



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CD44 Y VERSICANO EN
LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO**

TESIS DOCTORAL

DANIEL HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CD44 Y VERSICANO EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO

Memoria elaborada por
Daniel Hernández Martínez
Para optar al grado de
Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. **Anna Bassols Teixidó**, en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Daniel Hernández Martínez

Anna Bassols Teixidó

Bellaterra, octubre de 2009

Durante estos años, han sido muchas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a la realización de este trabajo. Por este motivo, me gustaría dedicaros a todos unas palabras de agradecimiento.

A la doctora Anna Bassols, per haver-me donat l'oportunitat d'integrar-me en el seu grup ara fa sis anys. Vull destacar la confiança que sempre ha mostrat en mi durant tot aquest temps, el seu ajut en els moments menys fàcils i el bon ambient de treball que sempre ha sabut mantenir.

Al doctor Joaquín Ariño, por su ayuda y sus consejos en los momentos en que lo he necesitado.

Al doctor Néstor Gómez, tant per tot allò relacionat amb la feina com per totes les altres converses que hem tingut (sobretot del Barça!).

Al grup de la doctora Àngels Fabra, especialment a ella personalment, a l'Antònia i a l'Anna Marazuela, per participar de manera tan important en aquest projecte.

Al grupo del doctor Thomas N. Wight de Seattle, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo durante 2 meses y por todo lo que hicieron por mí durante ese tiempo.

A mis compañeras de laboratorio. Por hacerme sentir uno más del grupo desde el principio, por enseñarme todo lo que he aprendido en este tiempo y por todos los buenos y menos buenos momentos que hemos vivido juntos. Gracias a Montse, Clelia, M^aJosé, Laia, Anna y Jenny. También me gustaría dar las gracias a todos los alumnos y alumnas de prácticas que han ido pasando por el laboratorio, especialmente a Anna (un altre cop! xD), Jara y Gemma, que fueron las que me tuvieron que aguantar más directamente.

Al resto de compañeros del departamento. A todos los becarios (Antonio y Roger incluidos, aunque no lo sean) gracias por los viajes, las cenas, las fiestas, las tardes en el SAF, los amigos invisibles y por todo lo que hemos compartido; a les tècnics (especialment a l'Anna Vilalta) i a la gent del servei de seqüenciació per la

seva inestimable ajuda; y a las secretarias por todo el trabajo realizado durante este tiempo.

A mis amigos David y Carlos, compañeros de viaje durante la carrera y ahora durante la tesis, por todas las charlas sobre el tema y por las tardes, noches y fines de semana que hemos pasado juntos. También gracias al resto de amigos con los que en algún momento he compartido un pedacito de esta tesis.

A mi familia, a mis padres y mi hermano, por estar siempre a mi lado, por confiar en mí y por preguntarme qué hacía pese a no entender mucho lo que les explicaba. Gracias a mi tata, a mis primos y a mi yaya Cristina, por interesarse por mi trabajo y por mí en todo momento.

A los que son ya también parte de mi familia: Lucas, Antonia, Roser y Josué. Por apoyarme durante todos estos años y por todos los momentos que hemos compartido.

A M^aCarmen. Por todo absolutamente. Por el día a día, por todo lo que me das, por todo lo que haces por mí. Por el cariño que me demuestras en todo momento, por apoyarme y creer en mí, por estar conmigo cuando lo necesito. Por todo lo que hemos pasado juntos y por todo lo que aún nos queda por vivir. Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. LA PIEL	7
2. EL MELANOMA	8
3. LA MATRIZ EXTRACELULAR	12
3.1 VERSICANO	13
4. ÁCIDO HIALURÓNICO	17
5. CD44	24
6. METALOPROTEASAS DE MATRIZ	28
7. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	30
7.1. LAS VÍAS MAPK	30
7.1.1. ERK1/2	31
7.1.2. JNK	32
7.1.3. p38	33
7.1.4. ERK1/2 EN EL MELANOMA	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO	39
2. ANTICUERPOS	40
3. CLONACIÓN DE LOS siRNAs CONTRA CD44 Y VERSICANO	40
4. TRANSFECCIÓN ESTABLE Y SELECCIÓN DE CLONES	41
5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	41
6. INMUNODETECCIÓN POR <i>WESTERN BLOT</i>	42
7. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA	42

8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	43
9. ENSAYO DE ADHESIÓN	43
10. ENSAYO DE MIGRACIÓN EN PLACA	44
11. ENSAYO DE INVASIÓN EN <i>TRANSWELLS</i>	44
12. CITOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO	45
13. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN MEDIO DE CULTIVO ...	45
14. ENSAYO DE ACTIVIDAD HIALURONIDASA	46
15. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO	47
16. ZIMOGRFÍA	48
RESULTADOS	49
1. TRANSFECCIÓN ESTABLE DE LAS LÍNEAS DE MELANOMA HUMANO	51
2. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131 Y MeWo TRAS LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD44	54
2.1. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de proliferación celular	54
2.2. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de adhesión celular	55
2.3. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo <i>wound healing</i>	56
2.4. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de invasión celular en <i>transwells</i>	56
2.5. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la activación de las vías MAPK ERK1/2 y p38	60
2.6. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en el metabolismo del ácido hialurónico	63
2.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados	63
2.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal	64
2.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico	65
2.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa	67

2.7. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad gelatinolítica de las células	68
3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONJUNTA DEL VERSICANO V3 Y DEL siRNA CONTRA CD44 EN LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO MeWo	69
3.1. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la capacidad de proliferación celular	69
3.2. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la capacidad de adhesión celular	70
3.3. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo <i>wound healing</i>	73
3.4. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la capacidad de invasión celular en <i>transwells</i>	73
3.5. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la activación de las vías MAPK ERK1/2 y p38	74
3.6. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en el metabolismo del ácido hialurónico	76
3.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados	76
3.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal	77
3.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico	78
3.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa	79
3.7. Efecto de la <i>dobles transfección</i> en la capacidad gelatinolítica de las células	80
4. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131 TRAS LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS V0 Y V1 DE VERSICANO	81
4.1. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de proliferación celular	81
4.2. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de adhesión celular	82
4.3. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo <i>wound healing</i>	83
4.4. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de invasión celular en <i>transwells</i>	85

4.5. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la activación de la vía p38	86
4.6. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en el metabolismo del ácido hialurónico	87
4.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados	87
4.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal	88
4.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico	88
4.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa	89
4.7. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad gelatinolítica de las células	90
DISCUSIÓN	93
1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD44 MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA EN EL COMPORTAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO ¿ES CD44 MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE LA SOBREENPRESION DE V3?	96
2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VERSICANO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA EN EL COMPORTAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131	109
3. MODELOS PROPUESTOS	116
CONCLUSIONES	121
ANEXO	125
BIBLIOGRAFÍA	135

Introducción

Figura 1. Esquema de la piel	7
Figura 2. Fases de progresión del melanoma cutáneo	10
Figura 3. Esquema de interacciones celulares	11
Figura 4. Estructura e isoformas del versicano	13
Tabla 1. Efectos del versicano en diferentes líneas celulares	17
Figura 5. Estructura del ácido hialurónico	18
Figura 6. Esquema de las hialuronato sintasas	19
Figura 7. Esquema de la degradación del ácido hialurónico	20
Figura 8. Estructura y dominios de CD44	25
Figura 9. Implicación de las MMPs en el proceso de invasión del melanoma	29
Figura 10. Cascadas de señalización de las MAPKs	30

Materiales y métodos

Tabla 2. Análisis citogenético de las líneas SK-mel-131 y MeWo	39
Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados	40

Resultados

Tabla 4. Líneas obtenidas por transfección de los siRNAs	51
Figura 12. Análisis por <i>western blot</i> de la expresión de CD44 y versicano	52
Figura 13. Análisis por inmunocitoquímica de la expresión de CD44 en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	52
Figura 14. Análisis por inmunocitoquímica de la expresión de CD44 en las líneas MeWo LX y MeWo V3 transfectadas (siCD44)	53
Figura 15. Análisis por inmunocitoquímica de la expresión de versicano en la línea SK-mel-131 transfectada (siGAGb)	53
Figura 16. Ensayo de proliferación en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	54
Figura 17. Ensayo de adhesión en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	55

Figura 18. Ensayo de <i>wound healing</i> en la línea SK-mel-131 transfectada (siCD44)	57
Figura 19. Ensayo de <i>wound healing</i> en la línea MeWo transfectada (siCD44)	58
Figura 20. Ensayo de invasión en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	59
Figura 21. Análisis de la activación de la vía ERK1/2 en la línea SK-mel-131 transfectada (siCD44)	60
Figura 22. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 21	61
Figura 23. Análisis de la activación de la vía ERK1/2 en la línea MeWo transfectada (siCD44)	61
Figura 24. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 23	61
Figura 25. Análisis de la activación de la vía p38 en la línea SK-mel-131 transfectada (siCD44)	62
Figura 26. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 25	62
Figura 27. Análisis de la activación de la vía p38 en la línea MeWo transfectada (siCD44)	62
Figura 28. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 27	63
Figura 29. ELISA de ácido hialurónico en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	64
Figura 30. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	65
Figura 31. Ensayo de internalización de ácido hialurónico en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	66
Figura 32. Ensayo de actividad hialuronidasa en las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	67
Figura 33. Zimografía de medios condicionados de las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas (siCD44)	68
Figura 34. Ensayo de proliferación en las líneas que presentan la doble transfección	70
Figura 35. Ensayo de adhesión en las líneas MeWo LX y MeWo V3 la doble transfección	71
Figura 36. Ensayo de <i>wound healing</i> en la líneas que presentan la doble transfección	72
Figura 37. Ensayo de invasión en las líneas que presentan la doble transfección	74

Figura 38. Análisis de la activación de la vía ERK1/2 en las líneas que presentan la doble transfección	75
Figura 39. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 38	75
Figura 40. Análisis de la activación de la vía p38 en las líneas que presentan la doble transfección	75
Figura 41. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 40	76
Figura 42. ELISA de ácido hialurónico en las líneas que presentan la doble transfección	77
Figura 43. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células en las líneas que presentan la doble transfección	78
Figura 44. Ensayo de internalización de ácido hialurónico en las líneas que presentan la doble transfección	79
Figura 45. Ensayo de actividad hialuronidasa en las líneas que presentan la doble transfección	80
Figura 46. Zimografía de medios condicionados de las líneas que presentan la doble transfección	81
Figura 47. Ensayo de proliferación en las línea SK-mel-131 siGAGb	82
Figura 48. Ensayo de adhesión en la línea SK-mel-131 siGAGb	83
Figura 49. Ensayo de <i>wound healing</i> en la línea SK-mel-131 siGAGb	84
Figura 50. Ensayo de invasión en la línea SK-mel-131 siGAGb	85
Figura 51. Análisis de la activación de la vía p38 en la línea SK-mel-131 siGAGb ...	86
Figura 52. Análisis por densitometría del <i>western blot</i> de la Figura 51	86
Figura 53. ELISA de ácido hialurónico en la línea SK-mel-131 siGAGb	87
Figura 54. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células en la línea SK-mel-131 siGAGb	88
Figura 55. Ensayo de internalización de ácido hialurónico en la línea SK-mel-131 siGAGb	89
Figura 56. Ensayo de actividad hialuronidasa en la línea SK-mel-131 siGAGb	90
Figura 57. Zimografía de medios condicionados de la línea SK-mel-131 siGAGb	90

Discusión

Figura 58. Modelo propuesto para la línea MeWo pSNG	116
Figura 59. Modelo propuesto para la línea MeWo siCD44	117
Figura 60. Modelo propuesto para la línea MeWo V3 siCD44	117
Figura 61. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 (pSNG / pSp)	118
Figura 62. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 siCD44	119
Figura 63. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 siGAGb	120

Antecedentes y objetivos

Años atrás, nuestro grupo describió por primera vez la presencia del proteoglicano de matriz extracelular versicano en diferentes líneas celulares de melanoma humano así como en biopsias de este tipo de tumores (Touab *et al.*, 2002). En las líneas celulares, se observó que el patrón de expresión de versicano dependía del grado de diferenciación celular, encontrándose la mayor expresión (isoformas V0 y V1) en las líneas más indiferenciadas y no hallando expresión en las células más diferenciadas (Domenzain *et al.*, 2003).

Dado que las líneas que expresan versicano son también las que presentan el fenotipo más maligno, se decidió transducir las células con un vector retroviral en el cual se clonó previamente el cDNA que codifica para la isoforma V3 de versicano (isoforma pequeña), pensando que su presencia podría revertir en parte el fenotipo maligno por competencia con las isoformas grandes V0 y V1.

Efectivamente, se observó que la presencia de la isoforma V3 de versicano provoca una alteración en el fenotipo maligno de la línea de melanoma humano SK-mel-1.36-1-5, indiferenciada y que expresa las isoformas V0 y V1 de versicano, disminuyendo su capacidad de proliferación *in vitro* y del crecimiento tumoral *in vivo* y aumentando la capacidad de adhesión y migración sobre ácido hialurónico (Serra *et al.*, 2005).

No obstante, al transducir la línea de melanoma MeWo, más diferenciada que la anterior y que no expresa ninguna isoforma de versicano, con la isoforma V3 se observaron los mismos efectos fenotípicos que en el caso de la línea que sí expresaba versicano (Serra *et al.*, 2005), de manera que estos efectos no podían explicarse tan sólo por una competencia de la isoforma V3 con las isoformas grandes de versicano V0 y V1.

El versicano es capaz de interactuar con numerosas moléculas, entre las cuales se encuentra el ácido hialurónico. Por ello se pensó que el versicano V3 podía ejercer también su acción por interacción (directa o indirecta) con CD44, receptor de membrana del ácido hialurónico. Dados estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de la inhibición de la expresión de CD44 mediante RNA de interferencia (siRNA) en las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo
- Estudiar el efecto conjunto de la expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la línea MeWo

- Estudiar el efecto de la inhibición de la expresión de versicano mediante siRNA en la línea SK-mel-131

Tras la obtención de líneas transfectadas de forma estable en cada uno de los tres puntos, el objetivo fue analizar los cambios fenotípicos producidos a nivel de proliferación, adhesión, migración e invasión celular; activación de las vías de señalización ERK1/2 y p38, metabolismo del ácido hialurónico y actividad metaloproteasa de las células.

Introducción

1. LA PIEL

La piel constituye el mayor órgano del cuerpo humano. Su principal función es la de actuar como barrera protectora del organismo frente al medio exterior y se divide principalmente en dos capas: la epidermis y la dermis.

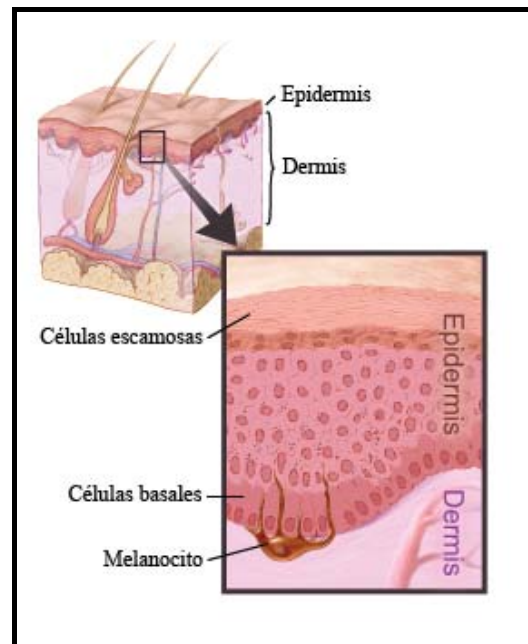


Figura 1. Esquema de la piel (adaptado de <http://www.caring4cancer.com>)

La epidermis, capa más externa de la piel, se divide a su vez en diferentes estratos que son, de más externo a más interno: estrato córneo, estrato granular, estrato espinoso y membrana basal. Los principales componentes celulares de la epidermis son los queratinocitos. Estos llevan a cabo un proceso de migración desde la membrana basal hasta el estrato córneo, durante el cual pierden gran parte del contenido celular.

En la membrana basal, en una proporción de 1:5 a 1:10 con los queratinocitos, encontramos los melanocitos. Los melanocitos son las células encargadas de producir el pigmento melanina que, además de dar color a la piel, la protege de las radiaciones ultravioletas. Esta melanina es distribuida por los melanocitos a los queratinocitos que los rodean mediante la emisión de dendritas.

Otros tipos celulares que encontramos en la epidermis son las células de Langerhans, linfocitos y las células de Merckel.

Justo debajo de la epidermis encontramos la dermis, con un grosor de 20 a 30 veces mayor que la primera y a la que proporciona soporte, nutrición y defensa. Está

compuesta de diferentes tipos de proteínas como el colágeno (componente mayoritario), elastina y proteoglicanos. Como tipo celular predominante encontramos los fibroblastos, además de vasos sanguíneos y células de defensa como macrófagos y linfocitos.

2. EL MELANOMA

El melanoma se define como la neoplasia originada por la malignización de las células productoras de melanina o melanocitos. Su incidencia se ha visto incrementada a lo largo de las últimas décadas, incluso en aquellos países en los que la tasa era baja. Así, estudios recientes demuestran que 1 de cada 63 estadounidenses desarrollará algún tipo de melanoma durante su vida, mientras que el riesgo era de 1 entre 1500 en 1935 y de 1 entre 250 en 1980 (Markovic *et al.*, 2007a). Las tasas de incidencia más elevadas son las correspondientes a Australia y Nueva Zelanda, siendo el melanoma el tercer (en el caso de las mujeres) y cuarto (en el caso de los hombres) tipo de cáncer más frecuente en Australia. Se ha observado que la incidencia del melanoma cutáneo aumenta de manera lineal con la edad. En el Reino Unido, las tasas de incidencia más elevadas se encuentran en el grupo de población de más de 75 años, a pesar de que es el segundo tipo de cáncer más común en el grupo de edad comprendido entre los 20 y los 39 años (Giblin *et al.*, 2007).

Existen numerosos factores de riesgo que pueden predisponer a la aparición del melanoma, factores tanto de tipo ambiental como factores del propio individuo. El factor ambiental más importante corresponde a la exposición a radiaciones ultravioleta, concretamente a las de tipo B (UVB). Esta fracción del ultravioleta es absorbida sólo parcialmente por la atmósfera, de manera que puede ser absorbida posteriormente por los ácidos nucleicos y provocar así mutaciones en estos. En el caso de la radiación UVA, no es altamente absorbida por la piel, mientras que la radiación UVC, a pesar de ser altamente tóxica para las células, es completamente absorbida por la atmósfera y no llega a la superficie terrestre (Hussein, 2005).

Diversos estudios han demostrado que la exposición intensa e intermitente al sol constituye un factor de riesgo importante en el desarrollo del melanoma, mientras que la exposición acumulativa se relaciona con la aparición de otros tipos de cáncer de piel no melanomatosos, como pueden ser el carcinoma escamoso o el carcinoma de células basales. Uno de los principales puntos dentro de la prevención primaria del melanoma es el uso de protectores solares. No obstante, y

paradójicamente, existen estudios que demuestran un incremento del riesgo de aparición de melanoma en personas que utilizan protectores solares, debido a que su uso puede predisponer a una exposición más prolongada a la radiación ultravioleta (Autier *et al.*, 2007).

Otros factores ambientales que pueden incrementar el riesgo de aparición del melanoma son el uso de anticonceptivos orales, factores antropométricos, dietéticos así como el estilo de vida. También se consideró la actividad profesional como un posible factor de riesgo, pero no se observó relación entre aquellos trabajos que requieren una exposición continuada al sol y un incremento del riesgo de desarrollo de melanoma (Markovic *et al.*, 2007a).

Entre los factores de riesgo intrínsecos al propio individuo encontramos el número de nevus benignos (congénitos o adquiridos), siendo de gran importancia el tipo, tamaño, número y localización. Los antecedentes familiares son un factor importante en cuanto al riesgo de padecer melanoma. Se ha demostrado que en aquellos individuos en los que se ha dado un caso de melanoma en alguno de los progenitores el riesgo de aparición de melanoma es aproximadamente el doble que en aquellos sin antecedentes familiares. Otros factores de este tipo pueden ser un estado de inmunosupresión y características fenotípicas tales como color de pelo y ojos y tipo de piel (Markovic *et al.*, 2007a).

Dado que la prevención primaria aún no ha demostrado una clara reducción en la incidencia del melanoma, la prevención secundaria, basada en la detección precoz de las lesiones melanocíticas, es actualmente el método más eficaz para evitar la aparición del melanoma. Se pueden diferenciar diferentes fases dentro de la progresión del melanoma (Gaggioli y Sahai, 2007; Chin, 2003):

- Nevus melanocítico: en la primera fase de la progresión, encontramos una proliferación aberrante de los melanocitos en la epidermis, los cuales pueden mostrar diferentes grados de displasia.
- Nevus displásico: durante esta fase, los cambios morfológicos y estructurales en los melanocitos resultan más evidentes y, además, los melanocitos displásicos adquieren capacidad para extenderse.
- Fase de crecimiento radial o RGP: en un primer momento, los melanocitos presentan un crecimiento lateral, el cual queda restringido a la epidermis o a

zonas muy cercanas. La detección de la lesión melanocítica en esta fase va normalmente asociada a un buen pronóstico.

- Fase de crecimiento vertical o VGP: en la fase VGP, las células comienzan a invadir la dermis y el pronóstico de la lesión es más grave. Durante esta fase, las células ya tienen capacidad invasiva, lo que nos lleva al último nivel de progresión del melanoma.

- Melanoma metastásico: las células tumorales pasan a los nódulos linfáticos y posteriormente a diferentes órganos y tejidos.

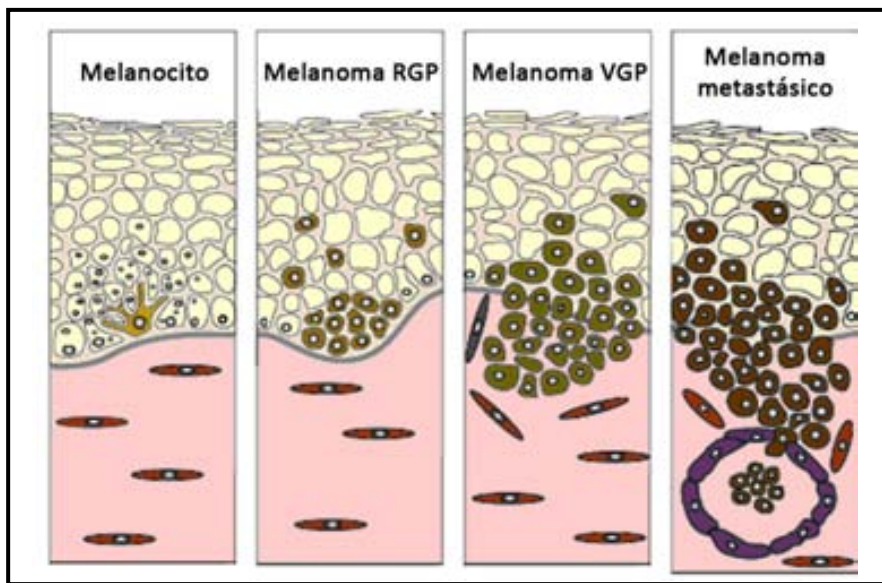


Figura 2. Fases de progresión del melanoma cutáneo (adaptado de Gruss y Herlin, 2001)

La progresión del melanoma va acompañada de un proceso de dediferenciación del melanocito, lo cual comporta un cambio en el patrón de expresión de ciertas moléculas de superficie. Uno de los cambios más aceptados es la transición de E-cadherina (que permite al melanocito establecer interacciones con los queratinocitos) a N-cadherina (Haass *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2000).

Además de la pérdida de E-cadherina, las células de melanoma dejan de expresar otras moléculas como la desmogleína-1 y pasan a expresar una serie de moléculas de superficie como Mel-CAM, VCAM-1, L1-CAM, ALCAM e integrinas como $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_v\beta_3$, lo que facilitará la interacción con otros tipos celulares, principalmente células endoteliales y fibroblastos (van Kempen *et al.*, 2003).

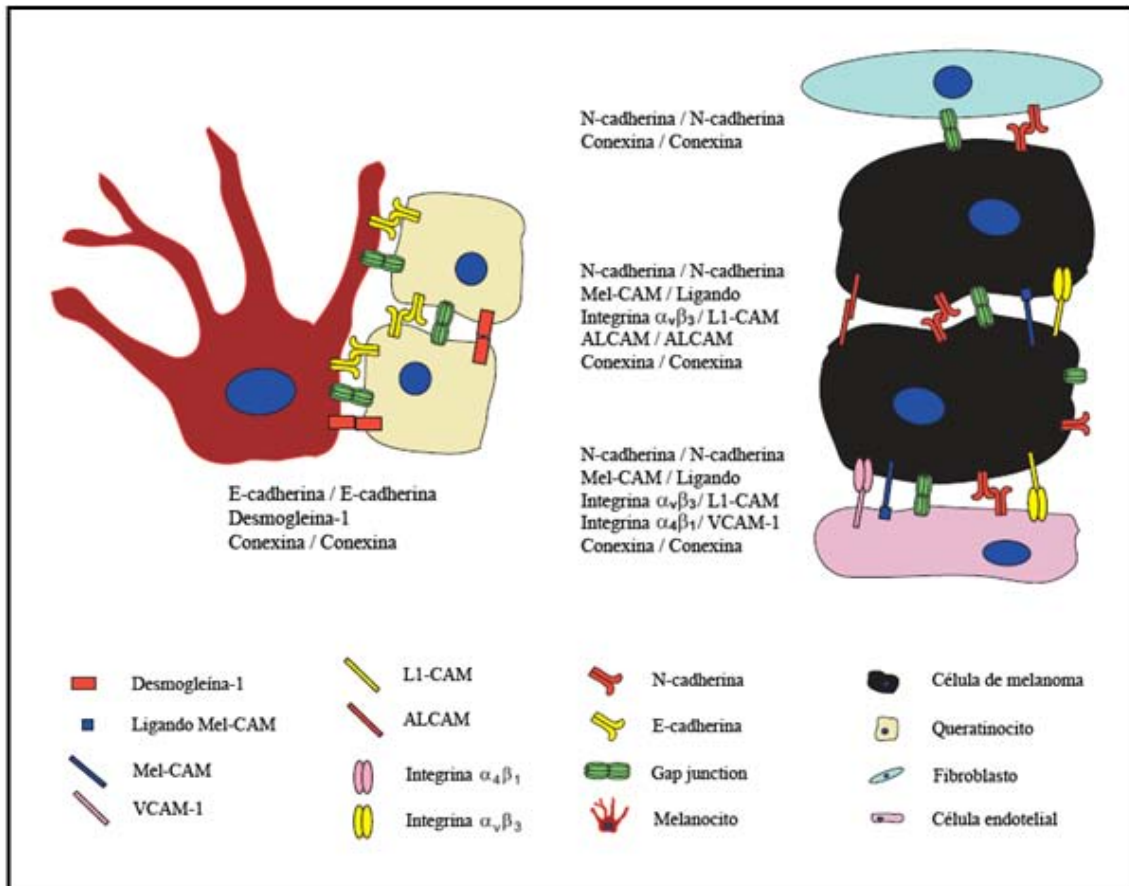


Figura 3. Esquema de las interacciones melanocito - queratinocito y entre la célula de melanoma y los fibroblastos y células endoteliales (adaptado de Haass *et al.*, 2005).

Durante la progresión tumoral, los cambios en la célula no son los únicos que se producen, sino que esta es capaz de alterar el ambiente en que se encuentra. Así, la célula adquiere la capacidad de secretar al medio una serie de factores, como factores de crecimiento o citoquinas, que alterarán el comportamiento de las células del estroma.

Otro de los cambios observados en el desarrollo del melanoma (y en otros tipos tumorales) es el que se da en la composición de la matriz extracelular. Con el fin de adquirir la capacidad de invasión de nuevos tejidos, la célula necesita encontrarse en un medio que facilite su migración hacia los vasos sanguíneos de la dermis. Este ambiente propicio se consigue mediante la producción de nuevos componentes por parte de la célula (como proteoglicanos de matriz o ácido hialurónico) o bien induciendo su expresión en las células del estroma a través de factores de crecimiento o citoquinas.

Todos estos cambios, harán que la célula de melanoma vaya progresando a través de los diferentes estadios hasta llegar a la fase de melanoma metastásico.

Tratamiento del melanoma

Clínicamente, se pueden distinguir 4 fases en la progresión del melanoma:

- Fase I: Lesiones de menos de 1 cm de profundidad sin evidencia de metástasis.
- Fase II: Lesiones de hasta 4 cm de profundidad sin evidencia de metástasis
- Fase III: Lesiones con invasión de los nódulos linfáticos
- Fase IV: Lesiones con metástasis en localizaciones distantes, incluyendo piel, tejido subcutáneo, nódulos linfáticos y órganos.

En cuanto al tratamiento del melanoma, el único tratamiento efectivo es la escisión quirúrgica del tumor, de manera que la detección precoz constituye un factor importante. Por norma general, los tumores en fase I presentan un riesgo bajo de diseminación tanto local como sistémica. Asimismo, es importante la evaluación del estado de los nódulos linfáticos, ya que es un buen indicador de recurrencia y supervivencia.

Cuando el melanoma se encuentra en una fase avanzada, el tratamiento quirúrgico es sólo parcialmente efectivo y se requiere la administración de terapia adyuvante. La única terapia adyuvante para melanomas de alto riesgo actualmente aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) americana es el tratamiento con interferón alfa 2b. En el caso de los melanomas metastásicos, los agentes aprobados por la FDA son la dacarbazina y la IL-2.

La terapia contra el melanoma en fases avanzadas, no obstante, es poco efectiva y se requerirá la combinación de diferentes agentes (biológicos y citotóxicos) para incrementar esta efectividad. Entre estos agentes encontramos vacunas, inhibidores de la angiogénesis y nuevos agentes citotóxicos (además de los ya utilizados carboplatino y paclitaxel) (Markovic *et al.*, 2007b).

3. LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular es una red compleja que envuelve las células compuesta básicamente por tres tipos de componentes: proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (como fibrilina, fibronectina y laminina) y proteoglicanos. La matriz extracelular no juega tan sólo un papel

estructural, sino que también interviene en los procesos de crecimiento, desarrollo, comportamiento y diferenciación celulares.

3.1. VERSICANO

Dentro de los proteoglicanos de tipo condroitín sulfato encontramos el versicano. Debido a su capacidad de unión al ácido hialurónico, el versicano pertenece a la familia de los hialectanos junto a agrecano, neurocano y brevicano. El gen del versicano se localiza en el cromosoma 5 (5q12-5q14) (Naso *et al.*, 1994) y su expresión da lugar a una proteína núcleo en la cual podemos diferenciar tres dominios globulares (Wight, 2002):

- Dominio G1: dominio de unión a ácido hialurónico
- Dominio G2: dominio de unión a cadenas de glicosaminoglicanos, dividida en los subdominios GAG α y GAG β
- Dominio G3: dominio que contiene 2 motivos EGF-*like*, una región de unión a lectina y una región CBP-*like*

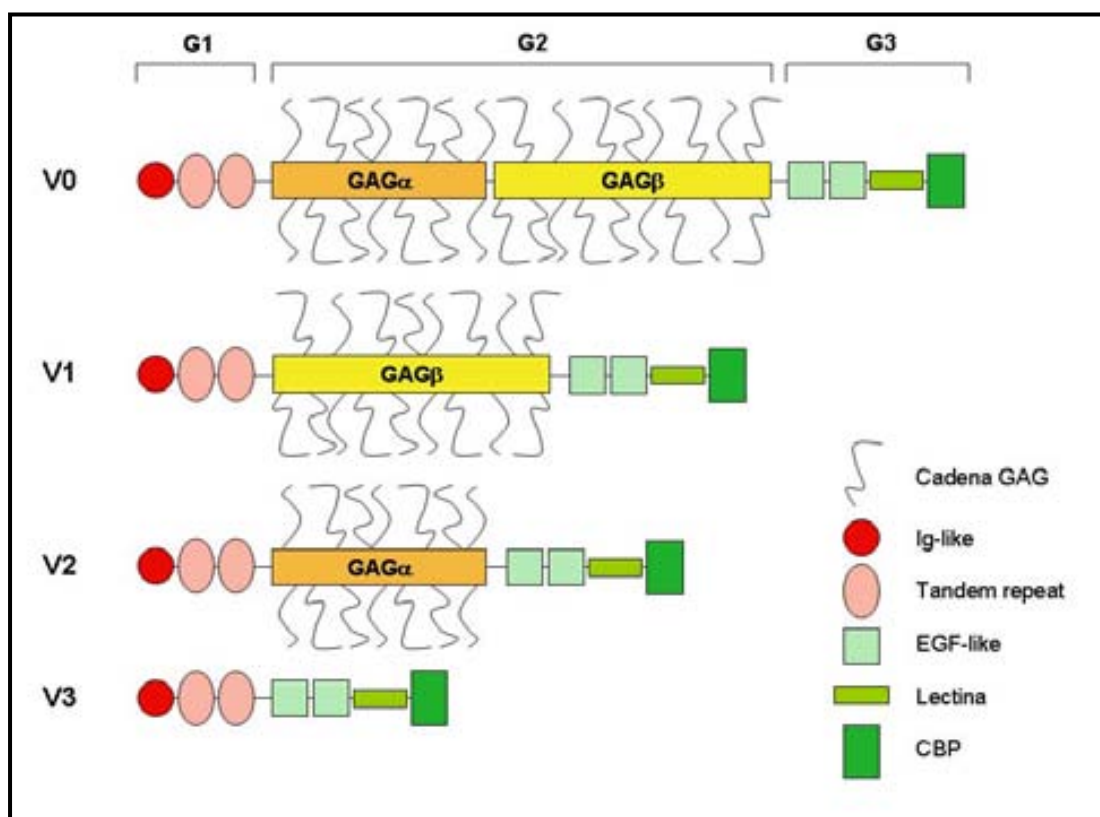


Figura 4. Estructura e isoformas del versicano

El *splicing* alternativo del dominio G2 da lugar a las cuatro isoformas descritas del versicano (Wight, 2002): la isoforma V0 (contiene los dos subdominios GAG), la isoforma V1 (contiene el subdominio GAG β), la isoforma V2 (contiene el subdominio GAG α) y la isoforma V3 (no contiene ningún subdominio GAG). Las diferentes isoformas difieren pues en su peso molecular y en la capacidad de unión de moléculas de glicosaminoglicanos, lo que hace que se diferencien también a nivel funcional. Recientemente se ha descrito una nueva isoforma de versicano (V4) en tumores de mama, formada por los dominios G1 y G3 y una fracción de GAG β (Kischel *et al.*, 2009).

El versicano no juega sólo un papel estructural dentro de la matriz extracelular sino que interviene en un gran número de procesos celulares tales como adhesión, migración y proliferación celular, entre otros. Esta diversidad de funciones viene dada por su capacidad de interactuar con un gran número de moléculas como son el ácido hialurónico, colágeno I, tenascina-R, fibulina 1 y 2, fibrilina-1, fibronectina, selectina P y L, quimioquinas (Theocharis, 2008) y las proteínas de membrana CD44, integrina β 1 y EGFR (Rahmani *et al.*, 2006).

En tejidos adultos, se ha observado expresión de versicano, en condiciones fisiológicas, en tejido conectivo, músculo liso, cartílago, sistema nervioso central y periférico y en las paredes de los vasos sanguíneos. En la piel adulta lo encontramos en el estrato basal de la epidermis así como en las capas papilar y reticular de la dermis (Touab *et al.*, 2002).

El versicano es uno de los principales proteoglicanos del sistema nervioso central, tanto durante el desarrollo (isoformas V0 y V1) como en el tejido adulto (isoforma V2) (Sheng *et al.*, 2005). Se ha demostrado que las isoformas V0 y V1 intervienen en el proceso de migración de las células de la cresta neural durante la embriogénesis (Perissinotto *et al.*, 2000). Se observó que la presencia de estas isoformas inhibe la migración de células madre provenientes del tubo neural hacia ciertos tejidos, guiando de esta manera a las células hacia sus tejidos diana. Este efecto del versicano tendría lugar impidiendo que las células interactuasen con los sustratos que permiten la migración (Dutt *et al.*, 2006a).

La isoforma V1, además, también ha demostrado participar en el proceso de diferenciación neuronal. Al transfectar células de la línea PC12 (línea celular derivada de un feocromocitoma) con esta isoforma, se observó la diferenciación de estas a neuronas, mientras que este proceso no se dio al transfectar la misma línea celular con la isoforma V2 de versicano o con el dominio globular G3. Se ha descrito

que este efecto podría tener lugar a través del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) (Wu *et al.*, 2004).

El versicano también interviene en los procesos de diferenciación de otros tipos celulares y en la formación de los órganos durante el desarrollo. Las interacciones epitelio - mesénquima juegan un papel importante en la organogénesis así como en enfermedades como el cáncer. Así, se ha observado una elevada expresión de versicano en la zona de condensación de células mesenquimales durante el desarrollo del cartílago, corazón, folículos pilosos y riñón (Kamiya *et al.*, 2006). En un modelo *in vitro*, la inhibición de la expresión de versicano provocó la no diferenciación condrogénica, hecho probablemente relacionado con la ausencia de cadenas de condroitín sulfato. En ratones transgénicos, la disrupción homocigótica del gen de versicano es letal a los pocos días de vida del embrión por defectos severos en la formación cardíaca, además de provocar alteraciones en la condrogénesis de las extremidades (Williams *et al.*, 2005).

En ciertas condiciones patológicas la expresión de versicano resulta alterada, especialmente en enfermedades cardiovasculares como en casos de arteriosclerosis (promoviendo la retención de células inflamatorias) y en varios tipos de tumores, como cáncer de testículos (Labropoulou *et al.*, 2006), endometrio (Kodama *et al.*, 2007), páncreas (Skandalis *et al.*, 2006), próstata (Ricciardelli *et al.*, 2007), mama (Koyama *et al.*, 2007) y en el melanoma (Touab *et al.*, 2002) entre otros. En estos casos, la expresión de versicano está directamente relacionada con el crecimiento tumoral, incremento de la angiogénesis y diseminación de las células cancerosas (Theocharis, 2008).

Existen estudios que relacionan los efectos del versicano en las células tumorales con el dominio globular G3. Al transfectar células de astrocitoma con una construcción que contenía este dominio, se observó un aumento del crecimiento tumoral así como de la expresión de fibronectina y del factor de crecimiento del endotelio vascular (Zheng *et al.*, 2004). Este mismo efecto de mayor capacidad proliferativa se observó al transfectar células de leiomiocarcinoma con los dominios G1 o G3 de versicano (Cataruzza *et al.*, 2004).

No obstante, el resto de dominios de la molécula también juegan un papel importante en las funciones del versicano. Así, la transfección de las isoformas V1 y V2 en fibroblastos NIH3T3 produjo diferentes efectos en el comportamiento de las células. Mientras la expresión de la isoforma V1 produjo un aumento en la capacidad de proliferación y una disminución de la apoptosis, en el caso de la isoforma V2 se observó un efecto opuesto (una disminución en la capacidad proliferativa de las

células y ausencia de efecto a nivel de apoptosis). Este incremento en la capacidad de proliferación celular se ha relacionado con un aumento en la expresión del EGFR así como en los niveles de fosforilación de las quinasas ERK1/2. Las células transfectadas con la isoforma V2, en cambio, mostraron una reducción en estos niveles de expresión y fosforilación (Sheng *et al.*, 2005).

También relacionado con la apoptosis, se ha observado que la transfección de una construcción de versicano (dominios G1, G3 y un fragmento de GAG α) en células U87 de astrocitoma les confiere resistencia a la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2005).

En el caso del melanoma, se ha observado una relación entre el grado de diferenciación celular y la expresión de versicano, pasando de no encontrarse expresión en las líneas más diferenciadas a expresarse diferentes isoformas en las líneas más indiferenciadas (Touab *et al.*, 2002; Touab *et al.*, 2003; Domenzain *et al.*, 2003). Asimismo, la inducción de la diferenciación en dos líneas de melanoma humano en estado de diferenciación temprano produjo la supresión de la expresión de versicano (Domenzain *et al.*, 2003). La adición de versicano purificado a cultivos de células de melanoma humano tuvo un efecto inhibitor en la capacidad de adhesión celular sobre fibronectina y colágeno I y un efecto positivo en la capacidad de proliferación (Touab *et al.*, 2002).

La expresión de la isoforma V3 de versicano en líneas de melanoma humano provocó una disminución de la capacidad proliferativa de las células, un aumento en la capacidad de adhesión y migración sobre ácido hialurónico (mediado por su receptor CD44), disminución de la capacidad tumorigénica, retraso en la activación de la vía de señalización de las MAPK ERK1/2, aumento de la producción de ácido hialurónico *in vitro* e *in vivo* y un aumento de la capacidad metastásica de las células (Serra *et al.*, 2005; Miquel-Serra *et al.*, 2006).

La regulación de la expresión de versicano tiene lugar a través de diferentes vías de transducción de señal. Se ha observado la implicación de receptores tirosina-quinasa y de las vías PI3K - PKB y Sonic Hedgehog (Rahmani, 2006). Asimismo, en el promotor de versicano se han encontrado secuencias de unión a TCF4 / β -catenina, AP1, SP1 y AP2 (Domenzain *et al.*, 2009) y la implicación de factores como p53, Pax3 y el grado de metilación del DNA (Rahmani, 2006). En diferentes líneas celulares se ha observado un incremento en la expresión de versicano tras tratarlas con factores de crecimiento como TGF β , PDGF, EGF o el factor de crecimiento similar a la insulina (Ricciardelli *et al.*, 2009). En el caso del melanoma, el tratamiento de la línea

celular SK-mel-131 con el inhibidor de la vía de ERK PD98059 o bien con el inhibidor de la quinasa JNK SP600125 provocó una disminución de la expresión de versicano, mostrando pues la implicación de estas dos vías en el proceso de regulación (Domenzain *et al.*, 2009).

Tabla 1. Resumen de los efectos producidos por el versicano en diferentes líneas celulares

Isoforma/ dominio	Efecto	Referencia
V0/V1	Regulación de la migración de las células de la cresta neural	Dutt <i>et al.</i> , 2006a
V1	Regulación de la diferenciación neuronal	Wu <i>et al.</i> , 2004
V0/V1	Regulación de la condensación de las células mesenquimales	Kamiya <i>et al.</i> , 2006
G3	Aumento del crecimiento tumoral en astrocitoma	Zheng <i>et al.</i> , 2004
G1-G3	Aumento de la proliferación en leiomiocarcinoma	Cataruzza <i>et al.</i> , 2004
V1	↑ proliferación, ↓ apoptosis en fibroblastos	Sheng <i>et al.</i> , 2006
V2	↓ proliferación, no efecto en apoptosis en fibroblastos	
G1-G3	↓ Apoptosis en astrocitoma	Wu <i>et al.</i> , 2005
VS purif.	↑ Proliferación, ↓ adhesión en melanoma	Touab <i>et al.</i> 2002
V3	↓ proliferación, ↑ adhesión y migración en HA, ↓ tumorigénesis, ↓ activación ERK1/2, ↑ producción HA, ↑ metástasis en melanoma	Serra <i>et al.</i> , 2005, Miquel-Serra <i>et al.</i> , 2006

En cuanto a su degradación, las familias de proteasas ADAMTS y MMPs han demostrado estar implicadas en la proteólisis del versicano (Sandy *et al.*, 2001; Malemud, 2006). Los fragmentos generados tras este proceso podrían contribuir al desarrollo de alteraciones cardiovasculares, mientras que en los procesos tumorales los dominios G1 y G3 estarían relacionados con la regulación de la motilidad de las células cancerosas y la capacidad metastásica (Ricciardelli *et al.*, 2009).

4. ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal perteneciente a la familia de los glicosaminoglicanos. Las moléculas de ácido hialurónico están formadas por repeticiones del disacárido ácido glucurónico - N-acetilglucosamina. Su peso molecular es variable, encontrándose en tejidos normales como ácido hialurónico de alto peso molecular (10^6 Da), mientras que en tejidos en reparación y en ciertos procesos patológicos se ha observado la predominancia de una forma de bajo peso molecular (10^5 Da) (Alaniz *et al.*, 2009).

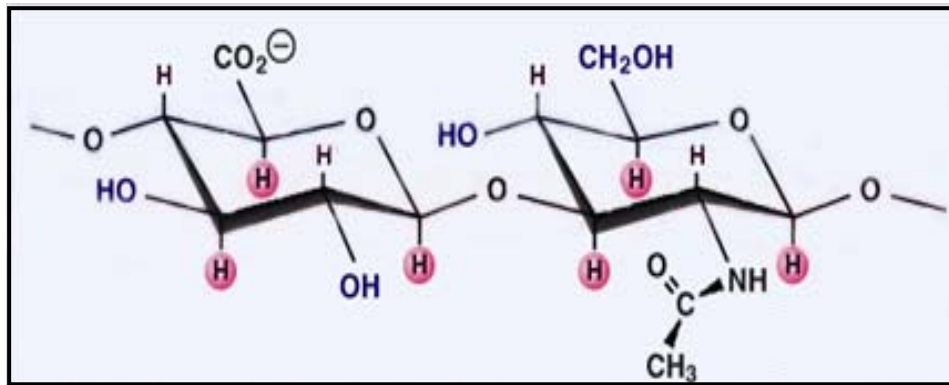


Figura 5. Estructura del disacárido ácido glucurónico - N-acetilglucosamina (<http://www.glycoforum.gr.jp>)

El ácido hialurónico se encuentra ampliamente distribuido por el organismo. Alcanza su máxima concentración en cordón umbilical (4 mg/g), líquido sinovial, dermis y cuerpo vítreo y la mínima en el plasma (0,01 a 0,1 $\mu\text{g/g}$) (Fraser *et al.*, 1997), encontrándose las concentraciones más elevadas durante la embriogénesis y en los procesos de recambio y reparación tisular (Stern, 2008b).

La síntesis del ácido hialurónico tiene lugar en la membrana plasmática a través de las hialuronato sintasas (HAS). Las nuevas moléculas son secretadas al espacio extracelular a medida que se van sintetizando, pudiendo pasar al medio o quedar ancladas a la membrana a través de alguno de sus receptores (CD44, RHAMM) o bien a través de la propia HAS (Toole, 2004).

Se han descrito tres tipos de hialuronato sintasas, que difieren en su actividad y en el peso molecular de las moléculas sintetizadas (Stern, 2005):

- HAS1: es la menos activa, sintetiza moléculas de alto peso molecular
- HAS2: es más activa, también sintetiza moléculas de alto peso molecular y está implicada en procesos de expansión y crecimiento de tejidos
- HAS3: es la más activa, sintetiza moléculas de menor peso molecular posible-mente implicadas en activación de vías de transducción de señal

Esta síntesis está regulada a nivel de transcripción de las diferentes hialuronato sintasas, que a su vez está regulada por factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. También se han observado factores post-transcripcionales como los niveles de fosforilación de las HAS así como las concentraciones de sus sustratos (UDP - ácido glucurónico y UDP - N-acetilglucosamina) (Jokela *et al.*, 2008).

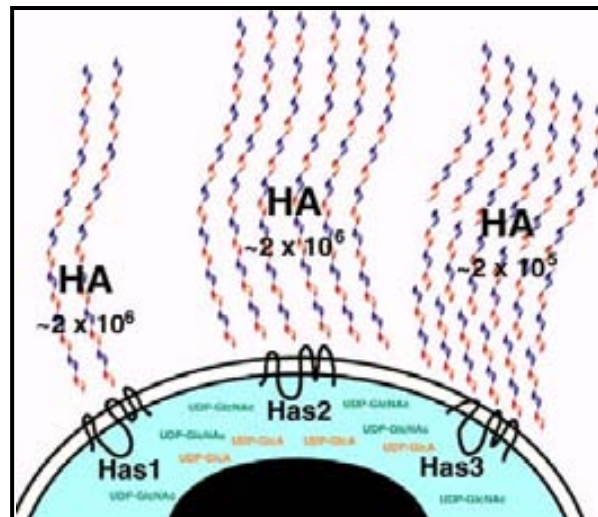


Figura 6. Representación de las diferentes hialuronato sintasas y de los productos sintetizados (<http://www.glycoforum.gr.jp>)

Se ha descrito que la expresión de las diferentes hialuronato sintasas es diferente según el órgano analizado. Así, HAS1 y HAS3 presentan una mayor expresión en corazón, hígado, músculo esquelético, próstata y ovario, mientras que HAS2 se expresa preferentemente en corazón e intestino delgado (Adamia *et al.*, 2005).

La degradación del ácido hialurónico la llevan a cabo una serie de enzimas denominados hialuronidasas. En el hombre se han descrito seis hialuronidasas diferentes, codificadas cada una por un gen distinto (Stern, 2005; Csoka *et al.*, 2001):

- Hyal-1: tiene localización lisosomal y degrada el ácido hialurónico hasta tetrasacáridos
- Hyal-2: se encuentra anclada a membrana y degrada el ácido hialurónico de alto peso molecular a fragmentos de aproximadamente 20 kDa
- Hyal-3: presenta una expresión elevada aunque su función es desconocida
- Hyal-4
- PH-20: es el producto del gen SPAM1, facilita la penetración del espermatozoide en el óvulo, aunque no es específica del esperma
- PHYAL1: es transcrito pero no traducido en humanos, contiene un codón de *stop*

El proceso de degradación del ácido hialurónico implica su internalización al espacio citoplasmático. En este paso se ha observado la participación del receptor de

membrana CD44, ya que su bloqueo provocó la acumulación de ácido hialurónico en la piel en ensayos *in vivo* (Tammi *et al.*, 2001).

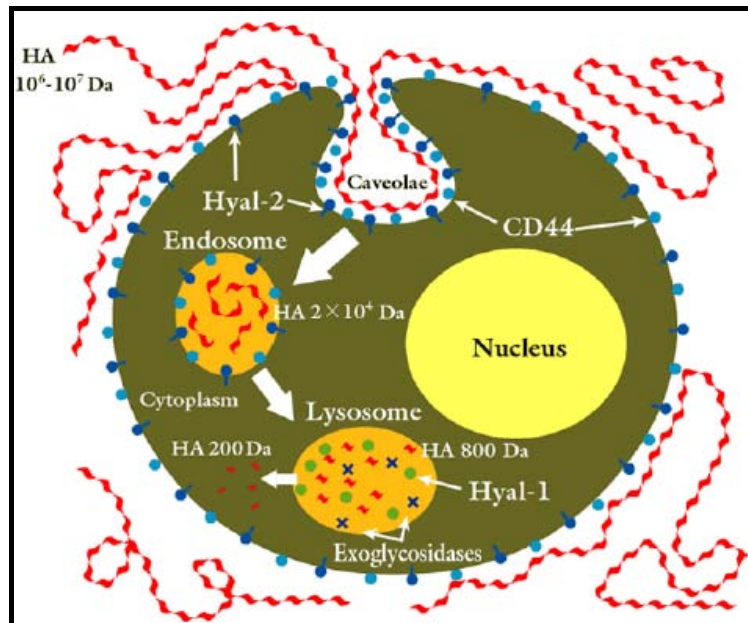


Figura 7. Esquema de la degradación del ácido hialurónico. La acción conjunta de CD44 y Hyal-2 provoca la formación de endosomas con fragmentos de ácido hialurónico de aproximadamente 20 kDa. Posteriormente, Hyal-1 degrada los fragmentos de 20 kDa a tetrasacáridos (adaptado de <http://www.glycoforum.gr.jp>)

Las diferentes funciones que puede realizar el ácido hialurónico dependen del peso molecular de la molécula así como de su concentración, siendo ambas características reguladas por los procesos coordinados de síntesis y degradación (Itano, 2008).

Inicialmente, el ácido hialurónico se describió como una molécula cuyas funciones se debían a sus características físicas (homeóstasis del agua, lubricante en articulaciones, entre otras), pero posteriormente se le han atribuido numerosas funciones que realiza a través de la interacción con moléculas de la matriz extracelular y de la membrana plasmática como crecimiento celular, diferenciación y angiogénesis (Adamia *et al.*, 2005; Heldin *et al.*, 2008). También participa en procesos como la migración de las *stem cells*, adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, unión de los monocitos a las células mesenquimales y adherencia bacteriana. Durante el desarrollo embrionario, el ácido hialurónico confiere a las células madre la capacidad de migrar hacia sus tejidos diana. En el caso de tejidos tumorales, esta misma característica es la que confiere a las células la capacidad metastásica (Stern, 2008a).

El ácido hialurónico ha demostrado participar en la activación de un gran número de quinasas, entre las cuales encontramos Src, HER2/Neu, FAK (*focal adhesion kinase*), protein quinasa C y MAP quinasas. La activación de estas vías de señalización, no obstante, depende en gran medida del tipo celular, lo que muestra la importancia del *background* celular en la capacidad de respuesta al ácido hialurónico (Turley *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos a través del cual el ácido hialurónico puede activar diferentes vías de señalización es por interacción con su receptor de membrana CD44, del cual se hablará en detalle más adelante. Esta interacción provoca la formación de complejos de CD44 con receptores de la familia ErbB como EGFR o ErbB2. La presencia de ácido hialurónico también puede provocar la activación de otros receptores tirosina quinasa como IGF1R- β , PDGFR- β o c-MET. La introducción de antagonistas del ácido hialurónico provocó la inhibición de la activación de estos receptores así como la desaparición de los complejos formados con CD44 (Misra *et al.*, 2006).

Además de la fracción extracelular, algunas líneas celulares presentan también ácido hialurónico en el citoplasma. Este ácido hialurónico podría contribuir a la regulación del ciclo celular a través de la unión a la ciclina CDC37 así como a la regulación de la vía de las MAPK ERK1/2 a través de la fracción intracelular de RHAMM (Adamia *et al.*, 2005).

El ácido hialurónico participa en diferentes procesos patológicos como artritis, aterosclerosis y restenosis o el cáncer (Stuhlmeier, 2006). En relación con los procesos tumorales, una elevada producción de ácido hialurónico está en la mayoría de casos asociada a un mal pronóstico, ya que niveles elevados de ácido hialurónico se relacionan con una mayor capacidad metastásica de las células en muchos tipos de tumores como cáncer de mama (Auvinen *et al.*, 2000), próstata (Bharadwaj *et al.*, 2009) o mieloma múltiple (Calabro *et al.*, 2002). En este sentido, la inhibición de la síntesis de ácido hialurónico mediante la adición al medio de cultivo de 4-metilumbeliferona produjo una disminución de la capacidad metastásica en células de melanoma (Yoshihara *et al.*, 2005). Asimismo, se ha demostrado que los productos de degradación del ácido hialurónico (oligosacáridos) son capaces de estimular la angiogénesis (Toole, 2004). El papel que juega esta molécula en el cáncer es, en cualquier caso, un papel complejo ya que los efectos en el comportamiento celular dependen en gran medida de su peso molecular y del contexto en que se encuentre, siendo de especial importancia la presencia / ausencia de diferentes hialuronato

sintasas y / o hialuronidasas (Toole *et al.*, 2008; Itano *et al.*, 2004) y el tipo de célula tumoral (Tammi *et al.*, 2008).

Está ampliamente descrito en la bibliografía que las células tumorales requieren la presencia de otros tipos celulares para su progresión, como células inflamatorias, células vasculares o fibroblastos (Goldstein *et al.*, 2005). Con el fin de atraer a estas células hacia el tumor, las propias células tumorales secretan al medio diversos factores quimioatrayentes como determinados factores de crecimiento e incluso ácido hialurónico. Además de facilitar la penetración de las células hacia el tejido tumoral, el ácido hialurónico (asociado en muchos casos a versicano) provocaría la activación de ciertas vías de señalización en estas células a través del receptor de membrana CD44, como la vía de las MAPK ERK1/2 y la vía PI3K/Akt (Itano & Kimata, 2008). Se ha descrito que esta interacción del ácido hialurónico con CD44 es también causa de quimioresistencia en cáncer de pulmón (Ohashi *et al.*, 2007).

El análisis de tumores malignos ha desvelado la presencia de niveles elevados de ácido hialurónico en el estroma que envuelve el tumor. Este ácido hialurónico es producido principalmente (aunque no únicamente) por los fibroblastos peritumorales (Stern, 2008a). Uno de los mecanismos propuestos para explicar la elevada producción de ácido hialurónico por parte de estos fibroblastos del estroma es la producción de lactato por las células tumorales, fruto de un metabolismo anaerobio (Stern, 2008b).

Todos estos datos indican que las células tumorales inician el desarrollo de un estroma que les proporciona los factores de crecimiento necesarios para su crecimiento así como un medio extracelular favorable para su expansión y que en este proceso el ácido hialurónico juega un papel fundamental.

Otro aspecto importante en la progresión tumoral es el proceso de angiogénesis, es decir, la formación de nuevos capilares que irrigen el tumor. Estos capilares se formarían a partir de vasos sanguíneos preexistentes, aunque se ha descrito recientemente que podría tener lugar una síntesis de nuevos vasos sanguíneos a través del reclutamiento de células madre de la médula ósea.

El ácido hialurónico participa de forma activa en el proceso angiogénico. Mientras que el ácido hialurónico de alto peso molecular inhibe la proliferación de las células endoteliales, los oligosacáridos producto de su degradación por parte de las hialuronidasas estimula la angiogénesis. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, este ácido hialurónico de alto peso molecular también es a su vez

necesario para la formación de una matriz extracelular apropiada para la fácil penetración de las células endoteliales en asociación con otras moléculas de la matriz como el versicano.

El papel del ácido hialurónico en los procesos tumorales está íntimamente ligado a la capacidad de síntesis y degradación de las células, es decir, a los niveles de expresión de las diferentes hialuronato sintasas y hialuronidasas. Así, Bullard y colaboradores describieron una correlación entre la expresión de HAS3 y la progresión del cáncer de colon. El análisis de dos líneas celulares obtenidas del mismo paciente en diferentes estadios de la enfermedad mostró una mayor expresión de HAS3 en la línea obtenida de un nódulo metastásico. Esta expresión estaba asociada a unos niveles elevados de ácido hialurónico pericelular y una mayor capacidad de crecimiento independiente de anclaje. La inhibición mediante siRNA de la expresión de HAS3 resultó en un fenotipo similar al de la línea celular obtenida del tumor primario (Bullard *et al.*, 2003).

En el mismo sentido, HAS1 demostró participar en la regulación del crecimiento de una línea de cáncer de vejiga. Al transfectar esta línea con un siRNA contra HAS1, la capacidad de proliferación de las células se vio reducida a un 20-25%. Esta disminución se debe a un incremento en la apoptosis así como a una disminución de los reguladores positivos de la transición G₂-M (Golshani *et al.*, 2008). La expresión de HAS1 también se ha asociado a un mal pronóstico en cáncer de colon (Yamada *et al.*, 2004).

En el caso de HAS2 se obtuvieron resultados similares al inhibir su expresión en una línea tumoral de mama. Esta inhibición produjo una disminución de la velocidad de proliferación de las células, debido al menos en parte a una supresión de las ciclinas A y B y de la quinasa cdc2. Además de este efecto a nivel de proliferación, la inhibición de HAS2 también provocó una disminución de la capacidad de migración e invasión de las células, efecto que iría mediado a través de CD44 (Li *et al.*, 2007).

La sobreexpresión de HAS3 en una línea celular de cáncer de próstata, en cambio, produjo una inhibición en el crecimiento tumoral. Esta inhibición, no obstante, desaparece al cotransfectar la misma línea celular con la hialuronidasa HYAL1. Estos resultados muestran, pues, que a pesar de que el tumor requiere la presencia de ácido hialurónico para su progresión, un exceso de este puede producir un efecto opuesto (Bharadwaj *et al.*, 2007).

Las hialuronidasas, especialmente HYAL1 (aunque también HYAL2 y HYAL3; Paiva *et al.*, 2005), también han demostrado tener un papel importante en la progresión tumoral. Se ha establecido una correlación entre actividad hialuronidasa y grado de malignidad en tumores de próstata y vejiga urinaria (principalmente) así como en tumores de mama, tumores metastásicos y gliomas (Lokeshwar y Selzer, 2008).

La inhibición de la expresión de HYAL1 provocó una disminución del crecimiento tumoral en células de cáncer de próstata, mientras que su sobreexpresión produjo un incremento de este crecimiento. Ciertos estudios en los que se sobreexpresaba HYAL1, la han descrito como un supresor tumoral. No obstante, los niveles de enzima alcanzados en estos experimentos exceden con creces los niveles encontrados en los tejidos tumorales, de manera que no se correspondería con una situación natural en el tumor (Lokeshwar y Selzer, 2008).

En un panel de líneas tumorales de mama, se encontró una relación entre la capacidad invasiva de las células y la expresión de las hialuronidasas HYAL1 y HYAL2. Así, las líneas con un fenotipo más agresivo presentaban un incremento de la expresión génica de estas hialuronidasas, siendo HYAL2 la que presentaba mayores niveles. Por el contrario, no se pudo detectar expresión de las hialuronidasas en las líneas menos invasivas (Udabage *et al.*, 2005).

5. CD44

CD44 es una glicoproteína de membrana celular que se caracteriza por ser el principal receptor del ácido hialurónico en la superficie celular. El gen de CD44 contiene 20 exones, siendo los 10 exones centrales susceptibles a sufrir *splicing* alternativo (la isoforma de CD44 denominada *standard* no contiene ninguno de estos 10 exones variables). Teóricamente, podrían existir más de 800 isoformas de CD44, aunque aparentemente no todas son expresadas. La variabilidad estructural de CD44 se ve aumentada por la presencia de modificaciones post-traduccionales, tales como N y O-glicosilaciones y unión a glicosaminoglicanos.

La estructura proteica de CD44 se puede dividir en los siguientes dominios (Ponta *et al.*, 2003):

- Dominio N-terminal: región extracelular a través de la cual CD44 puede unirse al ácido hialurónico.

- Región extracelular próxima a la membrana: susceptible de sufrir proteólisis, es la región donde se encuentran los exones variables.
- Región transmembrana
- Dominio C-terminal: es la región intracelular, a través de la cual CD44 interacciona con ciertas proteínas citoplasmáticas.

En el extremo N-terminal existe un fragmento de 92 aminoácidos que presenta un 35% de homología con una secuencia de una familia de proteínas englobadas bajo el nombre de hialadherinas por su capacidad de unión al ácido hialurónico. En esta familia encontramos moléculas como la proteína de unión del cartílago, agrecano, versicano, proteína-6 inducible por TNF (TSG-6) y el receptor 1 de ácido hialurónico del endotelio de los vasos linfáticos (LYVE-1) (Naor *et al.*, 2008).

Se han descrito tres estados de activación de CD44 (Naor *et al.*, 2008): activo (presenta capacidad de unión al ácido hialurónico de forma constitutiva), inducible (puede unir ácido hialurónico cuando es activado por factores inductores como anticuerpos o citoquinas) e inactivo (no une ácido hialurónico ni en presencia de inductores). En muchos casos, el patrón de N-glicosilación es el que determina la capacidad de CD44 de unir moléculas de ácido hialurónico (a más nivel de glicosilación, menos activación).

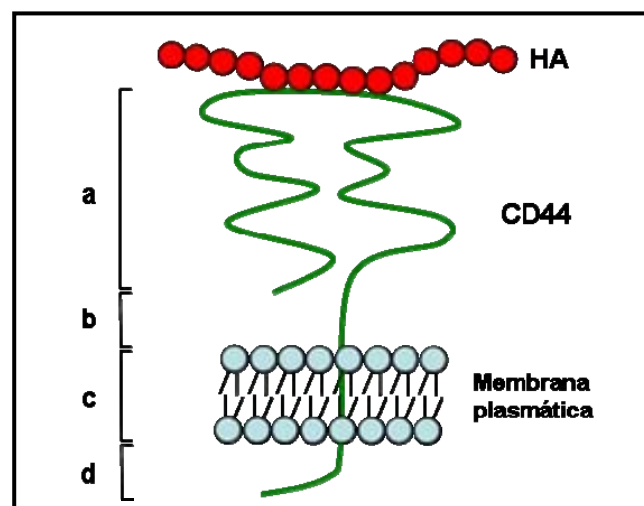


Figura 8. Estructura y dominios de CD44. (a) Dominio N-terminal. (b) Región de splicing alternativo. (c) Región transmembrana. (d) Dominio C-terminal

Las funciones que realiza CD44 son muy variadas, gracias a las múltiples interacciones que la molécula puede establecer tanto a nivel extracelular, en la membrana plasmática o a través de la cola citoplasmática. Además de ácido

hialurónico, CD44 puede unir otras moléculas tales como colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, cadenas de condroitín sulfato u osteopontina, entre otras. Asimismo, CD44 puede establecer interacciones con otros receptores y proteínas de membrana así como con proteínas del citoesqueleto. Las principales funciones de CD44 son la participación en interacciones célula-célula y en procesos de crecimiento, adhesión, motilidad y diferenciación celulares (Ponta *et al.*, 2003). CD44 también ha demostrado participar de manera importante en numerosos procesos tumorales.

Desde hace tiempo, está descrito que CD44 participa en los procesos de crecimiento tumoral e invasión metastásica (Naor *et al.*, 2002; Marhaba y Zöller, 2004). El análisis de dos líneas celulares de melanoma humano provenientes del mismo paciente mostró que la línea obtenida a partir de un nódulo metastásico expresaba CD44, mientras que la línea establecida a partir del tumor primario no lo hacía. En el caso de la línea que expresaba CD44, se observó mediante ensayos *in vivo* que las células presentaban una mayor capacidad de crecimiento y una mayor capacidad metastásica cuando se comparaba con la línea que no expresaba CD44. Estas diferencias entre ambas líneas desaparecían al tratar los animales con un anticuerpo dirigido contra CD44 (Guo *et al.*, 1994). También en el caso del melanoma, se ha asociado una elevada expresión de CD44 con una mayor capacidad de proliferación celular (Ahrens *et al.*, 2001).

Está ampliamente descrito en la bibliografía que la capacidad tumorigénica y metastásica atribuida a CD44 puede tener lugar mediante la interacción de este con la familia de receptores ErbB. En células de glioma se estableció una relación entre CD44 y los receptores EGFR y ErbB2 mediante ensayos de inmunoprecipitación. Esta interacción mostró tener implicaciones funcionales, ya que al tratar las células con diferentes concentraciones de ácido hialurónico se observó un aumento en los niveles de fosforilación de las quinasas ERK1 y 2 (Tsatas *et al.*, 2002).

En líneas celulares de cáncer de mama se ha relacionado CD44 con la capacidad de migración tumoral. En este caso, se observó una mayor expresión de CD44 en las líneas más agresivas. La participación del receptor en la motilidad celular tendría lugar a través de la activación de las quinasas ERK1 y 2, activación que también requeriría la participación de RHAMM (Hamilton *et al.*, 2007). La sobreexpresión de CD44 en otra línea celular de cáncer de mama provocó un incremento de la capacidad metastásica de las células (Ouhtit *et al.*, 2007).

La relación entre CD44 y la familia de receptores ErbB también ha demostrado ser de gran importancia en el cáncer de ovario. Al tratar la línea celular SK-OV-3.ipl con heregulina (capaz de activar a ErbB2 a través de Erb3 y ErbB4), se observó un aumento en la capacidad de proliferación y migración celular. Este efecto tendría lugar, al menos en parte, a través de un incremento en la producción de ácido hialurónico por estímulo de la activación de las diferentes hialuronato sintasas. Este ácido hialurónico activaría a su vez la cascada de señalización iniciada en CD44. Esto queda demostrado al perderse los efectos del tratamiento con heregulina cuando las células eran transfectadas con siRNAs contra las diferentes hialuronato sintasas o bien contra CD44 (Bourguignon *et al.*, 2007).

Además de interactuar con miembros de la familia ErbB, CD44 puede participar en la promoción del fenotipo maligno de las células tumorales por interacción con otros tipos de proteínas. Entre las proteínas intracelulares encontramos la anquirina, proteína del citoesqueleto asociada a la membrana plasmática. La interacción CD44 - anquirina provoca la activación del citoesqueleto, lo que permite numerosos efectos mediados por el ácido hialurónico como adhesión celular, proliferación y migración. Asimismo, la anquirina es responsable de la unión de CD44 al receptor de IP₃ (inositol 1,4,5 trifosfato), pudiendo provocar la movilización del Ca²⁺ intracelular y la participación en procesos como adhesión y proliferación celular (Bourguignon, 2008).

Otra vía a través de la cual CD44 participa en diferentes funciones celulares es la interacción con las RhoGTPasas, pertenecientes a la superfamilia de Ras. La interacción con proteínas como RhoA, Rac1 o Cdc42 amplía aún más el rango de procesos celulares en los que CD44 puede estar implicado (Bourguignon, 2008).

Uno de los aspectos importantes de la invasión tumoral es la capacidad de las células de degradar los componentes de la matriz extracelular. En este aspecto, la participación de CD44 en estos procesos de invasión ha demostrado estar ligada a la metaloproteasa de matriz MMP-2. El tratamiento de las líneas celulares de melanoma humano A375M y M151 con un anticuerpo que provoca la activación de CD44 causó un incremento en la actividad gelatinolítica asociada a MMP-2 asociada a un aumento en sus niveles de expresión (Takahashi *et al.*, 1999; Isacke y Yarwood, 2002).

En relación con estos resultados, el tratamiento de la línea celular de carcinoma de pulmón QG90 con ácido hialurónico provocó un aumento en la actividad MMP-2. Este aumento resultó disminuido tras la inhibición de la expresión

de CD44 mediante RNA de interferencia. Esta disminución también se observó al tratar la misma línea celular con diferentes inhibidores de las vías MAPK-ERK y PI3K, indicando su participación en el proceso de secreción de MMP-2 (Zhang *et al.*, 2002).

Otro proceso de degradación en el que interviene CD44 es la regulación de la degradación del ácido hialurónico por parte de las hialuronidasas 1 y 2. Harada y colaboradores transfectaron células HEK 293 con CD44 y / o las isoformas Hyal1, Hyal2 y Hyal3 de hialuronidasa. Después de añadir ácido hialurónico marcado al medio de cultivo, no se observó degradación de este en las líneas que no expresaban CD44, mientras que sí se observó un aumento de la degradación intracelular en la línea que expresaba Hyal1 y CD44 conjuntamente y de la degradación extracelular en el caso de la línea que expresaba Hyal2 y CD44 (Harada y Takahashi, 2007).

6. METALOPROTEASAS DE MATRIZ

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son un conjunto de endopeptidasas dependientes de zinc que degradan diferentes compuestos de la matriz extracelular. Su clasificación se realiza según su estructura, los substratos que degradan y la localización, dando lugar a 6 grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana (MT-MMPs) y otras (Jeziarska *et al.*, 2009).

Estructuralmente, se pueden diferenciar varios dominios: un péptido señal, un dominio propéptido N-terminal, un dominio catalítico (con un lugar de unión a zinc altamente conservado) y un dominio C-terminal de tipo hemopexina. La mayoría de MMPs son secretadas al medio extracelular. No obstante, las MT-MMPs permanecen ancladas a la membrana celular mediante un dominio transmembrana o un ancla glicosilfosfatidil-inositol (Hofman *et al.*, 2005).

La expresión basal de las MMPs es baja, aunque aumenta en situaciones en las que se requiere remodelar la matriz extracelular. Esta regulación se puede dar a diferentes niveles: a nivel de transcripción (inducida por factores como citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, oncogenes y promotores tumorales), a nivel de activación del zimógeno (la mayoría de MMPs son secretadas en formas latentes y requieren un proceso de activación proteolítica) y a nivel de inhibición del enzima activo (a través de los inhibidores de tejido de las MMPs o TIMPs) (Polette *et al.*, 2004).

En los procesos tumorales, se ha observado una relación directa entre la expresión de las metaloproteasas de matriz y la capacidad metastásica de las células.

En estudios *in vivo*, no obstante, se ha observado que la mayor parte de las MMPs asociadas a los tumores son producidas por las células del estroma más que por las propias células tumorales, las cuales sí serían responsables de la secreción de factores como el inductor de metaloproteasa de matriz extracelular (EMMPRIN) que aumentarían la expresión de MMPs por parte de los fibroblastos del estroma.

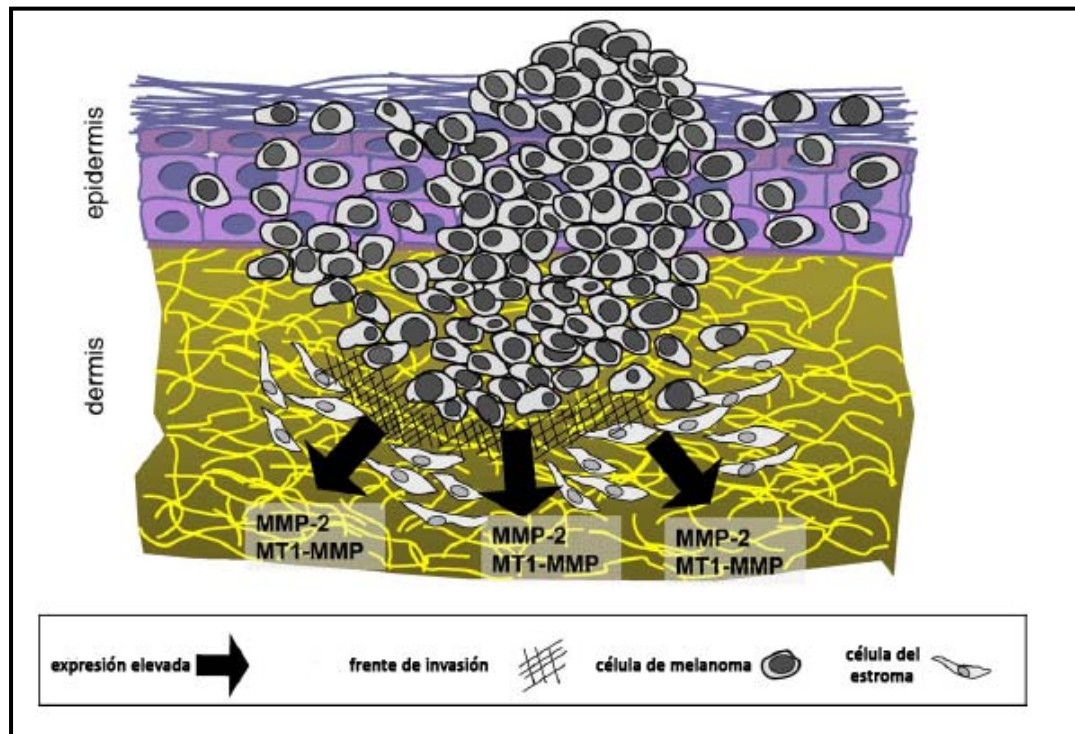


Figura 9. Esquema de la implicación de las MMPs en el proceso de invasión del melanoma (adaptado de Hofmann *et al.*, 2005)

En el caso concreto del melanoma, se ha encontrado expresión de MMP-1, -2, -9, -13 y MT1-MMP, además de TIMP-1, -2 y -3 que en algunos casos pueden actuar como activadores en lugar de inhibidores (Hofmann *et al.*, 2005).

Diferentes estudios han asociado la expresión elevada de MMP-2 y MT1-MMP con la progresión del melanoma así como con la capacidad metastásica. Estas metaloproteasas actuarían modulando la adhesión y dispersión de las células en los diversos componentes de la matriz extracelular, facilitando así la migración e invasión de las células.

7. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

7.1. LAS VÍAS MAPK

Las proteín-quinosas activadas por mitógenos (MAPK) constituyen una de las principales familias de vías de transducción de señal en los organismos eucariotas. Su activación puede ser iniciada por diferentes estímulos como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas o estrés. Estos estímulos ejercen su acción a través de receptores tirosina-quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteína G, receptores de citoquinas o receptores serina-treonina quinasa. Las diferentes vías MAPK participan en la regulación de diversas funciones celulares como expresión génica, regulación de ciclo celular, metabolismo, motilidad, supervivencia, apoptosis y diferenciación.

A día de hoy se han descrito seis grupos de MAPKs en mamíferos (Krishna y Narang, 2008): ERK1/2, JNK, p38, ERK7/8, ERK3/4 y ERK5. De estos grupos, los tres primeros son los más ampliamente estudiados.

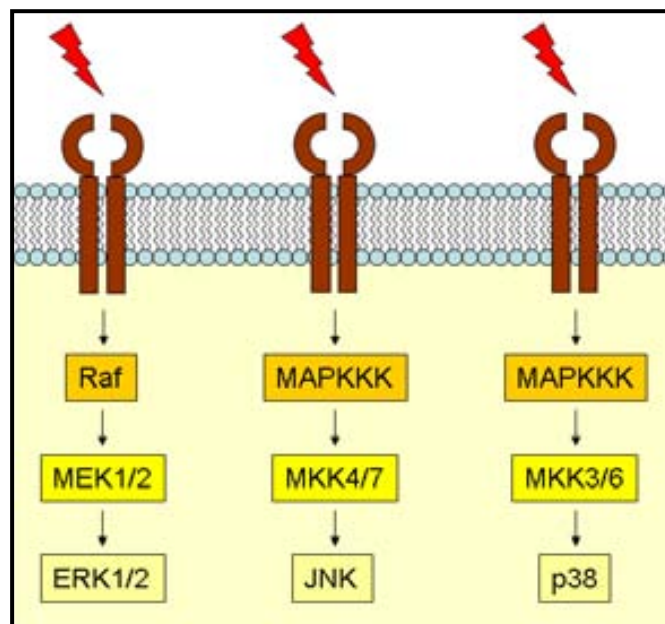


Figura 10. Esquema de las cascadas de señalización de las diferentes MAPKs

La activación de las MAPK tiene lugar a través de una serie de fosforilaciones sucesivas: las MAPK son fosforiladas por las MAPK quinosas (MAPKK), que a su vez son fosforiladas por las MAPKK quinosas (MAPKKK). Las MAPKKK son activadas por fosforilación o por interacción con *small G proteins* de la familia de Ras. Esto inicia una cadena de fosforilaciones que desemboca en la activación de diferentes sustratos de las MAPK, que pueden ser factores de transcripción, otras quinosas o proteínas del citoesqueleto. No obstante, se ha observado que ciertos efectos de las

MAPK no requieren una fosforilación sino simplemente una interacción proteína-proteína.

La especificidad de las MAPK viene regulada tanto por los lugares de fosforilación de los sustratos (serina/treonina seguida de Pro) como por los lugares de unión a estos sustratos, principalmente. Estos lugares de unión también se encuentran en los activadores (MAPKKs), proteínas formadoras de complejos (*scaffold*) y fosfatasas.

La regulación de la actividad de las MAPK tiene lugar de manera importante a través de las MAPK fosfatasas (MKPs), pudiendo ser serina/treonina fosfatasas (PPs), tirosina fosfatasas (PTPasas) o fosfatasas duales. La defosforilación es suficiente para inactivar la MAPK y bloquear su translocación al núcleo. En el caso de los procesos tumorales, no está claro de qué manera intervienen en la transformación maligna (sobrexpresión o supresión). La utilización de diferentes modelos animales permitirá dar una respuesta a esta cuestión (revisado por Keyse, 2008).

Dado que la activación de las vías MAPK puede provocar diferentes respuestas en una misma célula, se han propuesto diferentes mecanismos para intentar explicar la regulación de esta especificidad en la respuesta. Entre estos mecanismos podemos encontrar la duración y potencia de la señal, interacción con proteínas *scaffold*, localización subcelular, presencia de diferentes isoformas, *cross-talk* con otras vías o modificaciones post-traduccionales (Krishna y Narang, 2008).

7.1.1. ERK1/2

Las MAPKs ERK1/2 son activadas por un gran número de estímulos, siendo los más importantes factores de crecimiento, suero y ésteres de forbol. La cascada de activación se inicia en receptores de membrana como RTKs o receptores acoplados a proteína G. La señal se transmite a las *small G proteins*, de la familia de Ras. Las diferentes isoformas de Ras pueden activar diferentes cascadas dependiendo del contexto celular e incluso del activador que inicie la cascada de señalización, como la vía de la PI3K o la vía de ERK1/2. En este último caso, Ras recluta las MAPKKK, principalmente Raf, en la membrana para ser activadas. Existen numerosos sitios de fosforilación en Raf, que según su estado condicionarán la conformación de la molécula y la afinidad por los ligandos. Se ha observado que B-Raf es el principal activador de las quinasas MEK1/2, siendo 10 veces más eficiente que C-Raf y 500 veces más que A-Raf (Lefloch *et al.*, 2009). Una vez activadas, MEK1/2 fosforilarán a ERK1/2. Una parte importante de ERK1/2 fosforilada se transloca al núcleo donde

fosforilará numerosos sustratos (SRC-1, Pax6, NFAT, EIK-1, MEF-2, c-fos, c-jun, c-myc, STAT3) en los sitios consenso PxS/TP. No obstante, ERK1/2 también pueden fosforilar proteínas citoplasmáticas, de membrana y del citoesqueleto. La cadena de fosforilaciones puede prolongarse con la activación de nuevas quinasas por parte de ERK1/2.

La regulación de la vía de ERK es compleja. Se ha observado un patrón oscilatorio en la actividad de la vía el cual es regulado, al menos en parte, a través de un *feedback* negativo (esencial para el comportamiento oscilatorio) y otro positivo (responsable de la frecuencia y amplitud de las oscilaciones) (Shin *et al.*, 2009).

Dumesic y colaboradores han demostrado recientemente que la inhibición conjunta de las quinasas ERK1/2 provoca una disminución importante en la capacidad proliferativa de los queratinocitos de la epidermis. El grupo demostró también que este efecto tenía lugar a través de una inhibición del ciclo celular a nivel de la transición G2/M. No obstante, al realizar los experimentos en fibroblastos, observaron que la inhibición de la proliferación se daba a nivel de la transición G1/S, mostrando que las quinasas ERK1/2 pueden actuar en diferentes puntos del ciclo celular dependiendo de la línea celular estudiada (Dumesic *et al.*, 2009).

En el caso del melanoma, la vía ERK1/2 es de gran importancia ya que es una vía que presenta mutaciones con una frecuencia elevada, especialmente a nivel de B-Raf o N-Ras (ver apartado 7.1.4).

7.1.2. JNK

La vía de las JNKs se activa en respuesta a citoquinas, radiación ultravioleta, daño en el DNA y en menor medida por estimulación de ciertos receptores acoplados a proteína G, suero y factores de crecimiento.

Existen tres genes que codifican para las JNK (JNK1, JNK2 y JNK3). Estas JNKs son fosforiladas por las MAPKK MKK4 y MKK7. La gran diversidad de activadores de estas MAPKK hace que las JNK puedan activarse en respuesta a un gran número de estímulos. Esta activación puede resultar en cambios a nivel de expresión génica, muerte celular o proliferación.

De la misma manera que las ERK1/2, las JNKs pueden translocarse al núcleo tras ser fosforiladas, aunque en este caso en menor proporción. No obstante, existe un amplio rango de dianas nucleares de las JNKs, especialmente factores de transcripción y receptores hormonales. El principal sustrato de las JNKs es c-jun, que al ser fosforilado provoca un aumento de la actividad transcripcional del

complejo AP-1. Otros sustratos citoplasmáticos de las JNKs son proteínas *scaffold* y adaptadoras, proteínas implicadas en apoptosis o la quinasa Akt.

En cáncer se han encontrado niveles elevados de JNK en muchas líneas celulares, participando a nivel de apoptosis/supervivencia. Se ha demostrado que una activación prolongada de la vía JNK estimula la apoptosis, mientras que la activación transitoria estimularía la supervivencia celular.

7.1.3. p38

La vía de p38 participa en procesos de regulación osmótica, respuesta a estrés celular y procesos del ciclo celular. Se han descrito cuatro isoformas de p38 (α , β , γ y δ), siendo la isoforma α la más estudiada (Cuenda y Rousseau, 2007). Estas MAPK son activadas por las MAPKK MKK3 y MKK6, aunque se ha observado también activación por MKK4 y MKK7, lo que indicaría un cierto *cross-talk* entre las vías de p38 y JNK. En cuanto a las MAPKKK, se ha observado un gran número de estas capaces de activar a p38, como MTK1, MLK2/MST, MLK3, DLK, ASK1 y TAK1.

Tras activarse, p38 puede translocarse al núcleo (también se ha encontrado en el citoplasma). Las dianas de p38 pueden ser, entre otras, factores de transcripción u otras quinasas. Su activación se ha observado en procesos como la apoptosis, cáncer, desarrollo y diferenciación o inflamación, mientras que la regulación la llevan a cabo las fosfatasa MKP-1, MKP-4 y MKP-5.

7.1.4. ERK1/2 EN EL MELANOMA

La vía ERK se encuentra desregulada aproximadamente en un tercio de los procesos tumorales. Esta desregulación afecta a toda la vía, desde la sobreexpresión de los receptores de membrana y las dianas nucleares pasando por la mutación de Ras o Raf o la pérdida de diferentes inhibidores de la vía, localizándose las alteraciones más importantes en Ras y Raf. Estas alteraciones son de gran importancia ya que las dianas de ERK tienen un papel principal en los procesos de proliferación, angiogénesis, migración, invasión y metástasis, así como en la regulación del ciclo celular, apoptosis, supervivencia, desarrollo y diferenciación.

En el caso del melanoma, se ha observado el requerimiento de ciertos factores autocrinos para su progresión, siendo la mayor parte factores de crecimiento. Estos factores actúan en su mayoría activando la vía de señalización de

ERK1/2. Asimismo, el incremento en la actividad de la vía vendría dado también por las mutaciones en Ras y Raf mencionadas anteriormente (Dhomen y Marais, 2007).

En condiciones fisiológicas, la progresión a través del ciclo celular está estrictamente controlada por una familia de quinasas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La activación de Ras y Raf puede llevar, a través de diferentes vías, a la detención del ciclo celular en lugar de activar la proliferación, a través de un incremento en los niveles de los inhibidores de ciclo celular como p16Ink4a, p14arf o p15Ink4b. En los procesos tumorales, no obstante, este sistema de protección se pierde con frecuencia, llevando a la proliferación descontrolada (Smalley, 2003; Platz *et al.*, 2008).

Las mutaciones en RAS no son frecuentes en el melanoma (tan sólo un 15% de los casos), siendo NRAS la isoforma más frecuentemente mutada y raras las mutaciones en KRAS o HRAS (Chin *et al.*, 2006). Las alteraciones más frecuentes se dan en el codón 61, siendo las mutaciones más comunes Q61R y Q61K (substitución de glutamina por arginina o lisina, respectivamente).

En el caso de RAF, en cambio, se han encontrado mutaciones en BRAF en un 50-70% de los melanomas malignos (Goydos *et al.*, 2005), lo que lo convierte en el tipo de tumor con mayor tasa de mutaciones en este gen. La mutación más frecuente (90% de los casos de melanoma) es una substitución en el codón 600 de una valina por glutamato (V600E). Esta mutación confiere a BRAF una actividad quinasa 10 veces mayor que BRAF *wild type* (Fecher *et al.*, 2008). Está descrito que esta mutación es suficiente para promover la formación de nevus en un modelo animal (Patton *et al.*, 2005) y podría ser responsable del proceso de desdiferenciación (Rotolo *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la intensidad y el tipo de radiación ultravioleta está relacionado con la naturaleza de las mutaciones somáticas en el melanoma. Así, la mayor incidencia de mutaciones en BRAF se encuentra en melanomas de regiones expuestas al sol de forma intermitente.

Aparte de las mutaciones, existen otros mecanismos capaces de incrementar la actividad Ras/Raf, como el incremento de la unión de Ras a los RTKs, sobreexpresión de RAS *wild type*, expresión constitutiva de factores de crecimiento, incremento en la expresión de receptores de factores de crecimiento o disminución de la expresión de reguladores negativos de ERK.

La vía de las ERK1/2 es precisamente una de las dianas terapéuticas en el melanoma. El objetivo principal ha sido BRAF, utilizando agentes como el sorafenib (inhibidor múltiple de tirosinas quinasa), RAF-265 (inhibidor de la vía en líneas con

mutaciones en BRAF o NRAS) o el PLX4032 (inhibidor específico de BRAF mutado) (Wong, 2009).

La vía ERK1/2 presenta interacciones con muchas otras vías de señalización. Zheng y colaboradores han observado una relación entre BRAF y la vía LKB1-AMPK en cuanto a la capacidad de supervivencia de ciertas líneas de melanoma. Esta vía está implicada en la respuesta a estrés energético, provocando una parada del ciclo celular cuando los niveles de AMP son altos. Al estudiar este sistema se observó que en las líneas de melanoma que presentaban la mutación BRAF V600E los niveles de fosforilación de AMPK (y por tanto el grado de activación de la vía) eran bajos tras estimular las células con un agente mimético del AMP, mientras que la respuesta es normal en las líneas que no presentan la mutación. Esta podría ser un vía a través de las cuales BRAF V600E produce un aumento de la proliferación celular, además de la estimulación directa a través de MEK-ERK (Zheng *et al.*, 2009).

Materiales y métodos

1. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo son líneas celulares de melanoma humano, las cuales presentan diferentes grados de diferenciación.

- SK-mel-131, presenta un estado de diferenciación temprano
- MeWo, presenta un estado de diferenciación tardío
- Con anterioridad a este trabajo, la línea MeWo fue transducida en nuestro laboratorio mediante vectores retrovirales con la isoforma V3 de versicano, dando lugar a la línea MeWo LV3SN (de aquí en adelante MeWo V3). Como control se transdujo la misma línea con el vector retroviral vacío, obteniéndose la línea MeWo LXSN (de aquí en adelante MeWo LX; Serra *et al.*, 2005).

La línea celular SK-mel-131 fue amablemente cedida por el Dr. Houghton, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA. La línea celular MeWo fue amablemente cedida por el Dr. F. X. Real, IMIM, Barcelona.

Gracias a una colaboración con la Unidad de Genética del Hospital Clínic de Barcelona se realizó un análisis citogenético de estas dos líneas celulares con el fin de determinar la presencia de ciertas mutaciones. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 2. Resultados de los análisis citogenéticos de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo (* Mutación silenciosa).

Línea celular	Grado de diferenciación	B-RAF	N-RAS	APC exón 15
SK-mel-131	Temprano	V600E	<i>Wild-type</i>	T1493T / G1678E (Hetero) *
MeWo	Tardío	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	T1493T / G1678E (Hetero) *

La manipulación de las diferentes líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo para evitar cualquier tipo de contaminación. El cultivo de las líneas se llevó a cabo en un incubador a 37°C, en atmósfera humidificada y en presencia de un 5% de CO₂.

El medio de cultivo utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), 100 U/ml de penicilina; 0,1 mg/ml de estreptomycin y 1% de glutamina.

2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron los descritos en la tabla siguiente.

Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-CD44	WB: 1/10 ICQ: 1/100	Clon 156-3C11 cedido por el Dr. Vilella (Hospital Clínic, Barcelona)
Anti-versicano	WB: 1/100 ICQ: 1/50	Obtenido en nuestro laboratorio (Touab <i>et al.</i> , 2002)
Anti-fosfoMAPK p42/p44	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology
Anti-MAPK p42	WB: 1 µg/ml	Cedido por el Dr. Néstor Gómez (UAB, Barcelona)
Anti-fosfo p38	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology
Anti-p38	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology
Anti-β-actina	WB: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology

3. CLONACIÓN DE LOS siRNAs CONTRA CD44 Y VERSICANO

Con el fin de inhibir la expresión de CD44 en las líneas SK-mel-131 y MeWo y de las isoformas V0 y V1 de versicano en la línea SK-mel-131, se utilizó la técnica del RNA de interferencia. Los oligonucleótidos utilizados en el caso de CD44, basados en aquellos descritos en Tzircotis *et al.* (2005), fueron: 5' - GATCCCCGTATGACACAT ATTGCTTCTTCAAGAGAGAAGCAATATGTGTCATACTTTTTTA - 3' y 5' - AGCTTAAAAAGT ATGACACATATTGCTTCTCTCTTGAAGAAGCAATATGTGTCATACGGG - 3'. En el caso de versicano los oligonucleótidos se diseñaron mediante el servicio ofrecido por la casa comercial Sigma-Aldrich y fueron: 5' - GATCCCCGGAAGTACAGGTACGGCTTCTTTCAA GAGAAGAAGCCGTACCTGTAGTTCCTTTTTTA - 3' y 5' - AGCTTAAAAAGGAACTACAGGTAC GGCTTCTTCTCTTGAAGAAGCCGTACCTGTAGTTCGGG - 3'.

Los dos pares de oligonucleótidos fueron hibridados en buffer M (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) incubando durante 4 minutos a 95°C y disminuyendo gradualmente la temperatura hasta temperatura ambiente. Posteriormente, las secuencias de doble cadena resultantes fueron fosforiladas y clonadas en el plásmido pSUPERIOR.neo+gfp y pSUPERIOR.puro (OligoEngine, Seattle, WA, USA) en el caso de CD44 o bien en el plásmido pSUPERIOR.puro en el caso de versicano, previamente digeridos con los enzimas BgIII y HindIII, defosforilados y purificados. Las ligaciones se comprobaron por digestión con los enzimas EcoRI y HindIII y posterior secuenciación de las construcciones.

4. TRANSFECCIÓN ESTABLE Y SELECCIÓN DE CLONES

La presencia de genes de resistencia a antibióticos en los plásmidos utilizados para clonar las secuencias correspondientes a los dos siRNAs permitió una transfección estable de las líneas. Como vehículo de transfección se utilizó el reactivo Lipofectamine-Reagent PLUS (Invitrogen Life Technologies). Las células, en estado de subconfluencia, fueron transfectadas con 1 mg del plásmido correspondiente, según el protocolo de la casa comercial (ver apartado correspondiente en *Anexo*). Pasadas 48 horas, se añadió el antibiótico correspondiente a las células transfectadas (ver anexo) así como a células sin transfectar como control. Las células que incorporan el plásmido crecen en forma de pequeñas colonias, de manera que cada colonia corresponde a un clon. De cada transfección se seleccionó una serie de clones que fueron crecidos para posteriormente realizar un *screening* con el fin de seleccionar aquellos en los que la expresión de la proteína presentaba una mayor inhibición.

5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

· Extracción de proteína de membrana: las células, sembradas en placas de 10 centímetros y en estado de subconfluencia, fueron lavadas con PBS e incubadas durante 5 minutos en 150 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Las células se separaron de la placa por acción mecánica, se recogieron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, los pellets obtenidos se disolvieron en 100 µl de buffer de lisis (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% Nonidet P 40; 0,2 mM PMSF; 0,1% β-mercaptoetanol; 0,5 mM benzamidina) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo.

En el caso de las extracciones de membrana para realizar el ensayo de actividad hialuronidasa, la lisis se realizó con un buffer que no contenía los diferentes inhibidores de proteasas (PMSF, β-mercaptoetanol y benzamidina).

· Extracción de proteína fosforilada: las células, en placas de 10 centímetros y en estado de subconfluencia, se recogieron en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. Tras descartar el sobrenadante, los pellets se disolvieron en 100 µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,27 M sacarosa, 1 mM

EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₄, 10 mM β-glicerolfosfato sódico, 50 mM NaF, 5 mM pirofosfato sódico, 1% Triton X 100; 0,2 mM PMSF; 0,1% β-mercaptoetanol; 0,5 mM benzamidina) y se incubaron durante 15 minutos en agitación. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

· Obtención de medio condicionado: las células, en placas de 10 centímetros y en estado de subconfluencia, fueron lavadas 3 veces con PBS y se añadieron a la placa 5 ml de medio DMEM sin FCS. Al cabo de 24 horas se recogieron los medios y se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (1 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidina). En el caso de los medios condicionados para el ensayo de zimografía se congelaron sin añadir los inhibidores de proteasas.

6. INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT

Los medios condicionados o extractos celulares (40 µg de proteína por pozo) fueron separados en geles de poliacrilamida (6 o 10%) en presencia de SDS. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore), la cual fue posteriormente bloqueada con una solución de TBS + 0,05% Tween-20 (TBS-T) más un 5% de leche descremada en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T + 5% leche durante 16 horas a 4°C, en agitación constante.

Tras realizar varios lavados de la membrana con TBS-T (3 rápidos, 2 de 5 minutos y 1 de 15 minutos), ésta se incubó con una dilución del anticuerpo secundario correspondiente, 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó de nuevo la misma serie de lavados a la membrana, que fue revelada con el kit ECL-Plus (GE Healthcare) según el protocolo de la casa comercial. La señal fue detectada en un luminómetro Fuji LAS3000 (Fujifilm).

7. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos redondos colocados en placas de 24 pozos (5·10⁴ células por pozo en el caso de la línea celular SK-mel-131 y 10⁵ células por pozo en el caso de la línea celular MeWo) y, tras una incubación de 16 horas para permitir su adhesión, fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución de

3% paraformaldehído (PFA) + 2% sacarosa en PBS durante 15 minutos a 37°C. Las muestras fueron nuevamente lavadas con PBS y, en caso de ser necesario, permeabilizadas con una solución de Tritón® X 100 (Panreac) al 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó el bloqueo con 1% BSA + 0,02% *normal goat serum* en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y, tras eliminar la solución de bloqueo, la incubación con el anticuerpo primario en PBS durante 16 horas a 4°C.

Las muestras se lavaron con PBS y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo y se incubaron con una solución 100 µg/ml de bisBenzimide trihydrochloride (Hoechst 33342) en PBS para la tinción nuclear. Tras lavar de nuevo las muestras con PBS estas fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc) y analizadas en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800).

8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para realizar los ensayos de proliferación, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pozo en placas de 6 pozos (10 pozos por cada línea). Cada 24 horas, durante 5 días, se recogieron las células de 2 pozos en un volumen conocido, se realizó una dilución 1/5 en azul de tripano (0,1% azul de tripano en PBS) y se determinó el número de células por recuento en cámara de Neubauer.

9. ENSAYO DE ADHESIÓN

Los ensayos de adhesión se realizaron en placas de 96 pozos previamente recubiertos con diluciones de los diferentes sustratos a analizar:

- Colágeno tipo I: 10 µg/ml
- Laminina: 10 µg/ml
- Fibronectina: 10 µg/ml
- Vitronectina: 5 µg/ml
- Ácido hialurónico: 5 mg/ml
- PBS (control)

Los pozos fueron recubiertos con 100 µl de la solución correspondiente (3 pozos de cada solución por cada línea celular a analizar) y la placa se incubó durante 16 horas en campana de flujo. Pasado el tiempo de incubación, los pozos fueron

lavados con PBS y bloqueados con una solución de BSA al 0,1% en PBS durante 1 hora (excepto en el caso del ácido hialurónico). Seguidamente se eliminó la solución de bloqueo, se sembraron las células por triplicado a una concentración de $4 \cdot 10^4$ células por pozo en un volumen final de 50 μ l de DMEM sin FCS + 1% BSA y se incubó la placa durante 2 horas a 37°C (16 horas para la adhesión sobre ácido hialurónico). Las células no adheridas se eliminaron por inversión de la placa y se realizaron 2 lavados con PBS. Las células adheridas a la placa fueron fijadas con una solución al 4% de PFA en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar los pozos 2 veces con agua destilada, las células se tiñeron con una solución al 0,1% de cristal violeta en agua destilada (50 μ l por pozo) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo con agua destilada y se dejó secar la placa a 37°C. Una vez seca, se añadieron 50 μ l de HCl 0,1M a cada pozo y se determinó la absorbancia a 620 nm.

10. ENSAYO DE MIGRACIÓN EN PLACA

Para realizar estos ensayos de migración (tipo *wound healing*), se sembraron las células en placas de 3,5 cm y se dejaron crecer hasta llegar a confluencia. Una vez en este estado, mediante una punta de pipeta, se realizó una incisión en la placa de manera que quedara un espacio libre de células en el cual éstas pudieran migrar. En el momento de realizar la incisión y cada 24 horas las células se observaron al microscopio con el fin de analizar su capacidad de migración.

11. ENSAYO DE INVASIÓN EN *TRANSWELLS*

Para realizar los ensayos de invasión en *Transwells* (diámetro de membrana = 6,5 mm; diámetro de poro = 8 μ m, Costar), estos se recubrieron por la parte superior e inferior con 150 μ l del sustrato a analizar (colágeno, 100 μ g/ml; ácido hialurónico, 1,5 mg/ml) y se dejaron secar durante toda la noche en la campana de flujo. Pasado este tiempo el recubrimiento se rehidrató con 250 μ l de PBS en el interior del *Transwell* y 500 μ l en la parte inferior durante 2 horas en el incubador. Seguidamente, tras aspirar el PBS de los *Transwells* y los pozos, se sembraron $2 \cdot 10^5$ células por *Transwell* en 150 μ l de DMEM sin FCS + 0,1% BSA. En la parte inferior de los *Transwells* se añadieron 600 μ l de DMEM + 10% FCS como factor de migración excepto en los controles negativos, a los que se añadieron 600 μ l de DMEM sin FCS + 0,1% BSA, y las células se incubaron durante 6 horas (SK-mel-131) o 16 horas (MeWo)

para permitir la invasión. Pasado el tiempo de incubación se eliminaron las células de la parte superior del *Transwell* mediante bastoncillos de algodón humedecidos en PBS, se lavaron las células adheridas a la parte inferior del *Transwell* y se tiñeron con una solución de cristal violeta (0,1%) y metanol (20%) en PBS durante 10%. Tras varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de solución de tinción los *Transwells* se dejaron secar en la campana de flujo, se recortaron las membranas con la ayuda de un bisturí, se montaron en un portaobjetos de vidrio en medio DPX y se analizaron las muestras en el microscopio.

12. CITOQUÍMICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Con el fin de analizar la presencia y distribución del ácido hialurónico en las diferentes líneas celulares, se sembraron y fijaron las células en cubreobjetos redondos (ver apartado *Inmunocitoquímica de fluorescencia*), se lavaron con PBS y se añadieron a cada muestra 50 μ l de una solución de proteína de unión a ácido hialurónico conjugada a biotina (*biotinylated - Hyaluronan Binding Protein*, b-HABP, Seikagaku) a una concentración de 1 μ g/ml en PBS. Los controles negativos se incubaron con 50 μ l de PBS. Las muestras se incubaron durante 16 horas a 4°C, se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de estreptavidina conjugada a FITC (1/1000 en PBS, Servei de Microscòpia, UAB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron las muestras con PBS, se montaron en medio Vectashield® (Vector Laboratories Inc.) y fueron analizadas en el microscopio confocal Leica TCS SP5 AOBS (Servei de Microscòpia de la UAB).

13. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN MEDIO DE CULTIVO

Los medios condicionados de las líneas celulares a estudiar fueron digeridos con proteasa (Sigma) a una concentración final de 0,1 mg/ml durante 16 horas a 37°C. Tras la digestión, 130 μ l de estos medios se incubaron con 130 μ l de una solución de proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada (b-HABP) a una concentración de 5 μ g/ml en PBS + 10% *calf serum* (CS), durante 5 horas a 4°C. Además de los medios condicionados, se incubaron una serie de soluciones patrón a diferentes concentraciones de ácido hialurónico (50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ng/ml) con la misma solución de b-HABP.

Durante el tiempo de incubación, se recubrieron los pozos necesarios de una placa de 96 pozos (3 pozos por cada medio a analizar más las soluciones patrón) con una solución de ácido hialurónico conjugado a BSA (ver anexo), a una concentración final de 200 µg/ml en PBS, y se incubó la placa durante 2 horas a 4°C. Seguidamente se lavaron los pozos 4 veces con PBS y se realizó el bloqueo con 100 µl por pozo de una solución de CS al 10% en PBS, durante 3 horas a 4°C.

Pasados los tiempos de incubación, se eliminó la solución de bloqueo de los pozos y se añadieron 80 µl de medio o solución patrón a los pozos de la placa (cada muestra por triplicado). La placa se incubó durante 16 horas a 4°C. Tras la incubación se eliminaron los medios de los pozos, se lavaron 4 veces con PBS, se añadieron 80 µl de una solución de estreptavidina-peroxidasa (Sigma) a una concentración de 2 µg/ml en PBS + 10% CS y se incubó la placa durante 1,5 horas a 4°C. Seguidamente los pozos se lavaron 4 veces con PBS, se añadieron a cada pozo 70 µl de una solución al 0,05% de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (AEBT, Sigma) en 30 ml de citrato sódico 0,1 M (pH 4,2) + 30 µl H₂O₂ y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia de las muestras a 405 nm.

14. ENSAYO DE ACTIVIDAD HIALURONIDASA

Para determinar la actividad hialuronidasa total de las diferentes líneas celulares, se realizaron extracciones de membrana tal y como está descrito en el apartado correspondiente.

Para realizar el ensayo, se recubrieron los pozos necesarios de una placa de 96 pozos durante 2 horas con una solución de ácido hialurónico conjugado a BSA (ver anexo). Pasado este tiempo se lavaron los pozos y se añadieron 20 µg de proteína por pozo en *buffer* de hialuronidasa (0,1 formato sódico; 0,15 NaCl; 0,02% BSA, pH 4), en un volumen final de 80 µl por pozo. Como control se utilizaron diferentes diluciones de hialuronidasa (de *Streptomyces hyalurolyticus*, Sigma) a 0,01; 0,1 y 1 unidad/ml. Las muestras se incubaron durante 16 horas a 37°C.

Pasado este tiempo, se lavaron los pozos con PBS, se realizó el bloqueo durante 3 horas con una solución de CS al 10% en PBS y se añadieron a cada pozo 40 µl de una solución de b-HABP 1 µg/ml en PBS + 10% CS. Las muestras se incubaron durante 16 horas a 4°C.

Tras la incubación se eliminaron los medios de los pozos, se lavaron con PBS, se añadieron 80 µl de una solución de estreptavidina-peroxidasa a una concentración

de 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS + 10% CS y se incubó la placa durante 1,5 horas a 4°C. A continuación los pozos se lavaron 4 veces con PBS, se añadieron a cada pozo 70 μl de una solución al 0,05% de AEBT en 30 ml de citrato sódico 0,1 M (pH 4,2) + 30 μl H_2O_2 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido se determinó la absorbancia de las muestras a 405 nm.

15. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Antes de realizar el ensayo, se preparó un conjugado de ácido hialurónico (HA) a isotiocianato de fluoresceína (FITC), evitando en todo momento el contacto con la luz. Para ello, 50 mg de ácido hialurónico de elevado peso molecular (Sigma) se disolvieron en 40 ml de agua destilada + 20 ml de DMSO (Sigma). Una vez disuelto se añadieron 25 mg de fluoresceinamina (Sigma) en 0,5 ml de DMSO + 25 μl acetaldehído + 25 μl ciclohexil isocianida. Se ajustó el pH a 4,5 y se incubó durante 5 horas a temperatura ambiente. El conjugado HA-FITC se precipitó *overnight* en 70% de etanol a -20°C. La precipitación se repitió 2 veces más en las mismas condiciones. El volumen final se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm y el pellet se resuspendió en PBS a una concentración final de 5 mg/ml.

Para realizar el ensayo, se sembraron células en las mismas condiciones que en el caso de la inmunocitoquímica. Pasadas 24 horas, se añadió hialuronidasa a los cultivos a una concentración final de 2 U/ μl y se incubó durante 16 horas. Seguidamente, se lavaron las células con PBS, se añadió el conjugado HA-FITC a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ en DMEM sin FCS y se incubaron las células en dos condiciones:

- 1 hora a 4°C, para observar la unión del conjugado a la membrana
- 5 horas a 37°C, para observar la internalización del complejo

Una vez finalizados los tiempos de incubación, las células se lavaron 3-4 veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. A continuación se realizaron 2 lavados de 5 minutos de las muestras y se montaron sobre portaobjetos de vidrio en medio Vectashield.

El análisis de las muestras se realizó en un microscopio confocal Leica TCS SP5 AOBS (Servei de Microscòpia de la UAB). Se tomaron fotografías de las muestras en diferentes planos para poder realizar posteriormente una reconstrucción tridimensional de las mismas y poder así determinar con mayor exactitud la

localización del ácido hialurónico en las células mediante el programa informático IMARIS.

16. ZIMOGRFÍA

Con el fin de analizar la actividad gelatinolítica de las diferentes líneas celulares, se recogieron medios condicionados sin FCS provenientes de cultivos de células en estado de subconfluencia (los medios estuvieron en contacto con las células durante 24 horas). 20 μ l de estos medios fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida (7,5%) en presencia de SDS y de un 0,1% de gelatina. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 45 minutos del gel en *rinsing buffer* (2,5% Triton X-100 en 50 mM Tris-HCl pH 7,5), se lavó el gel con agua destilada para eliminar los restos del tampón y se incubó durante 20 horas a 37°C en *incubation buffer* (50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl y 10 mM CaCl₂, pH 7,5).

Tras la incubación el gel fue lavado con agua destilada y teñido con una solución de azul de Coomassie al 0,2% en 10% isopropanol + 10% ácido acético glacial durante 10 minutos. El exceso de azul de Coomassie se eliminó con una solución de isopropanol y ácido acético, ambos al 10%. La actividad gelatinolítica de las muestras se reflejó en forma de bandas no teñidas en el gel.

Resultados

1. Transfección estable de las líneas celulares de melanoma humano

Con el fin de inhibir la expresión de CD44 o versicano mediante la técnica del RNA de interferencia se clonaron las secuencias correspondientes a los dos siRNAs en los plásmidos pSUPERIOR.neo+gfp y/o pSUPERIOR.puro, tal y como está descrito en el apartado *Materiales y métodos*. El silenciamiento de la expresión de versicano se realizó con un siRNA dirigido contra el subdominio GAG β , el cual está presente en las dos isoformas (V0 y V1) expresadas en la línea SK-mel-131. La correcta clonación de las secuencias se comprobó por digestión y posterior secuenciación de las construcciones.

Las construcciones que habían incorporado el inserto de manera correcta fueron transfectadas en las líneas correspondientes, utilizando en cada caso como control el mismo plásmido vacío. Las líneas celulares obtenidas fueron las descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Líneas obtenidas por transfección con RNA de interferencia. En cada caso se indica contra qué molécula va dirigido el siRNA así como el plásmido en que está clonado.

Línea celular	siRNA	Plásmido
SK-mel-131 pSNG	-	pSUPERIOR.neo+gfp
SK-mel-131 siCD44	CD44	pSUPERIOR.neo+gfp
MeWo pSNG	-	pSUPERIOR.neo+gfp
MeWo siCD44	CD44	pSUPERIOR.neo+gfp
MeWo LX pSp	-	pSUPERIOR.puro
MeWo LX siCD44	CD44	pSUPERIOR.puro
MeWo V3 pSp	-	pSUPERIOR.puro
MeWo V3 siCD44	CD44	pSUPERIOR.puro
SK-mel-131 pSp	-	pSUPERIOR.puro
SK-mel-131 siGAGb	Versicano	pSUPERIOR.puro

Con el fin de comprobar si los siRNAs inhiben de forma eficaz la expresión de las moléculas contra las que van dirigidas, se realizó un análisis mediante *western blot* de extractos de membrana, en el caso de CD44, o medios condicionados, en el caso de versicano. Tal y como se muestra en la figura 12, la inhibición se consiguió de forma correcta, siendo prácticamente completa en la mayoría de los casos.

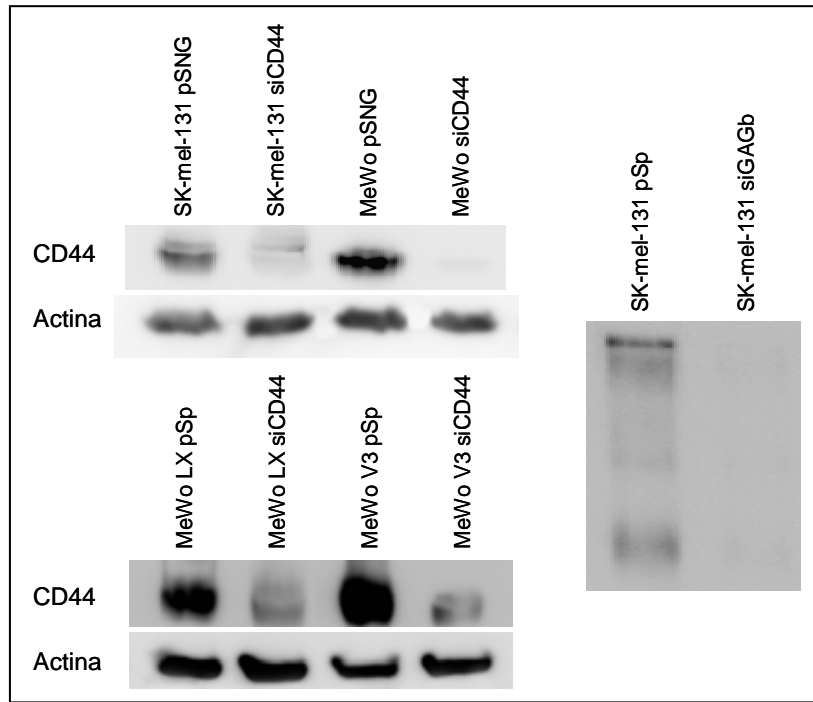


Figura 12. Análisis por *western blot* de la expresión de CD44 (paneles a la izquierda) y versicano (panel a la derecha) en las líneas transfectadas de forma estable con los correspondientes siRNAs

Para corroborar el resultado obtenido mediante el análisis por *western blot*, se realizó un segundo análisis por inmunocitoquímica de fluorescencia, utilizando los mismos anticuerpos que en el caso del *western blot*.

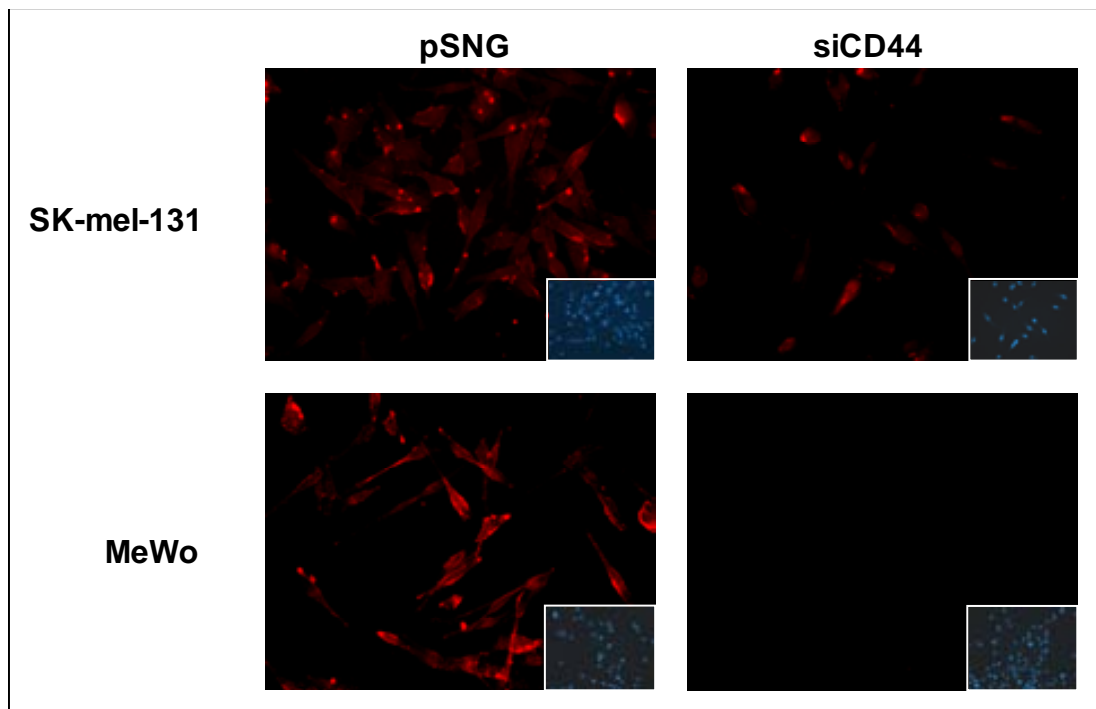


Figura 13. Análisis de la expresión de CD44 por inmunocitoquímica de fluorescencia de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles

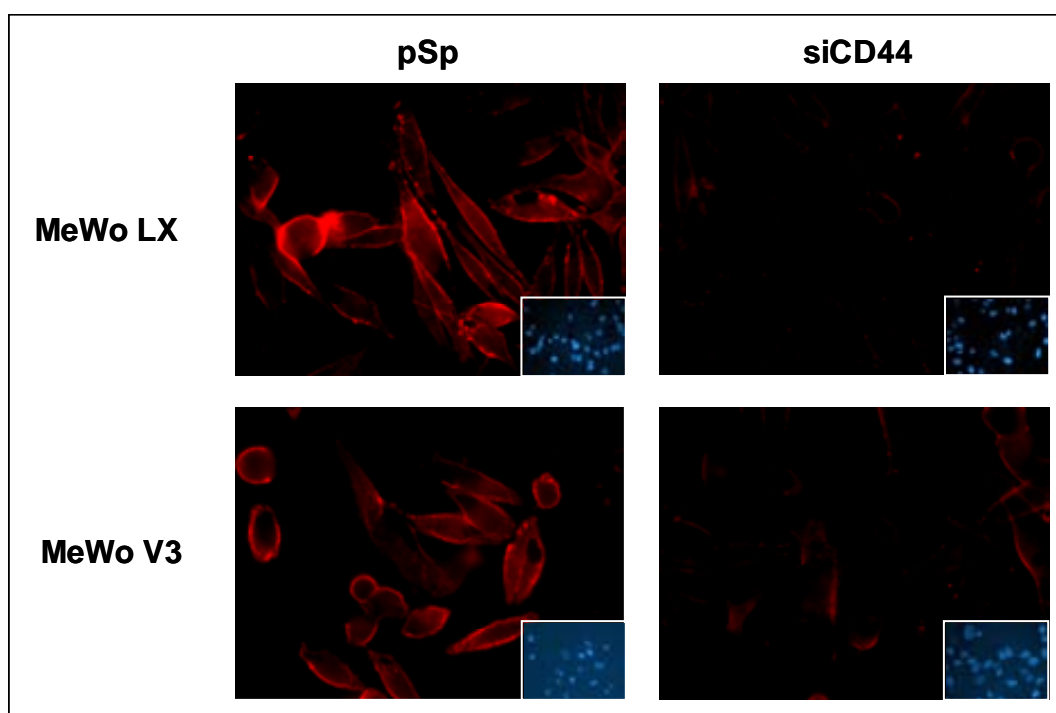


Figura 14. Análisis de la expresión de CD44 por inmunocitoquímica de fluorescencia de las líneas celulares MeWo LX y MeWo V3 transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles

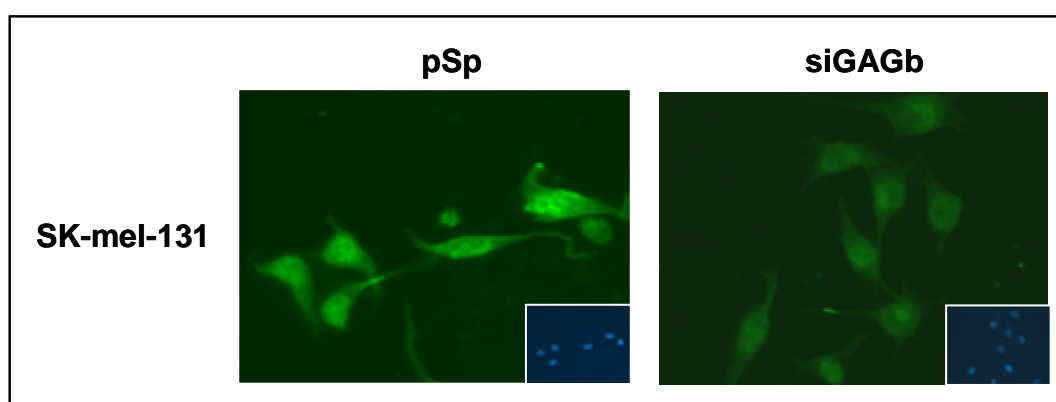


Figura 15. Análisis de la expresión de versicano por inmunocitoquímica de fluorescencia de la línea celular SK-mel-131 transfectada con el siRNA contra versicano y su respectivo control

Como se puede observar en las figuras anteriores, las líneas celulares transfectadas con el siRNA contra CD44 o bien contra versicano presentan una inhibición de la expresión de la proteína correspondiente, acorde con el resultado obtenido en el análisis mediante *western blot*. En el caso del silenciamiento de versicano, a pesar de observarse señal en el análisis por inmunocitoquímica, el análisis por *western blot* muestra que la presencia de versicano en el medio extracelular es prácticamente indetectable.

2. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131 Y MeWo TRAS LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD44

Tal y como se ha descrito en el apartado de antecedentes y objetivos, la expresión de la isoforma V3 de versicano en diferentes líneas de melanoma humano produjo efectos a nivel de proliferación, adhesión y migración celular. Los experimentos realizados parecían indicar que estos cambios fenotípicos podrían deberse, al menos en parte, a la interacción de esta isoforma de versicano con el receptor de membrana CD44, probablemente de forma indirecta a través del ácido hialurónico. La primera parte de este trabajo consistió, pues, en el análisis fenotípico de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo una vez silenciada la expresión de CD44 con el fin de estudiar si los efectos de la supresión de CD44 eran similares a los provocados por la expresión del versicano V3. Esto apoyaría la hipótesis de que ambas moléculas actúan por mecanismos similares.

2.1. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de proliferación celular

Dado que la expresión de la isoforma V3 de versicano en líneas de melanoma humano produjo una disminución en la capacidad de proliferación celular, se estudió cuál era el efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en esta capacidad proliferativa. Para ello, se sembraron células de las cuatro líneas a analizar en placas de 6 pozos y se realizó un recuento de estas cada 24 horas durante 5 días. Los resultados se muestran en la figura 16.

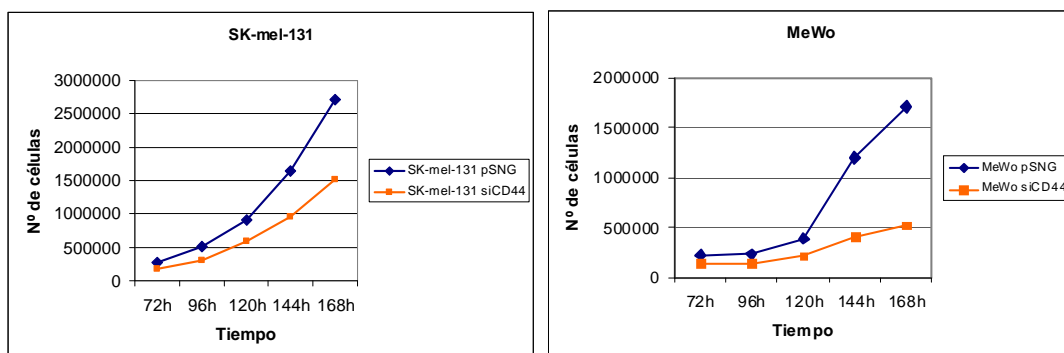


Figura 16. Análisis de la capacidad de proliferación de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pozo en placas de 6 pozos (2 pozos por cada punto) y se realizó un recuento de las mismas a los tiempos indicados en los gráficos. Se muestran resultados representativos (n=4)

Como se puede observar en la figura, la inhibición de la expresión de CD44 produjo una disminución de la capacidad proliferativa en ambas líneas celulares, siendo este descenso más acusado en el caso de la línea celular MeWo. Este resultado se corresponde con aquellos obtenidos en los experimentos realizados con las líneas celulares transducidas con la isoforma V3 de versicano, indicando que este efecto podría ser mediado a través de CD44.

2.2. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de adhesión celular

Otro aspecto de la fisiología celular que tiene gran importancia tanto en el melanoma como en el resto de procesos tumorales es la capacidad de adhesión celular a diferentes sustratos. El análisis de esta capacidad en las líneas celulares transducidas con la isoforma V3 de versicano no mostró una implicación de esta molécula en el proceso de adhesión (ver apartado 3.2), ya que no se observaron diferencias significativas entre las líneas transducidas y los respectivos controles.

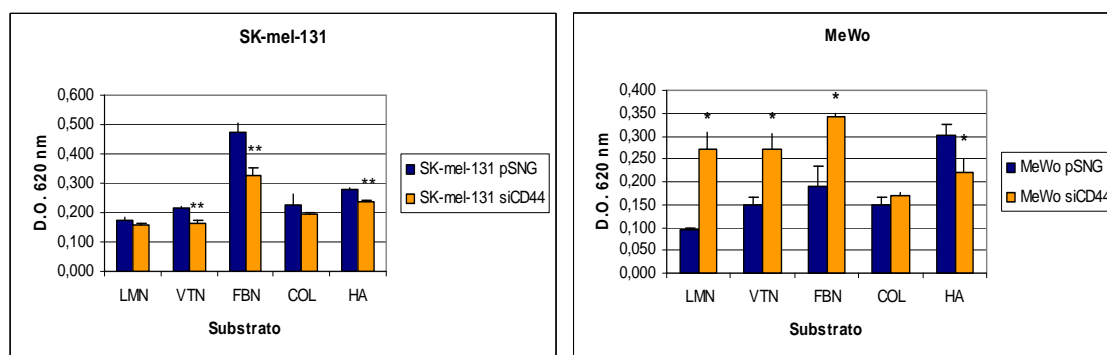


Figura 17. Análisis de la capacidad de adhesión de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Se recubrieron pozos de una placa de 96 con los diferentes sustratos a analizar (LMN = laminina, 10 $\mu\text{g/ml}$; VTN = vitronectina, 5 $\mu\text{g/ml}$; FBN = fibronectina, 10 $\mu\text{g/ml}$; COL = colágeno tipo I, 10 $\mu\text{g/ml}$; HA = ácido hialurónico, 5 mg/ml), se sembraron $4 \cdot 10^4$ células por pozo y se incubó durante 2 horas a 37°C (16h para HA). Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Se muestran resultados representativos ($n=3$)

No obstante, cuando se realizó el ensayo de adhesión sobre los mismos sustratos (vitronectina, laminina, fibronectina, colágeno tipo I y ácido hialurónico) con las líneas que no expresan CD44 se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la capacidad de adhesión de la línea celular MeWo siCD44 respecto a su control MeWo pSNG, presentando la primera una mayor capacidad de adhesión a los sustratos estudiados excepto sobre colágeno, donde no se observaron diferencias, y sobre ácido hialurónico, donde la línea MeWo siCD44 presentó una menor capacidad

de adhesión. En el caso de la línea celular SK-mel-131 se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el ensayo sobre vitronectina, fibronectina y ácido hialurónico, siendo en estos casos menor la capacidad de adhesión en la línea celular SK-mel-131 siCD44 (Figura 17).

2.3. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo *wound healing*

Con el fin de estudiar la influencia de CD44 en la capacidad de migración celular se realizó un ensayo de tipo *wound healing*, tal y como se describe en el apartado de *Materiales y métodos*.

Para ello, se hicieron crecer las células hasta confluencia para seguidamente practicar una incisión con una punta de pipeta. Posteriormente se tomaron fotografías de las placas en un microscopio Nikon Eclipse E800 a diferentes tiempos con el fin de observar cómo las células iban recubriendo el espacio libre. Las figuras 18 y 19 muestran cómo las líneas celulares donde está inhibida la expresión de CD44 presentan una menor capacidad de migración que los respectivos controles. Este efecto es más acusado en el caso de la línea celular MeWo.

Este resultado está en concordancia con los obtenidos en el caso de las líneas transducidas con la isoforma V3 de versicano, las cuales también presentaban una menor capacidad de migración en comparación con sus respectivos controles.

2.4. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de invasión celular en *Transwells*

Para analizar el efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de invasión, se realizaron ensayos en los que se analizó el paso de las diferentes líneas celulares a través de una membrana porosa (*Transwell*). Los *Transwells* fueron recubiertos con diferentes sustratos (colágeno tipo I y ácido hialurónico), se sembraron las células y se incubaron durante 6 o 16 horas (SK-mel-131 y MeWo, respectivamente). Pasado el tiempo de incubación se eliminaron las células de la parte superior del *Transwell*. Las células adheridas a la parte inferior se fijaron y tiñeron, se recortaron las membranas del *Transwell*, se montaron sobre cubreobjetos y se tomaron fotografías en el microscopio.

De manera similar a los ensayos de migración, las células transfectadas con el siRNA contra CD44 presentaron una menor capacidad de invasión comparadas con sus respectivos controles, tanto en colágeno como en ácido hialurónico (figura 20).

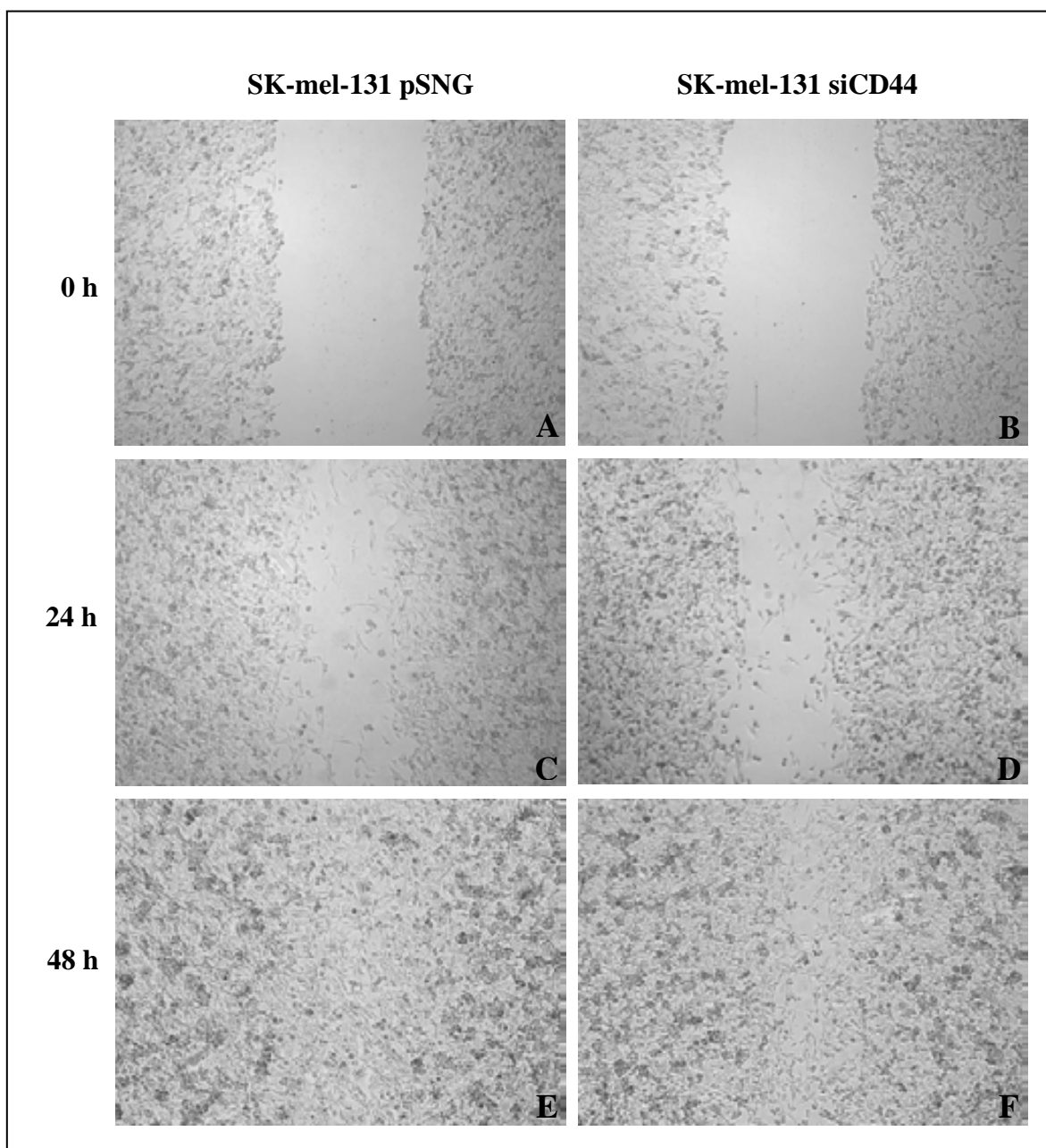


Figura 18. Resultado del ensayo de *wound healing* en las líneas SK-mel-131 pSNG (A, C, E) y SK-mel-131 siCD44 (B, D, F). Las células se sembraron, se dejaron crecer hasta llegar a confluencia, se practicó una incisión en la placa y se dejaron migrar durante 48 horas. Durante este tiempo, se tomaron fotografías en el microscopio a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=4)

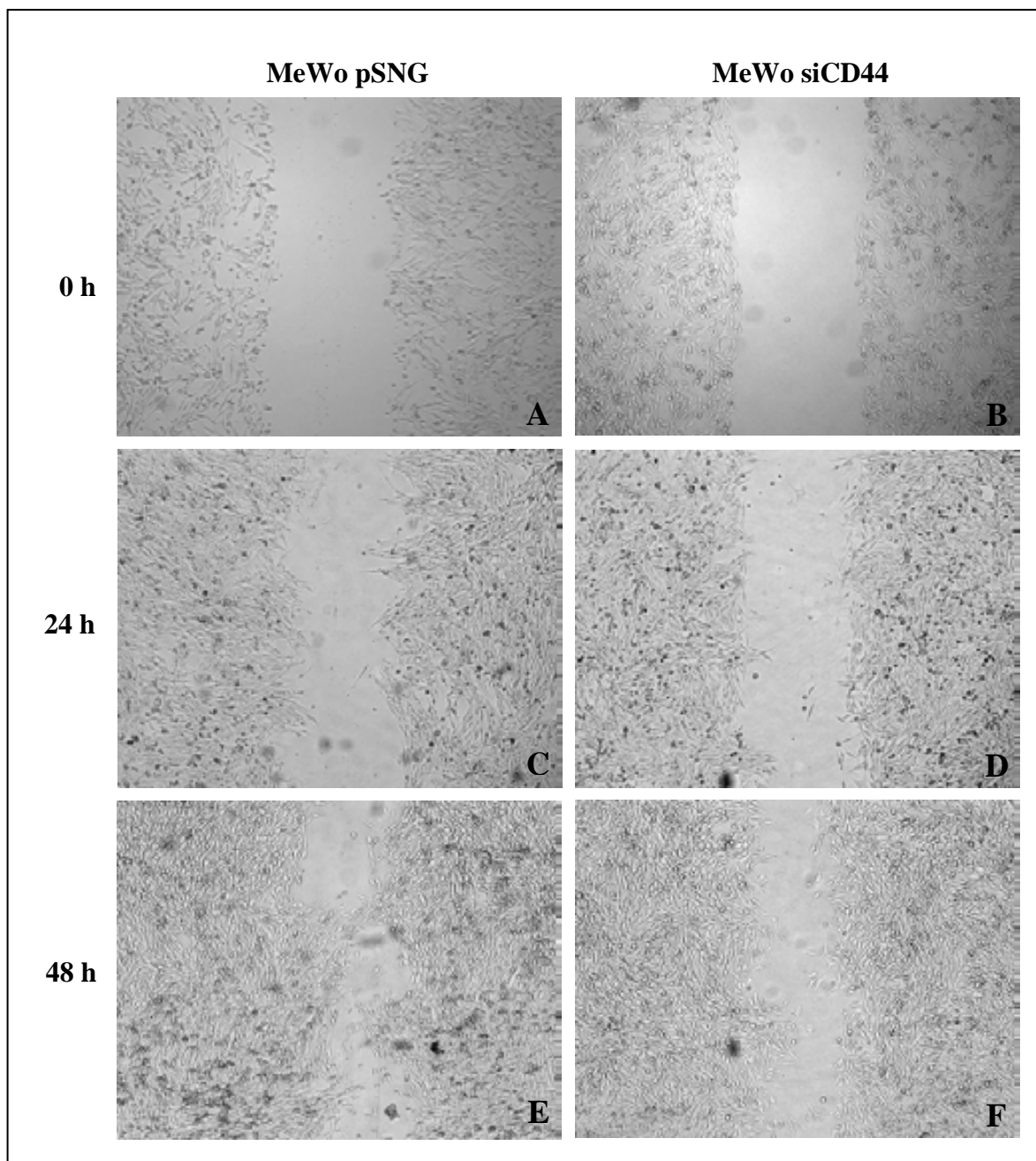


Figura 19. Resultado del ensayo de *wound healing* en las líneas MeWo pSNG (A, C, E) y MeWo siCD44 (B, D, F). Las células se sembraron, se dejaron crecer hasta llegar a confluencia, se practicó una incisión en la placa y se dejaron migrar durante 48 horas. Durante este tiempo, se tomaron fotografías en el microscopio a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=4)

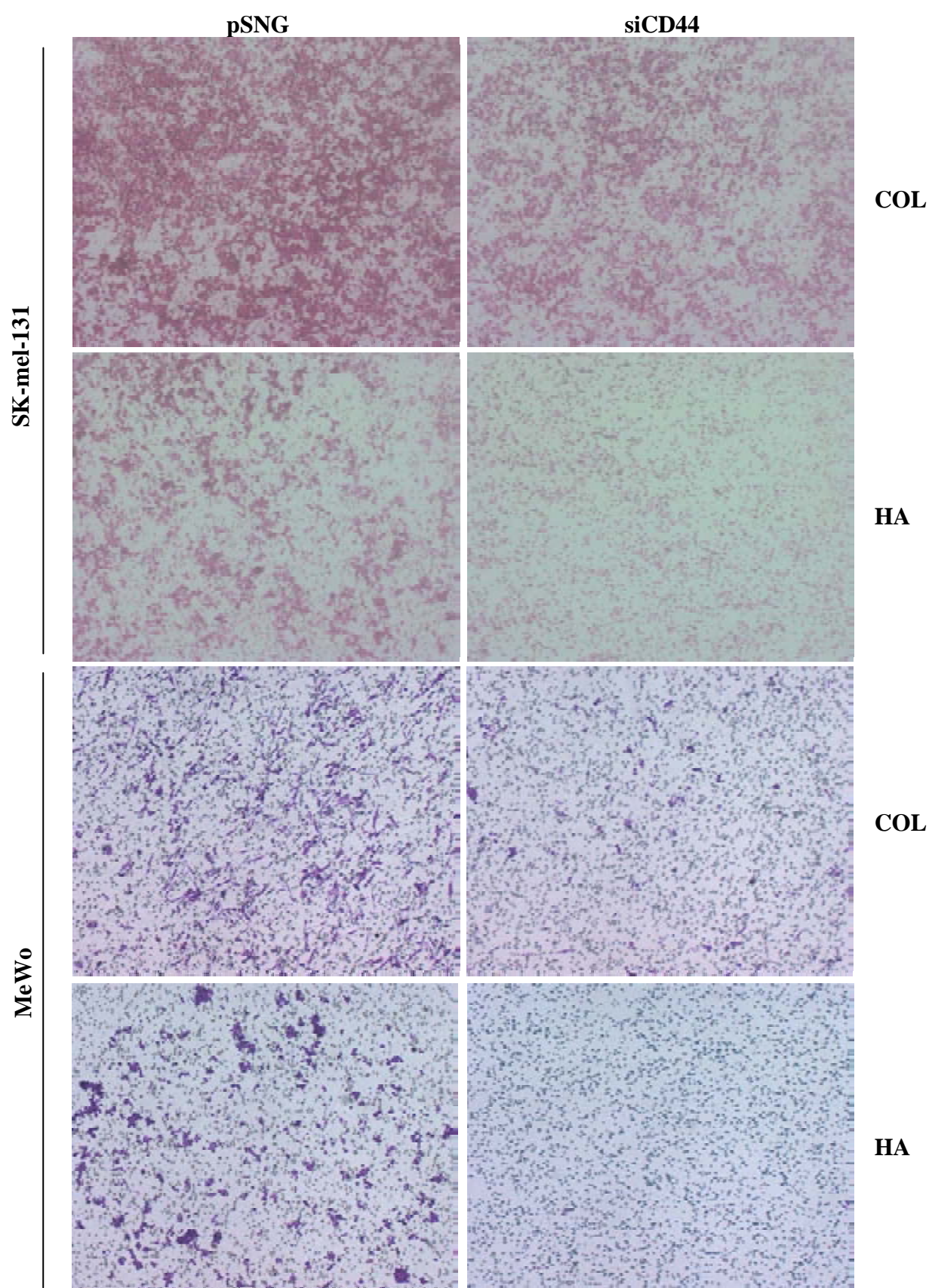


Figura 20. Ensayo de invasión en *Transwell*. Los *Transwells* fueron recubiertos con los diferentes sustratos (COL=colágeno tipo I, 100 μ g/ml; HA=ácido hialurónico, 1,5 mg/ml), se sembraron las células y se incubó durante 6 o 16 horas (SK-mel-131 y MeWo, respectivamente) a 37°C. Posteriormente las células que habían atravesado la membrana se fijaron, se tiñeron y se observaron en el microscopio. Se muestra un resultado representativo (n=3)

2.5. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la activación de las vías MAPK ERK1/2 y p38

Dados los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación y migración, se decidió estudiar la posible implicación de las vías de señalización MAPK ERK1/2 y p38. Está ampliamente descrito en la bibliografía la participación de estas vías en los procesos de proliferación y migración celular, así como la interacción de CD44 con la familia de receptores ErbB. Por ello, las células en cultivo se trataron a diferentes tiempos con 100 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) para iniciar la activación de estas vías. Tras la extracción de proteína con un buffer de lisis que contenía inhibidores de fosfatasa, se examinó el nivel de fosforilación a los diferentes tiempos de tratamiento mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior inmunodetección por *western blot*.

En el caso de la vía ERK1/2, al analizar la línea SK-mel-131 no se observaron diferencias entre la línea que contiene el siRNA contra CD44 y la línea control (figura 21), resultado esperable debido a la mutación que presenta esta línea en BRAF que hace que la vía ERK esté constitutivamente activa (ver apartado *Materiales y métodos*).

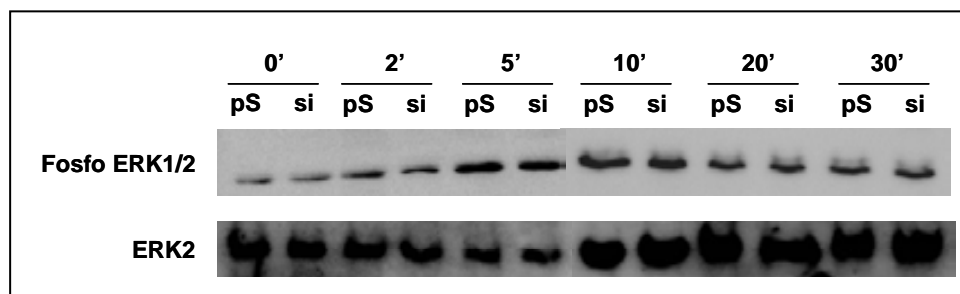


Figura 21. Análisis por *western blot* de la activación de la vía ERK1/2 en las líneas SK-mel-131 pSNG (pS) y SK-mel-131 siCD44 (si). Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con 100 μ g/ml de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

Este resultado se cuantificó analizando mediante densitometría la intensidad de las bandas del *western blot* correspondientes a la proteína fosforilada normalizada respecto al valor de ERK total (figura 22).

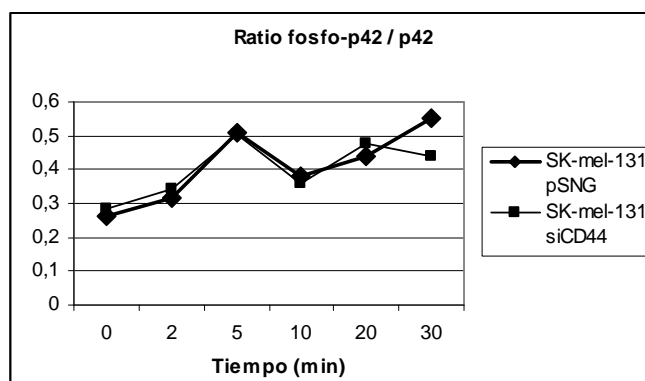


Figura 22. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de ERK1/2 fosforilada y ERK total de las líneas SK-mel-131 pSNG y SK-mel-131 siCD44. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de ERK fosforilada y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de ERK total

La activación de la misma vía en la línea celular MeWo, en cambio, sí difiere entre la línea donde la expresión de CD44 está inhibida y su respectivo control. En este caso, la línea MeWo siCD44 presenta una menor activación de la vía a todos los tiempos de tratamiento (figura 23).

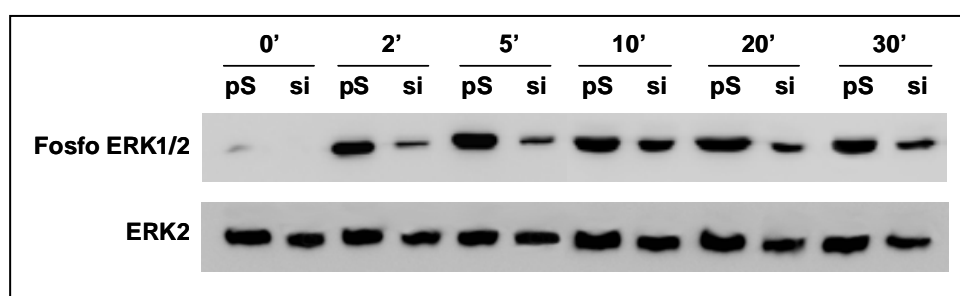


Figura 23. Análisis por *western blot* de la activación de la vía ERK1/2 en las líneas MeWo pSNG (pS) y MeWo siCD44 (si). Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

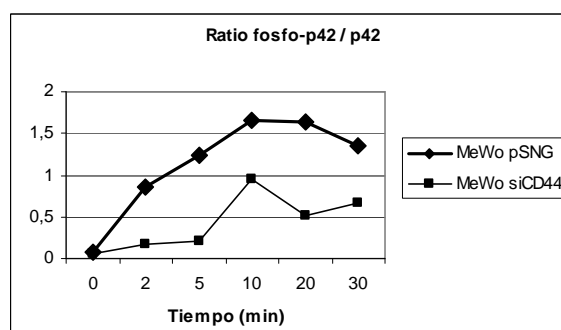


Figura 24. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de ERK1/2 fosforilada y ERK total de las líneas MeWo pSNG y MeWo siCD44. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de ERK fosforilada y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de ERK total

En el caso de p38, se observó un efecto paralelo al obtenido en el análisis de la activación de la vía de ERK1/2: en la línea SK-mel-131, la inhibición de la expresión de CD44 no tuvo ningún efecto en la activación de la vía (figuras 25 y 26), mientras que en la línea MeWo esta inhibición provocó una menor activación de la vía al tratar las células con EGF (figuras 27 y 28).

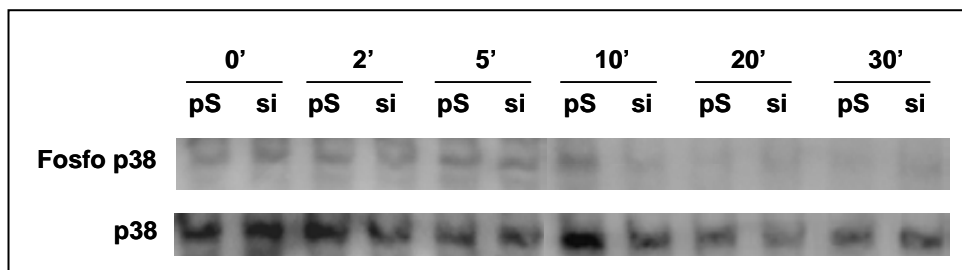


Figura 25. Análisis por *western blot* de la activación de la vía p38 en las líneas SK-mel-131 pSNG (pS) y SK-mel-131 siCD44 (si). Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

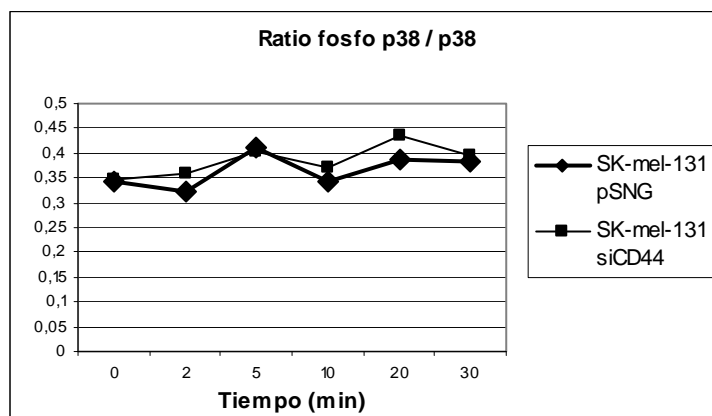


Figura 26. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de p38 fosforilada y p38 total de las líneas SK-mel-131 pSNG y SK-mel-131 siCD44. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de p38 fosforilada y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de p38 total

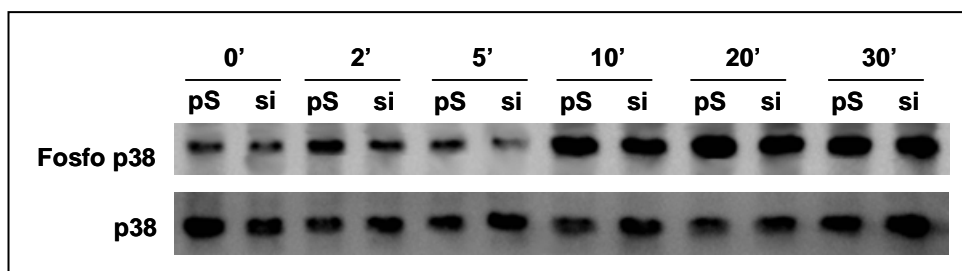


Figura 27. Análisis por *western blot* de la activación de la vía p38 en las líneas MeWo pSNG (pS) y MeWo siCD44 (si). Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

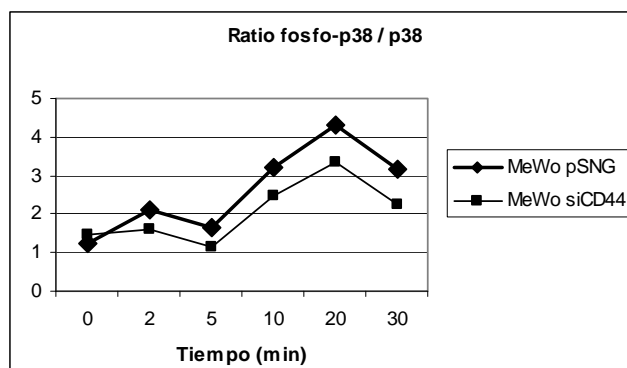


Figura 28. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de p38 fosforilada y p38 total de las líneas MeWo pSNG y MeWo siCD44. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de p38 fosforilada y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de p38 total

2.6. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en el metabolismo del ácido hialurónico

CD44 es el principal receptor de membrana del ácido hialurónico. Por ello, se creyó interesante estudiar los posibles cambios que la inhibición de su expresión producía en el metabolismo de este polisacárido.

2.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados

El primer paso consistió en determinar los niveles de ácido hialurónico en los medios condicionados (provenientes de cultivos subconfluentes) de las diferentes líneas celulares en estudio mediante un ensayo tipo ELISA descrito en el apartado *Materiales y métodos*.

Como se puede observar en la figura siguiente, en el caso de la línea SK-mel-131 no se encontraron diferencias entre la línea control y la que expresa el siRNA contra CD44. No obstante, la línea MeWo transfectada con el siRNA contra CD44 presenta un incremento significativo de aproximadamente tres veces en los niveles de ácido hialurónico en el medio respecto a su control.

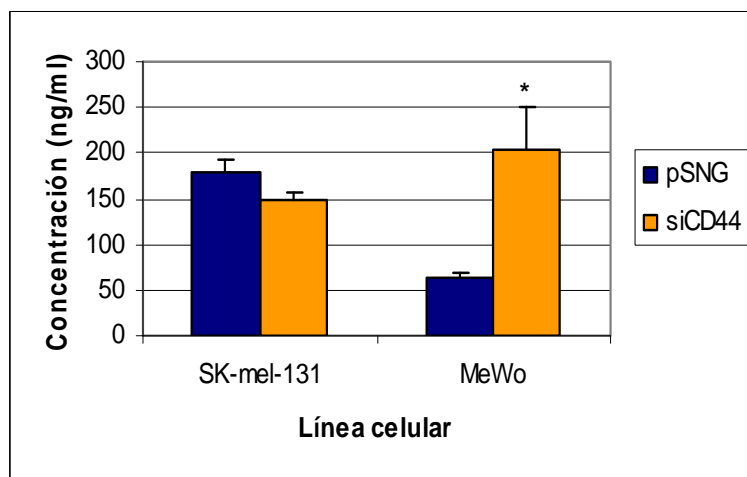


Figura 29. Análisis del contenido de ácido hialurónico de los medios condicionados de las líneas SK-mel-131 y MeWo transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Se sembraron 10^5 células por placa en placas de 3,5 cm y pasadas 24 horas se cambió el medio de cultivo por DMEM sin FCS. Al cabo de 16 horas se recogió el medio condicionado para determinar los niveles de ácido hialurónico en un ensayo tipo ELISA (*, $p < 0,05$). Se muestra un resultado representativo ($n=3$)

2.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal

Con el fin de analizar la distribución del ácido hialurónico en estas líneas, se sembraron y fijaron células sobre cubreobjetos y se incubaron con una proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada (b-HABP). Tras incubar las muestras con FITC-estreptavidina, estas se analizaron en el microscopio confocal. La utilización de este microscopio permitió tomar imágenes de las muestras en diferentes planos y su posterior integración para obtener una imagen transversal de las muestras. Las células, antes de ser fijadas, fueron tratadas con el reactivo *CellMask* que permite la tinción de la membrana plasmática (figura 30).

En las fotografías se puede observar, en el caso de la línea celular MeWo, cómo la línea que expresa el siRNA contra CD44 presenta una mayor tinción para el ácido hialurónico que la línea control. Las imágenes muestran claramente la localización del ácido hialurónico en la superficie celular, ya que la marca de fluorescencia verde correspondiente al ácido hialurónico se encuentra por encima de la marca de fluorescencia roja correspondiente a la membrana plasmática. Además, los cortes transversales (superposición de imágenes tomadas a diferentes alturas) mostrados en la parte derecha de las fotografías también muestran este hecho. En el caso de la línea celular SK-mel-131 no se observaron diferencias entre la línea

control y la transfectada con el siRNA contra CD44, resultado que concuerda con el obtenido en el análisis de los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo.

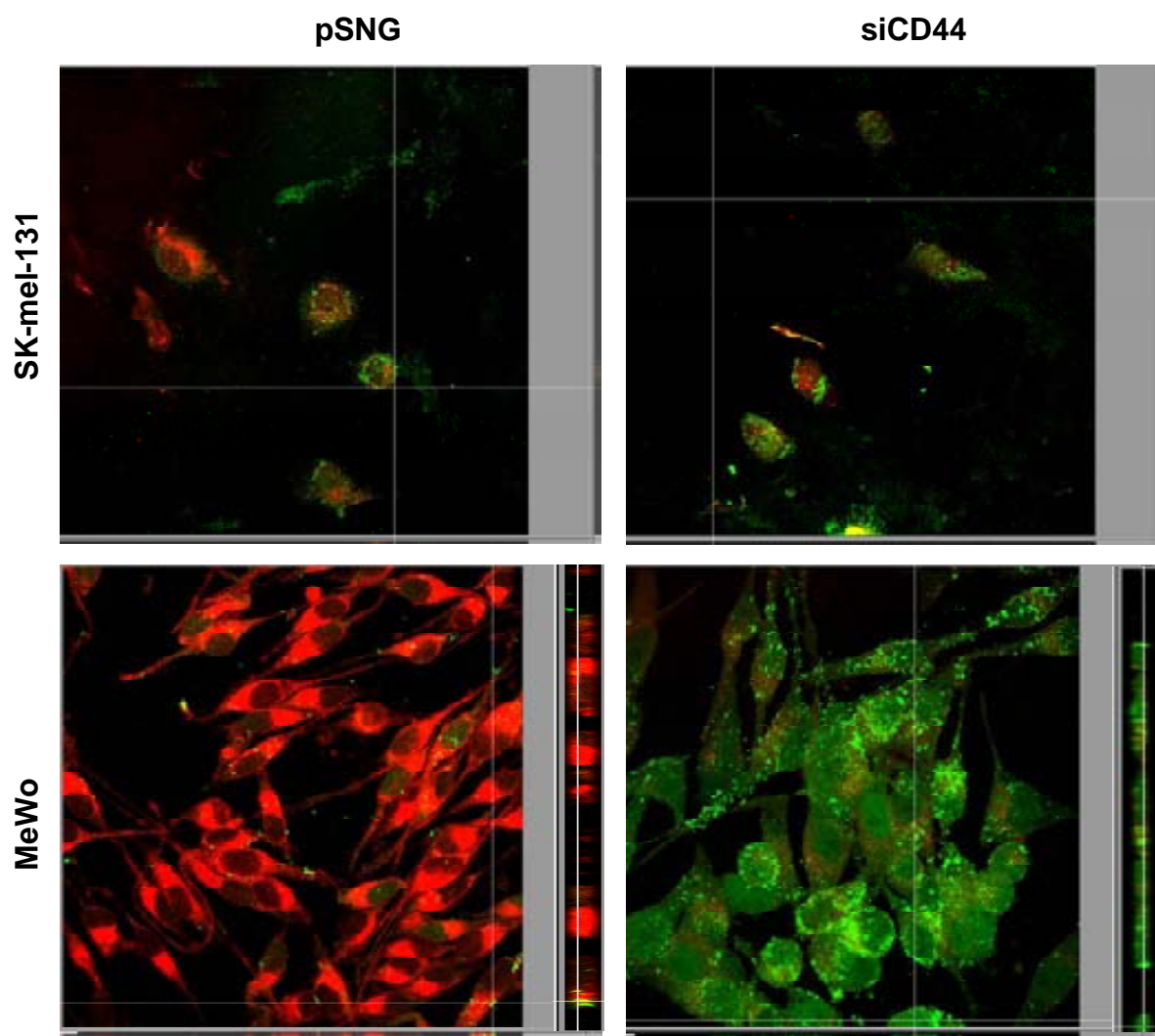


Figura 30. Análisis de la distribución del ácido hialurónico en las células. Las células se sembraron sobre cubreobjetos y al cabo de 24 horas se incubaron durante 30 minutos con el reactivo *CellMask* (rojo) y se fijaron con una solución de 3% paraformaldehído y 2% sacarosa en PBS. Las muestras fueron incubadas con una solución de proteína de unión al ácido hialurónico biotilada y posteriormente con FITC-estreptavidina (verde). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

2.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico

Dados estos resultados, se postuló la hipótesis de que las células que no expresan CD44 presentan una alteración en la capacidad de degradación del ácido hialurónico. Ya que esta degradación requiere un proceso de internalización, se realizó un ensayo consistente en tratar las células con ácido hialurónico conjugado a FITC (HA-FITC) a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas: las muestras se

trataron durante 1 hora a 4°C para observar la unión del complejo HA-FITC a la membrana plasmática o bien durante 5 horas a 37°C para analizar la capacidad de la célula de internalizar el complejo.

Los resultados obtenidos indican que CD44, como era de esperar, juega un papel importante en el proceso de adhesión del ácido hialurónico a la superficie celular y en la posterior internalización. En el caso del ensayo de unión a la superficie celular (ensayo realizado a 4°C), se observa que en las líneas control, tanto en la línea SK-mel-131 como en la línea MeWo, el complejo HA-FITC se adhiere a la membrana plasmática (figuras 31A y 31C), mientras que no se observa unión en las líneas transfectadas con el siRNA contra CD44 (figuras 31B y 31D).

En los ensayos realizados a 37°C para observar la internalización del complejo, las líneas control fueron capaces de llevar a cabo este proceso, encontrándose la marca correspondiente al complejo HA-FITC en el interior celular (figuras 31E y 31G). En el caso de las líneas en las que la expresión de CD44 está inhibida, tan sólo se observa una ligera unión del complejo a la superficie celular (figuras 31F y 31H).

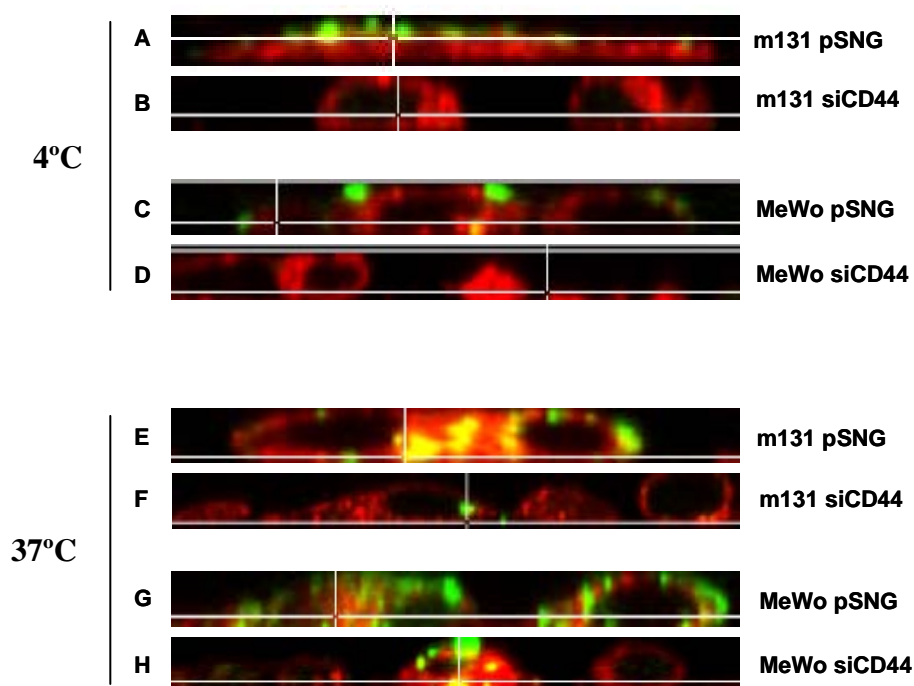


Figura 31. Ensayo de internalización del complejo HA-FITC. Las células se sembraron sobre cubreobjetos y tras 24 horas fueron incubadas durante 1 hora a 4°C (figuras A-D) o durante 5 horas a 37°C (figuras E-H) con un complejo formado por ácido hialurónico conjugado a FITC. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con el reactivo *CellMask*, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. Las imágenes corresponden a cortes transversales hechos en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

2.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa

Por último, para confirmar que el exceso de ácido hialurónico observado en la superficie de las células que no expresan CD44 es también debido a una disminución de su degradación, se determinó la actividad hialuronidasa total en extracciones de membrana de las diferentes líneas celulares. Se ha descrito que la internalización del ácido hialurónico requiere previamente la degradación parcial en oligosacáridos más pequeños, reacción catalizada por la hialuronidasa de membrana Hyal-2 (Stern, 2005) que requeriría la presencia de CD44 (Tammi *et al.*, 2001).

En el gráfico correspondiente a la figura 32, se muestra el resultado del análisis. Tal y como se puede observar, en el caso de la línea celular SK-mel-131 no se observaron diferencias significativas entre la línea control y la línea transfectada con el siRNA contra CD44. No obstante, sí se observaron diferencias en el caso de la línea celular MeWo, donde la inhibición de la expresión de CD44 provocó una disminución importante de la actividad hialuronidasa.

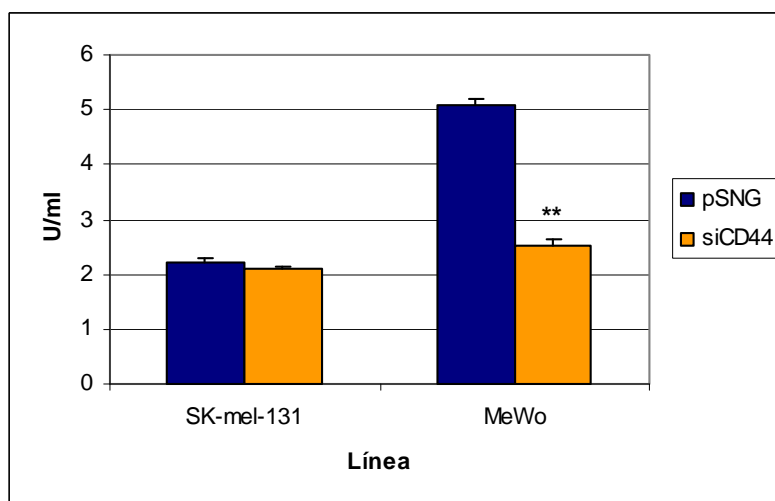


Figura 32. Análisis de la actividad hialuronidasa en extractos de membrana en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Los extractos de membrana se diluyeron en el buffer de hialuronidasa y se añadieron a pozos de una placa de 96 pozos previamente recubiertos con ácido hialurónico. Tras incubar la placa durante 16 horas a 37°C, el ácido hialurónico no degradado restante en la placa se determinó en un ensayo tipo ELISA (**, $p < 0,01$). Se muestra un resultado representativo (n=3)

2.7. Efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad gelatinolítica de las células

Durante los últimos años, se ha descrito que la actividad de las metaloproteasas de matriz (MMPs) puede estar regulada en parte por el receptor CD44 (Lou *et al.*, 2005; Yu y Stamenkovic, 1999). Con el fin de estudiar el efecto de la inhibición de CD44 en la actividad gelatinolítica (en nuestro caso, actividad de la MMP-2) de las líneas celulares en estudio, se recogieron medios condicionados de las diferentes líneas y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida a los que se añadió gelatina. Tras incubar los geles con los tampones correspondientes, la posterior tinción de estos con azul de Coomassie mostró la actividad metaloproteasa de las muestras en forma de bandas no teñidas en el gel.

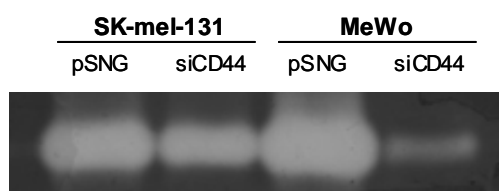


Figura 33. Ensayo de actividad gelatinolítica asociada a MMP-2 de las líneas transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Se recogieron medios condicionados de las líneas a analizar y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al que se añadió gelatina. Los geles fueron incubados durante 24 horas en un *buffer* para permitir la actividad gelatinolítica y teñidos posteriormente para observar la degradación de la gelatina. Se muestra un resultado representativo (n=3)

La figura 33 muestra el resultado del ensayo. Como se puede observar, la inhibición de la expresión de CD44 provocó una disminución de la actividad metaloproteasa de la MMP-2 tanto en la línea celular SK-mel-131 como en la línea MeWo en comparación con sus respectivos controles, siendo mayor la diferencia en la línea MeWo.

Se ha descrito ampliamente en la bibliografía que CD44 puede interactuar con la gelatinasa MMP-9 (Desai *et al.*, 2009). No obstante, en las líneas celulares analizadas no se detectó actividad de esta metaloproteasa.

3. EFECTO DE LA EXPRESIÓN CONJUNTA DEL VERSICANO V3 Y DEL siRNA CONTRA CD44 EN LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO MeWo

Los resultados obtenidos en el punto 2 parecían indicar de forma evidente que los cambios fenotípicos observados en las células transducidas con la isoforma V3 de versicano podían ir mediados, la mayor parte de ellos, a través de la interacción con CD44, tal y como se había postulado inicialmente. Los resultados a nivel de proliferación, migración, activación de las vías MAPK, metabolismo del ácido hialurónico y actividad metaloproteasa en las líneas transfectadas con el siRNA contra CD44 se correspondían con los obtenidos previamente en el análisis de las líneas que expresan la isoforma V3 de versicano.

Dado que las mayores diferencias se obtuvieron en el caso de la línea MeWo, se decidió utilizar esta línea para estudiar cuál era el efecto conjunto de la expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 (de aquí en adelante *doble transfección*). Se pretendía de esta manera determinar si esto producía un efecto aditivo, sinérgico o bien si no producía ningún efecto en los cambios observados en los dos casos por separado. La nomenclatura utilizada de aquí en adelante para cada una de las líneas será:

MeWo LX pSp (no expresa versicano V3 ni siRNA contra CD44) → MeWo LXp
 MeWo LX siCD44 (expresa siRNA contra CD44) → MeWo LXs
 MeWo V3 pSp (expresa versicano V3) → MeWo V3p
 MeWo V3 siCD44 (expresa versicano V3 y siRNA contra CD44) → MeWo V3s

3.1. Efecto de la *doble transfección* en la capacidad de proliferación celular

El primer punto a estudiar fue, como en los casos anteriores, el efecto de la doble transfección en la capacidad proliferativa de las células. De la misma manera que en los casos anteriores, se sembraron las células en placas de 6 pozos y se hizo el recuento en cámara de Neubauer en los días posteriores.

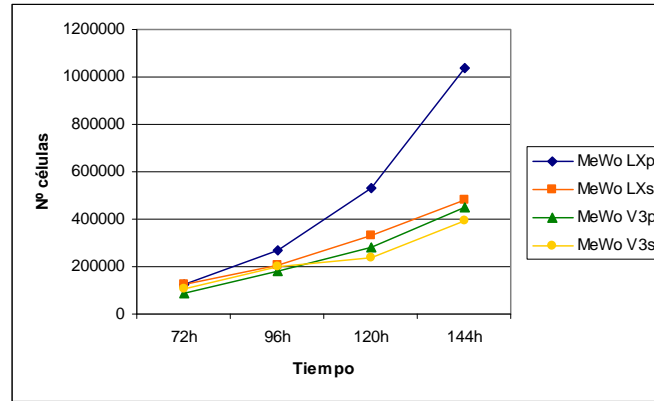


Figura 34. Efecto de la expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad proliferativa de la línea MeWo de melanoma. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pozo en placas de 6 pozos (2 pozos por cada punto) y se realizó un recuento de las mismas a los tiempos indicados en los gráficos. Se muestra un resultado representativo (n=4)

La figura 34 muestra el resultado del ensayo. Como se puede observar, tanto la línea que expresa la isoforma V3 de versicano (MeWo V3p) como la línea en la que se silenció la expresión de CD44 (MeWo LXs) presentan un crecimiento más lento que la línea control (MeWo LXp). En el caso de la línea que presenta la *doble transfección* (MeWo V3s), se observa también una menor capacidad de proliferación en comparación con la línea control, aunque no existen diferencias significativas cuando se compara con las líneas MeWo V3p o MeWo LXs.

3.2. Efecto de la *doble transfección* en la capacidad de adhesión

El siguiente punto a analizar fue el efecto de la *doble transfección* en la capacidad de adhesión celular a diferentes sustratos. De la misma manera que en el experimento anterior, las placas se recubrieron con los distintos sustratos a analizar, se sembraron las células y se incubaron durante 2 o 16 horas para permitir su adhesión. La posterior lectura de la placa dio los resultados que se muestran en la figura siguiente. En el caso de las células que expresan la isoforma V3 de versicano, como se ha descrito anteriormente, no se observaron diferencias entre estas y sus respectivos controles, mientras que las células en las que se silenció la expresión de CD44 (línea MeWo siCD44) presentaron una mayor capacidad de adhesión que las células control, tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 2.2).

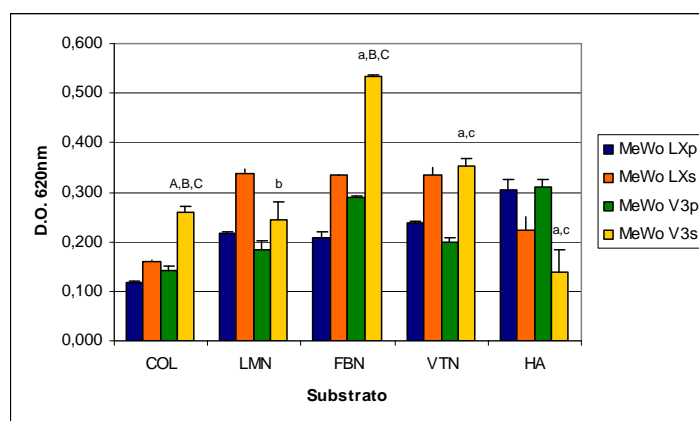


Figura 35. Efecto de la expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de adhesión a diferentes sustratos. Se recubrieron pozos de una placa de 96 con los diferentes sustratos a analizar (COL = colágeno tipo I, 10 $\mu\text{g/ml}$; LMN = laminina, 10 $\mu\text{g/ml}$; FBN = fibronectina, 10 $\mu\text{g/ml}$; VTN = vitronectina, 5 $\mu\text{g/ml}$; HA = ácido hialurónico, 5 mg/ml), se sembraron $4 \cdot 10^4$ células por pozo y se incubó durante 2 horas a 37°C (16h para HA). Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta, se incubaron con HCl 0,1 M y se determinó la absorbancia a 620 nm (prueba t: análisis respecto a LXp (a,A), LXs (b,B) y V3p (c,C); minúsculas, $p < 0,05$; mayúsculas, $p < 0,01$). Se muestra un resultado representativo ($n=3$)

Como se puede observar en el gráfico, la línea MeWo LXs presenta una mayor capacidad de adhesión a los diferentes sustratos (excepto sobre ácido hialurónico) en comparación con la línea control (MeWo LXp), resultado que concuerda con aquellos obtenidos con anterioridad. Al comparar la línea MeWo V3p con la línea control no se observan diferencias, excepto en el caso de la adhesión a fibronectina donde la adhesión de la línea que expresa la isoforma V3 de versicano es ligeramente superior a la de la línea control. Sorprendentemente, la *doble transfección* (línea MeWo V3s) produjo un incremento de la capacidad de adhesión a colágeno y fibronectina, tanto en comparación con la línea control como con las líneas que expresan la isoforma V3 de versicano y el siRNA contra CD44 por separado. En el caso de la adhesión sobre ácido hialurónico, la línea MeWo V3s presentó los niveles más bajos de adhesión de las cuatro líneas, aunque las diferencias con la línea MeWo LXs no fueron significativas.

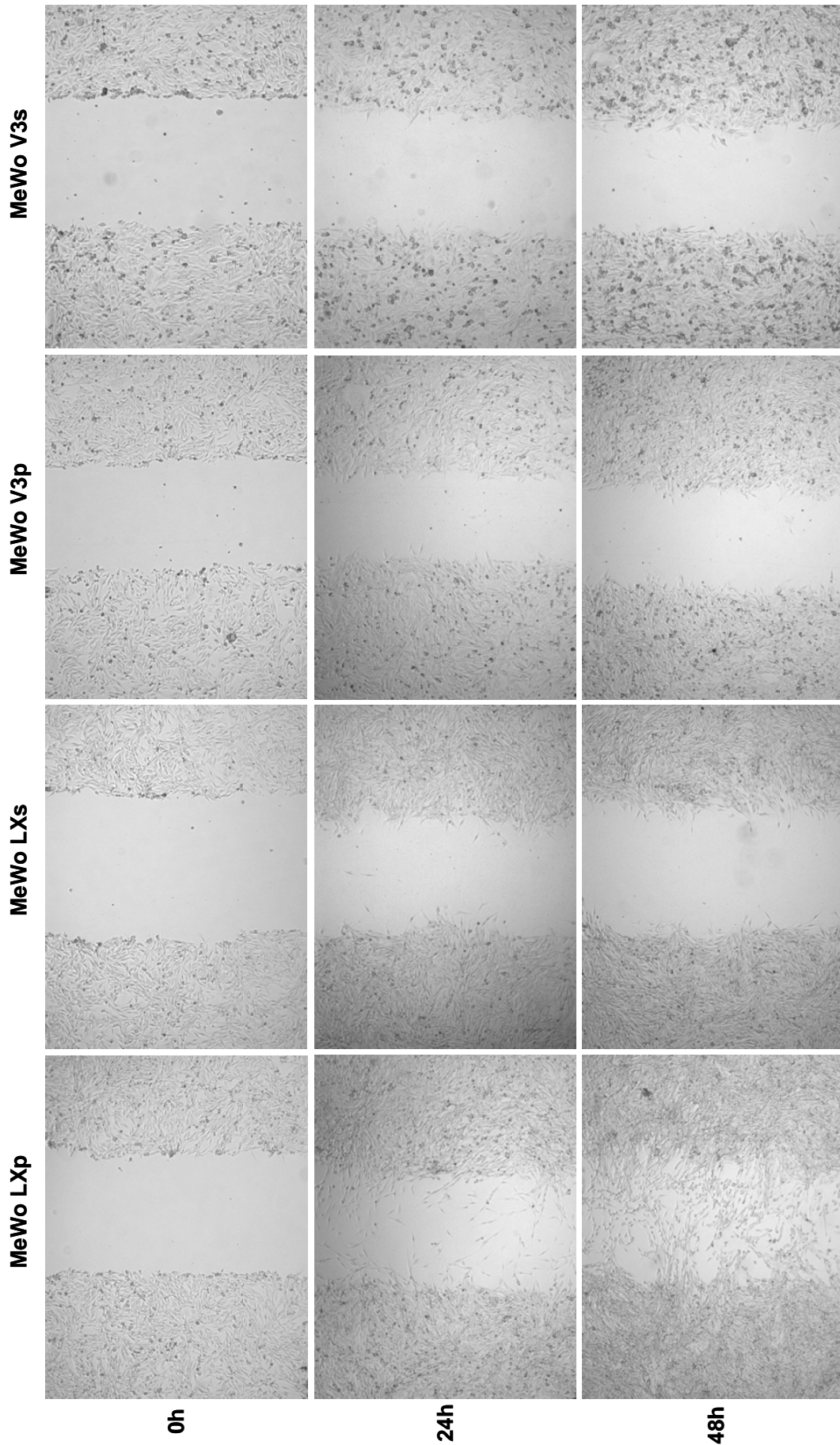


Figura 36. Resultado del ensayo de wound healing en las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Las células se sembraron, se dejaron crecer hasta llegar a confluencia, se practicó una incisión en la placa y se dejaron migrar durante 48 horas. Durante este tiempo, se tomaron fotografías en el microscopio a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

3.3. Efecto de la *doble transfección* en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo *wound healing*

De la misma manera que en los experimentos anteriores, se hicieron crecer hasta confluencia la línea que presenta la doble transfección así como las líneas control y se hizo una incisión en la placa, con el fin de analizar el efecto de esta doble transfección en la capacidad de migración.

El análisis de la capacidad de migración tanto de las líneas que expresan la isoforma V3 de versicano como las que expresan el siRNA contra CD44 mostró una menor capacidad de migración de estas en comparación con sus respectivos controles, tal y como se ha mencionado anteriormente (apartado 2.3) y de acuerdo con los resultados previos del laboratorio.

En la figura 36 se muestra el resultado de los experimentos. Como se puede observar, tanto la presencia de la isoforma V3 de versicano como el silenciamiento de CD44 produjeron una disminución de la capacidad de migración de las células. La *doble transfección* en este caso no produjo una mayor disminución de la capacidad de migración celular.

3.4. Efecto de la *doble transfección* en la capacidad de invasión celular en *Transwells*

En el caso del análisis de la capacidad de invasión, se observaron diferentes efectos entre las líneas que expresan la isoforma V3 de versicano y aquella en la que la expresión de CD44 se encuentra silenciada. Así, mientras que la línea MeWo V3 presenta una capacidad de invasión similar a la de su respectivo control, la capacidad de invasión de la línea MeWo siCD44 es menor que la de la línea control MeWo pSNG.

Con el fin de estudiar el efecto de la *doble transfección* en la capacidad de invasión de la línea celular MeWo, se recubrieron los *Transwells* con los sustratos a analizar (colágeno tipo I y ácido hialurónico), se sembraron las células y se añadió medio DMEM + 10% FCS como factor de migración. Tras 16 horas se observó el resultado del ensayo en el microscopio.

Como se puede apreciar en la figura 37, las células MeWo LXs y MeWo V3p presentaron el comportamiento esperado, presentando las primeras una mayor capacidad de invasión que el control y no encontrándose diferencias en el caso de las células que expresan la isoforma V3 de versicano. En el caso de las células que

expresan conjuntamente el versicano V3 y el siRNA contra CD44 se observó una capacidad de invasión prácticamente idéntica a la de las células transfectadas con el siRNA contra CD44, lo que indicaría que la presencia de V3 no altera la capacidad de invasión de las células.

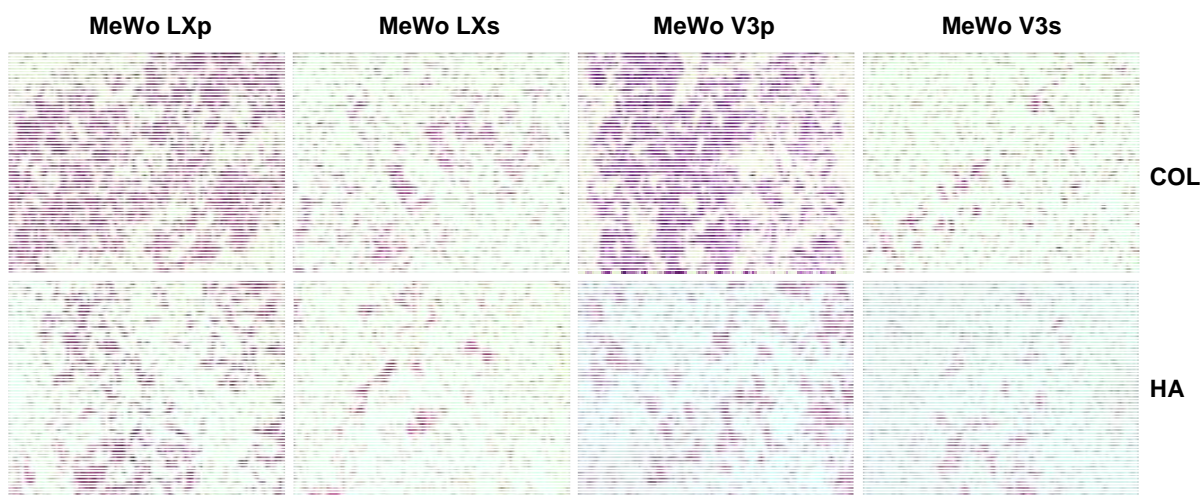


Figura 37. Ensayo de invasión en *Transwell*. Los *Transwells* fueron recubiertos con los diferentes sustratos (COL=colágeno tipo I, 100 μ g/ml; HA=ácido hialurónico, 1,5 mg/ml), se sembraron las células y se incubó durante 16 horas a 37°C. Posteriormente las células que habían atravesado la membrana se fijaron, se tiñeron y se observaron en el microscopio. Se muestra un resultado representativo (n=3)

3.5. Efecto de la *doble transfección* en la activación de las vías MAPK ERK1/2 y p38

Con el fin de estudiar la relación entre el versicano V3 y CD44 en la activación de las vías ERK1/2, se decidió realizar el análisis de estas vías en las líneas que presentan la *doble transfección*: se realizó un tratamiento de las células con EGF a los tiempos indicados, se hizo una extracción de proteína y se analizaron los extractos por *western blot*.

En el caso del análisis de la vía ERK1/2, la activación de las líneas MeWo LXs (como se ha descrito anteriormente) y MeWo V3p fue menor en comparación con el control MeWo LXp, especialmente a tiempos cortos (2 y 5 minutos). En el caso de la línea MeWo V3s, el nivel de activación de la vía fue similar al obtenido para las líneas MeWo LXs y MeWo V3p, tal y como se puede observar en la figura correspondiente a la densitometría del *western blot*.

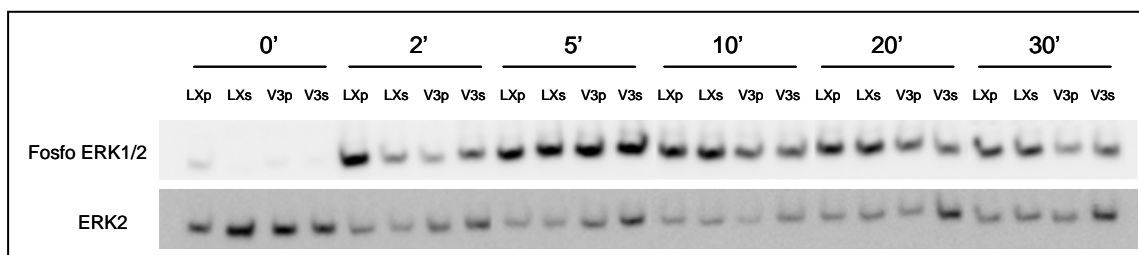


Figura 38. Análisis por *western blot* de la activación de la vía ERK1/2 en las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con $100 \mu\text{g/ml}$ de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo ($n=4$)

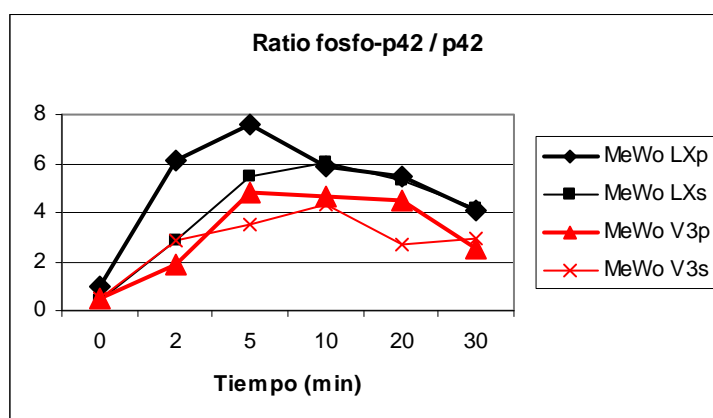


Figura 39. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de ERK1/2 fosforilada y ERK total de las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de ERK fosforilada y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de ERK total

Al realizar el análisis de la activación de la vía p38, se obtuvieron resultados similares a los de ERK1/2. La activación de las células que expresan el siRNA contra CD44 (tanto en el caso de la línea MeWo LXs como en la línea MeWo V3s) fue menor en comparación con el control MeWo LXp, mientras que la línea MeWo V3p también presentó una disminución de la activación aunque menos marcada que en el caso de la inhibición de CD44 (figuras 40 y 41).

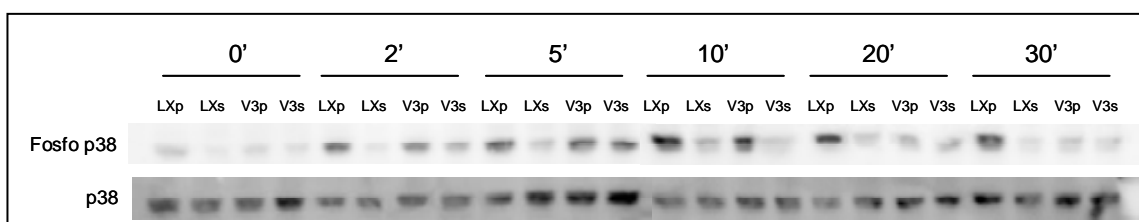


Figura 40. Análisis por *western blot* de la activación de la vía p38 en las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con $100 \mu\text{g/ml}$ de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo ($n=4$)

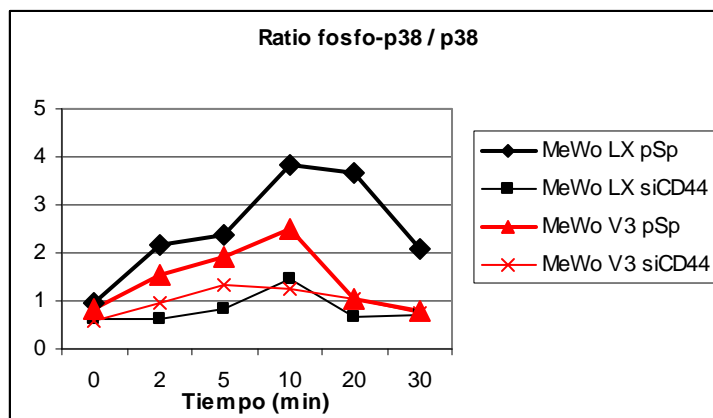


Figura 41. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de p38 fosforilado y p38 total de las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de p38 fosforilado y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de p38 total

3.6. Efecto de la *doble transfección* en el metabolismo del ácido hialurónico

3.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados

El análisis de contenido de ácido hialurónico en los medios de cultivo mediante ELISA de la línea MeWo siCD44 mostró unos niveles incrementados en comparación con su control MeWo pSNG. En el caso de la línea MeWo V3, no obstante, estas diferencias no se encontraron.

El análisis del medio de cultivo de la línea que presenta la *doble transfección* así como de sus respectivos controles dio los resultados que se muestran en la figura 42. Como se puede observar, la línea en la que la expresión de CD44 se encuentra silenciada (MeWo LXs), los niveles de ácido hialurónico se encuentran muy incrementados en comparación con la línea control (MeWo LXp), mientras que no existen diferencias en el caso de la línea MeWo V3p. En el caso de la línea que presenta la *doble transfección* (MeWo V3s), los niveles de ácido hialurónico se encuentran incrementados respecto a la línea control, aunque sin alcanzar los valores de la línea MeWo LXs.

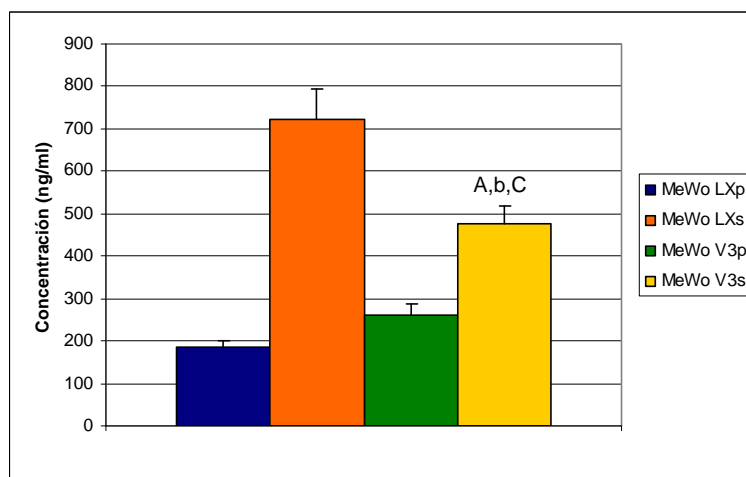


Figura 42. Análisis del contenido de ácido hialurónico en medios condicionados de las líneas MeWo LXp, MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s. Se sembraron 10^5 células por placa en placas de 3,5 cm y pasadas 24 horas se cambió el medio de cultivo por DMEM sin FCS. Al cabo de 16 horas se recogió el medio condicionado para determinar los niveles de ácido hialurónico en un ensayo tipo ELISA (prueba t: análisis respecto a LXp (A), LXs (b) y V3p (C); minúsculas, $p < 0,05$; mayúsculas, $p < 0,01$). Se muestra un resultado representativo ($n=3$)

3.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal

El siguiente paso, de la misma manera que en el punto 2.6, consistió en analizar la distribución del ácido hialurónico en las células mediante la incubación de estas, previamente fijadas, con una proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada seguida de una incubación con FITC-estreptavidina.

En la figura siguiente se puede observar cómo la presencia del siRNA contra CD44 produjo, de la misma manera que en el caso de las líneas MeWo pSNG y MeWo siCD44, un aumento de la cantidad de ácido hialurónico asociado a la membrana celular en la línea MeWo LXs. En la línea MeWo V3p se observó un incremento de ácido hialurónico en comparación con el control MeWo LXp, aunque no tan marcado como en la línea MeWo LXs. La doble transfección produjo en las células el mismo efecto que en el caso de la línea MeWo LXs.

Como se puede apreciar en la figura 43, y de acuerdo con los resultados obtenidos para la línea MeWo siCD44, el incremento de ácido hialurónico asociado a la inhibición de la expresión de CD44 en las líneas MeWo LXs y MeWo V3s se mostró en forma de ácido hialurónico asociado a la membrana.

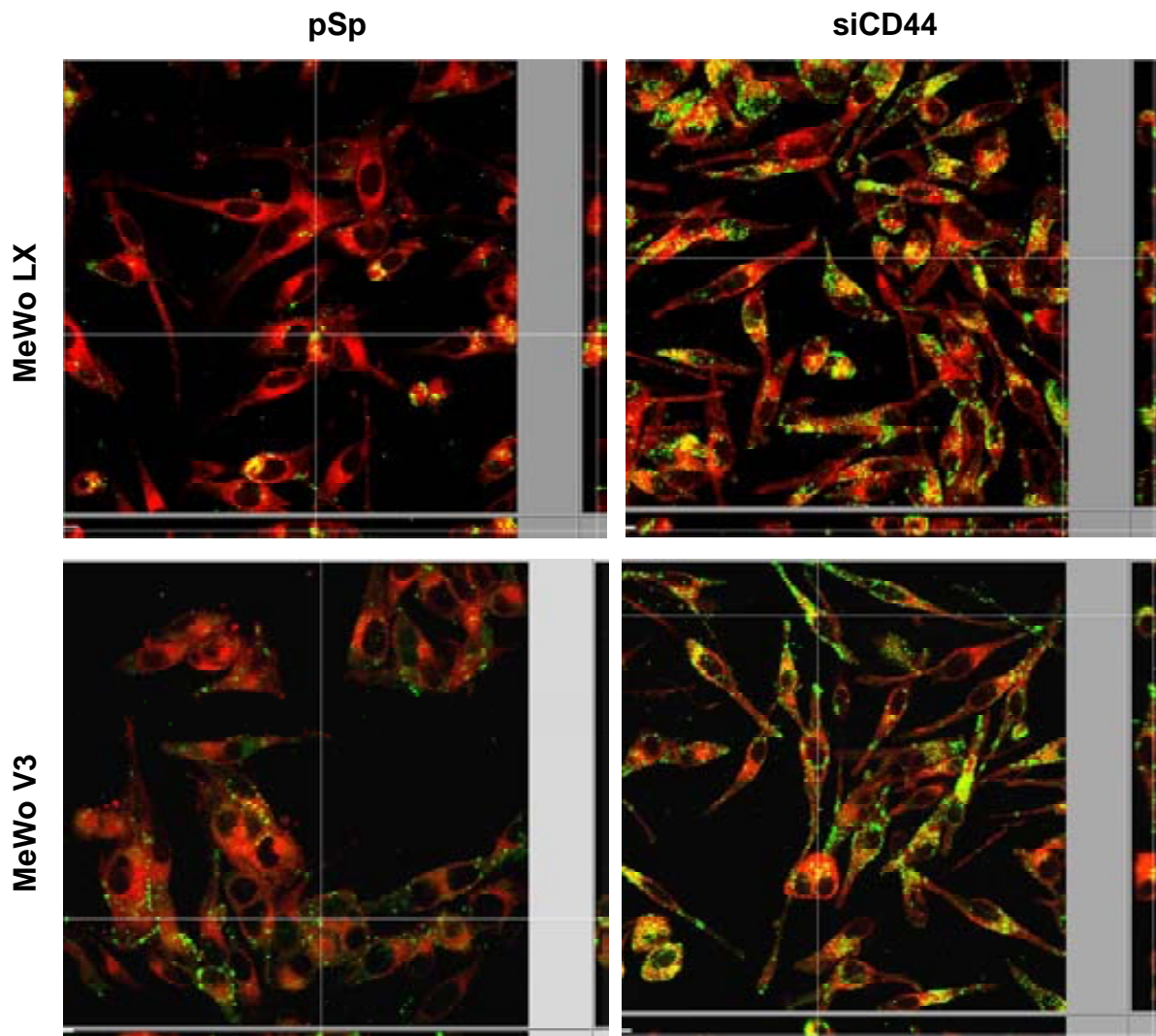


Figura 43. Análisis de la distribución del ácido hialurónico en las células. Las células se sembraron sobre cubreobjetos y al cabo de 24 horas se incubaron durante 30 minutos con el reactivo *CellMask* y se fijaron con una solución de 3% paraformaldehído y 2% sacarosa en PBS. Las muestras fueron incubadas con una solución de proteína de unión al ácido hialurónico biotinilada y posteriormente con FITC-estreptavidina. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

3.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico

Seguidamente, se realizó el ensayo con el complejo HA-FITC a 4 y a 37°C para observar la unión de este a la membrana o bien para observar posibles diferencias a nivel de internalización, respectivamente.

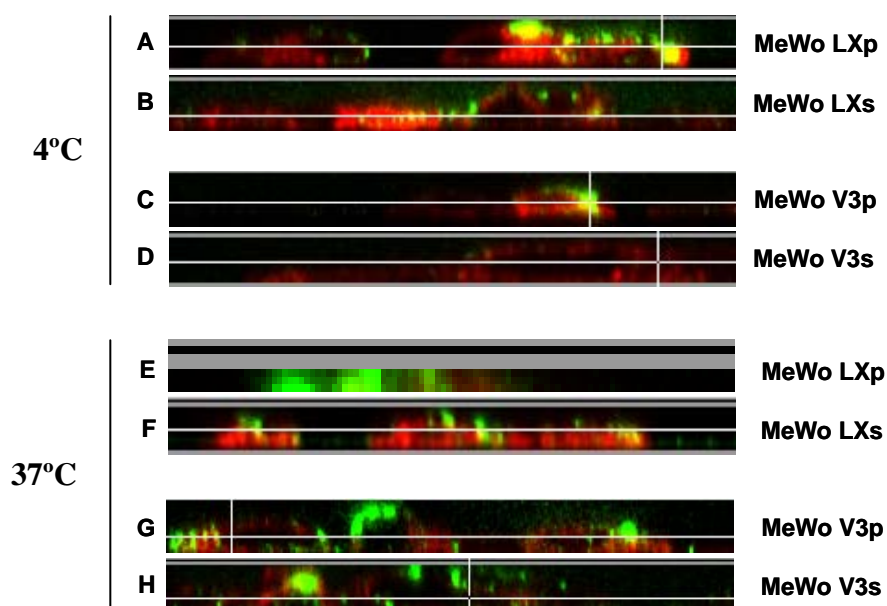


Figura 44. Ensayo de internalización del complejo HA-FITC. Las células se sembraron sobre cubreobjetos y tras 24 horas fueron incubadas durante 1 hora a 4°C (figuras A-D) o durante 5 horas a 37°C (figuras E-H) con un complejo formado por ácido hialurónico conjugado a FITC. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con el reactivo *CellMask*, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

La figura 44 muestra el resultado del ensayo. Como se puede observar, a 4°C (figuras A-D), la mayor unión del complejo HA-FITC a la membrana celular se da en la línea control MeWo LXp. En el caso de las líneas en la que la expresión de CD44 se encuentra silenciada o bien en la que expresa la isoforma V3 de versicano, la unión del complejo a la membrana es menor en comparación con la línea control, mientras que el menor nivel de unión lo encontramos en la línea que presenta la doble transfección.

En los ensayos realizados a 37°C se observó que, en el caso de la línea control MeWo LXp, el ácido hialurónico es internalizado por las células, ya que se localiza en el interior de estas (figura 44E). El resto de líneas, no obstante, no son capaces de internalizar el complejo, encontrándose este tan sólo en la superficie celular (figuras 44F-H).

3.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa

Por último, se determinó la actividad hialuronidasa total en extracciones de membrana de las líneas estudiadas en este apartado.

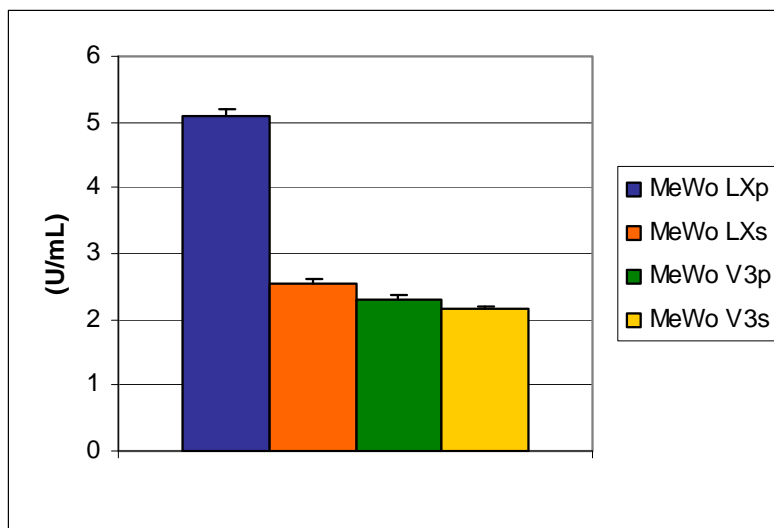


Figura 45. Análisis de la actividad hialuronidasa en extractos de membrana en la línea celular MeWo transfectada con el siRNA contra CD44 y/o transducida con la isoforma V3 de versicano. Los extractos de membrana se diluyeron en el buffer de hialuronidasa y se añadieron a pozos de una placa de 96 pozos previamente recubiertos con ácido hialurónico. Tras incubar la placa durante 16 horas a 37°C, el ácido hialurónico no degradado restante en la placa se determinó en un ensayo tipo ELISA. Se muestra un resultado representativo (n=3)

Como se puede apreciar en la figura 45, la inhibición de la expresión de CD44 así como la expresión de la isoforma V3 de versicano produjeron una disminución de la actividad hialuronidasa total de las células. No obstante, la *doble transfección* no produjo una disminución adicional de la actividad hialuronidasa de las células.

3.7. Efecto de la *doble transfección* en la capacidad gelatinolítica de las células

Los resultados obtenidos en el apartado 2.7 indican de forma clara que CD44 interviene de manera importante en la actividad de la MMP-2 de las células. Resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo mostraron que la presencia de la isoforma V3 de versicano también influye en esta capacidad de las células de degradar la gelatina. Por ello, se decidió estudiar cuál era el efecto de la *doble transfección* de las células en su actividad gelatinolítica.

En la figura 46 se puede observar, como era de esperar, que la línea transfectada con el siRNA contra CD44 y la línea que expresa la isoforma V3 de versicano presentan una menor actividad gelatinolítica. La *doble transfección*, no obstante, no produjo una mayor disminución en esta actividad MMP-2 de las células.

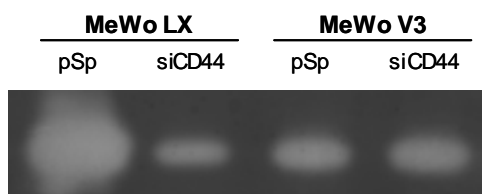


Figura 46. Ensayo de actividad gelatinolítica de las líneas MeWo LX y MeWo V3 transfectadas con el siRNA contra CD44 y sus respectivos controles. Se recogieron medios condicionados de las líneas a analizar y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al que se añadió gelatina. Los gels fueron incubados durante 24 horas en un *buffer* para permitir la actividad gelatinolítica y teñidos posteriormente para observar la degradación de la gelatina. Se muestra un resultado representativo (n=3)

4. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131 TRAS LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS V0 Y V1 DE VERSICANO

La expresión del proteoglicano de matriz extracelular versicano en el melanoma humano fue descrita por nuestro grupo años atrás. Desde entonces, gran parte del trabajo realizado se ha centrado en estudiar el papel que juega esta molécula en la progresión tumoral del melanoma. Para complementar la información obtenida hasta ahora, se decidió silenciar la expresión de las isoformas V0 y V1 en la línea SK-mel-131 y realizar el mismo panel de ensayos que en los puntos anteriores. Estas células, al contrario de la línea celular MeWo y tal y como se ha descrito anteriormente, producen de forma endógena estas dos isoformas de versicano V0 y V1 (Domenzain *et al.*, 2009). La inhibición de la expresión de estas isoformas se llevó a cabo mediante un siRNA dirigido contra el subdominio GAG β , que es el dominio que tienen en común las isoformas V0 y V1 (ver figura 4). La transfección con el siRNA contra versicano no se realizó en la línea celular MeWo ya que esta no expresa ninguna isoforma de versicano de forma endógena.

4.1. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de proliferación celular

Está ampliamente descrito en la bibliografía que la expresión de versicano es responsable de un aumento en el crecimiento celular. Previamente, nuestro grupo había descrito que la adición de versicano purificado al medio de cultivo provoca un aumento de la capacidad de proliferación celular en la línea de melanoma humano

SK-mel-1.36-1-5 (Touab *et al.*, 2002). Por ello, se realizó un ensayo de proliferación para estudiar cuál era el efecto de la inhibición de la expresión de versicano en esta capacidad de proliferación celular.

Las células se sembraron en placas de 6 pozos y se realizó un recuento (por duplicado) cada 24 horas. La figura 47 muestra el resultado del ensayo. Como se puede observar, el silenciamiento de la expresión de versicano provocó una disminución de la capacidad de proliferación celular, resultado que concuerda con lo obtenido previamente por nuestro grupo y con lo descrito en la bibliografía.

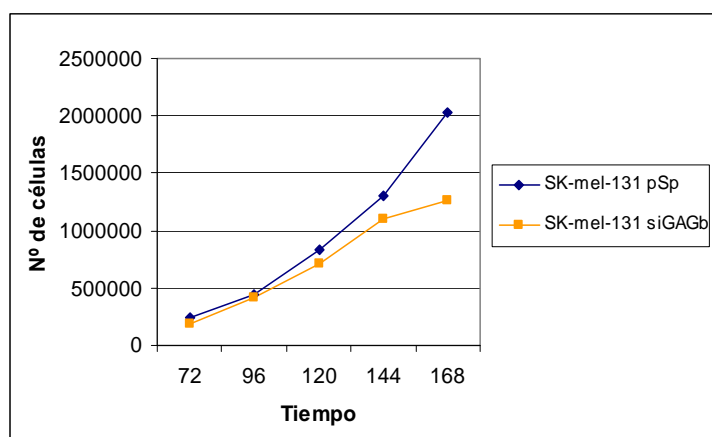


Figura 47. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad proliferativa de la línea SK-mel-131 de melanoma. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pozo en placas de 6 pozos (2 pozos por cada punto) y se realizó un recuento de las mismas a los tiempos indicados en el gráfico. Se muestra un resultado representativo (n=4)

4.2. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de adhesión celular

Otro de los efectos producidos por la presencia de versicano descrito por numerosos investigadores es la inhibición de la capacidad de adhesión celular a diferentes sustratos. Nuestro grupo también describió que la adición de versicano al medio de cultivo tenía un efecto negativo en la capacidad de adhesión de las células a fibronectina y colágeno tipo I (Touab *et al.*, 2002).

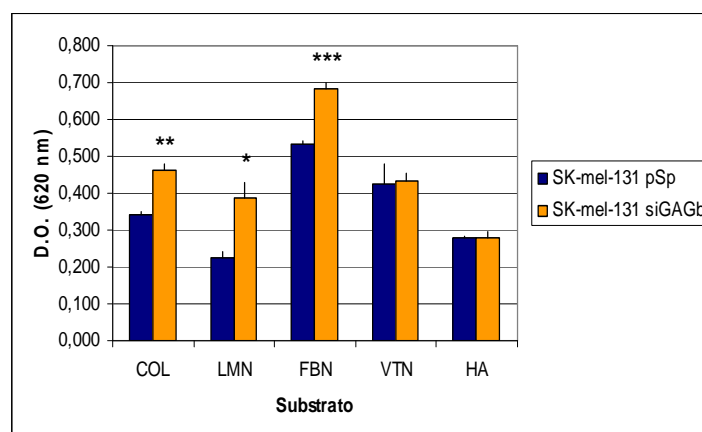


Figura 48. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de adhesión de la línea celular de melanoma humano SK-mel-131. Se recubrieron pozos de una placa de 96 con los diferentes sustratos a analizar (COL = colágeno tipo I, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; LMN = laminina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; FBN = fibronectina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; VTN = vitronectina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; HA = ácido hialurónico, 5 mg/ml), se sembraron $4 \cdot 10^4$ células por pozo y se incubó durante 2 horas a 37°C (16h para HA). Las células adheridas se tiñeron con cristal violeta, se incubaron con HCl 0,1 M y se determinó la absorbancia a 620 nm (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Se muestra un resultado representativo ($n=3$)

Dados estos antecedentes, se decidió analizar cuál era el efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de adhesión de la línea celular SK-mel-131 a los sustratos colágeno tipo I, laminina, fibronectina, vitronectina y ácido hialurónico. Tal y como se puede observar en la figura 48, el silenciamiento de la expresión de versicano en esta línea celular provocó un aumento en la capacidad de adhesión de las células a los sustratos colágeno tipo I, laminina y fibronectina, mientras que no se encontraron diferencias en cuanto a adhesión a vitronectina o ácido hialurónico. Este resultado confirma, pues, que el versicano ejerce un papel negativo sobre la capacidad de adhesión celular.

4.3. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de migración celular en ensayos de tipo *wound healing*

Tal y como se ha descrito en el apartado de introducción, nuestro grupo ha observado que la expresión de versicano se da en las líneas de melanoma más indiferenciadas (en una fase de progresión más avanzada), mientras que no hay expresión en las líneas más diferenciadas. Por ello, se decidió estudiar la influencia del versicano en la capacidad de migración celular, ya que esta capacidad se encuentra incrementada en las fases más avanzadas de melanoma.

Para ello, como en los casos anteriores, las células se hicieron crecer hasta confluencia y posteriormente se practicó una incisión en la placa, creando un espacio

libre a través del cual pudieran migrar las células. De esta manera, se observó que el silenciamiento de la expresión de versicano produce una disminución de la capacidad migratoria de las células (figura 49).

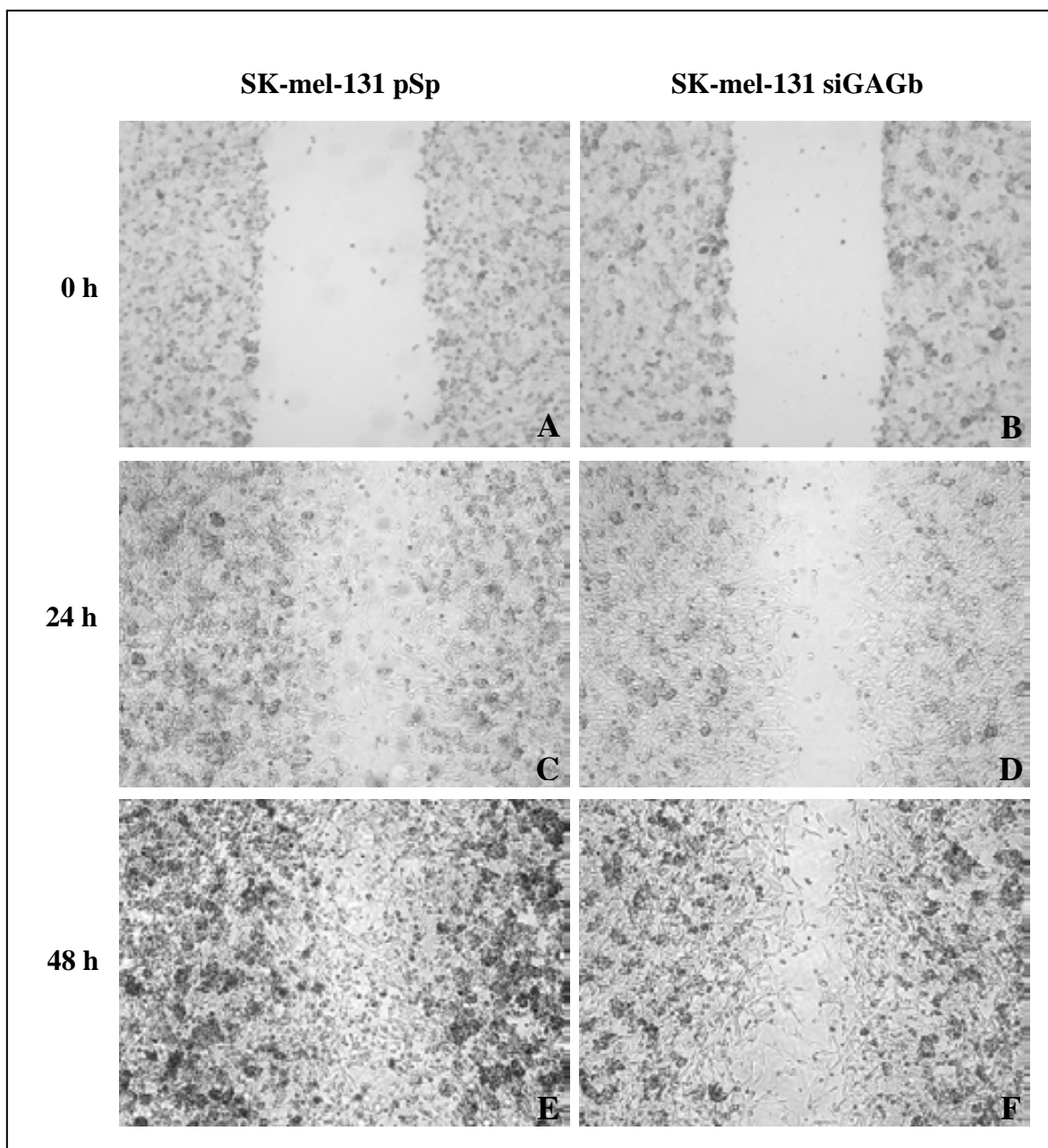


Figura 49. Resultado del ensayo de *wound healing* en las líneas SK-mel-131 pSp (A, C, E) y SK-mel-131 siGAGb (B, D, F). Las células se sembraron, se dejaron crecer hasta llegar a confluencia, se practicó una incisión en la placa y se dejaron migrar durante 48 horas. Durante este tiempo, se tomaron fotografías en el microscopio a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

4.4. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad de invasión celular en *Transwells*

Dado que los resultados de los ensayos de migración mostraron la participación del versicano en el proceso de migración celular, se decidió estudiar cuál era el efecto de su inhibición en la capacidad de invasión.

Las células se sembraron en pozos tipo *Transwell*, previamente recubiertos con los sustratos colágeno tipo I y ácido hialurónico, y se incubaron durante 6 horas para permitir su invasión a través de la membrana. Como se muestra en la figura 50, el silenciamiento de la expresión de versicano provocó una disminución de la capacidad de invasión de las células de la línea SK-mel-131 en comparación con la línea control. Este efecto se observó tanto sobre colágeno tipo I como sobre ácido hialurónico, lo cual indicaría la participación del versicano en los procesos de invasión a través de estos sustratos.

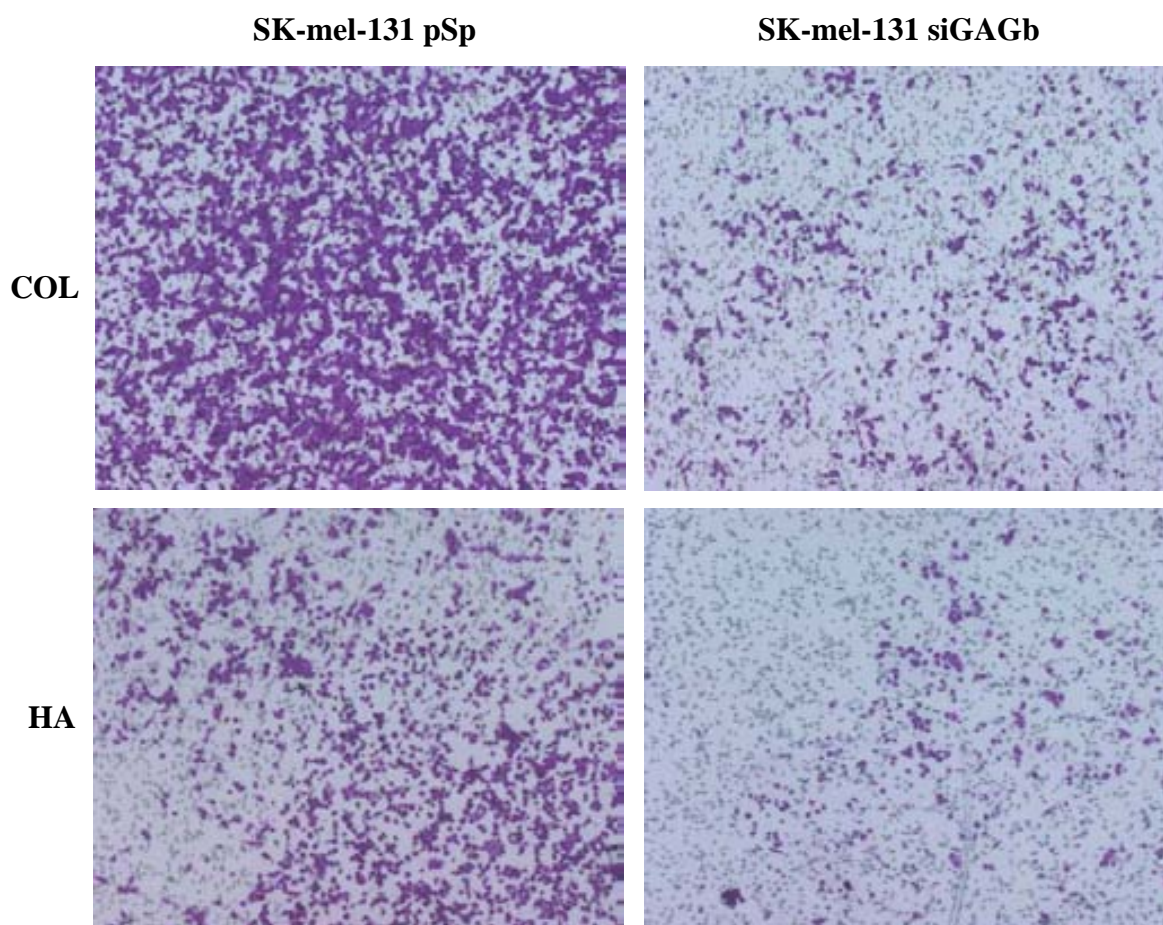


Figura 50. Ensayo de invasión en *Transwell*. Los *Transwells* fueron recubiertos con los diferentes sustratos (COL=colágeno tipo I, 100 μ g/ml; HA=ácido hialurónico, 1,5 mg/ml), se sembraron las células y se incubó durante 6 horas. Posteriormente las células se fijaron, se tiñeron y se observaron en el microscopio

4.5. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la activación de la vía p38

Dado que la línea SK-mel-131 presenta la mutación activadora V600E en BRAF que hace que la vía de ERK1/2 esté constitutivamente activa, tal y como se ha demostrado en el apartado 2, no se realizó el análisis de esta vía en las células transfectadas con el siRNA contra versicano.

En el caso de la vía de p38, el análisis se realizó de la misma manera que en los casos anteriores, activando las células a diferentes tiempos con EGF. El resultado del análisis por *western blot* se muestra en la figura siguiente.

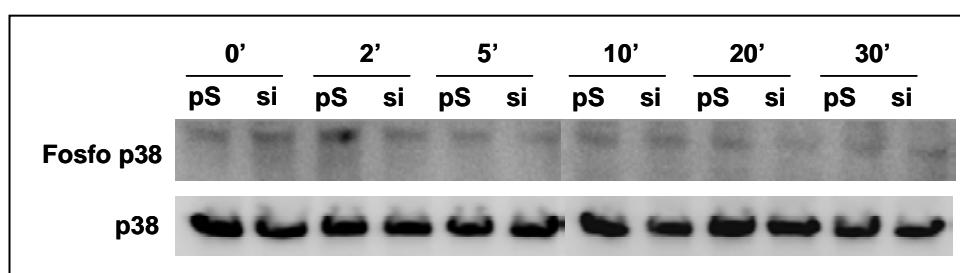


Figura 51. Análisis por *western blot* de la activación de la vía de p38 en las líneas SK-mel-131 pSp (pS) y SK-mel-131 siGAGb (si). Se sembraron 10^6 células por placa en placas de 10 cm, 24 horas después se cambió el medio DMEM por DMEM sin FCS, se incubó durante 16 horas y seguidamente se trataron las células con 100 μ g/ml de EGF a los tiempos indicados. Se muestra un resultado representativo (n=3)

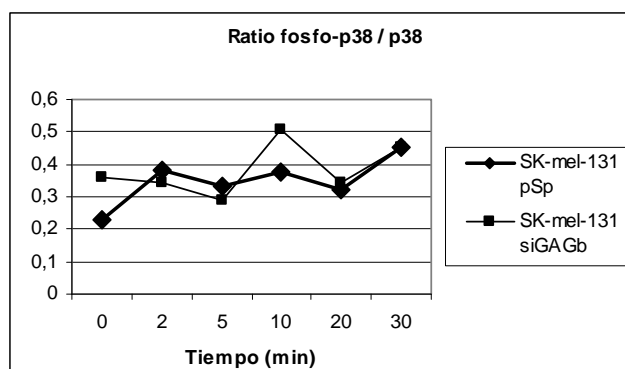


Figura 52. Análisis mediante densitometría de los *western blot* de p38 fosforilado y p38 total de las líneas SK-mel-131 pSp y SK-mel-131 siGAGb. Se determinó la intensidad de cada una de las bandas del *western blot* de p38 fosforilado y se normalizó por el valor de la intensidad de la banda correspondiente de p38 total

En la figura 52 se muestra el análisis por densitometría de los *western blot* de p38 fosforilada y p38 total. Como se puede observar, no se encontraron diferencias en cuanto a la activación de la vía entre la línea transfectada con el siRNA contra

versicano y su respectivo control. Como ya se ha descrito anteriormente en el apartado 2.5, la vía p38 no se activa por acción del EGF en esta línea celular.

4.6. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en el metabolismo del ácido hialurónico

Tal y como se ha descrito previamente, el versicano presenta tres dominios estructurales, siendo el dominio N-terminal un dominio globular de unión a ácido hialurónico. Debido a las interacciones que se establecen entre estas dos moléculas, se creyó interesante estudiar el efecto de la inhibición de la expresión de versicano en el metabolismo del ácido hialurónico.

4.6.1. Determinación de la concentración de ácido hialurónico en medios condicionados

El primer paso consistió en determinar los niveles de ácido hialurónico en medio condicionado de las células transfectadas con el siRNA contra versicano y su respectivo control.

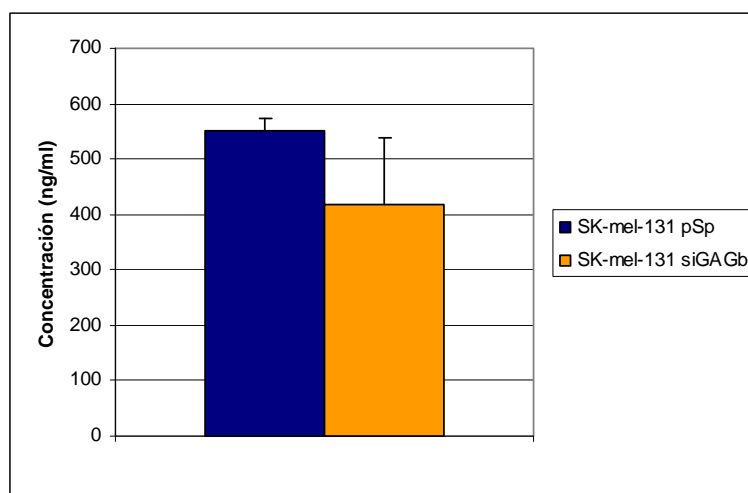


Figura 53. Análisis del contenido de ácido hialurónico de la línea SK-mel-131 y su respectivo control. Los extractos de membrana se diluyeron en el buffer de hialuronidasa y se añadieron a pozos de una placa de 96 pozos previamente recubiertos con ácido hialurónico. Tras incubar la placa durante 16 horas a 37°C, el ácido hialurónico no degradado restante en la placa se determinó en un ensayo tipo ELISA. Se muestra un resultado representativo (n=3)

Como se observa en la figura anterior, el silenciamiento de la expresión de versicano provocó una ligera disminución en los niveles de ácido hialurónico del medio de cultivo, aunque esta disminución no fue significativa ($p > 0,05$).

4.6.2. Análisis del ácido hialurónico asociado a las células mediante microscopía confocal

De la misma manera que en los casos anteriores, el siguiente paso consistió en analizar la distribución del ácido hialurónico en las células mediante la incubación con la proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada.

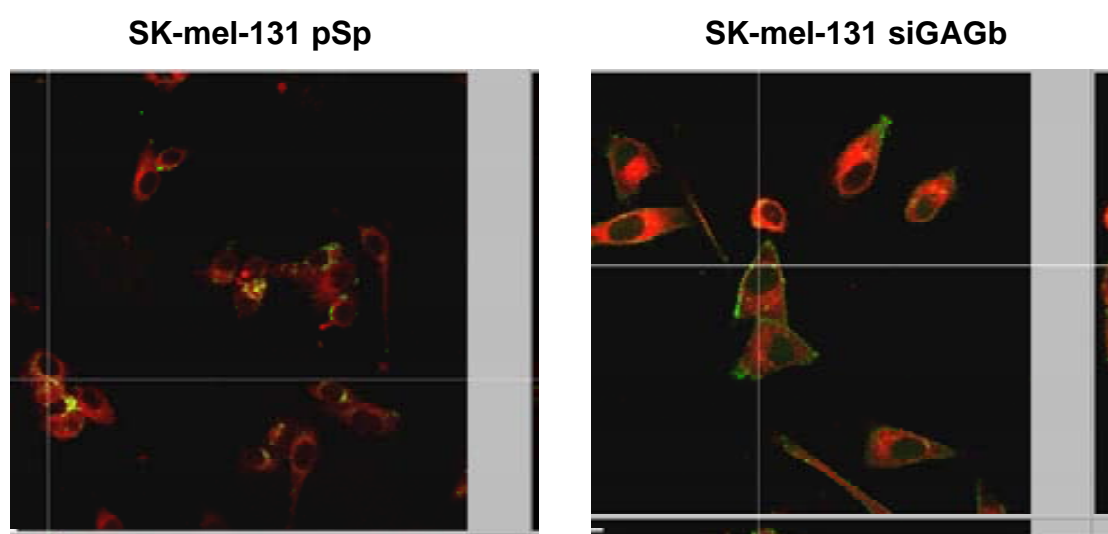


Figura 54. Análisis de la distribución del ácido hialurónico en las células. Las células se sembraron sobre cubreobjetos y al cabo de 24 horas se incubaron durante 30 minutos con el reactivo *CellMask* y se fijaron con una solución de 3% paraformaldehído y 2% sacarosa en PBS. Las muestras fueron incubadas con una solución de proteína de unión al ácido hialurónico biotinilada y posteriormente con FITC-estreptavidina. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

En la figura 54 se puede observar que el ácido hialurónico parece presentar una mayor unión a la membrana celular en el caso de la línea SK-mel-131 siGAGb en comparación con las células que sí expresan versicano. Por lo tanto, este resultado indica que el versicano podría intervenir en la regulación de la distribución del ácido hialurónico en el *pericellular coat*.

4.6.3. Ensayo de internalización de ácido hialurónico

A continuación se realizó el ensayo de internalización del complejo HA-FITC. Igual que en los casos anteriores las células se incubaron con el complejo a 4°C para

observar la unión a la membrana o bien a 37°C para analizar la capacidad de internalización de ácido hialurónico en las células.

En la figura 55 se puede observar que en el ensayo a 4°C el complejo presenta una ligera unión a la membrana de las células control, mientras que no se observa unión en el caso de las células en las que la expresión de versicano se encuentra silenciada (figuras 55A y 55B). Por el contrario, el análisis de la capacidad de internalización realizado a 37°C no mostró diferencias entre las dos líneas celulares (figuras 55C y 55D). Estos resultados nos indican que la presencia de versicano en el medio extracelular regula la unión del ácido hialurónico a la superficie celular, mientras que no intervendría en el proceso de internalización de este ácido hialurónico.

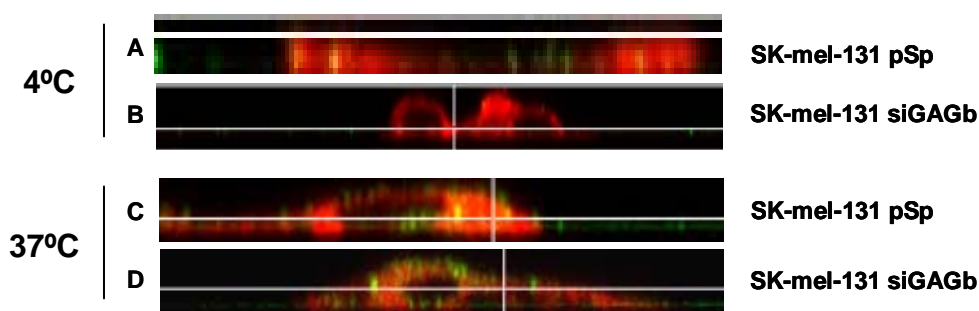


Figura 55. Ensayo de internalización del complejo HA-FITC. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 4°C (figuras A y B) o durante 5 horas a 37°C (figuras C y D) con un complejo formado por ácido hialurónico conjugado a FITC. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con el reactivo *CellMask*, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal. Se muestra un resultado representativo (n=4)

4.6.4. Ensayo de actividad hialuronidasa

Por último, se analizó el efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la actividad hialuronidasa de las células en extracciones de membrana. El resultado del análisis (figura 56) muestra que las células en las que se silenció la expresión de versicano presentan una menor actividad hialuronidasa que las células control. El hecho que no observen diferencias en los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo podría indicar un posible efecto de la inhibición de la expresión de versicano a nivel de las hialuronato sintasas.

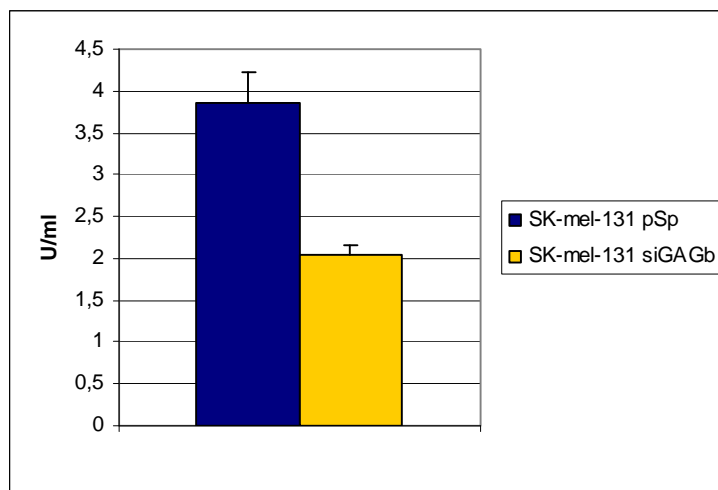


Figura 56. Análisis de la actividad hialuronidasa en extractos de membrana en la línea celular SK-mel-131 transfectada con el siRNA contra versicano y su respectivo control. Los extractos de membrana se diluyeron en el buffer de hialuronidasa y se añadieron a pozos de una placa de 96 pozos previamente recubiertos con ácido hialurónico. Tras incubar la placa durante 16 horas a 37°C, el ácido hialurónico no degradado restante en la placa se determinó en un ensayo tipo ELISA

4.7. Efecto de la inhibición de la expresión de versicano en la capacidad gelatinolítica de las células

Como se ha comentado anteriormente, los análisis realizados con anterioridad por nuestro grupo demostraron una participación de la isoforma V3 de versicano en la regulación de la actividad de la MMP-2, siendo esta menor en las células que expresan esta isoforma de versicano. Teniendo en cuenta este hecho, se creyó interesante determinar si la inhibición de la expresión de versicano podía tener alguna influencia en la capacidad de degradación de la gelatina en ensayos de zimografía.

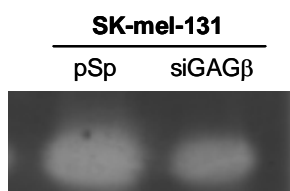


Figura 57. Ensayo de actividad gelatinolítica de la línea transfectada con el siRNA contra versicano y su respectivo control. Se recogieron medios condicionados de las líneas a analizar y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al que se añadió gelatina. Los gels fueron incubados durante 24 horas en un *buffer* para permitir la actividad gelatinolítica y teñidos posteriormente para observar la degradación de la gelatina. Se muestra un resultado representativo (n=3)

En la figura 57 se muestra el resultado del ensayo. Como se puede observar, el silenciamiento de la expresión de versicano produjo una ligera disminución de la actividad gelatinolítica de la MMP-2, indicando pues la participación del versicano en la regulación de la actividad de esta metaloproteasa.

Discusión

El melanoma es un tipo de cáncer de piel cuya incidencia ha aumentado de forma alarmante durante los últimos años. El hecho de que no existan tratamientos eficaces y que la prevención primaria no haya demostrado ser efectiva, hace que la detección de la lesión en fases iniciales sea crucial para un buen pronóstico.

A lo largo de los años, el melanoma ha sido caracterizado tanto a nivel genotípico como a nivel fenotípico, identificándose numerosas alteraciones a nivel génico (y en consecuencia a nivel proteico) que participan en la progresión de la enfermedad. Nuestro grupo describió por primera vez la presencia del proteoglicano versicano en lesiones melanocíticas y en cultivos celulares y se asoció la expresión de versicano al grado de malignidad de las células de melanoma (Touab *et al.*, 2002; Touab *et al.*, 2003; Domenzain *et al.*, 2003).

Este hecho hizo que nuestro grupo de investigación considerase el versicano como una posible diana para intentar contrarrestar el fenotipo maligno de las células de melanoma. Por ello, se decidió transducir células de melanoma con la isoforma V3 de versicano, con la hipótesis de que ésta podría competir con las isoformas grandes (V0 y V1). Tal y como se explica en el apartado de antecedentes, la expresión de la isoforma V3 en células de melanoma que expresan las isoformas V0 y V1 provocó una disminución de la capacidad de proliferación de las células, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como un aumento en la capacidad de adhesión y migración celular sobre ácido hialurónico (Serra *et al.*, 2005).

Estos efectos, no obstante, también se obtuvieron al transducir el versicano V3 en células de melanoma que no expresan de forma endógena ninguna de las isoformas, como la línea MeWo. De esta manera, se planteó la hipótesis de que estos efectos, o parte de ellos, podrían tener lugar a través de la interacción de la isoforma V3 de versicano con el receptor de membrana del ácido hialurónico CD44, dada la capacidad del versicano de interactuar con este ácido hialurónico y a que CD44 puede interactuar con otros receptores de membrana responsables de la activación de ciertas vías de señalización (Ponta *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que al menos una parte de los cambios fenotípicos observados en las líneas transducidas con la isoforma V3 de versicano son debidos a una interacción de éste con CD44, ya que la inhibición de este receptor de ácido hialurónico (SK-mel-131 siCD44 y MeWo siCD44) provocó efectos similares a los obtenidos con anterioridad en los experimentos de sobreexpresión con el versicano V3 (SK-mel-1.36-1-5 V3 y MeWo V3). Esta hipótesis queda reforzada por el hecho que la *doble transfección* no provoca, en la mayoría de

los casos, un efecto adicional en las células en comparación con cada una de las transfecciones por separado.

La inhibición de la expresión de versicano en las células SK-mel-131 (SK-mel-131 siGAGb), por otro lado, también provocó una atenuación de las características asociadas al fenotipo maligno, de manera que estos resultados también apoyan el modelo según el cual existe una competencia del versicano V3 con las isoformas grandes V0 y V1.

1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD44 MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA EN EL COMPORTAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO ¿ES CD44 MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE LA SOBREENPRESION DE V3?

Este apartado se ha estructurado de modo que se discutirán en primer lugar los efectos del silenciamiento de CD44 en las células de melanoma y, seguidamente, se compararán los efectos de la *doble transfección* (siCD44 y V3) con la transfección/transducción simple y la línea parental control.

1.1. Efecto en proliferación

Silenciamiento de CD44

Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, uno de los primeros puntos analizados tras silenciar la expresión de CD44 en las líneas de melanoma SK-mel-131 y MeWo fue el posible efecto que esta inhibición pudiera tener en la capacidad de proliferación. Así, como se puede observar en la figura correspondiente, la línea SK-mel-131 presentó una reducción del 40% de la capacidad de proliferación *in vitro* al inhibir la expresión de CD44, mientras que este descenso fue más acusado en la línea celular MeWo, siendo aproximadamente del 70% (figura 16).

En la bibliografía está ampliamente descrito que CD44 participa en la regulación de la proliferación de numerosas líneas celulares. Por ejemplo, Wang y colaboradores describieron que la inhibición de diversas isoformas de CD44 (variantes v3, v6 y v10) provoca un efecto inhibitorio en el crecimiento de la línea celular HSC-3 de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Wang *et al.*, 2009). Esta participación de CD44 en la regulación de la proliferación se ha encontrado también en otros tipos celulares como mastocitos (Takano *et al.*, 2009), células T (Kondo *et*

et al., 2009), cáncer de ovario (Bourguignon *et al.*, 2006) o cáncer de colon (Subramaniam *et al.*, 2007). En determinados casos se ha demostrado la participación específica de ciertas isoformas, especialmente CD44v6 (Misra *et al.*, 2009).

Uno de los posibles mecanismos a través del cual CD44 podría regular la capacidad de proliferación en la línea MeWo sería por interacción con la familia de receptores ErbB (Ghatak *et al.*, 2005). Estos receptores, entre los cuales se encuentra el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), están implicados en la activación de diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de ERK1/2 que está directamente implicada en la regulación del crecimiento celular. Este punto será desarrollado de forma más amplia posteriormente.

En la línea SK-mel-131, no obstante, la mutación en BRAF no permite explicar la disminución de la capacidad de proliferación mediante el mismo mecanismo. En este caso, el mecanismo propuesto se basaría en la interacción de CD44 con las proteínas del citoesqueleto (Hall, 2009). En la línea control SK-mel-131 pSNG, esta interacción permitiría una mayor capacidad de proliferación, la cual se perdería en parte al inhibir la expresión de CD44.

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

Uno de los cambios más importantes que se observó a nivel fenotípico al transducir las líneas SK-mel-1.36-1-5 (clon derivado de la línea SK-mel-131) y MeWo con la isoforma V3 de versicano fue una disminución de la capacidad de proliferación celular, especialmente en el caso de la línea celular MeWo (Serra *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos al silenciar la expresión de CD44 se corresponden, pues, con los obtenidos previamente por el grupo. Con el fin de confirmar la hipótesis planteada de que el versicano V3 podría ejercer su acción a través del receptor CD44 se realizaron ensayos de proliferación con la línea celular MeWo V3s (que expresa de forma conjunta la isoforma V3 de versicano y el siRNA contra CD44). En este caso no se observó una mayor disminución de la proliferación en comparación con las líneas MeWo V3p y MeWo LXs (figura 34). Este hecho, por tanto, indica que efectivamente los efectos observados a nivel de proliferación en las líneas transducidas con la isoforma V3 de versicano podrían ir mediados a través de CD44.

1.2. Efecto en adhesión

Silenciamiento de CD44

El siguiente punto a analizar fue el efecto de la inhibición de la expresión de CD44 en la capacidad de adhesión de las líneas celulares en estudio. CD44 es capaz de unirse a numerosas moléculas presentes en el medio extracelular como colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, condroitín sulfato u osteopontina, además de ácido hialurónico (Naor *et al.*, 2008).

Al silenciar la expresión de CD44 en la línea SK-mel-131 se observó una disminución de la capacidad de adhesión de las células a tres de los sustratos estudiados (vitronectina, fibronectina y ácido hialurónico), mientras que el descenso fue mucho más leve (no siendo significativo) en los otros dos sustratos analizados (laminina y colágeno tipo I). Este resultado parecía ser lógico dada la capacidad de CD44 de unirse a estos sustratos, tal y como se ha descrito con anterioridad. La diferencia respecto al sustrato puede estar relacionada con el hecho de que presumiblemente otras moléculas estén implicadas en el proceso: por ejemplo, se ha descrito que algunas integrinas, receptores de moléculas de MEC, pueden ser coreceptores con CD44 (Lee *et al.*, 2008). A pesar del amplio rango de moléculas con las que puede interaccionar CD44, los datos encontrados en la bibliografía se centran especialmente en ensayos de adhesión realizados sobre ácido hialurónico, los cuales relacionan directamente la capacidad de adhesión sobre este sustrato y la expresión de CD44. Este efecto ha sido observado en líneas celulares como la línea SKOV-3 de cáncer de ovario, donde la inhibición de la expresión de CD44 mediante siRNA provocó una disminución de la capacidad de adhesión celular sobre ácido hialurónico (Li *et al.*, 2008).

Sorprendentemente, la inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular MeWo provocó un aumento en la capacidad de adhesión sobre todos los sustratos analizados excepto sobre colágeno tipo I y ácido hialurónico (figura 17). Para intentar explicar este resultado, podemos basarnos en una de las características de las células MeWo que no expresan CD44, que es la acumulación de ácido hialurónico por parte de las células. En la bibliografía podemos encontrar resultados como el de Kudo y colaboradores, los cuales describen que la adición de ácido hialurónico de forma exógena al medio de cultivo provocó un aumento de la capacidad de adhesión de las células de la línea de melanoma B16F-10 (Kudo *et al.*, 2004). En otro trabajo, se ha asociado la presencia de ácido hialurónico a una mayor capacidad de adhesión en carcinoma de colon (Laurich *et al.*, 2004). Por lo tanto, podríamos atribuir esta

mayor capacidad de adhesión de la línea MeWo tras el silenciamiento de la expresión de CD44 al acúmulo de ácido hialurónico que presentan las células, mientras que este efecto no se daría en la línea celular SK-mel-131 al no presentar ésta unos niveles de ácido hialurónico tan elevados al inhibir la expresión de CD44. En cambio, en el caso de la adhesión sobre ácido hialurónico, el silenciamiento de CD44 sí provoca una disminución de la capacidad de adhesión como cabría esperar. En cualquier caso, se requieren experimentos adicionales para determinar el mecanismo de acción con mayor exactitud.

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

La expresión de la isoforma V3 de versicano en la línea celular MeWo, produjo resultados distintos a los descritos en el caso de la inhibición de CD44. En este caso, la presencia del versicano V3 no provocó cambios significativos en cuanto a adhesión a los sustratos descritos anteriormente.

En el caso de las células MeWo V3s se obtuvieron diferentes resultados según el sustrato analizado. En los ensayos de adhesión a colágeno tipo I y fibronectina, se puede observar que la acción conjunta de la presencia del versicano V3 y la inhibición de CD44 provoca en las células una mayor capacidad de adhesión en comparación con las líneas MeWo LXs y MeWo V3p (figura 35). Si observamos los niveles de adhesión de estas dos últimas líneas, podemos apreciar que en ambos casos la capacidad de adhesión es ligeramente superior (en el caso del colágeno tipo I) o superior (en el caso de la fibronectina) en comparación con el control MeWo LXp. No obstante, el efecto de la *doble transfección* en la adhesión a estos sustratos parece ser aditiva e incluso sinérgica. Esto indicaría que, aunque el versicano V3 es incapaz por sí solo de alterar la adhesión de la línea MeWo, sí que es capaz de modificar el efecto de CD44, especialmente sobre fibronectina.

En los ensayos realizados sobre laminina y vitronectina, en cambio, no se apreció ningún efecto aditivo (en el caso de la laminina los niveles de adhesión de la línea MeWo V3s son incluso ligeramente inferiores a los de la línea MeWo LXs). Este hecho parece indicar que el versicano V3 no interviene en la adhesión a estos sustratos y que los efectos observados en la línea MeWo V3s serían debidos exclusivamente a la inhibición de CD44. Por último, en los ensayos de adhesión sobre ácido hialurónico, la línea MeWo V3s presentó unos niveles de adhesión inferiores a los de las líneas MeWo LXp y MeWo V3p, mientras que en el caso de la línea MeWo LXs las diferencias no fueron significativas. Este hecho indica que, a pesar de la

presencia del versicano V3, la ausencia de CD44 resulta crítica para la adhesión de las células a ácido hialurónico.

1.3. Efecto en migración

Silenciamiento de CD44

En el caso de los ensayos de migración en las células donde se inhibió la expresión de CD44, los resultados obtenidos son, tal y como se describirá a continuación, paralelos a los obtenidos al expresar la isoforma V3 de versicano: el silenciamiento de la expresión de CD44 provocó una disminución de la capacidad de migración de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo, dándose la mayor disminución en esta última.

La participación de CD44 en los procesos de migración celular ha sido descrita por numerosos autores. Afify y colaboradores observaron una menor capacidad de migración en ensayos de *wound healing* en células de cáncer de mama que no expresan las isoformas estándar y v6 de CD44 (T47D) en comparación con otra línea que sí expresa estas isoformas (MDA-MB-468) (Afify *et al.*, 2009). También se ha demostrado que CD44 participa en el proceso de migración de la línea MIA PaCa-2 de carcinoma de páncreas, en este caso tras la inducción con fragmentos de condroitín sulfato E (Kazuki *et al.*, 2008).

Ha sido descrito por varios autores que CD44 puede interactuar con el citoesqueleto de la célula a través de proteínas como la anquirina, Rac1 o las Rho GTPasas (Bourguignon *et al.*, 2008). Por tanto, la disminución en la capacidad de migración celular observada al silenciar la expresión de CD44 es probablemente debida a una menor capacidad de la célula de reordenar su citoesqueleto y de realizar todas las modificaciones necesarias que permiten la motilidad celular. Otra causa de la menor capacidad de migración celular en el caso de la línea MeWo podría ser la menor activación de la vía ERK1/2, tal y como se describe en un trabajo realizado en células endoteliales (Chen *et al.*, 2009), por una menor interacción del complejo ácido hialurónico - CD44 con el EGFR (Wang y Bourguignon, 2006).

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

En cuanto a la capacidad de migración celular en ensayos de tipo *wound healing* en las líneas SK-mel-1.36-1-5 y MeWo, la expresión de la isoforma V3 de versicano provocó una disminución de esta capacidad en ambas líneas celulares, siendo el efecto más acusado en la línea celular MeWo (figura 36 y Laia Miquel-Serra,

tesis doctoral, 2009). Este mismo efecto ya se había descrito previamente en células musculares lisas (Lemire *et al.*, 2002).

Los experimentos realizados con la línea MeWo V3s no mostraron en este caso ningún efecto adicional en la capacidad de migración en comparación con las líneas MeWo LXs y MeWo V3p, por lo que se podría concluir que el versicano V3 realiza su acción inhibitoria de la migración celular a través de una interacción con CD44.

1.4. Efecto en invasión

Silenciamiento de CD44

En relación con la capacidad de migración celular, encontramos el proceso de invasión. En los ensayos de invasión realizados a través de diferentes substratos en pozos de tipo *Transwell*, se observó una menor capacidad de invasión en colágeno y HA en ambas líneas al inhibir la expresión de CD44.

Los resultados de otros autores están en concordancia con los obtenidos en este trabajo. El mismo trabajo de Afify y colaboradores, utilizando diferentes anticuerpos contra CD44, describe la implicación de la isoforma estándar de CD44 (CD44s) en el proceso de invasión en células de cáncer de mama en ácido hialurónico, mientras que no se observó participación de la isoforma v6 en este proceso (Afify *et al.*, 2009). En otro ensayo realizado en células de carcinoma hepatocelular se observó que al inhibir la expresión de CD44 mediante siRNA la capacidad de invasión en *ECMatrix gel* de las células se veía claramente reducida (Xie *et al.*, 2008).

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

En el caso de las células transducidas con la isoforma V3 de versicano se había observado una mayor capacidad de invasión de las células transducidas en comparación con su respectivo control (figura 37 y Serra *et al.*, 2005). Este aumento, no obstante, se perdía al tratar las células con un anticuerpo contra CD44 (Serra *et al.*, 2005).

El análisis de la capacidad de invasión de la línea MeWo V3s, mostró que esta presenta unas características similares a las de la línea MeWo LXs. Esto indicaría que CD44 participa de forma activa en el proceso de invasión celular a través de los substratos analizados, mientras que la implicación de la isoforma V3 de versicano en este proceso sería mucho menor, quedando su efecto enmascarado por la presencia

del siRNA contra CD44 (de manera similar al tratamiento de las células con un anticuerpo contra CD44 descrito en el párrafo anterior).

Tanto la capacidad de migración como la de invasión tumoral están directamente relacionadas con el proceso metastásico. En la bibliografía podemos encontrar numerosos autores que describen la participación de CD44 en la formación de metástasis. Este hecho se ha descrito en tumores como el carcinoma colorrectal (Amirghofran *et al.*, 2008), cáncer de hígado (Jha *et al.*, 2009) o neuroblastoma (Valentiner *et al.*, 2008), mientras que en otros tipos de tumores como los tumores de mama se ha establecido una relación inversa, es decir, la ausencia de CD44 es la que promovería la formación de metástasis (Mylona *et al.*, 2008).

El estudio de la implicación de CD44 en la formación de metástasis por parte de las células de melanoma no ha sido objeto de este trabajo. No obstante, sería un punto importante a analizar, dada la diversidad de resultados encontrados en la bibliografía y a los resultados obtenidos por nuestro grupo al trabajar con las líneas de melanoma humano transducidas con la isoforma V3 de versicano, ya que la línea MeWo V3 fue capaz de generar metástasis en ratones BALB/C *nu/nu*, mientras que no se observó la formación de metástasis en el caso de la línea control MeWo LX (Miquel-Serra *et al.*, 2006).

1.5. Efecto en señalización

Silenciamiento de CD44

Los cambios fenotípicos producidos por la inhibición de la expresión de CD44 podrían ser debidos a alteraciones en la activación de ciertas vías de señalización. Al tratar las células MeWo siCD44 con EGF a diferentes tiempos, se observó una menor activación de la vía ERK1/2 en las células transfectadas con el siRNA contra CD44.

Esta relación entre la expresión de CD44 y la activación de la vía ERK1/2 ha sido descrita por diversos autores. En uno de estos trabajos se observó que una elevada expresión de CD44 en células musculares lisas de aorta se relacionaba con una elevada actividad de la vía ERK1/2, mientras que la utilización de un anticuerpo contra CD44 provocó una disminución del estado de activación de la vía (Vigetti *et al.*, 2008). Este mismo efecto se observó en células de timoma: al sobreexpresar CD44, sobre todo en el caso de la isoforma CD44v6, se observó un incremento en el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2, indicando una mayor actividad de la vía (Marhaba *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, una mayor actividad de la vía se ha asociado a una mayor capacidad de proliferación y migración (Fu *et al.*, 2009), por lo

que los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a estos dos procesos podrían explicarse por la menor activación de la vía ERK1/2.

En el caso de la línea SK-mel-131, la inhibición de la expresión de CD44 no produjo ningún cambio en el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 al tratar las células con EGF. Esto se explica por el hecho que la línea SK-mel-131 presenta la mutación V600E en BRAF, como ya se ha descrito anteriormente. Esta mutación provoca que la vía esté constitutivamente activa y, por lo tanto, las modificaciones realizadas *upstream* no tendrán ningún efecto en el estado de fosforilación de ERK1/2. Este hecho se observó también en la línea SK-mel-1.36-1-5 transducida con la isoforma V3 de versicano, ya que dicha línea también presenta esta mutación en BRAF (Laia Miquel-Serra, tesis doctoral, 2009).

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

En el caso de la isoforma V3 de versicano, al tratar la línea MeWo V3 y su control MeWo LX con el factor de crecimiento epitelial (EGF) se observó una menor activación de la vía MAPK ERK1/2 en las células que expresan la isoforma V3 de versicano. Este hecho puede estar relacionado con la presencia de dominios EGF-like en el dominio G3 del versicano. En el caso de la línea SK-mel-1.36-1-5, no se observaron diferencias de activación ya que también presenta la mutación descrita en BRAF (Laia Miquel-Serra, Tesis Doctoral, 2009).

Dado que la presencia de la isoforma V3 de versicano produjo los cambios descritos en la línea MeWo a nivel de la vía MAPK ERK1/2, se decidió estudiar mediante ensayos de inmunoprecipitación la interacción entre los diferentes receptores de la familia ErbB. Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación mostraron tan sólo una interacción entre los receptores EGFR (ErbB1) y ErbB2, la cual no se vio afectada por la presencia de versicano V3 (Laia Miquel-Serra, tesis doctoral, 2009). Este mismo complejo (CD44-EGFR-ErbB2) fue descrito años atrás en diferentes líneas de cáncer de mama (Wobus *et al.*, 2002). La interacción entre CD44 y los receptores ErbB ha sido caracterizada por diferentes autores y en diferentes tipos de células tumorales (Bourguignon *et al.*, 2006; Pályi-Krekk, 2008). En todos los casos, se ha descrito que CD44 participa de forma positiva en la activación de la vía ERK1/2. En nuestro caso se observó una menor unión del receptor CD44 al complejo EGFR-ErbB2, hecho que podría estar relacionado con la menor capacidad de activación de la vía ERK1/2 (Laia Miquel-Serra, tesis doctoral, 2009).

Al analizar la activación de la vía ERK1/2 en la línea MeWo V3s, la disminución de la actividad fue comparable a las líneas MeWo LXs y MeWo V3p. Estas diferencias

de activación respecto al control MeWo LXp serían más acusadas a tiempos cortos de tratamiento (2 y 5 minutos). Por lo tanto, dados los resultados obtenidos por nuestro grupo y aquellos descritos en la bibliografía, podríamos afirmar que la inhibición de la expresión de CD44 en las líneas analizadas provoca una disminución de la actividad de la vía ERK1/2. En el caso de la línea MeWo V3, la isoforma V3 de versicano actuaría alterando la interacción entre CD44 y el complejo EGFR-ErbB2, lo que desembocaría en una menor activación de la vía.

Silenciamiento de CD44

La otra vía MAPK analizada en este trabajo, la vía de p38, mostró un comportamiento similar al de la vía ERK1/2. De la misma manera, la inhibición de la expresión de CD44 mediante la transfección con el siRNA no provocó diferencias de activación en la línea SK-mel-131 (por una falta de activación de la vía por acción del EGF), mientras que en la línea MeWo la activación de la vía fue menor en el caso de las células donde la expresión de CD44 se encuentra silenciada.

Este efecto de inhibición conjunta de las vías ERK1/2 y p38 también se ha observado en otras líneas celulares. En la línea HT-29 de cáncer de colon, por ejemplo, el tratamiento de las células con ácido ursólico provocó una disminución de la fosforilación del EGFR, que fue acompañada de una disminución del grado de fosforilación de ERK1/2 y p38 (Shan *et al.*, 2009). En el caso de melanoma, Estrada y colaboradores han descrito recientemente que en este tipo de tumor ambas vías pueden presentar un estado de activación elevado por pérdida de *loop* negativo de p38 hacia ERK1/2 (Estrada *et al.*, 2009). En contraposición, otros grupos han descrito que una baja activación de una de las dos vías puede ir acompañada de una elevada activación de la otra, como han descrito Liu y Chang, quienes observaron una disminución de los niveles de fosforilación de ERK1/2 y un aumento en el caso de p38 al inducir apoptosis en células de leucemia con ácido araquidónico (Liu y Chang, 2009).

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

La inhibición conjunta de estas dos vías ya fue observada por nuestro grupo con anterioridad en el caso de la línea celular MeWo transducida con la isoforma V3 de versicano, la cual presentó una menor capacidad de activación de la vía de p38 al ser tratada con EGF (Laia Miquel-Serra, tesis doctoral, 2009). En el caso de la línea MeWo V3s, la disminución de los niveles de activación fue igual a la obtenida en el caso de la línea MeWo LXs. En la línea MeWo V3p también se observó una menor

activación de la vía, aunque no tan marcada como en el caso de las líneas donde se silenció la expresión de CD44. Esto parece indicar que el efecto del versicano V3 tendría lugar a través de una interacción con CD44, siendo mayor este efecto cuando se inhibe directamente la expresión de CD44.

1.6. Efecto en el metabolismo del ácido hialurónico

Distribución del ácido hialurónico: efecto del silenciamiento de CD44

Tal y como se ha descrito con anterioridad, CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico en la membrana celular. Por ello, el silenciamiento de su expresión produjo efectos muy evidentes a nivel del metabolismo de este polisacárido, especialmente en la línea celular MeWo. El primero de los experimentos relacionados con este aspecto consistió en analizar los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo de las líneas en estudio. En el apartado de resultados podemos ver cómo la inhibición de la expresión de CD44 produjo un incremento de la concentración de ácido hialurónico en la línea MeWo siCD44, en comparación con su control MeWo pSNG. Este efecto ya se ha descrito con anterioridad en otros trabajos, como es el caso de Tammi y colaboradores que describieron una acumulación de ácido hialurónico tras el bloqueo del receptor CD44 (Tammi *et al.*, 2001).

Con el fin de determinar la distribución de este exceso de ácido hialurónico observado, se utilizó una proteína de unión a ácido hialurónico biotinilada, que permitió comprobar que el incremento de los niveles de ácido hialurónico en la línea MeWo pSNG se debe a una acumulación de este en la membrana celular, tal y como se demuestra en las fotografías tomadas en el microscopio confocal.

Está descrito que CD44 participa en el proceso de internalización del ácido hialurónico en la célula, el cual es un paso importante durante el proceso de degradación (Knudson *et al.*, 2002). Por ello, se realizó un ensayo de internalización para observar el *uptake* del ácido hialurónico hacia el citoplasma celular. En el caso de los ensayos realizados a 4°C se observó que las líneas que expresan el siRNA contra CD44 (SK-mel-131 siCD44 y MeWo siCD44) presentan una menor capacidad de unión al ácido hialurónico añadido de forma exógena. En los ensayos a 37°C, tal y como se había predicho, la ausencia de CD44 provocó que el ácido hialurónico marcado con FITC añadido al medio de cultivo se acumulara en el exterior de la célula, mientras que en las células control la marca se observa en todo el citoplasma, indicando la capacidad de estas células de internalizar el complejo. De esta manera, este experimento refuerza los resultados obtenidos en la citoquímica de ácido

hialurónico. La participación de CD44 en el proceso de internalización del ácido hialurónico ha sido descrita con anterioridad en numerosos trabajos, especialmente por el grupo de Knudson (Thankamony y Knudson, 2006; Embry y Knudson, 2003; Hua *et al.*, 1993).

Distribución del ácido hialurónico: efecto de la *doble transfección*

Los resultados obtenidos en las células que presentan la *doble transfección* parecen indicar que esta no tiene ningún efecto adicional sobre los niveles y distribución del ácido hialurónico en las células. En el caso de los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo, la concentración en el medio condicionado de la línea MeWo V3s fue superior a la de las líneas MeWo LXp y MeWo V3p pero sin alcanzar los niveles de la línea MeWo LXs. Estas diferencias podrían deberse a una menor eficiencia en la inhibición de la expresión de CD44 en la línea MeWo V3s.

En el caso de la distribución del ácido hialurónico en la célula, la línea MeWo V3s presenta una acumulación de ácido hialurónico en la membrana celular similar al de la línea MeWo LXs, mientras que la línea MeWo V3p presentó unos niveles de ácido hialurónico inferiores a estas dos líneas, aunque superiores a los de la línea control MeWo LXp.

En los ensayos de internalización, los resultados obtenidos en la línea MeWo V3s (figura 44) están de acuerdo con los descritos para las líneas SK-mel-131 y MeWo. De la misma manera, los ensayos a 4°C demuestran que las células que no expresan CD44 (MeWo LXs y MeWo V3s) presentan una menor capacidad de unión a ácido hialurónico en comparación con sus respectivos controles. En los ensayos realizados a 37°C se puede observar que las células donde la expresión de CD44 se encuentra silenciada (MeWo LXs y MeWo V3s) la capacidad de internalizar el complejo de ácido hialurónico es menor. En el caso de la línea MeWo V3p también se observa una menor capacidad de internalización, aunque el efecto producido por la presencia del versicano V3 no sería tan acusado como en las líneas en las que se inhibió la expresión de CD44.

Podemos concluir, por lo tanto, que los efectos observados en la línea MeWo V3s serían debidos principalmente al silenciamiento de la expresión de CD44 y en menor medida a la presencia del versicano V3.

Degradación del ácido hialurónico: efecto del silenciamiento de CD44

La degradación del ácido hialurónico requiere un proceso de internalización, el cual está precedido por una degradación previa de las largas cadenas de este

polisacárido por parte de la hialuronidasa de membrana Hyal-2 en fragmentos de aproximadamente 20 kDa, que son captados por la vía endocítica hasta los lisosomas, donde son degradados completamente por la Hyal-1. Dada la acumulación de ácido hialurónico observada en las células donde la expresión de CD44 se encuentra silenciada, se decidió analizar el efecto de este silenciamiento en la actividad hialuronidasa de las líneas en estudio.

Los resultados de los análisis muestran que en el caso de la línea celular MeWo, la inhibición de la expresión de CD44 provocó una disminución muy pronunciada de la actividad hialuronidasa en extractos de membrana. Esta disminución en la actividad sería debida, principalmente, a una menor actividad de la hialuronidasa Hyal-2. En un trabajo de Harada y Takahashi podemos encontrar resultados similares a los descritos en este trabajo. En este caso, se describió que tanto la hialuronidasa Hyal-1 (intracelular) como Hyal-2 (de membrana) tan sólo eran capaces de degradar el ácido hialurónico en presencia de CD44, tanto en ensayos realizados *in vivo* como en ensayos enzimáticos (Harada y Takahashi, 2007). Se ha propuesto por tanto, que Hyal-2 y CD44 interactúan en la membrana, siendo esta interacción necesaria para la completa actividad de Hyal-2. Nuestros resultados están de acuerdo con este modelo.

Si analizamos los resultados obtenidos en la línea MeWo V3s y sus respectivos controles (figura 45), podemos observar que tanto el silenciamiento de CD44 como la expresión del versicano V3 (líneas MeWo LXs, MeWo V3p y MeWo V3s) provocan una disminución de la actividad hialuronidasa de las células. Dado que en estos tres casos la actividad obtenida es muy similar, se puede afirmar que el efecto producido por la presencia de la isoforma V3 de versicano en la actividad hialuronidasa iría mediado a través de CD44.

Así pues, podemos concluir que la inhibición de la expresión de CD44 provoca una acumulación de ácido hialurónico en el medio y en la superficie celular en la línea celular MeWo. Esta acumulación sería debida a una alteración en la capacidad de internalización del ácido hialurónico por parte de la célula así como a una disminución de la actividad hialuronidasa. En el caso de las células transducidas con la isoforma V3 de versicano, la alteración más importante se produciría a nivel de degradación del ácido hialurónico (seguramente por una interacción de Hyal2 con CD44), lo que también repercutiría en la capacidad de internalización de este.

1.7. Efecto en la actividad gelatinolítica

Silenciamiento de CD44

El último aspecto analizado en este apartado fue la influencia de la inhibición de la expresión de CD44 en la actividad gelatinolítica de las células. Está descrito que CD44 interviene en la regulación de la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9. En el caso de las líneas celulares utilizadas en este trabajo, tan sólo se detectó actividad debida a la acción de la MMP-2, siendo menor esta actividad en las líneas en las que CD44 se encuentra silenciado (figura 33).

Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente sobre la asociación de CD44 con las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Lou *et al.*, 2005; Kinugasa *et al.*, 2004; Yu y Stamenkovic, 1999). Asimismo, se ha observado que la activación de CD44 por tratamiento de las células con ácido hialurónico provoca un incremento de la actividad de la MMP-2, acción que iría mediada por proteínas como PKC α , PKC δ o Rac1 (Kim *et al.*, 2008). Por tanto, podemos concluir que la supresión de la expresión de CD44 provoca una disminución de la actividad gelatinolítica de las células asociada a MMP-2.

Doble transfección: expresión de V3 y silenciamiento de CD44

Experimentos previos realizados por nuestro grupo, demostraron que la expresión de la isoforma V3 de versicano también provoca una disminución de la actividad de la MMP-2 en las líneas analizadas. Estos resultados quedan corroborados por los ensayos realizados con la línea MeWo V3p y sus controles. En la figura 46 se puede observar como tanto la presencia del versicano V3 como la inhibición de la expresión de CD44 producen un marcado descenso de la actividad gelatinolítica de las células. La doble transfección no produjo un efecto adicional en la modificación de la actividad de la MMP-2, por lo que podemos decir que los efectos producidos por la presencia del versicano V3 pueden ir mediados a través de CD44.

2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VERSICANO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA EN EL COMPORTAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK-mel-131

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la transducción de la línea SK-mel-1.36-1-5 (clon derivado de la línea SK-mel-131) con la isoforma V3 de versicano produjo cambios en diferentes aspectos de la fisiología celular, como proliferación, adhesión o migración (Laia Miquel-Serra, tesis doctoral, 2009). Uno de los modelos postulados para intentar explicar estos cambios observados consistía en una competición del versicano V3 con las isoformas expresadas de forma endógena por la línea SK-mel-1.36-1-5 (isoformas V0 y V1). En el apartado anterior, se ha demostrado que parte de los cambios observados podían ser atribuidos a una interacción del versicano V3 con el receptor CD44. No obstante, con el fin de analizar si también podría existir una competición con las isoformas V0 y V1 decidimos analizar el comportamiento de la línea celular SK-mel-131 tras la inhibición mediante siRNA de la expresión de estas dos isoformas. En este caso, las células SK-mel-131 siGAGb deberían mostrar un comportamiento similar a aquellas en que se había sobreexpresado el versicano V3.

2.1. Efecto en proliferación

Uno de los primeros cambios observados al transducir la línea SK-mel-1.36-1-5 (clon de SK-mel-131) con la isoforma V3 de versicano fue una disminución de la capacidad de proliferación celular (Serra et al., 2005). En los ensayos de proliferación realizados en la línea SK-mel-131 siGAGb se puede observar cómo la ausencia de las isoformas V0 y V1 de versicano produce un efecto negativo en la proliferación celular. Este efecto, sumado al producido por la inhibición de CD44, podría explicar la menor capacidad de proliferación observada en las células transducidas con la isoforma V3 de versicano.

El versicano ha demostrado ser un inductor de la proliferación de numerosas líneas celulares. Así, en células endoteliales (Huang *et al.*, 2006) y preadipocitos (Zizola *et al.*, 2007) su inhibición mediante RNA de interferencia o por adición de xilósido al medio (respectivamente) produjo una disminución de la capacidad de proliferación, mientras que la sobreexpresión de la isoforma V1 provocó un aumento de la capacidad de proliferación en fibroblastos (Sheng *et al.*, 2005). En el caso de células cancerosas, la sobreexpresión de versicano suele ir asociada a un fenotipo

maligno y por tanto a una mayor capacidad de proliferación. Nuestro grupo ha descrito que la adición de versicano purificado a cultivos celulares de melanoma incrementa su capacidad de proliferación (Touab *et al.*, 2002). En otros tipos de tumor, también se ha observado que la inhibición de la expresión de versicano produce una disminución de la capacidad de proliferación, como es el caso del trabajo de Creighton y colaboradores, que describieron una menor capacidad de proliferación *in vivo* en células de adenocarcinoma de pulmón donde se silenció la expresión de versicano (Creighton *et al.*, 2005).

Por tanto podemos concluir que la inhibición de la expresión de versicano en la línea celular SK-mel-131 tiene un efecto negativo sobre su capacidad de proliferación. Este efecto vendría dado por un cambio en las propiedades de la matriz extracelular, cuya estructura pasaría a ser menos propicia para la proliferación.

2.2. Efecto en adhesión

El versicano ha sido siempre descrito como una molécula capaz de inhibir la adhesión celular. Los resultados de este trabajo están de acuerdo con esta característica, ya que en los ensayos de adhesión realizados con la línea SK-mel-131 siGAGb la capacidad de adhesión de esta fue mayor en comparación con la línea control en todos los sustratos analizados, excepto sobre vitronectina y ácido hialurónico (figura 48).

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos que corroboran este hecho. Nuestro mismo grupo describió años atrás que la adición de versicano purificado al medio de cultivo en la línea SK-mel-1.36-1-5 provoca una disminución de la capacidad de adhesión de esta sobre los sustratos colágeno tipo I y fibronectina (Touab *et al.*, 2002). En otro trabajo realizado con diferentes líneas de cáncer de próstata, se observó que la adición de medio condicionado proveniente de células productoras de versicano provoca, de la misma manera que en el caso anterior, una disminución de la capacidad de adhesión de las células sobre fibronectina y laminina (Sakko *et al.*, 2003). Por el contrario, un trabajo de Yang y colaboradores, realizado con diferentes líneas celulares de disco intervertebral, describe que la adición del dominio G3 de versicano al medio de cultivo provoca un aumento de la capacidad de adhesión celular (Yang *et al.*, 2003). No obstante, este resultado no puede compararse con los descritos anteriormente, ya que el resto de dominios de versicano han demostrado influir de manera muy importante en las

características de la molécula, especialmente a nivel de las cadenas de condroitín sulfato unidas al dominio G2.

Por tanto, podemos afirmar que los resultados obtenidos en este trabajo corroboran los resultados obtenidos por el grupo anteriormente, demostrando que la inhibición de la expresión de versicano provoca un incremento de la capacidad de adhesión de las células de melanoma sobre diferentes sustratos y confirmando el papel anti-adhesivo de la molécula.

2.3. Efecto en migración

El papel del versicano como inhibidor de la capacidad de adhesión celular está relacionado con su influencia en la regulación del proceso de migración. Así, la menor capacidad de adhesión provocada por la presencia del versicano, proporcionará a las células una mayor capacidad para migrar.

Los resultados descritos en el punto 3.4 del apartado de resultados muestran cómo el silenciamiento de la expresión de versicano produce un efecto inhibitorio de la capacidad de migración de las células en ensayos de tipo *wound healing* (figura 49). Resultados similares han sido descritos con anterioridad por otros grupos. En un trabajo realizado con células de glioma, se demostró que el tratamiento de las células con TGF- β 2 provocaba un aumento de la capacidad de migración celular en ensayos de *wound healing* y que este aumento está asociado a un incremento en la producción de versicano por parte de las células (Arslan *et al.*, 2007). En un experimento similar al descrito en este trabajo, la inhibición de la expresión de versicano mediante RNA de interferencia también provocó una disminución de la capacidad de migración de células musculares lisas en un ensayo de *wound healing* (Huang *et al.*, 2006).

En conclusión, la inhibición de la expresión de versicano en la línea celular de melanoma SK-mel-131 provoca una disminución de la capacidad de migración celular. Esta disminución podría deberse a una alteración del complejo versicano - ácido hialurónico - CD44 y de la interacción de este complejo con el citoesqueleto, ya que los resultados obtenidos en este caso son muy similares a los obtenidos en los experimentos en los que se silenció la expresión de CD44.

2.4. Efecto en invasión

Tal y como se ha comentado anteriormente, los resultados obtenidos en los ensayos de invasión están directamente relacionados con los resultados de los ensayos de migración. La inhibición de la expresión de versicano provocó una disminución de la capacidad de invasión celular a través de los sustratos analizados (colágeno tipo I y ácido hialurónico) en ensayos de invasión en *Transwells*. En un trabajo realizado con células de adenocarcinoma de próstata, se describe que el tratamiento de las células con versicano purificado, en presencia de ácido hialurónico, provoca un aumento de la invasión celular en ensayos en cámaras Boyden (Ricciardelli *et al.*, 2007). Los análisis de dos líneas de astrocitoma, demostraron que la motilidad celular está directamente relacionada con la expresión de versicano, el cual ejercería su efecto a través del dominio G1 (Ang *et al.*, 1999).

El papel del versicano en la regulación de la capacidad de invasión celular, no obstante, depende en gran medida de la línea celular analizada. Existen trabajos en los que se describe al versicano como una molécula inhibidora de la capacidad de invasión celular. Es el caso, por ejemplo, de los ensayos realizados con células multipotentes de la cresta neural, donde la presencia de versicano en el medio tuvo un efecto inhibitorio de la capacidad de invasión en una matriz de fibronectina, debido a una inhibición crítica de la capacidad de adhesión a este sustrato (Dutt *et al.*, 2006b). En este caso, las isoformas V0 y V1 de versicano ejercerían un papel de "guía" en el proceso de migración de las células de la cresta neural hacia sus tejidos diana durante el proceso de embriogénesis.

Nuestros resultados, pues, están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros grupos en diferentes líneas tumorales. Así, podemos concluir que la inhibición de la expresión de versicano tiene un efecto inhibitorio en la capacidad de invasión celular en la línea de melanoma analizada. Por el contrario, el versicano puede influir de manera diferente en esta capacidad de migración/invasión dependiendo del contexto fisiológico.

2.5. Efecto en señalización

A lo largo de los diferentes apartados de este trabajo, se ha comentado en repetidas ocasiones que la línea celular SK-mel-131 presenta una mutación de la MAPKKK BRAF que la hace constitutivamente activa. Este hecho hace que sea difícil producir modificaciones de las vías relacionadas con esta proteína actuando en

niveles superiores. Nuestros resultados han demostrado que el silenciamiento de versicano no modifica el estado de activación de la vía p38, cuya activación por EGF en la línea SK-mel-131 control es nula o leve.

En el caso de la línea SK-mel-131 siCD44, se ha descrito en este mismo apartado que no se observaron diferencias en ninguna de las vías analizadas tras el tratamiento con EGF (ERK1/2, p38). También se ha discutido que existe una relación entre todas las vías de señalización analizadas en este trabajo. Por tanto, podríamos decir que el potente efecto de la mutación en BRAF podría estar enmascarando un posible efecto de la inhibición de versicano en estas vías.

Uno de los posibles experimentos a realizar para estudiar la influencia del versicano en la activación de estas vías de señalización sería añadir versicano purificado al medio de cultivo de una línea celular que no lo exprese de forma endógena (como sería el caso de la línea MeWo), o bien inhibir la expresión de versicano tal y como se ha hecho en este trabajo, pero utilizando una línea celular que exprese versicano de forma endógena y que no presente ninguna mutación en las vías a analizar.

2.6. Efecto en el metabolismo del ácido hialurónico

Una de las principales moléculas con las que es capaz de interactuar el versicano es el ácido hialurónico, a través de su dominio globular G1. Por ello se decidió analizar qué efecto tenía el silenciamiento de la expresión de versicano en el metabolismo del ácido hialurónico.

En el primer experimento realizado, se analizó el contenido de ácido hialurónico en medios condicionados provenientes de cultivos de las líneas SK-mel-131 pSp y SK-mel-131 siGAGb. Como se puede observar en la figura 53, los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo de la línea SK-mel-131 siGAGb fueron menores que los encontrados en la línea control, aunque estas diferencias no fueron significativas. En ensayos realizados en fibroblastos, se observó que la presencia de una molécula de versicano con menor capacidad de unión a ácido hialurónico provocó una disminución de la cantidad total de ácido hialurónico en extractos celulares y matriz extracelular, mientras que los niveles fueron mayores cuando se analizaron los medios de cultivo (Suwan *et al.*, 2009). En otros estudios, también se han asociado de forma directa los niveles de versicano con los niveles de ácido hialurónico (Berdiaki *et al.*, 2008; Faggian *et al.*, 2007). En nuestro caso, se podría asociar el descenso en los niveles de ácido hialurónico a una menor capacidad de retención por

parte de la matriz extracelular, aunque como ya se ha comentado la diferencia observada no fue significativa.

Esta diferencia observada en los niveles de ácido hialurónico en el medio de cultivo podría explicarse por el resultado obtenido en el experimento siguiente. En la figura 54 se ha mostrado cómo la línea donde la expresión de versicano se encuentra silenciada presenta un ligero aumento en la unión de ácido hialurónico a la membrana celular. La ausencia de una de sus moléculas de unión en el medio de cultivo podría provocar que el ácido hialurónico presentara una mayor unión a la membrana celular, a través de algunos de sus receptores como CD44, y por tanto la concentración de ácido hialurónico en el medio de cultivo sería menor.

En el caso de los ensayos de internalización, la ausencia de versicano no provocó cambios en la capacidad de la célula de internalizar el complejo en comparación con la línea control SK-mel-131 pSp. Por ello, podemos concluir que el versicano no influye en la regulación de este proceso.

Por último, se analizó la influencia de la inhibición de la expresión de versicano en la actividad hialuronidasa en extractos de membrana. La figura 56 muestra el resultado del ensayo. Sorprendentemente, el silenciamiento de la expresión de versicano provocó una disminución de la actividad hialuronidasa de la célula, siendo esta disminución de aproximadamente el 50%. En la literatura no existen trabajos en los que se relacione el versicano con la actividad hialuronidasa, de manera que es difícil proponer un modelo que lo explique. Una posible explicación vendría dada por la mayor presencia de ácido hialurónico observada en la membrana celular y descrita anteriormente. Este exceso de ácido hialurónico podría interactuar con su receptor CD44, de manera que provocase un bloqueo del receptor y una disminución de la actividad hialuronidasa, ya que como se ha demostrado en apartados anteriores CD44 participa de forma activa en la regulación de este proceso.

2.7. Efecto en la actividad gelatinolítica

El último aspecto analizado en la línea SK-mel-131 siGAGb fue la influencia de la inhibición de la expresión de versicano en la actividad gelatinolítica de las células. Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, la ausencia de versicano provocó una disminución de la actividad de la metaloproteasa MMP-2. A pesar de que se ha descrito que MMP-2 puede participar en la degradación de versicano (Passi *et*

al., 1999), no existe ninguna referencia acerca de la posible regulación de la actividad MMP-2 por parte del versicano.

Un posible mecanismo que podría explicar este efecto sería una mediación de CD44 en el proceso. Está descrito, como se ha discutido anteriormente, que CD44 participa en la regulación de la actividad de la metaloproteasa MMP-2. También podemos encontrar en la bibliografía que las cadenas de glicosaminoglicanos pueden unirse a CD44 (Kawashima *et al.*, 2000). En un modelo en el que encontramos versicano en el espacio extracelular, las cadenas de glicosaminoglicanos asociadas podrían participar en la activación de CD44 y por tanto en la regulación de la actividad MMP-2. Al silenciar la expresión de versicano, la activación de CD44 sería menor, lo cual desembocaría en una menor actividad gelatinolítica por parte de la MMP-2.

3. MODELOS PROPUESTOS

Dados los resultados discutidos a lo largo de este apartado, proponemos los siguientes modelos para cada una de las líneas analizadas.

3.1. Línea celular MeWo

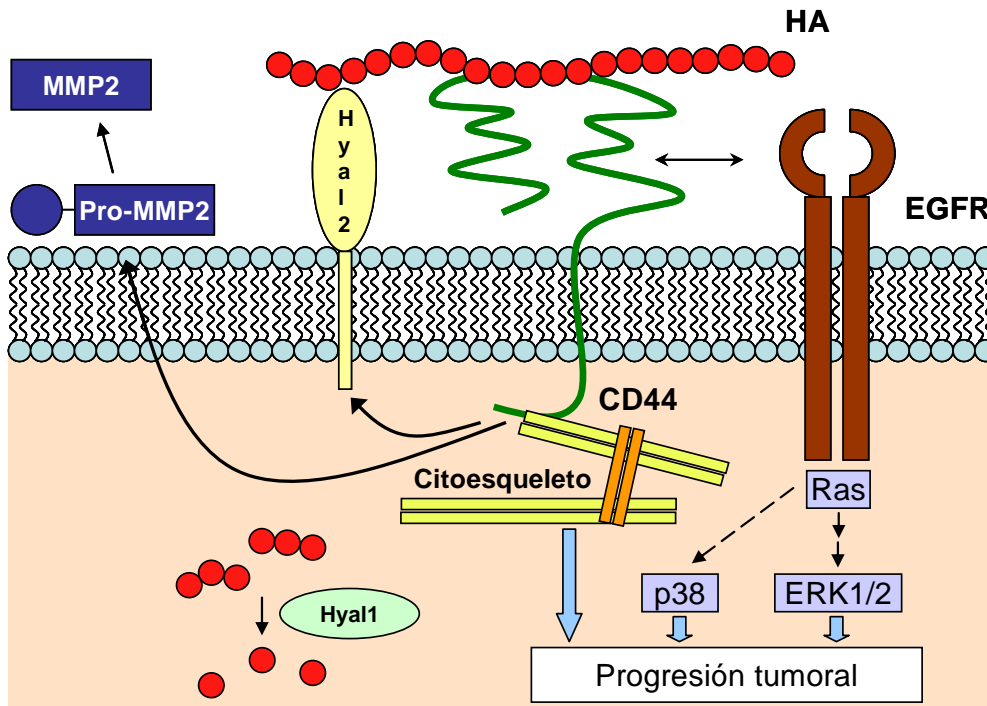


Figura 58. Modelo propuesto para la línea MeWo pSNG

En el caso de la línea celular MeWo (figura 58), la interacción de CD44 tanto con el EGFR como con el citoesqueleto de la célula, tendría un efecto positivo en la capacidad de proliferación y migración tumorales. La presencia de CD44 también regularía tanto la actividad MMP-2 como la actividad de la hialuronidasa Hyal2.

Al silenciar la expresión de CD44 (figura 59), los niveles de activación de las vías ERK1/2 y p38 se verían reducidos por una menor actividad del EGFR. Asimismo, la estructura del citoesqueleto se vería alterada, de manera que tanto la capacidad de proliferación como la de migración celular se verían considerablemente reducidas. De la misma manera, la ausencia de CD44 provocaría una disminución de la actividad de los enzimas MMP-2 y Hyal-2, provocando en este último caso (unido a la pérdida de la capacidad de internalización) un acúmulo de ácido hialurónico en la superficie celular que estaría implicado en el aumento de la capacidad de adhesión.

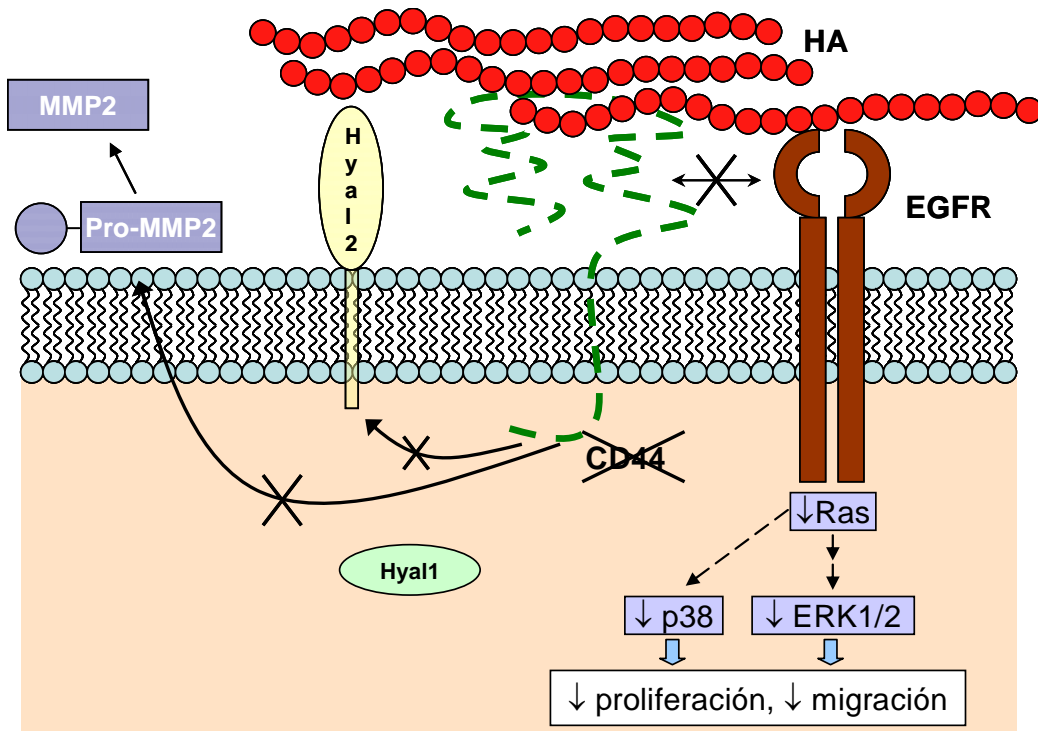


Figura 59. Modelo propuesto para la línea MeWo siCD44

Al darse de manera conjunta la expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44, el modelo sería muy parecido al anterior, ya que los efectos observados son prácticamente idénticos en los dos casos.

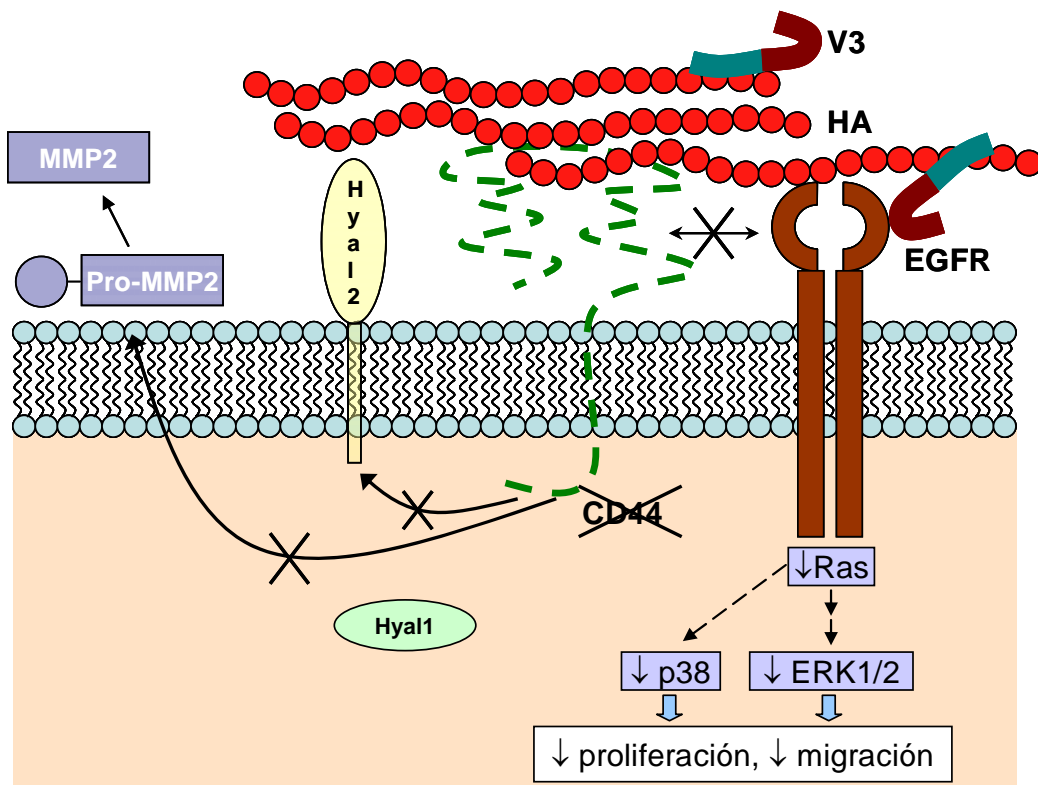


Figura 60. Modelo propuesto para la línea MeWo V3 siCD44

En todos los aspectos estudiados, el efecto de V3s ha sido muy similar al de V3, excepto en la adhesión a fibronectina y colágeno, invasión y metabolismo del ácido hialurónico, lo que sugiere que en estos procesos V3 actúa por otros mecanismos además de a través de CD44 (por ejemplo, integrinas).

3.2. Línea celular SK-mel-131

En la línea celular SK-mel-131, la activación constitutiva de la vía ERK1/2 tiene una importancia fundamental en el comportamiento de estas células (Figura 61). Los efectos observados al inhibir tanto la expresión de CD44 como la de versicano, a nivel de proliferación y migración, no pueden explicarse por una disminución de la actividad de las vías de señalización.

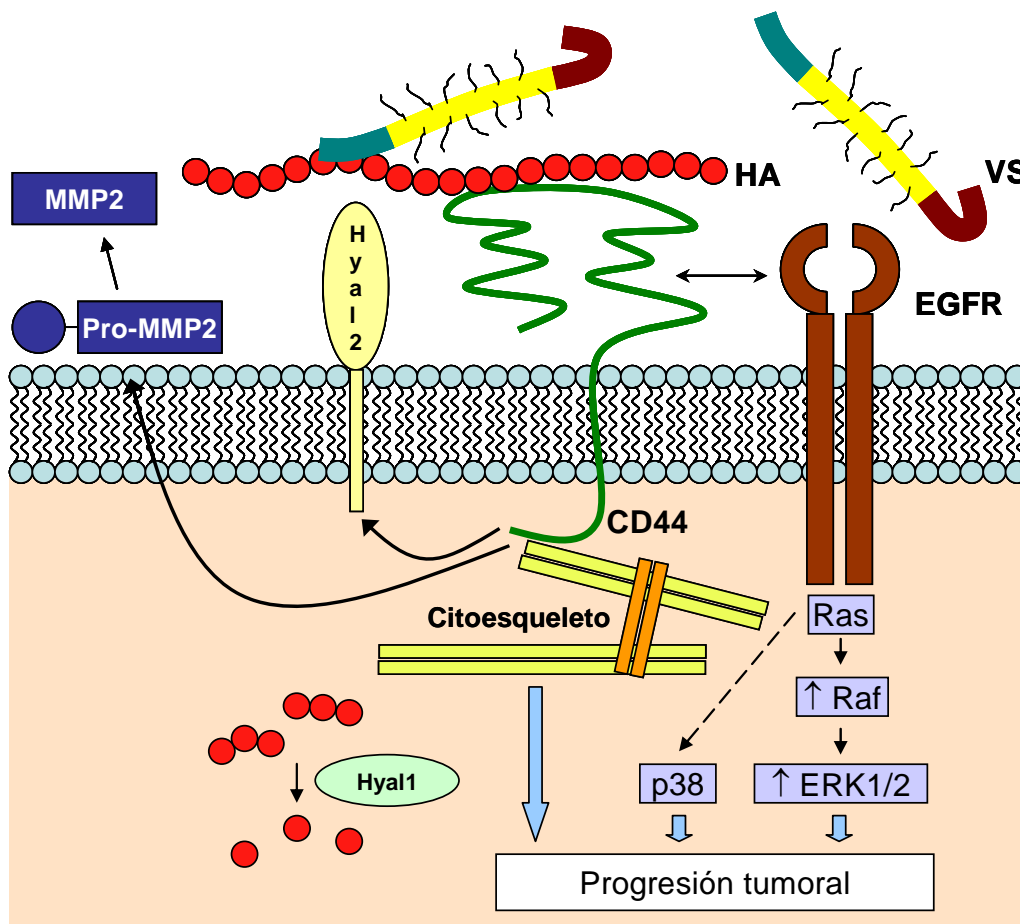


Figura 61. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 (pSNG / pSp)

Al inhibir la expresión de CD44 (figura 62), la reestructuración del citoesqueleto provocaría que la capacidad de proliferación y migración celular se viese alterada. La capacidad de internalización del ácido hialurónico así como la

actividad MMP-2 también se verían reducidas por la ausencia de CD44, mientras que la actividad hialuronidasa no se vería modificada.

Cuando se inhibe la expresión de versicano, la ausencia de este provoca una modificación de la composición de la matriz extracelular, especialmente por la ausencia de las cadenas de glicosaminoglicanos, siendo esta nueva matriz menos propicia para la proliferación y la migración y favorable para la adhesión. Asimismo, la ausencia de versicano también provocaría una disminución de las actividades MMP-2 y hialuronidasa de la célula (figura 63).

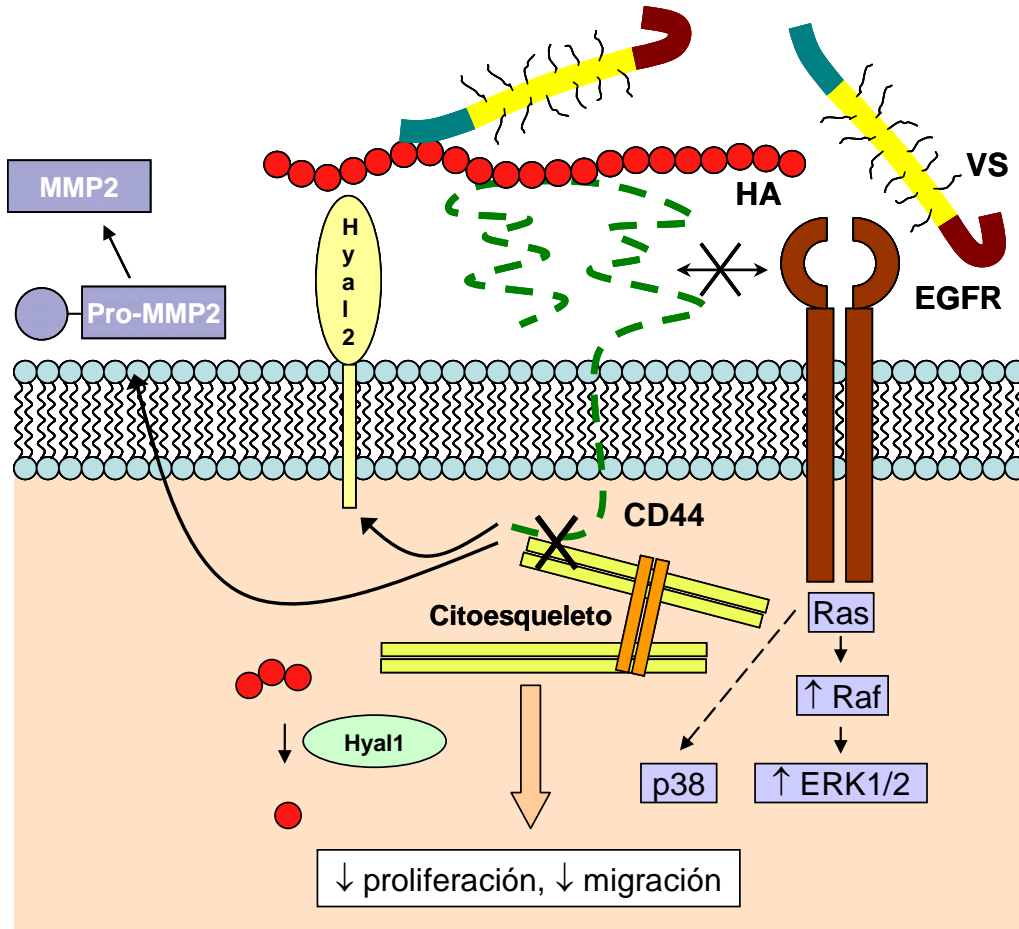


Figura 62. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 siCD44

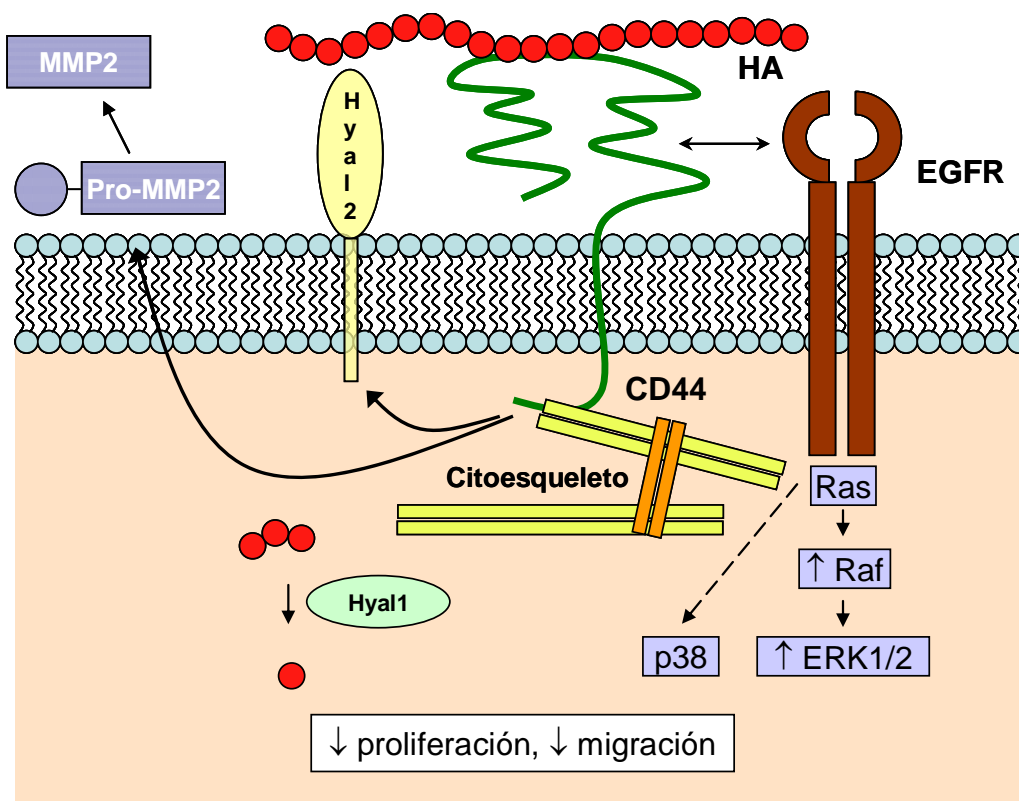


Figura 63. Modelo propuesto para la línea SK-mel-131 siGAGb

Conclusiones

1. La inhibición de la expresión de CD44 en las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo altera la capacidad proliferativa, de adhesión, migración e invasión de las células provocando:

- a) Una disminución de la capacidad de proliferación, más acusada en la línea celular MeWo.
- b) Una disminución de la capacidad de adhesión sobre vitronectina, fibronectina y ácido hialurónico en la línea SK-mel-131 y, en la línea MeWo, un aumento de la adhesión sobre laminina, vitronectina y fibronectina y una disminución sobre ácido hialurónico.
- c) Una disminución de la capacidad de migración en ensayos de *wound healing*.
- d) Una disminución de la capacidad de invasión en *Transwells* recubiertos con colágeno tipo I o ácido hialurónico.

2. La inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular SK-mel-131 no provoca cambios en la activación de las vías ERK1/2 y p38 tras el tratamiento con EGF. En el caso de la línea MeWo, se observó una inhibición de la activación de ambas vías (ERK1/2 y p38).

3. a) La inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular SK-mel-131 provoca una disminución de la capacidad de internalización del complejo HA-FITC y de la unión de este complejo a la membrana celular, mientras que no se observaron cambios en los niveles de ácido hialurónico en medio de cultivo, distribución del ácido hialurónico o actividad hialuronidasa.

En el caso de la línea celular MeWo la inhibición de la expresión de CD44 produce un aumento en los niveles de ácido hialurónico en el medio y de la asociación de este a la membrana celular, una disminución de la capacidad de internalización y unión a la membrana del complejo HA-FITC y una disminución de la actividad hialuronidasa.

b) La inhibición de la expresión de CD44 en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo provoca una disminución de la actividad de la metaloproteasa MMP-2, siendo el descenso más acusado en la línea celular MeWo.

4. La expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular MeWo no produce un efecto adicional en los descensos de la capacidad de proliferación, migración e invasión celular, mientras que se observa un

incremento de la capacidad de adhesión a los substratos colágeno tipo I y fibronectina de la línea MeWo V3s en comparación con cada transfección por separado (líneas MeWo LXs y MeWo V3p).

5. La expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular MeWo no produce un efecto adicional en la disminución de la capacidad de activación de las vías ERK1/2 y p38 en comparación con cualquiera de las transfecciones por separado en el primer caso y con la línea MeWo LXs en el segundo.

6. a) La expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular MeWo no produce efectos adicionales en ninguno de los aspectos del metabolismo del ácido hialurónico en comparación con la inhibición de la expresión de CD44 por separado.

b) La expresión de la isoforma V3 de versicano y la inhibición de la expresión de CD44 en la línea celular MeWo no produce un descenso adicional de la actividad de la MMP-2.

7. La inhibición de la expresión de versicano en la línea celular SK-mel-131 produce una disminución de la capacidad de proliferación celular, un aumento de la capacidad de adhesión celular sobre los substratos colágeno tipo I, laminina y fibronectina; una disminución de la capacidad de migración celular en ensayos de *wound healing* y una disminución de la capacidad de invasión a través de los substratos colágeno tipo I y ácido hialurónico.

8. La inhibición de la expresión de versicano en la línea celular SK-mel-131 no produce alteraciones de la activación de las vías ERK1/2 y p38 tras el tratamiento con EGF.

9. a) A nivel del metabolismo del ácido hialurónico, la inhibición de la expresión de versicano en la línea celular SK-mel-131 provoca un aumento de la localización del ácido hialurónico en la membrana celular así como una disminución de la actividad hialuronidasa.

b) La inhibición de la expresión de versicano en la línea celular SK-mel-131 provoca una disminución de la actividad de la metaloproteasa MMP-2.

Anexo

Cultivos celulares

Composición del medio DMEM (5 l)

Medio DMEM polvo (Reactiva)	cantidad para 5 l
Bicarbonato sódico	18,5 g
Penicilina/Estreptomina (PAA)	50 ml
H ₂ O milliQ	c.s.p. 5 l

Ajustar el pH a 7,4 y esterilizar por filtración.

Composición del *buffer* PBS (5 l)

NaCl	40 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14,32 g
H ₂ O milliQ	c.s.p. 5 l

Ajustar el pH a 7,4 y esterilizar en autoclave.

Concentración de antibióticos para la selección de las líneas transducidas y/o transfectadas

Línea celular	Geneticina	Puromicina
MeWo LXS _N	0,3 mg/ml	-
MeWo LV3S _N	0,3 mg/ml	-
SK-mel-131 pSNG	0,36 mg/ml	-
SK-mel-131 siCD44	0,36 mg/ml	-
MeWo pSNG	0,24 mg/ml	-
MeWo siCD44	0,24 mg/ml	-
MeWo LX pSp	0,3 mg/ml	500 ng/ml
MeWo LX siCD44	0,3 mg/ml	500 ng/ml
MeWo V3 pSp	0,3 mg/ml	500 ng/ml

Línea celular	Geneticina	Puromicina
MeWo V3 siCD44	0,3 mg/ml	500 ng/ml
SK-mel-131 pSp	-	750 ng/ml
SK-mel-131 siGAG β	-	750 ng/ml

Composición del medio de congelación

DMEM	65%
FCS	20%
DMSO	15%

Clonación de los siRNAs contra CD44 y versicano

<u>Reacción de hibridación:</u>	- Oligo F (3 μ g/ μ l)	1 μ l
	- Oligo R (3 μ g/ μ l)	1 μ l
	- Buffer M	2 μ l
	- H ₂ Od	16 μ l

· Programa:

* 95°C	-	4 min
* 85°C	-	4 min
* 80°C \rightarrow 45°C	-	Disminuyendo 5°C cada 2 min
* 37°C	-	20 min

<u>Reacción de fosforilación:</u>	- Reacción de hibridación	9 μ l
	- Buffer 10x	6 μ l
	- Optikinasa	4,5 μ l
	- ATP (10 μ M)	6 μ l
	- H ₂ Od	33,9 μ l

· Incubar 30 min a 37°C

<u>Reacción de digestión:</u>	- Plásmido (500 ng/ml)	10 µl
	- Buffer M	2,5 µl
	- HindIII	2 µl
	- H ₂ O	10,5 µl

· Incubar 3h a 37°C y añadir a la reacción:

- Buffer H	5 µl
- BglIII	2 µl
- H ₂ O	18 µl

· Incubar 3h a 37°C

<u>Reacción de defosforilación:</u>	- Plásmido digerido	50 µl
	- Buffer 10X	10 µl
	- Fosfatasa alcalina (0,01 U/ml)	11,75 µl
	- H ₂ O	28,25 µl

· Incubar 30 min a 37°C, añadir 2 µl de EDTA 0,5M e incubar 20 min a 65°C

<u>Reacción de ligación:</u>	- Plásmido purificado	100 ng
	- Reacción de fosforilación	18 µl
	- Buffer 10X	2,5 µl
	- T4 ligasa	1 µl
	- H ₂ O	(c.s.p.) 25 µl

· Incubar *overnight* a 16°C

Transfección estable

<u>Tubo 1:</u>	- DMEM sin FCS	198 µl
	- DNA (100 ng/µl)	22 µl
	- Plus Reagent	8,8 µl

<u>Tubo 2:</u>	- DMEM sin FCS	225 μ l
	- Lipofectamina	9 μ l

- Preparar los tubos 1 y 2 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente
- Añadir al tubo 1 228,8 μ l del tubo 2 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir la mezcla a las células (sembradas en placas de 6 pozos, previamente lavadas con PBS y en 800 μ l de DMEM sin FCS), 200 μ l por pozo, por duplicado
- Incubar 4 horas y añadir 1 ml de DMEM + 20% FCS a cada pozo

Inmunodetección por *Western blot*

Composición de los geles de poliacrilamida

· Stacking:

H ₂ O _d	3,2 ml
Tris 0,5M (pH=6,8)	1,25 ml
Acrilamida/bis (37,5:1)	487,5 μ l
SDS 10%	50 μ l
PSA 10%	50 μ l
TEMED	30 μ l

· Resolving:

	<u>6%</u>	<u>10%</u>
H ₂ O _d	5,8 ml	4,8 ml
Tris 1,5 M (pH=8,9)	2,5 ml	2,5 ml
Acrilamida/bis (37,5:1)	1,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l
PSA 10%	66,6 μ l	66,6 μ l
TEMED	40 μ l	40 μ l

Composición del buffer de carga 6x (10 ml)

SDS 10%	1,5 ml
β -mercaptoetanol	375 μ l
0,5 M Tris-HCl pH=6,8	650 μ l
Sacarosa	1 g
Azul bromofenol 1%	250 μ l
H ₂ Od	c.s.p. 10 ml

Composición del *buffer* de electroforesis (5 l)

Tris	15 g
Glicina	72,4 g
SDS	10 g
H ₂ Od	c.s.p. 5 l

Composición del *buffer* de transferencia (5 l)

Tris	15 g
Glicina	72,5 g
Metanol	1 l
H ₂ Od	c.s.p. 5 l

Composición del *buffer* TBS (5 l)

Tris	12,1 g
NaCl	43,825 g
H ₂ Od	c.s.p. 5 l

Ajustar el pH a 7,4.

Determinación de niveles de ácido hialurónico en medio de cultivo

Preparación de la solución HA-BSA (200 µg/ml)

- Preparar 50 ml de NaCl 0,2 M en H₂O_d y ajustar el pH a 4,7
- Añadir 10 mg de ácido hialurónico (si está en solución, restar el volumen necesario a los 50 ml del punto anterior)
- Añadir 10 mg de BSA
- Añadir 2 mg de 1-etil-3-carbodiimida
- Agitar durante 1 hora y comprobar el pH

Una vez preparada la solución es necesario dializarla.

- Preparar los sacos de diálisis:
 - Cortar fragmentos de unos 30 cm y hervirlos en 2% bicarbonato sódico + 1 mM EDTA (pH=8,0)
 - Lavar bien las membranas con H₂O_d y hervirlas de nuevo en 1 mM EDTA (pH=8,0)
 - Dejar enfriar y guardar a 4°C en 20% EtOH
- Lavar muy bien los sacos de diálisis con H₂O_d
- Cerrar un extremo con dos pinzas, llenar el saco con H₂O_d y comprobar que no hay pérdida de líquido
- Vaciar el saco y llenar con la solución de HA-BSA (25 ml por saco, aproximadamente), de manera que quede un espacio vacío de unos 5-7 cm
- Cerrar el saco con dos pinzas por el otro extremo de manera que no quede aire en su interior
- En un vaso de precipitados, poner 1,5 l de PBS filtrado e introducir los sacos de manera que queden en posición vertical. Dializar durante 2 horas a 4°C, en agitación
- Cambiar el PBS y dejar dializar durante 48 horas
- Hacer alícuotas de 10 ml y guardar a -20°C

Preparación de las soluciones patrón:

[HA] ng/ml	0	50	100	200	400	600	800	1000
HA 0,2 µg/ml (µl)	-	32,5	65	130	-	-	-	-
HA 2 µg/ml (µl)	-	-	-	-	26	39	52	65
PBS (µl)	130	97,5	65	-	104	91	78	65

ZimografíaComposición del gel de poliacrilamida - gelatina· Stacking:

H ₂ O _d	3,2 ml
Tris 0,5M (pH=6,8)	1,25 ml
Acrilamida/bis (37,5:1)	487,5 µl
SDS 10%	50 µl
PSA 10%	50 µl
TEMED	30 µl

· Resolving:

H ₂ O _d	1,625 ml
Tris 1,5M (pH=8,9)	2,5 ml
Acrilamida/bis (37,5:1)	1,875 ml
Gelatina-SDS	3,95 ml
PSA 10%	50 µl
TEMED	40 µl

· Gelatina - SDS

Gelatina	0,09 g
SDS 10%	3 ml
H ₂ O _d	35,52 ml

Composición del buffer de carga 5x (10 ml)

1 M Tris-HCl pH=6,8	1,2 ml
Glicerol 87%	5,75 ml
SDS 10%	2 ml
Azul bromofenol 1%	10 µl
H ₂ O _d	1,04 ml

Composición del *Rinsing buffer* 5x (1 l)

Tritón X-100	125 ml
1 M Tris-HCl pH=7,5	250 ml
Azida sódica	2,5 g
H ₂ Od	c.s.p. 1 l

Composición del *Incubation buffer* 5x (1 l)

1 M Tris-HCl pH=7,5	250 ml
0,5 M CaCl ₂	100 ml
NaCl	44 g
Azida sódica	2,5 g
H ₂ Od	c.s.p. 1 l

Composición del *Staining buffer* (100 ml)

1% Azul Coomassie	10 ml
Ácido acético glacial	10 ml
2-propanol	10 ml
H ₂ Od	70 ml

Composición del *Destaining buffer* (1 l)

Ácido acético glacial	100 ml
2-propanol	100 ml
H ₂ Od	800 ml

Bibliografía

ADAMIA, S., MAXWELL, C.A. and PILARSKI, L.M., 2005. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders*, 5(1), 3-14.

AFIFY, A., PURNELL, P. and NGUYEN, L., 2009. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Experimental and molecular pathology*, 86(2), 95-100.

AHRENS, T., ASSMANN, V., FIEBER, C., TERMEER, C., HERRLICH, P., HOFMANN, M. and SIMON, J.C., 2001. CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *The Journal of investigative dermatology*, 116(1), 93-101.

ALANIZ, L., RIZZO, M., MALVICINI, M., JAUNARENA, J., AVELLA, D., ATORRASAGASTI, C., AQUINO, J.B., GARCIA, M., MATAR, P., SILVA, M. and MAZZOLINI, G., 2009. Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response. *Cancer letters*, 278(1), 9-16.

AMIRGHOFAN, Z., JALALI, S.A., HOSSEINI, S.V., VASEI, M., SABAYAN, B. and GHADERI, A., 2008. Evaluation of CD44 and CD44v6 in colorectal carcinoma patients: soluble forms in relation to tumor tissue expression and metastasis. *Journal of gastrointestinal cancer*, 39(1-4), 73-78.

ANG, L.C., ZHANG, Y., CAO, L., YANG, B.L., YOUNG, B., KIANI, C., LEE, V., ALLAN, K. and YANG, B.B., 1999. Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(6), 597-605.

ARSLAN, F., BOSSERHOFF, A.K., NICKL-JOCKSCHAT, T., DOERFELT, A., BOGDAHN, U. and HAU, P., 2007. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor-beta2. *British journal of cancer*, 96(10), 1560-1568.

AUTIER, P., BONIOL, M. and DORE, J.F., 2007. Sunscreen use and increased duration of intentional sun exposure: still a burning issue. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121(1), 1-5.

AUVINEN, P., TAMMI, R., PARKKINEN, J., TAMMI, M., AGREN, U., JOHANSSON, R., HIRVIKOSKI, P., ESKELINEN, M. and KOSMA, V.M., 2000. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *The American journal of pathology*, 156(2), 529-536.

BERDIKI, A., ZAFIROPOULOS, A., FTHENOU, E., KATONIS, P., TSATSAKIS, A., KARAMANOS, N.K. and TZANAKAKIS, G.N., 2008. Regulation of hyaluronan and versican deposition by growth factors in fibrosarcoma cell lines. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(2), 194-202.

BHARADWAJ, A.G., KOVAR, J.L., LOUGHMAN, E., ELOWSKY, C., OAKLEY, G.G. and SIMPSON, M.A., 2009. Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing. *The American journal of pathology*, 174(3), 1027-1036.

BHARADWAJ, A.G., RECTOR, K. and SIMPSON, M.A., 2007. Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, **282**(28), 20561-20572.

BOURGUIGNON, L.Y., 2008. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Seminars in cancer biology*, **18**(4), 251-259.

BOURGUIGNON, L.Y., GILAD, E., BRIGHTMAN, A., DIEDRICH, F. and SINGLETON, P., 2006. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, **281**(20), 14026-14040.

BOURGUIGNON, L.Y., GILAD, E. and PEYROLLIER, K., 2007. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *The Journal of biological chemistry*, **282**(27), 19426-19441.

BULLARD, K.M., KIM, H.R., WHEELER, M.A., WILSON, C.M., NEUDAUER, C.L., SIMPSON, M.A. and MCCARTHY, J.B., 2003. Hyaluronan synthase-3 is upregulated in metastatic colon carcinoma cells and manipulation of expression alters matrix retention and cellular growth. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **107**(5), 739-746.

CALABRO, A., OKEN, M.M., HASCALL, V.C. and MASELLIS, A.M., 2002. Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood*, **100**(7), 2578-2585.

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. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**(6), 779-781.

CHEN, W.L., LIN, C.T., LI, J.W., HU, F.R. and CHEN, C.C., 2009. ERK1/2 activation regulates the wound healing process of rabbit corneal endothelial cells. *Current eye research*, **34**(2), 103-111.

CHIN, L., 2003. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature reviews. Cancer*, **3**(8), 559-570.

CHIN, L., GARRAWAY, L.A. and FISHER, D.E., 2006. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & development*, **20**(16), 2149-2182.

CREIGHTON, C.J., BROMBERG-WHITE, J.L., MISEK, D.E., MONSMA, D.J., BRICHORY, F., KUICK, R., GIORDANO, T.J., GAO, W., OMENN, G.S., WEBB, C.P. and HANASH, S.M., 2005. Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation. *Molecular cancer research : MCR*, **3**(3), 119-129.

- CSOKA, A.B., FROST, G.I. and STERN, R., 2001. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 20(8), 499-508.
- CUENDA, A. and ROUSSEAU, S., 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1358-1375.
- DESAI, B., MA, T., ZHU, J. and CHELLAIAH, M.A., 2009. Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface. *Journal of cellular biochemistry*, 108(1), 272-284.
- DHOMEN, N. and MARAIS, R., 2007. New insight into BRAF mutations in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 17(1), 31-39.
- 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. *Biochimica et biophysica acta*, 1642(1-2), 107-114.
- DOMENZAIN-REYNA, C., HERNANDEZ, D., MIQUEL-SERRA, L., DOCAMPO, M.J., BADENAS, C., FABRA, A. and BASSOLS, A., 2009. Structure and regulation of the versican promoter: the versican promoter is regulated by AP-1 and TCF transcription factors in invasive human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), 12306-12317.
- DUMESIC, P.A., SCHOLL, F.A., BARRAGAN, D.I. and KHAVARI, P.A., 2009. Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *The Journal of cell biology*, 185(3), 409-422.
- DUTT, S., KLEBER, M., MATASCI, M., SOMMER, L. and ZIMMERMANN, D.R., 2006a. Versican V0 and V1 guide migratory neural crest cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(17), 12123-12131.
- DUTT, S., MATASCI, M., SOMMER, L. and ZIMMERMANN, D.R., 2006b. Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *TheScientificWorldJournal*, 6, 1114-1117.
- EMBRY, J.J. and KNUDSON, W., 2003. G1 domain of aggrecan cointernalizes with hyaluronan via a CD44-mediated mechanism in bovine articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 48(12), 3431-3441.
- FAGGIAN, J., FOSANG, A.J., ZIEBA, M., WALLACE, M.J. and HOOPER, S.B., 2007. Changes in versican and chondroitin sulfate proteoglycans during structural development of the lung. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(2), R784-92.
- FECHER, L.A., AMARAVADI, R.K. and FLAHERTY, K.T., 2008. The MAPK pathway in melanoma. *Current opinion in oncology*, 20(2), 183-189.
- FRASER, J.R., LAURENT, T.C. and LAURENT, U.B., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine*, 242(1), 27-33.

FU, P., JIANG, X. and ARCASOY, M.O., 2009. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(3), 696-701.

GAGGIOLI, C. and SAHAI, E., 2007. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 20(3), 161-172.

GHATAK, S., MISRA, S. and TOOLE, B.P., 2005. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(10), 8875-8883.

GIBLIN, A.V. and THOMAS, J.M., 2007. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 60(1), 32-40.

GOLDSTEIN, L.J., CHEN, H., BAUER, R.J., BAUER, S.M. and VELAZQUEZ, O.C., 2005. Normal human fibroblasts enable melanoma cells to induce angiogenesis in type I collagen. *Surgery*, 138(3), 439-449.

GOLSHANI, R., LOPEZ, L., ESTRELLA, V., KRAMER, M., IIDA, N. and LOKESHWAR, V.B., 2008. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44. *Cancer research*, 68(2), 483-491.

GOYDOS, J.S., MANN, B., KIM, H.J., GABRIEL, E.M., ALSINA, J., GERMINO, F.J., SHIH, W. and GORSKI, D.H., 2005. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *Journal of the American College of Surgeons*, 200(3), 362-370.

GRUSS, C. and HERLYN, M., 2001. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Current opinion in oncology*, 13(2), 117-123.

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(6), 1561-1565.

HAASS, N.K., SMALLEY, K.S. and HERLYN, M., 2004. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *Journal of molecular histology*, 35(3), 309-318.

HAASS, N.K., SMALLEY, K.S., LI, L. and HERLYN, M., 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 18(3), 150-159.

HALL, A., 2009. The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 5-14.

HAMILTON, S.R., FARD, S.F., PAIWAND, F.F., TOLG, C., VEISEH, M., WANG, C., MCCARTHY, J.B., BISSELL, M.J., KOROPATNICK, J. and TURLEY, E.A., 2007. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(22), 16667-16680.

- HARADA, H. and TAKAHASHI, M., 2007. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *The Journal of biological chemistry*, **282**(8), 5597-5607.
- HELDIN, P., KAROUSOU, E., BERNERT, B., PORSCH, H., NISHITSUKA, K. and SKANDALIS, S.S., 2008. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connective tissue research*, **49**(3), 215-218.
- HOFMANN, U.B., HOUBEN, R., BROCKER, E.B. and BECKER, J.C., 2005. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*, **87**(3-4), 307-314.
- HSU, M.Y., MEIER, F.E., NESBIT, M., HSU, J.Y., VAN BELLE, P., ELDER, D.E. and HERLYN, M., 2000. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *The American journal of pathology*, **156**(5), 1515-1525.
- HUA, Q., KNUDSON, C.B. and KNUDSON, W., 1993. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *Journal of cell science*, **106** (Pt 1)(Pt 1), 365-375.
- HUANG, R., MERRILEES, M.J., BRAUN, K., BEAUMONT, B., LEMIRE, J., CLOWES, A.W., HINEK, A. and WIGHT, T.N., 2006. Inhibition of versican synthesis by antisense alters smooth muscle cell phenotype and induces elastic fiber formation in vitro and in neointima after vessel injury. *Circulation research*, **98**(3), 370-377.
- HUSSEIN, M.R., 2005. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of cutaneous pathology*, **32**(3), 191-205.
- ISACKE, C.M. and YARWOOD, H., 2002. The hyaluronan receptor, CD44. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34**(7), 718-721.
- ITANO, N., 2008. Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *Journal of Biochemistry*, **144**(2), 131-137.
- ITANO, N. and KIMATA, K., 1996. Molecular cloning of human hyaluronan synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, **222**(3), 816-820.
- ITANO, N., SAWAI, T., ATSUMI, F., MIYAISHI, O., TANIGUCHI, S., KANNAGI, R., HAMAGUCHI, M. and KIMATA, K., 2004. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *The Journal of biological chemistry*, **279**(18), 18679-18687.
- JEZIERSKA, A. and MOTYL, T., 2009. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **15**(2), RA32-40.
- JHA, R.K., MA, Q., CHEN, S., SHA, H. and DING, S., 2009. Relationship of fibronectin and CD44v6 expression with invasive growth and metastasis of liver cancer. *Cancer investigation*, **27**(3), 324-328.

JOKELA, T.A., JAUHAINEN, M., AURIOLA, S., KAUKANEN, M., TIIHONEN, R., TAMMI, M.I. and TAMMI, R.H., 2008. Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines. *The Journal of biological chemistry*, **283**(12), 7666-7673.

KAMIYA, N., WATANABE, H., HABUCHI, H., TAKAGI, H., SHINOMURA, T., SHIMIZU, K. and KIMATA, K., 2006. Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *The Journal of biological chemistry*, **281**(4), 2390-2400.

KAWASHIMA, H., HIROSE, M., HIROSE, J., NAGAKUBO, D., PLAAS, A.H. and MIYASAKA, M., 2000. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *The Journal of biological chemistry*, **275**(45), 35448-35456.

KEYSE, S.M., 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer metastasis reviews*, **27**(2), 253-261.

KIM, Y., LEE, Y.S., CHOE, J., LEE, H., KIM, Y.M. and JEOUNG, D., 2008. CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *The Journal of biological chemistry*, **283**(33), 22513-22528.

KINUGASA, Y., HATORI, M., ITO, H., KURIHARA, Y., ITO, D. and NAGUMO, M., 2004. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 and CD44. *Clinical & experimental metastasis*, **21**(8), 737-745.

KISCHEL, P., WALTREGNY, D., DUMONT, B., TURTOI, A., GREFFE, Y., KIRSCH, S., DE PAUW, E. and CASTRONOVO, V., 2009. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, .

KNUDSON, W., CHOW, G. and KNUDSON, C.B., 2002. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, **21**(1), 15-23.

KODAMA, J., HASENGAOWA, KUSUMOTO, T., SEKI, N., MATSUO, T., OJIMA, Y., NAKAMURA, K., HONGO, A. and HIRAMATSU, Y., 2007. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **18**(2), 269-274.

KONDO, Y., MACHIDA, K., LIU, H.M., UENO, Y., KOBAYASHI, K., WAKITA, T., SHIMOSEGAWA, T. and LAI, M.M., 2009. Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances fas-mediated apoptosis by down-regulating the expression of CD44 splicing variant 6. *The Journal of infectious diseases*, **199**(5), 726-736.

KOYAMA, H., HIBI, T., ISOGAI, Z., YONEDA, M., FUJIMORI, M., AMANO, J., KAWAKUBO, M., KANNAGI, R., KIMATA, K., TANIGUCHI, S. and ITANO, N., 2007. Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates

angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *The American journal of pathology*, 170(3), 1086-1099.

KRISHNA, M. and NARANG, H., 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(22), 3525-3544.

KUDO, D., KON, A., YOSHIHARA, S., KAKIZAKI, I., SASAKI, M., ENDO, M. and TAKAGAKI, K., 2004. Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochemical and biophysical research communications*, 321(4), 783-787.

LABROPOULOU, V.T., THEOCHARIS, A.D., RAVAZOULA, P., PERIMENIS, P., HJERPE, A., KARAMANOS, N.K. and KALOFONOS, H.P., 2006. Versican but not decorin accumulation is related to metastatic potential and neovascularization in testicular germ cell tumours. *Histopathology*, 49(6), 582-593.

LAURICH, C., WHEELER, M.A., IIDA, J., NEUDAUER, C.L., MCCARTHY, J.B. and BULLARD, K.M., 2004. Hyaluronan mediates adhesion of metastatic colon carcinoma cells. *The Journal of surgical research*, 122(1), 70-74.

LEE, J.L., WANG, M.J., SUDHIR, P.R. and CHEN, J.Y., 2008. CD44 engagement promotes matrix-derived survival through the CD44-SRC-integrin axis in lipid rafts. *Molecular and cellular biology*, 28(18), 5710-5723.

LEFLOCH, R., POUYSSEGUR, J. and LENORMAND, P., 2009. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(5), 705-711.

LEMIRE, J.M., MERRILEES, M.J., BRAUN, K.R. and WIGHT, T.N., 2002. Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. *Journal of cellular physiology*, 190(1), 38-45.

LI, C.Z., LIU, B., WEN, Z.Q. and LI, H.Y., 2008. Inhibition of CD44 expression by small interfering RNA to suppress the growth and metastasis of ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Folia biologica*, 54(6), 180-186.

LI, Y., LI, L., BROWN, T.J. and HELDIN, P., 2007. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 120(12), 2557-2567.

LIU, W.H. and CHANG, L.S., 2009. Arachidonic acid induces Fas and FasL upregulation in human leukemia U937 cells via Ca(2+)/ROS-mediated suppression of ERK/c-Fos pathway and activation of p38 MAPK/ATF-2 pathway. *Toxicology letters*, .

LOKESHWAR, V.B. and SELZER, M.G., 2008. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Seminars in cancer biology*, 18(4), 281-287.

LOU, G., GAO, Y., NING, X.M. and ZHANG, Q.F., 2005. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World journal of gastroenterology : WJG*, 11(32), 5032-5036.

MALEMUD, C.J., 2006. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **11**, 1696-1701.

MARHABA, R., BOUROUBA, M. and ZOLLER, M., 2005. CD44v6 promotes proliferation by persisting activation of MAP kinases. *Cellular signalling*, **17**(8), 961-973.

MARHABA, R. and ZOLLER, M., 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *Journal of molecular histology*, **35**(3), 211-231.

MARKOVIC, S.N., ERICKSON, L.A., RAO, R.D., WEENIG, R.H., POCKAJ, B.A., BARDIA, A., VACHON, C.M., SCHILD, S.E., MCWILLIAMS, R.R., HAND, J.L., LAMAN, S.D., KOTTSCHADE, L.A., MAPLES, W.J., PITTELKOW, M.R., PULIDO, J.S., CAMERON, J.D., CREAGAN, E.T. and MELANOMA STUDY GROUP OF THE MAYO CLINIC CANCER CENTER, 2007a. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clinic proceedings.Mayo Clinic*, **82**(3), 364-380.

MARKOVIC, S.N., ERICKSON, L.A., RAO, R.D., WEENIG, R.H., POCKAJ, B.A., BARDIA, A., VACHON, C.M., SCHILD, S.E., MCWILLIAMS, R.R., HAND, J.L., LAMAN, S.D., KOTTSCHADE, L.A., MAPLES, W.J., PITTELKOW, M.R., PULIDO, J.S., CAMERON, J.D., CREAGAN, E.T. and MELANOMA STUDY GROUP OF MAYO CLINIC CANCER CENTER, 2007b. Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clinic proceedings.Mayo Clinic*, **82**(4), 490-513.

MIQUEL-SERRA, L., SERRA, M., HERNANDEZ, D., DOMENZAIN, C., DOCAMPO, M.J., RABANAL, R.M., DE TORRES, I., WIGHT, T.N., FABRA, A. and BASSOLS, A., 2006. V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **86**(9), 889-901.

MIQUEL-SERRA, L., 2009. Estudi del mecanisme d'acció de la isoforma V3 de versicà en la progressió del melanoma. *Tesis doctoral*.

MISRA, S., HASCALL, V.C., DE GIOVANNI, C., MARKWALD, R.R. and GHATAK, S., 2009. Delivery of CD44 shRNA/nanoparticles within cancer cells: perturbation of hyaluronan/CD44v6 interactions and reduction in adenoma growth in Apc Min/+ MICE. *The Journal of biological chemistry*, **284**(18), 12432-12446.

MISRA, S., TOOLE, B.P. and GHATAK, S., 2006. Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, **281**(46), 34936-34941.

MYLONA, E., GIANNOPOULOU, I., FASOMYTAKIS, E., NOMIKOS, A., MAGKOU, C., BAKARAKOS, P. and NAKOPOULOU, L., 2008. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human pathology*, **39**(7), 1096-1102.

NAOR, D., NEDVETZKI, S., GOLAN, I., MELNIK, L. and FAITELSON, Y., 2002. CD44 in cancer. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, **39**(6), 527-579.

NAOR, D., WALLACH-DAYAN, S.B., ZAHALKA, M.A. and SIONOV, R.V., 2008. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Seminars in cancer biology*, **18**(4), 260-267.

- NASO, M.F., ZIMMERMANN, D.R. and IOZZO, R.V., 1994. Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter. *The Journal of biological chemistry*, **269**(52), 32999-33008.
- OHASHI, R., TAKAHASHI, F., CUI, R., YOSHIOKA, M., GU, T., SASAKI, S., TOMINAGA, S., NISHIO, K., TANABE, K.K. and TAKAHASHI, K., 2007. Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer letters*, **252**(2), 225-234.
- OUHTIT, A., ABD ELMAGEED, Z.Y., ABDRABOH, M.E., LIOE, T.F. and RAJ, M.H., 2007. In vivo evidence for the role of CD44s in promoting breast cancer metastasis to the liver. *The American journal of pathology*, **171**(6), 2033-2039.
- PAIVA, P., VAN DAMME, M.P., TELLBACH, M., JONES, R.L., JOBLING, T. and SALAMONSEN, L.A., 2005. Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer. *Gynecologic oncology*, **98**(2), 193-202.
- PALYI-KREKK, Z., BAROK, M., KOVACS, T., SAYA, H., NAGANO, O., SZOLLOSI, J. and NAGY, P., 2008. EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44. *Cancer letters*, **263**(2), 231-242.
- PASSI, A., NEGRINI, D., ALBERTINI, R., MISEROCCHI, G. and DE LUCA, G., 1999. The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS letters*, **456**(1), 93-96.
- PATTON, E.E., WIDLUND, H.R., KUTOK, J.L., KOPANI, K.R., AMATRUDA, J.F., MURPHEY, R.D., BERGHMANS, S., MAYHALL, E.A., TRAVER, D., FLETCHER, C.D., ASTER, J.C., GRANTER, S.R., LOOK, A.T., LEE, C., FISHER, D.E. and ZON, L.I., 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current biology : CB*, **15**(3), 249-254.
- PERISSINOTTO, D., IACOPETTI, P., BELLINA, I., DOLIANA, R., COLOMBATTI, A., PETTWAY, Z., BRONNER-FRASER, M., SHINOMURA, T., KIMATA, K., MORGELIN, M., LOFBERG, 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 (Cambridge, England)*, **127**(13), 2823-2842.
- PLATZ, A., EGYHAZI, S., RINGBORG, U. and HANSSON, J., 2008. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Molecular oncology*, **1**(4), 395-405.
- POLETTE, M., NAWROCKI-RABY, B., GILLES, C., CLAVEL, C. and BIREMBAUT, P., 2004. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical reviews in oncology/hematology*, **49**(3), 179-186.
- PONTA, H., SHERMAN, L. and HERRLICH, P.A., 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews.Molecular cell biology*, **4**(1), 33-45.

RAHMANI, M., WONG, B.W., ANG, L., CHEUNG, C.C., CARTHY, J.M., WALINSKI, H. and MCMANUS, B.M., 2006. Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **84**(1), 77-92.

RICCIARDELLI, C., RUSSELL, D.L., WEEN, M.P., MAYNE, K., SUWIWAT, S., BYERS, S., MARSHALL, V.R., TILLEY, W.D. and HORSFALL, D.J., 2007. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *The Journal of biological chemistry*, **282**(14), 10814-10825.

RICCIARDELLI, C., SAKKO, A.J., WEEN, M.P., RUSSELL, D.L. and HORSFALL, D.J., 2009. The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer metastasis reviews*, **28**(1-2), 233-245.

ROTOLO, S., DIOTTI, R., GORDON, R.E., QIAO, R.F., YAO, Z., PHELPS, R.G. and DONG, J., 2005. Effects on proliferation and melanogenesis by inhibition of mutant BRAF and expression of wild-type INK4A in melanoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **115**(1), 164-169.

SAKKO, A.J., RICCIARDELLI, C., MAYNE, K., SUWIWAT, S., LEBARON, R.G., MARSHALL, V.R., TILLEY, W.D. and HORSFALL, D.J., 2003. Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican. *Cancer research*, **63**(16), 4786-4791.

SANDY, J.D., WESTLING, J., KENAGY, R.D., IRUELA-ARISPE, M.L., VERSCHAREN, C., RODRIGUEZ-MAZANEQUE, 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. *The Journal of biological chemistry*, **276**(16), 13372-13378.

SERRA, M., MIQUEL, L., DOMENZAIN, C., DOCAMPO, M.J., FABRA, A., WIGHT, T.N. and BASSOLS, A., 2005. V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **114**(6), 879-886.

SHAN, J.Z., XUAN, Y.Y., ZHENG, S., DONG, Q. and ZHANG, S.Z., 2009. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, **10**(9), 668-674.

SHENG, W., WANG, G., LA PIERRE, D.P., WEN, J., DENG, Z., WONG, C.K., LEE, D.Y. and YANG, B.B., 2006. Versican mediates mesenchymal-epithelial transition. *Molecular biology of the cell*, **17**(4), 2009-2020.

SHENG, W., WANG, G., WANG, Y., LIANG, J., WEN, J., ZHENG, P.S., WU, Y., LEE, V., SLINGERLAND, J., DUMONT, D. and YANG, B.B., 2005. The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Molecular biology of the cell*, **16**(3), 1330-1340.

SHIN, S.Y., RATH, O., CHOO, S.M., FEE, F., MCFERRAN, B., KOLCH, W. and CHO, K.H., 2009. Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *Journal of cell science*, **122**(Pt 3), 425-435.

SKANDALIS, S.S., KLETSAS, D., KYRIAKOPOULOU, D., STAVROPOULOS, M. and THEOCHARIS, D.A., 2006. The greatly increased amounts of accumulated versican and

decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta*, **1760**(8), 1217-1225.

SMALLEY, K.S., 2003. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **104**(5), 527-532.

STERN, R., 2008a. Association between cancer and "acid mucopolysaccharides": an old concept comes of age, finally. *Seminars in cancer biology*, **18**(4), 238-243.

STERN, R., 2008b. Hyaluronan in cancer biology. *Seminars in cancer biology*, **18**(4), 237.

STERN, R., 2005. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie-biologie*, **53**(7), 372-382.

STUHLMEIER, K.M., 2006. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*, **156**(21-22), 563-568.

SUBRAMANIAM, V., VINCENT, I.R., GILAKJAN, M. and JOTHY, S., 2007. Suppression of human colon cancer tumors in nude mice by siRNA CD44 gene therapy. *Experimental and molecular pathology*, **83**(3), 332-340.

SUGAHARA, K.N., HIRATA, T., TANAKA, T., OGINO, S., TAKEDA, M., TERASAWA, H., SHIMADA, I., TAMURA, J., TEN DAM, G.B., VAN KUPPEVELT, T.H. and MIYASAKA, M., 2008. Chondroitin sulfate E fragments enhance CD44 cleavage and CD44-dependent motility in tumor cells. *Cancer research*, **68**(17), 7191-7199.

SUWAN, K., CHOOCHEEP, K., HATANO, S., KONGTAWELERT, P., KIMATA, K. and WATANABE, H., 2009. Versican/Pg-M Assembles Hyaluronan into Extracellular Matrix and Inhibits CD44-mediated Signaling toward Premature Senescence in Embryonic Fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, **284**(13), 8596-8604.

TAKAHASHI, K., ETO, H. and TANABE, K.K., 1999. Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **80**(3), 387-395.

TAKANO, H., NAKAZAWA, S., SHIRATA, N., TAMBA, S., FURUTA, K., TSUCHIYA, S., MORIMOTO, K., ITANO, N., IRIE, A., ICHIKAWA, A., KIMATA, K., NAKAYAMA, K., SUGIMOTO, Y. and TANAKA, S., 2009. Involvement of CD44 in mast cell proliferation during terminal differentiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **89**(4), 446-455.

TAMMI, R., RILLA, K., PIENIMAKI, J.P., MACCALLUM, D.K., HOGG, M., LUUKKONEN, M., HASCALL, V.C. and TAMMI, M., 2001. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *The Journal of biological chemistry*, **276**(37), 35111-35122.

TAMMI, R.H., KULTTI, A., KOSMA, V.M., PIRINEN, R., AUVINEN, P. and TAMMI, M.I., 2008. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in cancer biology*, **18**(4), 288-295.

THANKAMONY, S.P. and KNUDSON, W., 2006. Acylation of CD44 and its association with lipid rafts are required for receptor and hyaluronan endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), 34601-34609.

THEOCHARIS, A.D., 2008. Versican in health and disease. *Connective tissue research*, 49(3), 230-234.

TOOLE, B.P., 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature reviews.Cancer*, 4(7), 528-539.

TOOLE, B.P. and SLOMIANY, M.G., 2008. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. *Seminars in cancer biology*, 18(4), 244-250.

TOUAB, M., ARUMI-URIA, M., BARRANCO, C. and BASSOLS, A., 2003. Expression of the proteoglycans versican and mel-CSPG in dysplastic nevi. *American Journal of Clinical Pathology*, 119(4), 587-593.

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. *The American journal of pathology*, 160(2), 549-557.

TSATAS, D., KANAGASUNDARAM, V., KAYE, A. and NOVAK, U., 2002. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 9(3), 282-288.

TURLEY, E.A., NOBLE, P.W. and BOURGUIGNON, L.Y., 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *The Journal of biological chemistry*, 277(7), 4589-4592.

TZIRCOTIS, G., THORNE, R.F. and ISACKE, C.M., 2005. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *Journal of cell science*, 118(Pt 21), 5119-5128.

UDABAGE, L., BROWNLEE, G.R., WALTHAM, M., BLICK, T., WALKER, E.C., HELDIN, P., NILSSON, S.K., THOMPSON, E.W. and BROWN, T.J., 2005. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer research*, 65(14), 6139-6150.

VALENTINER, U., VALENTINER, F.U. and SCHUMACHER, U., 2008. Expression of CD44 is associated with a metastatic pattern of human neuroblastoma cells in a SCID mouse xenograft model. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 29(3), 152-160.

VAN KEMPEN, L.C., VAN MUIJEN, G.N. and RUITER, D.J., 2007. Melanoma progression in a changing environment. *European journal of cell biology*, 86(2), 65-67.

VIGETTI, D., VIOLA, M., KAROUSOU, E., RIZZI, M., MORETTO, P., GENASETTI, A., CLERICI, M., HASCALL, V.C., DE LUCA, G. and PASSI, A., 2008. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *The Journal of biological chemistry*, 283(7), 4448-4458.

WANG, S.J. and BOURGUIGNON, L.Y., 2006. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 132(7), 771-778.

WIGHT, T.N., 2002. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current opinion in cell biology*, 14(5), 617-623.

WILLIAMS, D.R., JR, PRESAR, A.R., RICHMOND, A.T., MJAATVEDT, C.H., HOFFMAN, S. and CAPEHART, A.A., 2005. Limb chondrogenesis is compromised in the versican deficient hdf mouse. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(3), 960-966.

WOBUS, M., RANGWALA, R., SHEYN, I., HENNIGAN, R., COILA, B., LOWER, E.E., YASSIN, R.S. and SHERMAN, L.S., 2002. CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 10(1), 34-39.

WONG, K.K., 2009. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 4(1), 28-35.

WU, Y., SHENG, W., CHEN, L., DONG, H., LEE, V., LU, F., WONG, C.S., LU, W.Y. and YANG, B.B., 2004. Versican V1 isoform induces neuronal differentiation and promotes neurite outgrowth. *Molecular biology of the cell*, 15(5), 2093-2104.

WU, Y., WU, J., LEE, D.Y., YEE, A., CAO, L., ZHANG, Y., KIANI, C. and YANG, B.B., 2005. Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 24(1), 3-13.

XIE, Z., CHOONG, P.F., POON, L.F., ZHOU, J., KHNG, J., JASINGHE, V.J., PALANIYANDI, S. and CHEN, C.S., 2008. Inhibition of CD44 expression in hepatocellular carcinoma cells enhances apoptosis, chemosensitivity, and reduces tumorigenesis and invasion. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 62(6), 949-957.

YAMADA, Y., ITANO, N., NARIMATSU, H., KUDO, T., MOROZUMI, K., HIROHASHI, S., OCHIAI, A., UEDA, M. and KIMATA, K., 2004. Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer. *Clinical & experimental metastasis*, 21(1), 57-63.

YANG, B.L., YANG, B.B., ERWIN, M., ANG, L.C., FINKELSTEIN, J. and YEE, A.J., 2003. Versican G3 domain enhances cellular adhesion and proliferation of bovine intervertebral disc cells cultured in vitro. *Life Sciences*, 73(26), 3399-3413.

YOSHIHARA, S., KON, A., KUDO, D., NAKAZAWA, H., KAKIZAKI, I., SASAKI, M., ENDO, M. and TAKAGAKI, K., 2005. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS letters*, 579(12), 2722-2726.

YU, Q. and STAMENKOVIC, I., 1999. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & development*, 13(1), 35-48.

ZHANG, Y., THANT, A.A., MACHIDA, K., ICHIGOTANI, Y., NAITO, Y., HIRAIWA, Y., SENGU, T., SOHARA, Y., MATSUDA, S. and HAMAGUCHI, M., 2002. Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90. *Cancer research*, 62(14), 3962-3965.

ZHENG, B., JEONG, J.H., ASARA, J.M., YUAN, Y.Y., GRANTER, S.R., CHIN, L. and CANTLEY, L.C., 2009. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell*, 33(2), 237-247.

ZHENG, P.S., WEN, J., ANG, L.C., SHENG, W., VILORIA-PETIT, A., WANG, Y., WU, Y., KERBEL, R.S. and YANG, B.B., 2004. Versican/PDGF-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(6), 754-756.

ZIZOLA, C.F., JULIANELLI, V., BERTOLESI, G., YANAGISHITA, M. and CALVO, J.C., 2007. Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 26(6), 419-430.