

RESULTATS

RESULTATS

1. L'expressió dels gens DCC i Smad4 es troba disminuïda en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon, en tumors de còlon, i en línies cel·lulars derivades de càncer de pàncrees, respecte l'expressió d'aquests gens en teixit normal. Les alteracions en ambdós gens són esdeveniments independents

Els gens DCC i Smad4 són forts candidats a gens supressors de tumor dintre de la regió cromosòmica 18q21 (veure secció 5 de la introducció). A fi d'estudiar més en detall la seva implicació en el càncer colorectal i de pàncrees, s'ha analitzat la seva expressió, per RT-PCR semiquantitativa, en: (1) un panell de 12 línies cel·lulars derivades de càncer de còlon que presenten diferents capacitats de diferenciació *in vitro*, (2) 10 pacients amb càncer de còlon dels quals disposàvem de mostres de teixit normal i de tumor, i (3) 16 línies derivades de càncer de pàncrees. Per l'anàlisi del DCC s'han emprat dos parells d'encebadors, EX1/EX2 i IN3/IN2, corresponents a seqüències codificants dels dominis extracel·lular i intracel·lular de la proteïna, respectivament, capaços ambdós de detectar els fenòmens de processament alternatiu del mRNA descrits en Reale et al. (1994) (veure secció 5.2 dels materials i mètodes). Els nivells d'expressió dels trànscrits de DCC i Smad4 s'han determinat per densitometria i s'han comparat als d'un gen "housekeeping" com és la β actina.

Entre les línies derivades de càncer de còlon analitzades, HT-29, SW480 i SW620 són exemples de línies indiferenciades (Drewinko et al., 1984; Fogh and Trempe, 1975; Leibovitz et al., 1976; Zweibaum et al., 1991), HT-29 M6 i LS174T són cèl·lules mucosecretors (Lessuffleur et al., 1990; Rutzky et al., 1980; Tom et al., 1976) i Caco-2 representa el millor model en cultiu de cèl·lules absortives (Fogh et al., 1977; Pinto et al., 1983). Les altres línies cel·lulars són representatives de diferents graus de diferenciació definits en base als marcadors moleculars que expressen i al grau de polarització de la capa cel·lular (Chantret et al., 1988). A mode d'exemple, les cèl·lules HT-29

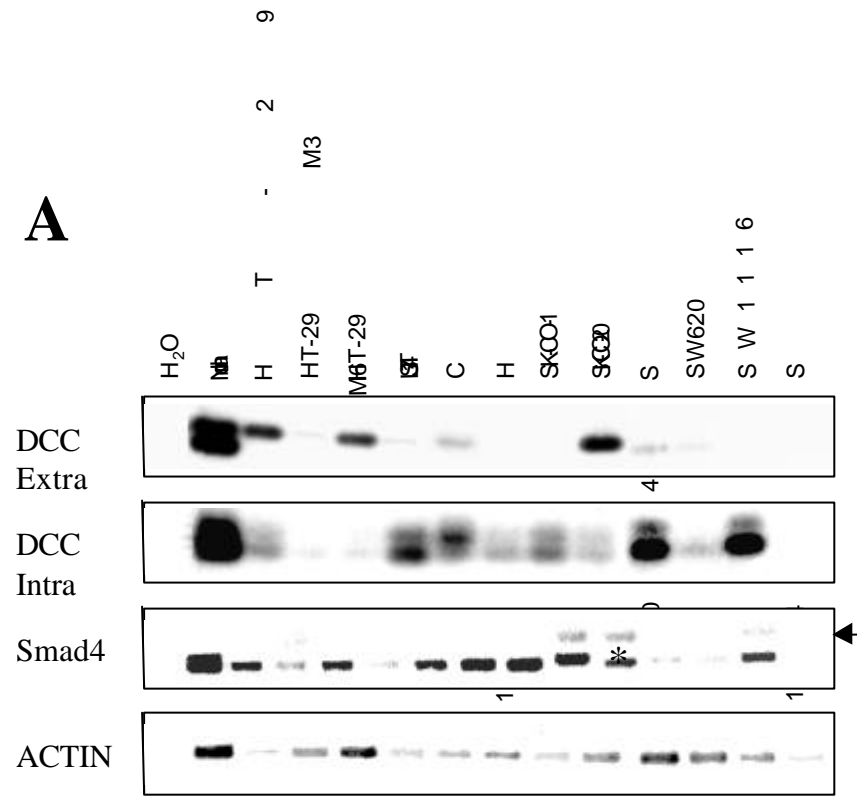
M3 creixen en monocapa de cèl·lules polaritzades amb vora en raspall que expressen DPPIV i vilina però no expressen CEA ("Carcinoembryonic Antigen"), mucines o sucrasa-isomaltasa (Lesuffleur et al., 1991).

En una de les línies analitzades (SW1417), no s'han detectat els trànscrips de DCC i en la resta de línies el mRNA d'aquest gen es detecta a nivells més baixos que el teixit normal (Fig. 1). Per altra banda, s'observa una discrepància de resultats en l'amplificació del mRNA del DCC segons el parell d'encebadors utilitzat. Així, no hi ha correlació entre els nivells d'amplificació dels dominis intracel·lular i extracel·lular dintre d'una mateixa línia cel·lular i no es pot establir cap correlació entre aquest patró d'amplificació i el fenotip d'aquestes línies cel·lulars. A mode d'exemple les línies SW480, LS174T i Caco-2, les quals expressen diferents fenotips, presenten un patró similar on els nivells d'expressió de DCC detectats amb el parell d'encebadors IN3/IN2 són majors que els detectats amb el parell EX1/EX2. De la mateixa manera, les cèl·lules HT-29 M6 i les LS174T, ambdues mucosecretores, presenten patrons d'amplificació diferents.

Respecte a les formes de processament del mRNA alternatiu, en aquestes línies predomina l'expressió de la forma llarga (341 pb) versus la forma curta (281 pb) a l'amplificar amb els encebadors EX1/EX2. Utilitzant el parell IN3/IN2 es detecta en nivells més alts la forma curta (fragment de 159 pb versus 164). No hi ha correlació entre el patró d'expressió de les formes de processament del mRNA alternatiu i el fenotip de les línies estudiades.

L'expressió de Smad4 es detecta en les 12 línies cel·lulars examinades i també està disminuïda en les línies respecte al teixit de còlon normal. Les cèl·lules SK-CO-20 donen lloc a un producte d'amplificació de pes molecular lleugerament més elevat que la resta de cèl·lules i amplifiquen una seqüència addicional que també es troba en altres línies: HT-29 M3, SK-CO-1 i SW1417. Aquest producte d'amplificació addicional no s'ha considerat en els estudis de quantificació.

A



B

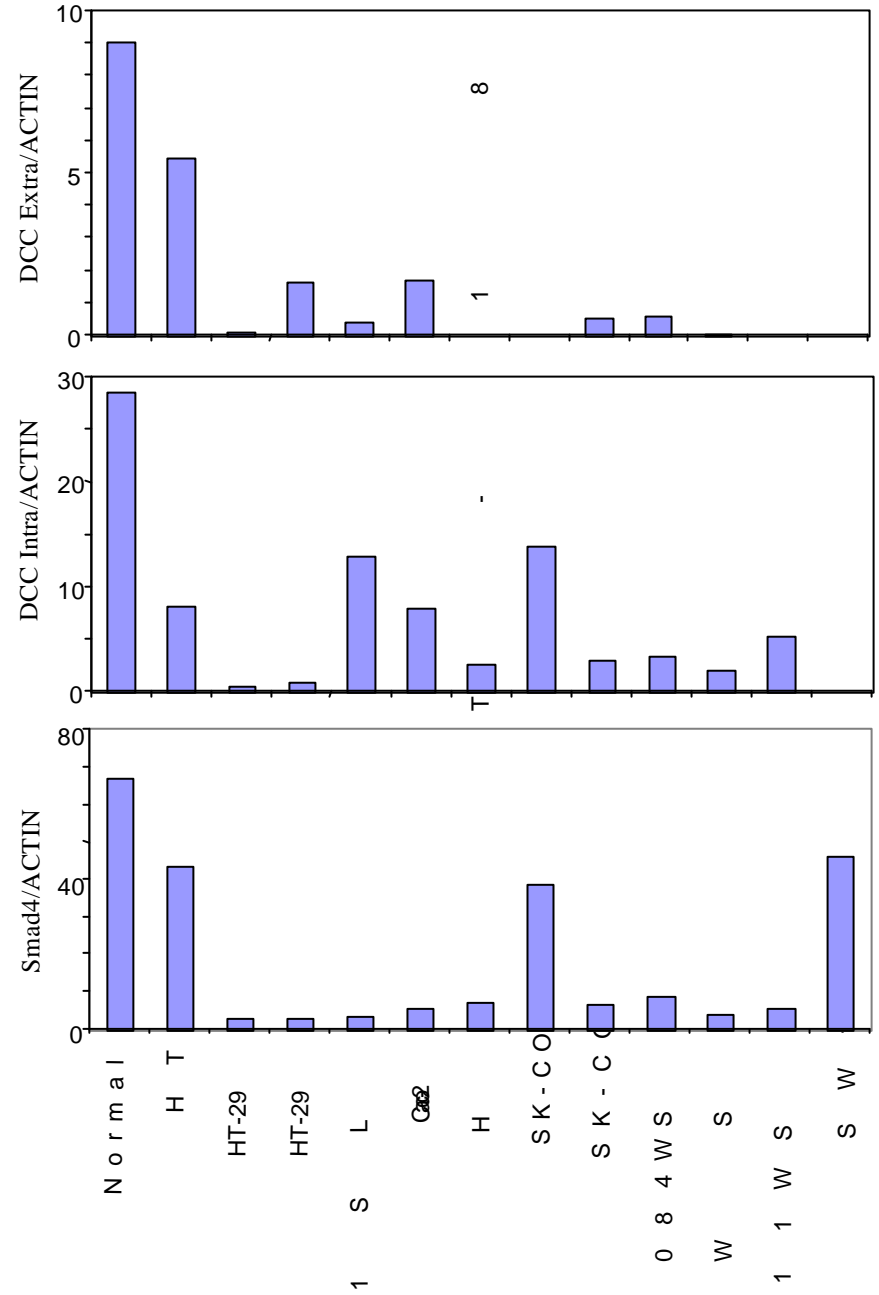


Figura 1: Anàlisi, per RT-PCR, de l'expressió dels gens DCC i Smad4 en línies derivades de càncer de còlon.

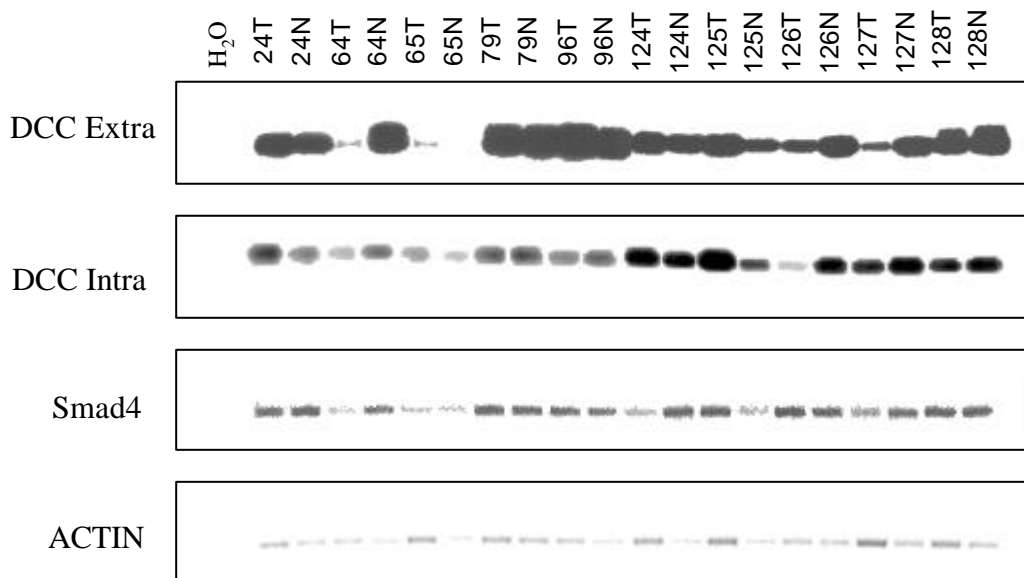
(A): Anàlisi per electroforesi dels productes de PCR amplificats en fase lineal, a partir dels cDNA's sintetitzats per cadascuna de les mostres. Els productes d'amplificació generats en el domini extracel·lular i en el domini intracel·lular del gen DCC són fragments de 341 o 281 pb, i de 164 o 159 pb, respectivament. Les diferents talles en cadascun dels casos, corresponen a fenòmens de processament alternatiu del mRNA descrits prèviament. El fragment amplificat per l'anàlisi d'expressió de Smad4 és de 285 pb. L'asterisc senyala una banda de mida superior als 285 pb esperats, detectada en la línia SK-CO-20. La fletxa marca una banda addicional amplificada en alguns dels casos. (B): Gràfics que representen els nivells d'expressió relativa de DCC i Smad4, els quals han estat determinats per densitometria semiquantitativa (unitats de densitometria de DCC o Smad4 / unitats de densitometria d'Actina).

RESULTATS

En tots els casos de mostres de tumor de còlon, l'expressió del DCC és més baixa en el tumor que en el teixit normal del mateix pacient (Fig. 2). En el 80% dels tumors, aquesta disminució de l'expressió segons ambdós encebadors, és d'almenys un 44%. Les diferents formes de processament alternatiu del mRNA que es detecten, varien segons els pacients però no canvien entre la mostra de tumor i teixit normal del mateix malalt. Només en la mostra 64, el tumor perd el fragment de 341 pb amplificat amb el parell EX1/EX2, però donats els baixos nivells d'expressió del gen DCC que s'observen en aquest cas, pot ser simplement un problema de nivells de detecció.

L'expressió de Smad4 també està reduïda en els tumors respecte al teixit normal. Així, en un 70% dels casos s'observa una reducció de l'expressió del 40%.

A



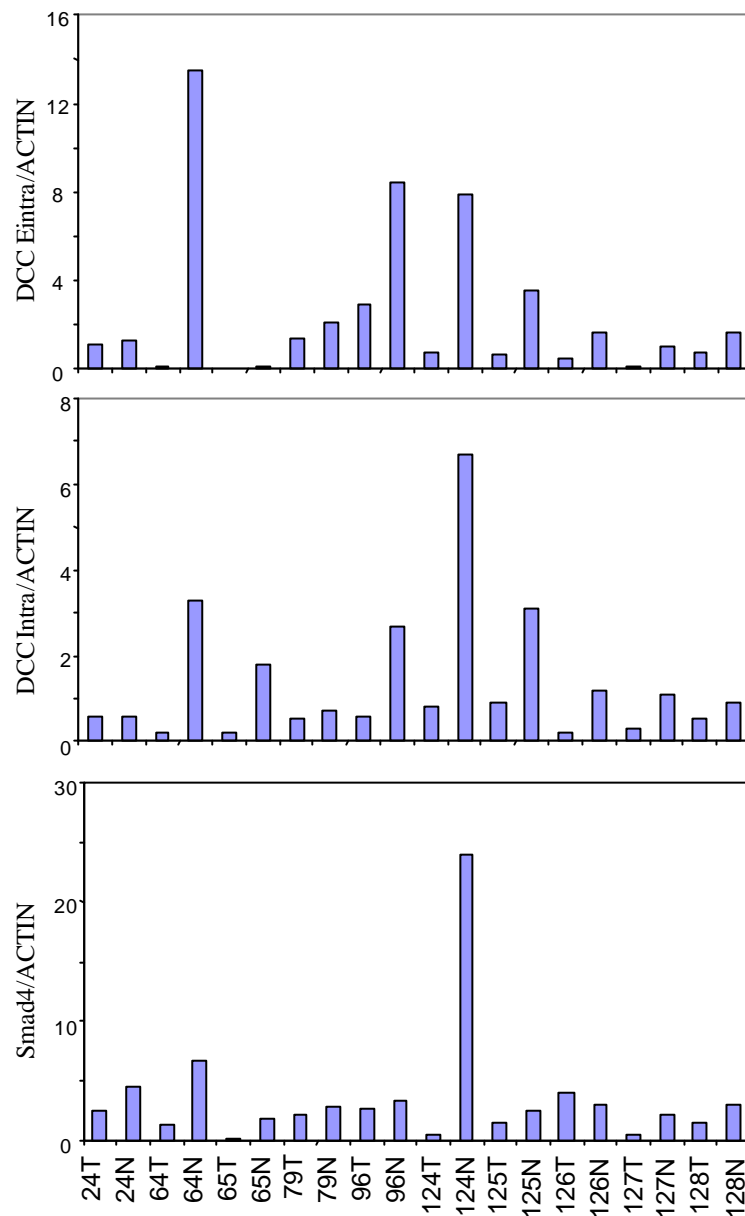
B

Figura 2: Anàlisi, per RT-PCR, de l'expressió dels gens DCC i Smad4 en tumors primaris colorrectals

(A): Anàlisi per electroforesi dels productes de PCR amplificats en fase lineal, a partir dels cDNA's sintetitzats per cadascuna de les mostres.

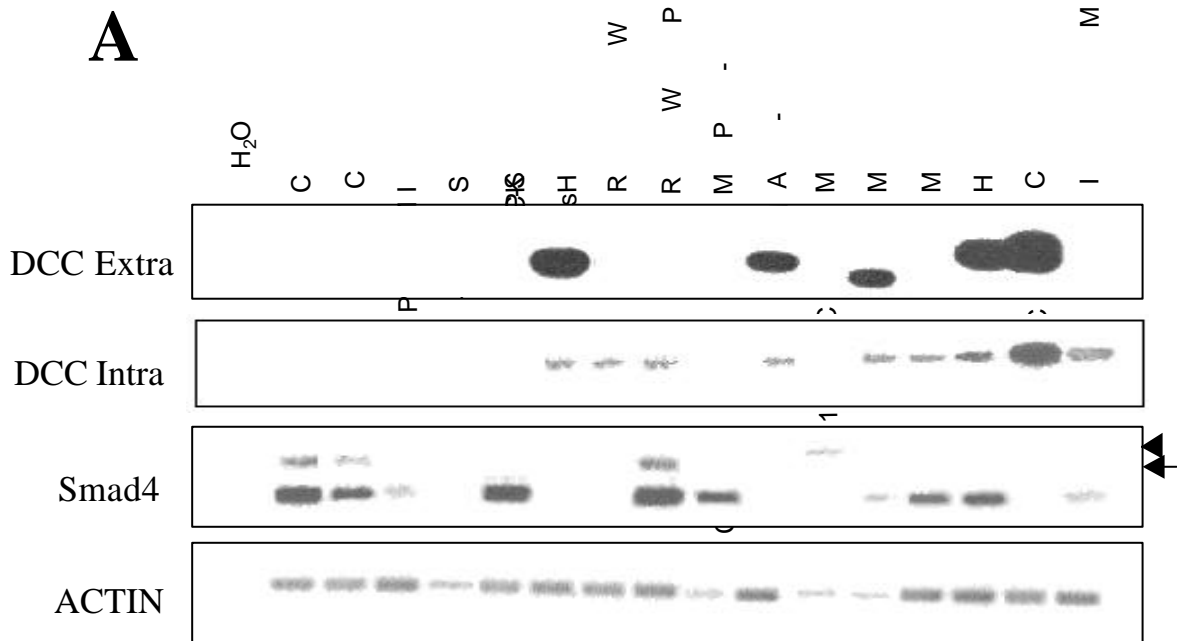
A cada mostra de tumor (T) li correspon una mostra de teixit normal (N) del mateix pacient. Els productes d'amplificació generats en el domini extracel·lular i en el domini intracel·lular del gen DCC són fragments de 341 o 281 pb, i de 164 o 159 pb, respectivament. Les diferents talles en cadascun dels casos, corresponen a fenòmens de processament alternatiu del mRNA descrits prèviament. El fragment amplificat per l'anàlisi d'expressió de Smad4 és de 285 pb. (B): Gràfics que representen els nivells d'expressió relativa de DCC i Smad4, els quals han estat determinats per densitometria semiquantitativa (unitats de densitometria de DCC o Smad4 / unitats de densitometria d'Actina).

RESULTATS

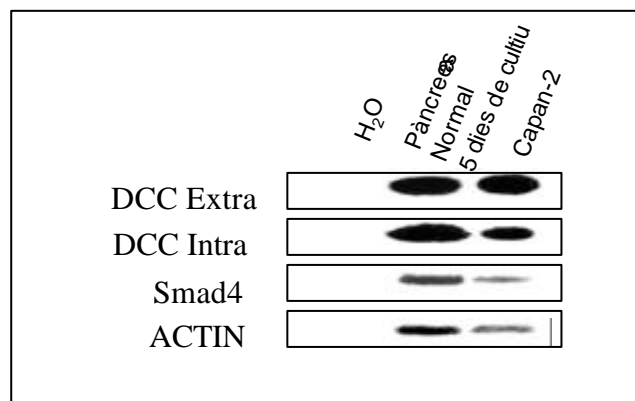
Totes les línies derivades de càncer de pàncrees analitzades (n=16) presenten un fenotip ductal (Vilà et al., 1994). En 7 de les línies (44%) no es detecta expressió del DCC amb cap dels parells d'encebadors utilitzats i en 4 línies l'expressió del domini extracel·lular és indetectable mentre que la del domini intracel·lular és molt baixa (Fig. 3 A i C).

S'observa una manca d'expressió de Smad4 en 5 de les 16 línies (31%), on en una d'elles (MZPC-1) s'amplifica una seqüència més llarga que no ha estat analitzada i que no s'ha considerat en aquest estudi semiquantitatiu. En 3 de les línies on s'expressa Smad4, també s'observa el producte d'amplificació addicional descrit anteriorment per les línies derivades de càncer de colòn.

En teixit pancreàtic normal, després de 5 dies de cultiu, es detecta l'expressió de tots dos gens (Fig. 3 B).



B



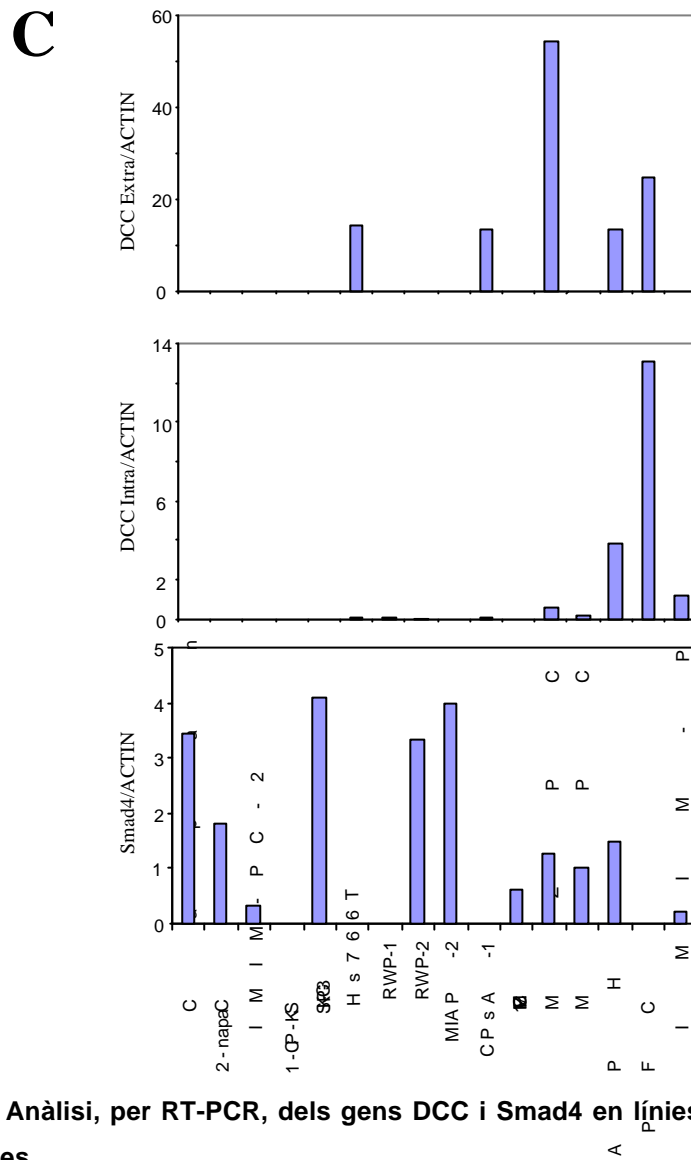


Figura 3: Anàlisi, per RT-PCR, dels gens DCC i Smad4 en línies derivades de càncer de pàncrees

(A): Anàlisi per electroforesi dels productes de PCR amplificats en fase linear, a partir dels cDNA's sintetitzats per cadascuna de les mostres. Els productes d'amplificació generats en el domini extracel·lular i en el domini intracel·lular del gen DCC són fragments de 341 o 281 pb, i de 163pb o 159 pb, respectivament. Les diferents talles en cadascun dels casos, corresponen a fenòmens de processament alternatiu del mRNA descrits prèviament. El fragment amplificat per l'anàlisi d'expressió de Smad4 és de 285 pb. La fletxa indica una banda addicional amplificada en alguns dels casos. El cap de fletxa senyala una banda de mida no esperada, amplificada en la línia MZPC-1. (B): Gràfics que representen els nivells d'expressió relativa de DCC i Smad4, determinats per densitometria semiquantitativa (unitats de densitometria de DCC o Smad4 / unitats de densitometria d'Actina). (C): Anàlisi per electroforesi dels productes de PCR amplificats en fase linear, a partir dels cDNA's sintetitzats per una mostra de pàncrees normal després de 5 dies de cultiu *in vitro*, i la línia cel·lular Capan-2.

Tant en l'anàlisi dels tumors com de les línies derivades de càncer de còlon i de pàncrees, l'expressió de DCC i de Smad4 es troba doncs disminuïda respecte els teixits normals. Per altra banda, aquests resultats demostren que les alteracions en DCC i Smad4 tenen lloc de forma independent. Així, s'observa que no existeix correlació entre els nivells de DCC i els de Smad4 en l'anàlisi d'expressió tant en tumors com en línies cel·lulars. A mode d'exemple, en les 3 línies derivades de càncer de còlon on els nivells de Smad4 són més elevats (HT-29, SK-CO-1 i SW1417), HT-29 presenta expressió de DCC amb ambdós parells d'encebadors, SK-CO-1 només presenta producte d'amplificació amb els encebadors del domini intracel·lular, i en SW1417 s'observa manca total de l'expressió d'aquest gen (Fig. 1). Els resultats obtinguts amb les línies derivades de càncer de pàncrees encara són més reveladors, de manera que nivells alts de Smad4 en 5 de les línies s'associen a la manca de detecció de trànscrips del DCC amb ambdós parells d'encebadors. De la mateixa manera, en la línia CFPAC1 la manca d'expressió de Smad4 correlaciona amb l'expressió del DCC (Fig. 3).

2. DCC no està implicat en diferenciació epitelial intestinal

2.1. Anàlisi de la correlació entre el fenotip de les línies cel·lulars derivades de càncer de còlon i l'expressió del DCC

Donats els resultats de Hedrick et al. (1994) on es proposava un paper del DCC en la diferenciació mucosecretora de les cèl·lules de l'epiteli intestinal, s'ha estudiat la possible correlació entre l'expressió del DCC i el fenotip mucosecretor de les línies derivades de càncer de còlon.

Primerament, amb la fi de determinar la capacitat mucosecretora de les 12 línies, es va analitzar la producció de muc en seccions de rollos de cèl·lules cultivades fins a 10 dies post-confluència, mitjançant dues tècniques: 1) Tinció de les mucines amb Blau Alcà, 2) Immunofluorescència utilitzant l'anticòs monoclonal anti-mucines colòniques ZE4. Com s'observa en la

figura 4, on només es mostren els resultats més representatius, un 70% de cèl·lules HT-29 M6 són reactivives amb Blau Alcà, així com un 25% i 10% de les LS174T i HT-29 M3 respectivament. Cap de les altres línies estudiades va donar positiu per la síntesi de moc. Els resultats obtinguts amb totes dues tècniques són semblants, excepte en el cas de les HT-29 M6 donat que expressen predominantment mucines de tipus gàstric.

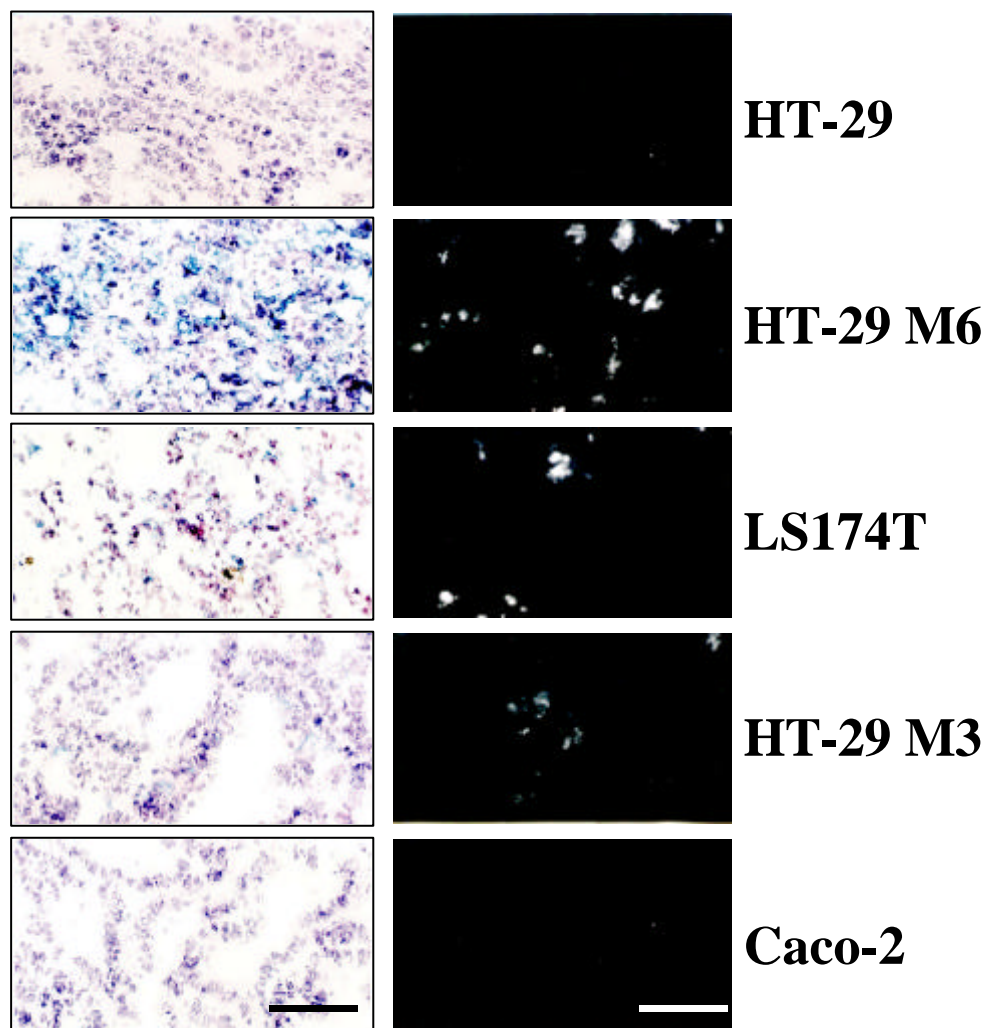


Figura 4: Anàlisi de la diferenciació mucosecretora de les línies de càncer de còlon

La capacitat mucosecretora de les cèl·lules s'ha analitzat sobre talls de criostat de rotllos de cèl·lules cultivades prèviament fins a 10 dies post-confluència. Esquerra: Tinció de les mucines amb Blau Alcà i contratinció dels nuclis amb vermell nuclear. Dreta: Immunofluorescència utilitzant l'anticòs monoclonal anti-mucines colòniques ZE4. Barra de escala: 135 µm.

D'altra banda, s'analitzà la presència de trànscrips corresponents tant a mucines colòniques (MUC2, MUC3, MUC5B) com gàstriques (MUC5AC, MUC5B, MUC6) per Northern blot (Fig. 5). En el RNA total del còlon normal, utilitzat com a control, es detecten els trànscrips de MUC2, MUC3 i MUC5B.

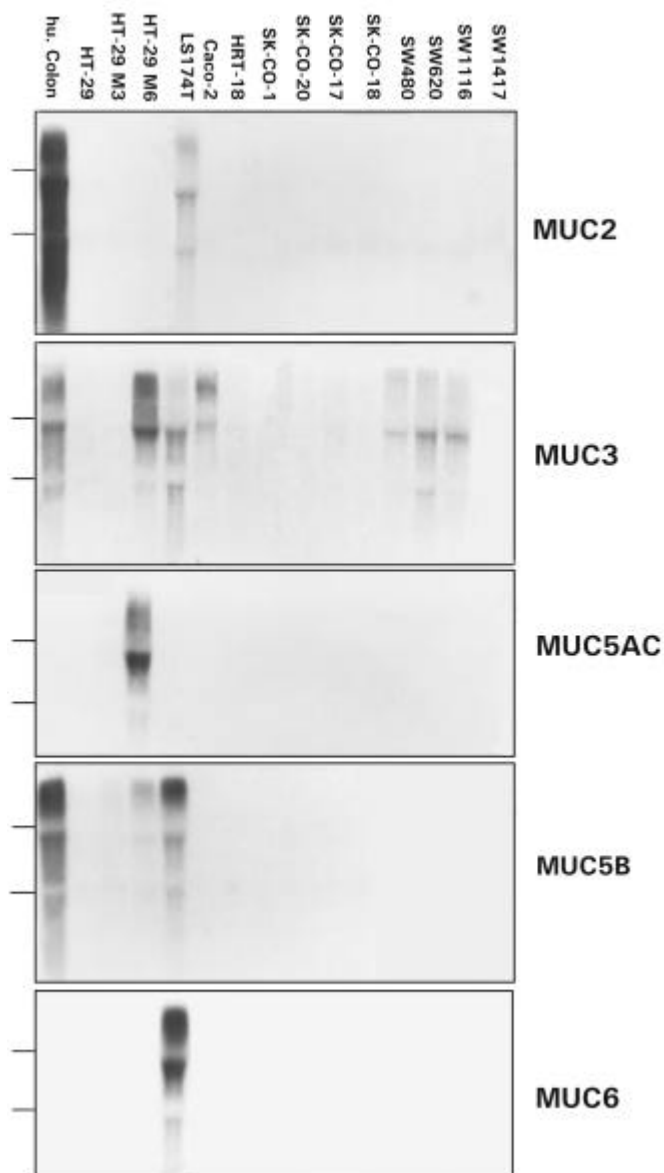


Figura 5: Anàlisi per Northern blot, de l'expressió de mucines en colon normal i línies cel·lulars humanes derivades de carcinoma de còlon

15 µg de RNA total de cadascuna de les línies i d'una mostra de còlon normal, s'han analitzat per Northern blot utilitzant sondes que reconeixen el mRNA de les mucines colòniques (MUC2, MUC3, MUC5B) i gàstriques (MUC5AC, MUC5B, MUC6). A l'esquerra estan indicada la mobilitat de les subunitats de RNA ribosomal 18S i 28S.

Cap de les línies cel·lulars presenta un patró d'expressió de mucines similar al del teixit de còlon normal i tampoc s'observen patrons comuns entre elles (Fig. 5). Així mentres que MUC3 i MUC5AC són més abundants en la línia HT-29 M6, MUC5B i MUC6 predominen en les LS174T. Els resultats del Northern blot confirmen l'absència de correlació entre la expressió de DCC i la síntesi de mucines. En la taula I estan resumits els resultats d'expressió del DCC per RT-PCR, la síntesi de moc i la presència dels trànscrips de les diferents mucines, per les diferents línies derivades de còlon estudiades.

Tipus Cel·lular ó Teixit	Expressió del DCC per RT-PCR		Tinció amb Blau Alcià	Expressió de Mucines per Northern blot				
	EX	IN		MUC2	MUC3	MUC5AC	MUC5B	MUC6
CÒLON Normal	+	+	+	+	+	-	+	-
HT-29	+	+	-	-	-	-	-	-
HT-29 M3	+/-	+/-	+(10%)	-	-	-	+/-	-
HT-29 M6	+	+/-	+	-	+	+	+	-
LS174T	+	+	+	+	+	-	+	+
Caco-2	+	+	-	-	+	-	-	-
HRT-18	-	+	-	-	+/-	-	-	-
SK-CO-1	-	+	-	-	-	-	-	-
SK-CO-20	+	+	ND	-	-	-	-	-
SK-CO-17	+	-	-	-	+/-	-	-	-
SW 480	+	+	-	-	+	-	-	-
SW 620	+/-	+	-	-	+	-	-	-
SW 1116	-	+	-	-	+	-	-	-
SW 1417	-	-	-	-	-	-	-	-

Taula I: Estudi comparatiu de l'expressió del mRNA del DCC, tinció del moc, i l'expressió dels gens de mucines en còlon normal humà i en línies cel·lulars derivades de càncer de còlon amb potencial de diferenciació variable *in vitro*.

2.2. Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió del DCC en l'epiteli de còlon normal

Malgrat són un bon model d'estudi, les línies cel·lulars derivades de tumors, presenten limitacions degut a la seva natura transformada i no són totalment representatives del corresponent teixit normal. Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió del DCC, paral·lelament amb la síntesi de moc, en la

mucosa normal del còlon. Així, s'han analitzat per immunohistoquímica seccions seriades del teixit inclòs en parafina, utilitzant un anticòs policlonal generat contra el domini intracel·lular del DCC (anti-DCC.I) i purificat per afinitat (veure secció 7.1 dels Materials i Mètodes). La proteïna DCC es detecta en totes les cèl·lules epitelials (Fig 6 B). No s'observa immunoreacció si s'utilitza un anticòs irrelevant (Fig. 6 A). El moc, detectat per tinció amb Blau Alcà, s'observa en les cèl·lules mucosecretors i, en menys quantitat, en l'epiteli de superfície (Fig. 6 C). Per tal d'aprofundir més en la caracterització de les cèl·lules que expressen DCC, s'han fet dobles marcatges utilitzant els anticòs anti-DCC.I i anti-MUC2, mucina majoritària expressada per les cèl·lules mucosecretors de l'epiteli colònic (revisat a Buisine et al., 1998). DCC s'expressa tant en cèl·lules que presenten aquesta mucina colònica com en cèl·lules on aquesta hi és absent (Fig. 6 D, D.1). De la mateixa manera s'han fet dobles marcatges utilitzant els anticòs anti-DCC.I i anti-CEA, un marcador de cèl·lules absortives amb localització apical, demostrant la co-expressió de totes dues proteïnes en la mucosa normal del còlon (Fig. 6 E, E.1). Aquests resultats demostren que l'expressió del DCC no és específica de cèl·lules mucosecretors sino que DCC també s'expressa en les cèl·lules absortives de la mucosa normal del còlon.

2.3. Anàlisi de l'efecte de l'expressió ectòpica del DCC sobre el fenotip de les cèl·lules HT-29

Per aprofundir en l'estudi de la possible implicació del DCC en el procés de diferenciació epitelial, es van generar transfectants estables de cèl·lules HT-29 que expressaven la proteïna DCC de forma ectòpica. Les cèl·lules HT-29 creixen formant una multicapa de cèl·lules indiferenciades (Zweibaum et al., 1991) i presenten nivells molt baixos de DCC, de manera que malgrat es detecta el mRNA per RT-PCR, la proteïna no es detecta per Western blot. Tal com es detalla en la secció 2.1 dels Materials i Mètodes es van transfectar cèl·lules HT-29 amb el cDNA sencer del DCC clonat en el vector

pCMVneo (HT-29/DCC), així com amb el vector pCMVneo sense insert, a mode de control (HT-29 control).

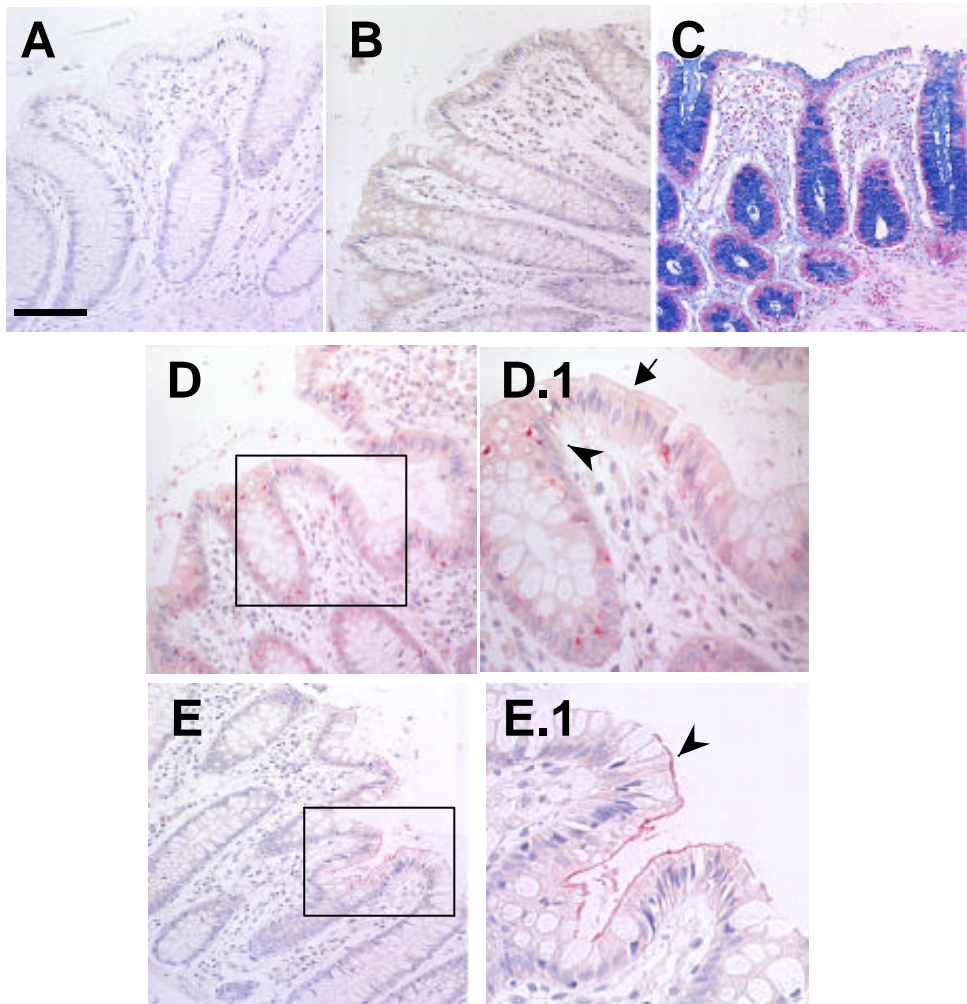


Figura 6: Localització de l'expressió del DCC i anàlisi de la síntesi de moc en mucosa de còlon normal

S'han utilitzat seccions seriades de teixit de còlon normal inclòs en parafina. (A) Immunohistoquímica utilitzant un anticòs irrelevant (anti-dextrà B12) a mode de control negatiu. (B) Immunohistoquímica utilitzant l'anticòs anti-DCC.I purificat per afinitat (veure secció 7.1.1 de Materials i Mètodes). (C) Tinció amb Blau Alcian de les mucines colòniques. Dobles marcatges: (D) Anti-DCC.I en marró i anti-MUC2 en vermell. (D.1) Detall de la regió emmarcada en (D): el cap de fletxa i la fletxa senyalen respectivament, una cèl·lula mucosecretora i una cèl·lula no mucosecretora amb expressió de DCC. (E) Anti-DCC.I en marró i anti-CEA en vermell. (E.1) Detall de la regió emmarcada en (E): el cap de fletxa senyala una cèl·lula amb doble marcatge DCC i CEA. Barra d'escala: 180 μm (A-E); 60 μm (D.1, E.1).

En els clons aïllats, resistents a la geneticina, s'analitzà l'expressió de la proteïna DCC per Western blot. Paral·lelament, s'analitzà la seva distribució subcel·lular ja que, per ésser funcional, DCC ha d'estar situat en la membrana plasmàtica. Es van obtenir cinc clons independents que expressaven nivells variables de proteïna DCC en la fracció que conté les proteïnes de membrana (Fig. 7C). L'anàlisi per immunofluorescència mostrà que el DCC es distribueix en la membrana plasmàtica i en el citosol de les cèl·lules transfectades (Fig. 7B). Per a confirmar la localització del DCC a la membrana citoplasmàtica dels transfectants, les proteïnes de membrana es van biotinitar i, seguit d'una extracció amb Tritó X-114, es van purificar utilitzant streptavidin-agarosa. Seguint aquest protocol (veure secció 9.3 dels Materials i Mètodes), DCC es detecta majoritàriament en la fracció que conté les proteïnes de membrana (Fig. 7D). Com a control de la biotinitació exclusiva de les proteïnes de membrana s'analitzaren l'E-cadherina, proteïna de membrana que forma part de les unions adherents, i la proteïna citosòlica PKC α . Tal com s'observa en la figura 7D, ambdues proteïnes estan presents en els lisats totals (carril T), però només es detecta l'E-cadherina en la fracció biotinitada (carril D). El conjunt d'aquests resultats confirma que DCC es localitza en la membrana plasmàtica de les cèl·lules HT-29 transfectades, indicant que aquestes expressen una proteïna potencialment funcional.

Les cèl·lules HT-29/DCC creixen formant una multicapa de cèl·lules no polaritzades, suggerint que l'expressió del DCC no activa cap programa de diferenciació. Per a confirmar aquests resultats es va estudiar per Western blot l'expressió de marcadors de diferenciació mucosecretora (mucines) o absortiva (sucrasa isomaltasa). Independentment dels nivells d'expressió del DCC, cap dels clons HT-29/DCC presenta expressió d'aquests marcadors. En la figura 8 es mostra el resultat per a l'anàlisi de les mucines, les quals només es detecten en les cèl·lules HT-29 M6 utilitzades com a control positiu (Lesuffleur et al., 1993).

El conjunt d'aquests resultats indica que no existeix correlació entre l'expressió del DCC i el fenotip cel·lular, tant en línies derivades de càncer colorectal com en el teixit normal, i que l'expressió ectòpica d'aquest gen en les cèl·lules HT-29 no activa cap programa de diferenciació cel·lular.

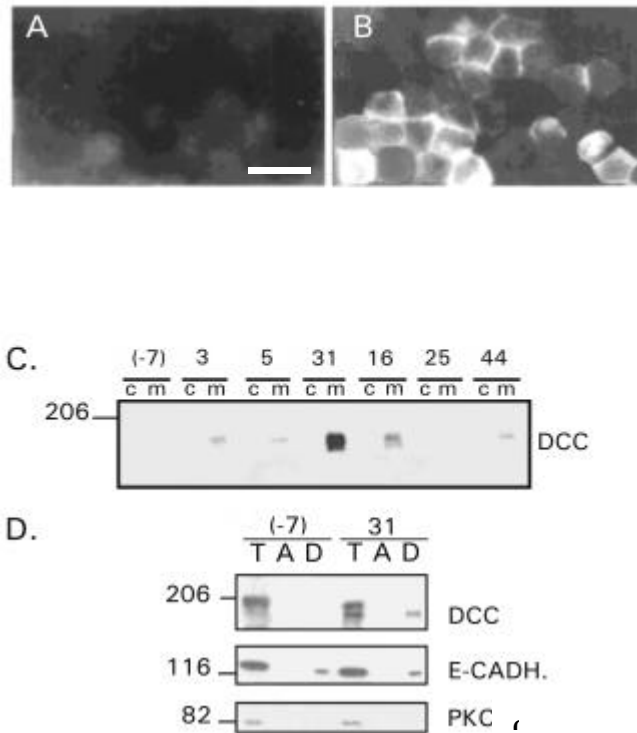
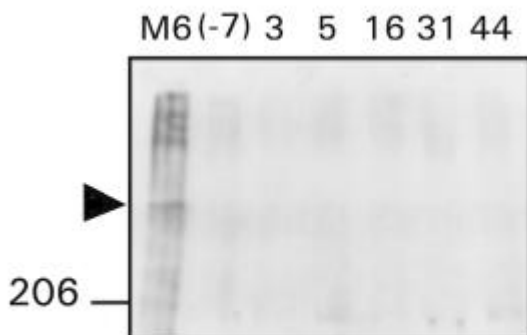


Figura 7: Anàlisi de la localització del DCC en els transfectants HT-29/DCC

Anàlisi per immunofluorescència en (A) cèl·lules HT-29 control (clon -7) i (B) un clon positiu per l'expressió del DCC (clon 31). Barra d'escala: 40 µm. (C) Anàlisi de l'expressió per Western blot del DCC, en fraccions de proteïnes citosòliques (c) o de membrana (m), en un clon control (-7) i en els diferents clons HT-29/DCC (Clons: 3, 5, 31, 16, 25, 44). Els nivells d'expressió en els diferents clons són diferents, però DCC sempre es detecta en la fracció proteica que conté les proteïnes de membrana.

Figura 8: Anàlisi de l'expressió de mucines per Western blot en els transfectants HT-29 control i DCC

S'han utilitzat extrems de proteïna total d'un control (-7), dels clons que expressen DCC (3, 5, 16, 31, 44) i de cèl·lules M6 com a control positiu. Els extrems proteïcs han estat separats per SDS-PAGE(6% d'acrilamida/bis), transferits a un filtre de nitrocel·lulosa i incubats amb l'anticòs anti-mucines gàstriques L56. El cap de fletxa indica la separació entre el gel concentrador i el de migració.



3. El DCC regula l'adhesió cel·lular *in vitro* i té un efecte antitumoral *in vivo*

Per a estendre els estudis de l'efecte del DCC sobre el fenotip cel·lular vem analitzar les HT-29/DCC a nivell de morfologia, proliferació *in vitro* i capacitat tumorigènica *in vivo*, adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu, mobilitat i capacitat de disseminació *in vivo*. Aquests paràmetres es van estudiar en paral·lel tractant les cèl·lules amb medi condicionat de cèl·lules 293/EBNA-Net-1. D'altra banda, considerant la possibilitat de que el DCC pogués tenir un lligand específic del sistema gastrointestinal i la importància de les interaccions epiteli-mesènquima en el desenvolupament de l'epiteli intestinal (Gordon and Hemirston, 1994; Simon-Assmann et al., 1995; Kedinger et al., 1996; Simon-Assmann et al., 1998; revisat a Montgomery et al., 1999), s'estudià també l'efecte de cèl·lules mesenquimals derivades de biòpsies d'intestí (clons C9 i C20) sobre les HT-29/DCC, com a possibles fonts d'altres lligands. Els resultats obtinguts venen descrits a continuació.

3.1. Morfologia

Com s'observa per microscopia en contrast de fases (Fig. 9 A i B), els espais intercel·lulars en les cèl·lules HT-29/DCC en cultiu, són menors en comparació als de les HT-29 control. A més, la densitat de confluència és el doble per a les cèl·lules HT-29/DCC respecte a les control, sense que varii el tamany cel·lular tal com s'observa en els talls semifins (Fig. 9 C i D). Aquests resultats s'han confirmat a postconfluència (Fig. 9 C i D), on per altra banda s'observa que les cèl·lules HT-29/DCC, a l'igual que les control, creixen en multicapa de cèl·lules no polaritzades.

El medi condicionat de les cèl·lules que secreten Netrina-1 (293/EBNA-Net-1), així com les 293/EBNA control, no produeix cap canvi en la morfologia de les cèl·lules HT-29/DCC (Fig 10. G i H) o control (Fig. 10 B i C). El medi condicionat dels clons C9 i C20 indueix les cèl·lules a individualitzar-se i a adoptar una morfologia arrodonida indicant una pèrdua de contactes intercel·lulars (Fig. 10 D, E, I i J). No obstant aquest efecte no és específic de l'expressió del DCC, ja que també té lloc en els clons control.

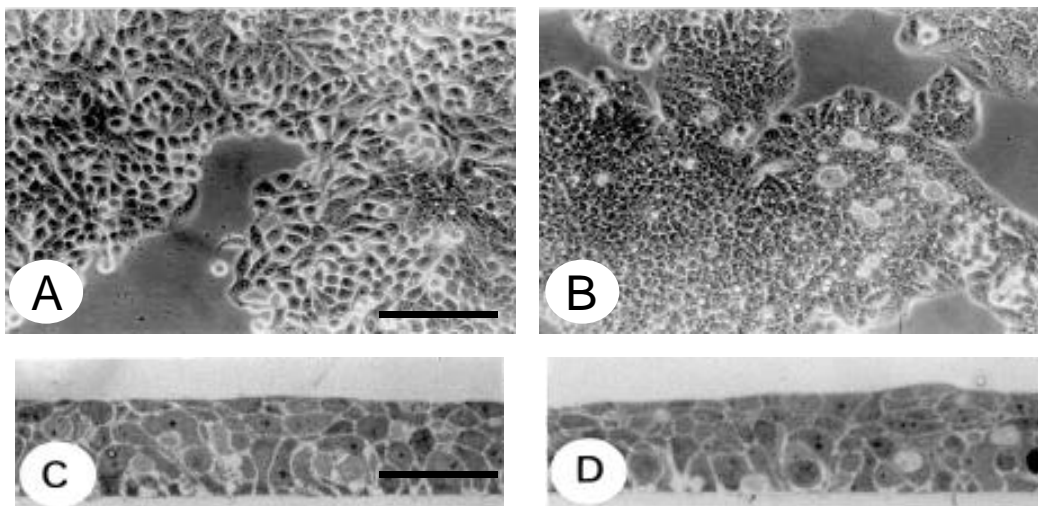


Figura 9: Efecte del DCC sobre la morfologia de les HT-29

A i B: Morfologia de les cèl·lules en cultiu a preconfluència analitzada per microscopia de contrast de fases. C i D: Seccions semifines de cultius a 21 dies de cultiu, tenyides amb blau de toluidina i analitzades per microscopia de contrast de fases. A i C són un clon HT-29 control; B i D són un clon HT-29/DCC. Les barres d'escala corresponen a 240 μm (A i B) i 60 μm (C i D).

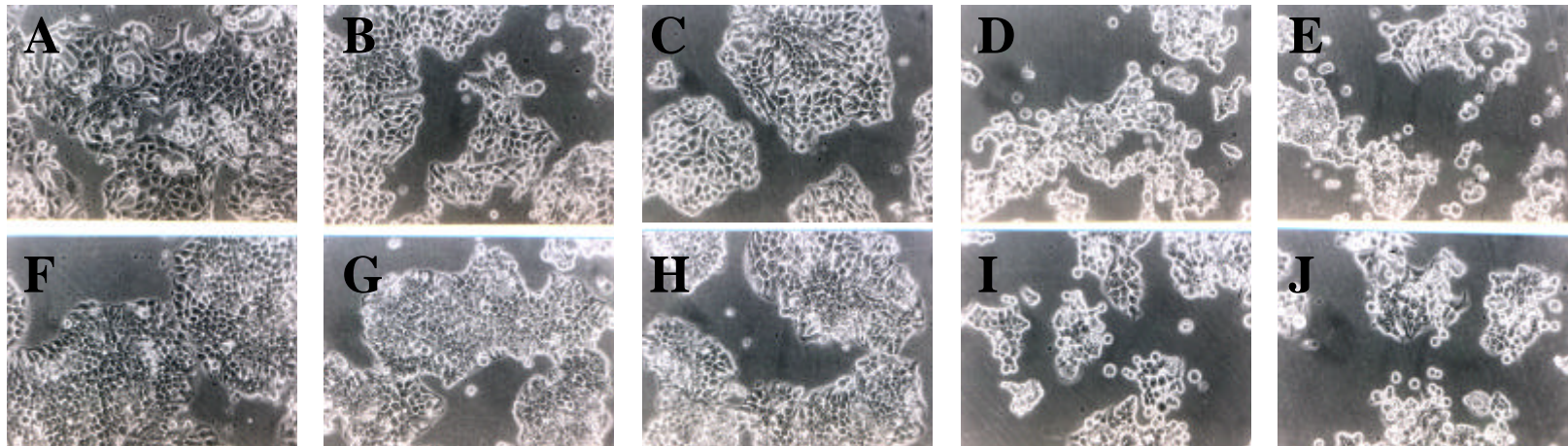


Figura 10: Efecte del medi condicionat de les cèl·lules 293/EBNA-Net-1 i control i els clons C9 i C20 sobre les cèl·lules HT-29 control i DCC

Morfologia, analitzada per microscopia de contrast de fases, de les cèl·lules HT-29 control (A-E) i HT-29/DCC (F-J) cultivades en presència dels següents medis: A i F: DMEM suplementat amb 10% de FCS; B i G: medi condicionat de cèl·lules 293/EBNA control; C i H: medi condicionat de cèl·lules 293/EBNA-Net-1; D i I: medi condicionat del clon C9; E i J: medi condicionat del clon C20.

3.2. Proliferació

Les taxes de proliferació *in vitro* dels clons HT-29/DCC i control no presenten diferències significatives (Fig. 11 A). Igualment, la presència dels medis condicionats de les cèl·lules C9 i C20 no indueix diferències significatives en la taxa proliferativa de les cèl·lules HT-29, independentment de l'expressió del DCC (Fig. 11 B, C). Així doncs es pot concloure que l'expressió del DCC no afecta a les propietats proliferatives de les cèl·lules HT-29 *in vitro*.

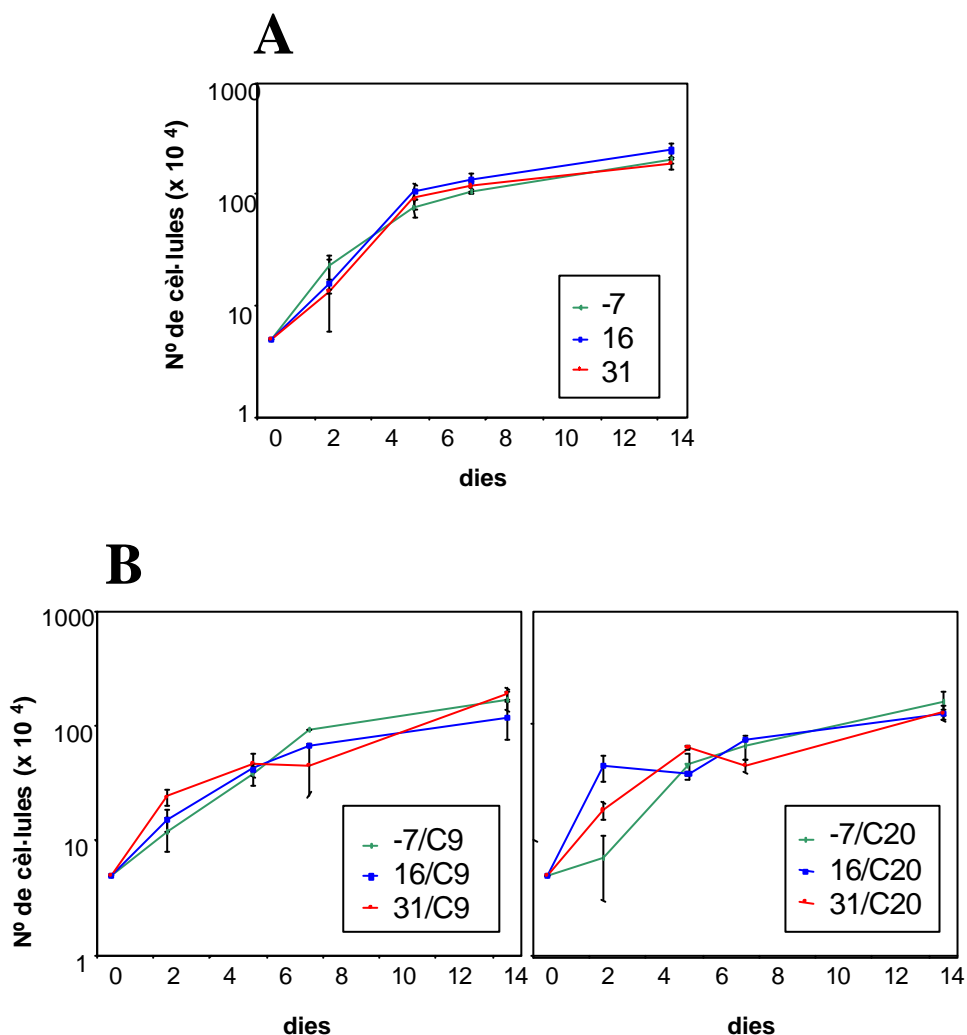


Figura 11: Efecte del DCC sobre la proliferació de les cèl·lules HT-29

A: Corbes de proliferació del clon control -7 i dels clons HT-29/DCC (16 i 31), en condicions normals de cultiu (DMEM, 10% de FCS). B i C: Comparació del creixement dels clons HT-29/DCC (16 i 31) amb el clon control (-7) en medi condicionat de cèl·lules C9 i C20, respectivament.

Per a determinar l'efecte del DCC sobre la capacitat tumorigènica, les cèl·lules HT-29 es van injectar en ratolins *nude*. Els resultats demostren que els tumors generats per les cèl·lules HT-29/DCC creixen més lentament que els tumors desenvolupats a partir de les cèl·lules HT-29 control. A dia 50 post-injecció, la inhibició del creixement tumoral induïda per l'expressió del DCC en les cèl·lules HT-29 varia, depenent de l'experiment del 40 al 86% en el clon 16 i del 48 al 60% en el clon 31 (Fig.12 A).

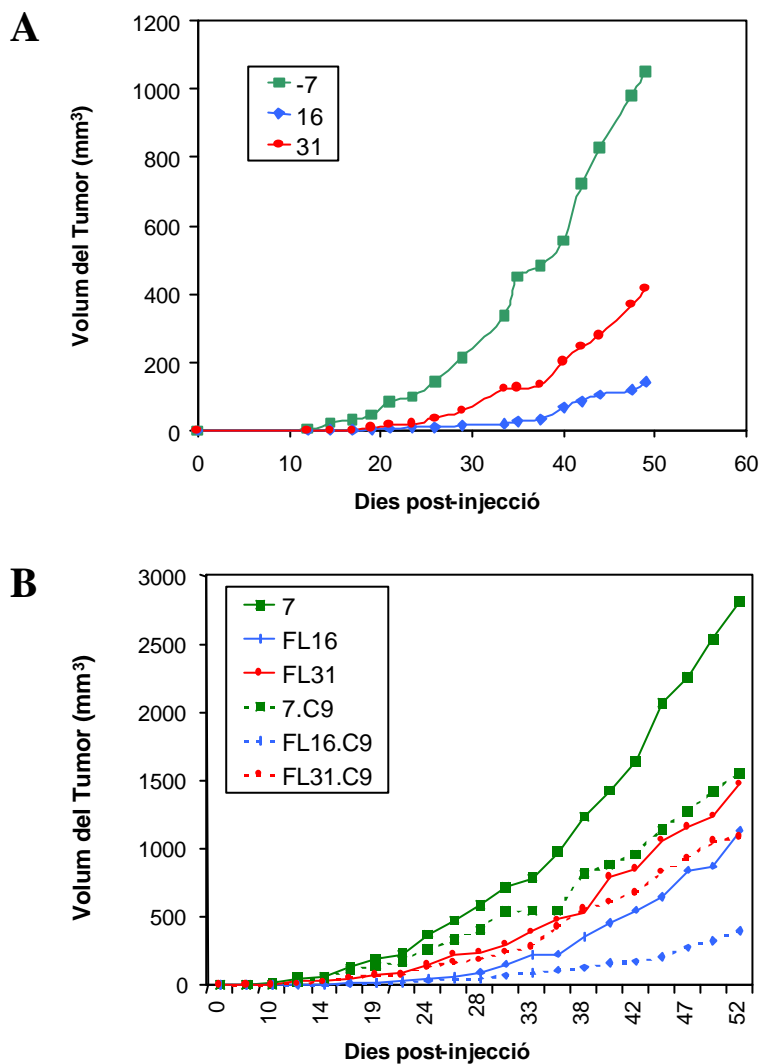


Figura 12: Corbes de creixement dels tumors desenvolupats en ratolins *nude*

El desenvolupament dels tumors generats per la injecció subcutània de les cèl·lules HT-29/DCC (clons 16 i 31) i control (clon -7) en ratolins *nude* s'ha mesurat al llarg del temps. El volum dels tumors, en mm³, s'ha calculat segons la fórmula $\frac{4}{3} \pi r^3$. (A): El gràfic mostra les mitjanes dels resultats de dos experiments independents. (B): Les línies discontinues corresponen als tumors desenvolupats pels transfectants HT-29/DCC i control co-injectats amb les cèl·lules C9 en relació numèrica 1:1.

Aquests experiments demostren que el DCC té un efecte anti-tumorigènic *in vivo*. Amb la fi d'estudiar si els clons C9 o C20 podien afectar a aquesta capacitat supressora de tumor del DCC, es van co-injectar aquestes cèl·lules amb les HT-29/DCC i control en relació numérica 1:1. La co-injecció dels clons C9 i C20 indueix una disminució del creixement tumoral generat per les cèl·lules HT-29 independent de l'expressió del DCC (Fig. 12 B). A dia 50 post-injecció, aquesta disminució del creixement tumoral és del 45%, 65% i 26% pels clons -7, 16 i 31 respectivament.

3.3. Adhesió cèl·lula-cèl·lula

En els epitelis, les interaccions intercel·lulars proporcionen la cohesió, la permeabilitat selectiva i la resistència característiques del teixit. Numerosos estudis han revelat que la funcionalitat de les unions adherents es perd en la majoria dels càncers humans epitelials (revisat en Christofori and Semb, 1999). Els mecanismes responsables inclouen alteracions en l'expressió i funció de l'E-cadherina així com alteracions en les altres proteïnes components de la unió adherent funcional. En general, aquestes alteracions correlacionen amb tumors invasius i metàstacs (revisat a Birchmeier and Behrens, 1994; Bracke et al., 1996; Nollet et al., 1999; Beavon, 2000). No obstant, si la pèrdua de la funcionalitat de l'E-cadherina és un pre-requisit per a la progressió tumoral o bé és una conseqüència d'aquesta és encara una qüestió oberta a discussió (revisat a Christofori and Semb, 1999).

Per una altra banda, s'ha demostrat que diversos tipus de tumors, i particularment les metàstacs derivades d'aquests, presenten uns nivells reduïts i en molts casos indetectables de components dels desmosomes tals que la desmoplakina, la plakoglobina i la desmogleïna I (Buchner et al., 1998; Depont et al., 1999; Tada et al., 2000).

L'observació al microscopi de contrast de fases de les cèl·lules HT-29/DCC indicava que els espais intercel·lulars eren menors que els de les cèl·lules control (veure secció 3.1 d'aquest capítol), suggerint un major nombre de

contactes intercel·lulars i/o unes unions més fortes. Per aquesta raó es van estudiar les unions adherents en els transfectants control i DCC, analitzant per Western blot la proporció d'E-cadherina insoluble en Tritó X-100 ó associada al citosquelet i per tant funcional. Com s'observa en la figura 13, no hi ha diferències en els nivells d'E-cadherina associada al citosquelet ni els d'E-cadherina total entre les cèl·lules HT-29 control i DCC. Aquests resultats demostren que la presència del DCC no afecta de manera directa a les unions adherents de les cèl·lules HT-29.

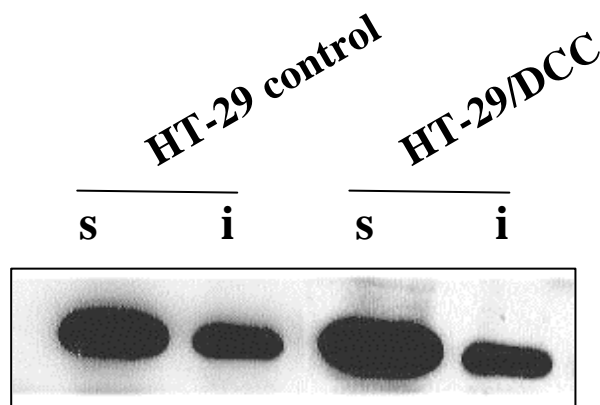


Figura 13: Anàlisi per Western blot de l'E-cadherina.

Les fraccions proteïques solubles (s) i insolubles (i) en Tritó X-100 dels transfectants s'han analitzat per la presència d'E-cadherina.

En canvi, l'estudi dels desmosomes per microscopia electrònica revelà que les HT-29/DCC contenen quasi bé el doble de desmosomes que les HT-29 control (10 ± 2.38 versus 6 ± 2.34 , respectivament). A més, els desmosomes de les HT-29/DCC presenten un nivell més alt de complexitat estructural que els de les HT-29 control (Fig. 14 A). D'acord amb aquests resultats, per immunofluorescència s'observa una disposició més extensa i regular de les desmoplakines I i II en la membrana de les cèl·lules HT-29/DCC respecte les cèl·lules control (Fig. 14 B).

El conjunt d'aquests resultats demostra que DCC incrementa les unions intercel·lulars induïnt un augment del número i de la complexitat dels desmosomes sense afectar directament a les unions adherents. Aquest fet

suggereix que el DCC podria tenir un efecte com a inhibidor de la mobilitat cel·lular.

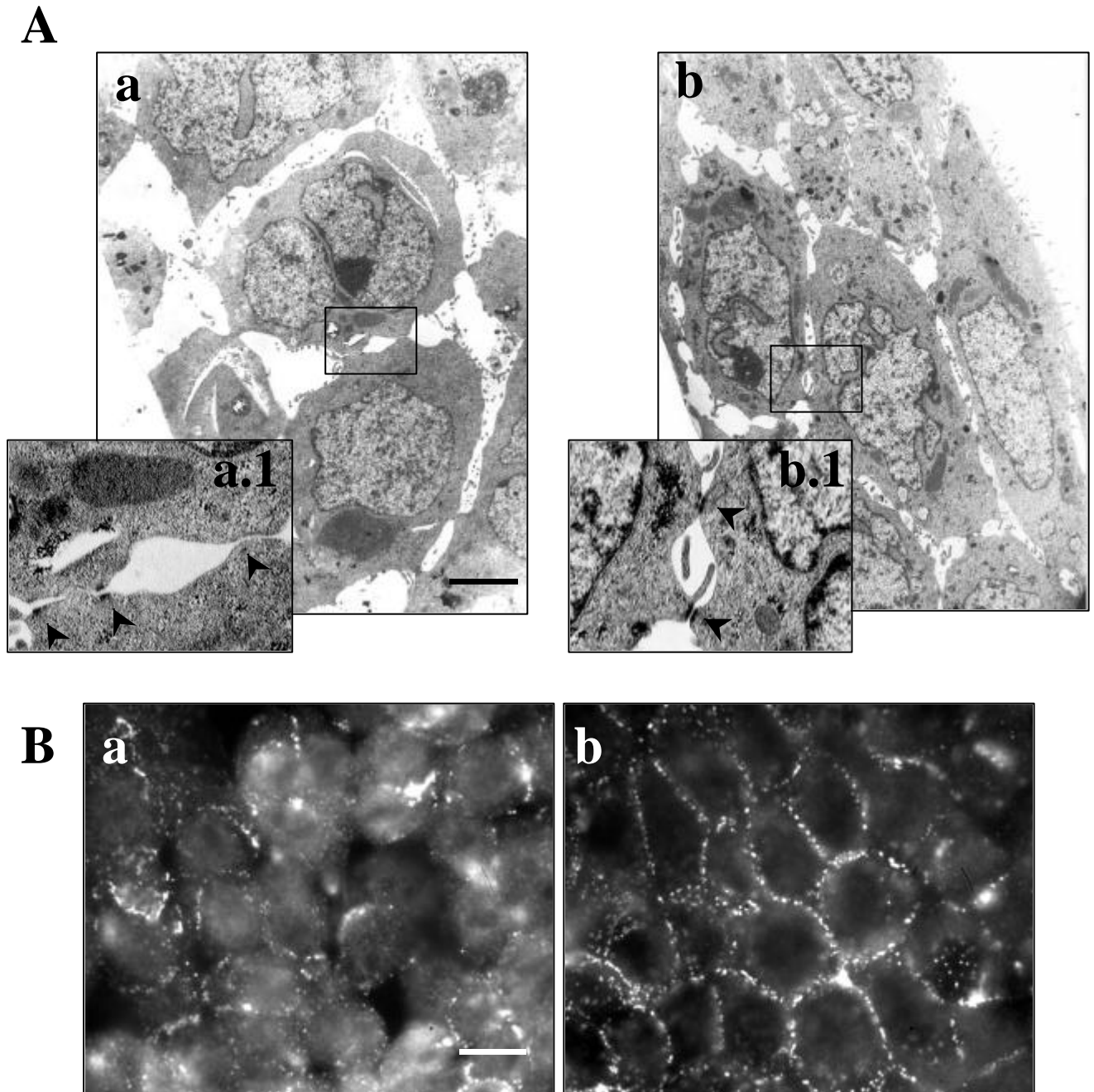


Figura 14: Estudi dels desmosomes

(A): Anàlisi per microscopia electrònica de l'estructura dels desmosomes. (a) HT-29 control, (b) HT-29/DCC. (a.1) i (b.1) són un detall de les regions enquadrades en (a) i (b) respectivament. Els caps de fletxa senyalen desmosomes. Barra d'escala: 10 μm . (B): Anàlisi per immunofluorescència de les desmoplakines I i II en les cèl·lules HT-29 control (a) i HT-29/DCC (b). Barra d'escala: 50 μm .