fenotip indiferenciat (Houghton et al., 1987) podria ser una possible explicació d'aquest resultat, ja que les permetria créixer d'una forma autocrina. La línia cel·lular Mewo és més diferenciada i, possiblement, més dependent de les senyals del microambient cel·lular. Primer es van analitzar els tumors primaris amb l'anticòs policlonal anti-versicà obtingut al nostre laboratori (Touab et al., 2002). En el cas de les línies cel·lulars de melanoma humà observarem un marcatge pericel·lular molt marcat en els melanòcits de la dermis en el cas de les SK-mel-1.36-5, tant a les controls com a les que sobreexpressaven V3. En canvi, en el cas de les Mewo no es detectà cap marca a les controls, mentre que una marca pericel·lular molt lleugera als melanòcits de la dermis que sobreexpressaven V3. Aquests resultats demostren que els tumors són originats per les línies de melanoma i, a més, expressen el versicà transfectat. Com a control positiu intern teníem el marcatge de l'epiteli de l'epidermis del ratolí, ja que en la pell adulta normal, el versicà només es troba a l'epidermis i al voltant dels fol·licles pilosos, glàndules salivals i el teixit perivascular dels vasos sanguinis més grans (Zimmermann et al., 1994). L'anticòs utilitzat no reaccionà amb el versicà d'origen caní (CML-1 i CML-10c2) i, per tant, no vam poder comparar els tumors originats per aquestes línies cel·lulars.

En el nostre cas, els tumors primaris originats de les cèl·lules que sobreexpressaven V3 arribaven a mides similars que els tumors originats de les cèl·lules control, tot i que en major temps. Aquests resultats es contradiuen amb els d'un estudi molt recent, on es descrivia que les lesions tumorals formades per les cèl·lules de leiomioma que sobreexpressaven el domini G1 de versicà creixien més ràpid i eren de mides majors que els tumors produïts per les cèl·lules controls i aquest efecte seria mediat per la localització d'HA a la proximitat de la membrana cel·lular mediada per G1 (Cattaruzza et al., 2004). En un altre estudi recent observaren que l'expressió d'un constructe de G3 de versicà en cèl·lules humanes d'astrocitoma promovia el creixement tumoral en ratolins i aquest efecte seria secundari a un increment en l'angiogènesi, ja que aquests tumors contenien més vasos sanguinis i més grans, implicant que G3 jugava un rol en la formació de vasos sanguinis. A més, van descriure la interacció entre versicà, fibronectina i VEGF, formant un complex que afavoria l'adhesió endotelial, la proliferació i la migració amb un efecte additiu d'aquests tres components (Zheng et al., 2004). Aquests resultats no estan d'acord amb els observats en les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3, tot i que, com s'ha comentat anteriorment, podria ser que V3 tingués una interacció amb el receptor d'EGF diferent que el constructe del domini G3. En aquest sentit, cal destacar un altre estudi molt recent on mostren que l'expressió del G3 Δ EGF (li falten els dos motius *EGF-like*) de versicà produeix la pèrdua de transformació cel·lular i tumorigènesi *in vitro* i *in vivo* (Wu, et al., 2004a). Així doncs, sembla que la sobreexpressió de G1 o G3 independentment augmenta la tumorigènesi, mentre que la de V3 la disminueix. Hem de tenir en compte que en els dos estudis comentats, on analitzen només l'efecte d'un sol domini de versicà (G1 o G3), injecten subcutàniament les cèl·lules tumorals d'origen no cutani (leiomioma i astrocitoma, respectivament) als ratolins. En canvi, el nostre és un model òrgan-específic, ja que injectem les cèl·lules tumorals de melanoma intradèrmicament, de manera que provoquem el tumor primari a la dermis, el mateix lloc on es produiria de forma espontània. D'aquesta manera, el tumor creix en una estructura similar a la real, la dermis, mantenint les relacions paracrines corresponents amb els fibroblasts i queratinòcits de l'hoste, de la manera més semblant al que succeiria en el tumor espontani.

Amb la finalitat de veure què passava *in vivo* amb el complex versicà-HA-CD44, a part de l'anàlisi de versicà, es van analitzar també l'HA i el CD44. Pel que fa als marcatges amb HA s'observà un major marcatge en els tumors originats de les cèl·lules que sobreexpressaven V3 respecte les control, sobretot en el cas de les línies cel·lulars SK-mel-1.36-1-5 i CML-10c2. Aquest resultat suggereix que V3 afavoreix la retenció d'HA. En canvi, en el cas de CD44 no es van observar diferències significatives entre els tumors originats de les cèl·lules control i els de

les transfectades amb V3. Pels dos marcatges s'observà una tinció més intensa a la perifèria del tumor, encara que no sobreposats, ja que CD44 sembla tenir una distribució més homogènia mentre que HA marca els nusos o feixos de cèl·lules. S'ha descrit que la capacitat de les cèl·lules de melanoma per créixer *in vitro* es veu afavorida pel CD44 i l'HA. Per tant, l'increment en HA en les cèl·lules que sobreexpressen V3 suggeriria que aquests tumors haurien de créixer més ràpid que els controls respectius, la qual cosa no és el que s'observa en els ratolins. S'ha descrit, però, que *in vivo* no passa el mateix, ja que una expressió reduïda a la superfície cel·lular de CD44 i nivells reduïts d'HA s'associen amb un mal pronòstic en el melanoma cutani humà (Karjalainen et al., 2000). Per tant, aquests resultats concordarien, en el cas de la línia CML-10c2, amb què els tumors que sobreexpressen V3, i expressen menys HA, creixin més lents.

Per tant, les diferències observades en els diferents estudis de tumorigènesi poden ser degudes a les múltiples variables que es donen en una molècula gran i formada per dominis amb funcions diferents, com és el versicà. A més, com hem comentat anteriorment, el sistema d'inoculació pot influir en el desenvolupament del tumor, així com el tipus tumoral que s'inocula, ja que cada línia cel·lular tumoral té diferències en el comportament en funció del seu origen.

Efectes de la sobreexpressió de V3 sobre l'adhesió i migració cel·lulars

L'estructura dels dominis del versicà dona lloc a múltiples tipus d'interaccions ja siguin tipus proteïna-proteïna o proteïna-carbohidrat. La més coneguda és la interacció específica entre el domini amino-terminal del versicà (G1) i l'HA, la qual està estabilitzada per la *link protein*. També interacciona amb altres molècules de la MEC com la tenascina a través del domini d'unió de lectines (G3), el qual també interacciona amb la fibulina-1 i -2, la fibrilina i l'elastina (proteïnes associades amb les fibres elàstiques). El versicà també s'uneix a CD44 a través de les cadenes de condroitin sulfat i aquesta interacció podria estabilitzar els agregats HA-versicà associats amb la superfície cel·lular (Wight, 2002).

A més de l'efecte negatiu sobre la proliferació cel·lular, es va observar un increment en l'adhesió cel·lular sobre l'HA com a substrat, encara que es tractava d'un increment moderat (aproximadament un 20%). Aquest efecte pro-adhesiu pot ser degut, en el cas de les línies que expressaven versicà endogen (SK-mel-1.36-1-5 i CML-1), per l'efecte competitiu de la isoforma V3 sobreexpressada amb l'efecte antiadhesiu de les isoformes V0 i V1, que sí tenen GAGs, tal com proposen Lemire *et al.* per les cèl·lules arterials de múscul llis. En el cas de les línies cel·lulars Mewo i CML-10c2, que no expressen versicà endogen, aquest augment en l'adhesió podria ser conseqüència d'una interacció alterada entre l'HA i el seu receptor de superfície cel·lular CD44 per la presència de la isoforma V3 de versicà, que no té cadenes de GAGs. La

unió i adhesió de les cèl·lules de melanoma a l'HA és principalment dependent de CD44 (Ahrens et al., 2001b). Per tant, en les cèl·lules que sobreexpressen V3 l'estabilització dels agregats HA-versicà a la matriu pericel·lular donada per la interacció de les cadenes GAG del versicà amb CD44 no es dona. Per altra banda, la funció antiadhesiva de les isoformes de versicà que contenen CS també s'ha atribuït a l'elevada càrrega negativa i les propietats higroscòpiques de les cadenes GAGs. Les propietats anti-adhesives del versicà estan mediades, doncs, a través de funcions complementàries del cor proteic i les cadenes CS (Sakko et al., 2001). En el nostre sistema, veiem que la sobreexpressió de versicà produeix un lleuger augment d'adhesió, que s'explicaria perquè és la isoforma V3, que no té cadenes CS i, per tant, no té les propietats anti-adhesives. En el cas de la sobreexpressió de V3 (dominis G1 i G3, sense cadenes GAG) en les cèl·lules SK-mel-1.36-1-5 de melanoma no vam observar diferències en l'adhesió sobre col·lagen tipus I, tot i que l'expressió incrementada de la subunitat $\beta 1$ observada en aquestes cèl·lules suggeria un possible augment d'aquest tipus d'adhesió. Per tant, en aquest cas el domini G1 podria contrarestar l'efecte del G3. De fet, sí observem una adhesió incrementada sobre HA, via la unió del domini G1 de versicà.

Els resultats descrits a la bibliografia sobre l'adhesió discrepen segons el tipus cel·lular, constructe i substrat estudiats. Així veiem que les cèl·lules arterials de múscul llis que sobreexpressen V3 mostren una incrementada adhesió sobre plàstic, probablement a través de l'elastina i/o per competició amb les isoformes endògenes V0/V1 (Lemire et al., 2002; Merrilees et al., 2002). En el cas de les cèl·lules de leiomioma es descriu que l'expressió independent de G1 o G3 no afecta l'adhesió sobre fibronectina, col·lagen VI o laminina-1 (Cattaruzza et al., 2004). En canvi, s'observa una adhesió incrementada d'astròcits i fibroblasts en plaques recobertes amb miniversicà o amb G3 per interacció amb la integrina $\beta 1$ (Wu et al., 2002). La diversitat dels sistemes utilitzats, doncs, dificulta la comparació de resultats.

Els resultats obtinguts en aquest treball demostren que, a més de regular adhesió, la sobreexpressió de V3 produeix un increment en la migració cel·lular en cambres tipus *transwell* sobre substrat d'HA. Aquesta migració és abolida un 50% aproximadament quan les cèl·lules són tractades amb un anticòs bloquejant anti-CD44 o preincubades amb HA soluble, la qual cosa indica que, almenys parcialment, la senyal es transmet via aquest receptor (Fig. 38).

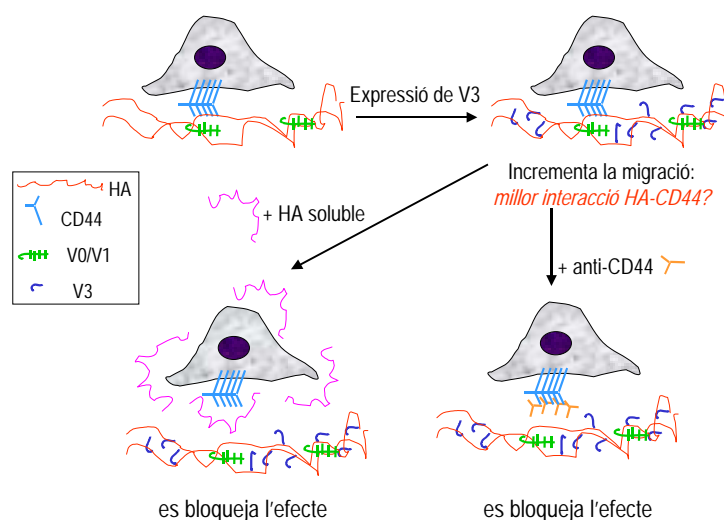


Figura 38. Efectes de la sobreexpressió de V3 sobre la migració cel·lular sobre HA. Bloqueig de l'efecte de la sobreexpressió de V3 per addició d'un anticòs bloquejant anti-CD44 i per addició d'HA soluble.

En el cas de l'HA soluble es produiria una competició amb l'HA de la MEC de les cèl·lules de melanoma per la unió amb el CD44 de superfície cel·lular. Diferents estudis mostren resultats similars, com el cas d'una línia cel·lular de melanoma humana transfectada amb el cDNA de la hialuronat sintasa, la qual cosa produeix la formació d'una matriu pericel·lular rica en HA i un increment en la migració, que es bloqueja amb un anticòs monoclonal anti-CD44 (Ichikawa et al, 1999). També s'ha descrit que la invasió i migració induïda per l'addició d'HA exogen de les cèl·lules de glioma *in vitro* es pot inhibir amb un anticòs monoclonal anti-CD44 i també amb oligonucleòtids *anti-sense* de CD44. Les HABPs solubles competeixen per la unió de l'HA endogen als receptors de superfície cel·lular i, per tant, en preveuen la senyal *downstream*. La sobreexpressió de CD44 soluble inhibeix el creixement tumoral, la invasió i metàstasi *in vivo* (Koochekpour et al.,1995; Ward et al., 2003). Es suggereix que les cèl·lules tumorals podrien migrar a través d'un ambient extracel·lular ric en HA quan envaeixen teixits hostes propers i que la producció d'HA per part de les cèl·lules tumorals podria incrementar aquesta migració, encara que en el nostre cas no es modifica la producció d'HA per part de les cèl·lules que sobreexpressen V3 *in vitro*.

Recentment, però, s'ha descrit en el sistema de les cèl·lules endotelials que l'anticòs bloquejant anti-CD44 (però no l'anti-RHAMM) inhibeix l'adhesió de la cèl·lula endotelial a l'HA i la proliferació cel·lular, mentre que l'anti-RHAMM (i no l'anti-CD44) bloqueja la migració a través de Matrigel d'aquestes cèl·lules (Savani et al., 2001). Per tant, aquests resultats no estarien d'acord amb els observats en el cas de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3, on es veu una inhibició de la migració amb l'anticòs anti-CD44. Pot ser que l'explicació d'aquesta discordança sigui el diferent substrat on s'estudia la migració, ja que la unió a HA és via CD44.

L'adhesió mitjançant CD44 és relativament dèbil en comparació amb altres mecanismes d'adhesió cel·lular com les integrines. Per tant, es suggereix que CD44 no tingui un rol primari en promoure les unions que fortament ancoren les cèl·lules a la matriu, sinó que pot facilitar les associacions transitòries que permeten l'activació de cascades intracel·lulars involucrades en processos cel·lulars com proliferació o migració. En melanoma s'ha descrit que CD44, però no RHAMM, mitjança l'adhesió dependent d'HA i la proliferació (Ahrens et al., 2001). Recentment s'ha proposat que la senyal de CD44 activa la senyal de Rac1, una via coneguda per regular l'ensamblatge d'actina que s'associa amb la mobilitat i transformació cel·lulars (revisat per Turley et al., 2002). CD44 pot augmentar les vies de senyal de Rho i Ras, interaccionar amb la tirosina quinasa *c-Src* i reclutar les proteïnes del citoesquelet ankirina i l'eizrina/radixina/moesina. (McDonald i Hascall, 2001). Així doncs, la via mediada per CD44 és una important reguladora en l'increment en la capacitat de migrar de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen la isoforma V3, com ja s'ha descrit en altres cèl·lules de melanoma humà i de ratolí (Faassen et al., 1992; Knutson et al., 1996).

També cal pensar en la possible alteració d'altres molècules de la MEC de les cèl·lules que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà. La migració cel·lular depèn d'un delicat equilibri entre l'adhesió cel·lular i la desadhesió (revisat per Li i Herlyn, 2000). S'ha demostrat recentment que l'E-cadherina regula negativament la interacció CD44-HA i la funció de CD44 de manera específica. Un desequilibri per una sobreexpressió de la funció de CD44 i/o disminució de la funció d'E-cadherina segurament contribuirà a la progressió tumoral (Xu i Yu, 2003). Les cèl·lules de carcinoma escamós N-cadherina positives *in situ* són més invasives (Islam et al., 1996) i es proposa que la invasió és potenciada per les interaccions via N-cadherina entre les cèl·lules del tumor i les de l'estroma. En el nostre sistema, caldria valorar si la funció de les cadherines està alterada i podria ser, almenys en part, motiu de les diferències observades en el fenotip cel·lular de les cèl·lules que sobreexpressen V3.

Encara que no es modifica la quantitat d'HA, un altre mecanisme que podria actuar en les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3 és l'efecte diferencial de l'HA en funció de la seva mida. S'ha descrit que l'HA d'elevat pes molecular per sobre de certes concentracions causa aturada del cicle cel·lular, un procés mediat per CD44 i la seva proteïna intracel·lular *Merlin* (Morrison et al., 2001). Per tant, la digestió de l'HA d'elevat pes molecular podria permetre a les cèl·lules tumorals escapar de l'aturada de cicle cel·lular induït per l'HA i, alhora, els productes de degradació de l'HA podrien proporcionar noves propietats en el tumor o les cèl·lules de l'estroma, incloent la producció de MMPs (Fieber et al., 2004). En els nostres experiments, tant el recobriment dels pous dels *transwells* com el tractament amb HA soluble es

feien amb l'HA d'elevada mida. Es necessiten més estudis per veure si els efectes diferencials observats en l'adhesió, migració i proliferació de les cèl·lules de melanoma LV3SN poden estar relacionats amb la fragmentació de l'HA.

Hem de tenir en compte que les diferències que observem en la migració de les cèl·lules que sobreexpressen V3 estan d'acord amb altres estudis on descriuen que les diferents isoformes de versicà influeixen de manera diferencial a la migració cel·lular. Perissinotto *et al.* (2000) van descriure que les diferents isoformes de versicà i agrecà tenien funcions guies divergents durant la dispersió cel·lular de la cresta neural, les quals estaven mediades tant pel cor proteic com per les cadenes de GAGs. En un estudi molt recent (Cattaruzza *et al.*, 2004) descriuen que la sobreexpressió del domini G1 de versicà, però no de G3, va incrementar significativament la capacitat invasiva de cèl·lules de melanoma, suggerint que aquest fenomen podria estar associat amb una modificació de la MEC produïda pel domini G1 secretat, possiblement formant una major retenció d'HA al voltant de les cèl·lules, tot i que les cèl·lules també van incorporar HA intracel·lularment. Aquest efecte no va ser degut a nivells incrementats de CD44. En el nostre cas, però, en els assaigs d'exclusió de partícules no hem observat una major retenció d'HA pericel·lular. Pel que fa a l'HA intracel·lular, seria interessant mesurar-ho, tot i que no està clara la seva funció.

Cattaruzza *et al.* (2002) descriuen en les cèl·lules endotelials humanes estimulades a migrar que s'alterava l'expressió de versicà i es transcrivien la isoforma V3 *de novo*. Així doncs, en aquest estudi descriuen una relació de l'expressió de V3 amb un augment de migració, com el que observem nosaltres, i, a més, no es pot descartar l'efecte de V3 a través de processos intracel·lulars. En el nostre cas, hem pogut detectar V3 dins del citoplasma cel·lular en les immunocitoquímiques de versicà de les cèl·lules de melanoma que sobreexpressaven V3. A més, en el nostre sistema els efectes induïts per la sobreexpressió de V3 no estan causats per un canvi en l'expressió de CD44 ni per la quantitat d'HA produït per les cèl·lules, indicant que V3 per sí mateix és el que provocaria un canvi en la interacció de CD44 i HA. En qualsevol cas, està clar que les cèl·lules tumorals poden modular el seu microambient *in vitro*, la qual cosa s'ha de considerar en els estudis relacionats amb migració i invasió (Bouterfa *et al.*, 1999). Els nostres resultats anteriors *in vitro* ja suggerien una acció directa del versicà sobre les vies de transducció de senyal, com per exemple l'efecte directe positiu sobre la proliferació cel·lular i negatiu sobre l'adhesió cel·lular en el cas del melanoma (Touab *et al.*, 2002).

Molt recentment s'ha descrit com les isoformes de versicà juguen diferents papers en la diferenciació neuronal i l'extensió de les neurites. La transfecció de V1 incrementa l'expressió del receptor de l'EGF i de les integrines $\beta 1$, $\alpha 3$ i $\alpha 5$, responsables de la diferenciació induïda per

V1. El domini G3 sol és insuficient per una diferenciació neuronal completa i sembla ser que el domini CS β és important en aquesta acció (Wu et al., 2004b). Per tant, com hem suggerit en el nostre sistema, en aquest cas també veiem un efecte complex de la sobreexpressió de versicà mediat pel receptor d'EGF i les integrines, així com de la presència de CS.

Per últim, doncs, cal comentar que el versicà podria ser una molècula diana important en la immunoteràpia dels tumors, com s'ha vist en el cas del cervell (Paulus et al., 1996). Molt recentment s'ha descrit que, tot i que els components de la MEC versicà, tenascina i HA semblen estar colocalitzats en un possible complex amb propietats anti-adhesives en els tumors de mama, la relació entre el contingut de versicà i els altres components de matriu varia entre els individus. Dins d'aquest complex, versicà és l'únic predictor de risc i, per tant, es suggereix que el versicà té un paper important en l'extensió del càncer de mama (Suwivat et al., 2004). Per altra banda, els nostres resultats mostren que la coexistència de diverses isoformes de versicà pot modular la seva activitat i que es pot alterar el comportament de les cèl·lules de melanoma modificant la composició i estructura de la MEC i, per tant, apareixen noves possibilitats de control del creixement de la cèl·lula tumoral.

Estudi de l'expressió de MMPs

La MEC és un reservori de proteïnes d'unió cel·lular i de factors de creixement que afecten al comportament de la cèl·lula tumoral. També és modificada substancialment per les proteases produïdes per les cèl·lules del tumor o de l'estroma. Com a resultat de l'activitat d'aquestes proteases, les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu s'alteren i es generen noves molècules biològicament actives a la MEC, i també es modifica la bioaccessibilitat i activitat de molts factors de creixement, receptors de factors de creixement i citoquines. Les proteases que degraden la MEC també juguen un paper crític en l'angiogènesi, on poden fer de reguladors positius i negatius de la proliferació de les cèl·lules endotelials i la morfogènesi vascular. L'activitat proteolítica de les proteases que degraden la MEC genera fragments de proteïnes biològicament actives que poden afectar a la proliferació, supervivència i plasticitat de les cèl·lules tumorals (revisat per DeClerck et al., 2004)

Mentre algunes macromolècules del teixit connectiu, particularment els col·làgens, són relativament resistents a l'atac proteolític i requereixen l'acció de proteases especialitzades, la majoria de proteoglicans semblen ser susceptibles a la degradació per diverses proteases. La degradació dels proteoglicans normalment s'inicia a l'ambient extracel·lular on les proteases degraden el cor proteic. Sota condicions normals varis passos són necessaris per tal que s'activi

l'acció proteolítica. A més, la síntesi tant de proteases com dels seus inhibidors està sota el control de varis factors de creixement i citoquines, cosa que manté normalment un equilibri (revisat per Roughley i Mort, 2000).

Un dels nostres objectius inicials consistia en completar la caracterització de les tres línies de melanoma caní CML-1, CML-6M i CML-10c2. Per aquest motiu, es va valorar la producció i activitat de metal·loproteases de matriu. Per dur a terme aquest objectiu es van realitzar zimogrames i *northern blot*. Molts anticossos que identifiquen proteases no distingeixen entre les formes actives i les inactives. Per tant, la sobreexpressió d'aquestes proteases, documentada en tumors per immunohistoquímica, no necessàriament implica un increment en l'activitat proteolítica. Per tant, és necessari conèixer l'activitat d'aquestes proteases *in vivo* o *ex vivo*. Així doncs, la zimografia és una eina molt important en determinar l'envolupament d'aquesta família d'enzims en els processos patofisiològics, ja que permet una avaluació directa del nivell d'activitat de les MMPs en un teixit o un tumor (revisat per Forget et al., 1999). Com es veu en els zimogrames obtinguts (tant en el de medis obtinguts de cultius confluents com en el de medis de cultius subconfluents) en les línies de melanoma caní hi ha presència d'una banda de 62-64 kDa, la qual correspon a la banda de MMP-2 (72 kDa) que quan s'activa es converteix a aquestes formes més petites. La banda gelatinolítica és present a les tres línies cel·lulars canines. En el cas del zimograma amb medis obtinguts de cultius subconfluents veiem com l'activitat gelatinolítica és superior en la línia cel·lular CML-1, la qual, a més, presenta una banda gelatinolítica de pes molecular superior corresponent a uns 84 kDa. Aquesta banda es troba al pes molecular corresponent a la forma activa de MMP-9, la qual evidencia la seva activitat en cultius cel·lulars subconfluents. L'expressió incrementada de MMP-9 (gelatinasa B o col·lagenasa tipus IV de 92 kDa) es correlaciona amb la invasió primerenca de melanoma humà (van den Oord et al., 1997), però també s'ha descrit la seva expressió en set línies cel·lulars de melanoma derivades d'avançats estadis de progressió (MacDougall et al., 1995). En les línies de melanoma humà estudiades SK-mel-1.36-1-5 i Mewo també hem vist activitat i expressió de MMP-2, mentre que, en canvi, no hem observat activitat de MMP-9.

Els nostres resultats estan d'acord amb altres descrits a la bibliografia: l'increment d'expressió de MMP-1, MMP-2 i MMP-9 en cèl·lules de melanoma s'ha correlacionat amb fenotip invasiu i migració (revisat per Hoffmann et al., 2000c). L'increment d'expressió de MMP-2 i la presència de la MMP-2 activa funcionalment s'ha associat amb la progressió de melanoma, de manera que la MMP-2 activa només es va observar en línies cel·lulars altament invasives, mentre que estava absent en línies cel·lulars pobrament o no invasives (Hofmann et al., 1999). Segons aquestes dades podem afirmar, mitjançant un altra característica molecular, que les

nostres línies cel·lulars de melanoma caní són altament invasives. Veiem que en els cultius confluents obtenim una activitat similar en les tres línies cel·lulars, mentre que en el cas dels cultius subconfluents veiem que la línia cel·lular CML-1 presenta una activitat gelatinolítica superior, a part de presentar també activitat gelatinolítica corresponent a l'activitat de la MMP-9. Aquests resultats d'activitat de la MMP-2 es corresponen amb el seu grau d'expressió de mRNA obtingut mitjançant el *northern blot*, on veiem que la línia cel·lular CML-1 és la que presenta més expressió d'aquest mRNA (resultats ja normalitzats per la quantitat total de RNA). Aquestes dades *in vitro* podrien fer pensar que la línia cel·lular CML-1 potser és la d'un comportament més invasiu. En canvi, en els resultats *in vivo* mostrats en els assaigs de tumorigènesi no s'han observat diferències significatives entre el potencial tumorigènic en els tumors induïts per CML-1 i els de CML-10c2

Per continuar amb l'estudi de les MMPs i les cèl·lules de melanoma, un dels següents objectius va ser continuar la caracterització de la matriu extracel·lular de les cèl·lules que sobreexpressaven la isoforma V3 de versicà. Per això vam voler veure quin era el rol de les MMPs en aquest sistema cel·lular. El fet que la sobreexpressió de V3 produís un lleuger augment de l'expressió i activitat de la MMP-2, sobretot en la línia canina CML-10c2, no era el resultat que s'esperava en un principi. S'havia relacionat un augment de MMP-2 amb major capacitat invasiva (Hofmann et al., 1999) i, en canvi, les cèl·lules que sobreexpressaven la isoforma V3, i semblaven tenir més activitat de MMP-2, tenien un comportament menys proliferatiu tant *in vivo* com *in vitro*. En canvi, en les migracions sobre àcid hialurònic sí que les cèl·lules que sobreexpressaven V3 tenien més capacitat migratòria, la qual cosa sí que podria ser, almenys en part, gràcies a la sobreexpressió de MMP-2, a través del següent mecanisme: s'ha descrit que CD44 uneix i localitza la MMP-9 a la superfície cel·lular. A més, l'activació de CD44 per la unió amb HA produeix la secreció de pro-MMP2, la qual passa a ser la forma activa per l'acció de MT1-MMP (revisat per Isacke i Yarwood, 2002). Per tant, un augment de MMP-2 en el cas de les cèl·lules que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà es podria correspondre amb una activació de CD44 per la unió amb HA, la qual també incrementaria la migració cel·lular, tal i com veiem en els nostres resultats. Per altra banda, el CD44 per sí mateix és també un substrat per la MT1-MMP. El CD44 intacte uneix els seus lligands extracel·lulars i lligands de superfície cel·lular al citoesquelet d'actina via la seva capacitat d'unir els membres de la família ERM. El trencament d'aquesta unió reflexa la capacitat de MT1-MMP per promoure la migració cel·lular mediada per CD44 (Fig. 39).

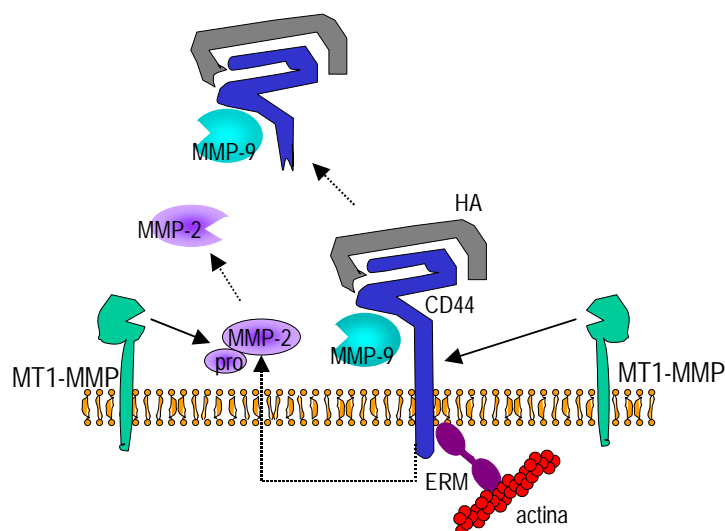


Figura 39. Interacció de CD44 amb MMPs. El CD44 localitza la MMP-9 a la superfície cel·lular. L'activació del CD44 per la seva unió amb HA produeix la secreció de pro-MMP-2, que és activada per la MT1-MMP, la qual també trenca la molècula de CD44. El CD44 intacte uneix la MEC al citoesquelet d'actina, via la família ERM (ezrina, radixina, moesina). Adaptat de Isacke i Yarwood, 2002.

En varis tipus tumorals, entre ells el melanoma, s'ha trobat una correlació positiva entre l'elevat nivell d'expressió proteica de MMP-2 i mal pronòstic. En el melanoma s'ha descrit MMP-2 com a factor de pronòstic per la supervivència, independent de la classificació Breslow o el nivell Clark (Väisänen et al., 1998). A part de la proteòlisi de components de la matriu extracel·lular, la MMP-2 també causa la proteòlisi de components de superfície cel·lular que medien l'adhesió de cèl·lules de melanoma humà a la matriu extracel·lular. Per tant, pot modular l'adhesió i facilitar la migració cel·lular i invasió (Ray i Stetler-Stevenson, 1995). El rol de la MMP-9 en la progressió del melanoma no està tan clara. S'ha vist que la MMP-9 activa s'uneix a isoformes específiques del PG CD44 a la superfície de cèl·lules de carcinoma mamari de ratolí i cèl·lules de melanoma humà, cosa que promou la degradació del col·lagen tipus IV *in vitro* i la invasió de cèl·lules tumorals de monocapes de mioblasts (Yu i Stamenkovic, 1999). Per tant, CD44 serveix per ancorar MMP-9 a la superfície cel·lular i defineix un mecanisme per la invasió tumoral mediada per CD44.

La importància d'una comprensió més completa dels rols de les proteases en la progressió maligna està adquirint urgència ja que els assaigs clínics usant inhibidors sintètics de MMPs no estan demostrant que la inhibició sigui eficaç. Recentment s'ha descrit un rol important per la MT1-MMP durant l'angiogènesi tumoral, ja que, entre altres coses, participa i coopera amb les integrines $\beta 1$ i $\alpha v\beta 3$ en la migració de les cèl·lules endotelials sobre diferents MEC (Gálvez et al., 2002; revisat per DeClerck et al., 2004). Les proteïnases es localitzen predominantment a la "invadopodia" (extensions de membrana especialitzades, les quals són llocs de degradació de

la MEC) (revisat per Murphy i Gavrilovic, 1999). Estudis recents mostren que MT1-MMP i MMP-2 estan expressades a la interfase tumor-estroma al front invasiu dels melanomes primaris, suggerint que aquests enzims poden estar lligats en promoure la progressió del melanoma i la invasió als teixits que l'envolten (revisat per Iida et al., 2001; Takino et al., 2004). Aquest fet concordaria amb els nostres resultats de la localització de CD44, que aniria relacionada amb la de MMP-2 i MT1-MMP, a la perifèria dels melanomes malignes canins, així com a la perifèria dels melanomes induïts als ratolins. Hi ha evidència que la MT1-MMP juga un rol clau en la capacitat d'envair del melanoma maligne *in vitro* i que els nivells d'expressió de TIMP-2 podrien regular l'expressió de pro-MMP-2 mediada per MT1-MMP (Kurschat et al., 1999).

Estudi de l'expressió d'integrines

Les integrines són un gran grup de glicoproteïnes, l'estructura de les quals consisteix en l'associació heterodimèrica de les subunitats α i β . Cada component important de la MEC pot ser reconegut per una o més integrines, però el significat d'aquesta redundància no es coneix. L'associació dinàmica dels receptors d'integrines amb el citoesquelet d'actina, a través de la subunitat β , pot induir canvis en la morfologia cel·lular, els quals alteren la capacitat de les cèl·lules de proliferar, diferenciar-se, adherir-se o migrar (revisat per Rosso et al., 2004). Les interaccions de les integrines amb la MEC també activen les vies de transducció de senyal (revisat per Brakebusch i Fässler, 2003).

En veure els resultats diferencials d'adhesió i migració de les cèl·lules que sobreexpressaven la isoforma V3 del versicà respecte les seves controls, es va pensar en la possibilitat d'una acció mediada, almenys en part, per les integrines. S'ha descrit que la subunitat $\beta 1$ de la integrina s'uneix al domini C-terminal del versicà, la qual cosa activa l'activitat quinasa d'adhesió focal (*focal adhesion kinase, FAK*), incrementa l'expressió d'integrina i promou l'adhesió cel·lular. L'activitat FAK és el pas intracel·lular immediat en la via mediada per la integrina. Com a resultat, les cèl·lules que expressen el domini C-terminal de versicà són resistents a l'apoptosi induïda per radicals lliures. A més, el mecanisme d'unió a la integrina és un nou mecanisme, ja que no és el motiu consens RGD (Wu et al., 2002).

Vam observar que només les cèl·lules de melanoma humà SK-mel-1.36-1-5 transfectades amb la isoforma V3 semblaven tenir més expressió d'integrines $\beta 1$ que les seves control respectives. Per tant, aquesta abundància de $\beta 1$ ens podria explicar, almenys en part, la migració diferencial sobre HA entre les cèl·lules controls respecte les que sobreexpressaven V3, ja que s'ha descrit que un increment en la subunitat de la integrina $\beta 1$, la qual s'uneix amb el receptor d'EGF, produeix un increment d'adhesió, disminució de proliferació i de migració (Wu et

al., 2004a). S'ha descrit que la integrina $\alpha 2\beta 1$, i no el CD44, mitjancia la migració de les cèl·lules de melanoma i la reorganització de la MEC en matrius de col·lagen tridimensionals que contenen HA (Maaser et al., 1999). Pel que fa a la resta de marcadors analitzats - que foren les subunitats de les integrines αv , $\beta 3$, $\beta 5$ i les integrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ i $\alpha v\beta 6$ - l'expressió fou molt menor i, a més, no s'observaren diferències entre les cèl·lules control i les transfectades amb V3.

En el nostre sistema estudiat, l'increment de l'expressió de la integrina $\beta 1$ en el cas de les SK-mel-1.36-1-5 LV3SN pot causar, almenys en part, la migració augmentada d'aquestes cèl·lules. També s'ha descrit que la integrina $\alpha v\beta 3$ i el CD44 (receptors d'adhesió cel·lular) interaccionen amb enzims proteolítics a la superfície cel·lular i això facilita la proteòlisi de les proteïnes de la MEC i la migració i/o invasió cel·lular. La interacció de MMP-2 i la integrina $\alpha v\beta 3$ permet que les cèl·lules tumorals puguin focalitzar i activar MMPs en els llocs d'adhesió a prop de la superfície cel·lular. (revisat per Iida et al., 2001).

Estudi de l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$

Un altre objectiu va ser estudiar l'expressió de la integrina $\alpha v\beta 3$ en les tres línies cel·lulars de melanoma caní, ja que diferents observacions suggereixen que la integrina $\alpha v\beta 3$ (també coneguda com el receptor de la vitronectina) és una de les integrines que juga un paper important en la tumorigènesi i la metastasi. Té diverses funcions biològiques durant la progressió de la fase radial no tumorigènica a la fase vertical invasiva del melanoma primari (Hsu et al., 1998). En aquest cas, només vam obtenir un resultat positiu a la immunocitoquímica d' αv en la línia cel·lular CML-1. Vam trobar una reacció positiva per tota la membrana cel·lular amb una tendència a marcar contactes focals, tot i que menys evident del què s'esperava. En els contactes focals, les integrines físicament fan de pont de la MEC cap a la xarxa de filaments citoplasmàtics d'actina (revisat per Rosso et al., 2004). Aquest resultat és interessant, ja que estudis recents proposen antagonistes d'aquesta integrina (sobretot de la subunitat αv , que és la que nosaltres analitzem) com a possible teràpia del melanoma maligne, ja que la integrina $\alpha v\beta 3$ s'ha implicat en la progressió del melanoma maligne i en l'angiogènesi com a un receptor que proporciona senyals de supervivència (Mitjans et al., 1995; Mitjans et al., 2000).

L'anticòs utilitzat en la immunocitoquímica realitzada a les nostres línies cel·lulars de melanoma caní fou el 17E6. Aquest anticòs fou generat contra la subunitat αv de les integrines i reconeix les integrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ i $\alpha v\beta 1$. Recentment s'ha suggerit que les cadenes $\beta 1$ i αv de les integrines s'expressen independentment en el melanoma metastàtic i poden tenir un efecte en el potencial metastàtic de les cèl·lules de melanoma (Nikkola et al., 2004). El

tractament amb antagonistes anti- αv i, concretament, amb el 17E6 inhibeix l'adhesió de cèl·lules de melanoma humà a vitronectina i fibronectina, desorganitza el citoesquelet d'actina, i redistribueix les integrines αv i els contactes focals. Així mateix inhibeix el desenvolupament tumoral *in vivo* sense citotoxicitat evident (Mitjans et al., 1995; Petitclerc et al., 1999; Castel et al., 2000). Aquest anticòs monoclonal és el que s'ha proposat com a possible teràpia del melanoma *in vivo*. Molt recentment s'ha vist que un anticòs monoclonal humà que inhibeix les integrines αv (CNTO 95) inhibeix l'adhesió, migració i invasió *in vitro* de les cèl·lules de melanoma humà. Aquest anticòs inhibeix el creixement tumoral humà independentment de la seva activitat antiangiogènica (Tripathi et al., 2004). Cal destacar els rols de la integrina $\alpha v\beta 3$ i les metal·loproteases en el procés d'angiogènesi. Una aplicació clínica més immediata és l'angiogènesi tumoral com a marcador de pronòstic en la neoplàsia maligna (Piulats i Mitjans, 2000). Un dels marcadors més específics de la vasculatura tumoral són les integrines αv . A més, també s'ha proposat l'ús d'agents dirigits anti- αv com a portadors de fàrmacs, radionucleòtids, gens i altres substàncies terapèutiques per tal d'introduir-los a la vasculatura tumoral (revisat per Hahn, 1999).

Per tant, la integrina $\alpha v\beta 3$ és essencial en el creixement del melanoma maligne humà *in vivo* i proporciona un potencial terapèutic pels seus antagonistes en el tractament d'aquests tumors (Mitjans et al., 2000). El fet que la línia cel·lular CML-1 mostri l'expressió d'aquesta subunitat αv , que pensem que es correspondria majoritàriament a la de la integrina $\alpha v\beta 3$, pot tenir importància pel seu possible ús com a model d'estudi terapèutic i de diagnòstic. Tenint en compte tots els aspectes de la caracterització de les tres línies cel·lulars de melanoma caní, proposem aquesta línia cel·lular com la millor candidata de model d'estudi del melanoma humà. Cal recordar que prové d'un melanoma oral caní, que és el melanoma caní de comportament biològic més similar al melanoma maligne humà. Per tant, es podria proposar el melanoma oral caní com a possible model d'estudi de futures teràpies.

3. Expressió de CD44 en melanomes canins

L'adhesió cel·lular és crucial per la formació i integritat dels teixits. La superfície cel·lular posseeix dues classes de receptors: les integrines i les no integrines. Dins dels no integrines, els més estudiats són els sindecans i el CD44 (revisat per Rosso et al., 2004). CD44 i el seu lligand HA han estat implicats en la proliferació i migració del melanoma humà i murí (Faasen et al.,

1992; Thomas et al., 1992; Knutson et al., 1996., Peck i Isacke, 1996). La interacció entre el CD44, expressat a les cèl·lules tumorals, i l'HA de l'estroma poden incrementar el creixement i invasió de certs tumors. S'ha descrit que el trencament de la interacció entre CD44 i HA per CD44 soluble inhibeix la formació del tumor per cèl·lules de limfoma i melanoma transfectades amb CD44 (Zeng et al., 1998). A sobrenadants de cèl·lules de melanoma humà es va detectar la proteïna CD44 soluble en elevades concentracions. Les serin-proteases i metal·loproteases estan involucrades en la proteòlisi i alliberament de CD44 de la superfície de les cèl·lules de melanoma. El CD44 soluble quasi inhibia completament la unió de l'HA per les cèl·lules de melanoma (Ahrens et al., 2001a).

Els nostres primers resultats en les línies de melanoma caní havien mostrat diferents nivells de versicà i HA. Ja que aquestes molècules exerceixen la seva funció a través de CD44 vam decidir investigar l'expressió d'aquest receptor en el model caní. En les dues línies cel·lulars de melanoma caní estudiades, CML-1 i CML-10c2, vam observar la presència d'una proteïna d'uns 80 kDa, identificada com CD44. En moltes espècies, CD44 es troba com a diferents isoformes originades de l'*splicing* alternatiu de 10 exons (Goodison et al., 1999; Bajorath, 2000). No s'ha descrit res de les isoformes de CD44 canines, però per extrapolació de les dades humanes (East et al., 1993; Manten-Horst et al., 1995; Goebeler et al., 1996) suggerim que la isoforma trobada en les línies cel·lulars de melanoma caní correspon a la isoforma estàndard, la que no porta cap dels exons variables. L'anticòs caní que es va utilitzar per la immunodetecció de CD44 és un anticòs caní monoclonal específic contra CD44 caracteritzat per Alldinger *et al.* (Alldinger et al., 1999). Aquest anticòs havia estat assajat en diferents teixits i s'havia descrit que marcava el 100% de les cèl·lules tumorals en histiocitosi maligne i més del 50% en les cèl·lules d'histiocitoma caní. D'acord amb la seva localització a la membrana, el marcatge amb aquest anticòs tant de cèl·lules com de biòpsies de melanoma donà una marca clara a la membrana cel·lular, i revela la disposició de les cèl·lules en nus.

L'HA junt amb el versicà i altres glicoproteïnes com la tenascina (Yamaguchi, 2000) formen una matriu pericel·lular que proporciona la informació i senyals necessàries al CD44, que es troba unit a la membrana cel·lular (Karjalainen et al., 2000). Les línies cel·lulars CML-1 i CML-10c2 difereixen en la quantitat de HA dipositat a la matriu pericel·lular, així com en l'expressió de versicà. Mentre que la línia CML-1 té una matriu pericel·lular prominent degut al superior contingut en HA, el qual interacciona amb el versicà expressat, no es pot observar recobriment pericel·lular en el cas de la línia CML-10c2, que té produeix HA en menor quantitat i no expressa cap isoforma de versicà. Proposem, doncs, que els tres components són necessaris per formar el complex CD44-HA-versicà i la matriu pericel·lular. Aquest recobriment extracel·lular format per

HA-VS i altres glicoproteïnes proporciona informació a CD44, que donarà senyals intracel·lulars per incrementar la proliferació i migració.

El rol clínic de CD44 i HA a melanoma cutani en humans ha romàs obscur i amb resultats divergents. S'ha observat que un nivell reduït de CD44 i associat HA al tumor primari es correlaciona amb la subseqüent progressió de la malaltia i poca supervivència. Dietrich *et al.* (1997) descriueren un incrementat risc de metàstasi del melanoma associat a una elevada expressió de CD44. En canvi, Karjalainen *et al.* (2000) van descriure que l'expressió de CD44 es trobava disminuïda en els melanomes metastàtics. Resultats contradictoris, doncs, s'han descrit respecte a l'expressió incrementada o disminuïda de CD44 en el melanoma humà. En el nostre estudi, hem mostrat que l'expressió de CD44 és més elevada en els melanomes canins malignes respecte els benignes, ja que el 71% dels melanomes malignes expressen alts nivells de CD44 (classificats com +++ o ++++), mentre que només el 36% dels benignes ho fan. Aquestes diferències amb els melanomes humans poden ser deguts a les diferències de localització entre els melanomes malignes canins, majoritàriament de la mucosa oral, i els melanomes malignes humans, majoritàriament cutanis. L'ambient que envolta les cèl·lules a la mucosa oral difereix molt del de les cèl·lules cutànies, sobretot en el contingut de HA (Tammi *et al.*, 1990), la qual cosa podria explicar algunes de les diferències entre l'expressió de CD44 humà i caní en el melanoma.

En l'estudi de les biòpsies de melanomes canins, s'observa que la distribució intratumoral de CD44 entre els melanomes benignes i malignes és notablement diferent. Entre tumors que mostraven una expressió de CD44 elevada comparable, es va veure com els benignes tenien una distribució homogènia de CD44 en totes les regions del tumor (tres de quatre casos), mentre que nou de dotze melanomes malignes mostraven una expressió de CD44 molt més intensa a la perifèria del tumor, coincidint amb les àrees externes de proliferació del tumor, la qual cosa suggereix que l'expressió de CD44 pot ser un factor que afavoreix a la proliferació cel·lular del tumor. Havíem detectat també una expressió localitzada de CD44 en la perifèria dels tumors primaris originats de les línies CML-1 i CML-10c2. Aquests resultats concorden amb el que succeeix en els tumors cerebrals humans, on s'observa que CD44 està intensament expressat a la interfase entre el tumor invasiu i el cervell normal (Koochekpour *et al.*, 1995). Els resultats del nostre estudi ens suggereixen la possible utilització de CD44 com a marcador de malignitat en el diagnòstic i pronòstic del melanoma caní, el qual és difícil en el cas dels melanomes amelanòtics.

El melanoma es caracteritza per un comportament altament agressiu tant en els humans com en els gossos. Per tant, com a conclusió dels diferents resultats obtinguts amb les cèl·lules i biòpsies de melanoma canines, es pot pensar en el gos com a un bon model d'estudi del melanoma i de la matriu extracel·lular. Pot tenir avantatges sobre els models en ratolins ja que, a part de ser tumors espontanis, trobem diferències topogràfiques en la pell dels humans i els ratolins. Els melanòcits murins, a diferència dels humans, es troben en els fol·licles pilosos profunds de la dermis i, per tant, cal tenir cautela quan s'interpreten els resultats obtinguts de models de ratolí (revisat per Hsu et al., 2002), mentre que l'estructura de la pell del gos és més semblant a la humana.

El versicà s'ha descrit com a possible marcador de pronòstic del melanoma maligne i com a marcador per diferenciar els NAD amb atípia severa dels d'atípia lleu o moderada (Touab et al., 2002; Touab et al., 2003). Amb els nostres resultats podem parlar de diferents funcions del versicà en funció de la isoforma expressada. Mentre que el V0 i V1 s'expressen a cèl·lules més indiferenciades i agressives, s'observa que la sobreexpressió de V3 produeix un retard en el creixement cel·lular, tant *in vivo* com *in vitro*. Per tant, s'aconsegueix revertir el fenotip de la cèl·lula de melanoma amb la sobreexpressió de la isoforma V3. Així doncs, modificant l'estructura i composició de la MEC es pot alterar el comportament de les cèl·lules de melanoma i, per tant, apareixen noves possibilitats pel tractament del creixement tumoral.

Conclusions

1. Els PGs extracel·lulars produïts per les línies cel·lulars de melanoma caní CML-1 i CML-6M són versicà i un altre CSPG similar a mel-CSPG, de manera semblant a les línies cel·lulars indiferenciades de melanoma humà. La línia cel·lular de melanoma caní CML-10c2 produeix una quantitat molt baixa de PGs extracel·lulars d'elevat pes molecular, de manera similar al que passa a les línies cel·lulars de melanoma humà diferenciades.
2. El TGF- β 1 incrementa la producció de PGs en el medi extracel·lular de les línies cel·lulars CML-1 i CML-6M i incrementa el pes molecular d'aquestes macromolècules, per la inducció de la síntesi de cadenes GAGs, similar a la situació que es dona a les cèl·lules humanes indiferenciades. La línia cel·lular CML-10c2 no respon al tractament amb TGF- β 1, de forma semblant al que succeeix a les cèl·lules humanes diferenciades. El tractament amb IGF-1 (50 ng/ml) indueix la síntesi de PGs a les tres línies cel·lulars estudiades, mentre que el tractament amb HGF no mostra cap efecte en la síntesi de PGs.
3. La sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà a les cèl·lules de melanoma humà, SK-mel-1.36-1-5 i Mewo, i a les de melanoma caní, CML-1 i CML-10c2, incrementa l'adhesió cel·lular sobre l'HA.
4. La sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà a les cèl·lules de melanoma humà, SK-mel-1.36-1-5 i Mewo, i a les de melanoma caní, CML-1 i CML-10c2, incrementa la migració cel·lular sobre HA, interferint amb la interacció HA-CD44.
5. La sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà disminueix la proliferació cel·lular a través d'un mecanisme independent de l'adhesió. Els nivells de p21 es troben incrementats en les línies que sobreexpressen V3 respecte les controls. Les cèl·lules de melanoma humà Mewo que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà tenen un lleuger retard en el cicle cel·lular respecte les controls i mostren un increment molt lleuger en l'apoptosi.
6. L'efecte de V3 sobre el fenotip cel·lular pot explicar-se en part per una acció competitiva amb les isoformes V0 i V1 endògenes en el cas de les línies SK-mel-1.36-1-5 i CML-1, però hi ha d'haver un altre efecte independent ja que també es poden veure els efectes en les línies Mewo i CML-10c2 que no expressen V0 ni V1 endògenament.
7. Les tres línies cel·lulars de melanoma caní expressen MMP-2, la qual és troba activa en els medis condicionats. La línia cel·lular CML-1 també mostra activitat gelatinolítica corresponent a MMP-9. Les cèl·lules de melanoma que sobreexpressen V3 tenen més expressió i activitat de MMP-2 que les controls respectives, sobretot la línia cel·lular de melanoma caní CML-10c2.

8. Les cèl·lules de melanoma humà SK-mel-1.36-1-5 que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà tenen una expressió superior de la subunitat $\beta 1$ de les integrines i mostren una menor migració sobre col·lagen.
9. La sobreexpressió de la isoforma V3 de versicà a les cèl·lules Mewo, CML-1 i CML-10c2 provoca un període de latència més llarg que les seves respectives controls en assaigs de tumorigènesi en ratolins.
10. Els tumors primaris originats de les cèl·lules de melanoma SK-mel-1.36-1-5 i CML-10c2 que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà mostren una tinció més intensa de CD44 i HA a la part més externa del tumor. Les cèl·lules que sobreexpressen V3 presenten una marca més intensa de HA que a les controls i no es veuen diferències significatives en la tinció amb CD44.
11. Les línies cel·lulars de melanoma humà Mewo i caní CML-10c2 que sobreexpressen la isoforma V3 de versicà produeixen metàstasis al pulmó (principal lloc de metàstasi dels melanomes), mentre que no se'n produeixen en els controls respectius.
12. La línia cel·lular de melanoma caní CML-1 expressa CD44, produeix elevades quantitats de HA i expressa versicà. La línia cel·lular de melanoma caní CML-10c2 també expressa CD44, produeix HA en menor quantitat i no expressa versicà. La matriu pericel·lular de CML-1 és visible, mentre que no ho és la de CML-10c2, la qual cosa indica que la presència dels tres components del complex és necessari pel seu ensamblatge.
13. L'expressió de CD44 és superior en els melanomes malignes canins que en els melanocitomes. Els tumors malignes canins mostren una expressió més intensa de CD44 a la perifèria del tumor, mentre que els benignes mostren una expressió de CD44 homogènia en el tumor.

Annex. Materials i mètodes

ZIMOGRAFIA

A.- PREPARACIÓ DE LES MOSTRES PER ZIMOGRAFIA

A.1.- Medis

Les tres línies cel·lulars canines de melanoma es cultivaren fins estar a una confluència del 80 % i, en el cas dels cultius subconfluents, fins a un 50-60 %. S'aspirà el medi i es feu una incubació de 6 hores amb medi sense sèrum. Es retirà aquest medi i es tornà a afegir medi RPMI sense sèrum durant 24 hores, després de les quals el medi fou recollit. Aquests medis condicionats es varen analitzar mitjançant la tècnica de la zimografia de gelatina. Com a control positiu s'utilitzà el medi condicionat de les cèl·lules MXT.C1.1, les quals procedeixen d'una metàstasi a pulmó d'un adenocarcinoma de mama de ratolí (cedides amablement per A. Fabra, I.R.O, Barcelona). S'agafà el volum necessari de cada mostra per tenir un total de 10 µg de proteïna (mesurat mitjançant mètode Bradford) i 6 µg de proteïna de la mostra control.

A.2.- Extractes

Les tres línies cel·lulars canines de melanoma es cultivaren fins estar en estat exponencial (60-70% de confluència). Es rentaren amb PBS tres vegades i es tripsinitzaren. Es realitzà el seu comptatge i les mostres es centrifugaren (2000 rpm) dues vegades. Posteriorment el pellet obtingut es resuspengué en TBS i es tornà a centrifugar. El pellet obtingut es va resuspendre en 100 µl de 1.5 % TritonX-114 en TBS - aquest detergent solubilitza les proteïnes de membrana cel·lular - i mantenint les mostres en gel. S'incubaren a 4°C durant 15 minuts i, posteriorment, es centrifugaren a 14000 rpm, mantenint les mostres a 4°C, durant 2 minuts. Es recollí el sobrenadant, el qual s'incubà durant 5 minuts a 37°C. Es centrifugaren les mostres (d'aparença tèrbola) a 6500 rpm, durant 5 minuts a temperatura ambient, i es van obtenir dues fases a cada mostra: la fase del detergent i la de l'aigua. S'eliminà aquesta última fase. Per últim, es procedí al càlcul de la concentració cel·lular de les mostres obtingudes (nº cèl·lules totals de la mostra/ volum fase detergent). El zimograma es va normalitzar per nombre de cèl·lules (entre 1-2 milions de cèl·lules/pou) intentant que el volum fos el mínim possible.

B.- ZIMOGRAFIA

A les mostres se'ls afegí el tampó de càrrega (preparat 5X, conté 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, 10 % SDS i 1 % de blau de bromofenol) i es van carregar a un gel d'electroforesi. Les mostres (medis o extractes) s'analitzaren electroforèticament en un gel del 7.5 % de poliàcrilamida amb gelatina a una concentració final del 0.1 % incorporada com a substrat, sota condicions no reductores a 40V durant tota la nit (en un sistema refrigerat). Per incorporar la

gelatina al gel, primer es dissolgueren 0.03 g de gelatina (BioRad®) en 1 ml de SDS 10% i 10.84 ml d'aigua a 37 °C, en agitació. Posteriorment es filtrà amb un filtre de 45 µm i es barrejà amb la resta de components del gel.

El gel fou rentat dues vegades a temperatura ambient durant 45 minuts cada cop en una solució del 2.5 % Triton X-100 en 50 mM Tris-HCl pH 7.5 amb 0.05 % d'azida sòdica. Després es rentà diverses vegades en aigua destil·lada i s'incubà en *developing buffer* (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05 % azida sòdica, pH 7.5) durant tota la nit a 37 °C. Les bandes d'activitat gelatinolítica s'observaren després de tenyir el gel amb 0.1 % Blau Brillant de Coomassie en una solució del 10 % d'isopropanol/ 10 % àcid acètic glacial. Aleshores el gel fou destenyit en una solució del 10 % isopropanol/10 % àcid acètic glacial i després incubat en una solució del 50 % metanol i 5 % glicerol per aconseguir la mida de gel desitjada. Després el gel fou assecat. El càlcul del pes molecular aparent de les bandes gelatinolítiques es feu en referència al marcador estàndard de pes molecular utilitzat (Benchmark®).

NORTHERN BLOT

Alíquotes de 15 µg de RNA total de cada mostra foren separades en un gel desnaturalitzant d'agarosa a l'1.1 % , el qual contenia formaldehid, i transferides a una membrana de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech®). La membrana va ser hibridada durant tota la nit en rotació, a 42 °C amb una sonda humana de MMP-2 marcada amb [³²α-P]dCTP (PCDcol IVδ5A, cedida per A.Fabra de l'I.R.O, Barcelona) en el tampó d'hibridació amb un 50 % de formamida.

A les 24 hores la membrana fou rentada sota condicions restringents en una solució 2X SSC-0.1 % SDS a temperatura ambient durant 30 minuts i un segon rentat a 55 °C durant una hora. Aleshores la membrana s'exposà al film durant tota una nit a -80°C i es el resultat es veié per autoradiografia. El mateix blot fou rehibridat a una sonda GAPDH per normalitzar la quantitat de RNA existent a les mostres.

La quantificació es determinà per densitometria (com s'ha explicat anteriorment) i la normalització es feu segons la quantitat total de RNA (GAPDH).

DENSITOMETRIA

Els zimogrames i *northern blots* foren analitzats mitjançant un densitòmetre (Gel Doc 2000, BioRad®) i el *software* associat (programa *Quantity One*). Per obtenir un valor semiquantitatiu per cada mostra, la intensitat i àrea de cada banda es comparà al valor de la

mostra control. Es calculà una relació dels valors de les mostres respecte el control, obtenint així valors arbitraris per a cada mostra.

IMMUNOCITOQUÍMICA

La tècnica d'immunolocalització ens permet detectar si una determinada proteïna s'expressa en una cèl·lula i localitzar en quin compartiment cel·lular es troba. Tot això s'aconsegueix mitjançant la utilització d'anticossos específics sobre cèl·lules prèviament fixades. Així, les cèl·lules van ser crescudes en portaobjectes de vidre circulars (1 cm de Ø, prèviament esterilitzats). La majoria de cèl·lules poden créixer bé sobre aquests portaobjectes mantenint les seves característiques morfològiques. Els portaobjectes són fàcilment manipulables i permeten gastar volums mínims d'anticossos i dels altres reactius. En aquest apartat es descriu la tècnica referent a la detecció d'integrina αv i de la isoforma V3 de versicà.

1.- Fixació: quan les cèl·lules arribaren a la densitat de creixement desitjada (subconfluents, aproximadament 20000 cèl·lules/portaobjectes), s'aspirà el medi de cultiu i es rentaren tres vegades amb PBS atemperat per eliminar totes les restes. Les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid 3%-sacarosa 2% en PBS, durant 25 minuts. S'eliminà el paraformaldehid i es rentà amb PBS.

2.- Permeabilització de les mostres amb Triton-X-100 0.1% en G-PBS (20 mM glicina en PBS) durant 5 minuts i posteriorment es van rentar amb G-PBS.

3.- Bloqueig de les unions inespecífiques amb BSA 1% en G-PBS.

4.- Immunolocalització: posteriorment s'incubaren les cèl·lules amb l'anticòs primari 17E6 (subunitat αv), cedit amablement per F. Mitjans (Merck I+D, Barcelona), es deixà 45-60 minuts a 37 °C, a una dilució 1/100. En el cas de la immunocitoquímica de versicà, l'anticòs primari fou l'anti-versicà policlonal produït al nostre laboratori a una dilució 1/100 i es deixà incubant 16-18 hores a 4°C.

5.- Es rentaren amb PBS i en el cas de la immunocitoquímica de la integrina s'incubaren amb l'anticòs secundari monoclonal anti IgG-FITC a una dilució 1/35 i, a més, també s'afegí faloidina-TRITC a una dilució 1/100, per la tinció del citoesquelet. En el cas del versicà l'anticòs secundari va ser un anti-IgG de conill marcat amb FITC a una dilució 1/30. La incubació, de 60 minuts a 37°C, i la resta de passos es mantingueren a les fosques. Es van rentar amb PBS. Posteriorment es tenyiren els nuclis amb Hoechst (33258) 1/1000 (*stock* 1 mM) durant 5 minuts, es rentaren i després ja es féu el muntatge amb Immunofluore (ICN). Les mostres es van mirar amb el

microscopi Nikon Eclipse E800®. Com a controls negatius dels antisèrums s'utilitzà PBS per l'anticòs monoclonal i pel policlonal s'utilitzà sèrum de conill a la mateixa dilució que el primari.

MIGRACIÓ SOBRE COL·LAGEN

Com a substrat vam utilitzar el col·lagen tipus I (SIGMA®, C-9791) a la concentració de 15 µg/ml en PBS. Per fer aquests assaigs de migració es van utilitzar plaques HTS Fluoroblock amb *transwells* amb porus de 8 µm (Falcon®), a les quals es van afegir 75 µl de col·lagen a la superfície de cada *transwell* i 100 µl dins de cada pou, per fer-ne el recobriment, i es van incubar 2-3 hores a 37°C o 16-18 hores a 4°C.

Posteriorment s'eliminà el substrat sobrant dels pous i es plaquejaren les cèl·lules a una concentració de 5×10^4 cèl·lules/pou, resuspeses en 100 µl medi DMEM sense FCS-1% BSA. Es van fer quadruplicats de cada línia cel·lular i es van incubar 2 hores. Seguidament es van posar 500 µl del mateix medi amb una concentració de 50 ng/ml de *rHGF* (R&D Systems ®) com a factor migratori al compartiment inferior. Les cèl·lules es van incubar a 37°C durant 16-18 hores. Els controls negatius van ser les cèl·lules sense el factor migratori.

Posteriorment es van afegir 50 µl de 0.1mM calceïna (Calbiochem®) als 500 µl de medi de sota els pous i s'incubà 1 hora a 37°C. Es va aspirar el medi de sobre els pous i es féu un rentat amb PBS. Seguidament ja es procedí a la lectura dels resultats de migració al CytoFluor 2350 (Millipore®) a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i una lectura d'emissió de 530 nm. També es van observar les cèl·lules que havien migrat en un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800®. Aquests assaigs es van realitzar en col·laboració amb el Dr. J. Adan (Merck I+D, Barcelona).

ANÀLISI D'INTEGRINES PER CITOMETRIA DE FLUX

Es tripsinitzaren les cèl·lules per tenir 250000 cèl·lules pel marcador i 250000 cèl·lules pel control negatiu. Primer es feren 2 rentats amb tampó: PBS-BSA1%-0.01% azida, centrifugant a 2000 rpm cada vegada i llençant el sobrenadant. Posteriorment es van afegir els 100 µl de l'anticòs primari, és a dir del marcador d'integrina corresponent, a una concentració de 10 µg/ml, i al control negatiu, a la mateixa concentració que el primari, s'hi va posar una IgG del mateix isotipus. Les cèl·lules es van incubar durant 20 minuts a 4°C amb l'anticòs primari.

Posteriorment es van fer dos rentats amb el mateix tampó utilitzat anteriorment i s'afegiren els 100 µl de l'anticòs secundari: la fracció F_{ab2} d'un anticòs anti-ratolí de cabra (ALEXafluor 4.88), a una dilució 1/250 (8 µg/ml) i s'incubà durant 20 minuts a 4°C. Es van fer 2

rentats de la mateixa manera que els anteriors i les mostres es van resuspendre en 500 µl de tampó i s'hi afegiren 3µl de iodur de propidi (IP, 10 µg/ml). Les mostres s'analitzaren per citometria de flux amb el citòmetre EPICS-XL (Beckman®) amb la col·laboració del Dr. J. Adan (Merck I+D, Barcelona).

ANÀLISI DE CICLE CEL·LULAR PER CITOMETRIA DE FLUX

Es van plaquejar les cèl·lules en plaques de 100 mm per tenir-les a una confluència d'un 50%. Un cop arribat a aquest grau de confluència, les cèl·lules es van posar amb medi sense FCS (MCDB 105 SIGMA®) durant 8 dies per a sincronitzar-les. Quan ja estigueren sincronitzades, van ser estimulades amb DMEM-10%FCS i vam agafar mostres a diferents temps (0h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h, 44h i 48h) per fer el protocol per anàlisi de cicle (FACS) a cada mostra.

Primer es van tripsinitzar les cèl·lules (se'n recolliren el medi i els rentats, per tal de comptar també les cèl·lules mortes) i es van comptar per a tenir $1-2 \times 10^6$ cèl·lules totals per FACS i pels *Western Blots* (WB) de proteïnes de cicle cel·lular. Es van centrifugar les cèl·lules (400g, 5 minuts) i es feren 2 rentats amb PBS (mostres per WB) o PBS-1% FCS (mostres per FACS), amb 2 centrifugacions més (500g, 1 minut). A les mostres per WB es va aspirar el PBS i es guardà el pellet a -80°C fins la seva utilització. A les mostres per FACS s'aspirà el PBS i es van resuspendre bé les cèl·lules en 0.5 ml de PBS-1% FCS. Posteriorment s'afegí gota a gota (amb una pipeta *Pasteur*) els 0.5 ml de la mostra a un tub amb 5 ml d'etanol 70% fred, mentre el tub estava al vòrtex suau. Es van deixar 2 hores a 4°C perquè es donés la fixació de les cèl·lules. Després es van guardar a -20°C fins la seva anàlisi per citometria (es poden guardar varies setmanes).

Per fer l'anàlisi de FACS, primer es van centrifugar (800 g, 5 minuts) les mostres per eliminar-ne l'etanol. Es van rentar dues vegades amb 500 µl PBS-1% FCS, centrifugant cada vegada. Seguidament es resuspendueren en 400 µl PBS-1% FCS i es van afegir 50 µl d' IP (stock 0.5 mg/ml). S'afegiren 5 µl de RNAsa A lliure de DNAsa (10 mg/ml) i es van incubar 30-45 minuts a 37°C (perquè actués l'enzim) i a les fosques (perquè no es degradés l'IP). Posteriorment ja s'analitzaren per citometria de flux amb el citòmetre FACScalibur (Becton Dickinson®). Aquests assaigs es van fer amb la col·laboració del Dr. J. Gil i la Dra. E. Castaño (UB, Bellvitge).

IMMUNOHISTOQUÍMICA DE TUMORS PRIMARIS

Versicà

Les biòpsies dels tumors primaris es van congelar en nitrogen líquid, es van incloure en OCT i es van mantenir a -80°C fins el moment de la seva anàlisi. Es van fer talls seriatos de $4\ \mu\text{m}$ amb el criostat. Després d'atemperar les mostres i fer un rentat en TBS, es va inhibir la peroxidasa endògena de les mostres amb 3% H_2O_2 (33%) en metanol durant 30 minuts i seguidament es van rentar amb TBS. Després es procedí al bloqueig de les unions inespecífiques amb sèrum normal de cabra (SNC) al 20% en TBS durant 30 minuts. Posteriorment es van incubar les mostres amb l'anticòs primari policlonal contra el versicà (Touab et al., 2002) a una dilució 1/50 en TBS tota la nit a 4°C .

Es van rentar amb TBS i s'incubaren amb l'anticòs secundari biotinitat anti-conill (GAR-b) a una dilució 1/300 en TBS-20% SNC durant 1 hora. Es van rentar amb TBS. Posteriorment es van incubar amb l'ABC (*avidin biotin complex*) a una dilució 1/50 durant 30 minuts, es rentaren i després es féu el revelat amb el substrat AEC durant 15 minuts. Posteriorment es rentaren les mostres i es contrarestà amb hematoxilina per tenyir els nuclis. Seguidament es procedí al muntatge de les mostres i es van mirar amb el microscopi Nikon Eclipse E800®. Com a controls negatius s'utilitzà sèrum de conill a la mateixa dilució que l'anticòs primari.

Àcid hialurònic

En aquest cas també es van utilitzar mostres de teixit congelat. En aquest assaig es fan dos controls negatius. El primer control negatiu es fa amb tractament amb hialuronidasa (*from Streptomyces hyalurolyticus*, SIGMA® H-1136), que digereix l'HA de la mostra i, per tant, l'HABP-biotinilada (*hyaluronic acid binding protein*, Seikagaku®) no es podrà unir enlloc. En el cas del segon control negatiu, el que fem és incubar amb l'HABP-b junt amb HA soluble (*from human umbilical cord*, SIGMA® H-1876), que competirà amb els llocs d'unió per l'HA amb l'HA de la mostra. Després d'atemperar les mostres i inhibir la peroxidasa endògena es van rentar amb PBS. Posteriorment es va digerir un dels controls negatius de cada mostra amb $20\ \mu\text{U/ml}$ hialuronidasa en la solució 50 mM NaOAc, 0.15M NaCl, pH 6.0, durant 1 hora a 37°C . Les seccions no digerides (l'altre control negatiu i la mostra positiva) es van incubar paral·lelament amb la mateixa solució sense l'enzim. Després de la digestió es rentaren amb PBS i es procedí al bloqueig de les unions inespecífiques amb sèrum normal de cabra (SNC) al 10% en PBS durant 30 minuts. Posteriorment es van incubar les mostres amb $4\ \mu\text{g/ml}$ l'HABP-b en el cas de les mostres positives i el control negatiu tractat amb hialuronidasa o amb el complex HABP-b ($4\ \mu\text{g/ml}$) /HA ($100\ \mu\text{g/ml}$) per l'altre control negatiu a una cambra humida a 4°C tota la nit.

Es van rentar amb PBS i s'incubaren amb l'ABC a una dilució 1/50 durant 30 minuts, es rentaren primer amb PBS i després amb TBS. El revelat es féu amb el substrat DAB durant 10 minuts a 37°C. Es parà la reacció amb TB i posteriorment es rentaren les mostres i es contrarestà amb hematoxilina per tenyir els nuclis. Seguidament es procedí al muntatge de les mostres i es van mirar amb el microscopi Nikon Eclipse E800®. Com a controls negatius s'utilitzaren les mostres digerides amb hialuronidasa i les incubades amb HA.

Els estudis de tumorigènesi es van realitzar a l'I.R.O. (Barcelona) en col·laboració i sota la supervisió de la Dra. A. Fabra.

LLISTAT DE PRODUCTES UTILITZATS

Cultius cel·lulars, estudis funcionals:

Medi RPMI 1640, Gibco BRL/Life Technologies

Medi DMEM, Gibco BRL/Life Technologies

Plaques amb pous Transwell (6.5 mm de diàmetre, 8 µm porus), Corning

Col·lagen tipus I, SIGMA

Calceïna, Calbiochem

HA, SIGMA

Anticossos, factors de creixement i enzims:

Anti-CD44 (J173), Becton and Dickinson

b-HABP, Seikagaku

HGF, SIGMA

rHGF, R&D Systems

IGF-I, SIGMA

TGF-β, Collaborative Research

Condroitinasa ABC, Seikagaku

Heparitinasa, Seikagaku

Radiactius:

[Cr⁵¹], Amersham Pharmacia Biotech

[³⁵S] sulfat, Amersham Pharmacia Biotech

[³⁵S] metionina, Promix

Western Blot i Northern Blot:

Immobilon-P Membranes, Millipore

ECL System, Amersham Pharmacia Biotech

Rneasy isolation kit, Qiagen

Hybond-XL membranes, Amersham Pharmacia Biotech

LLISTAT DE MÈTODES UTILITZATS

Article 1:

- Marcatges metabòlics amb ^{35}S sulfat i L- ^{35}S metionina amb i sense pre-tractament amb factors de creixement (TGF- β , IGF-1, HGF).
- Assaig de proliferació
- Digestions enzimàtiques (condroitinasa ABC, heparitinasa)
- Anàlisi per Western Blot (versicà)

Article 2:

- Construcció i infecció amb el vector retroviral (LXSN, LV3SN).
- Extracció RNA i northern blot (C10)
- Western Blot (versicà)
- Immunocitoquímica (CD44)
- Assaigs de proliferació (corbes de creixement)
- Adhesió sobre HA
- Migració sobre HA (cambres tipus *transwell*)
- ELISA competitiu per la determinació d'HA
- Assaig de tumorigènesi (inoculació intradèrmica de les cèl·lules).

Article 3:

- Immunocitoquímica (CD44, versicà).
- Western Blot (CD44, versicà)
- ELISA competitiu per la determinació d'HA
- Visualització de la matriu pericel·lular (assaig d'exclusió de partícules).
- Immunohistoquímica de biòpsies de melanomes i melanocitomes canins (CD44)

Resultats complementaris articles 1 i 2 (Annex. Materials i mètodes):

- Anàlisi MMPs: zimografia (medis cel·lulars, extractes cel·lulars) i northern blot.
- Anàlisi per densitometria .
- Immunocitoquímica (versicà, subunitat αv de les integrines).
- Migració sobre col·lagen tipus I (plaques HTS Fluoroblock, calceïna)
- Anàlisi d'integrines per citometria de flux
- Anàlisi de cicle cel·lular per citometria de flux
- Immunohistoquímiques de tumors primaris de ratolins (versicà, HA, CD44).

Bibliografia

- Ackerman, A.B. (1980) Malignant melanoma: A unifying concept. *Human Pathol.* 41: 591-595.
- Ågren, U.M., Tammin, M., Rynanen, M., and Tammi, R. (1997) Developmentally programmed expression of hyaluronan in human skin and its appendages. *J Invest Dermatol.* 109: 219-224.
- Ahrens, T., Sleeman, J.P., Schempp, C.M., Howells, N., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., and Simon J.C. (2001a) Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* 20: 3399-3408.
- Ahrens, T., Assmann, V., Fieber, C., Termeer, C., Herrlich, P., Hofmann, M., and Simon J.C. (2001b) CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol.* 116: 93-101.
- Alanko, T. and Saksela, O. (2000) Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis in normal melanocytes but not in nevus cells grown in type I collagen gel. *J. Invest. Dermatol.* 115: 286-291.
- Albino, P.A., Davis, B.M., and Nanus, D.M. (1991) Induction of growth factor RNA expression in human malignant melanoma: markers of transformation. *Cancer Res.* 51: 4815-4820.
- Alldinger, S., Baumgartner, W., Kremmer, E., and Fonfara S. (1999) Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. *Zentralbl Veterinarmed A* 46: 19-32.
- Alonso, S.R., Ortiz, P., Pollán, M., Pérez-Gómez, B., Sánchez, L., Acuña, M.J., Pajares, R., Martínez-Tello, F.J., Hortelano, C.M., Piris, M.A., and Rodríguez-Peralto, J.L. (2004) Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. A tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 164: 193-203.
- Aronsohn, M.G. and Carpenter, J.L. (1990) Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 26: 605-612.
- Bajorath, J. (2000) Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 39: 103-111.
- Banerji S., Ni, J., Wang, S.X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones M., and Jackson, D.G. (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol.* 144: 789-801.
- Bassols, A. and Massagué, J. (1988) Transforming growth factor β regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 263: 3039-3045.
- Bataille, V. (2003) Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 39: 1341-1347.
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidler, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., and Herlyn, M. (2001) Transforming growth factor- β 1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* 61: 8306-8316.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Winsdor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4: 197-250.
- Bode-Lesniewska, B., Dours-Zimmermann, M.T., Odermatt, B.F., Briner, J., Heitz, P.U., and Zimmermann, D.R. (1996) Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem.* 44: 303-312.
- Bolon, B., Calderwood Mays, M.B., and Hall, B.J. (1990) Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol.* 27: 96-102.
- Bouterfa, H., Darlapp, A.R., Klein, E., Pietsch, T., Roosen, K., and Tonn, J.C. (1999) Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to variant culture conditions. *J Neurooncol.* 44: 23-33.
- Brakebusch, C. and Fässler, R. (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO Journal.* 22: 2324-2333.

- Breslow, A. (1970) Cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 172: 902.
- Breuer, B., Schmidt, G., and Kresse, H. (1990) Non-uniform influence of transforming growth factor- β on the biosynthesis of different forms of small chondroitin sulphate/dermatan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* 269: 551-554.
- Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Cheresch, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Cell* 85: 683-693.
- Brown, L.F., Guidi, A.J., Schnitt, S.J., Van De, W.L., Iruela-Arispe, M.L., Yeo, T.K., Tognazzi, K. and Dvorak, H.F. (1999) Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res.* 5: 1041-1056.
- Burg, M.A., Grako, K.A., and Stallcup, W.B. (1998) Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. *J Cell Physiol.* 177: 299-312.
- Calabro, A., Midura, R.J., Hascall, V.C., Plaas, A., Goodstone, N.J., and Rodén, L. (2000) Structure and biosynthesis of chondroitin sulfate and hyaluronan. In: Iozzo, R.V. ed. *Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions.* 1st edition. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 2, pp: 5-22.
- Castel, S., Pagan, R., García, R., Casaroli-Marano, R.P., Reina, M., Mitjans, F., Piulats, J., and Vilaró, S. (2000) Alpha v integrin antagonists induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *Eur J Cell Biol.* 79: 502-512.
- Cattaruzza, S., Schiappacassi, M., Ljungberg-Rose, A., Spessotto, P., Perissinotto, D., Mörgelin, M., Mucignat, M.T., Colombatti, A., and Perris, R. (2002) Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and *de novo* expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis *in vitro*. *J Biol Chem.* 277: 47626-47635
- Cattaruzza, S., Schiappacassi, M., Kimata, K., Colombatti, A., and Perris, R. (2004) The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 18: 779-781.
- Chelberg, M.K., Tsilibary, E.C., Hauser, A.R., and McCarthy, J.B. (1989) Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion nad migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule. *Cancer Res.* 49: 4796-4802.
- Chin L. (2003) The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man (review). *Nat Rev Cancer* 3: 559-570.
- Clark, W.H. Jr., From, L., Bernardino, E.A., et al. (1969a). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 29: 705-727.
- Clark, W.H. Jr. and Mihm, M.C. Jr. (1969b). Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Am J Pathol.* 55: 39-67.
- Clark, W.H. Jr., Elder, D.E., and Van Horn, M., (1984) The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 17: 443-450.
- Clark, W.H. Jr., Elder, D.E., Guerry, D., 4th, Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression *J Natl Cancer Inst.* 81: 1893-1904.
- Clark, W.H., (1991) Tumour progression and the nature of cancer. *Brit J Cancer* 64: 631-644.
- Crelin, E.S. (1974) Development of the nervous system. A logical approach to neuroanatomy. *Clin Sym.* 26: 1-32.
- Crutcher W.A. and Sagebiel, R.W. (1984) Prevalence of dysplastic naevi in a community practice (letter). *Lancet.* 1: 729.

Day, A.J. and Prestwich, G.D. (2002) Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. Minireview. *J Biol Chem.* 277: 4585-4588.

DeClerck, Y.A., Mercurio, A.M., Stack, M.S., Chapman, H.A., Zutter, M.M., Muschel, R.J., Raz, A., Matrisian, L.M., Sloane, B.F., Noel, A., Hendrix, M.J., Coussens, L., and Padarathsingh, M. (2004) Proteases, extracellular matrix, and cancer. A workshop of the Path B Study Section. *Review. Am J Pathol.* 164: 1131-1139.

Derynck, R., Akhurst, R.J. and Balmain, A. (2001) TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29: 117-129.

Dietrich, A., Tanczos, E., Vanscheidt, W., Schopf, E., and Simon, J.C. (1997) High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. *Eur J Cancer* 33: 926-930.

Domenzain, C., Docampo, M.J., Serra, M., Miquel, L., and Bassols, A. (2003) Differential expression of versican isoforms is a component of the human melanoma cell differentiation process. *Biochem Biophys Acta* 1642: 107-114.

Dours-Zimmermann, M.T. and Zimmermann, D.R. (1994) A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem.* 269: 32992-32998.

Du Cros, D.L., LeBaron, R.G., and Couchman, J.R. (1995) Association of versican with dermal matrices and its potential role in hair follicle development and cycling. *J Invest Dermatol.* 150: 426-431.

East J.A., Mitchell S.D., Hart I.R.. (1993) Expression and function of the CD44 glycoprotein in melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 3: 341-346.

Eisenmann, K.M., McCarthy, J.B., Simpson, M.A., Keely, P.J., Guan, J.L., Tachibana, K., Lim, L., Manser, Ed., Furcht, L.T., and Iida, J. (1999) Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130^{cas}. *Nature Cell Biol.* 1: 507-513.

Elder, D.E., Gene MH, Bondi, E.E., et al. (1981) A cohort study of melanoma. The dysplastic nevus syndrome, in Ackerman AB (ed). *Pathology of Malignant Melanoma.* New York, NY Masson.

Elder, D.E., Rodeck, U., Thurin, J., Cardillo, F., Clark, W.H., Stewart, R., and Herlyn, M. (1989) Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. *Cancer Res.* 49: 5091-5096.

Faassen, A.E., Mooradian, D.L., Tranquilo, R.T., Dickinson, R.B., Letorneau, P.C., Oegema, T.R., and McCarthy, J.B. (1992) Cell surface CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan is required for transforming growth factor-beta stimulated mouse melanoma cell motility and invasive behavior on type I collagen. *J Cell Biol.* 105:501-511.

Fieber, C., Baumann, P., Vallon, R., Termeer, C., Simon, J.C., Hofmann, M., Angel, P., Herrlich, P., and Sleeman, J.P. (2004) Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci.* 117: 359-367.

Fischer, J.W., Kinsella, M.G., Hasenstab, D., Clowes, A.W., and Wight, T.N. (2001) Cell-mediated transfer of proteoglycan genes. *Methods Mol Biol.* 171: 261-269.

Fitzpatrick, T.B., Szabo, G., Seiji, M., and Quved, W.C. Jr (1979) Biology of the melanin pigmentary system. In: Fitzpatrick T.B., Eise A.Z., Wolf, K., Freedberg I.M., Ansten, K.F. (eds) *Dermatology in general medicine*, 2nd ed. McGraw-Hill, New York, pp 131.

Forget, M-A., Desrosiers, R.R., and Béliveau, R. (1999) Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol.* 77: 465-480.

Gálvez, B.G., Matías-Román, S., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Arroyo, A.G. (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with β 1 or α v β 3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol.* 159:509-521.

Ghiorzo P., Villaggio, B., Sementa, A.R., Hansson, J., Platz, A., Nicolo, G., Spina, B., Canepa, M., Palmer, J.M., Hayward, N.K. and Bianchi-Scarra, G. (2004) Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol.* 35 (1): 25-33

Giancotti, F.G. (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 691-700.

GLYCOFORUM. <http://glycoforum.gr.jp>

Goebeler, M., Kaufmann, D., Brocker, E.B., and Klein, C.E. (1996) Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increase turnover and shedding of CD44 receptors. *J Cell Sci.* 109: 1957-1964.

Goldschmidt, M.H., Dunstan, R.W., Stannard, A.A., von Tscherner, C., Walder, E.J., Yager, J.A. (1998) Melanocytic tumors. In: *Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals*. Published by the Armed Force Institute of Pathology. Washington, DC. Chapter 8, pp: 38-41.

Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 52: 189-196.

Green, A. (1982) Melanoma of the sin: some epidemiological aspects. *Aust Fam Physician* 11:7-12.

Grover, R., Chana, J.S., Wilson, G.D., Richman, P.I., and Sanders, R. (1998) An analysis of p16 protein expression in sporadic malignant melanoma. *Melanoma Res.* 8 (3): 267-272.

Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M., and Sy, M.S. (1994) Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res.* 54: 1561-1565.

Hahn, K.A. (1999) Integrins: the next tumor target?. *Proc. 17th ACVIM, Chicago*, pp: 382-383.

Hamoen, K.E., Borel Rinkes, I.H., and Morgan, J.R. (2001) Hepatocyte growth factor and melanoma: gene transfer studies in human melanocytes. *Melanoma Res.* 11: 89-97.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hardingham, T.E. and Fosang, A.J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861-870.

Harwood, C.A., Greenm, M.A., and Cook, M.G. (1996) CD44 expression in melanocytic lesions: a marker of malignant progression? *Br J Dermatol.* 135: 876-882.

Hendrix M.J.C., Seftor, E.A., Meltzer, P.S., Gardner, L.M.G., Hess, A.R., Kirschmann, D.A., Schattman, G.C., and Seftor, R.E.B. (2001) Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8018-8023

Heredia, A., Villena, J., Romaris, M., Molist, A., and Bassols, A. (1996a) The effect of TGF- β on cell proliferaci3n and proteoglycan production in human melanoma cells depends on the degree of cell diferenciaci3n. *Cancer Letters.* 109: 39-47.

Heredia, A., Villena, J., Romaris, M., Molist, A., and Bassols, A. (1996b) Transforming growth factor β 1 increases the synthesis and shedding of the melanoma-specific proteoglycan in human melanoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 333: 198-206.

Herlyn, M., Clark, W.H., Rodeck, U., Mancianti, M.L., Jambrosic, J., and Koprowski, H. (1987) Biology of tumor progression in human melanocytes. (review) *Lab Invest.* 56: 461-474.

Herlyn, M., Padarathsingh, M., Chin, L., Hendrix, M., Becker, D., Nelson, M., DeClerck, Y., McCarthy, J., and Mohla, S. (2002) New approaches to the biology of melanoma: a workshop of the national institutes of health pathology B Study Section. *Am J Pathol.* 161: 1949-1957.

Hinek, A., Braun, K.R., Liu, K., Wang, Y., and Wight, T.N. (2004) 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.* 164: 119-131.

- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Zendman, A.J.W., Cornelissen, I.M.H.A., Ruiter, D.J. and Van Muijen G.N.P. (1999) Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* 81: 774-782.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Becker, J.C., Ruiter, D.J., and Van Muijen G.N.P. (2000a) Coexpression of integrin $\alpha_v\beta_3$ and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol.* 115: 625-632.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Van Kraats, A.A., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N.P. (2000b) Expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase.1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 87: 12-19.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., van Muijen, G.N.P., and Ruiter, D.J. (2000c) Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 115: 337-344.
- Hoosein, N.M., McKnight, K., Levine, A.E., Mulder, K.M., Childress, K.E., Brattain, D.E. and Brattain, M.G. (1989) Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor- β 1. *Exp Cell Res.* 181: 442-453.
- Houghton, A.N., Eisinger, M., Albino, A.P., Caimcross, J.G., and Old, L.J. (1982) Surface antigens of melanocytes and melanoma: Markers of melanocyte differentiation and melanoma subsets. *J Exp Med.* 156: 1755-1766.
- Houghton, A.N., Real, F.X., Davis, L.J., Cordon-Cardo, C., and Old, L.J. (1987) Phenotypic heterogeneity of melanoma. *J Exp Med.* 164: 812-829.
- Hsu, M., Shih, D., Meier, F.E., Van Belle, P., Hsu, J., Elder, D.E., Buck, A.A., and Herlyn, M. (1998) Adenoviral gene transfer of β_3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am J Pathol.* 153: 1435-42.
- Hsu, M., Meier, F., and Herlyn, M. (2002) Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70: 522-536.
- Huang, L., Grammatikakis, N., Yoneda, M., Banerjee, S.D., and Toole B.P. (2000) Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan binding protein. *J Biol Chem.* 275: 29829-29839.
- Hynes, R.O. (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med.* 8: 918-921.
- Ichikawa, T., Itano, N., Sawai, T., Kimata, K., Koganehira, Y., Saida, T., and Taniguchi, S. (1999) Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 113: 935-939.
- Iida, J., Meijne, A.M.L., Spiro, R.C., Roos, E., Funcht, L.T., and McCarthy, J.B. (1995) 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.* 55: 2177-2185.
- Iida, J., Meijne, A.M.L., Oegema, T.R.J., Yednock, T.A., Kovach, N.L., Furcht, L.T., and McCarthy, J.B. (1998) A role of chondroitin sulfate glycosaminoglycan binding site in alpha4beta1 integrin-mediated melanoma cell adhesion *J Biol Chem* 273: 5955-5962
- Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M.A., Herlyn, M., Furcht, L.T., and McCarthy, J.B. (2001) Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J Biol Chem.* 276: 18786-18794.
- Iozzo, R.V. (1988) Proteoglycans and neoplasia. *Cancer Metastasis Rev.* 7: 39-50.
- Iozzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 67: 609-652.
- Iozzo, R.V. (2000) Introductory remarks and overview. In: Iozzo, R.V. ed. *Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions.* 1st edition. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 4, pp: 61-92.
- Isacke, C. and Yarwood, H. (2002) The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Bioch Cell Biol.* 34: 718-721.

- Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, and Johnson KR. (1996) Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblast phenotyp with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 135: 1643-1654.
- Isogai, Z., Shinomura, T., Yamakawa, N., Takeuchi, J., Tsuji, T., Heinegard, D., and Kimata, K. (1996) 2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Cancer Res.* 56: 3902-3908.
- Itano, N., Atsumi, F., Sawai, T., Yamada, Y., Miyaishi, O., Senga, T., Hamaguchi, M., and Kimata, K. (2002) Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 3609-3614.
- Ito, K., Shinomura, T., Zako, M., Ujita, M., and Kimata, K. (1995) Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem.* 270: 958-965.
- Juliano, R.L. and Haskill, S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 120: 577-85.
- Kähäri, V.M., Larjava, H., and Uitto, J. (1991) Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 266: 10608-10615.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Biol Chem.* 153: 893-904.
- Karjalainen, J.M., Tammi, R.H., Tammi, M.I., Eskelinen, M.J., Ågren, U.M., Parkkinen, J.J., Alhava, E.M., and Kosma, V. (2000) Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am J Pathol.* 157: 957-965.
- Kaushal, G.P. and Shah, S.V. (2000) The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J Clin Invest.* 105: 1335-1337.
- Kimata, K., Oika, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M., and Suzuki, S. (1986) A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. *J Biol Chem.* 261: 13517-13525.
- Kleiner, D.E. and Stetler-Stevenson, W.G. (1999) Matrix metalloproteinases and metastasis (review). *Cancer Chemother Pharmacol.* 43 Supl: S42-51.
- Knudson C.B. and Knudson, W. (1993) Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis and disease. *FASEB J.* 7: 1233-1241.
- Knudson, W. (1996) Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol.* 148:1721-1726
- Knutson, J.R., Iida, J., Fields, G.B. and McCarthy, J.B. (1996) CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and β_1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell* 7: 383-396.
- Koenig, A., Bianco, S.R., Fosmire S., Wojcieszyn, J., and Modiano, J.F. (2002) Expression and significance of p53, Rb, p21/waf-1, p16/link-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet Pathol.* 39: 458-472.
- Koenig, A., Wojcieszyn, J., Weeks, B.R., and Modiano, J.F. (2001) Expression of S100a, Vimentin, NSE, and MelanA/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol.* 38: 427-435.
- Koochekpour, S., Pilkington, G.J., and Merzak, A. (1995) Hyaluronic acid/CD44H interaction induces cell detachment and stimulates migration and invasion of human glioma cells *in vitro*. *Int J Cancer* 63: 450-454.
- Kopf, A.W., Welkovich, B., Frankel, R.E., Stoppelman, E.J., Bart, R.S., Rogers, G.S., Rigel, D.S., Friedman, R.J., Levenstein, M.J., Gumpert, S.L., et al. (1987) Thickness of malignant melanoma: global analysis of related factors. *J Dermatol Surg Oncol.* 13: 345-390.

- Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, f., Ichimura, F., and Matsushima, K. (1997) Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem.* 272: 556-562.
- Kuno, K., Okada, Y., Kawashima, H., Nakamura, H., Miyasaka, M., Ohno, H., and Matsushima, K. (2000) ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Letters* 478: 241-245.
- Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., and Falus, A. (2000) Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine.* 12: 574-554.
- Lee G.M., Johnstone, B., Jacobson, K., and Caterson, B. (1993) The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells. *J Cell Biol.* 123: 1899-1907.
- Lemire, J.M., Braun, K.R, Maurel, P., Kaplan, E.D., Schwartz, S.M., and Wight, T.N. (1999) Versican/PG-M isoforms in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1630-1639.
- Lemire, J.M., Merrilees, M.J., Braun, K.R., and Wight, T.N. (2002) Overexpression of the V3 variant of versican alters smooth muscle adhesion, migration and proliferation in vitro. *J Cell Physiol.* 190: 38-45
- Li G. and Herlyn, M. (2000) Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Medicine Today* 6: 163-169.
- Li, G., Schaidler, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M. (2001a) Downregulation of E-cadherin and desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20: 8125-8135.
- Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001b) N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61: 3819-3825.
- Lynch, H.T., Fritchot, B.C. 3rd, and Lynch, J.F. (1978) Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet.* 15: 352-356.
- Maaser, K., Wolf, K., Klein, C.E., Niggemann, B., Zänker, K.S., Bröcker, E., and Friedl, P. (1999) Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin $\alpha 2\beta 1$ but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell* 10: 3067-3070.
- MacDougall, J.R., Bani, M.R., Lin, Y., Rak, J., and Kerbel, R.S. (1995) The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. *Cancer Res.* 55: 4174-4181.
- Manten-Horst, E., Danen, E.H., Smit, L., Snoek, M., Le Poole, I.C., Van Muijen, G.N., Pals, S.T., and Ruiter, D.J. (1995) Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int J Cancer* 64: 182-188.
- Massagué, J., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1994) The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology* 4: 172-178.
- Massagué, J. (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
- McDonald, J., and Hascall, V.C. (2001) Hyaluronan minireview series. *J Biol Chem.* 277: 4575-4579.
- Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M-Y., Schitteck, B., Garbe, C., and Herlyn, M. (1998) Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* 15: 1005-1010.
- Merrilees, M.J., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Kinsella, M.G., Braun, K.R., Clowes, A.W., and Wight, T.N. (2002) Retrovirally mediated overexpression of versican V3 by arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointima after vascular injury. *Circ Res.* 90: 481-487.

- Meyskens, F.L., Farmer, P.J., and Anton-Culver, H. (2004) Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk. *Clin Cancer Res.* 10: 2581-2583.
- Mitjans, F., Sander, D., Adán, J., Sutter, A., Martinez, J.M., Jäggle, C-S., Moyano, J.M., Kreysch, H-G., Piulats, J., and Goodman, S.L. (1995) An anti- α_v -integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci.* 108: 2825-2838.
- Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S.L., Jonczyk, A., Marshall, J.F., Reyes, G., and Piulats, J. (2000) *In vivo* therapy of malignant melanoma by means of antagonists of α_v integrins. *Int J Cancer* 87: 716-723.
- Montgomery, A.M.P., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A., Taylor, S.M., and DeClerk, Y.A. (1994) Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res.* 54: 5467-5473.
- Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., and Herrlich, P. (2001) The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* 15: 968-980.
- Murphy, G. and Gavrilovic, J. (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol.* 11: 614-621.
- Nakamura, H., Suenaga, N., Taniwaki, K., Matsuki, H., Yonezawa, K., Fujii, M., Okada, Y., and Seiki, M. (2004) Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 64: 876-82.
- Nara, Y., Kato, Y., Torii, Y., Tsuji, Y., Nakagaki, S., Goto, S., Isobe, H., Nakashima, N., and Takeuchi J. (1997) Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem J.* 29: 21-30.
- Nelson, David L., Cox, Michael M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 3rd edition, February 2000. Worth Publishers, New York.
- Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Heino, J., and Pyrhonen, S. (2004) Integrin chains beta1 and alpha v as prognostic factors in human metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 14: 29-37.
- Nishiyama, A., Dahlin, K.J., Prince, J.T., Johnstone, S.R., and Stallcup, W.B. (1991) The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J Cell Biol.* 114: 359-371.
- Oliver, J.L. and Wolfe, L.G. (1992) Antigen expression in canine tissues, recognized by a monoclonal antibody generated against canine melanoma cells. *Am J Vet Res.* 53: 123-128.
- Oliver, J.L., Wolfe, L.G., Lopez, M.K., Church-Bird, A., Toivio-Kinnucan, M., and Dietrich, M.A. (1997) Isolation and characterization of the canine melanoma antigen recognized by the murine monoclonal antibody IBF9 and its distribution in cultured canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res.* 58: 46-52.
- Otsuka, T., Takayama, H., Sharp, R., Celli, G., LaRochelle, W.J., Bottaro, D.P., Ellmore, N., Vieira, W., Owens, J.W., Anver, M., and Merlino, G. (1998) c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res.* 58: 5157-5167.
- Paulus, W., Baur, I., Dours-Zimmermann, M.T., and Zimmermann, D.R. (1996) Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 528-33.
- Peck, D. and Isacke, C.M. (1996) CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol.* 6: 884-890.
- Perissinotto, D., Iacopetti, P., Bellina, I., Doliana, R., Colombatti, A., Pettway, Z., Bronner-Fraser, M., Shinomura, T., Kimata, K., Mörgelin, M., Löfberg, J., and Perris, R. (2000) Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. *Development.* 127: 2823-2842.

- Petitclerc, E., Strömblad, S., von Schalscha, T.L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A.M., Cheresch, D.A., and Brooks, P.C. (1999) Integrin $\alpha_v\beta_3$ promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 59:2724-2730.
- Piulats, J. and Mitjans, F. (2000) Angiogenesis switch pathways. In: *Principles of Molecular Oncology*. Bronchud, M.H., ed. Humana Press Inc., Totowa. Part II, pp: 271-295.
- Pluschke, G., Vanek, M., Evans, A., Dittmar, T., Schmid, P., Itin, P., Filardo, E.J., and Reisfeld, R.A. (1996) Molecular cloning of human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 9710-9715.
- PROLYSIS. <http://delphi.phys.univ-tours.fr/prolysis>
- Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A., and Kottler, S.J. (2000) Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* 37: 597-608.
- Ranade, K., Hussussian, C.J., Sikorski, R.S., Varmus, H.E., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D., and Dracopoli, N.C. (1995) Mutations associated with familial melanoma impair p16^{INK4} function. *Nat Genetica* 10: 114-117.
- Rapraeger, A.C. (1993) In: *Molecular and cellular aspects of basement membranes* (ed. D.R. Rohrbach and R. Timpl), pp.267-88. Academic Press. San Diego.
- Rapraeger, A.C. (2000) Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol.* 149: 995-998
- Ray, J.M. and Stetler-Stevenson, W.G. (1995) Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *EMBO J.* 14: 908-917.
- Real, F.X., Houghton, A.N., Albino, A.P., Cordon-Cardo, C., Melamed, M.R., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1985) 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.* 45: 4401-4411.
- Rettig, W.J., Real, F.X., Spengler, B.A., Biedler, J.L. and Old, L.J. (1986) Human melanoma proteoglycan: expression in hybrids controlled by intrinsic and extrinsic signals. *Science.* 231: 1281-1284.
- Ricciardelli, C., Mayne, K., Sykes, P.J., Raymond, W.A., McCaul, K., Marshall, V.R., Tilley, W.D., Skinner, J.M., and Horsfall, D.J. (1997) Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 3: 983-992.
- Ricciardelli, C., Mayne, K., Sykes, P.J., Raymond, W.A., McCaul, K., Marshall, V.R., and Horsfall, D.J. (1998) Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 4: 963-971.
- Rigel, D.S., Friedman, R.J., and Kopf, A.W. (1996) Lifetime risk for development of skin cancer in the U.S. population: current estimate is now 1 in 5. *J Am Acad Dermatol.* 35: 1012-1013.
- Romarís, M., Heredia, A., Molist, A., and Bassols, A. (1991) Differential effect of transforming growth factor- β on proteoglycan synthesis in human embryonic lung fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 1093: 229-233.
- Romarís, M., Bassols, A., and David, G. (1995) Effect of transforming growth factor- β on the expression of cell surface proteoglycans in human lung fibroblasts. *Biochem J.* 310: 73-81.
- Ross, A.H., Cassu, G., Herlyn, M., Ernest, C.S., Guerry, D., Bennicelli, J., Ghrit, B.F.D., Atkinson, B., and Koprowski, H. (1984) Immunoassay for melanoma-associated proteoglycan in the sera of patients using a monoclonal and polyclonal antibodies. *Cancer Res.* 44: 4642-4647.
- Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., and Barbarisi, A. (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. Review. *J Cell Physiol.* 199:174-80.

- Roughley, P.J. and Mort, J.S. (2000) Catabolism of proteoglycans. In: Iozzo, R.V. ed. Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions. 1st edition. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 5, pp: 93-108.
- Rusciano, D., Lorenzoni, P., Lin, S., and Burger, M.M. (1998) Hepatocyte growth factor/scatter factor and hepatocytes are potent downregulators of tyrosinase expression in B16 melanoma cells. *J Cell Biochem.* 71: 264-276.
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., and Goetinck, P.F. (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 2805-10.
- Sakko, A.J., Ricciardelli, C., Mayne, K., Tilley, W.D., LeBaron, R.G., and Horsfall, D.J. (2001) Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 61: 926-930.
- Sandy, J.D., Westling, J., Kenagy, R.D., Iruela-Arispe, M.L., Verscharen, C., Rodriguez-Manzaneque, J.C., Zimmermann, D.R., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Wight, T.N., and Clowes, A.W. (2001) Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu⁴⁴¹-Ala⁴⁴² bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 276: 13372-13378.
- Savani R.C., Cao, G., Pooler, P.M., Zaman, A., Zhou, Z., and DeLisser, H.M. (2001) Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem.* 276: 36770-36778.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D., and Herlyn, M. (2001) Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.* 61: 7318-7324.
- Schaider, H., Soyer, H.P., Heider, K.H., Hofmann-Wellenhof, R., Zatloukal, K., Smolle, J., and Kerl, H. (1998) CD44 and variants in melanocytic skin neoplasms. *J Cut Pathol.* 25: 199-203.
- Schmalfeldt, M., Dours-Zimmermann, M.T., Winterhalter, K.H., and Zimmermann, D.R. (1998) Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem.* 273: 15758-15764.
- Schmalfeldt, M., Bandtlow, C.E., Dours-Zimmermann, M.T., Winterhalter, K.H., and Zimmermann, D.R. (2000) Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci.* 113: 807-816.
- Schönherr, E., Jarvelainen, H.T., Sandell, L.J., and Wight, T.N. (1991) 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.* 266: 17640-17647.
- Schönherr, E., Jarvelainen, H.T., Kinsella, M.G., Sandell, L.J., and Wight, T.N. (1993) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscl and Trombosis* 13: 1026-1036.
- Seelentag, W.K., Boni, R., Gunthert, U., Futo, E., Burg, G., Heitz, P.U., and Roth, J. (1997) Expression of CD44 isoforms and beta 1,6-branched oligosaccharides in human malignant melanoma is correlated with tumor progression but not with metastatic potential. *J Cut Pathol.* 24: 206-211.
- Shellman, Y.G., Chapman, J.T., Fujita, M., Norris, D.A., and Maxwell, I.H. (2000) Expression of activated N-ras in a primary melanoma cell line counteracts growth inhibition by transforming growth factor- β . *J Invest Dermatol.* 114: 1200-1204.
- Shinomura, T., Nishida, Y., Ito, K., and Kimata, K. (1993) cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem.* 268: 14461-14469.
- Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D.L., and Cheresch, D.A. (2001) Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 119-124.

- Simpson, M.A., Wilson, C.M., and McCarthy J.B. (2002) Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. *Am J Pathol.* 161: 849-857.
- Slominski, A., Paus, R., and Mihm, M.C. (1998) Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. *Anticancer Res.* 18: 3709-15.
- Smith, S.H., Goldschmidt, M.H., and McManus, P.M. (2002) A comparative review of melanocytic neoplasms (review article). *Vet Pathol.* 39: 651-678
- Sparrow, L.E., Eldon, M.J., English, D.R., and Heenan, P.J. (1998) p16 and p21^{WAF1} protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol.* 20 (3): 255-261.
- Sulaimon, S.S., Kitchell, B.E., and Ehrhart, E.J. (2002) Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *J Comp Path.* 127: 162-168.
- Sulaimon, S.S. and Kitchell, B.E. (2003) The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. Review. *J Vet Intern Med.* 17: 760-772.
- Suwiat, S., Ricciardelli, C., Tammi, R., Tammi, M., Auvinen, P., Kosma, V., LeBaron, R.G., Raymond, W.A., Tilley, W.D., and Horsfall, D.J. (2004) Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10: 2491-2498.
- Takahashi K., Eto, H., and Tanabe, K.K. (1999) Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int J Cancer* 80: 387-395.
- Takeda, M., Terasawa, H., Sakakura, M., Yamaguchi, Y., Kajiwara, M., Kawashima, H., Miyasaka, M., and Shimada, I. (2003) Hyaluronan recognition mode of CD44 revealed by cross-saturation and chemical shift perturbation experiments. *J Biol Chem.* 278: 43550-43555.
- Takenouchi, T., Ito, K., Kazama, T., and Ito, M. (1994) Establishment and characterization of a clear-cell sarcoma (malignant melanoma of soft parts) cell line. *Arch Dermatol Res.* 286: 254-260
- Takino, T., Miyamori, H., Watanabe, Y., Yoshioka, K., Seiki, M., and Sato, H. (2004) Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res.* 64: 1044-1049.
- Tammi, R., Tammi, M., Hakkinen, L., and Larjava, H. (1990) Histochemical localization of hyaluronate in human oral epithelium using a specific hyaluronate-binding probe. *Archives Oral Biol.* 35: 219-224.
- Teti, A., De Giorgi, A., Spinella, M.T., Migliaccio, S., Canipari, R., Onetti Muda, A. and Faraggiana, T. (1997) Transforming growth factor-beta enhances adhesion of melanoma cells to the endothelium in vitro. *Int. J. Cancer* 72: 1013-1020.
- Thiébot, B., Bichoulane, L., Langris, M., Bonnamy, P.-J., Barbey, P., Carreau, S., and Bocquet, J. (1997) IGF-1 stimulates synthesis of undersulfated proteoglycans and of hyaluronic acid by peritubular cells from immature rat testis. *Biochem Biophys Acta* 1358: 127-141.
- Thomas, L., Byers, H.R., Vink, J., and Stamenkovic, I., (1992) CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol.* 118: 971-977.
- Thomas, L., Etoh, T., Stamenkovic, I., Mihm, M.C.Jr, and Byers, H.R. (1993) Migration of human melanoma cells on hyaluronate is related to CD44 expression. *J Invest Dermatol.* 100: 115-120.
- Tiedemann, K., Malmstrom A., and Westergren-Thorson, G. (1997) Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separate and synergistic effects. *Matrix Biol.* 15: 469-478.
- Tomczuk, M., Takahashi, Y., Huang, J., Murase, S., Mistretta, M., Klaffky, E., Sutherland, A., Bolling, L., Coonrod, S., Marcinkiewicz, C., Sheppard, D., Stepp, M.A., and White, J.M. (2003) Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. *Exp Cell Res.* 290: 68-81.

- Toole, B.P. (2000) Hyaluronan. In: Iozzo, R.V. ed. Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions. 1st edition. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 4, pp: 61-92.
- Toole, B.P. (2002) Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* 12: 37R-42R.
- Toole, B.P. and Hascall, V.C. (2002) Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol* 161: 745-747.
- Touab, M., Villena, J., Barranco, C., Arumí-Uría, M., and Bassols, A. (2002) Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol.* 160:549-557
- Touab M., Arumi-Uria M., Barranco C., and Bassols A. (2003) Expression of the proteoglycans versican and mel-CSPG in dysplastic nevi. *Am J Clin Pathol.* 119 (4): 587-593
- Tran, N.L., Nagle, R.B., Cress, A.E., and Heimark, R.L. (1999) N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with stromal cells. *Am J Pathol.* 155: 787-798.
- Tran, T.P., Titus-Ernstoff, L., Perry, A.E., Ernstoff, M.S., and Newsham, I.F. (2002) Alteration of chromosome 9p21p and/or p16 in benign and dysplastic nevi suggests a role in early melanoma progression (United States). *Cancer Causes Control* 13: 675-682.
- Trikha, M., Zhou, A., Nemeth, J.A., Chen, Q., Sharp, C., Emmell, E., Giles-Komar, and Jand Nakada, M.T. (2004) CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits alpha v integrins, has antitumor and antiangiogenic activity *in vivo*. *Int J Cancer* 110: 326-335.
- Turley E.A. and Tretiak M. (1985) Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* 45: 4589-4592.
- Turley, E.A., Noble, P.W., and Bourguignon, L.Y.W. (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem.* 277: 4589-4592.
- Vail, D.M. and MacEwen, E.G. (2000) Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 18: 781-792.
- Väisänen, A., Kallioinen, M., Taskinen, P.J., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (1998) Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kDa type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol.* 186: 51-58.
- van den Oord, J.J., Paemen, L., Opendakker, G., and de Wolf Peeters, C. (1997) Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol.* 151: 665-670.
- van der Kraan, P.M., Vitters, E.L., Postma, N.S., Verbunt, J., and van den Berg, W.B. (1993) Maintenance of the synthesis of large proteoglycans in anatomically intact murine articular cartilage by steroids and insulin-like growth factor I. *Ann Rheum Dis.* 52: 734-741.
- Vollmer, R.T. (1989) Malignant melanoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Pathol Annu.* 24: 383.
- Voura, E.B., Ramjeesingh, R.A., Montgomery, A. M. P., and Siu, C. (2001) Involvement of integrin $\alpha v \beta 3$ and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 12: 2699-2710.
- Wang, Y. and Becker, D. (1996) Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 12: 1069-1075.
- Ward, J.A., Huang, L., Guo, H., Ghatak, S., and Toole, B.P. (2003) Perturbation of hyaluronan interactions inhibits malignant properties of glioma cells. *Am J Pathol.* 162: 1403-1409.
- Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M. (1997) Hyaluronan synthases. Review. *J Biol Chem.* 272: 13997-14000.
- Wellbrock, C., Oglivie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004) ^{v599}EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* 64: 2338-2342

- Westermarck, J. and Kähäri, V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 13: 781-792.
- Wight, T.N., Heinegard, D.K., and Hascall, V.C. (1991) Proteoglycans. Structure and function. In: *Cell biology of extracellular matrix*, E.D. Hay, ed., pp: 45-78. Plenum Press. New York.
- Wight, T.N. (2002) Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14: 617-623.
- Winberg, J.O., Kolset, S.O., Berg, E., and Uhlin-Hansen, L. (2000) Macrophages secrete matrix metalloproteinase 9 covalently linked to the core protein of chondroitin sulphate proteoglycans. *J Mol Biol.* 304: 669-680.
- Wolfe, L.G., Oliver, J.L., Smith, B.B., Toivio-Kinnucan, M.A., Powers, R.D., Brawner, W.R., Henderson, R.A., and Hanks, G.H. (1987) Biologic characterization of canine melanoma cell lines. *Am J Vet Res.* 48: 1642-1648.
- Wu, Y., Zhang, Y., Cao, L., Chen, L., Lee, V., Zheng, P., Kiani, C., Adams, M.E., Cyn Ang, L., Paiwand, F., and Yang, B.B. (2001) 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.* 276: 14178-14186.
- Wu, Y., Chen, L., Zheng, P., and Yang, B.B. (2002) β 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.* 277: 12294-12301.
- Wu, Y., Chen, L., Cao, L., Sheng, W., and Yang, B.B. (2004a) 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.* 117: 2227-2237.
- Wu, Y., Sheng, W., Chen, L., Dong, H., Lee, V., Lu, F., Wong, C.S., Lu, W., and Yang, B.B. (2004b) Versican V1 isoform induces neuronal differentiation and promotes neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* 15: 2093-2104.
- Xu, X.M., Chen, Y., Chen, J., Yang, S., Gao, F., Underhill, C.B., Creswell, K., and Zhang, L. (2003) A peptide with three hyaluronan binding motifs inhibits tumor growth and induces apoptosis. *Cancer Res.* 63: 5685-5690.
- Xu, Y. and Yu, Q. (2003) E-cadherin negatively regulates CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem.* 278: 8661-8668.
- Yamada, M., Shinomura, T., and Kimata, K. (1993) Tissue variation of two large chondroitin sulfate proteoglycans (PG-M/versican and PG-H/aggrecan) in chick embryos. *Anat Embryol.* 187: 433-444.
- Yamagata, M., Suzuki, S., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., and Kimata, K. (1989) Regulation of cell-substratum adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem.* 264: 8012-8018.
- Yamagata, M. and Kimata, K. (1994) Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci.* 107: 2581-2590.
- Yamaguchi, Y. (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. Review. *Cell Mol Life Sci.* 57: 276-289
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 13: 35-48.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14: 163-76.
- Yu, W.H. and Woessner, J.F. Jr. (2000) Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem.* 275: 4183-4191.
- Zako, M., Shinomura, T., Ujita, M., Ito, K., and Kimata, K. (1995) Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment region in mouse and human tissues. *J Biol Chem.* 270: 3914-3918.

- Zako, M., Shinomura, T. and Kimata, K. (1997) Alternative splicing of the unique "PLUS" domain of chicken PG-M/versican is developmentally regulated. *J Biol Chem.* 272: 9325-9331.
- Zeng, C., Toole, B.P., Kinney, S.D., Kuo, J., and Stamenkovic, I. (1998) Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* 77:396-401.
- Zhang, L., Underhill, C.B. and Chen, L. (1995) Hyaluronan on the surface of tumour cells is correlated with metastatic behaviour. *Cancer Res.* 55: 428-433.
- Zhang, Y., Cao, L., Yang, B.L., and Yang, B.B. (1998) The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem.* 273: 21342-21351.
- Zhang, Y., Cao, L., Kiani, C., Yang, B.L., Hu, W., and Yang, B.B. (1999) Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by G1 domain and EGF-like motifs. *J Cell Biochem.* 73: 445-457.
- Zheng, P., Wen, J., Ang, L.C., Sheng, W., Vilorio-Petit, A., Wang, Y., Wu, Y., Kerbel, R.S., and Yang, B.B. (2004) Versican/Pg-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *FASEB J* 18: 754-756.
- Zimmermann, D.R., Dours-Zimmermann, M.T., Schubert, M., and Bruckner-Tuderman, L. (1994) Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol.* 124: 817-825.
- Zimmermann, D.R. (2000) Versican. In: Iozzo, R.V. ed. *Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions.* 1st edition. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 13, pp: 327-340.