



Universitat Autònoma de Barcelona



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA

**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VERSICANO Y SU RELACIÓN
CON LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA
HUMANO”**

TESIS DOCTORAL

CLELIA DOMENZAIN REYNA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLÒGIA MOLECULAR

FACULTAT DE VETERINÀRIA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

BARCELONA, 2006.

**“Regulación de la Expresión de Versicano y su Relación con la
Diferenciación de las Células de Melanoma Humano”**

Memoria presentada por
Clelia Domenzain Reyna
para optar al grado de
Doctora en Bioquímica i Biología Molecular
por la Universitat Autònoma de Barcelona

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

Fdo. Clelia Domenzain Reyna

Fdo. Anna Bassols i Teixidó

Bellaterra, Septiembre de 2006.

A LA MEMORIA DE MI IAIA Y MI ABUELO

Voldria agrair no tan sols a la gent que m'ha donat suport acadèmicament durant aquests anys, sinó també a la gent que ha estat allà, al costat, sempre, compartint tots els moments i donant-me suport, perquè sense ells tampoc hauria estat possible la realització de la tesi. Compartint els moments d'estrès i de distensió, d'alegria i de tristesa, d'empipament i de reconciliació. Ja sabeu tots que no sóc molt bona escrivint els meus sentiments, però espero poder transmetre tot l'agraïment que aquestes paraules porten. Vull agrair-vos per deixar-me formar part de les vostres vides i per ser part de la meua. Per mi aquesta etapa no ha estat tan sols una època plena d'aprenentatge acadèmic, sinó també una experiència de vida, un mitjà per conèixer, una cultura, una forma de veure la vida i viure-la, un país. Aquest país m'ha donat grans amics i inoblidables experiències i he après que un ÉS: en la seva llengua, en la seva cultura, en les seves tradicions i en les seves experiències de vida, això és simplement impossible de robar; però tot i això, s'ha de SER cada dia per no finir. Moltes gràcies, de tot cor a tots!

Quisiera ahora agradecer no solo a la gente que académicamente me ha apoyado durante estos años, sino también a la gente que ha estado ahí, al lado siempre compartiendo momentos de estrés y de distensión, de tristeza y de felicidad, de enojo y de reconciliación. Ya saben que no soy muy buena escribiendo y me es difícil expresar todo lo que les tengo que decir, pero espero que en estas palabras vean escrito todo lo mucho que les agradezco el haber formado parte de mi vida. Para mi esta etapa no ha sido sólo una etapa llena de aprendizaje académico, sino una experiencia de vida, una forma de conocer una cultura, una forma de ver la vida y de vivirla, una forma de conocer un país que me ha dado grandes amigos y grandes experiencias y si algo he aprendido de todo esto es que, uno es, en su lengua, en su cultura, en su tradición y en su vida, esto nadie te lo puede quitar y hay que seguir siendo día a día para no perecer. Muchas gracias a todos de todo corazón!.

Voldria agrair:

A la Dra. Anna Bassols per haver-me donat l'oportunitat de realitzar, durant tots aquest anys, aquesta tesi en el seu laboratori. Però no només per això, sinó també per tot el suport que m'ha brindat des del primer dia que vaig arribar – encara recordo aquell primer dia a l'aeroport, la xafogor i la meua primera vista de la ciutat de Barcelona, va ser increïble – El camí ha estat llarg però hem disfrutat i après molt, gràcies.

A la Dra. Àngels Fabra pels seus consells, el seu entusiasme i l'oportunitat d'aprendre. Per haver-me donat suport en tot durant el treball que vaig realitzar en el seu laboratori, sense tot aquest suport aquesta tesi no hagués estat possible.

Als Drs. Josep Baulida, Garcia-Herreros y Duñac, pel temps que ens heu dedicat per la millor comprensió dels processos β -catenina y TCF-4.

A l'Anna Vilalta pel seu invaluable ajut en el laboratori i per les llargues "plàtiques" de Mérida, l'emoció del futbol, la política catalana, la vida en el laboratori i les bones hores compartides.

A Joaquín Ariño por todo el apoyo brindado durante los años de esta tesis.

A la gent del labo, els he d'agrair molt i moltes coses, ufffff!: especialment la setmana d'esclavitud que m'heu brindat, a més de totes les petites ajudes del dia a dia. Sense elles no hauria estat possible tot aquest treball però a més a més hem construït durant aquests anys petites aliances i grans amistats i per això també he d'agrair-vos. A la Malika, sin ti mis primeros meses hubieran sido aún más difíciles. A la Mon per tot, les converses, els grans consells que m'has donat sempre, les llàgrimes, els moments de "això no surt mai" i els moments de rialles i felicitat que hem viscut juntes, sort que mai ens vam posar d'acord per estar malament quan només érem tu i jo al laboratori :). A la Laia per ser molt més que una amiga, gairebé una germana, pel teu suport sempre, amb l'ull morat i tot, sempre has estat allà per ajudar-me, escoltar-me i aguantar "estoicament" tots els meus rotllos i les meves paranoies mentals i per moltes, moltes, moltes coses més. A la Merijou (yo te bautizo jajajajajajajaja), por ufffff, por rara, por mexicana postiza, por el gusto del buen comer y el buen beber, por las risas no siempre entendidas, ;) , y por estos últimos largos momentos de "impresión" (y no sólo de eso , (te has fijado aquí sobra un espacio y el año no es el que debe de ser!!!!)) sin ti la escritura de la tesis hubiera sido simplemente imposible. Así de fácil, no hay más! Gracias, no me cansaré de decirlo. Espero que la vida te depare momentos de azulidad absoluta donde el azul sea el único color que puedas ver y que los espíritus chocarreros te dejen y permitan que la azulidad llegue a tu vida y se establezca para siempre. A Deiniel, jajajajajajajajaja, por, por, por, por, por, no lo se (¡apoco!), por, XDDDDD, por aguantarme, por aguantar mis momentos violentos y aun así seguir siendo mi amigo (¡que impresión!), hemos compartido grandes momentos y hemos cantado grandes canciones, que serán recordadas por el resto de los pobres a los que dejamos sordos, jajajajajajajajajajaja, ahhhh cierto, por las sillas güey, jajajajajajaja, gracias, de verdad. Por ser un buen hombre en el cual recargarse cuando uno lo necesita, ¡un poco alto para mi tamaño! Vull mencionar a la gent que ha passat pel laboratori i m'ha ajudat i ha conviscut amb mi, el nostre Xavi, el Carles, la Tania, el Santi i la més petita de tots l'Anna. Diuen que el riure fa a la gent més jove i nosaltres hem rigut tant per tantes xorrades i per tantes coses que serem eternament joves si seguim així.

A la gent de Bioquímica Clínica: Yolanda i Mercè.

A la gente del 181 por aguantarme, jajaja, por dejarme robar todo lo robable y además decirme como usarlas, por la infinita paciencia de Amparo para enseñarme siempre que lo he necesitado, gracias TV, A Raquel por su buen humor, por compartir horas cantando y ganarle al invencible. A Asier por su buen humor siempre, por los paseos de Euskadi, por los helaaaaaaados, en fin por los buenos momentos. A María por su buena vibra y el tiempo compartido y los bandshifts!!! Al resto de la gente del laboratorio con quien he compartido muchas horas risas y buenos momentos, la Laia, el Martí, el Xavi, el Carlos, Maribel, María Jesús, Loli, Antonio Casamayor, Anna Barceló, y los que ya no están Ernesto e Ivan.

A les noies de l'IRO, la Mireia, la meva mestra de clonin, l'Antònia, gràcies per tota l'ajuda que em vas brindar, l'Eva per les rialles i els magnífics moments, l'Anna Marazuela per la seva incondicional ajuda, sempre, l'Anna Llorens per la seva ajuda, Eider pel nostre català. Merci per tot, gràcies de veritat, la meitat d'aquesta tesi es va poder realitzar gràcies als vostres consells i al vostre suport, gràcies per la vostra amistat.

A les secretàries Rosa, Ester i Sílvia per la seva ajuda indispensable, com no recordar-se dels múltiples papers que hem hagut de fer pels visats, semblava un treball impossible de realitzar. Gràcies per la vostra paciència.

Al Néstor per les seves converses i el seu suport sempre que l'he necessitat. A la gente de su laboratorio las que estaban por las risas, los bailes, las apuestas y concursos, "Antananaribo se acuerdan?" (Lurdes y Fátima), y els que hi són ara (el Josep i el Luis).

A las chicas, como decía Malika, no se que decir no se que ni como expresarlo, me gustaría tener la capacidad de transmitirles a cada una lo que quieren decir las palabras que mal escribo a continuación por todos los viajes, cenas, conciertos, momentos de supervivencia dura y agreste, y por todo, gracias. A la Marta por el viaje que aún hemos de hacer a Cadiz!!!!!! A Mire por siempre estar ahí, por siempre contar conmigo. A Sylvie o Silvia para los cuates, jajajajajaja, por las cenas en tu casa y los viajes a Francia. Es difícil poner en palabras todo lo que he de decirles, me han apoyado y me han aguantado, por todo mil gracias.

A la Vik por las horas y horas de platicas (siempre me acordaré de la primera de todas!) y por compartir conmigo esas cosas que son incomprensibles para la gente de aquí, aunque algunos ya las han comprendido y hasta adoptado: los abrazos, los pequeños momentos de felicidad, un buen cuadro abstracto, un deliciosa NY cheese cake, la eterna capacidad de enamorarse, el miedo a volver...

Al Xavier per totes les "plàtiques" per Gràcia i entendre i compartir les meves històries, les meves postures polítiques, o almenys moltes d'elles, i per la música, els concerts, gràcies. Esperaré el dia que caminant junts, ¿per on era? Ah sí crec que París, recordarem el que hem viscut fins aquell moment. "La libertad solo es visible para quien la labra y en lo prohibido vive astuta la tentación. Nacer a veces mata y ser feliz desgarrar. A quien acusaremos cuando triunfe el amor" *Silvio*

A Joel per la seva impassible amistat, jo vull ser com tu quan sigui gran!!! Jajajajaja No, ja de veritat merci per la teva amistat, merci per tenir paciència amb el meu català, i ajudar-me a perfeccionar-lo i a la vegada ensenyar-me la teva cultura i deixar-me formar part d'ella, però a més a més gràcies per voler conèixer la meva cultura.

A la Núria, per les moltes pel·lícules que hem compartit, fa molt que no hi anem!!! Moltíssima sort a Canadà ja ens veurem per allà.

A tota la gent del CBATEG que m'ha ajudat en tots aquest anys: Al Sergio, per las largas conversaciones, A l'Alba per ensenyar-me a donar classes, A l'Àlex per mirar a Collserola i no morir en l'intent. A la resta de gent amb la que hem passat bons moments i rialles.

Ara és el torn de la gent que em va acollir a casa seva els primers dies (mesos) de mi vida en aquest país, per donar-me tot el seu suport i a més a més brindar-me la seva amistat durant tots aquest anys. Al Marc y a la Sara, els he d'agrair la seva amistat i el seu suport incondicional en cada moment, també i molt especialment per haver-nos acollit en la seva llar i sense haver-nos conegut abans, imagineu-vos si haguéssim resultat uns psicòpates, uff quina por, jajajajajajaja. Però hem de dir que tot és culpa d'en Marià a qui vaig conèixer en estranyes circumstancies a Mèxico, potser tu ets el que va posar la bomba, jajajajajajajaja, és broma; moltes gràcies per brindar-me l'oportunitat de conèixer-vos a tots, a la Laia pels moments de després, una vegada heu deixat de donar voltes pel món; a la Laura i al Jacob pels bons moments de cine, les converses i sopars per Gràcia i a la resta de la gent que sempre m'ha pres en compte per fer calçotades, tapes i demés coses: la Bea, el Ferran, la Glòria, el Rafael, la Montse, el Carles, l'Anna i el Fausto.

Quisiera no dejarme por ningún motivo a toda la gente que aún estando lejos me ha apoyado, a todos los mexicanos que vía mail, Chat, teléfono, carta, postal, señales de humo, telepátia, o cualquier otro medio de comunicación, han estado a mi lado siempre (incluso compartiendo protocolos e ideas experimentales!) aunque usted no lo crea!!!! Tata, Paú, Mariana, Luis, Luiso, Yu, E, Cei, Carlitos, Andy, Viole, Güera, Keren, Tania, Laura, Sebastián, Don A, Pavelo. Mil gracias, por los momentos juntos y

las pláticas de ayuda que me han dado a lo largo de estos años, la vida lejos es más fácil cuando sabes que siempre tendrás alguien del otro lado para darte la mano y seguir el camino juntos.

A mi familia, por todo el apoyo que me han brindado. A mi madre y a mi padre que, además de darles cobijo a todo el que iba a México y enseñarles lo hermoso de nuestro país, me han apoyado y desde la distancia, dirigido. Durante todos estos años hemos pasado muchas cosas, momentos felices, la llegada de nueva gente a la familia, reencuentros formidables, cambios políticos y decepciones políticas, pero también pérdidas enormes y momentos muy duros, y siempre hemos estado ahí para compartirlos y pasarlos. Millones de gracias. Los quiero cada día más.

A ti, gracias....., el camino lo empezamos juntos, fue duro y difícil, pero lo hemos aplanado, hecho caminable, lo hemos decorado a nuestro gusto y le hemos colgado en las paredes sentimientos, momentos y fotografías imborrables, todas ellas cuentan nuestra vida juntos y dibujan nuestro futuro, Alfonso, te quiero.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	II
Índice	VII
Resumen	1
Antecedentes y Objetivos	3
Introducción	7
La piel	9
El melanoma	10
Epidemiología	10
Progresión	11
Alteraciones genéticas	13
Progresión <i>versus</i> diferenciación	17
Comunicación con el entorno	18
Proteoglicanos	19
Proteoglicano específico de melanoma (mel-PG)	20
Versicano	22
CD44	26
Relación entre los cambios en la composición de los proteoglicanos y los procesos de diferenciación y desarrollo	28
Regulación génica	30
La vía de β -catenina-TCF-4	30
El factor Sp1	32
El factor AP-1	33
Resultados	35
Determinación de la expresión de versicano y mel-PG en líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación	37
Expresión de las distintas isoformas de versicano en las líneas celulares de versicano humano con diferentes grados de diferenciación	38
Expresión de versicano a lo largo del proceso de diferenciación <i>in vitro</i> de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44	42
Determinación de la expresión de versicano en las líneas celulares de astrocitoma y neuroblastoma humano	47
Obtención del promotor de versicano humano	51
Determinación del papel que juegan en la actividad del promotor de versicano las diferentes regiones de éste en las líneas celulares de melanoma humano con distintos grados de diferenciación, SK-mel-131 y MeWo	54
Determinación del papel de TCF-4 en la actividad del promotor de versicano en las líneas celulares de melanoma humano	56
Determinación del papel de AP-1 en la expresión de versicano en las células de melanoma humano	65
Papel de la región central del promotor de versicano en la regulación de la actividad de este promotor en las células de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo	70
Acción de las deleciones del promotor de versicano sobre su actividad en otras líneas celulares	75

TGF- β activa la expresión de versicano en la línea celular de melanoma SK-mel-131	78
Discusión	81
La expresión de versicano y su correlación con la regresión de las células de melanoma humano a un estado desdiferenciado	83
La inducción <i>in vitro</i> del proceso de diferenciación de las células de melanoma conduce a la desaparición gradual de la expresión de las isoformas de versicano	87
Expresión de versicano en las líneas celulares de astrocitoma y neuroblastoma	89
El promotor de versicano es regulado a varios niveles y en ello intervienen los factores de transcripción Sp1, AP-1 y TCF-4	90
Modelo de regulación del promotor de versicano propuesto para la línea celular SK-mel-131 de melanoma humano	98
Conclusiones	101
Materiales y Métodos	105
Cultivos y líneas celulares	107
Anticuerpos	108
Medios condicionados y digestiones enzimáticas	108
Obtención de extractos de proteínas totales	109
Preparación de extractos nucleares	109
Determinación de proteína	110
Extracción de ARN	110
Preparación de ADN plasmídico	110
Obtención de ADN cromosomal	110
Inmunodetección por Western Blot	110
Análisis por inmunocitoquímica de fluorescencia	111
Análisis RT-PCR	111
Análisis por hibridación ARN-ADN (<i>Northern Blot</i>)	112
Obtención de las sondas para <i>Northern Blot</i>	113
Clonación del promotor de versicano	113
Mutantes de delección	114
Mutagénesis dirigida	115
Transfección transitoria y ensayo luciferasa/renilla	116
Tratamientos con inhibidores	117
EMSA (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	117
Anexo	119
Inmunodetección por <i>Western Blot</i>	121
Análisis RT-PCR	121
Análisis por hibridación ARN-ADN (<i>Northern Blot</i>)	123
Artículo	127
Bibliografía	137

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Fases de progresión de melanoma.	12
Figura 2: Codificación del locus CDKN2A y el mecanismo de acción de los supresores de tumores p16 ^{INK4a} y p14 ^{ARF} .	14
Figura 3: Esquema de la cascada de señalización de Ras y las mutaciones activadoras descritas más frecuentemente en el melanoma.	15
Figura 4: Vía de señalización β -catenina/TCF-4.	16
Figura 5: Desarrollo y progresión del melanoma.	17
Figura 6: Estructura del proteoglicano específico de melanoma (mel-PG/NG2).	21
Figura 7: Isoformas de Versicano.	23
Figura 8: Representación esquemática de la estructura del gen de versicano humano.	23
Figura 9: Estructura del proteoglicano CD44.	27
Figura 10: Inmunodetección de VS y mel-PG en las líneas celulares de melanoma.	38
Figura 11: Localización de los oligonucleótidos para la identificación de las isoformas de VS mediante RT-PCR.	39
Figura 12: Análisis específico de las isoformas de VS por RT-PCR en ARN total de diferentes líneas celulares.	39
Figura 13: Análisis por Northern Blot de la expresión de VS en diferentes líneas celulares de melanoma humano.	41
Figura 14: Diferenciación <i>in vitro</i> .	42
Figura 15: Cambios morfológicos en las líneas celulares de melanoma durante el proceso de diferenciación <i>in vitro</i> .	43
Figura 16: Cambios en la expresión de VS y marcadores de diferenciación durante el proceso de diferenciación inducido con TPA.	45
Figura 17: Inmunodetección de VS y mel-PG en las células de melanoma humano durante el proceso de diferenciación <i>in vitro</i> .	46
Figura 18: Análisis por RT-PCR de las isoformas de VS durante el proceso de diferenciación <i>in vitro</i> .	47
Figura 19: Identificación de VS en medios condicionados de líneas celulares humanas de origen neuronal.	48
Figura 20: Inmunocitoquímica de VS en las células humanas de origen neuronal.	49
Figura 21: Detección de las isoformas de VS (V0, V1, V2 y V3) en líneas celulares neurales humanas por RT-PCR.	49
Figura 22: Análisis por Northern Blot de la expresión de VS en diferentes líneas celulares de origen neural.	50
Figura 23: Secuencia del fragmento del promotor de VS humano aislado.	52
Figura 24: Mapa esquemático del los sitios de unión de los factores de transcripción al promotor de VS humano.	53
Figura 25: Representación esquemática del promotor de VS humano clonado y las diferentes mutantes de delección.	55

Figura 26: Análisis del efecto de las diferentes deleciones del promotor de VS en las líneas celulares de melanoma humano productoras y no productoras de este proteoglicano. _____	56
Figura 27: Efecto de las deleciones de las cajas TCF-4 del promotor de VS humano en la actividad del mismo en las líneas celulares de melanoma humano. _____	57
Figura 28: Efecto de β -catenina/TCF-4 sobre el promotor de VS. _____	59
Figura 29: Formación específica de un complejo ADN-proteína en las dos secuencias de unión para TCF-4 del promotor de VS en las líneas de melanoma humano. _____	60
Figura 30: El complejo TCF-4/ β -catenina se une de manera específica al promotor de VS. _____	62
Figura 31: Las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo producen TCF-4 y β -catenina. _____	63
Figura 32: Efecto de la sobreexpresión de β -catenina/TCF-4 sobre la actividad TOP/FOP de las células de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo. _____	64
Figura 33: Efecto de la mutación de la caja putativa de reconocimiento AP-1 del promotor de VS en la actividad del mismo. _____	66
Figura 34: Efecto de la inhibición de la quinasa JNK sobre la regulación de la actividad del promotor de VS en la línea celular SK-mel-131. _____	67
Figura 35: c-Jun no forma parte del complejo de unión a la región -36 del promotor de VS humano en las células de melanoma humano. _____	68
Figura 36: La actividad MAPK es importante en la regulación de la actividad del promotor de VS en la línea celular SK-mel-131. _____	69
Figura 37: Las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo producen AP-2 α y Sp1. _____	71
Figura 38: Las líneas de melanoma humano SK-mel-131, MeWo y Hep-G2 producen AP-2 α y Sp1. _____	71
Figura 39: Formación de complejos ADN-proteína específicos en las secuencias de reconocimiento para Sp1 y AP-2 del promotor de VS humano en las células de melanoma humano. _____	39
Figura 40: Sp1 se une de manera específica al promotor de VS humano en las células de melanoma humano. _____	37
Figura 41: Esquema de las mutantes de deleción para la región Sp1/AP-2 del promotor de VS humano. _____	74
Figura 42: Efecto de las diferentes deleciones de la región central del promotor de VS en las líneas celulares de melanoma humano productoras y no productoras de este proteoglicano. _____	75
Figura 43: Diagrama esquemático de todas las construcciones del promotor de VS humano generadas para este trabajo. _____	76
Figura 44: Análisis del efecto de las diferentes deleciones del promotor de VS en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo, RWP-1, U-251 y Hep-G2. _____	77
Figura 45: Efecto de TGF- β en la actividad del promotor de VS. _____	79
Figura 46: Vía propuesta de diferenciación del melanocito según su fenotipo de marcadores de superficie celular y su morfología. _____	84
Figura 47: El grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma correlaciona de manera inversa con el patrón de expresión de las isoformas de VS. _____	85
Tabla 1: Mutaciones de las líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación. _____	93

Figura 48: Modelo del papel de la mutación en APC en las células SK-mel-131 sobre la regulación del promotor de VS. _____	94
Figura 49: Posible cooperación entre TCF-4/ β -catenina y AP-1 en la regulación del promotor de VS. _____	96
Figura 50: Modelo de regulación de la expresión de VS en la línea celular SK-mel-131 _____	99
Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos de RT-PCR. _____	112
Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación del promotor de versicano y cada uno de los mutantes de deleción del mismo. _____	114
Tabla 4: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para obtener los mutantes puntuales del promotor de versicano. _____	115
Tabla 5: Plásmidos utilizados para las transfecciones transitorias. _____	116
Tabla 6: Inhibidores utilizados. _____	117
Tabla 7: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA _____	118

La composición de la matriz extracelular (MEC) determina algunos aspectos cruciales del comportamiento tumoral. Entre sus componentes destacan glicoproteínas y proteoglicanos (PGs), algunos de los cuales tienen receptores en la membrana celular. Nuestro grupo de investigación está interesado en la biología de los PGs en el melanoma humano.

El VS es un PG de matriz de la familia de los hialectanos. Está formado por tres dominios: G1, G2 y G3. El *splicing* alternativo del dominio central G2 genera cuatro isoformas denominadas V0, V1, V2 y V3.

En células de melanoma humano se ha descrito la expresión de proteoglicanos como el proteoglicano específico de melanoma (mel-PG), CD44 o versicano (VS), cuya presencia fue descrita en nuestro laboratorio. Asimismo, describimos su capacidad para incrementar la proliferación y migración en células de melanoma humano, además de disminuir su adhesión.

En la primera parte de este trabajo determinamos el patrón de expresión de las isoformas de VS y de mel-PG durante el proceso de dediferenciación de las células de melanoma, utilizando líneas celulares con diferentes grados de diferenciación (temprano, intermedio y tardío).

Nuestros resultados muestran que el grado de diferenciación de las células determina la expresión diferencial de VS y mel-PG, de tal forma que las líneas celulares más indiferenciadas expresan todas las isoformas de versicano y las más diferenciadas ninguna de ellas. De ello concluimos que la pérdida del estado diferenciado se acompaña de la expresión de las diferentes isoformas de VS, hecho que parece ser común en tumores derivados de células con mismo origen embrionario, como muestran nuestros análisis preliminares realizados en células de neuroblastoma y astrocitoma.

Durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las líneas celulares SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44 estos PGs desaparecen, por lo que proponemos que la producción de versicano es señal de regresión a un estado no diferenciado durante la progresión tumoral, y que existe un patrón temporal para la expresión de cada isoforma de versicano.

En la segunda parte analizamos la regulación del promotor de VS en líneas celulares de melanoma humano con grados de diferenciación temprano y tardío.

Aislamos, secuenciamos y clonamos el promotor de VS humano. El análisis *in silico* del mismo determinó tres regiones de regulación: la primera en el extremo 5', presenta dos cajas de reconocimiento para TCF-4; la segunda en la zona central, 6 cajas de unión para Sp1, 7 para AP-2 y una para Smad3/4; y la tercera en el extremo 3', una caja de unión para AP-1.

Construimos diversos mutantes de delección diseñados para aislar el papel de cada uno de los elementos reguladores del promotor de *VS* y los transfectamos de manera transiente en las líneas celulares.

Los resultados muestran que TCF-4 es un activador responsable de más del 50% de la actividad total de este promotor, ya que la sobreexpresión de algunos de los participantes de la vía de señalización de TCF-4 tiene un efecto directo sobre la actividad del mismo. Además, mediante ensayos de EMSA determinamos la unión específica del complejo TCF-4/ β -catenina. En la región central reside aproximadamente el 10% de la actividad total del promotor y hemos determinado la unión específica a 3 de los posibles sitios de unión para Sp1. Planteamos por tanto, que Sp1 es un modulador o quizás regulador de respuesta rápida de *VS*. Por último, en la región 3' del promotor, que contiene la secuencia de reconocimiento para AP-1, se encuentra el 40% restante de la actividad y hemos determinado que dicha secuencia es la responsable de la actividad basal de *VS*.

Antecedentes y Objetivos

Desde hace tiempo nuestro laboratorio trabaja en el estudio del papel de los proteoglicanos (PGs) en los procesos de transformación, malignización y diferenciación de las células. El modelo que hemos utilizado para este fin es el melanoma humano, patología de gran importancia dado que ha visto aumentar significativamente su incidencia en la población mundial en los últimos años.

Uno de los PGs identificado en el melanoma es mel-PG, del cual nuestro grupo había descrito su relación con el grado de diferenciación de líneas celulares de melanoma y su regulación por parte de TGF- β (Heredia *et al.*, 1996b), así como su expresión en lesiones melanocíticas humanas (Touab *et al.*, 2003).

También nuestro laboratorio describió la presencia de versicano (VS), un proteoglicano tipo condroitín sulfato de alto peso molecular, en la matriz extracelular de las células de melanoma humano. Este PG es capaz de aumentar la proliferación y la migración de estas células *in vitro*, además de producir una disminución en su adhesión (Touab *et al.*, 2002). *In vivo*, la presencia de VS en cortes histológicos de diferentes tipos de lesiones melanocíticas cutáneas sólo se detecta en el melanoma maligno y no así en los nevus benignos (Touab *et al.*, 2003).

De la regulación de la expresión de versicano no hay mucha información. Se describió la región promotora de este proteoglicano en 1995 y desde esa fecha sólo se han propuesto tres participantes en su regulación: Pax3 y AP-2, ambos factores de transcripción relacionados con el desarrollo de la cresta neural (Naso *et al.*, 1994; Scholl *et al.*, 2001), y recientemente TCF-4 en células de músculo liso (Rahmani *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes nos hemos propuesto como objetivos de este trabajo:

1.- Caracterizar los cambios en la expresión de versicano y mel-PG en líneas celulares de melanoma humano y su relación con su grado de diferenciación.

1.1.- Caracterización de la expresión de mel-PG y versicano en líneas celulares de melanoma humano con distintos grados de diferenciación: temprano (SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37, AX-3 y Rider), intermedio (SK-mel-3.44) y tardío (SK-mel-23, MeWo y DX-2).

1.2.- Determinación de la expresión de las isoformas de versicano en estas líneas y su relación con el grado de diferenciación de las mismas.

2.- Analizar si el proceso de diferenciación *in vitro* de células de melanoma humano con grado de diferenciación temprano (SK-mel-1.36-1-5) e intermedio (SK-mel-3.44) va acompañado de cambios en la expresión de versicano y sus isoformas.

3.- Caracterizar la expresión de VS en líneas celulares de tumores del sistema nervioso central, tanto de origen glial como de origen neural.

4.- Aislar el promotor de VS humano de las células de melanoma.

5.- Caracterizar los factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de VS en las líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación: SK-mel-131 (temprano) y MeWo (tardío).

Introducción

Los procesos neoplásicos en general pueden ser descritos como la pérdida de la homeostasis de un tejido normal. Esta pérdida deja sin control mecanismos tan importantes como la proliferación, la diferenciación y la respuesta a la apoptosis de las células. Al perderlos la célula comienza a transformarse: expresa moléculas nuevas y factores de crecimiento que le ayudan a sobrevivir, comienza a dividirse sin control y posteriormente comienza el proceso de invasión de los tejidos sanos contiguos.

Estas células transformadas a su vez transforman su entorno, modifican la composición del medio que le circunda, la matriz extracelular (MEC), para así facilitar su supervivencia. La composición de la MEC determina entre otras cosas la maleabilidad del entorno, la disponibilidad de citoquinas, la activación de las mismas, la comunicación celular, etc. Anteriormente, se pensaba que sólo jugaba un papel estructural, pero ahora se sabe que la vida media de muchos factores de crecimiento se alarga o disminuye según la composición de la MEC, que sus componentes, como por ejemplo las glicoproteínas o los proteoglicanos, tienen características funcionales que durante el proceso de tumorigénesis pueden estar involucrados en la facilitación u obstrucción de este proceso. También se sabe que algunos de estos componentes poseen receptores en las membranas plasmáticas y que la unión de éstos a su receptor modifica el comportamiento celular.

Es por eso que para las células transformadas, poder modificar su entorno es un paso crucial para su progresión. Y por esto también el campo de investigación de la biología de la MEC resulta de suma importancia para entender los mecanismos de progresión e invasión tumoral.

LA PIEL.

La piel es un órgano heterólogo que se constituye de elementos de origen ectodérmico, endodérmico y mesodérmico. Está estructurado en tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis. Las primeras dos capas se encuentran separadas por la lámina basal. La epidermis es un epitelio formado por los queratinocitos, los cuales se encuentran dispuestos en diferentes estratos dentro de la misma. En el estrato más profundo, el estrato basal, se encuentran los melanocitos, los cuales, a diferencia de los queratinocitos, derivan de la cresta neural. La función principal de estas células es la de sintetizar, almacenar y transferir melanina a las células contiguas. Los melanocitos normales se encuentran cerca de la membrana basal formando junto a los queratinocitos circundantes unidades de melanina. Estos últimos en su estado indiferenciado se encuentran en el estrato basal y regulan el crecimiento de los melanocitos, así como el número de dendritas y la expresión de moléculas de superficie que éstos presentan (Gruss and Herlyn,

2001). La unidad de melanina de la epidermis denota la relación simbiótica entre un melanocito y, aproximadamente, 36 queratinocitos asociados. En el estrato basal de la epidermis se encuentran localizados los melanocitos junto con los queratinocitos basales en una ratio de 1:5. Este balance se mantiene gracias a la regulación estricta de la división de los melanocitos. Para proliferar, los melanocitos necesitan desprenderse de la lámina basal y de los queratinocitos, retrotraer sus prolongaciones dendríticas, dividirse y migrar a través de la lámina basal antes de volver a acoplarse a la matriz y a los queratinocitos, formando una nueva unidad de melanina. El crecimiento de los melanocitos es controlado estrictamente mediante su comunicación: con el medio a través de moléculas de adhesión a la MEC como las integrinas o CD44 o a través de citoquinas de forma paracrina, y con las células circundantes a través de las moléculas de comunicación célula-célula, como por ejemplo las cadherinas o *gap-junctions* (Haass et al.). Este patrón altamente regulado sirve como base estructural de la regulación del melanocito. Cuando el melanocito escapa a este control se da la transformación maligna y por lo tanto el melanoma.

EL MELANOMA.

El primer caso descrito de melanoma ha sido encontrado en los escritos de Hipócrates, donde se habla de “tumores fatales, negros y con metástasis”. Asimismo, un grupo de paleopatólogos descubrió metástasis en huesos y masas melanocíticas redondas en la piel de momias peruanas del siglo IV a.C. Sin embargo, no fue sino hasta 1806 que la enfermedad fue caracterizada en detalle y bautizada por René Laennec como “la melanose” en la Facultad de Medicina de París. En 1820, William Norris sugirió que el melanoma podría tener un carácter hereditario y podría estar ligado a la presencia de nevus, al estudiar una familia cuyos miembros presentaban tanto melanomas y lesiones metastásicas como numerosos nevus.

Epidemiología.

La incidencia del melanoma en el mundo ha ido en aumento desde hace más de 80 años. Se ha determinado que la tasa de crecimiento es del 3-7% anual según el país. Sólo en Europa, durante el año 2000 aproximadamente 59 000 personas fueron diagnosticadas de melanoma y alrededor de 16 000 murieron de esta enfermedad (de Vries and Coebergh, 2004; Perlis and Herlyn, 2004; Thompson *et al.*, 2005).

La esperanza de vida de una persona con melanoma diseminado es de 8.1 meses y al pasar 5 años sólo el 2% de las personas diagnosticadas permanecen con vida, lo que lo hace uno de los cánceres con peor pronóstico. Además, no existe ningún tratamiento con más de un 2% de éxito para esta neoplasia, ya que es resistente a la quimioterapia y radioterapia y los tratamientos relacionados con vacunas no han demostrado tener gran efectividad (Röckmann and Schadendorf, 2003). Este aumento en la incidencia se ha relacionado con el cambio en las costumbres de exposición al sol de las últimas décadas. Desde 1930 el aspecto bronceado empezó a ser un símbolo de salud, y a partir de la década de 1950 la masificación de las vacaciones en lugares de playa ha hecho que la exposición al sol de la mayoría de la población haya cambiado, incrementando así la incidencia de melanoma (de Vries and Coebergh, 2004). En cuanto a la localización corporal, el melanoma ocurre de manera menos frecuente en áreas de exposición continua al sol como por ejemplo manos y cara, y aumenta en zonas de poca exposición solar como por ejemplo el tronco en los hombres o la parte posterior de las piernas en las mujeres. Hay estudios en los que se plantea que la exposición intensa e intermitente a los rayos UV no da tiempo suficiente a los melanocitos para sintetizar la melanina que requieren para protegerse de dicha radiación. En las exposiciones de larga duración, los melanocitos generan melanina suficiente para envolver el núcleo y protegerlo, cosa que no pasa con las exposiciones intermitentes (Perlis and Herlyn, 2004).

Progresión.

Basadas en características clínicas e histopatológicas, se han propuesto cinco fases en la progresión de melanoma: 1) nevus adquirido común y congénito con melanocitos de estructura normal; 2) nevus displásico con atipia estructural y arquitectural; 3) fase temprana de crecimiento radial (RGP); 4) melanoma primario de crecimiento vertical avanzado (VGP) con competencia para metástasis, y 5) melanoma metastático.

Hay algunas evidencias que sugieren que el nevus displásico podría ser un precursor del melanoma, pero esta relación es controvertida ya que más del 50% de los melanomas parecen surgir *de novo* sin ninguna lesión precursora (Chudnovsky *et al.*, 2005). A medida que el melanoma progresa de la fase radial a la vertical, las opciones de tratamiento, cura y supervivencia decrecen de forma importante. Muchos de los subtipos de melanoma muestran un lento crecimiento en fase radial, seguido por un crecimiento vertical acelerado. Durante la fase radial las células de melanoma se extienden dentro de la epidermis, pero permanecen en su lugar y carecen de la capacidad de invadir la dermis y metastatizar. Normalmente en esta fase el melanoma es curable con cirugía. En la fase vertical, las células invaden la dermis y las estructuras

más profundas de la piel hasta llegar a los vasos sanguíneos y volverse competentes para metastatizar en órganos distantes.

Las células de melanoma pueden escapar del control ejercido por los queratinocitos a través de varios mecanismos que perturban la relación del melanocito con su entorno. En primer lugar, mediante la modificación de la composición de la MEC así como de moléculas que le permitan la comunicación de ésta con la célula, como por ejemplo las integrinas o proteoglicanos como mel-PG o CD44. En segundo lugar, el *switch* que ocurre en las moléculas de adhesión que permiten las interacciones entre las células de melanoma entre sí y con las células del estroma, mediante la inhibición de la expresión de proteínas, como serían E-cadherina, P-cadherina, desmogleína y las conexinas, y la expresión *de novo* de otros, como por ejemplo N-cadherina y MUC18, entre otras (Jean *et al.*, 1998). Un tercer mecanismo sería a través de la expresión de moléculas intracelulares y factores de transcripción que modifican la síntesis de proteínas básicas para el correcto funcionamiento de los melanocitos, como por ejemplo AP-2 (la pérdida de expresión de este factor de transcripción está relacionada con la sobreexpresión de MUC18 o MMP-2), ATF o CREB (que se encuentran sobreexpresados en células de melanoma metastático, en las cuales además se ha demostrado que la inhibición de la expresión de CREB disminuye su capacidad tumorigénica y metastática) (Hsu *et al.*, 2002; Haass *et al.*, 2005) o AP-1 (que está relacionado con la sobreexpresión de CD44 (Lamb *et al.*, 1997).

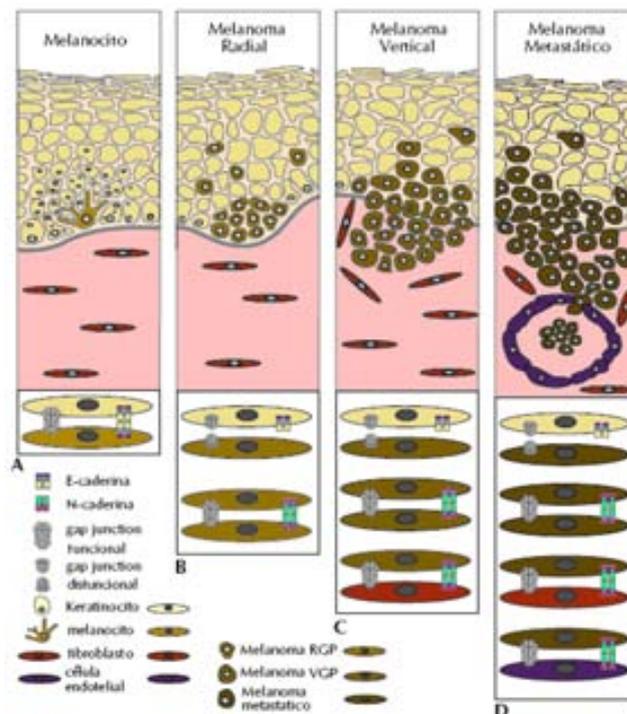


Figura 1: **Fases de progresión de melanoma.** En el melanoma los melanocitos pierden la comunicación normal con el entorno y establecen nuevas comunicaciones que facilitan su progresión. La primera fase sería la de Melanoma Radial, donde los melanocitos transformados crecerían de forma incontrolada invadiendo sólo la epidermis. La fase de Melanoma Vertical se caracterizaría por el crecimiento de estas células invadiendo la dermis. En el Melanoma Metastático se observaría la extravasación de las células de melanoma para así colonizar órganos lejanos (adaptado de Gruss and Herlyn, 2001).

En la fase de crecimiento radial, los melanocitos transformados proliferan e invaden la epidermis, en este momento la unión entre los queratinocitos y las células de melanoma ya no está presente, debido a que éstas últimas cambian su patrón de expresión de moléculas de superficie y pasan de expresar E-cadherina a N-cadherina. Esta expresión impide la comunicación con los queratinocitos pero favorece la comunicación de las células de melanoma entre sí y de éstas con las células del estroma, como los fibroblastos y las células endoteliales (Hsu *et al.*, 2000). Además, se ha relacionado la expresión de N-cadherina con la disminución de la apoptosis de las células de melanoma. Esta acción estaría mediada por la vía de señalización de AKT inactivando el factor pro apoptótico *Bad* (Li *et al.*, 2001). Dado que N-cadherina también favorece la migración del melanoma, podría jugar un rol importante en la metástasis.

En el proceso de progresión del melanoma se han identificado una serie de cambios encaminados a conferir a las células la capacidad de inmortalizarse, proliferar y migrar. Entre los cambios encontrados, uno de los primeros en ocurrir es la desaparición del control de los queratinocitos sobre los melanocitos, al fallar la regulación ejercida en parte por la proteína E-cadherina, como ya hemos comentado (Hsu *et al.*, 2000). A la pérdida de esta proteína se unen después el aumento o expresión *de novo* de factores de crecimiento y citoquinas (PDGF, bFGF, IGF-1, IL-8, TGF- β 1, etc.), de factores angiogénicos (VEGF, etc.) y de moléculas de adhesión (β 3integrina, N-cadherina, etc.) (Hsu *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Satyamoorthy *et al.*, 2001; Sturm *et al.*, 2002). Es entonces cuando las células empiezan a proliferar más rápidamente. La metástasis es un proceso complejo que incluye la migración de las células tumorales, su paso al torrente circulatorio o linfático, su diseminación por el organismo y extravasación para finalmente proliferar y dar lugar a tumores secundarios en tejidos diana específicos. Las células metastásicas tienen un fenotipo muy inestable y se pueden adaptar rápidamente a cualquier situación, lo que permite que, al menos algunas de ellas, sobrevivan incluso en las circunstancias más desfavorables (Meier *et al.*, 1998).

Alteraciones genéticas.

Mucho del conocimiento adquirido acerca de la susceptibilidad genética hacia el melanoma proviene de estudios de melanoma familiar, y hasta el momento las alteraciones genéticas responsables del desarrollo y la progresión del melanoma no familiar aun están parcialmente sin aclarar. El melanoma familiar representa un porcentaje muy bajo de entre los melanomas, aproximadamente el 10%, pero ha tenido un papel importante en la elucidación de los cambios genéticos que han de ocurrir para la aparición del mismo. Se han descrito mutaciones que se han relacionado directamente con la progresión del melanoma.

La pérdida del locus CDKN2A fue identificado en un principio como una mutación propia del melanoma familiar. Este locus codifica para dos genes supresores de tumores, p16^{INK4} y p14^{ARF}. La proteína p16^{INK4} es un inhibidor de CDKs: inhibe la fosforilación e inactivación de RB mediada por CDK4/6, paso esencial en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular; por lo tanto, la falta de p16 provoca la proliferación descontrolada de la célula de melanoma. Por otra parte, la otra proteína, p14^{ARF}, inhibe la degradación de p53 mediada por la acción de H/MDM2 (Chin, 2003; Haluska *et al.*, 2006). Se ha identificado la pérdida de este locus en el 25-50% de los pacientes con melanoma familiar; posteriormente se han encontrado cifras similares para los melanomas esporádicos (Chudnovsky *et al.*, 2005).

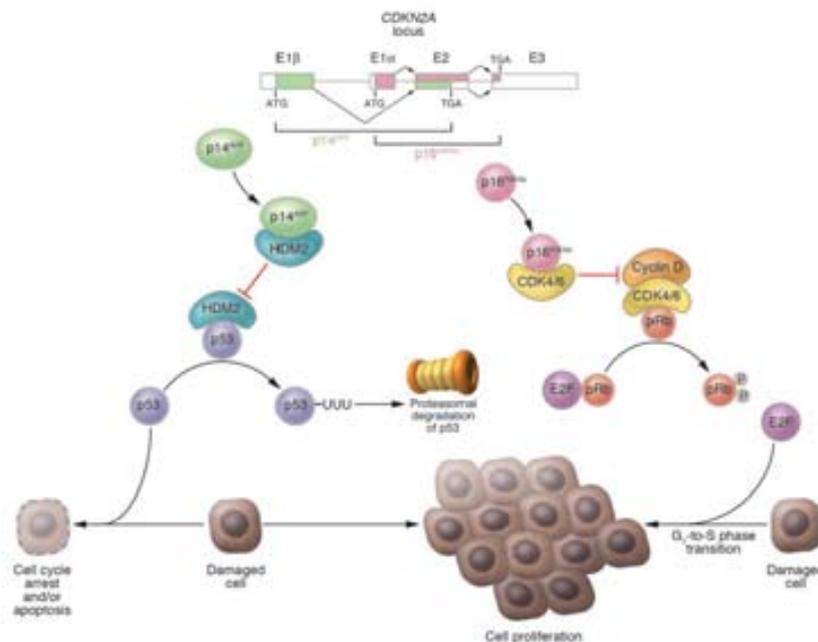


Figura 2: **Codificación del locus CDKN2A y el mecanismo de acción de los supresores de tumores p16^{INK4a} y p14^{ARF}.** El locus CDKN2A está formado por 4 exones (1α, 1β, 2 y 3) que mediante un cambio en el patrón de lectura codifican para los supresores de tumores p16 y p14. En condiciones normales, p16 secuestra al complejo CDK4/6 impidiendo la hiperfosforilación de Rb y por lo tanto impidiendo la transición de G1 a S. En ausencia de p16, CDK4/6 se unen a la ciclina D, complejo que fosforila a Rb. La hiperfosforilación de esta última permite la liberación de E2F, el cual da paso a la transición G1-S del ciclo celular, permitiendo así la proliferación. Por otro lado, en condiciones normales la expresión de p14 actúa secuestrando a HDM2, hecho que bloquea la ubiquitinación de p53. En ausencia de ésta, HDM2 ubiquitina a p53 dirigiéndola al proteosoma para su degradación, lo que impide la acción de ésta en la protección celular. p53 sirve como un sensor del daño del ADN: cuando detecta algún daño obliga a la célula a pararse o a entrar en apoptosis. Por lo tanto, la pérdida de cualquiera de las funciones de las proteínas para las cuales codifica este locus contribuye a la transformación celular (Chudnovsky *et al.*, 2005).

No se ha demostrado que las mutaciones en p53 sean generales en el melanoma, ya que sólo se ha descrito su presencia en aproximadamente un 10% de estos tumores. No obstante, existen trabajos en los que se relaciona la presencia de mutaciones en p53 con un mal pronóstico de la enfermedad (Zerp *et al.*, 1999) (Fig. 2).

Otra de las alteraciones genéticas que se ha observado en el melanoma es la presencia de alteraciones en la vía de señalización de Ras. Aún así, se han detectado pocas mutaciones directas

del gen N-Ras (~10%). Las alteraciones en esta vía son debidas a mutaciones en B-Raf o PTEN. Se ha descrito que entre el 60-80% de los melanomas, tanto esporádicos como familiares, presentan mutaciones activadoras en B-Raf. Es importante mencionar que las mutaciones en N-Ras y B-Raf han mostrado ser autoexcluyentes, ya que no se ha descrito la presencia de ambas mutaciones en la misma lesión (Gorden *et al.*, 2003; Kabbarah and Chin, 2005). En la cascada de señalización de la activación de Ras, B-Raf sería activado por Ras y esto activaría a su vez la vía de señalización de las MAPK (Fig. 3). Esta activación al final desemboca en la activación de diversos factores de transcripción tales como c-Fos, c-Jun, ATF2 o CREB (Chin, 2003). Hay evidencias que muestran que las mutaciones en B-Raf son suficientes para la formación de nevus (Pollock *et al.*, 2003), más sin embargo no son suficientes para la transformación de los melanocitos, por lo que es necesaria la acción de algún otro factor para la generación del melanoma, entre los posibles candidatos se encuentran p53 o la ciclina D1 (Patton *et al.*, 2005).

Una más de estas alteraciones genéticas extensamente observadas en melanoma es la pérdida del regulador PTEN (visto en el 30-50% de los melanomas malignos). Se trata de un inhibidor de la PI3K, relacionada con la vía de Ras mediante Akt. Se ha demostrado que la vía Akt está activada de manera constitutiva en más del 60% de los melanomas malignos, siendo más alto el porcentaje en la fase tardía. Es importante hacer notar que las mutaciones en PTEN pueden estar presentes en las mismas células mutadas en B-Raf pero nunca en N-Ras (Fig. 3). (Chudnovsky *et al.*, 2005; Smalley and Herlyn, 2005).

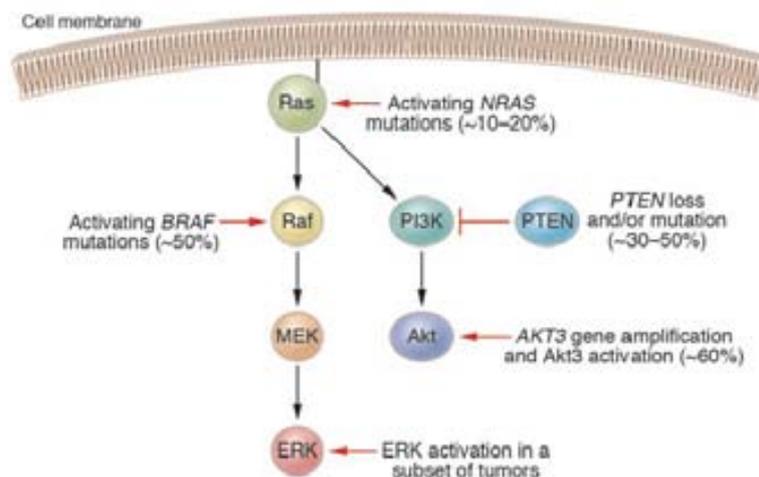


Figura 3: Esquema de la cascada de señalización de Ras y las mutaciones activadoras descritas más frecuentemente en el melanoma. Se han descrito mutaciones en N-Ras en aproximadamente el 20% de los melanomas, esta mutación activaría tanto la vía de Akt como la de MAPK. Esta última vía también puede ser activada por mutaciones en B-Raf, hecho que se ha descrito en aproximadamente el 80% de los melanomas malignos. Otra vía para la activación constitutiva de la vía de Akt es la mutación supresora de PTEN, proteína que regularía de forma negativa la vía PI3K-Akt, en condiciones normales. Se ha descrito que las mutaciones en N-Ras y B-Raf son autoexcluyentes. Las mutaciones en la vía de Ras son promotoras de la progresión tumoral ya que influyen en la regulación de la proliferación y la resistencia a la apoptosis (Chudnovsky *et al.*, 2005).

En el melanoma se ha determinado también la alteración de otros genes, aunque con una menor incidencia entre ellos se encuentran β -catenina y APC (5 y 10% respectivamente) (Rubinfeld *et al.*, 1997; Rimm *et al.*, 1999). Las mutaciones identificadas en β -catenina impiden la fosforilación de ésta por GSK3 β para su posterior degradación, lo que resulta en la estabilización de β -catenina y, probablemente, en su translocación al núcleo, donde activaría los genes que regula. También se han identificado mutaciones en APC que provocan su inactivación, hecho que tendría un efecto similar al observado por las mutaciones en β -catenina (Worm *et al.*, 2004).

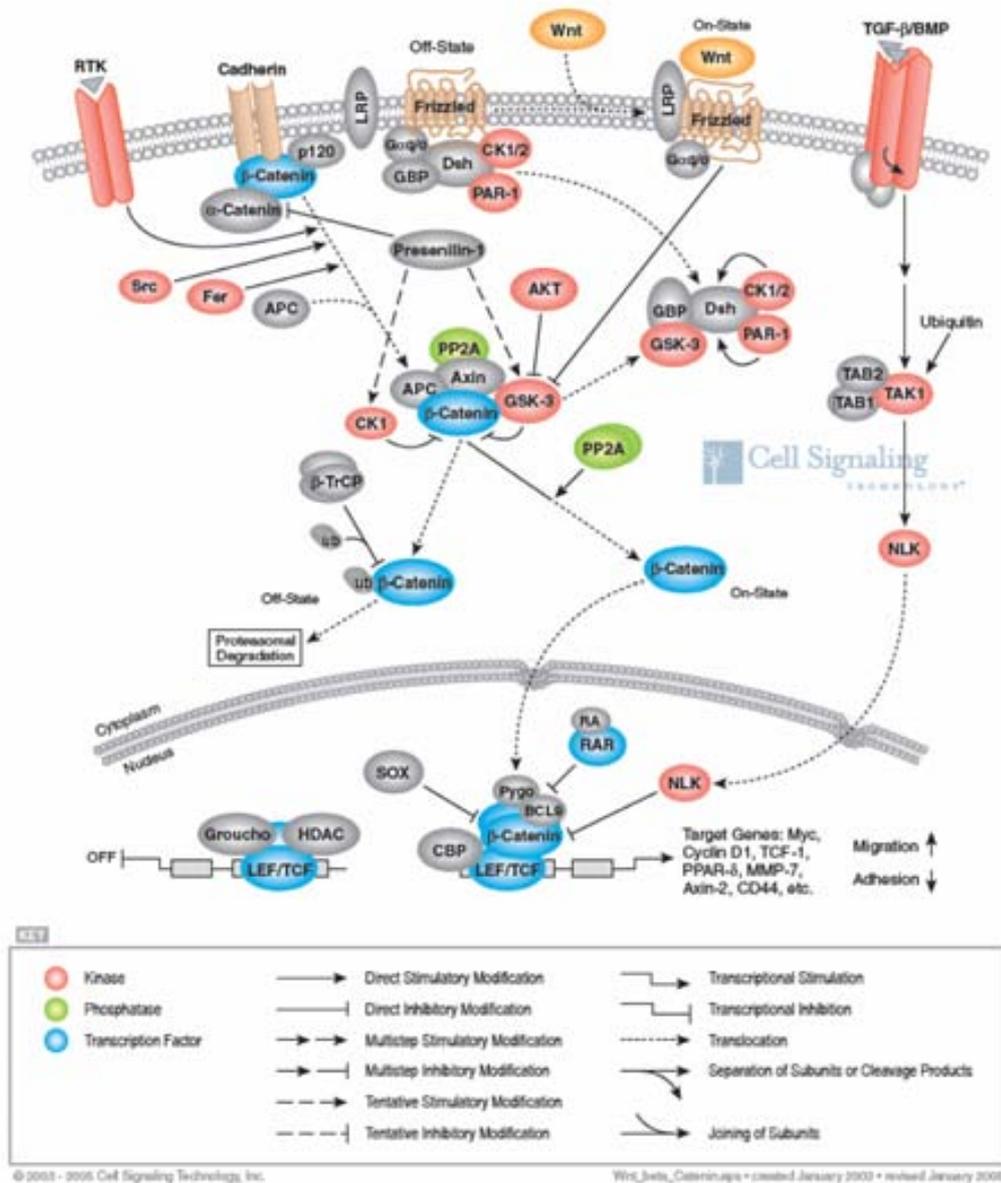


Figura 4: Vía de señalización β -catenina/TCF-4. En condiciones normales, el complejo APC-GSK3-Axina fosforila a β -catenina dirigiéndola hacia el proteosoma para su degradación. Cuando APC y GSK3 se encuentran activadas vía la señalización de Wnt, éstas no fosforilan a β -catenina, inhibiendo así su degradación y favoreciendo su translocación al núcleo, donde se unirá a los factores de transcripción Lef/TCF, activando así la transcripción de diversos genes (Cell Signalling Technology Inc., 2005).

Progresión versus diferenciación.

Una de las características del proceso de progresión del melanoma son las variaciones en la expresión de antígenos, lo que se ha relacionado con el nivel de diferenciación de las células melanocíticas. Por otra parte, es interesante observar que en el estado embrionario y durante el proceso de maduración del melanocito también existen cambios en la expresión de diversos antígenos, y que al relacionar estos cambios con los encontrados en los melanomas, se observa que la expresión de muchas de las moléculas durante la malignización también son antígenos que se encontraban en las células melanocíticas en algún momento de su maduración. El grupo del Dr. L. J. Old y colaboradores ha realizado estudios para ver la relación entre la expresión de antígenos en el proceso de maduración de los melanocitos y el proceso de desdiferenciación durante la progresión del melanoma. Estos autores han descrito la expresión de antígenos de membrana durante el proceso de diferenciación de los melanocitos, comparando entre melanocitos fetales, post nacimiento y adultos. De los resultados obtenidos proponen tres estadios de diferenciación en los melanocitos: melanocitos precursores, intermedios y maduros. Estos tres estadios se correlacionan con los tres estadios de diferenciación que proponen para las células de melanoma humano también estudiados por este grupo (Houghton *et al.*, 1987), ya que expresan el mismo grupo de antígenos de diferenciación. Estas observaciones sugieren que el proceso de diferenciación/desdiferenciación podría tener alguna relevancia en la progresión del melanoma maligno (Fig. 5).

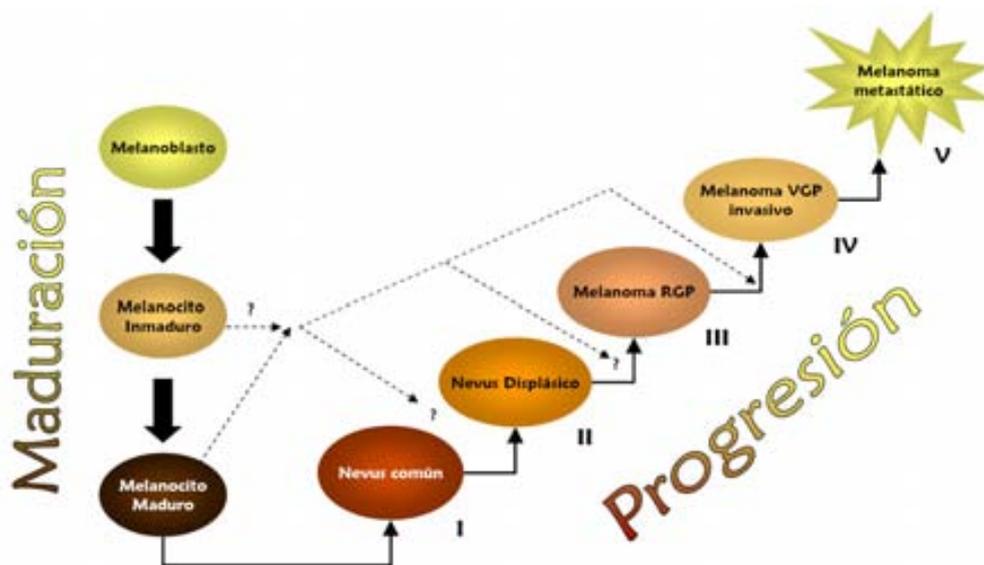


Figura 5. **Desarrollo y progresión del melanoma.** El modelo desarrollado por Clark, Elder y Guerry, implica que el del desarrollo y progresión del melanoma se genera en una serie de pasos a partir de las lesiones névicas. Sin embargo el melanoma se puede desarrollar directamente a partir de células melanocíticas normales. El papel de los melanoblastos en la generación del melanoma no está bien definido (adaptado de Meier *et al.*, 1998).

Comunicación con el entorno.

Una de las características de las células malignas es la capacidad que tienen de modificar su entorno. Se ha descrito que éstas son capaces de modificar el estroma tumoral activando a las células del estroma como por ejemplo los fibroblastos, para iniciar, inhibir o aumentar la producción de moléculas que faciliten el proceso de malignización. En la progresión del melanoma se generan cambios importantes en la composición de la matriz extracelular (MEC), que contribuirá a desarrollar el comportamiento metastático del mismo.

La comunicación entre las células del melanoma y su entorno se da mediante interacciones célula-célula y la liberación al medio de moléculas solubles. Cuatro de los factores de crecimiento derivados de melanoma que tienen un efecto potencial sobre el estroma son: bFGF (*basic fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y TGF- β (*tumor growth factor- β*). bFGF, TGF β y PDGF se expresan constitutivamente en el melanoma en fase vertical y en el melanoma metastático. El bFGF parece tener un papel de estimulación de las células melanocíticas en todos los estados, ya que cuando se expresa en melanocitos normales permite su crecimiento en medio sin suero. PDGF actúa como un factor de mantenimiento y supervivencia en la progresión del melanoma; ayuda al tumor a organizar el estroma, incluyendo la producción de proteínas de la matriz extracelular. Este factor es producido exclusivamente para la estimulación paracrina de los fibroblastos circundantes. PDGF induce la expresión de VEGF, que a su vez induce angiogénesis. En la progresión de melanoma RGP hacia VGP, el factor de crecimiento VEGF parece jugar un papel primordial debido al papel angiogénico que jugará en el tumor (Ruiter *et al.*, 2002). Las células de melanoma, además, producen metaloproteasas como MMP-2 y MT1-MMP, y sus inhibidores como por ejemplo TIMP-1 y TIMP-3 (Hofmann *et al.*, 2005).

Los fibroblastos también son una fuente de factores de crecimiento tales como IGF-1, VEGF y TGF- β , entre otros, pero sólo una vez que han sido activados por las células de melanoma.

Las moléculas que forman la MEC están involucradas en funciones tan variadas como el establecimiento de la rigidez de los órganos o en procesos celulares importantes como la diferenciación, migración, proliferación, etc. En los últimos años, una mejor comprensión sobre las funciones de la MEC ha permitido un mayor entendimiento sobre los procesos de diferenciación y malignización celular. Entre las áreas de estudio de la MEC destacarían: la caracterización de los diversos componentes de la MEC y la importancia de moléculas como los proteoglicanos en las funciones de la misma; la caracterización de proteasas y sus inhibidores, que regulan tanto la estructura de la MEC como su reciclaje (MMPs, TIMPs); la identificación de

nuevos receptores y mecanismos de señalización que median respuestas celulares y que modifican los componentes de la MEC, y la descripción de dominios que permiten la interacción de sus componentes, tanto entre ellos como con los de las membranas celulares (Reichardt, 1999).

Uno de los factores que influyen en la modificación de la composición de la MEC en el melanoma es el TGF- β , que actúa tanto de forma autocrina como de forma paracrina, activando a los fibroblastos que se encuentran en el estroma tumoral. La activación de los fibroblastos por TGF- β 1 se traduce en el aumento de varias moléculas de la MEC como tenascina-C, varios tipos de colágenos, integrinas y algunos proteoglicanos (Berking *et al.*, 2001). En el melanoma, se ha descrito la elevada expresión de este factor de crecimiento, hecho que se correlaciona con el aumento en la acumulación de la MEC, el aumento de la angiogénesis, y la supervivencia de las células transformadas, además de relacionarse con la transición a un fenotipo más maligno en esta neoplasia. Las células son resistentes a la inducción de la inhibición del crecimiento por TGF- β , y este hecho no es debido a la presencia de alteraciones genéticas ni para TGF- β , ni para su receptor o Smad, ya que ninguna de éstas ha sido descrita en el melanoma. La expresión diferencial de las isoformas de TGF- β en las diferentes lesiones melanocíticas nos habla de su posible papel en la progresión de esta neoplasia (Hussein, 2005).

PROTEOGLICANOS.

Los Proteoglicanos (PG) son macromoléculas compuestas por una proteína “núcleo” que puede variar en tamaño desde los 10kDa hasta 400kDa. A estas proteínas se unen covalentemente cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), cuya composición da lugar a la clasificación de los PG. Las cadenas de GAG están unidas a las cadenas peptídicas mediante enlaces O-glicosídicos. Estos GAG son cadenas de polisacáridos no ramificados, que se forman a partir de unidades repetidas de disacáridos. Una de estas unidades de disacáridos es siempre un aminoazúcar y la otra es un ácido urónico. Los GAG se clasifican en cuatro tipos: el ácido hialurónico (HA), heparan sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y keratan sulfato (KS); dependiendo de la combinación de unidades de disacáridos que presenten. Estos proteoglicanos se pueden localizar tanto en la MEC como en la membrana plasmática o en vesículas intracelulares. Las cadenas de glicosaminoglicanos que se encuentran en el espacio intercelular son capaces de retener grandes cantidades de agua y resistir a presiones externas, por lo cual son los responsables de soportar mecánicamente la estructura del tejido y permitir la migración celular. Es por eso que estas moléculas son de gran importancia en la progresión tumoral y el desarrollo.

Los proteoglicanos de la MEC se pueden dividir en tres grandes subfamilias: los proteoglicanos pequeños, dentro de los que se encuentran la decorina y el biglicano, que se

caracterizan por una proteína núcleo de aproximadamente 35 a 44kDa que contiene repeticiones ricas en leucina; los proteoglicanos de la membrana basal, dentro de los que se encuentra el perlecano; y los hialectanos como el versicano, el agregcano, el neurocano y el brevicano, que presentan similitudes estructurales y la capacidad de unirse al ácido hialurónico. En melanoma se han descrito principalmente tres proteoglicanos distintos: el proteoglicano específico de melanoma o mel-PG, el Versicano (VS) y CD44.

Proteoglicano específico de melanoma (mel-PG).

El mel-PG o proteoglicano específico de melanoma es un PG condroitín sulfato transmembranal, el cual está codificado en el cromosoma 15 de humanos. La proteína núcleo tiene un tamaño de 250kDa y está constituida por una secuencia de 2322 aminoácidos que comprenden un gran dominio extracelular, una región transmembranal hidrofóbica y una cola citoplasmática corta. La región extracelular se divide en tres subdominios. El primero presenta una configuración compacta con puentes disulfuro que estabilizan la molécula y 3 sitios potenciales de glicosilación. El segundo subdominio contiene 7 sitios de unión a GAG, además de 6 sitios de glicosilación y un dominio de unión a colágeno tipo VI (Burg *et al.*, 1997). El último subdominio contiene sólo un sitio de unión a GAG y dos lugares potenciales para el procesamiento mediante proteólisis. El dominio citoplasmático de mel-PG incluye tres residuos treonina posiblemente fosforilables por PKC (Pluschke *et al.*, 1996). El peso molecular total de mel-PG es variable desde 420 a 1000kDa, según el número de cadenas de GAG unidas a la proteína, que podrían ser entre 3 y 12 cadenas (Ross *et al.*, 1983; Garrigues *et al.*, 1986) (Fig. 6).

Mel-PG participa en la regulación de la adhesión y la proliferación celular, así como en algunos procesos de diferenciación y malignización celulares. Existen evidencias del papel de este proteoglicano y su participación en las interacciones célula-matriz y célula-célula.

En las células de melanoma se ha demostrado que la expresión de mel-PG en las superficies celulares facilita el crecimiento independiente de anclaje, el cual es importante para la metástasis de las células tumorigénicas (Harper and Reisfeld, 1983). Además actúa como co-receptor para la formación de contactos focales en asociación con la integrina $\alpha_4\beta_1$, lo que favorecería la migración de las células (Iida *et al.*, 1995). Se ha descrito que la expresión de mel-PG en células de melanoma incrementa su proliferación modulando negativamente los eventos de unión mediados por CD44 y la integrina $\alpha_4\beta_1$. En ensayos *in vivo* se ha demostrado que la expresión de mel-PG aumenta el carácter tumorigénico y metastático. Estos estudios demuestran que mel-PG es capaz de modular la adhesión, proliferación y el potencial metastático de las células de melanoma (Burg *et al.*, 1998).

Estos efectos no serían posibles sin la interacción directa de mel-PG con otras moléculas. Así, se ha demostrado la interacción de mel-PG con varias moléculas de la MEC como el colágeno tipo VI (Nishiyama and Stallcup, 1993) y la tenascina o la laminina (Burg *et al.*, 1996), que podrían involucrar a mel-PG en el ensamblaje de la matriz pericelular. No se conocen los mecanismos mediante los cuales ejerce sus funciones, pero se han relacionado las vías de señalización de rac y cdc42 como posibles ejecutoras de la acción de este proteoglicano. Es decir, cada vez más se apoya la idea de que mel-PG funcione como un receptor de algunas señales específicas (Stallcup, 2002).

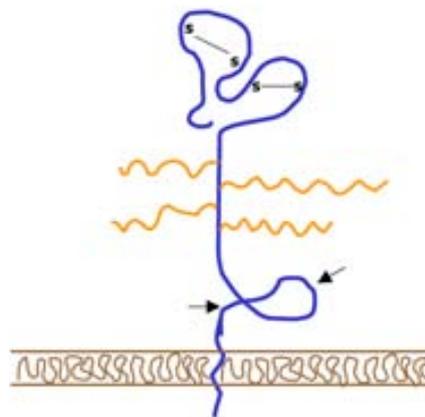


Figura 6: **Estructura del proteoglicano específico de melanoma (mel-PG/NG2).** La región N-terminal extracelular se encuentra estabilizada por la formación de puentes disulfuro, aunque no se sabe a ciencia cierta el número necesario para estabilizar la molécula. El dominio central contiene tanto la región de unión para las cadenas de GAGs como un dominio de unión para colágeno tipo VI. El dominio más cercano a la membrana celular contiene dos sitios susceptibles de procesamiento proteolítico (flechas). El sitio intracelular, C-terminal, contiene un dominio de unión a PDZ, una zona rica en prolinas y algunas secuencias susceptibles de fosforilación en treoninas (adaptado de Stallcup, 2002).

En la membrana citoplasmática de células de melanoma, mel-PG se ha localizado en estructuras filamentosas específicas de la superficie apical y lateral y en microespículas. Estas estructuras están involucradas en las interacciones célula-célula y adhesión célula-sustrato, que podrían ser importantes para el proceso de progresión y metástasis (Garrigues *et al.*, 1986).

Este proteoglicano ha sido identificado como marcador tumoral y de diferenciación melanocítica, y su expresión, junto con la de otras moléculas, permite el establecimiento de un patrón según el grado de diferenciación entre las distintas líneas de células pigmentadas (Houghton *et al.*, 1982, 1987; Real *et al.*, 1985). Su presencia es específica de melanoma, melanocitos fetales, nevus y algunos tumores de origen neuroectodérmico, como astrocitoma y neuroblastoma, estando ausente en otros tumores y en melanocitos adultos (Real *et al.*, 1985; Rettig *et al.*, 1986).

Más tarde se han atribuido otras funciones a esta molécula. Se identificó otro PG al que se le denominó NG2, considerado el homólogo de mel-PG en rata (Pluschke *et al.*, 1996). NG2

se describió originalmente en sistema nervioso durante el desarrollo, donde parece estar involucrado en la inhibición de la formación de axones en astrocitos (Fidler *et al.*, 1999). En el cerebro adulto se ha descrito que inhibe la regeneración neuronal tras la generación de daño en el SNC (Levine, 1994). Mel-PG también está presente en células inmaduras durante la diferenciación del cartílago en extremidades, pero su expresión decrece en cuanto comienza la diferenciación terminal de los condrocitos (Nishiyama *et al.*, 1991).

También se ha demostrado la interacción de mel-PG con el receptor α PDGF en células de músculo liso vascular (Grako and Stallcup, 1995), y los receptores de bFGF y PDGF-AA (Goretzki *et al.*, 1999). Se ha descrito que el mel-PG soluble aumenta significativamente la activación del plasminógeno por medio del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (U-PA). Así mismo, el mel-PG soluble inhibe el efecto antagónico de la angioestatina en la proliferación de células endoteliales. Estas observaciones convertirían a mel-PG en un regulador positivo de la proliferación celular y la migración requeridas para la angiogénesis (Goretzki *et al.*, 2000).

Versicano.

El versicano es un proteoglicano extracelular de tipo condroitín sulfato cuya proteína núcleo está compuesta por tres dominios estructurales: el dominio N-terminal, la región C-terminal y el dominio central, al cual se unen las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Este dominio está formado por dos subdominios (GAG- α y GAG- β) codificados por dos exones que son objeto de *splicing* alternativo. Hay cuatro posibles variantes o isoformas en el versicano de mamíferos dependiendo del proceso de *splicing* del que hayan sido objeto: V0 (que contiene GAG- α y GAG- β), V1 (que contiene sólo GAG- β), V2 (que contiene sólo GAG- α) y V3 (la cual no contiene ninguno de los dos subdominios). Así pues, los extremos N- y C-terminal son comunes para todas las isoformas, de modo que presentan, en el lado N- terminal, una estructura de unión a proteínas que contiene un *loop* semejante al de las inmunoglobulinas, y un dominio con dos *tandem-repeat* que media la interacción de VS con el ácido hialurónico (HA). En su extremo C-terminal presenta dos elementos tipo EGF, un dominio lectina tipo C y un módulo CRP (Zimmermann and Ruoslahti, 1989). Las diferencias entre las isoformas son debidas a los dominios GAG- α y GAG- β , que se encuentran en el dominio central según se mencionó anteriormente; dado que la isoforma V3 carece de dichos subdominios y por lo tanto no cuenta con cadenas de glicosaminoglicanos, podría no ser considerada un proteoglicano (Fig. 7). Gracias a la combinación de los dominios estructurales citados anteriormente, una característica esencial de este proteoglicano sería la capacidad de unirse a carbohidratos complejos en su extremo N-terminal, como el ácido hialurónico, y a azúcares menos complejos en su extremo C-terminal. Las diferencias en el subdominio central le conferirían diversas propiedades para modular la

viscosidad de la matriz circundante. Esto se debe a que la carga negativa que le confieren las cadenas de condroitín sulfato le permite interactuar con las moléculas de agua. Esta propiedad le permite regular la avidéz de una gran variedad de moléculas cargadas positivamente como citoquinas, factores de crecimiento o quimioquinas.

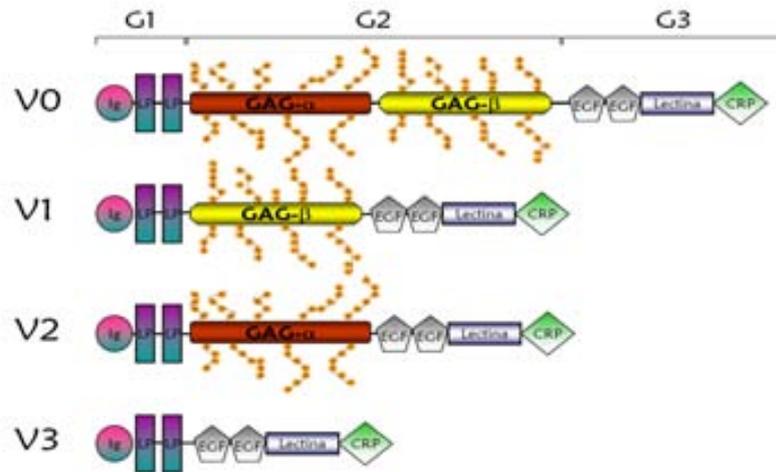


Figura 7: **Isoformas de Versicano.** El versicano está formado por tres dominios estructurales G1, G2 y G3. El dominio central, a su vez, está formado por dos subdominios GAG α y GAG β . Este dominio es objeto de *splicing* alternativo dando lugar así a las cuatro isoformas de versicano, V0, V1, V2 y V3, las cuales contienen los subdominios GAG α y GAG β , GAG β , GAG α , y ninguno de éstos, respectivamente.

El gen de versicano se localiza en el cromosoma humano 5q13.2 (Iozzo *et al.*, 1992). Éste se encuentra dividido en 15 exones que codifican para los diferentes subdominios de este proteoglicano y abarca más de 90kb. El exón 1 codifica para el péptido señal; los exones 3 al 6 codifican para el dominio G1 o región de unión a HA; la región de unión de los GAG o G2 está codificada por los exones 7 y 8, siendo el primero el que codifica para el dominio alfa y el segundo para el dominio beta. La región C-terminal o G3 está codificada por los exones del 9 al 14 y el exón 15 codifica para la región de poliadenilación y el codón de paro de este proteoglicano (Fig. 8) (Naso *et al.*, 1994).

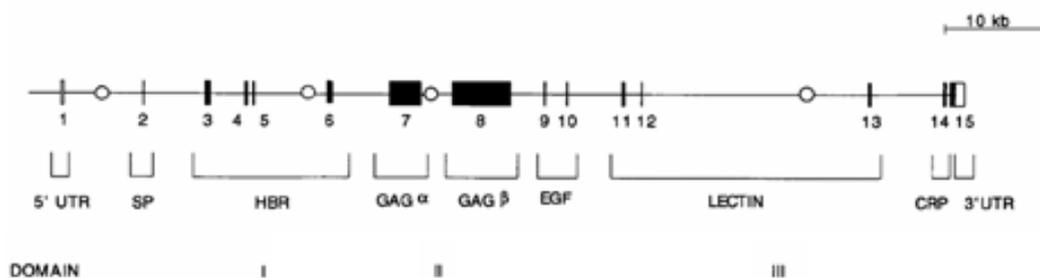


Figura 8: **Representación esquemática de la estructura del gen de versicano humano.** Los exones se encuentran representados en rectángulos rellenos y los intrones por rayas delgadas. Los círculos indican que la longitud exacta de dicho intrón no se conoce. Los tres dominios principales se indican en números romanos. SP: *signal peptide*. HBR: región de unión al ácido hialurónico. GAG α y GAG β : subdominios de unión a las cadenas de glicosaminoglicanos α y β respectivamente. EGF: dominio de repeticiones semejantes a EGF. CRP: dominio similar a la proteína reguladora del complemento (Naso *et al.*, 1994).

En 1994 se describió la secuencia del promotor de versicano humano. Este promotor tiene una secuencia típica TATA box en el extremo 5', situado 16 pares de bases antes del lugar de inicio de la transcripción. En ese mismo trabajo se realizaron análisis de la actividad del promotor donde se determinó que en las células HeLa la actividad máxima del promotor estaría dada por los 445pb contiguos al sitio de inicio de la transcripción. De estos datos se desprende la presencia de factores reguladores negativos en la zona -632/-645. En dicho trabajo se sugiere que la regulación de versicano podría estar dada por el factor de transcripción AP-2, ya que encuentran diversas secuencias de unión a dicho factor de transcripción en este promotor (Naso *et al.*, 1994).

El versicano fue aislado originalmente de fibroblastos humanos (Krusius *et al.*, 1987). Su expresión también se puede detectar en otros tipos celulares como los queratinocitos, las células de músculo liso de los vasos sanguíneos, el cerebro o las células mesangiales del riñón. (Cattaruzza *et al.*, 2002).

El versicano toma su nombre de *versátil* ya que, debido a sus características estructurales, participa en una gran variedad de fenómenos fisiológicos. Se ha demostrado su participación en diversos procesos tales como la arteriosclerosis, el cáncer, la remodelación de los tendones, el ciclo de los folículos pilosos, las lesiones en el sistema nervioso y el crecimiento de las neuritas, además de procesos de desarrollo como el del sistema nervioso central, del corazón, o la condrogénesis. Muchos de los tipos celulares que expresan versicano muestran una expresión espacio-temporal relacionada bien con el desarrollo embrionario o bien con la progresión de la enfermedad.

El versicano está relacionado con una gran variedad de procesos celulares como serían la proliferación y migración. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de versicano y su relación con la proliferación celular está mediada por PDGF y TGF- β en células de músculo liso arterial (Schönherr *et al.*, 1991; Evanko *et al.*, 2001). También se ha observado la expresión *de novo* de las isoformas V0, V1 y V3 al añadir TGF- β pero no PDGF; sin embargo, la adición a diferentes líneas celulares tanto de estos factores de crecimiento como de bFGF estimuló de manera importante la transcripción de la isoforma V3 (Nikitovic *et al.*, 2006). Asimismo, el V5 se encuentra excluido de los contactos focales en fibroblastos en cultivo, lo que se relaciona con la inhibición de la adhesión celular (Yamagata *et al.*, 1993). Finalmente, en células de astrocitoma la expresión aumentada de V5 se relaciona con la alta motilidad celular (Ang *et al.*, 1999). También se ha descrito su importancia en procesos de desarrollo del SNC, donde la isoforma V2 previene el crecimiento axonal durante las fases tardías del desarrollo cerebral en ratón (Schmalfeldt *et al.*, 2000) y, en las fases tempranas, las isoformas involucradas serían V0 y V1, que dirigirían la migración de las células de la cresta neural (Dutt *et al.*, 2006). Por último, el V5 también está involucrado en otros procesos fisiológicos. Por mencionar algunos, en riñón se ha detectado que

las L y P-selectinas se unen a VS, lo que podría estar relacionado con el tráfico de leucocitos hacia el riñón (Kawashima *et al.*, 1999), y podría estar involucrado en regular la actividad de algunas citocinas (Hirose *et al.*, 2001).

Se ha descrito que la metaloproteasa ADAMTS-4 proteoliza específicamente el versicano y que los productos de dicha proteólisis podrían tener efectos fisiológicos específicos (como una manera de transformación post transcripcional). Por ejemplo, la proteína GHAP, relacionada con el envejecimiento neuronal, es seguramente el producto de proteólisis de la isoforma V2 (Westling *et al.*, 2004). Además se ha correlacionado la expresión de versicano con la expresión de las ADAMTS durante el desarrollo de hueso en las ratas (Nakamura *et al.*, 2005).

Mediante experimentos con fragmentos pequeños de versicano se han descrito diversas funciones de estos fragmentos: el dominio G3 de versicano regula la unión neural, el crecimiento de las neuritas y la función sináptica de las neuronas del hipocampo (Xiang *et al.*, 2006).

Existe poca literatura que relacione la relevancia de las diferencias en la expresión de las isoformas generadas por *splicing* alternativo del dominio central y las funciones del versicano, aunque existen evidencias que sugieren que su expresión diferencial podría representar un papel muy importante en el proceso de diferenciación del sistema nervioso (Milev *et al.*, 1998; Dutt *et al.*, 2006).

También podemos decir que las isoformas de versicano están distribuidas en los tejidos de forma especial, ya que no todos los tejidos que expresan versicano expresan todas las isoformas. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de las isoformas V0 y V1 en los fibroblastos, condrocitos, hepatocitos y en el cerebro humano, el músculo liso de la aorta y del miometrio. En cambio, los queratinocitos expresan solamente V1 (Dours-Zimmermann and Zimmermann, 1994). Como ya se ha dicho, las isoformas de versicano parecen tener efectos opuestos en el caso del desarrollo del SNC; trabajos que confirman estos resultados muestran como, además, la isoforma V1 puede aumentar la proliferación y modular la entrada en el ciclo celular, además de inhibir la apoptosis en los fibroblastos NIH3T3 (Sheng *et al.*, 2005).

La expresión de versicano también se detecta en varios tumores, en los que hay diferencias entre las isoformas que se expresan: mientras que V0 y V1 se expresan en gliomas, meduloblastomas, schwannomas, neurofibromas y meningiomas, V2 sólo se expresa en gliomas, y la expresión de V3 se observa en todos los anteriores a excepción de los meduloblastomas (Paulus *et al.*, 1996). También se ha descrito la presencia de versicano en el cáncer de próstata (Ricciardelli *et al.*, 1997), osteosarcoma, adenocarcinoma renal (Hirose *et al.*, 2001) y recientemente en nuestro laboratorio se ha descrito su presencia en melanomas (Touab *et al.*,

2002). La expresión de versicano en estos tipos de cáncer está relacionada con mala prognosis de la enfermedad.

En el caso del cáncer de próstata se ha relacionado la presencia de proteoglicanos de tipo condroitín sulfato con el mal pronóstico de dicho cáncer. La matriz del estroma tumoral contiene concentraciones elevadas de VS, el cual es producido por las células del estroma bajo los efectos del PDGF y TGF- β que secretan las células del tumor. Por medio de análisis por microarrays en células de carcinoma de colon, se ha relacionado la expresión de p53 con la sobreexpresión de versicano (Yoon *et al.*, 2002).

En nuestro laboratorio se ha descrito que el VS induce un aumento de proliferación y migración de células de melanoma y astrocitoma, además de producir una disminución de la adhesión (Touab *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el VS podría contribuir a una malignidad superior en los melanomas. Los trabajos que hemos realizado con la isoforma V3 de versicano revelan el posible papel que juega esta isoforma, ya que la sobreexpresión de V3 disminuye la capacidad de proliferación y tumorigénesis de las células de melanoma (Serra *et al.*, 2005; Miquel-Serra *et al.*, 2006).

CD44.

CD44 es un proteoglicano de membrana celular “de tiempo parcial” (puede presentarse sin cadenas de glicosaminoglicanos), la función del cual es actuar como receptor del ácido hialurónico (Aruffo *et al.*, 1990). CD44 es sintetizado por linfocitos, células epiteliales, fibroblastos, células gliales y células mesangiales del riñón (Jalkanen *et al.*, 1987). El dominio extracelular de CD44 guarda una gran homología con la región de unión a hialurónico de los proteoglicanos agregano, neurocano y versicano. Existen diferentes isoformas de CD44, originadas por el *splicing* alternativo de 10 exones variables contenidos en la región que codifica para una porción del dominio extracelular (Screaton *et al.*, 1992). Existen pruebas que indican que CD44 tiene gran importancia en el desarrollo de los tumores. Varios tipos de tumores como melanomas, carcinomas y gliomas muestran un nivel alto de expresión de CD44 (East *et al.*, 1993; van Muijen *et al.*, 1995). Además, células de melanoma y linfoma humanas transfectadas con CD44, *in vivo* muestran un aumento en el crecimiento y metástasis tumoral en comparación con las no transfectadas (Sy *et al.*, 1991; Bartolazzi *et al.*, 1994). La presencia de CD44 en la membrana plasmática se ha asociado con el incremento de la motilidad celular y el potencial metastático en el melanoma maligno (Slominski *et al.*, 1998). Basándose en la hipótesis de que la región extracelular proteolizada de CD44 competiría con las formas ancladas a la membrana, se han usado formas solubles de CD44 como antagonistas de la progresión del linfoma, melanoma

y carcinoma (Toole, 2000). Aunque determinadas isoformas provenientes del *splicing* alternativo de CD44 parecen estar expresadas a un nivel alto en algunos tipos de cáncer (Gunthert *et al.*, 1995), se ha sugerido que la capacidad funcional del CD44 expresado en células de melanoma puede estar modificada más por su estado de activación que por el *splicing* del que es objeto (East *et al.*, 1993).

Otros estudios han relacionado proteoglicanos de tipo condroitín sulfato y algunas integrinas como mediadores de la adhesión celular a fibronectina en células de melanoma de ratón (Iida *et al.*, 1992). Entre ellos se ha descrito un CSPG cuya proteína núcleo tiene 110kDa y que es reconocido por anticuerpos contra CD44. Este proteoglicano media las interacciones entre la célula y la matriz extracelular para jugar así un papel importante en la motilidad e invasión celulares a través de las cadenas de glicosaminoglicanos (Faassen *et al.*, 1992). También se ha mostrado que CD44, junto a la integrina $\alpha_2\beta_3$, colabora en la migración de las células de melanoma humano sobre colágeno tipo IV y en la invasión de las membranas basales (Knutson *et al.*, 1996). Se ha descrito que al expresar NG2 *in vitro*, éste colocaliza con CD44 y la integrina $\alpha_1\beta_3$, sugiriendo que podría modular negativamente procesos de unión mediados por estas dos moléculas (Burg *et al.*, 1998).

Es por tanto que CD44 cobra importancia al formar parte de la red de comunicación célula-MEC, mediante su interacción con el HA y lecticanos como el versicano.



Figura 9: **Estructura del proteoglicano CD44.** En el dominio extracelular se encuentra la región de unión a HA. En la parte más proximal a la membrana de este mismo dominio se encuentra la zona de *splicing* alternativo que da lugar a las distintas isoformas de este PG; cada una de las isoformas expresadas presenta diferente afinidad para unir el HA. En el dominio intracelular se encuentran las regiones de unión a proteínas del citoesqueleto mediante la anquirina y las proteínas de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina) (adaptado de Goodisson *et al.*, 1999).

Aunque no existe un modelo definitivo, parece claro que diversas moléculas de membrana (CD44, NG2, integrinas) actuarían de receptores/coreceptores de complejos extracelulares formados por múltiples moléculas (PGs, colágenos, glicoproteínas).

Relación entre los cambios en la composición de los proteoglicanos y los procesos de diferenciación y desarrollo.

Uno de los procesos mejor estudiados para determinar el papel de diferentes proteoglicanos en los procesos de migración, diferenciación y proliferación celular es el desarrollo del cerebro. En este proceso se ha descrito la presencia de proteoglicanos como glipecano, fosfacano, sindecano, agrecano, versicano, etc., cuya expresión tiene lugar según un patrón espacio-temporal estricto. Hay evidencias que muestran que dichos proteoglicanos actúan como reguladores de la migración celular, el crecimiento axonal, la sinaptogénesis y la plasticidad estructural (Bandtlow and Zimmermann, 2000). Algunos ejemplos del papel que podrían jugar los proteoglicanos en el desarrollo del cerebro son los siguientes:

Se han descrito diferencias en la expresión de hialectanos (proteoglicanos con capacidad de unirse al HA) durante el desarrollo. En el caso del agrecano, su concentración incrementa de manera constante durante el desarrollo del cerebro de rata hasta alcanzar su máxima expresión 5 meses después del nacimiento. La expresión del dominio alfa de versicano sigue un patrón opuesto al observado para la expresión del dominio beta de este proteoglicano, ya que mientras el dominio alfa casi no se expresa al principio del desarrollo del cerebro, el dominio beta se expresa abundantemente, y cuando la expresión de éste disminuye, después del nacimiento, la expresión de alfa se ve incrementada casi siete veces. En el caso del neurocano, su expresión se incrementa durante el periodo embrionario, alcanzando un máximo de expresión en el periodo temprano post natal, momento a partir del cual decrece su expresión (Zhou *et al.*, 2001). En el caso de brevicano, su expresión sigue un patrón similar al del agrecano, ya que es casi indetectable en las primeras etapas del desarrollo embrionario y su concentración comienza a aumentar constantemente justo después del nacimiento hasta que el cerebro alcanza la madurez. Estas variaciones distintivas dentro del proceso de desarrollo del cerebro indican que cada uno de estos PG, así como sus isoformas, podrían tener una función única dentro del proceso de diferenciación del sistema nervioso (Milev *et al.*, 1998).

Especialmente en el caso de la migración de las células que forman la cresta neural se han descrito resultados a veces contradictorios, ya que mientras que en el caso de agrecano parece claro que su función es inhibir la migración de las células de la cresta neural, en el caso del versicano puede ser más compleja. El grupo del Dr. Zimmermann (Dutt *et al.*, 2006) describe la

presencia de las isoformas V0 y V1 de versicano en las regiones fronterizas de las zonas de migración de las células de la cresta neural, lo que relaciona con la capacidad de estas isoformas de inhibir el crecimiento y por lo tanto de actuar como un bloqueador de la migración. En el caso descrito por el grupo del Dr. Perris (Perissinotto *et al.*, 2000) se muestra que el VS podría actuar como una molécula atrayente para la migración de las mismas células, ya que al realizar implantes de VS en zonas adyacentes a las zonas por donde deberían migrar las células de la cresta neural, éstas migran hacia el implante y no siguen el patrón normal de migración.

Otro modelo para analizar la función de los proteoglicanos en la diferenciación, migración y proliferación de las células es la condrogénesis. Varios tipos de proteoglicanos participan en el desarrollo de las extremidades en embriones. En las membranas basales, los proteoglicanos de tipo heparán sulfato y el sindecano están presentes brevemente antes de la diferenciación del mesodermo temprano. El VS producido por los fibroblastos del mesodermo de las extremidades aumenta durante la condensación del precartilago antes de la diferenciación (Kimata *et al.*, 1986). El VS parece tener mucha importancia por su localización altamente restringida y su habilidad para unir tanto HA como fibronectina, que se encuentran probablemente involucrados en la condrogénesis temprana. Se ha determinado específicamente la presencia de las isoformas V0 y V1 en los estadios tempranos de la diferenciación de condrogénesis (Kamiya *et al.*, 2006). La fibronectina promueve la condensación del precartilago en cultivo a través de interacciones que involucran sus dominios de unión a heparina. Muchos de los proteoglicanos mencionados son capaces de interactuar con este dominio, pero no se conoce si alguno podría ser un ligando natural y si esta interacción es importante *in vivo*. La diferenciación inducida por TGF- β hacia condrocitos en células madre mesenquimatosas provoca una rápida acumulación de los componentes de la matriz extracelular específica de cartílago, como la fibromodulina y la proteína de matriz oligomérica de cartílago. Un incremento en la síntesis de las proteínas núcleo de agregano y versicano definen un estado intermedio en el que también están involucrados los PG decorina y biglicano. Más tarde aparecen el colágeno tipo II y la condroadherina. Estos datos ayudan a definir el fenotipo de diferenciación celular y así poder entender los detalles del proceso secuencial de la construcción de la matriz extracelular (Barry *et al.*, 2001). Experimentos realizados con miniconstructos de VS, en los cuales se encuentran expresados sólo los dominios G1 o G3, han demostrado tener un papel activo, ya que estimulan la proliferación de los condrocitos y su “desdiferenciación” a una morfología fibroblástica (Zhang *et al.*, 1999, 2001).

REGULACIÓN GÉNICA.

Como ya hemos dicho, la MEC juega un papel crucial en la progresión tumoral y por lo tanto la regulación de la expresión de los componentes de la misma es de gran importancia para la célula. Esta regulación se lleva a cabo mediante factores de transcripción que se unirán a sus secuencias consenso en los promotores de las proteínas a las cuales regulan.

La vía de β -catenina/TCF-4.

Los factores de transcripción de la familia LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor/T-cell-specific factor*) son los últimos efectores de la cascada de señalización vía Wnt. Hasta hoy, en mamíferos, se han descrito cuatro miembros de esta familia LEF-1, TCF-1, TCF-3, y TCF-4. Todos éstos comparten homologías estructurales entre las que se encuentran en el extremo N-terminal la región de unión a β -catenina y en el extremo C-terminal la caja HMG (*high mobility group*), la cual media la interacción con el ADN. TCF se une en forma de monómeros a la secuencia consenso AGATCAAAGGG del ADN (van de Wetering et al., 1991; van Beest et al., 2000). Estos factores de transcripción son incapaces de modular la transcripción por sí mismos, por lo que se unen a proteínas auxiliares para así regular la expresión de proteínas. Otro mecanismo de regulación sería la fosforilación de los mismos, hecho que se ha descrito para TCF y que impediría así la interacción de TCF con β -catenina (Ishitani *et al.*, 1999). La familia LEF/TCF ha sido relacionada con el desarrollo embrionario y en los individuos adultos sigue jugando un papel regulador de la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación en órganos como la piel (Merrill *et al.*, 2001) o la mucosa intestinal (Korinek *et al.*, 1998), entre otros.

Originalmente, β -catenina fue caracterizada como una proteína involucrada en la adhesión celular. Como tal, promovía la unión de la proteína transmembranal E-cadherina a los filamentos de actina del citoesqueleto; de ahí su nombre (*cadherina de cadena*, porque se pensaba que su papel era unir cadherinas al citoesqueleto). Hoy día, la β -catenina está asociada no tan sólo a la adhesión celular y organización del citoesqueleto, sino también a la regulación de la transcripción de diferentes genes asociados a la proliferación y diferenciación celular, a través de la vía de señalización *Wnt*.

β -catenina es una proteína de 781 aminoácidos. Pertenece a la familia de proteínas *armadillo* por tener 12 copias de este dominio: se trata de un *tandem-repeat* de aproximadamente 40 aminoácidos originalmente identificado en el gen *armadillo* en *Drosophila*,

involucrado en transducción de señales. Dicho motivo participa en diferentes procesos que incluyen la señalización intracelular y la regulación del citoesqueleto, y está presente en proteínas tales como la plakoglobina, APC o el factor nuclear de transporte importin- α .

Debido a su rol dual tanto en la adhesión celular como en la vía de señalización de *Wnt*, β -catenina puede ser encontrada tanto en el citoplasma como en el núcleo. β -catenina es regulada principalmente por fosforilación, ya sea para interactuar con E-cadherina a través de su dominio armadillo (Piedra *et al.*, 2001) o en la vía de señalización, por fosforilación en su parte amino terminal por la acción concertada de la APC, la axina y la quinasa GSK3 que permite su degradación. Cuando no está fosforilada, la acumulación de β -catenina promueve su translocación al núcleo y la transcripción de los genes regulados por *Wnt* al unirse a los factores de transcripción LEF/TCF (Klymkowsky, 2005). Los dominios de β -catenina involucrados en la activación de la transcripción se encuentran en los dominios N- y C-terminales. Ambos dominios interactúan con una larga lista de factores nucleares.

Se han descrito mutaciones en β -catenina asociadas a diferentes tipos de cáncer como son los de colon, de próstata o el melanoma. Evidentemente, su posición como reguladora tanto de la adhesión como de la señalización celular la convierte en un paso clave de la oncogénesis. Por ejemplo, se han descrito mutaciones que evitan la interacción catenina-cadherina en cáncer de pulmón, carcinoma ovárico o en cáncer estomacal. Dichas mutaciones pueden ser en los sitios de unión entre cadherina y catenina o en la α -catenina, que media la interacción entre ambas. En cuanto a la vía de señalización, diferentes tumores correlacionan con fallos en la regulación de la proteína a diferentes niveles, lo que permite su acumulación y por tanto la sobreexpresión de los genes asociados a TCF. Por ejemplo, la mutación de APC se ha relacionado con cáncer colorrectal, los carcinomas hepáticos se han ligado a mutaciones en la axina y el cáncer gástrico se ha asociado a mutaciones en el dominio N-terminal de la β -catenina (Kolligs *et al.*, 2002).

La vía *Wnt* controla el desarrollo de las células de la cresta neural que darán lugar a los melanocitos mediante la activación de β -catenina y TCF los cuales a su vez activan al gen MITF, que controla la proliferación y la supervivencia de dichas células (Wu *et al.*, 2003). En el caso particular del melanoma, como ya hemos dicho se han descrito mutaciones en β -catenina o en APC que se relacionan con la progresión de la enfermedad (Rubinfeld *et al.*, 1997). Además se ha descrito la acumulación de β -catenina en el núcleo en líneas celulares de melanoma y su presencia correlaciona con las células con más capacidad migratoria, hecho que relacionan con la capacidad metastática de las mismas (Muramaki *et al.*, 2001).

El factor Sp1.

Sp1 (*specificity protein 1*) fue la primera proteína en ser identificada como factor de transcripción a principios de la década de los 80 (Safe and Abdelrahim, 2005). Reconoce las cajas GC/GT y su sitio de unión consenso es 5' (G/T)GGGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) 3'. Mediante análisis de cristalografía se sabe que Sp1 interacciona con el ADN a través de tres dedos de zinc localizados en el dominio C-terminal. Cada dedo reconoce tres bases de una cadena del ADN y una sola de la cadena complementaria; estudios recientes muestran que el dedo más C-terminal tiene una especificidad reducida, por lo que también puede unirse a sólo dos bases de la secuencia consenso, lo que podría explicar el gran número de genes regulados por Sp1.

Durante varios años se pensó que Sp1 era el único factor de transcripción para los motivos GC. Sin embargo, hoy día se sabe que Sp1 pertenece a una familia de factores de transcripción cuya característica principal es el dominio de unión al ADN: se trata de 81 aminoácidos cercanos a la región C-terminal y que consiste en tres dedos de zinc del tipo C₂H₂ (parecidos a los encontrados en la proteína reguladora Krüppel de *D. melanogaster*, por lo que se conoce a la familia como factores Sp/Krüppel-like (Sp/XKLF)). Estudios estructurales han permitido predecir que los aminoácidos de Sp1 que con mayor probabilidad harán contacto con el ADN son: KHA para el primer dedo, RER para el segundo y RHK para el tercero (Philipsen and Suske, 1999). Estos aminoácidos se encuentran presentes en otros miembros de la familia, lo que demuestra la importancia de la estructura de este dominio para cumplir su función.

La familia Sp/XKLF ha sido subdividida de acuerdo a sus características estructurales. Sp1 forma un subgrupo con las proteínas Sp2, Sp3 y Sp4; además de la región de unión al ADN, comparten varios dominios de activación ricos en glutamina y en serina/treonina *stretches* (Sp3, además, cuenta con un dominio de inhibición). Estos factores de transcripción participan en una gran variedad de fenómenos como son el ciclo celular, activación hormonal, apoptosis o angiogénesis. Por ello, su actividad se encuentra muy regulada e incluso, dado que una misma célula puede expresar varios de estos factores, es posible que formen una red de regulación entre ellos, ya sea afectando directamente su expresión o mediante interacciones proteína-proteína (Black *et al.*, 2001). Sp1 es regulada mediante glicosilación y fosforilación post-transcripcional, en algunos contextos por la competencia por el sitio de unión con Sp3 (por ejemplo, la relación Sp1/Sp3 correlaciona con la regulación de la transcripción de conexina 26 en el epitelio uterino y mamario durante el embarazo (Black *et al.*, 2001)) y por su interacción con otros co-factores (tanto inhibidores como activadores) tales como los TAF (*TATA-binding protein associated factors*) o el complejo CRSP (*co-factor required for Sp1 activation*).

Sp1 desempeña un papel muy importante en el cáncer. Existen numerosos estudios donde se muestra la correlación entre la progresión, transformación, crecimiento tumoral o metástasis y la sobre o subexpresión de Sp1. Dicha interacción es efectuada a varios niveles:

- a) Sp1 puede intervenir en la transcripción de múltiples oncogenes y supresores de tumores. Por ejemplo, se ha demostrado que Sp1 regula la expresión de TGF- β en diferentes tumores como cáncer de mama (Safe and Abdelrahim, 2005).
- b) Sp1 puede activar la transcripción de diversos genes en conjunción con otros factores de transcripción como E2F, NF- γ , Smads, NF- κ B, proteínas GATA o miembros de AP-1 (Safe, 2001).
- c) De la misma manera, otros factores pueden afectar la transcripción de Sp1. Por ejemplo, p53 puede alterar la transcripción de genes dependientes del sitio Sp1 a través de diferentes vías (Black *et al.*, 2001).
- d) Sp1 puede modificar la expresión de otros factores necesarios para el desarrollo de la célula cancerosa (angiogénesis, apoptosis, crecimiento celular...). Por ejemplo, controla la expresión de VEGF en diferentes tumores como cáncer de páncreas (Safe and Abdelrahim, 2005), carcinoma mamario o melanoma (Trisciuglio *et al.*, 2004), o la regulación de la apoptosis (Deniaud *et al.*, 2006).

Recientemente se ha comenzado a explotar esta diversidad para tratar ciertos tipos de cáncer, con el desarrollo de drogas específicas para ciertas vías reguladas por Sp1 (Safe, 2001).

El factor AP-1.

AP-1 (*active protein 1*) es una familia de factores de transcripción formados por homodímeros y heterodímeros de Jun, Fos, ATF (*activating transcription factor*), así como otras proteínas que contienen el dominio bZIP (*Basic region-leucine zipper*) como las Maf (*musculoaponeurotic fibrosarcoma*) (Karin *et al.*, 1997). Dichos factores estimulan la transcripción de genes mediante el sitio de unión consenso de AP-1: TGA(C/G)TCA. Por ejemplo, los heterodímeros Jun-Jun y Jun-Fos se unen preferentemente al elemento responsivo a TPA (ERT), en tanto los dímeros Jun-ATF, así como los homodímeros de ATF, se unen preferentemente al elemento responsivo de cAMP (ERC). Aún así, existen diferencias significativas, tanto en la capacidad de unión al ADN como en la efectividad para activar la transcripción, entre los diferentes miembros de AP-1, lo que sugiere que sus miembros juegan diversos roles en la regulación génica.

La actividad de AP-1 es regulada por la abundancia de proteínas que la conforman, por la conformación y estabilidad de los dímeros, por modificaciones post-traduccionales o por la presencia de otros factores AP-1 que compitan por el sitio de unión y produzcan efectos contrarios (represión contra estimulación). Por mencionar tan sólo un par de ejemplos sobre la regulación, en el caso de Jun existen diferentes proteínas capaces de interactuar con su dominio amino-terminal para modular su actividad. Concretamente, la fosforilación de serinas y treoninas en dicho dominio por MAPK reduce su ubicuitinación y por tanto su degradación, por lo tanto la fosforilación por JNK en las serinas 63 y 73 aumenta su estabilidad (Karin *et al.*, 1997). Por otra parte, el homodímero de c-Jun es uno de los elementos más eficientes en la activación de la transcripción y puede ser reprimido por la formación de heterodímeros c-Jun/JunB que son inactivos (Poser and Bosserhoff, 2004).

Estudios hechos tanto en ratones *knockout* como en líneas celulares deficientes en algún(os) componente(s) de AP-1 indican que la actividad de AP-1 es inducida por diferentes elementos entre los que se incluyen factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores o estrés (Zenz and Wagner, 2006). No es de sorprender, pues, que la familia AP-1 esté involucrada en un gran número de respuestas tanto normales como patológicas. En cuanto a las primeras, AP-1 es indispensable para la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares (c-Jun es imprescindible para la diferenciación de los fibroblastos (Karin *et al.*, 1997)), para iniciar la apoptosis en algunos tipos celulares, para la adaptación de la célula a cambios en las condiciones del medio... En cuanto a lo segundo, varios genes regulados por AP-1 están asociados a la progresión, proliferación, invasión y metástasis de diferentes tumores.

En el caso particular del melanoma humano, existe evidencia que apunta hacia un rol importante por parte de los miembros de AP-1 en la progresión del tumor: por ejemplo, los melanocitos normales expresan principalmente c-Jun, JunD y FosB, en tanto que aquellos en RGP del melanoma expresan c-Jun, JunD y Fra-1, y en las células de melanoma en estadio VGP sólo se ha podido detectar JunD (Milde-Langosch, 2005); de hecho, se ha observado un descenso en la expresión de c-Jun y un aumento de JunB y c-Fos en melanomas metastáticos en comparación con melanocitos normales, lo que sugiere un rol para los genes de AP-1 en la transformación de la célula (Yang *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que las concentraciones normales de ARNm de c-Jun, JunB y c-Fos se encuentran alteradas en células metastáticas (Yamanishi *et al.*, 1991). Finalmente, hay que mencionar que también se ha descrito el aumento de la expresión de c-Jun en líneas celulares de melanoma humano (Rutberg *et al.*, 1994).

Resultados

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VERSICANO Y MEL-PG EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO CON DIFERENTES GRADOS DE DIFERENCIACIÓN.

El primer objetivo de este trabajo fue determinar si el grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma humano influía en la expresión de versicano. Se han aislado numerosas líneas celulares de melanoma humano, las cuales difieren mucho entre sí dado el alto grado de heterogeneidad fenotípica de los melanomas (Albino *et al.*, 1981). Es por eso que dentro de un mismo tumor podemos encontrar células productoras y no productoras de melanina con tasas de crecimiento disímiles, morfologías diversas y marcadores de membrana distintos.

Existe un gran número de artículos en los cuales se describen y caracterizan diversas líneas celulares de melanoma humano de acuerdo a su grado de diferenciación. En este trabajo hemos utilizado algunas de las líneas celulares anteriormente descritas en el trabajo de Houghton *et al.* (1987). Las líneas de melanoma humano que hemos utilizado son: SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37, AX3 y Rider, con estado de diferenciación temprana; SK-mel-3.44, de diferenciación intermedia; y SK-mel-23, MeWo y DX-2, de diferenciación tardía, además de la línea celular U-251 de astrocitoma humano como control positivo, ya que expresa todas las isoformas de VS (Dours-Zimmermann and Zimmermann, 1994).

Analizamos por Western Blot la presencia de los proteoglicanos mel-PG y VS en medios condicionados de las líneas celulares de melanoma humano mencionadas anteriormente. Los medios se obtuvieron después de 24 horas en contacto con cultivos subconfluentes de cada línea celular y se digirieron con condroitinasa ABC para liberar la proteína núcleo en ambos casos.

Detectamos la presencia de mel-PG con el anticuerpo monoclonal B5 específico contra mel-PG, en los medios condicionados de las líneas celulares utilizadas (Heredia *et al.*, 1996a). Este anticuerpo reconoce dos bandas de 250 y 240kDa, que corresponden a diferentes grados de glicosilación del proteoglicano. La presencia de VS la detectamos con un anticuerpo policlonal específico desarrollado en el laboratorio que reconoce la proteína núcleo de este proteoglicano (Touab *et al.*, 2002).

Como se muestra en la figura 10B la expresión de mel-PG está relacionada con el grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma humano, ya que observamos la presencia de las dos bandas esperadas en las células con grado de diferenciación intermedio y temprano, mientras que no se observa ninguna banda en los medios de las células de estado de diferenciación tardío. Estos datos concuerdan con los descritos anteriormente por el grupo del Dr. Old y confirman el grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma que estamos

utilizando, ya que mel-PG ha sido descrito como un marcador de células de melanoma indiferenciadas (Houghton *et al.*, 1982).

Podemos observar en la figura 10A la relación entre la expresión de VS y el grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma humano. Vemos claramente la presencia de las isoformas V0 y V1 de versicano en las líneas celulares SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37, AX3 y Rider (grado de diferenciación temprano) y SK-mel-3.44, que presenta un grado de diferenciación intermedio, mientras que no detectamos su presencia en los medios condicionados de las líneas celulares SK-mel-23, MeWo y DX-2 con grado de diferenciación tardío (Fig. 10). Nuestro anticuerpo contra VS es incapaz de reconocer la isoforma V3, la más pequeña de las isoformas de VS.

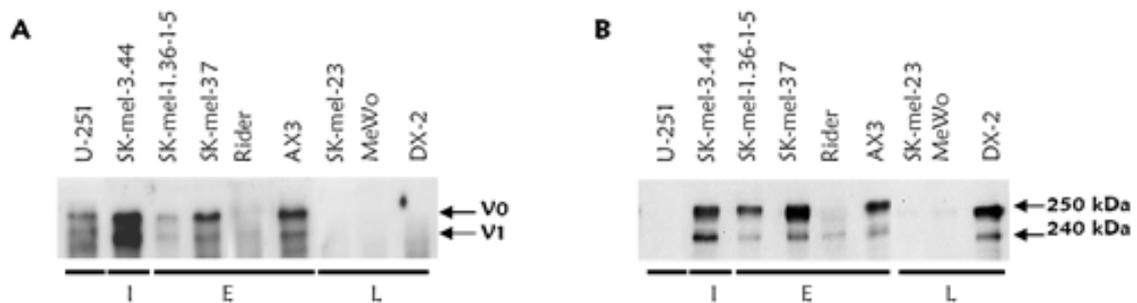


Figura 10: Inmunodetección de VS y mel-PG en las líneas celulares de melanoma. Medios condicionados de cultivos subconfluentes de líneas celulares de melanoma humano con grados de diferenciación (E) temprano, (I) intermedio y (L) tardío (por las siglas en inglés) fueron digeridos con condroitinasa ABC y separados por SDS-PAGE 6%. La detección se realizó con anticuerpos específicos para: (A) VS (1:1000) y (B) mel-PG (1:50).

EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE VERSICANO EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO CON DIFERENTES GRADOS DE DIFERENCIACIÓN.

Como ya dijimos el VS sufre *splicing* alternativo que da origen a sus cuatro isoformas. Para determinar la expresión de cada una de estas isoformas decidimos realizar un análisis de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. En la figura 11 mostramos la localización de cada pareja de oligonucleótidos para la detección específica de cada isoforma. Para establecer las condiciones específicas de la reacción de PCR para cada isoforma, y como control positivo de la reacción, utilizamos ARN total de la línea celular de astrocitoma U-251.

Los tamaños esperados de los productos de PCR para cada isoforma son: V0, 351pb; V1, 386pb; V2, 373pb, y V3, 342pb. Para el control de retrotranscripción y amplificación de PCR utilizamos GAPDH y el tamaño esperado para ésta es de 960pb.

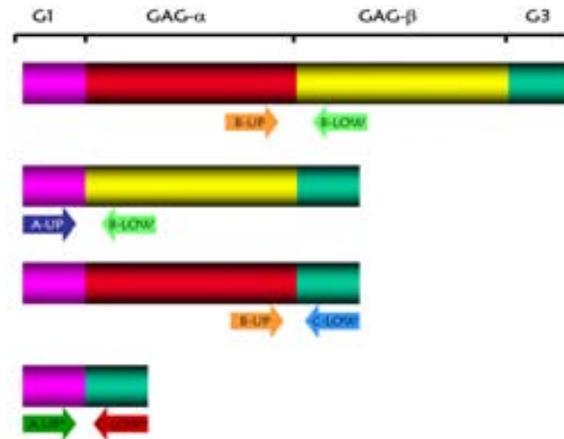


Figura 11: **Localización de los oligonucleótidos para la identificación de las isoformas de VS mediante RT-PCR.** Las flechas muestran la localización y nombre de los oligonucleótidos empleados para cada reacción de PCR específica para cada una de las isoformas de versicano. G1: dominio de unión al ácido hialurónico; GAG: dominio de unión a las cadenas de glicosaminoglicanos α o β ; G3: dominio formado por los sitios tipo EGF, lectina y CRP. Modificado de Paulus *et al.* (1996).

En la figura 12 mostramos los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR de las isoformas de VS en nuestro panel de líneas celulares de melanoma humano con diferente grado de diferenciación.

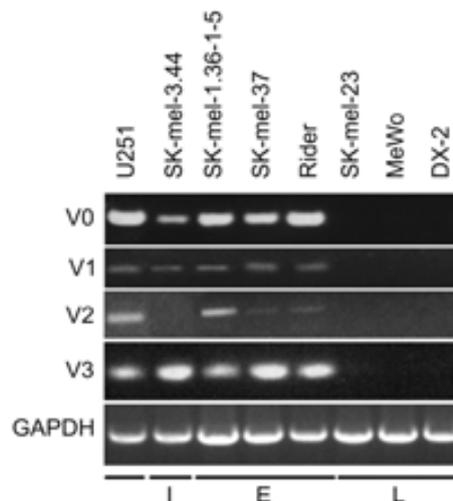


Figura 12: **Análisis específico de las isoformas de VS por RT-PCR en ARN total de diferentes líneas celulares.** Se realizaron las reacciones de RT-PCR a partir de $1\mu\text{g}$ de ARN total extraído de cultivos celulares subconfluentes de las líneas de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación: (E) temprano, (I) intermedio y (L) tardío, y la línea U-251 de astrocitoma. Para la reacción de PCR utilizamos oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas de VS. Las reacciones se separaron y analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y posteriormente se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Realizamos para cada línea celular RT-PCR de GAPDH como control de la reacción.

Las isoformas V0, V1 y V3 se expresan en todas las líneas celulares con grado de diferenciación temprano e intermedio (SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37, Rider y SK-mel-3.44), mientras que la isoforma V2 sólo se expresa en las líneas celulares de grado de diferenciación temprana (SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37 y Rider). La expresión de la isoforma V2 se ha descrito, en tejidos adultos, exclusivamente en células del sistema nervioso (Paulus *et al.*, 1996). Ninguna de las líneas celulares con grado de diferenciación tardío (SK-mel-23, MeWo y DX-2) expresa alguna de las isoformas de VS (Fig. 12).

Estos resultados confirman los resultados obtenidos por Western Blot (Fig. 10A), y relacionan la expresión de las isoformas de VS con el grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma humano.

Para comprobar los resultados obtenidos tanto por Western Blot como por RT-PCR decidimos realizar un análisis de Northern Blot en nuestro panel de células de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación.

Determinamos la expresión del ARNm de VS mediante un análisis de hibridación ARN-ADN (Northern Blot) con sondas específicas para los dominios de VS. Las sondas empleadas fueron: D7, PCR-genomic y C4, que identifican específicamente las regiones HBR, GAG- α y GAG- β respectivamente. Los tamaños de cada una de las sondas fueron: D7, 1Kb; PCR-genomic, 1.5Kb, y C4, 2Kb. Todas las sondas utilizadas fueron amablemente cedidas por el Dr. Zimmermann (Universidad de Zúrich, Suiza).

Las líneas celulares de grado de diferenciación tardío, SK-mel-23, MeWo y DX-2, no expresan ninguna isoforma de VS, como lo demuestra la ausencia de señal al hibridar con las tres sondas específicas utilizadas (Fig. 13).

La línea celular SK-mel-3.44 de grado de diferenciación intermedio expresa las isoformas V0 y V1, ya que detectamos señal al hibridar con las sondas D7 y C4. Al hibridar con la sonda PCR-genomics, específica para el dominio GAG- α , no detectamos ninguna señal (Fig. 13).

Todas las líneas de grado de diferenciación temprano, SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37 y Rider (Fig. 13), expresan las isoformas V0 y V1. Al hibridar con la sonda específica para el dominio GAG- β (C4) observamos una banda de aproximadamente 13Kb que corresponde a V0 y dos bandas de aproximadamente 10Kb que corresponden a la isoforma V1, generadas por las distintas poliadenilaciones de la secuencia de ARN de dicha isoforma (Dours-Zimmermann and Zimmermann, 1994).

Además, podemos observar que la línea celular SK-mel-1.36-1-5 expresa más ARNm de la isoforma V1, al contrario de lo que observamos en la línea celular Rider, en la cual hay una mayor expresión de la isoforma V0. En el caso de las líneas celulares SK-mel-37 y SK-mel-3.44 observamos que las isoformas V0 y V1 se expresan en la misma proporción. Este resultado se corrobora al hibridar el ARNm de estas mismas líneas celulares con la sonda D7 específica para el dominio HABR, como se observa en la figura 13.

La isoforma V2 sólo se expresa en las líneas celulares de grado de diferenciación temprano, SK-mel-1.36-1-5 y Rider. Al hibridar el ARNm con la sonda PCR-genomics específica para GAG- α detectamos una banda de la altura esperada. La isoforma V2 es la menos abundante en estas líneas celulares, ya que requerimos seis veces más tiempo de exposición para obtener la señal observada (Fig. 13).

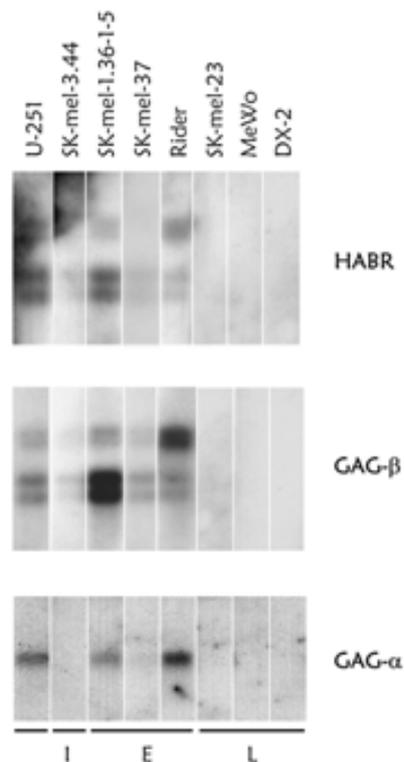


Figura 13: **Análisis por Northern Blot de la expresión de VS en diferentes líneas celulares de melanoma humano.** 15 μ g de ARN total de células subconfluentes de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación: (E) temprano, (I) intermedio y (L) tardío. El ARN fue separado en electroforesis desnaturizante en agarosa 0.8% e hibridado con sondas específicas (marcadas radiactivamente) de ADNc: sonda específica para el dominio HABR (D7), sonda específica para GAG- β (C4), sonda específica para el dominio GAG- α (PCR-genomic).

Mediante este ensayo, no fuimos capaces de detectar la isoforma V3 en ninguna de las líneas celulares utilizadas, que debería poder ser detectada con la sonda HABR

En resumen, podemos concluir que la expresión de las isoformas de versicano se relaciona con el grado de diferenciación de las células de melanoma humano.

EXPRESIÓN DE VERSICANO A LO LARGO DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO SK-MEL-1.36-1-5 Y SK-MEL-3.44.

Los resultados anteriores muestran una estrecha relación entre la expresión de VS y el estado de diferenciación de las células de melanoma humano. Por lo tanto, decidimos inducir *in vitro* este mismo proceso mediante el tratamiento con TPA (Houghton *et al.*, 1987) y determinar si la disminución de la expresión de VS acompañaba a este proceso.

Escogimos para esto dos líneas celulares de melanoma humano que expresasen VS: la línea SK-mel-1.36-1-5, con grado de diferenciación temprano, y SK-mel-3.44, con grado de diferenciación intermedio.

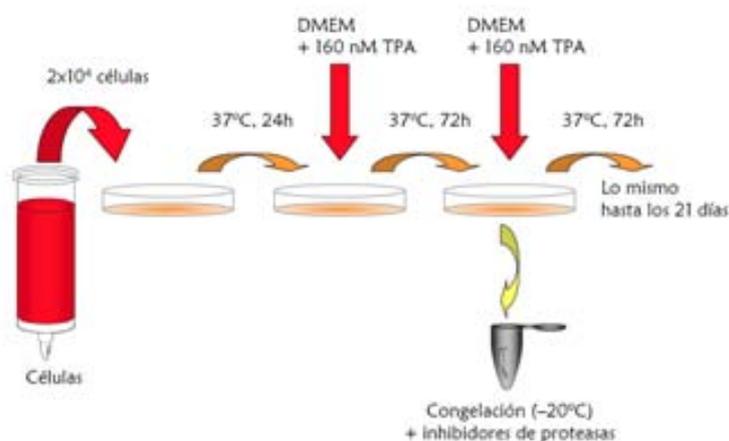


Figura 14: **Diferenciación *in vitro***. Esquema de la inducción del proceso de diferenciación *in vitro* de las líneas celulares de melanoma humano con grado de diferenciación temprano e intermedio mediada por TPA.

Para el ensayo sembramos las células y dejamos que se adhirieran a la placa durante 24 horas. Comenzamos la inducción añadiendo medio de cultivo DMEM más TPA a una concentración final de 160nM, el cual cambiamos cada tres días durante un periodo de 18-21 días. Utilizamos como controles medio DMEM sólo y medio DMEM con DMSO al 0.0016%, el solvente utilizado para disolver el TPA (Fig. 14). Determinamos la concentración óptima de TPA a utilizar realizando experimentos previos de diferenciación en ambas líneas celulares. Se realizaron experimentos a 80nM, 160nM y 320nM, siendo la concentración de 160nM aquella donde las diferencias morfológicas eran más evidentes en un periodo de tiempo más corto y al mismo tiempo las células presentaban un buen aspecto.

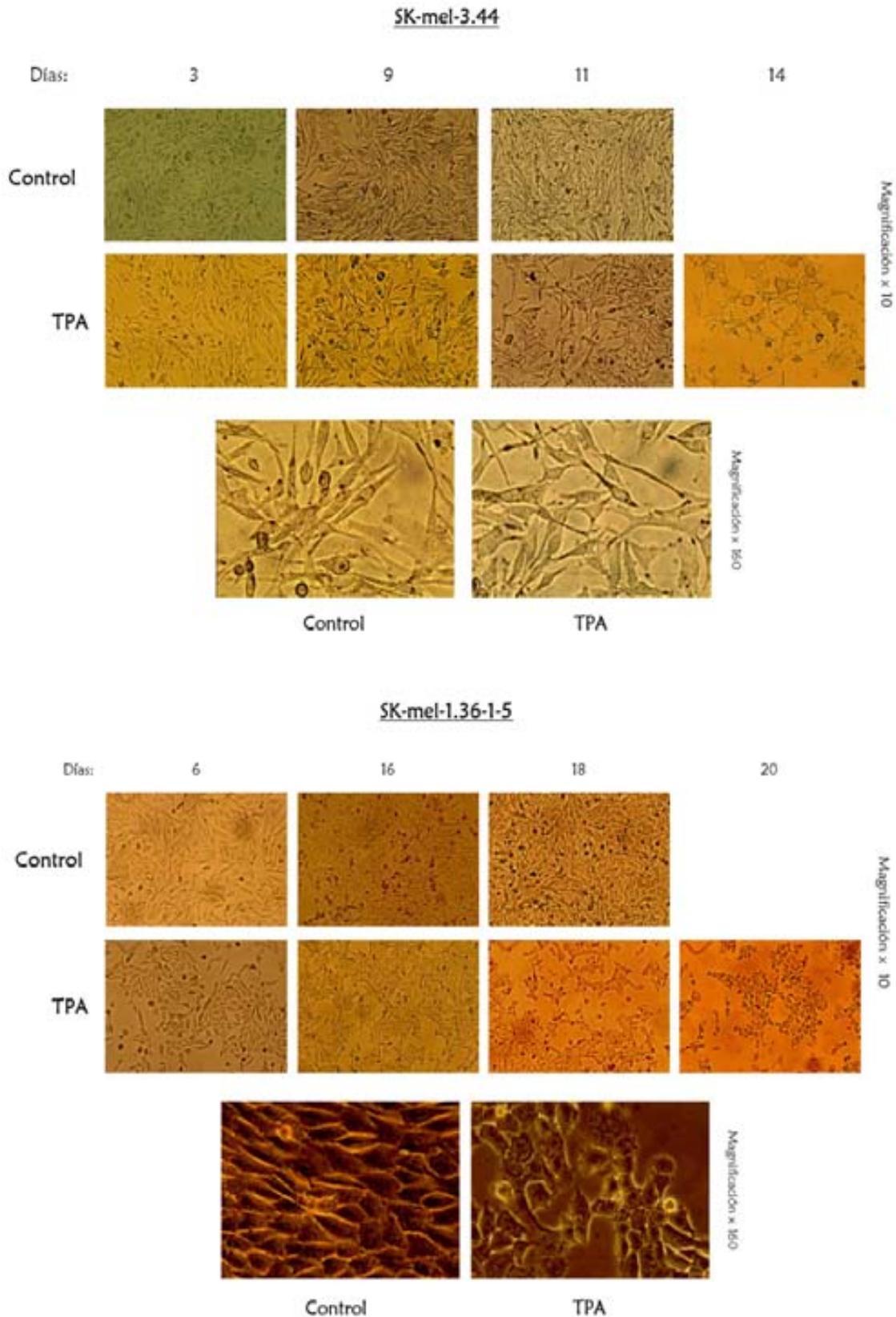


Figura 15: Cambios morfológicos en las líneas celulares de melanoma durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Inducimos el proceso de diferenciación *in vitro* de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-3.44 y SK-mel-1.36-1-5 con 160nM de TPA. Se muestran los experimentos "Control": DMEM más DMSO al 0.0016% y "TPA": con DMEM, DMSO al 0.0016% y TPA [160nM] a lo largo del experimento. Los cultivos fueron visualizados y fotografiados con un microscopio Leica Fluovolt-Fu.

Después del día 6 de tratamiento con TPA, ambas líneas celulares comenzaron a mostrar diferencias morfológicas que se hicieron más evidentes con el tiempo. Después de la inducción, las células SK-mel-3.44 se volvieron más poligonales y polidendríticas, mientras que las células SK-mel-1.36-1-5 presentaron una forma más redondeada, además de tender a organizarse de una forma particular (Fig. 15). Las células de los pozos control de ambas líneas celulares siguieron creciendo normalmente, llegando a confluencia antes del día 15.

Los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con TPA se muestran en la figura 15. El proceso de diferenciación inducido por TPA en las células de melanoma humano lo hemos caracterizado determinando varios antígenos de diferenciación: mel-PG es uno de estos antígenos. Este proteoglicano es un marcador de células de melanoma humano con grado de diferenciación temprano, que desaparece a lo largo del proceso de diferenciación de las células de melanoma (Houghton *et al.*, 1987). Otros antígenos como gp110, gp180 o el antígeno de melanosomas, los hemos utilizado como marcadores de diferenciación tardía (Houghton, *et al.*, 1982). De esta forma hemos seguido el proceso de diferenciación *in vitro* de las células de melanoma.

Las detecciones por inmunocitoquímica fueron realizadas en células tratadas con TPA a los días 0 y 12 del tratamiento de diferenciación *in vitro* de las células SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44. Fijamos las células con paraformaldehído-sacarosa, se permeabilizaron y realizamos la inmunodetección con anticuerpos específicos para cada uno de los antígenos arriba mencionados, con el anticuerpo monoclonal B5 contra mel-PG, con el obtenido en el laboratorio contra VS (Touab *et al.*, 2002), y con el anticuerpo monoclonal M111 contra la proteína gp110.

Como se muestra en la figura 16, a los 12 días del tratamiento con TPA la expresión de mel-PG desaparece, mientras que el marcador de diferenciación tardío gp110 se induce en ambas líneas celulares. Obtuvimos resultados similares para los marcadores gp180 y el antígeno de melanosoma (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que las células han sufrido el proceso de diferenciación deseado. Podemos observar como, de acuerdo con nuestra hipótesis, este proceso va acompañado por la desaparición de VS.

Realizamos un estudio más detallado del proceso de diferenciación analizando los medios condicionados de las células SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44 a lo largo del proceso de diferenciación *in vitro*. Los ensayos de Western Blot realizados nos muestran la desaparición rápida de mel-PG en las células SK-mel-3.44, mientras que en las células SK-mel-1.36-1-5 esta disminución es más lenta (Fig. 17). La desaparición de mel-PG en ambas líneas celulares demuestra el avance en el estado de diferenciación de las células.

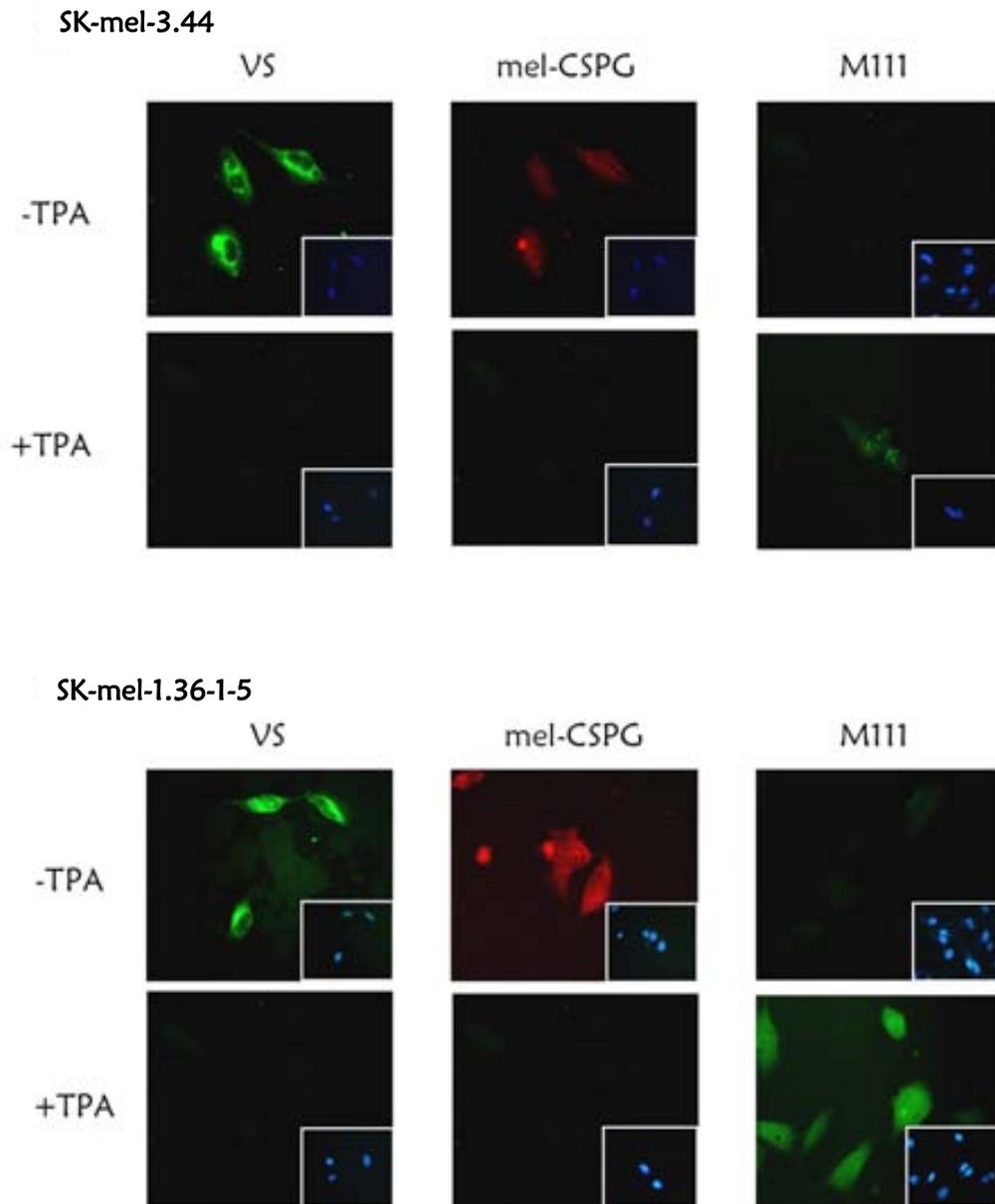


Figura 16: **Cambios en la expresión de VS y marcadores de diferenciación durante el proceso de diferenciación inducido con TPA.** Crecimos células de las líneas SK-mel-3.44 y SK-mel-1.36-1-5 sobre cubreobjetos y las tratamos con TPA para inducir el proceso de diferenciación. Después de 12 días de tratamiento las fijamos con paraformaldehído-sacarosa. Después de permeabilizar, incubamos las células con el anticuerpo policlonal específico para VS (1:100), con el anticuerpo monoclonal B5 específico para mel-PG (1:50) y con el anticuerpo monoclonal M111 específico para gp110 (1:100). La tinción de los núcleos se hizo con Hoechst 33342 (1:100) (recuadro). Los cultivos fueron visualizados y fotografiados con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800.

La expresión de VS no sigue el mismo patrón de desaparición que mel-PG, ya que desaparece más lentamente en la línea celular SK-mel-3.44. En ambas líneas celulares la expresión de VS disminuye a medida que se diferencian y esta desaparición se da de forma paralela en las isoformas V0 y V1 (Fig. 17).

Como controles se muestran los medios de las células crecidas sin TPA de los días 0 y 9, ya que después de este día los cultivos llegan a confluencia y la expresión de VS y mel-PG comienza a disminuir. Ambos proteoglicanos se expresan en condiciones de proliferación celular y disminuye su expresión cuando las células están en estado quiescente; este fenómeno se ha descrito con anterioridad: para VS en queratinocitos y fibroblastos humanos normales y en el caso de mel-PG en células murinas de melanoma (Zimmermann *et al.*, 1994 y Burg *et al.*, 1998).

Por lo tanto, concluimos que en ambas líneas celulares la expresión de versicano y mel-PG disminuye al progresar las células hacia un estado más tardío de diferenciación (Fig. 17).

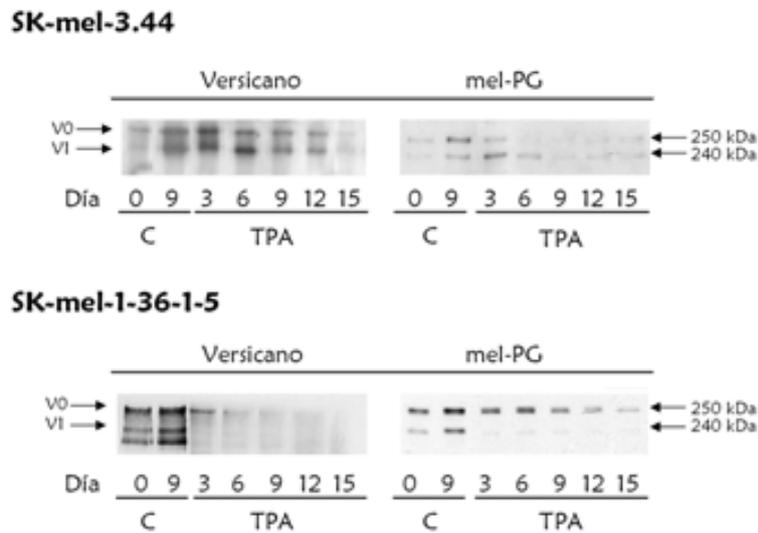


Figura 17: Inmunodetección de VS y mel-PG en las células de melanoma humano durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Medios condicionados de las dos líneas celulares de melanoma humano (SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44) diferenciadas *in vitro* con TPA 160nM fueron digeridos con condroitinasa ABC y separados por SDS-PAGE 6%. La detección se realizó con el anticuerpo específicos para VS (1:1000) y el anticuerpo monoclonal B5 específico para mel-PG (1:50). C: medios condicionados obtenidos a diferentes días de crecimiento y TPA: medios condicionados obtenidos a diferentes días a lo largo del proceso de diferenciación *in vitro*.

Analizamos la expresión de las cuatro isoformas de versicano mediante RT-PCR en las líneas celulares SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44 después de la inducción del proceso de diferenciación con TPA. Utilizamos para el análisis por RT-PCR ARN total de los días 0 y 12 del ensayo de diferenciación *in vitro* de ambas líneas celulares de melanoma, siguiendo las condiciones determinadas en los ensayos anteriores. En la figura 18 vemos claramente que la línea celular SK-mel-3.44, que originalmente expresaba las isoformas V0, V1 y V3, sólo expresa la isoforma V0 tras el tratamiento con TPA, mientras que la línea celular SK-mel-1.36-1-5, que originalmente expresaba las cuatro isoformas de VS, ahora sólo expresa las isoformas V0 y V3, después del mismo proceso.

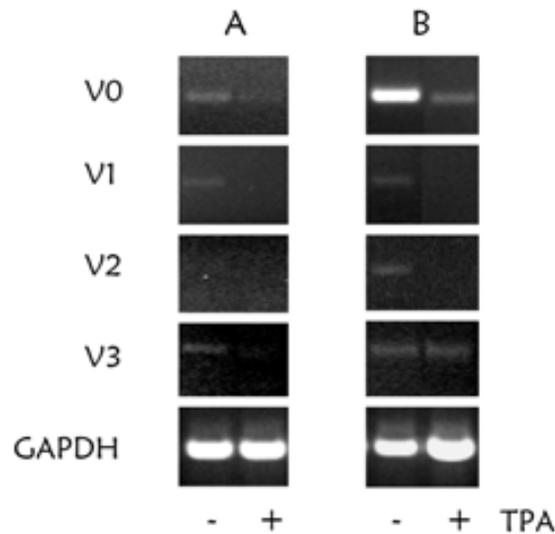


Figura 18: Análisis por RT-PCR de las isoformas de VS durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Realizamos RT a partir de 1µg de ARN total de cultivos celulares de las líneas SK-mel-1.36-1-5 (A) y SK-mel-3.44 (B) de melanoma humano diferenciadas *in vitro* con 160nM de TPA de los días 0 y 15. Las reacciones de PCR las realizamos utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas de VS. Analizamos las reacciones mediante electroforesis en agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. Como control de la reacción utilizamos RT-PCR de GAPDH.

Todos los resultados mostrados evidencian la relación entre la desaparición de la expresión del VS y sus isoformas y el proceso de diferenciación *in vitro* de las células de melanoma humano.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VERSICANO EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMA Y NEUROBLASTOMA HUMANO.

Los melanocitos de la piel tienen el mismo origen embrionario que algunas células del sistema nervioso central, ya que ambas se originan en la cresta neural. En el cerebro adulto, el versicano se encuentra estrictamente regulado: durante la etapa embrionaria se expresan principalmente las isoformas V0 y V1 en lo que será el sistema nervioso central, mientras que en el cerebro adulto se expresa casi exclusivamente la isoforma V2.

Nuestros resultados anteriores habían demostrado la presencia de versicano en las líneas celulares de melanoma humano y su correlación inversa con el grado de diferenciación de las mismas. Además, hemos demostrado que las líneas celulares más indiferenciadas expresan todas las isoformas de VS.

Se había descrito con anterioridad la expresión de todas las isoformas de VS en la línea U-251, que proviene de un astrocitoma (Paulus *et al.*, 1996). Nos planteamos describir la

presencia de VS y sus isoformas en líneas celulares humanas de tumores neurales con diferentes orígenes, tanto glial como neural. Para esto utilizamos tres líneas de astrocitoma humano (U-251, U-373, SW-1088) y dos líneas celulares de neuroblastoma humano (SH-SY5Y, SK-NSH).

Obtuvimos medios condicionados de cultivos subconfluentes de las líneas celulares anteriormente descritas (U-251, U-373, SW-1088, SH-SY5Y y SK-NSH). Éstos fueron digeridos con condroitinasa ABC y analizados por Western Blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-VS producido en nuestro laboratorio (Touab *et al.*, 2002).

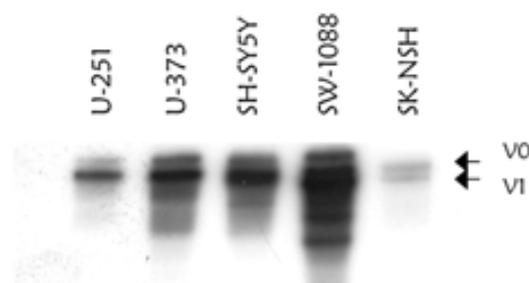


Figura19: **Identificación de VS en medios condicionados de líneas celulares humanas de origen neuronal.** Medio condicionado tanto de células de astrocitoma humano U251, U373 y SW1088, así como de células de neuroblastoma SK-NSH y SH-SY5Y, fueron digeridos con condroitinasa ABC y separados en SDS-PAGE 6%. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-VS tal como se describe en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la figura 19, tanto en los medios condicionados de las líneas celulares de astrocitoma humano como en los de las líneas celulares de neuroblastoma, detectamos la expresión y secreción de las isoformas de versicano V0 y V1.

Determinamos la presencia en las células de este proteoglicano mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para esto fijamos y teñimos las células con el anticuerpo policlonal contra VS. Nuestro anticuerpo reconoce la proteína núcleo del VS (Touab *et al.*, 2002) y por tanto es adecuado para detectar la fracción intracelular de la molécula. El versicano está presente en las células de astrocitoma y neuroblastoma, y presenta una distribución perinuclear en el citoplasma, coherente con una localización en el aparato de Golgi (Fig. 20).

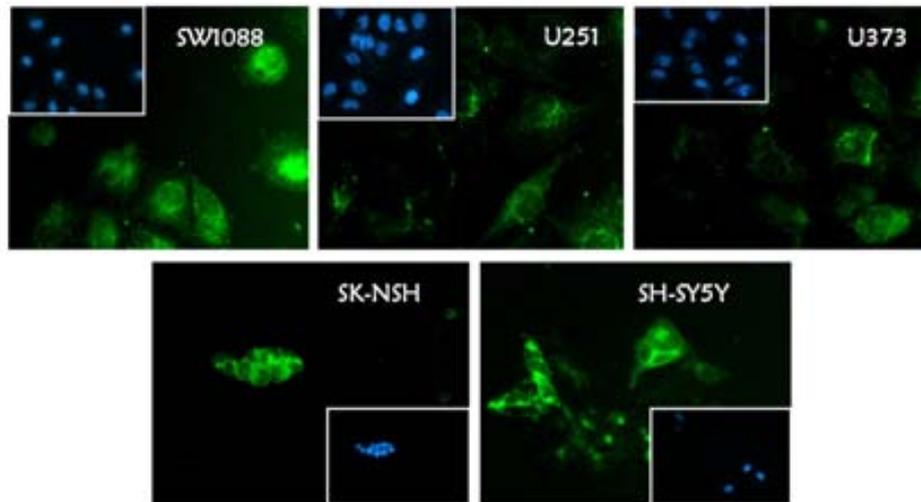


Figura 20: **Inmunocitoquímica de VS en las células humanas de origen neuronal.** Cultivos subconfluentes de las líneas celulares de astrocitoma humano U-251, U-373 y SW1088, y de neuroblastoma humano, SK-NSH y SH-SY5Y, se fijaron con paraformaldehído-sacarosa y se permeabilizaron. Incubamos las células con el anticuerpo policlonal específico para VS (1:1000). La tinción de los núcleos se hizo con Hoechst 33342 (1:100) (recuadro). Los cultivos fueron visualizados y fotografiados con el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800.

Como hemos dicho anteriormente, nuestro anticuerpo es incapaz de detectar todas las isoformas de VS, así que para detectarlas es preciso utilizar otras aproximaciones. Para esto realizamos ensayos de RT-PCR y Northern Blot con ARNm extraído de células en cultivo en crecimiento exponencial.

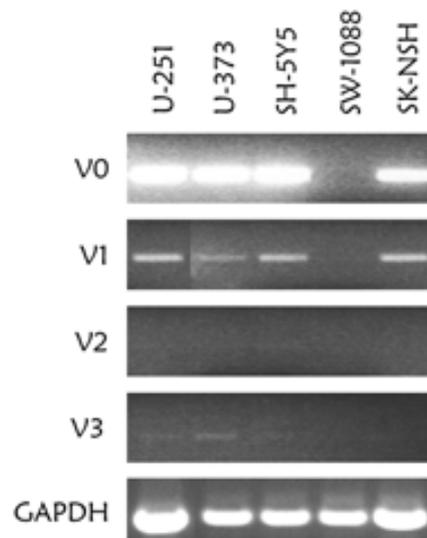


Figura 21: **Detección de las isoformas de VS (V0, V1, V2 y V3) en líneas celulares neurales humanas por RT-PCR.** Realizamos RT a partir de 1µg de ARN total de cultivos de las líneas celulares humanas, de astrocitoma U-251, U-373, SW-1088, y de neuroblastoma SK-NSH y SH-SY5Y. Las reacciones de PCR las realizamos utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas de VS. Analizamos las reacciones mediante electroforesis en agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. Como control de la reacción utilizamos RT-PCR de GAPDH.

Como únicamente se pudieron detectar las isoformas principales V0 y V1 en el Western Blot, decidimos analizar la producción de todas las isoformas en nuestro panel de líneas celulares por medio de RT-PCR y Northern Blot.

Aislamos ARNm de cultivos subconfluentes de las líneas celulares de astrocitoma U-251, U-373, SW-1088, y de neuroblastoma SH-5Y5Y y SK-NSH, y realizamos ensayos de RT-PCR para determinar cada una de las isoformas de VS. Como se muestra en la figura 21, todas las líneas celulares analizadas producen las isoformas V0 y V1, en tanto que sólo las células de astrocitoma producen la isoforma más pequeña, V3. No se detectó V2 en ninguna línea celular analizada. Dado que no se pudo obtener ningún dato cuantitativo de dicho análisis, se hicieron una serie de ensayos de Northern Blot que arrojaron resultados similares (Fig. 22). Los transcritos para V0 y V1 fueron detectados mediante la hibridación con una sonda específica para el dominio GAG- β ; se observan como una doble banda alrededor de los 13kb y una dúplex a los 30kb tal como se ha descrito para las células de astrocitoma U251 (Zimmermann *et al.*, 1994). Para V2 se utilizó una sonda específica para el dominio GAG- α que requirió de seis veces más tiempo de exposición que la prueba anterior. Finalmente, se utilizó una sonda para la región HABR, presente en las cuatro isoformas; en este caso tan sólo se pudieron detectar dos bandas correspondientes a V0 y V1, ya que tanto V2 como V3 se mantuvieron por debajo de los límites de detección del Northern Blot. A pesar de detectar grandes cantidades de VS en la línea celular SW-1088 mediante Western Blot e inmunocitoquímica de fluorescencia, fuimos incapaces de detectar la presencia de este proteoglicano tanto en los ensayos de RT-PCR como en los de Northern Blot. Esto podría deberse a mutaciones específicas del gen de VS en esta línea celular.

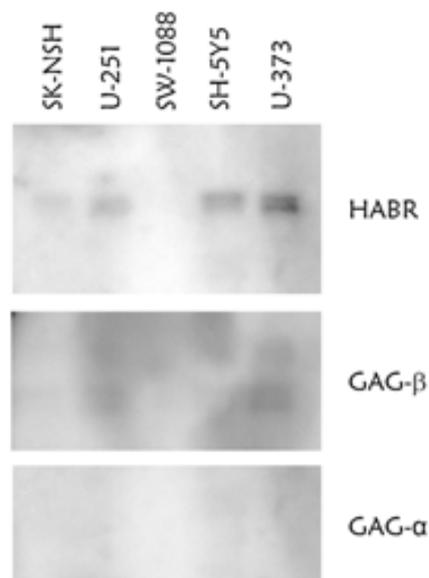


Figura 22: **Análisis por Northern Blot de la expresión de VS en diferentes líneas celulares de origen neural.** 15 μ g de ARN total de cultivos subconfluentes las líneas celulares humanas de astrocitoma, U-215, U-373 y SW-1088, y de neuroblastoma, SK-NSH y SH-5Y5Y, fueron separados en electroforesis desnaturalizante en agarosa 0.8%. Hibridamos con sondas específicas marcadas radioactivamente: sonda específica para el dominio HABR (D7), sonda específica para GAG- β (C4), sonda específica para el dominio GAG- α (PCR-genomic).

OBTENCIÓN DEL PROMOTOR DE VERSICANO HUMANO.

Una vez observada la diferencia en la expresión de versicano entre las distintas líneas celulares de melanoma humano y su relación con el estado de diferenciación de las mismas, decidimos estudiar la regulación de la expresión de versicano en este contexto celular, utilizando como modelo una línea diferenciada que expresa el PG y otra indiferenciada que no lo expresa. Así pues, como segundo objetivo nos planteamos la clonación del promotor de VS humano con la finalidad de analizar su actividad, así como los factores de transcripción que la regulan.

La estrategia utilizada fue la clonación del promotor de VS a partir del ADN cromosomal de células en cultivo de la línea de melanoma humano SK-mel-1.36-1-5 de grado de diferenciación temprano que, como se ha mostrado anteriormente, expresa todas las isoformas de VS. Posteriormente, construimos un plásmido reportero dentro del cual se encontraba la secuencia promotora del gen de VS humano, dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa. Este sistema permite medir el papel que juegan determinadas secuencias reguladoras en la actividad del promotor gracias a la expresión de este gen reportero.

Para conseguir el primer objetivo amplificamos, mediante PCR, un fragmento de 620pb de la secuencia promotora del VS, basándonos en la descrita anteriormente por Naso *et al.* (1994). Clonamos el producto de PCR obtenido en el plásmido pCR2.1, para después subclonarlo en el plásmido pGL2-basic en la posición inmediatamente *up-stream* del gen de la luciferasa. Al final comprobamos la inserción correcta del promotor de versicano mediante digestión y secuenciación.

Comparamos la secuencia obtenida con la descrita anteriormente y encontramos una homología de casi el 100%. Sólo detectamos seis mutaciones puntuales: dos mutaciones de cambio de base, en las posiciones -279 (T/G) y -357 (A/G), y cuatro mutaciones de adición de base, en las posiciones -159, -309 y -406 se añadió una g y en la posición -270 se añadió una c.

Para determinar los posibles factores de transcripción involucrados en la expresión de versicano en las células de melanoma humano, primero realizamos un análisis computacional del fragmento clonado y secuenciado de la región promotora del VS con el programa PATCH (www.gene-regulation.com). Mediante este análisis es posible determinar las secuencias de unión para un gran número de factores de transcripción.

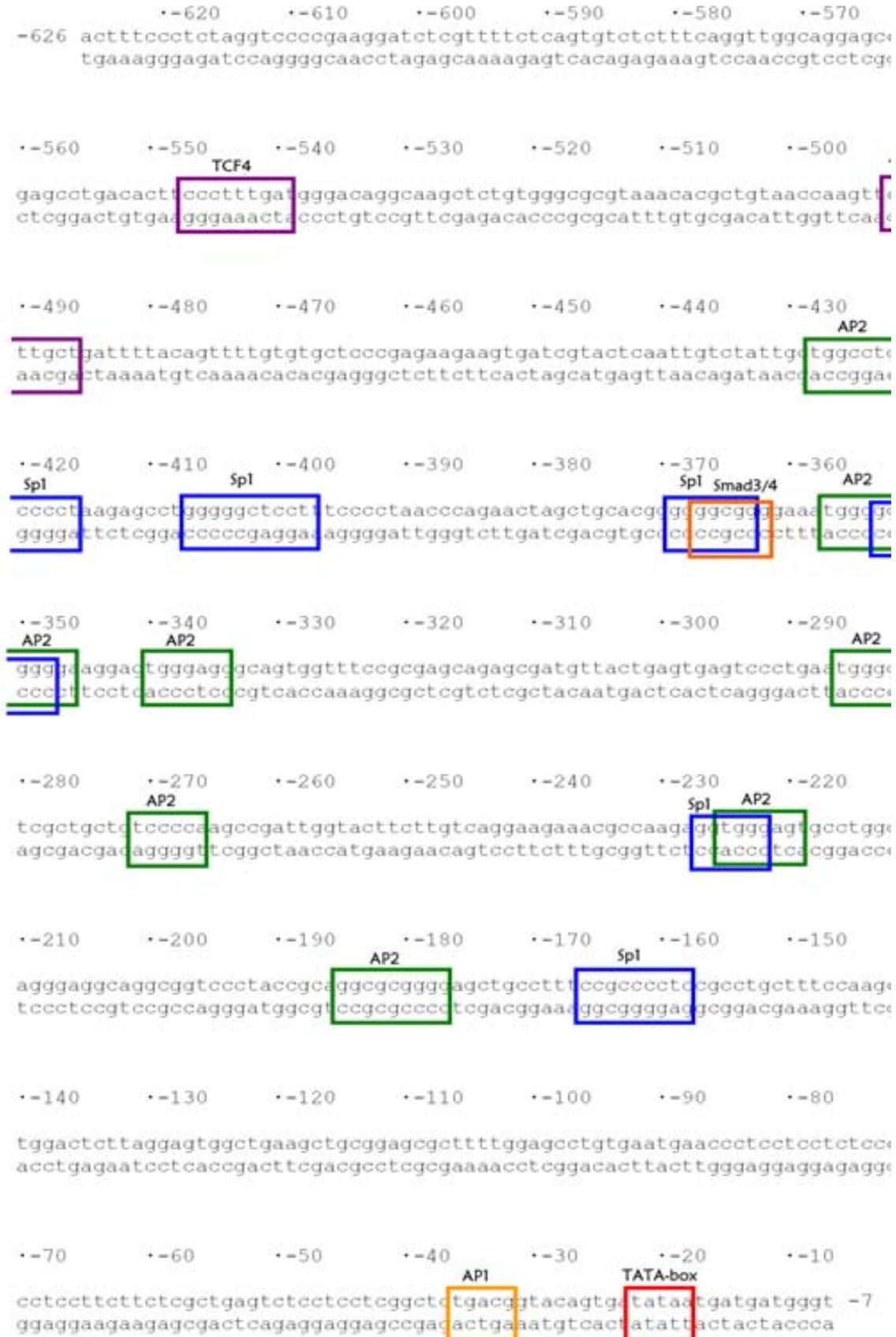


Figura 23: Secuencia del fragmento del promotor de VS humano aislado. Se muestran las cajas de reconocimiento para los diferentes factores de transcripción según el programa PATCH.

De los factores de transcripción encontrados nos fijamos principalmente en aquellos que se hubieran relacionado anteriormente con la progresión del melanoma o la diferenciación del melanocito.

En la figura 23 se muestra la secuencia del fragmento clonado del promotor de *VS* y las cajas de unión para algunos de los factores de transcripción detectados por el programa PATCH. En la figura 24 mostramos un mapa esquemático de estas mismas secuencias y su localización.

Basándonos en los resultados del análisis computacional, determinamos tres zonas de regulación dentro del promotor de *VS*. La primera de ellas se encuentra en el extremo 5' y presenta dos cajas de reconocimiento para TCF-4 en las posiciones -546/-538 y -492/-485 respecto al inicio de la transcripción. La segunda se localiza en la zona central y contiene diversas cajas de unión para Sp1 y AP-2, concretamente 6 secuencias putativas de unión para Sp1 (-421/-417, -407/-397, -370/-361, -354/-349, -227/-221 y -166/-156) y 7 para AP-2 (-428/-424, -356/-346, -340/-335, -286/-280, -271/-266, -225/-220 y -184/-178), además de un caja de unión a Smad3/4 localizada en -366. En la tercera zona localizamos una caja de unión para AP-1 en la posición -36/-32 de dicho promotor.

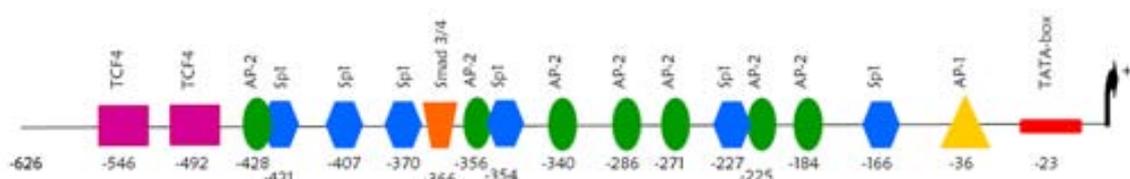


Figura 24: **Mapa esquemático del los sitios de unión de los factores de transcripción al promotor de VS humano.** Se muestra la localización en el promotor de las secuencias de las cajas putativas de reconocimiento de diferentes factores de transcripción, TCF-4 (■), AP-2 (●), Sp1 (⬡), Smad3/4 (▲) y AP-1 (▲).

De entre los factores de transcripción encontrados por el análisis *in silico*, la elección de los arriba mencionados se basó en la posible función de los mismos sobre la expresión de versicano en el contexto celular del melanoma, ya que la vía TCF-4/ β -catenina, AP-2, Sp1, TGF- β y AP-1, han sido relacionados con la progresión del melanoma (entre otras neoplasias) (Robbins *et al.*, 1996; Gershenwald *et al.*, 2001; Korabiowska *et al.*, 2004; Poser y Bosserhoff, 2004; Yang y Meyskens, 2005; Hussein, 2005; Safe y Abdelrahim, 2005) así como con el desarrollo y maduración del melanocito (AP-2) (Nottoli *et al.*, 1998). Es de destacar la abundancia de sitios de unión detectados para los factores de transcripción Sp1 y AP-2.

DETERMINACIÓN DEL PAPEL QUE JUEGAN EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE VERSICANO LAS DIFERENTES REGIONES DE ÉSTE EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO CON DISTINTOS GRADOS DE DIFERENCIACIÓN, SK-MEL-131 Y MEWO.

Una vez obtenida la construcción del promotor de versicano pGL2-pVS-626, ésta fue transfectada de manera transiente en las líneas celulares SK-mel-131 (productora de VS) y MeWo (no productora de VS). Las transfecciones siempre se realizaron en medio con suero y cuando las células se encontraban en el mismo momento aproximadamente de la fase de crecimiento exponencial. La línea celular SK-mel-131 es de melanoma humano y es la línea parental de la línea SK-mel-1.36-1-5 y presenta las mismas características morfológicas y de expresión de moléculas de superficie (Houghton *et al.*, 1987).

El sistema de análisis de la actividad del promotor de VS se basa en la transfección transiente de dos plásmidos reporteros. El primero de ellos, el plásmido pRL-TK, nos indica la efectividad de introducción del ADN a las células, este plásmido contiene un promotor fuerte de expresión constante que dirige la expresión del gen de la renilla. El segundo plásmido, pGL2-basic, es el plásmido a partir del cual hemos construido el plásmido que contiene la secuencia del promotor de versicano humano. Por lo tanto, la actividad relativa de dicho promotor se expresará como la ratio entre la actividad determinada para luciferasa dividida por la actividad detectada para renilla, lo que nos dará un dato normalizado de la actividad del promotor que estemos analizando.

Como era de esperar, al transfectar la línea SK-mel-131 de melanoma humano obtuvimos una actividad relativa 4.6 veces mayor a la obtenida en la línea celular de melanoma MeWo (Fig. 26). Este resultado indica de forma clara que el promotor en la línea celular MeWo se encuentra menos activo que en la línea celular SK-mel-131.

Para analizar el papel concreto que desempeñaba cada una de las regiones del promotor en la regulación de la expresión del VS, obtuvimos mutantes de delección para cada una de las 3 regiones que habíamos determinado anteriormente mediante el análisis computacional del promotor.

A partir del promotor largo (pGL2-pVS-626) clonamos las distintas mutantes de delección en el vector pGL2-basic, dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa. Así obtuvimos las siguientes construcciones: pGL2-pVS-467, la cual no contiene ninguna de las dos cajas putativas de reconocimiento para TCF-4 pero mantiene las secuencias AP-2, Sp1 y AP-1 del promotor, y pGL-VS-120, que carece además de la región central donde se encontraban las diversas cajas

putativas de reconocimiento para AP-2 y Sp1, pero que conserva la secuencia de reconocimiento para AP-1 del extremo 3' (Fig. 25).

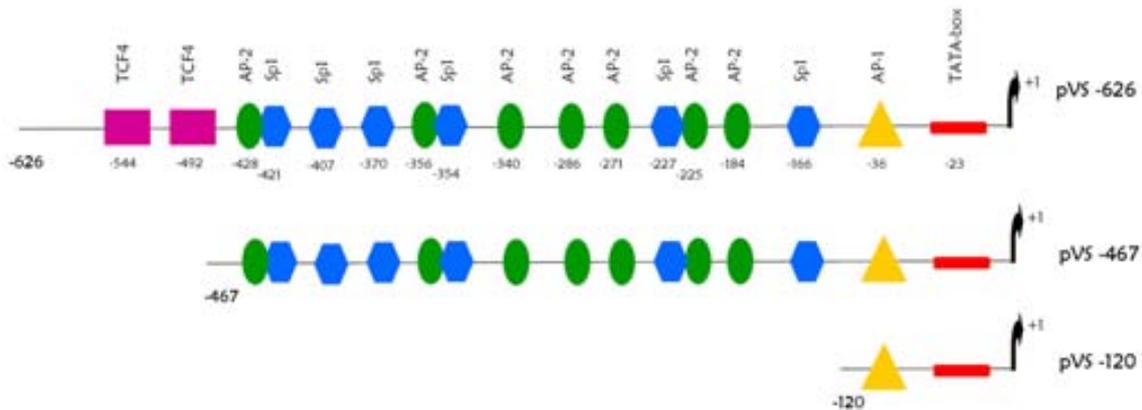


Figura 25: **Representación esquemática del promotor de VS humano clonado y las diferentes mutantes de delección.** Se muestran las mutantes de delección del promotor de VS construidas y la localización en éste de las cajas de reconocimiento para los distintos factores de transcripción (TCF-4 ■, AP-2 ●, Sp1 ⬡ y AP-1 ▲).

Transfectamos de manera transiente las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo. 24 horas más tarde recogimos los extractos celulares y medimos la actividad relativa del promotor de VS entero y de cada una de las mutantes de delección.

En este experimento no observamos ningún efecto significativo sobre la actividad luciferasa en la línea celular MeWo; dado que esta línea celular no produce versicano era de esperar que la actividad del promotor no se viera afectada por la delecciones realizadas en el mismo (Fig. 26).

En el caso de la línea celular SK-mel-131, observamos que la delección del extremo 5' del promotor de VS (construcción pGL2-pVS-467) reduce de manera muy importante su actividad, aproximadamente un 60% (Fig. 26). En esta construcción no se encuentran, entre otras, ninguna de las dos cajas putativas de reconocimiento para TCF-4. La pérdida de más del 60% de la actividad nos indica la presencia de elementos importantes que regularían de forma positiva la expresión de este proteoglicano en la región -626/-467 del promotor.

Como se observa en la figura 26, al transfectar de manera transiente la construcción pGL2-pVS-120 en la línea celular SK-mel-131 detectamos una actividad relativa del 25% con respecto al promotor largo de VS. La diferencia en la actividad del promotor detectada entre la construcción pGL2-pVS-467 y pGL2-pVS-120 es sólo de un 10% menos. El 25% de la actividad total del promotor de versicano es debida a los 120pb que se encuentran justo antes del inicio de la transcripción. Podemos decir que esta es la actividad mínima del promotor de VS y es

responsable de la activación de la producción de este proteoglicano. En esta zona hemos localizado secuencias de reconocimiento para AP-1, entre otros factores de transcripción.

Al eliminar la región central del promotor de versicano (-467/-120) se produce una pérdida del 10% de la actividad de dicho promotor, lo cual parece indicar que los elementos reguladores de dicha región, donde se encuentran cajas putativas de reconocimiento para AP-2 y Sp1, son menos relevantes para la expresión de versicano en las células de melanoma humano que los elementos reguladores que se encuentran tanto en el extremo 5' (pGL2-pVS-626, TCF-4) como en el extremo 3' (pGL2-pVS-120, AP-1).

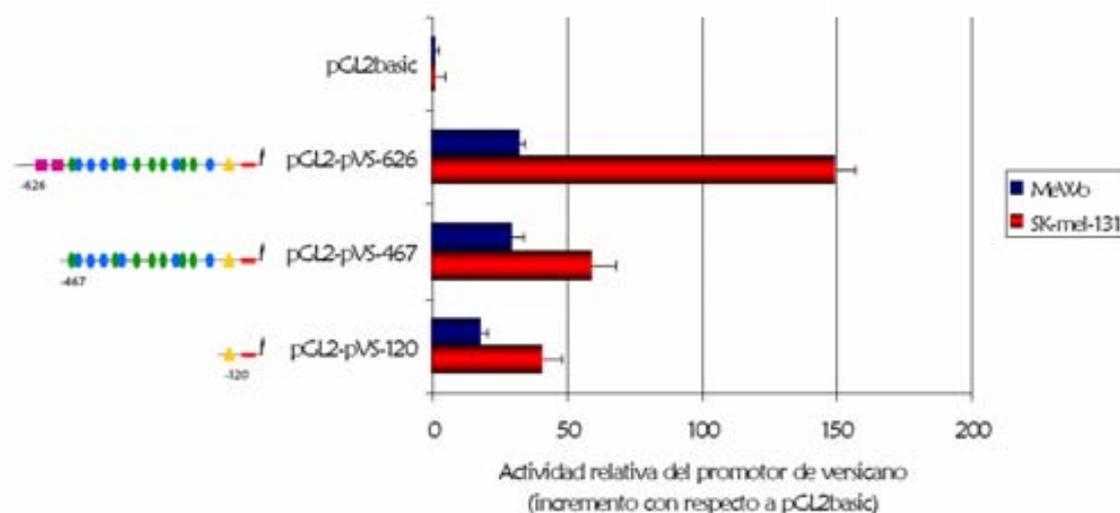


Figura 26: Análisis del efecto de las diferentes deleciones del promotor de VS en las líneas celulares de melanoma humano productoras y no productoras de este proteoglicano. Análisis de la actividad del promotor de VS humano. Transfección transiente de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 (rojo) y MeWo (azul) con la construcción del promotor de versicano largo pGL2-pVS-626 y las mutantes de deleción del mismo promotor pGL2-pVS-467 y pGL2-pVS-120. La transfección se realizó en cultivos celulares subconfluentes y en medio con suero. La actividad de luciferasa se midió 24 horas después de la transfección. Se utilizó 1µg de ADN de cada construcción y 100ng del plásmido pRL-TK como control de la transfección. Los resultados se muestran expresados como el incremento de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector vacío, pGL2-basic. Se muestran los resultados de un experimento de 8 realizados de forma independiente.

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE TCF-4 EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE VERSICANO EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO.

El factor de transcripción TCF-4 pertenece a la familia LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor/T-cell-specific factor*), cuyos miembros son los últimos componentes de la vía de señalización de Wnt. Hasta el momento se han descrito cuatro miembros de esta familia en

mamíferos: LEF-1, TCF-1, TCF-3, y TCF-4, los cuales reconocen la secuencia consenso AGATCAAAGGG (van de Wetering *et al.*, 1991; van Beest *et al.*, 2000).

Habíamos observado la presencia de dos cajas de reconocimiento para el factor de transcripción TCF-4 en el extremo 5' del promotor de VS y al eliminar ambas cajas de reconocimiento observábamos la pérdida de más del 60% de la actividad del promotor. Esto nos hablaba de la importancia de dicha zona en el control de la producción de éste proteoglicano en el contexto celular del melanoma.

Con estos resultados nos planteamos determinar el papel del extremo 5' del promotor de VS y más en concreto el papel que juegan las secuencias de reconocimiento de TCF-4 -546 y -492. Decidimos generar dos mutantes de delección para aislar el papel que pudiera tener cada una de ellas en la expresión de VS. Obtuvimos así la construcción pGL2-pVS-518, la cual carece de la caja -546 para la posible unión a TCF-4 (Fig. 27).

Transfectamos de forma transiente las construcciones pGL2-pVS-626 (con las dos cajas de reconocimiento -546 y -492), pGL2-pVS-518 (con la caja -492) y pGL2-pVS-467 (sin ninguna de las dos cajas) en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo. 24 horas después recogimos los extractos de estas transfecciones y medimos la actividad relativa de luciferasa. Como se muestra en la figura 27, al quitar la primera caja de unión a TCF-4 perdemos más del 65% de la actividad total del promotor, mientras que cuando quitamos las dos cajas de reconocimiento la pérdida es del 45%.

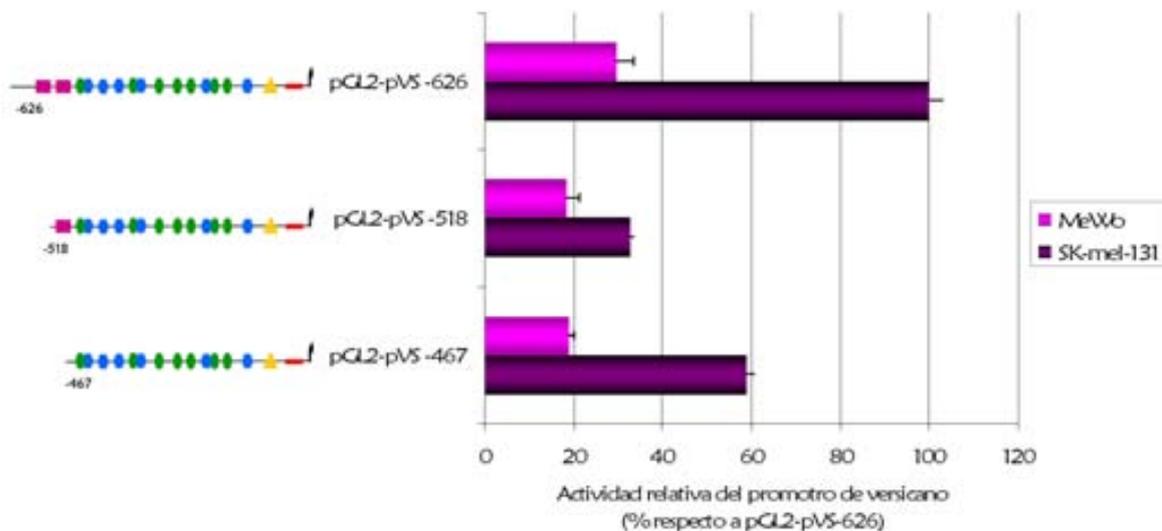


Figura 27: Efecto de las delecciones de las cajas TCF-4 del promotor de VS humano en la actividad del mismo en las líneas celulares de melanoma humano. Análisis de la actividad del promotor de versicano humano. Transfección transiente de la línea celular SK-mel-131 (morado) y MeWo (rosa) con 1µg de las construcciones pGL2-pvs-626, pGL2-pVS-518 o pGL2-pVS-467 y 100ng del vector pRL-TK. La actividad de luciferasa se midió 24 horas después de la transfección. Los datos están expresados en porcentaje de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-626. Se muestran los resultados de un experimento de 6 realizados de manera independiente.

Nuestros resultados muestran que los factores de transcripción que se unen en la zona del promotor comprendida entre -626 a -518, y que contiene la caja -546, son necesarios para la expresión de versicano, regulando casi el 65% de dicha expresión (Fig. 27).

Al eliminar la zona donde se encuentra la segunda caja putativa para la unión de TCF-4, la actividad relativa del promotor aumenta un 20% con respecto a la construcción pGL2-pVS-518. Esto bien pudiera ser un artefacto ya que en esta construcción sólo hay 20pb tras la secuencia de reconocimiento para TCF-4 y podría ser que este espacio no fuese suficiente para la estabilización o formación del complejo transcripcional (Fig. 27).

Es importante hacer notar que al transfectar las mutantes de delección del promotor en la línea celular MeWo no vemos ningún efecto significativo en la actividad que éste muestra (Fig. 27).

A diferencia de los factores de transcripción clásicos, los miembros de la familia LEF/TCF no sólo requieren de la unión de éstos al ADN para activar la transcripción, sino que se convierten en potentes activadores de la transcripción gracias a la interacción de éstos con β -catenina, también miembro de la cascada de señalización de Wnt.

De esta manera, si las cajas de reconocimiento -546 y -492 son reguladas de forma específica por TCF-4, la sobreexpresión conjunta o por separado de TCF-4 y β -catenina debería producir un aumento en la actividad relativa del promotor de VS.

Con el fin de estudiar este efecto, cotransfectamos de manera transiente la línea celular SK-mel-131 con las construcciones del promotor de VS pGL2-pVS-626 o pGL2-pVS-467, así como con los vectores de expresión de activadores o represores de la vía Wnt siguientes:

- β -catenina silvestre
- TCF-4 silvestre
- TCF-4-VP16 (dominante positivo de TCF-4)
- TCF-4- Δ N (dominante negativo de TCF-4)

48 horas después de la transfección recogimos los extractos celulares y determinamos la actividad específica de luciferasa/renilla.

Como se muestra en la figura 28, la sobreexpresión de TCF-4 y β -catenina induce la actividad del promotor de versicano. Al cotransfectar la construcción del promotor de versicano largo pGL2-pVS-626 y β -catenina o TCF-4 en las células SK-mel-131, inducimos un incremento de 2.5 veces en la actividad luciferasa respecto al control. En contraste, la cotransfección con la

construcción del promotor de versicano pGL2-pVS-467, que carece de las dos cajas putativas de reconocimiento para TCF-4, no responde a la sobreexpresión de estas dos proteínas.

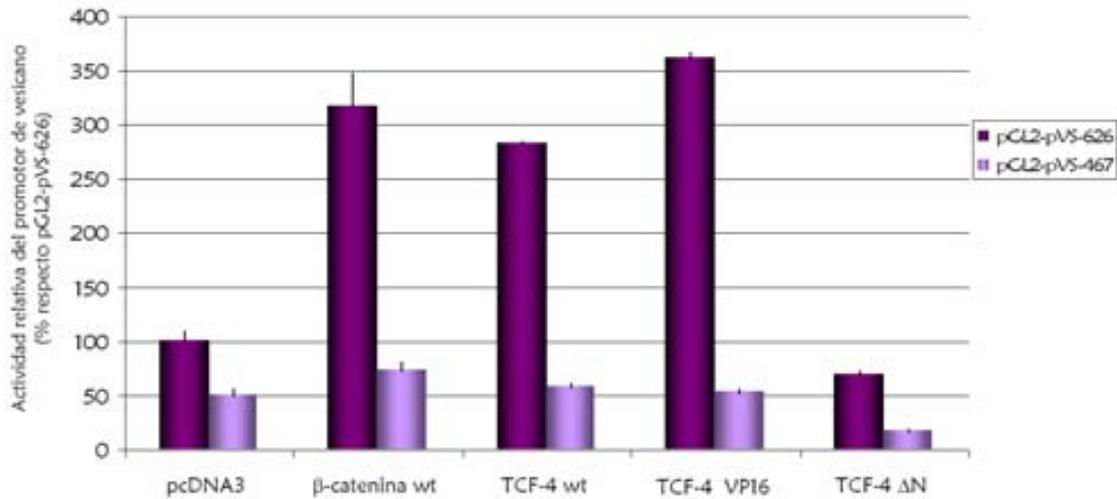


Figura 28: **Efecto de β-catenina/TCF-4 sobre el promotor de VS.** Cotransfección transiente de la línea celular de melanoma humano SK-mel-131 con 1μg de las construcciones pGL2-pVS-626 (morado) o pGL2-pVS-467 (lila); 1μg de los vectores de expresión de β-catenina wt, TCF-4 wt, TCF-4-VP16 o TCF-4-ΔN, para equiparar la cantidad de ADN transfectado se utilizó el plásmido pcDNA3, y 100ng del vector pRL-TK como control de la transfección. La actividad de luciferasa se midió 48 horas después de la transfección. Los datos se muestran como porcentaje de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la de la construcción pGL2-pVS-626. Se muestran los resultados de un experimento de 4 realizados de manera independiente.

Además, cuando sobreexpresamos el dominante positivo de TCF-4, TCF-4-VP16, observamos un mayor incremento de la actividad del promotor (3.5 veces con respecto al control), mientras que al sobreexpresar el dominante negativo de TCF-4, TCF-4-ΔN, inhibimos la actividad del promotor de VS.

Todos estos efectos se observan sólo al transfectar la construcción que contiene el promotor largo de VS (pGL2-pVS-626) y no así en la transfección con el promotor que carece de las cajas de reconocimiento para TCF-4 (pGL2-pVS-467). Por lo tanto, podemos decir que β-catenina/TCF-4 activan la expresión de VS de forma específica en la región -626 y -467 del promotor en las células de melanoma humano (Fig. 28).

A pesar de que las secuencias de unión a TCF-4 encontradas en el promotor de versicano no corresponden exactamente a la secuencia consenso de unión reportada para este factor de transcripción (AGATCAAAGGG), nuestros resultados demuestran que TCF-4 actúa claramente sobre la expresión de este proteoglicano.

En este sentido, y para verificar la unión de este factor de transcripción al promotor, decidimos realizar en paralelo ensayos de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) para cada una de las dos cajas putativas de unión a TCF-4, -544/-538 y -492/-485, del promotor de VS.

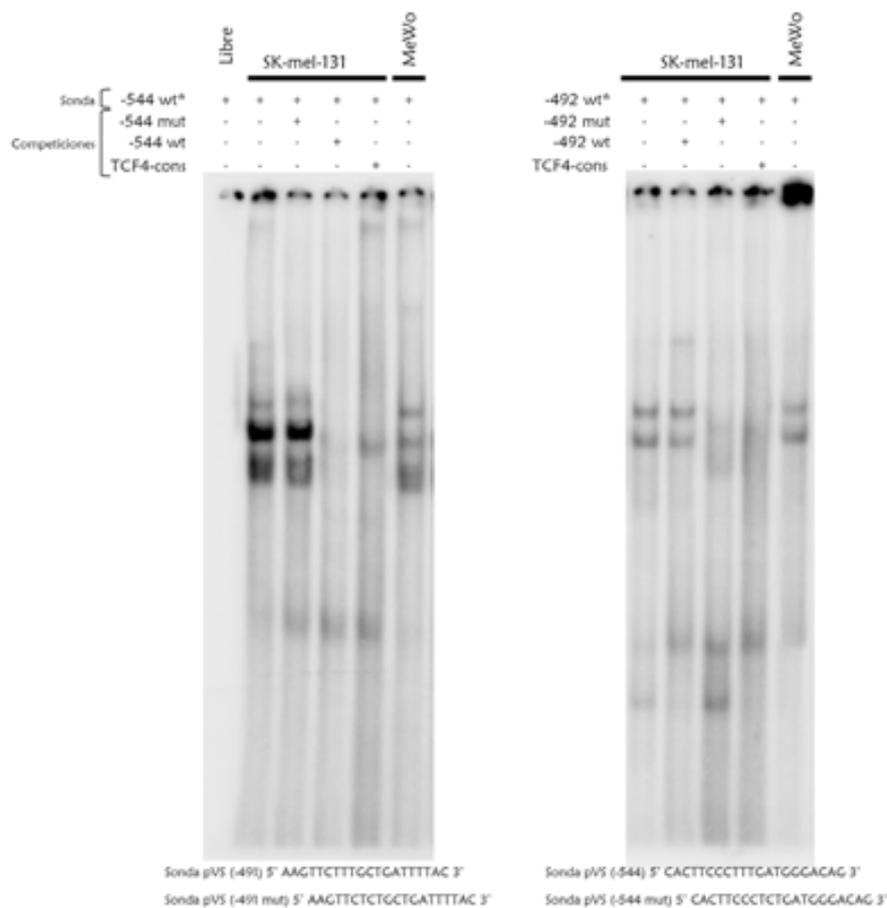


Figura 29: **Formación específica de un complejo ADN-proteína en las dos secuencias de unión para TCF-4 del promotor de VS en las líneas de melanoma humano.** 10 μ g de extracto nuclear de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo se incubaron con 100000cpm de oligonucleótido específico de doble cadena marcado radiactivamente (*) (oligonucleótido -544wt y oligonucleótido -492wt). La especificidad del complejo se comprobó mediante competición con el mismo oligonucleótido sin marcar, oligonucleótido consenso para TCF-4 u oligonucleótido mutado para cada una de las secuencias; para esto añadimos a la reacción oligonucleótido de doble cadena sin marcar 50 veces más concentrado. Los complejos de ADN-proteína fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida al 5% en condiciones no desnaturalizantes.

Para ello, hibridamos los extractos nucleicos de las líneas celulares de melanoma SK-mel-131 y MeWo con oligonucleótidos de doble cadena específicos de las regiones -544 (5'-CACTTCCCTTTGATGGGACAG-3') y -492 (5'-AAGTTCTTTGCTGATTTTAC-3') del promotor de versicano marcados radiactivamente. Estos complejos se separaron posteriormente en geles de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes.

El oligonucleótido que contiene la caja de reconocimiento TCF -544 forma un complejo proteína-ADN de gran intensidad en el caso de la línea SK-mel-131 (Fig. 29), mientras que en la línea MeWo este mismo complejo presenta una intensidad menor. Esta diferencia en la intensidad de los complejos podría significar que en estas células no se encuentra activo este sitio de unión, es decir, los factores de transcripción no se encuentran activados para poder unirse al promotor. Este hecho estaría en concordancia con nuestros resultados anteriores (Fig. 26 y Fig. 27).

En el caso del oligonucleótido que contiene la secuencia de la caja que reconoce a TCF-4 -492, el patrón de bandas obtenido no es el mismo que en el caso del oligonucleótido anterior, posiblemente por la composición proteica del complejo formado. En este caso también, la intensidad de la señal obtenida en las células SK-mel-131 es mayor que en la línea celular MeWo.

Determinamos la especificidad de la unión de ambos oligonucleótidos al competir cada uno de ellos con el mismo oligonucleótido o con el oligonucleótido consenso para TCF-4 y pudimos observar que en ambas competiciones el complejo formado anteriormente era desplazado. En cambio, cuando competimos la unión con oligonucleótidos mutados en la zona de unión para TCF-4 no observamos el desplazamiento de la marca observada (Fig. 29).

Para determinar la composición del complejo formado en ambos oligonucleótidos y así poder establecer la presencia de TCF-4 y β -catenina, incluimos en el mismo ensayo de EMSA anticuerpos específicos contra estas proteínas.

En la figura 30 se muestra como la presencia del anticuerpo anti-TCF-4 disminuye la intensidad del complejo formado, es decir, secuestra parte de este complejo (indicado por la flechas en la figura 30). En el caso del anticuerpo específico contra β -catenina, podemos ver que la presencia de este anticuerpo disminuye con más efectividad el complejo formado. Por lo tanto, ahora sabemos que el complejo TCF-4/ β -catenina se une específicamente a las secuencias de reconocimiento específicas para TCF-4 del promotor de versicano en las células de melanoma humano.

Nuestros resultados nos han permitido determinar la importancia de la acción del complejo TCF-4/ β -catenina en la activación del promotor de versicano, pero ¿qué relevancia tiene la acción de estas proteínas en la expresión de versicano en el contexto de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo?

Para responder a esta pregunta, analizamos mediante un ensayo de Western Blot la presencia de TCF-4 y β -catenina en las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo. Para esto utilizamos extractos nucleares de ambas líneas celulares, que separamos en SDS-PAGE y posteriormente incubamos con anticuerpos específicos para cada proteína.

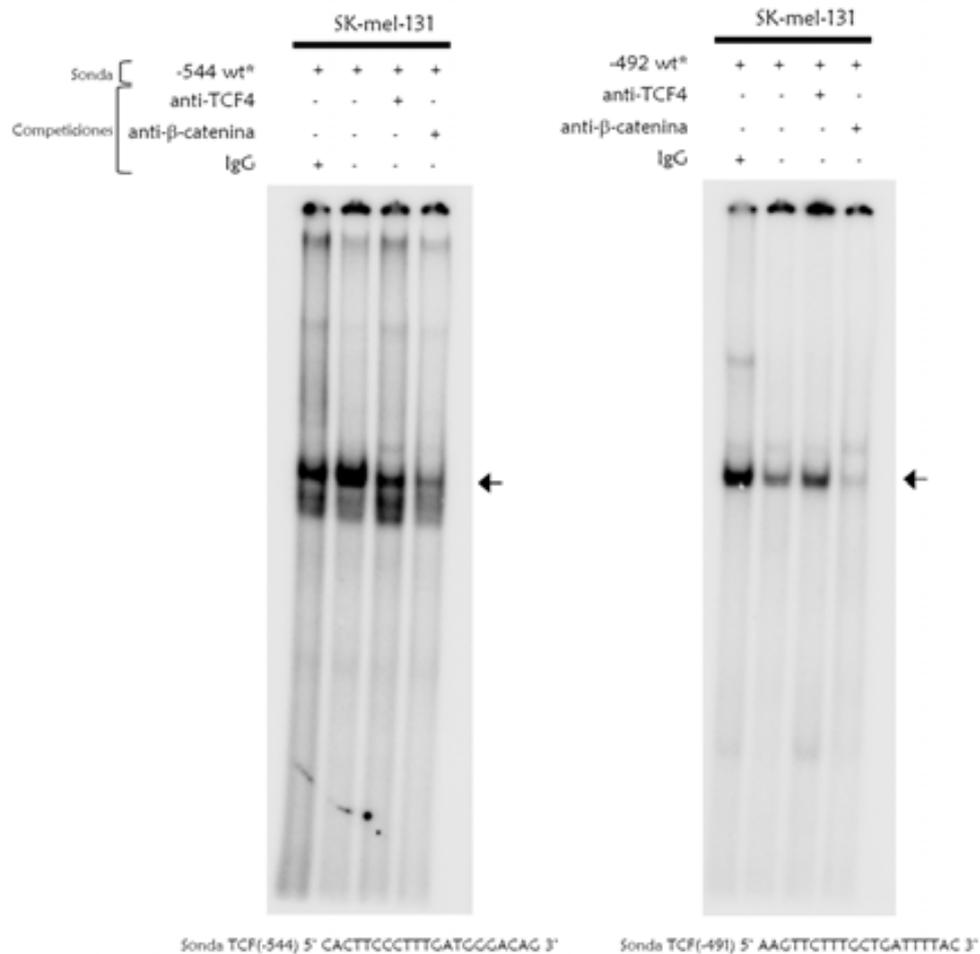


Figura 30: **El complejo TCF-4/β-catenina se une de manera específica al promotor de VS.** 10μg de extracto nuclear de la línea celular SK-mel-131 se incubaron con 100000cpm de oligonucleótido específico de doble cadena marcado radiactivamente (*) (oligonucleótido -544wt y oligonucleótido -492wt). La presencia en el complejo de ADN-proteína de TCF-4 o β-catenina se detectó por medio de la adición de 3μg de anticuerpo específico anti-TCF-4 o anti-β-catenina, como control se añadieron 3μg de IgG no específicas. Los complejos ADN-proteína fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida al 5% en condiciones no desnaturizantes.

Como se muestra en la figura 31, la detección con el anticuerpo específico contra TCF-4 nos permite observar la presencia de dos bandas de aproximadamente 60kDa en ambas líneas celulares: este patrón de bandas es el esperado para TCF-4. Parece que la expresión de TCF-4 se encuentra ligeramente disminuida en la línea celular MeWo en comparación con la señal detectada para SK-mel-131.

Al incubar con el anticuerpo específico contra β-catenina pudimos detectar en ambas líneas celulares la presencia de una banda de aproximadamente 92kDa que correspondería a β-catenina. En este caso no detectamos diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas entre los extractos nucleares de ambas líneas celulares.

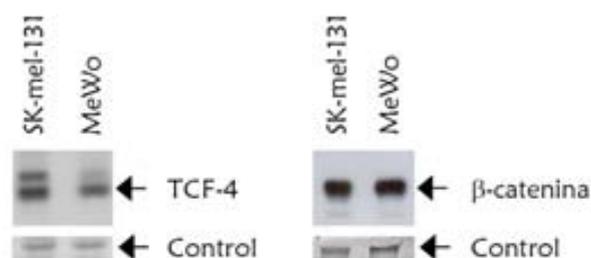


Figura 31: Las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo producen TCF-4 y β -catenina. 30 μ g de extractos nucleares de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo fueron separados en SDS-PAGE al 6%. La detección se realizó con anticuerpos comerciales específicos para TCF-4 (1:1000) y β -catenina (1:2000). Como control de carga se muestra la tinción con Coomassie de las membranas transferidas.

Para determinar la capacidad de respuesta de las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo al estímulo de la vía TCF-4/ β -catenina, hemos determinado la actividad TOP-Flash/FOP-Flash de estas células.

La activación de la vía TCF-4/ β -catenina se refleja en la transactivación de la luciferasa en el plásmido TOP-Flash *versus* el plásmido mutado FOP-Flash, ya que la construcción TOP-Flash contiene tres sitios específicos de unión para los factores de transcripción LEF/TCF que regularían la expresión del gen de la luciferasa, mientras que el plásmido FOP-Flash contendría estos mismos sitios reguladores mutados.

Para analizar la actividad TOP/FOP de las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo, cotransfectamos de forma transiente las construcciones reporteras de la actividad TCF/ β -catenina TOP-flash o el mutante FOP-flash y los siguientes vectores de expresión:

- β -catenina silvestre
- β -catenina S37Y (dominante positivo de β -catenina)
- TCF-4 silvestre
- TCF-VP16 (dominante positivo de TCF-4)
- TCF- Δ N (dominante negativo de TCF-4)

Como control positivo utilizamos la línea celular de carcinoma pancreático RWP-1, de carácter epitelial. Esta línea responde muy bien a los estímulos de la vía Wnt por lo que serviría para verificar que el sistema TOP/FOP esté funcionando (Pujal *et al.*, 2006). En la figura 32A se muestra como la actividad relativa TOP/FOP en la línea celular RWP-1 aumenta cuando sobrexpresamos activadores de esta vía como son β -catenina, β -catenina-S37Y y TCF-4-VP16, y disminuye cuando sobrexpresamos el dominante negativo de TCF-4.

Como podemos observar en la figura 32B, la línea SK-mel-131 presenta una actividad TOP/FOP aproximadamente 2 veces mayor que la presente en la línea MeWo. La cotransfección

de TOP o FOP con los vectores de expresión β -catenina y β -catenina S37Y en la línea SK-mel-131, induce un aumento de la actividad TOP/FOP de más de 7 veces con respecto a la actividad basal de esta línea celular, mientras que la línea MeWo es incapaz de responder a este estímulo.

Respecto a los vectores de expresión de TCF-4, al transfectar la línea celular SK-mel-131 con el dominante positivo de TCF-4, TCF-4-VP16, observamos un aumento de 10 veces en la actividad TOP/FOP. Como era de esperar, en las células MeWo también vemos un aumento de dicha actividad. Por el contrario, cuando sobrexpresamos el dominante negativo de TCF-4, TCF-4- Δ N, observamos una disminución del 30% de la actividad TOP/FOP en la línea celular SK-mel-131. Sin embargo, es curioso notar que la sobrexpresión de TCF-4 wt no tiene ningún efecto sobre la actividad TOP/FOP en las células SK-mel-131. Esto podría deberse a que el TCF-4 sobrexpresado no se encuentre en el núcleo. Esto podría ser así ya que tampoco observamos un efecto claro de esta sobrexpresión en la línea celular RWP-1.

Podemos concluir que la vía de activación TCF-4/ β -catenina se encuentra más activa en la línea celular SK-mel-131 que en la línea celular MeWo.

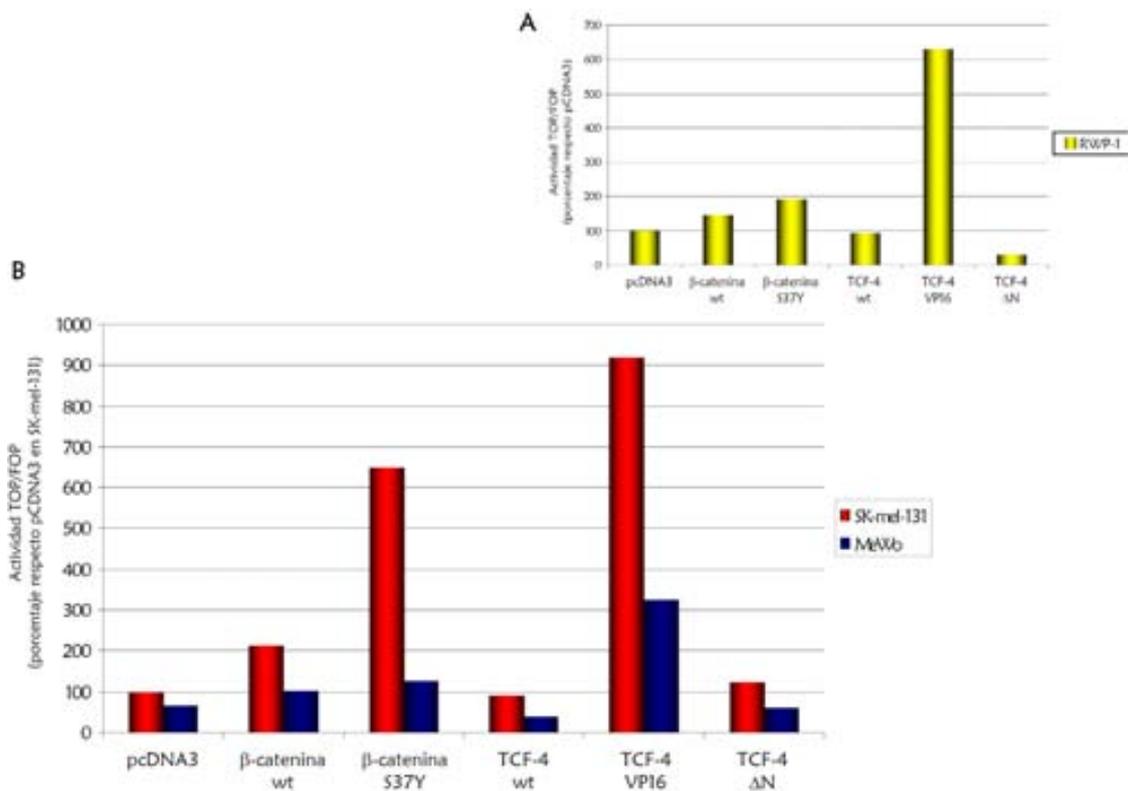


Figura 32: Efecto de la sobrexpresión de β -catenina/TCF-4 sobre la actividad TOP/FOP de las células de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo. Cotransfección transiente de las líneas celulares SK-mel-131 (rojo) y MeWo (azul) de melanoma humano (B) y de la línea de carcinoma pancreático RWP-1 (amarillo) como control (A) con 1 μ g de las construcciones TOP-flash o FOP-flash, 1 μ g de los vectores de expresión de β -catenina wt, β -catenina S37Y, TCF-4 wt, TCF-4-VP16 o TCF-4- Δ N. Para igualar la concentración de ADN se utilizó pcDNA3, y 100ng del vector pRL-TK como control de la transfección. La actividad de luciferasa se midió 48 horas después de la transfección. Los datos se muestran como el porcentaje de la actividad TOP-flash/FOP-flash con respecto a la del pcDNA3 en la línea SK-mel-131. Se muestran los resultados de un experimento de 4 realizados de manera independiente.

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE AP-1 EN LA EXPRESIÓN DE VERSICANO EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.

Hemos descrito que más del 30% de la actividad del promotor de versicano en las células SK-mel-131 de melanoma humano se da gracias a los últimos 120pb del promotor y al analizar *in silico* la secuencia del promotor de versicano detectamos dentro de esta región una secuencia de reconocimiento para el factor de transcripción AP-1.

Para analizar el papel que juega esta secuencia de reconocimiento en la actividad del promotor de VS, generamos dos construcciones con mutaciones específicas en la caja de reconocimiento para AP-1.

Obtuvimos las construcciones: pGL2-pVS-626^{AP-1mut}, que contiene la secuencia completa del promotor de VS y sólo tiene dos bases cambiadas en la región -36, y la construcción pGL2-pVS-120^{AP-1mut}, que sólo contiene los últimos 120 pares de bases del promotor de VS y dos bases mutadas en la región -36. Comprobamos por secuenciación la presencia de las mutaciones en ambas construcciones.

Transfectamos de forma transiente en la línea celular SK-mel-131 las construcciones pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-120 y las mutadas pGL2-pVS-626^{AP-1mut} y pGL2-pVS-120^{AP-1mut}.

Como se observa en la figura 33, al mutar directamente la caja de reconocimiento para AP-1, la actividad del promotor de VS es abolida por completo, tanto en la construcción larga (pGL2-pVS-626^{AP-1mut}) como en la construcción pGL2-pVS-120^{AP-1mut}. Podemos concluir que esta secuencia es crucial para la actividad del promotor de versicano en las células de melanoma humano.

AP-1 (*Activating protein-1*) es una familia de factores de transcripción que consiste en homodímeros o heterodímeros de proteínas del tipo bZIP (*basic region leucine zipper*), como Jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), o ATF (*activating transcription factor*; ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF). La quinasa JNK (*Jun-N-terminal kinase*) fosforila y activa a miembros de esta familia como por ejemplo c-Jun, B-Jun o ATF2 (Karin *et al.*, 1997).

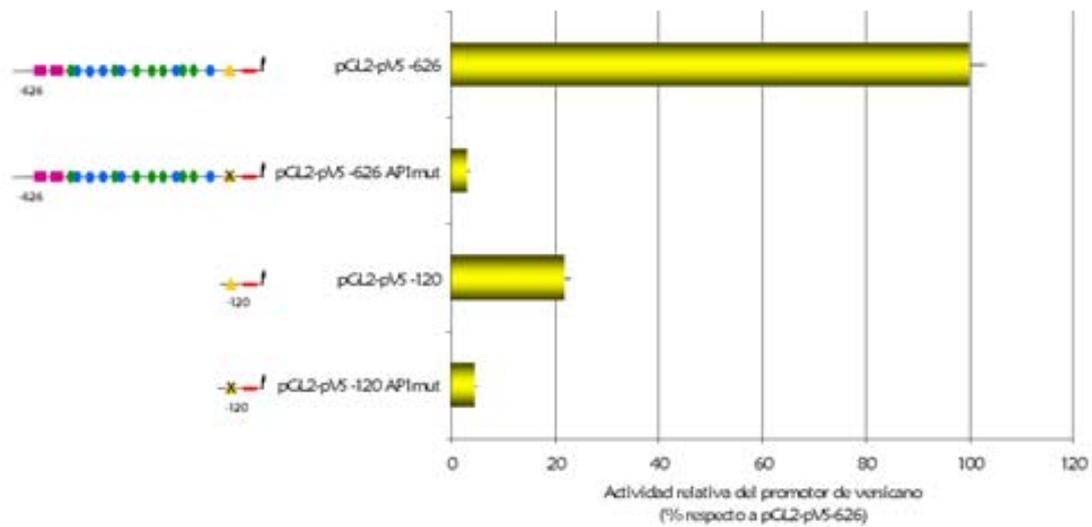


Figura 33: **Efecto de la mutación de la caja putativa de reconocimiento AP-1 del promotor de VS en la actividad del mismo.** Análisis de la actividad luciferasa/renilla del promotor de VS. Transfección transiente de la línea celular SK-mel-131 con 1 μ g de las construcciones pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-626^{AP-1mut}, pGL2-pVS-120 y pGL2-pVS-120^{AP-1mut} y 100ng del vector pRL-TK como control de la transfección. La actividad de luciferasa se midió 24 horas después de la transfección. Los datos se muestran como el incremento de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-626. Se muestran los resultados de un experimento de 6 realizados de forma independiente.

Para determinar el papel de AP-1 en la actividad del promotor de VS inhibimos la acción de las JNK añadiendo en la transfección de las construcciones pGL2-pVS-626 y pGL2-pVS-120 el inhibidor específico para JNK, SP600125. Como podemos observar en la figura 34, al añadir el inhibidor SP600125 la actividad relativa del promotor de VS corto pGL2-pVS-120 disminuye un 50%. También observamos esta inhibición en el caso del promotor largo, pero con menor intensidad (aproximadamente 30% de inhibición).

Podemos concluir que la inhibición de la quinasa JNK disminuye la activación del promotor de VS en las células de melanoma humano SK-mel-131.

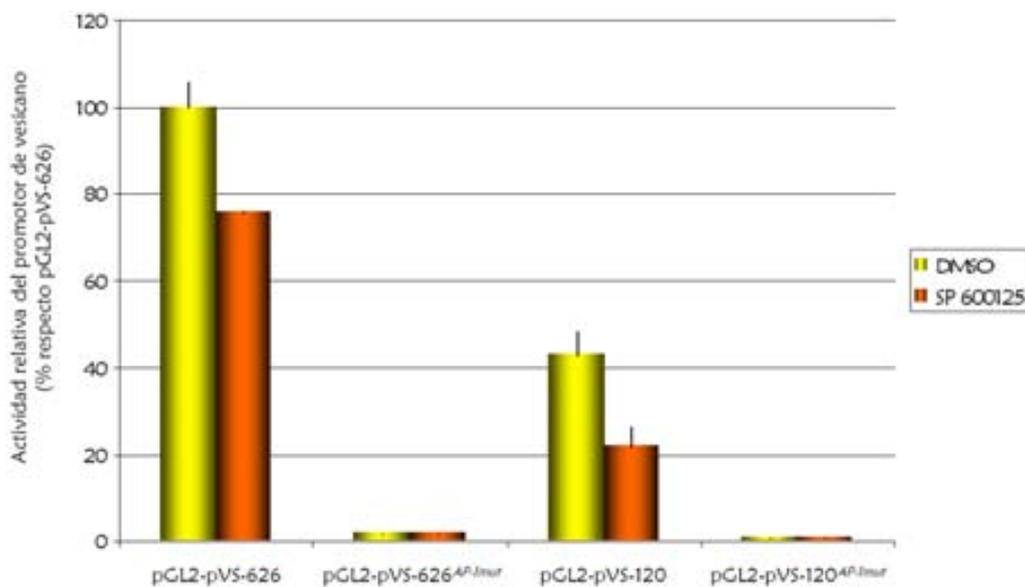


Figura 34: **Efecto de la inhibición de la quinasa JNK sobre la regulación de la actividad del promotor de VS en la línea celular SK-mel-131.** Análisis de la actividad relativa del promotor de VS. Transfectamos de forma transiente las células de melanoma humano SK-mel-131 con 1 μ g de las construcciones pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-626^{AP-1mut}, pGL2-pVS-120 o pGL2-pVS-120^{AP-1mut} y 100ng del vector pRL-TK como control de transfección. 16 horas antes de recoger los extractos, las células se trataron en medio sin FCS con 50 μ M del inhibidor SP 600125 (naranja). Los resultados se muestran como el incremento de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-626. Se muestra un experimento de 4 realizados de manera independiente.

Después de observar este efecto inhibitorio de JNK sobre la activación del promotor de VS, decidimos realizar ensayos de EMSA de la región de unión a AP-1 para así verificar que el efecto que observamos es debido a la unión directa de esta familia de factores de transcripción al promotor de VS.

Para ello hibridamos los extractos nucleares de la línea celular de melanoma SK-mel-131 con oligonucleótidos de doble cadena específicos de la región -36 del promotor de VS marcados de forma radiactiva y separamos los complejos formados en un gel de acrilamida no desnaturizante.

En la figura 35 podemos observar la formación de un complejo ADN-proteína específico de la región -36 del promotor de versicano. La especificidad de la unión ADN-proteína fue determinada mediante la competencia con el mismo oligonucleótido o con el oligonucleótido consenso para AP-1. Como se puede apreciar, en estas condiciones el complejo observado es desplazado por completo (Fig. 35).

Para determinar la presencia de la proteína c-jun en el complejo ADN-proteína, añadimos a la unión un anticuerpo específico contra c-jun. Sin embargo, esta competición no es

capaz de desplazar la unión al oligonucleótido. De esto se deduce que c-jun no forma parte de este complejo (Fig. 35).

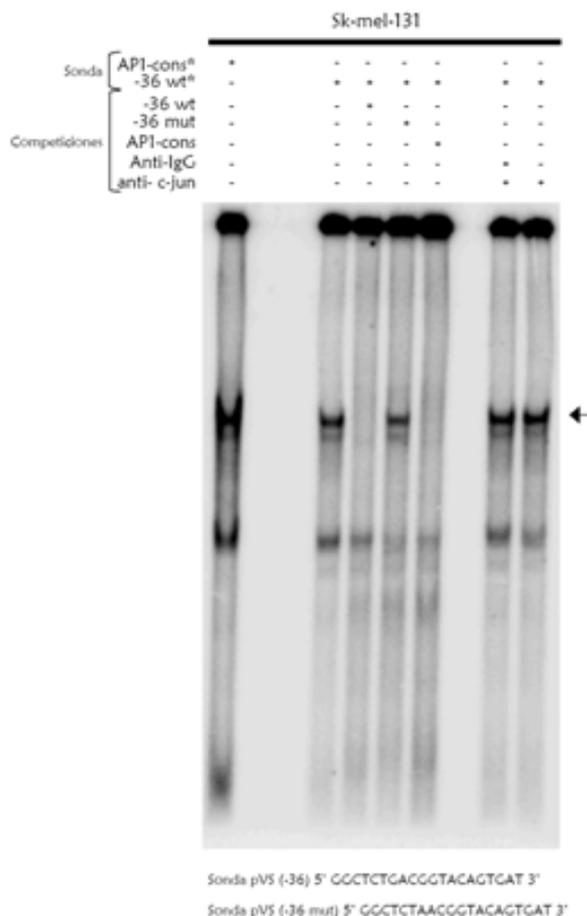


Figura 35: **c-Jun no forma parte del complejo de unión a la región -36 del promotor de VS humano en las células de melanoma humano.** 10µg de extracto nuclear de la línea celular SK-mel-131 se incubaron con 100000cpm de oligonucleótido específico de doble cadena marcado radiactivamente (*) (oligonucleótido -36). La especificidad del complejo se comprobó mediante competición con el mismo oligonucleótido sin marcar, oligonucleótido consenso para AP-1 u oligonucleótido mutado para cada una de las secuencias. Para esto añadimos a la reacción oligonucleótido de doble cadena sin marcar 50 veces más concentrado. La presencia en el complejo de ADN-proteína de c-jun se detectó por medio de la adición de 3µg de anticuerpo específico anti-c-jun, como control se añadieron 3µg de IgG no específicas. Los complejos ADN-proteína fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida al 5% en condiciones no desnaturizantes.

Hemos visto que la inhibición de las quinasas JNK sólo es capaz de inhibir el 30% de la actividad del promotor largo (pGL2-pVS-626) y el 50% de la actividad del promotor pVS-120. Sabemos que no es c-jun el responsable de esta inhibición, ya que no somos capaces de identificar su unión a la caja de reconocimiento de AP-1 del promotor de VS humano.

Nos planteamos entonces hacer ensayos con inhibidores de las distintas cascadas de señalización intracelulares, para así poder determinar cual era la vía de señalización que estaba involucrada en la regulación de la actividad del promotor de versicano en el contexto de las líneas celulares de melanoma humano.

Para ello, realizamos transfecciones transientes de las construcciones pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-467 y pGL2-pVS-120, en la línea celular SK-mel-131. Seis horas antes de recoger los extractos celulares tratamos las células con los distintos inhibidores en medio sin FCS:

- Mithramycina: Inhibidor específico de la fosforilación de Sp1.
- SB 203580: Inhibidor de la p38.
- Wortmannina: Inhibidor específico de la PI3K.
- PD 098059: Inhibidor específico de la MAPKK, p42/44.
- Como control añadimos al medio el solvente de los distintos inhibidores (DMSO).

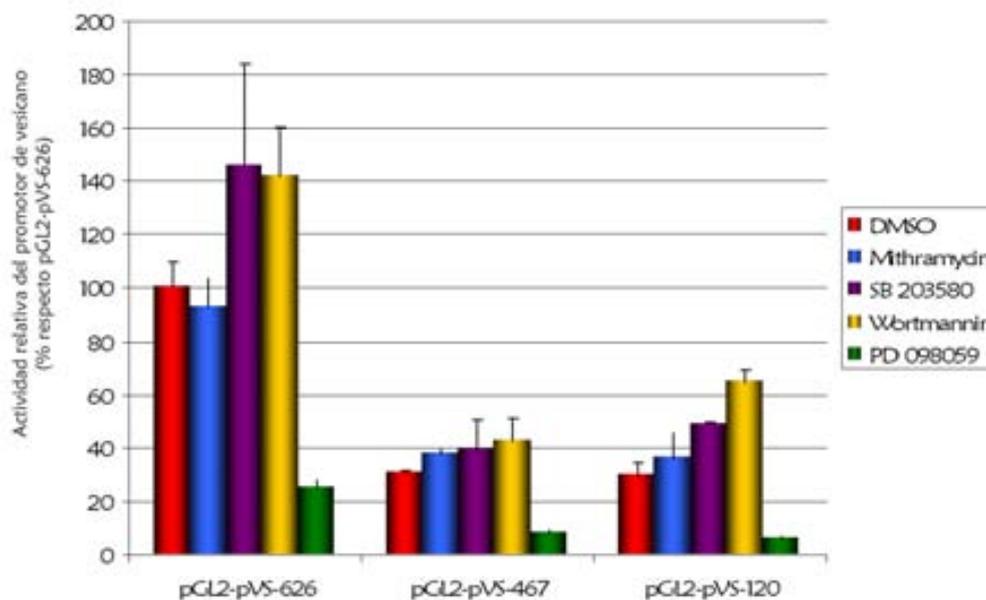


Figura 36: **La actividad MAPK es importante en la regulación de la actividad del promotor de VS en la línea celular SK-mel-131.** Análisis de la actividad relativa del promotor de VS. Transfectamos de forma transiente las células de melanoma humano SK-mel-131 con 1µg de las construcciones pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-467, pGL2-pVS-120 y 100ng del vector pRL-TK como control de transfección. 4 horas antes de recoger los extractos, las células se trataron en medio sin FCS con los distintos inhibidores: 40mM del inhibidor PD 98059 (verde), 100nM del inhibidor Mythramycin (azul), 20µM del inhibidor SB 203580 (morado) y 210nM de Wortmannin (amarillo), como control se añadió 1.5µl/ml DMSO (0.15%) (rojo). Los resultados se muestran como el incremento de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-626. Se muestra un experimento de 3 realizados de manera independiente.

Como se observa en la figura 36, hay un efecto drástico sobre la actividad relativa del promotor de versicano al añadir al medio el inhibidor de la MAPK, PD098059. Este efecto se observa en la actividad de todas las construcciones del promotor de VS. Esto sugiere que la activación de la vía de las MAPK es esencial para la actividad del promotor de VS y que ésta ejerce su función principalmente a través de los últimos 120 pares de bases de dicho promotor. Es interesante notar que el efecto observado con este inhibidor se parece mucho al efecto que tuvo la mutación específica de la caja de reconocimiento para AP-1 sobre la actividad del promotor de VS.

En cuanto al efecto de los demás inhibidores, podemos decir que tanto la Wortmanina como el inhibidor de la p38, SB 203580, inducen un pequeño aumento en la actividad relativa del promotor de VS, en tanto que la Mitramicina parece no tener ningún efecto sobre dicha actividad.

PAPEL DE LA REGIÓN CENTRAL DEL PROMOTOR DE VERSICANO EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ESTE PROMOTOR EN LAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO SK-MEL-131 Y MEWO.

AP-2 α (*Activating enhancer-binding protein 2 alpha*) es una proteína de 52kDa que se une como homodímero al ADN en las secuencias consenso GCCNNNGGC. Se ha demostrado que el factor de transcripción AP-2 α se expresa en tejidos de origen ectodérmico, es indispensable durante el desarrollo embrionario de las células de la cresta neural, la progresión del melanoma y se le ha relacionado estrechamente con la apoptosis y la inhibición del crecimiento (Nottoli *et al.*, 1998; Bar-Eli, 1999; Hilger-Eversheim *et al.*, 2000).

Por otra parte, Sp1 pertenece a una familia de factores de transcripción caracterizada por una región de unión a ADN muy conservada que contiene 3 dedos de zinc. Dicha familia incluye a las proteínas Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4, que regulan la expresión constitutiva basal de genes involucrados en diferentes actividades tanto en el tejido normal como en el canceroso (Black *et al.*, 2001; Safe and Abdelrahim, 2005).

Mediante el análisis *in silico* determinamos la presencia de un gran número de secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción Sp1 y AP-2. Curiosamente, todas estas secuencias se encontraban tan sólo en la región central del promotor, entre los pares de bases -467 y -120. Anteriormente se había descrito que ambos factores de transcripción podrían regular la transcripción de algunos genes de manera conjunta, siendo la ratio Sp1/AP-2 lo que determinase la actividad de la célula en cada momento. Por todo esto nos planteamos determinar el papel que jugaban todas estas secuencias de reconocimiento en la expresión de VS.

De forma paralela a los experimentos descritos anteriormente, realizamos el análisis de la región central de este promotor. En primer lugar determinamos la presencia de Sp1 y AP-2 en extractos nucleares de las células SK-mel-131 y MeWo mediante Western Blot.

Separamos las proteínas de los extractos nucleares de ambas líneas celulares en SDS-PAGE al 6% y posteriormente incubamos con anticuerpos específicos para cada una de las proteínas

que queríamos detectar. Como se puede observar en la figura 37 fuimos capaces de detectar la presencia tanto de Sp1 como de AP-2 α en ambas líneas celulares.

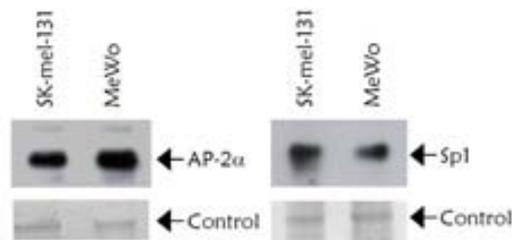


Figura 37: **Las líneas de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo producen AP-2 α y Sp1.** 30 μ g de extractos nucleares de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 y MeWo fueron separados en SDS-PAGE al 6%. La detección se realizó con anticuerpos comerciales específicos para AP-2 α (1:1000) y Sp1 (1:2000). Como control de carga se muestra la tinción con Coomassie de las membranas transferidas.

Una vez determinada la presencia de estos factores de transcripción en nuestras líneas celulares, decidimos realizar ensayos de EMSA para algunas de las regiones de unión a Sp1 y AP-2 del promotor de versicano. Como las secuencias de unión para estos factores de transcripción son muy parecidas, e incluso en algunos casos se encuentran solapadas entre sí, en estos ensayos utilizamos además la línea celular humana de carcinoma hepático Hep-G2; como no expresa AP-2 (Fig. 38) (Johnson *et al.*, 1997), la utilizamos como un control para poder discernir entre las uniones específicas de Sp1 y de AP-2 a los oligonucleótidos ensayados.

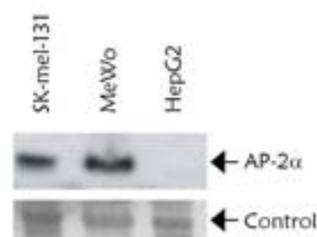


Figura 38: **Las líneas de melanoma humano SK-mel-131, MeWo y Hep-G2 producen AP-2 α y Sp1.** 30 μ g de extractos nucleares de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131, MeWo y Hep-G2 fueron separados en SDS-PAGE al 6%. La detección se realizó con anticuerpos comerciales específicos para AP-2 α (1:1000). Como control de carga se muestra la tinción con Coomassie de las membranas transferidas.

Hibridamos los extractos nucleares de las líneas celulares de melanoma SK-mel-131 y MeWo, y de la línea celular Hep-G2 con oligonucleótidos de doble cadena específicos para las cajas de unión a Sp1/AP-2, -428, -352 y -225, del promotor de VS humano marcados radiactivamente. Separamos posteriormente los complejos ADN-proteína en geles de acrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes. Para determinar la especificidad de los complejos

formados, realizamos competiciones específicas con oligonucleótidos no marcados, competición con el mismo oligonucleótido y competición con los oligonucleótidos consenso para Sp1 y AP-2. Como se muestra en la figura 39, fuimos capaces de detectar dos complejos específicos formados en las tres líneas celulares ensayadas, aunque siempre el complejo de mayor intensidad era el formado en la línea celular SK-mel-131.

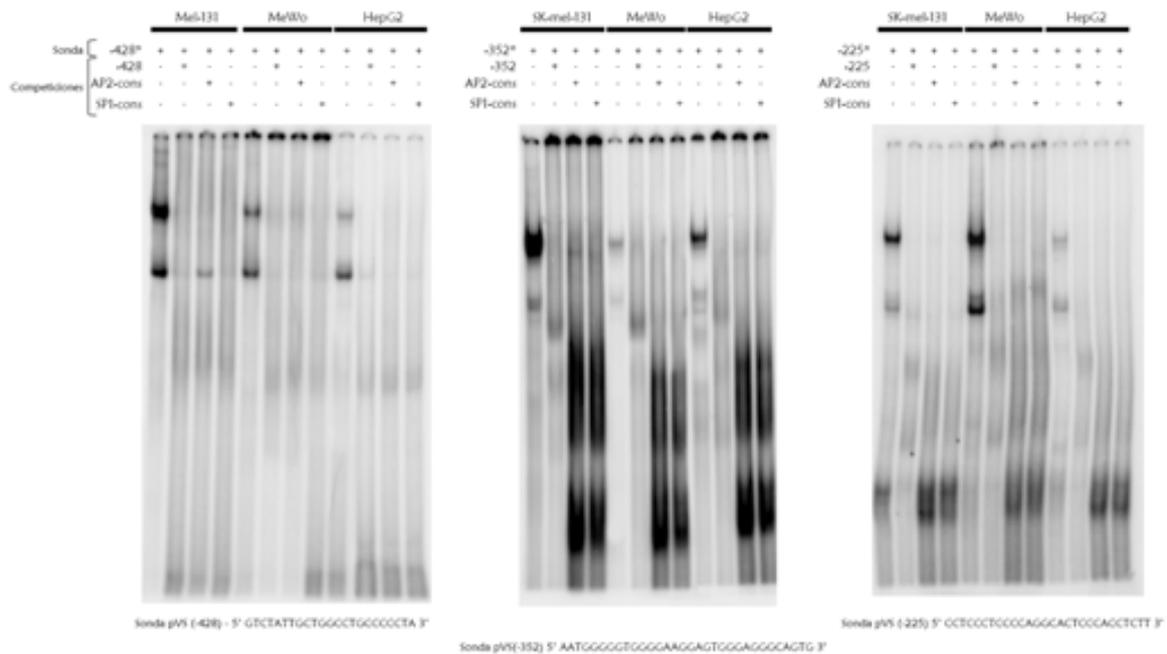


Figura 39: Formación de complejos ADN-proteína específicos en las secuencias de reconocimiento para Sp1 y AP-2 del promotor de VS humano en las células de melanoma humano. 10µg de extracto nuclear de las líneas celulares SK-mel-131, MeWo y Hep-G2 se incubaron con 100000cpm de los distintos oligonucleótidos específicos de doble cadena marcados radiactivamente (*) (oligonucleótido -428; oligonucleótido -352; oligonucleótido-225). La especificidad del complejo se comprobó mediante competición con el mismo oligonucleótido sin marcar y con oligonucleótidos consenso para Sp1 y AP-2, para esto añadimos a la reacción oligonucleótido de doble cadena sin marcar 50 veces más concentrado. Los complejos de ADN-proteína fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida al 5% en condiciones no desnaturizantes.

Para determinar la presencia de los factores de transcripción Sp1 y AP-2 en los complejos formados competimos las uniones a los oligonucleótidos en la línea celular SK-mel-131 con anticuerpos específicos para ambos factores de transcripción.

Como se muestra en la figura 40, al añadir el anticuerpo específico para Sp1 en la reacción, la intensidad de los complejos formados baja con respecto a la unión sin anticuerpo y además somos capaces de detectar un complejo de mayor tamaño, el cual estaría formado por el oligonucleótido, las proteínas nucleares del extracto y el anticuerpo específico para este factor de transcripción (*super shift*). Podemos observar que al añadir a la reacción el anticuerpo específico contra AP-2 no somos capaces de desplazar dicha unión.

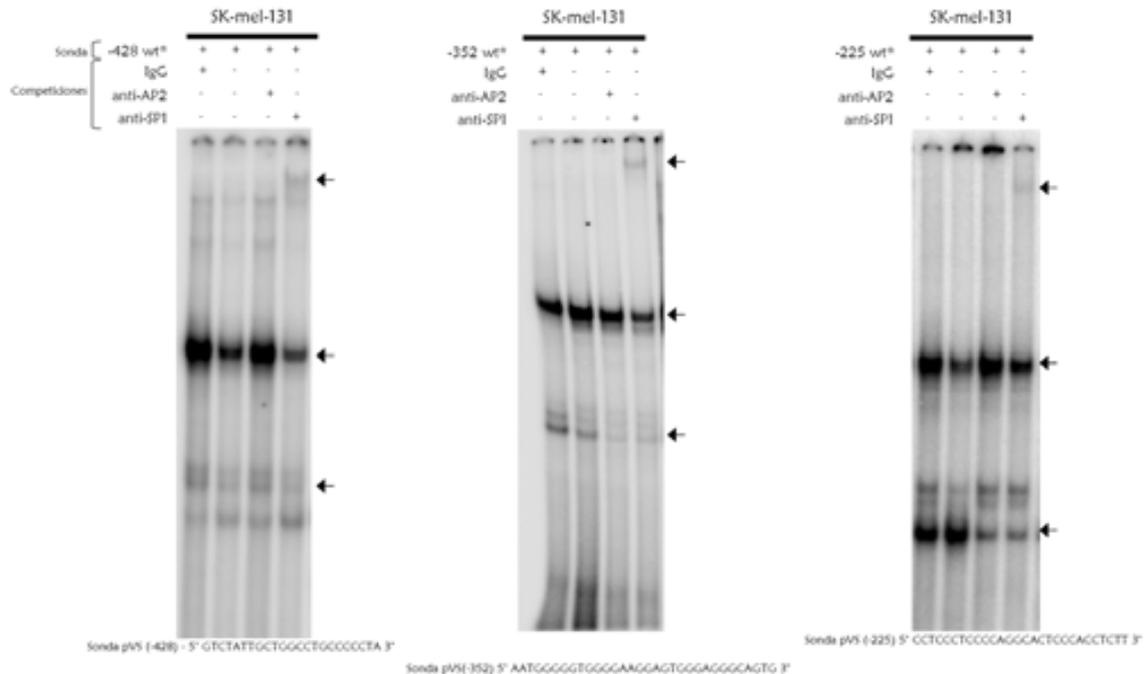


Figura 40: **Sp1 se une de manera específica al promotor de VS humano en las células de melanoma humano.** 10 μ g de extracto nuclear de la línea celular SK-mel-131 se incubaron con 100000cpm de los distintos oligonucleótidos específicos de doble cadena marcados radiactivamente (*) (oligonucleótido -428; oligonucleótido -352; oligonucleótido -225). La presencia en el complejo de ADN-proteína de Sp1 o AP-2 se detectó por medio de la adición de 3 μ g de anticuerpo específico contra cualquiera de estas dos proteínas, como control se añadieron 3 μ g de IgG no específicas. Los complejos ADN-proteína fueron separados por electroforesis en gel de acrilamida al 5% en condiciones no desnaturalizantes. Las flechas señalan los complejos de unión ADN-proteína y el super shift generado en cada caso.

Por lo tanto, podemos concluir de estos experimentos que Sp1 se une de manera específica a las secuencias de reconocimiento del promotor de VS, -428, -352 y -225, en las células de melanoma humano. La existencia de complejos de diferentes tamaños se puede deber a que los complejos formados pueden tener diferentes componentes de los miembros de la familia de Sp1 u otros factores de transcripción como el propio AP-2.

Una vez determinamos la unión de Sp1 al promotor de VS, nos planteamos generar diversos mutantes de delección de la región central del promotor de VS a partir de la construcción pGL2-pVS-626, para visualizar el papel que éstos jugaban en la actividad del promotor. Así obtuvimos 3 construcciones nuevas: pGL2-pVS-361, pGL2-pVS-256 y pGL2-pVS-178 (Fig. 41). Al final tuvimos 5 construcciones: la construcción -467, la que tendría toda la región central del promotor de VS; la construcción -361, a la que le haría falta las secuencia de -428; la construcción -256, en donde no se encuentra la secuencia de unión para Sp1 -356; la construcción -178, en la que no esta presente la secuencia de unión -225, y por último la construcción -120, la que no tendría ninguna de las secuencias de unión para Sp1 o AP-2.

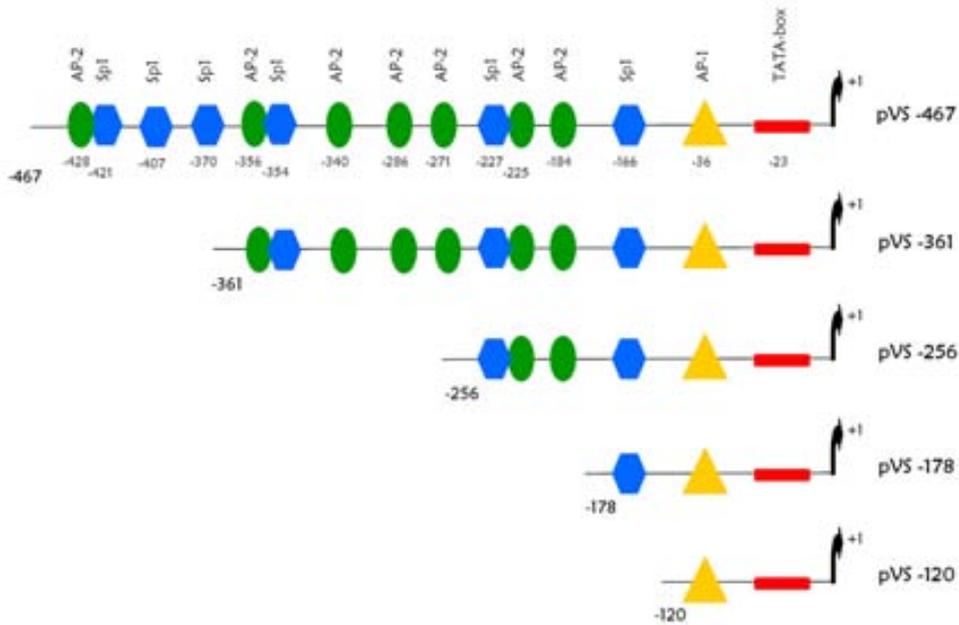


Figura 41: **Esquema de las mutantes de delección para la región Sp1/AP-2 del promotor de VS humano.** Se muestran de manera esquemática las cajas de reconocimiento para los diferentes factores de transcripción: AP-2 ●, Sp1 ● y AP-1 ▲ y su localización.

Transfectamos de manera transiente cada una de las construcciones obtenidas pGL2-pVS-467, pGL2-pVS-361, pGL2-pVS-256, pGL2-pVS-178 y pGL2-pVS-120, en las líneas celulares de melanoma humano con diferente grado de diferenciación SK-mel-131 y MeWo.

Como podemos observar en la figura 42, al transfectar cada una de las mutantes de delección en la línea celular MeWo, la actividad relativa de las construcciones no varía de forma significativa.

Observamos en la línea celular SK-mel-131 que la delección que tiene un efecto significativo en la actividad del promotor de VS es aquella del fragmento -467/-361, donde se localiza la secuencia de reconocimiento -428.

Sin embargo, sabemos que Sp1 se une también a las secuencias -352 y -225, pero las delecciones de estas zonas del promotor no parecen tener un gran efecto en su actividad. Podríamos teorizar que estas zonas de reconocimiento funcionan como secuencias de modulación fina en la expresión de VS.

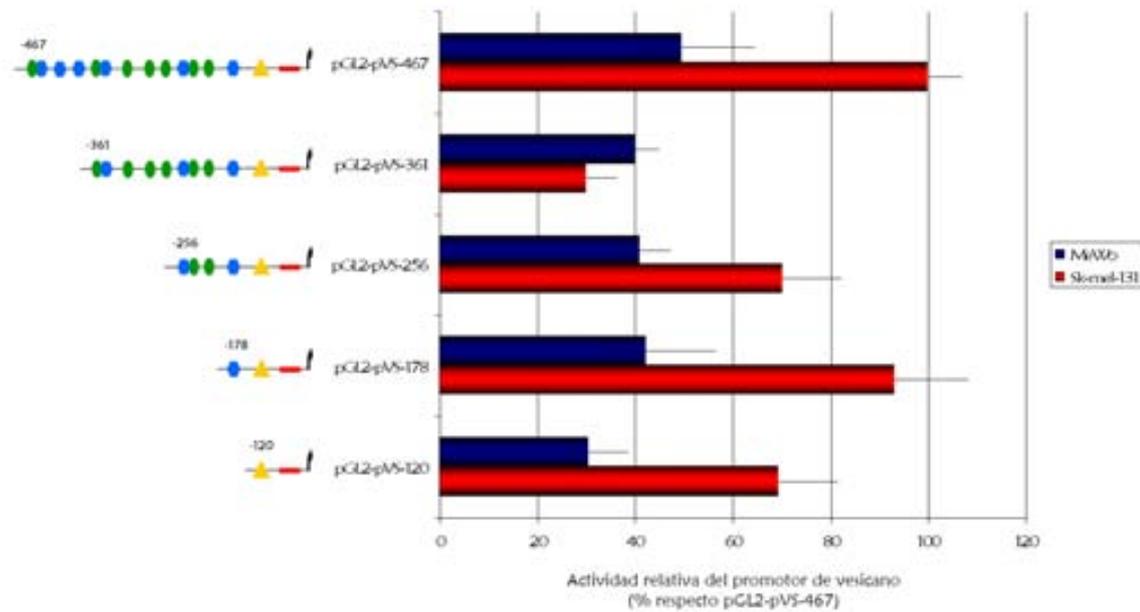


Figura 42: Efecto de las diferentes deleciones de la región central del promotor de VS en las líneas celulares de melanoma humano productoras y no productoras de este proteoglicano. Análisis de la actividad del promotor de VS humano. Transfección transiente de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 (rojo) y MeWo (azul) con las construcciones del promotor de VS: pGL2-pVS-467, pGL2-pVS-361, pGL2-pVS-256, pGL2-pVS-178 y pGL2-pVS-120. La actividad de luciferasa se midió después de 24 horas de la transfección. Se utilizó 1µg de ADN de cada construcción y 100ng del plásmido pRL-TK como control de la transfección. Los resultados se muestran expresados en porcentaje de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-467. Se muestran los resultados de un experimento de 8 realizados de forma independiente.

ACCIÓN DE LAS DELECCIONES DEL PROMOTOR DE VERSICANO SOBRE SU ACTIVIDAD EN OTRAS LÍNEAS CELULARES.

Nuestros resultados muestran que en las células de melanoma humano: la secuencia de reconocimiento para AP-1 localizada en el lugar -36 del promotor es la responsable de la actividad basal de VS, TCF-4 un activador fuerte responsable de más del 50% de la actividad total del promotor y Sp1 un modulador o quizás regulador de respuesta rápida de este proteoglicano.

Nos planteamos ver si el comportamiento del promotor de VS en otros contextos celulares era el mismo o podía obedecer a patrones de regulación distintos. En cada tipo celular la expresión de una misma proteína se regula de formas distintas, por lo tanto, las cascadas de señalización y la consiguiente activación de los distintos factores de transcripción variarán y esto nos llevaría a pensar que en otros tipos celulares el papel que juegan los distintos factores de transcripción, que nosotros hemos identificado para la expresión de VS, pueden no ser los mismos.

Con este fin, hemos analizamos la expresión de VS en líneas celulares humanas con distintos orígenes tumorales: RWP-1 de carcinoma pancreático, U-251 de astrocitoma y Hep-G2 de carcinoma hepático. Determinamos mediante Western Blot la presencia de este proteoglicano en medios condicionados de las líneas celulares antes mencionadas. De esta manera pudimos determinar que todas las líneas celulares expresaban altos niveles de este proteoglicano (dato no mostrado).

Una vez determinada la expresión de VS en las líneas celulares, para poder determinar el papel que cada una de las regiones del promotor jugaba en los distintos contextos celulares, decidimos transfectar de forma transiente en las líneas celulares SK-mel-131, MeWo, RWP-1, U-251 y HEP-G2, todas las construcciones del promotor de VS que habíamos obtenido: pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-518, pGL2-pVS-467, pGL2-pVS-361 pGL2-pVS-256, pGL2-pVS-178, y pGL2-pVS-120 (Fig. 43)

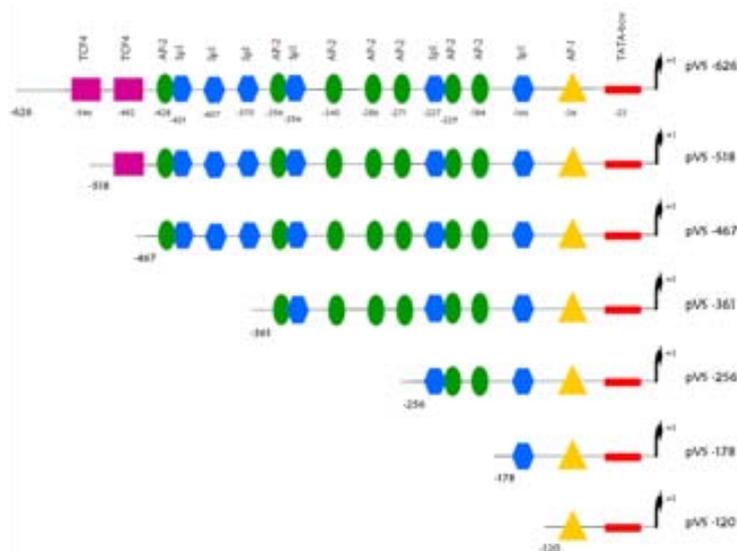


Figura 43: **Diagrama esquemático de todas las construcciones del promotor de VS humano generadas para este trabajo.** Se muestra la ubicación en el promotor de VS de las cajas de reconocimiento para los diversos factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de este proteoglicano (TCF-4 (caja rosa), AP-2 (círculo verde), Sp1 (círculo azul) y AP-1 (triángulo amarillo)).

Como podemos ver en la figura 44, el comportamiento de la actividad del promotor de VS en cada una de las líneas celulares es diferente. Al transfectar de forma transiente la línea celular de carcinoma pancreático RWP-1 (barras amarillas) pudimos observar que la actividad máxima del promotor se obtenía al transfectar la construcción pVS-518 y no la pVS-626, como habíamos observado en la línea SK-mel-131. La baja actividad de esta última (pVS-626) en comparación con la pVS-518 nos dice que en el fragmento entre -626 y -518 debe de encontrarse una secuencia de unión para un represor; es por eso que al quitar esta secuencia observamos el aumento de la actividad. Entre la construcción -518 y -467 hay una diferencia del 40%, como sabemos que en estas células se encuentra activa la vía TCF-4/ β -catenina, podemos hipotetizar

que este 40% de actividad podría deberse a la acción de esta vía sobre el promotor. En el resto de las construcciones podemos observar una disminución paulatina a medida que vamos eliminando fragmentos del promotor. Podemos observar que en este caso, la zona central del promotor juega un papel más importante en la regulación de la actividad del promotor que en las células SK-mel-131, ya que esa región (entre -467 y -120) es responsable del 60% de la actividad total del mismo. En el fragmento de 120pb más cercano al promotor sólo reside el 10% de la actividad total.

En el caso de la línea celular U-251 observamos que la actividad máxima se encuentra en las construcciones pVS-626 y pVS-256 (Fig. 44, barras lilas) y que la actividad mínima del promotor se encuentra en la construcción pVS-361.

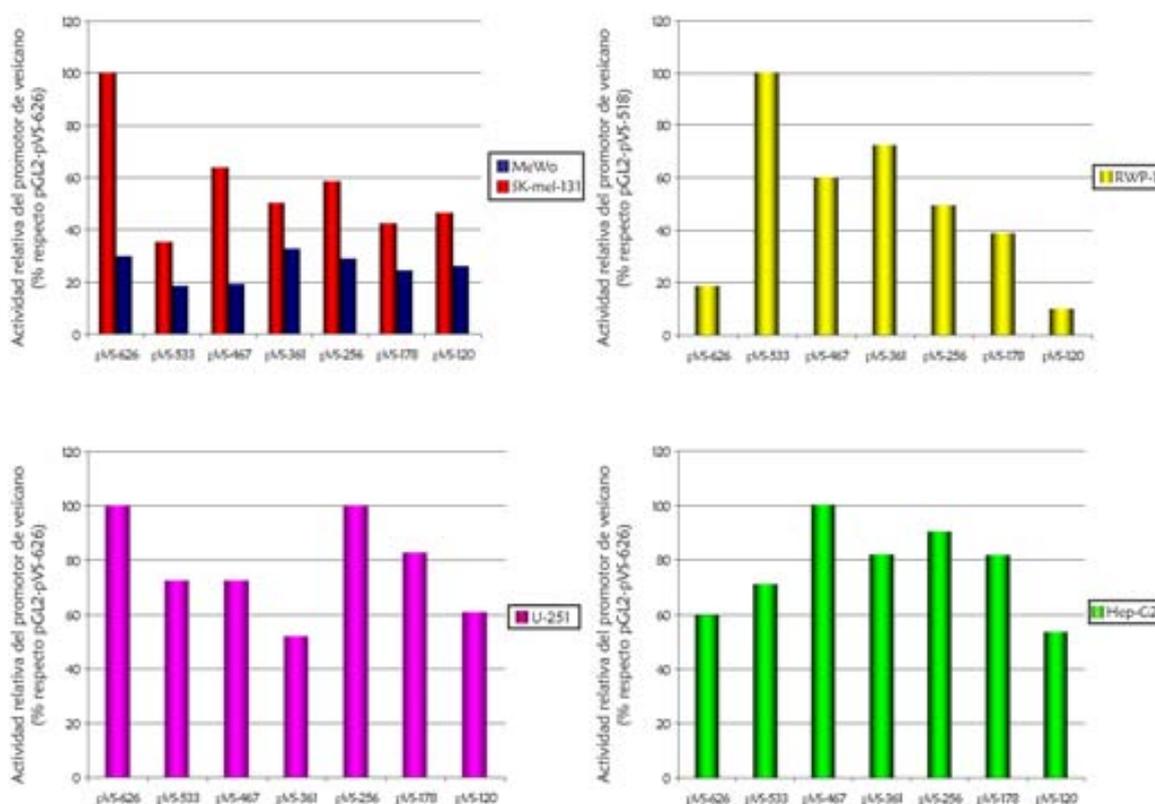


Figura 44: **Análisis del efecto de las diferentes deleciones del promotor de VS en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo, RWP-1, U-251 y Hep-G2.** Análisis de la actividad del promotor de VS humano. Transfección transiente de las líneas celulares de melanoma humano SK-mel-131 (rojo) y MeWo (azul), la línea celular de carcinoma de páncreas humano RWP-1 (amarillo), la línea celular de astrocitoma humano U-251 (lila), y la línea celular de carcinoma hepático humano Hep-G2 (verde), con las diferentes construcciones del promotor de versicano: pGL2-pVS-626, pGL2-pVS-518, pGL2-pVS-467, pGL2-pVS-361, pGL2-pVS-256, pGL2-pVS-178 y pGL2-pVS-120. La actividad de luciferasa se midió después de 24 horas de la transfección. Se utilizó 1µg de ADN de cada construcción y 100ng del plásmido pRL-TK como control de la transfección. Los resultados se muestran expresados en incrementos de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector con mayor expresión. Se muestran los resultados de un experimento de 3 realizados de forma independiente.

En el caso de la línea celular Hep-G2, observamos que la zona central del promotor tiene una gran importancia, ya que la actividad máxima la encontramos en la construcción pVS-467; el

fragmento entre -467 y -120 en esta línea celular es responsable del 50% de la actividad total del promotor (Fig. 44, barras verdes). En este caso hemos determinado la unión específica de Sp1 a las secuencias -428, -352 y -225 (Fig. 39). En cuanto al extremo 5' del promotor, en esta línea celular parece una vez más ser regulado por un represor. En este caso desconocemos el estado de activación de la vía TCF-4/ β -catenina, así que no podemos descartar que en esta línea celular dicha vía este poco activada y eso se traduzca en la falta de protagonismo de TCF-4 en la regulación de VS.

Con estos resultados queremos mostrar que la regulación de la expresión de VS difiere según el contexto celular en el que se encuentre. Aunque en las células de melanoma humano SK-mel-131 parece ser que la regulación vía Sp1 es sólo de un 10%, en otros contextos como por ejemplo en RWP-1 o Hep-G2 parece tener mayor relevancia. Al igual que en otros contextos diferentes, la gran cantidad de sitios de reconocimiento para AP-2 podrían regular la expresión de este proteoglicano, por ejemplo durante el desarrollo, así como otros factores de transcripción, como por ejemplo Smad, NF κ B, etc., que también tienen sitios de reconocimiento en el promotor.

TGF- β AUMENTA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE VERSICANO EN LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO SK-MEL-131.

TGF- β es un factor de crecimiento involucrado en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la producción de componentes de la MEC como por ejemplo algunos proteoglicanos. Inicialmente el TGF- β se describió como un inhibidor del crecimiento celular en condiciones normales; ahora con el tiempo se ha generado cada vez mayor evidencia del papel que éste juega en la progresión tumoral en general, y en particular en el melanoma. Hay trabajos en los cuales se describe la expresión de TGF- β por parte de las células transformadas y esta expresión contribuye a aumentar la proliferación celular, la migración, la invasión y la metástasis de dichas células, además de ayudar a disminuir la respuesta inmune que el huésped genera (Kaminska *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio se había descrito anteriormente como la adición de TGF- β al medio aumentaba la expresión de proteoglicanos en las líneas celulares de melanoma humano (Heredia *et al.*, 1996b). Así, decidimos determinar el papel que este factor de crecimiento podría jugar en la regulación de la actividad del promotor de VS en la línea celular de melanoma humano SK-mel-131. Con este fin, decidimos transfectar de forma transiente la construcción del promotor de VS, pGL2-pVS-626, en la línea celular SK-mel-131, añadiendo al medio TGF- β .

Este estudio preliminar indica que TGF- β tienen un efecto positivo sobre la actividad del promotor de VS, ya que al añadir este factor de crecimiento en el medio somos capaces de aumentar en un 20% la actividad de dicho promotor (Fig. 45).

Este resultado, aunque requiere de un estudio más detallado, nos abre un camino para ahondar en el mecanismo mediante el cual TGF- β es capaz de inducir este aumento en la actividad del promotor de VS en las células de melanoma, y así poder determinar si este efecto es mediado por el sitio de reconocimiento para Smad3/4 de dicho promotor.

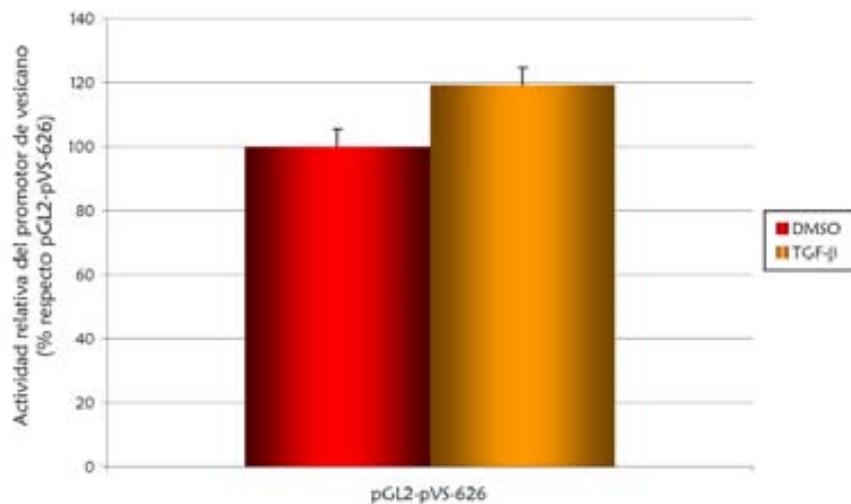


Figura 45: **Efecto de TGF- β en la actividad del promotor de VS.** Análisis de la actividad relativa del promotor de VS. Transfectamos de forma transiente las células de melanoma humano SK-mel-131 con 1 μ g de las construcciones pGL2-pVS-626 y 100ng del vector pRL-TK como control de transfección. 4 horas antes de recoger los extractos las células se trataron en medio sin FCS con 200pM TGF- β (naranja), como control se añadió 1.5 μ l/ml DMSO (0.15%) (rojo). Los resultados se muestran como el incremento de la actividad luciferasa/renilla con respecto a la del vector pGL2-pVS-626. Se muestra un experimento de 2 realizados de manera independiente.

Discusión

El presente trabajo se divide en dos partes bien diferenciadas pero relacionadas estrechamente entre sí. La primera de ellas se basa en un análisis de la expresión de las isoformas de versicano en las células de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación, y cómo esta expresión correlaciona de manera inversa con el grado de diferenciación de las mismas. Este hecho parece ser común a los tumores derivados de células con el mismo origen embrionario, como se demuestra en los análisis preliminares realizados en células de neuroblastoma y astrocitoma.

La segunda parte es un análisis de la regulación, en este mismo contexto celular, de la expresión de versicano, del cual concluimos que los principales factores involucrados en la expresión de este proteoglicano son AP-1, TCF-4 y Sp1.

LA EXPRESIÓN DE VERSICANO Y SU CORRELACIÓN CON LA REGRESIÓN DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO A UN ESTADO DESDIFERENCIADO.

Desde hace tiempo es aceptado que durante el proceso de progresión tumoral, a lo largo del cual las células adquieren una mayor capacidad proliferativa y migratoria, se produce una regresión de las mismas hacia un fenotipo indiferenciado. La correlación entre la progresión tumoral y la desdiferenciación no es siempre un fenómeno lineal y homogéneo, es decir, en un mismo tumor podemos encontrar células que se encuentran en diversos estados de diferenciación. Esto es debido a que las células al transformarse no están sincronizadas y además el entorno de cada célula, dentro del tumor, no es el mismo (Albino *et al.*, 1984). No expresará las mismas moléculas una célula que se encuentra en el frente invasivo de un tumor, que una que se encuentra rodeada de células tumorales y en el centro del tumor.

En el melanoma, el proceso de desdiferenciación que sufren los melanocitos cuando éstos se transforman en células neoplásicas ha sido caracterizado en base a la morfología y fisiología de estas células. Esto ha permitido relacionar el grado de diferenciación de las células de melanoma con la expresión o la represión de algunas moléculas de superficie o antígenos (Houghton *et al.*, 1982; Albino and Houghton, 1985). Las líneas celulares utilizadas en el presente estudio han sido caracterizadas como células con grado de diferenciación temprano, intermedio o tardío, en base a diferencias fenotípicas, tasa de crecimiento, morfología, expresión diferencial de antígenos de superficie, expresión de glicoproteínas, actividad tirosinasa y la pigmentación que presentan estas células (Houghton *et al.*, 1982). En este sentido, se ha propuesto que estos tres grados de diferenciación descritos se corresponderían con las características que durante el desarrollo embrionario presentan los melanocitos normales. De esta manera un melanocito indiferenciado o fetal se correlacionaría con una célula de melanoma indiferenciada; el primero se encontraría en

las primeras etapas del desarrollo y la segunda se encontraría en las fases más tardías de la progresión tumoral (Fig. 46).

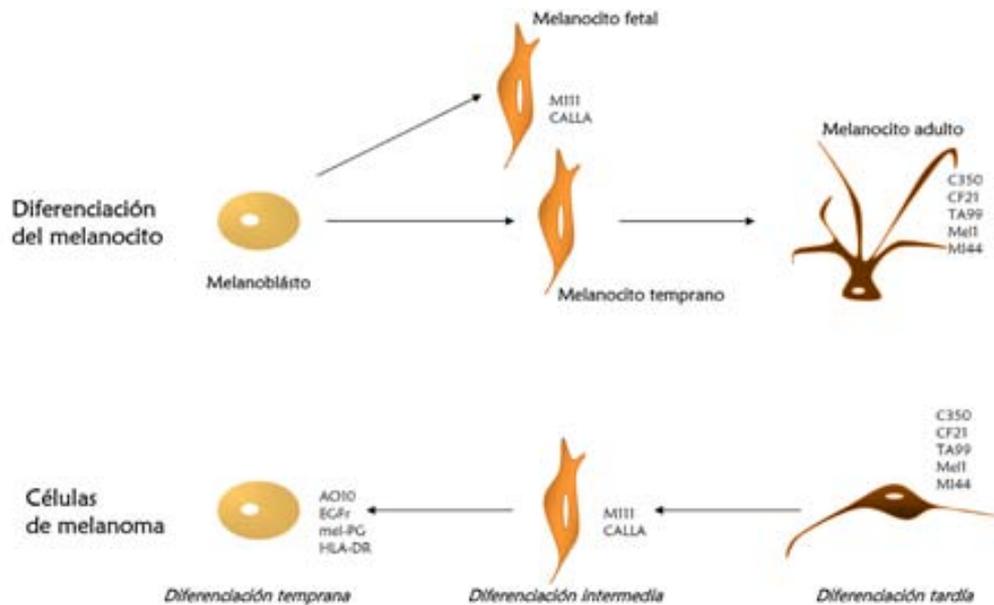


Figura 46: **Vía propuesta de diferenciación del melanocito según su fenotipo de marcadores de superficie celular y su morfología.** El fenotipo de las células de melanoma que corresponderían a las etapas temprana, intermedia o tardía, también está ilustrado. En este esquema como marcadores tempranos estarían AO10, EGFr, mel-PG y HLA-DR; como marcadores intermedios, M111 y CALLA, y como marcadores tardíos, C350, CF21, TA99, Mel I y MI44 (adaptado de Houghton *et al.*, 1982).

El proteoglicano específico de melanoma (mel-PG), el cual ha sido propuesto como marcador diagnóstico para esta enfermedad, es producido por las líneas celulares de melanoma indiferenciadas (Fig. 10). En nuestro laboratorio determinamos la expresión de versicano como un nuevo marcador de malignidad en lesiones melanocíticas *in vivo* (Touab *et al.*, 2002; Touab *et al.*, 2003), ya que en nevus melanocíticos benignos no se observa inmunoreacción para versicano; mientras que ésta es positiva en nevus displásicos, estando directamente correlacionada la expresión de versicano con el grado de atipia de las lesiones, y en el caso de los melanomas malignos la reacción es intensamente positiva (Touab *et al.*, 2003). Este hallazgo corroboraría la hipótesis de la existencia de un proceso de progresión tumoral, en el cual el nevus displásico constituiría la fase precursora del melanoma maligno (Meier *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, nos planteamos como objetivo el análisis de la relación existente entre la expresión de VS y sus isoformas y el grado de diferenciación de las células de melanoma humano.

Nuestros resultados muestran que las líneas celulares con grado de diferenciación tardío, SK-mel-23, MeWo y DX2, no producen ninguna de las isoformas de VS. Las líneas de

diferenciación temprana, SK-mel-1.36-1-5, SK-mel-37 y Rider, producen las 4 isoformas, y la línea celular SK-mel-3.44, de diferenciación intermedia, sólo expresa tres de las cuatro isoformas, V0, V1 y V3, tal y como se muestra mediante el análisis de RT-PCR (Fig. 12) y Northern Blot (Fig. 13).

Mediante el análisis cuantitativo de la expresión de las isoformas de VS (Northern Blot), pudimos determinar que las isoformas V0 y V1 eran las más abundantes en las líneas celulares indiferenciadas. Es importante hacer notar que, en las líneas celulares indiferenciadas, el nivel de expresión de V2 es menor que el de las isoformas V0 y V1, ya que el tiempo de exposición requerido para obtener una intensidad de banda similar fue considerablemente más largo en el caso de V2 (Fig. 13). Más aún, no fue posible detectar ninguna banda correspondiente a V2 en los ensayos de Western Blot, a pesar de que nuestro anticuerpo reconoce una banda similar a V2 en extractos de encéfalo bovino (datos no mostrados). La isoforma más pequeña de VS, V3, fue detectada por RT-PCR, pero no mediante Northern Blot.

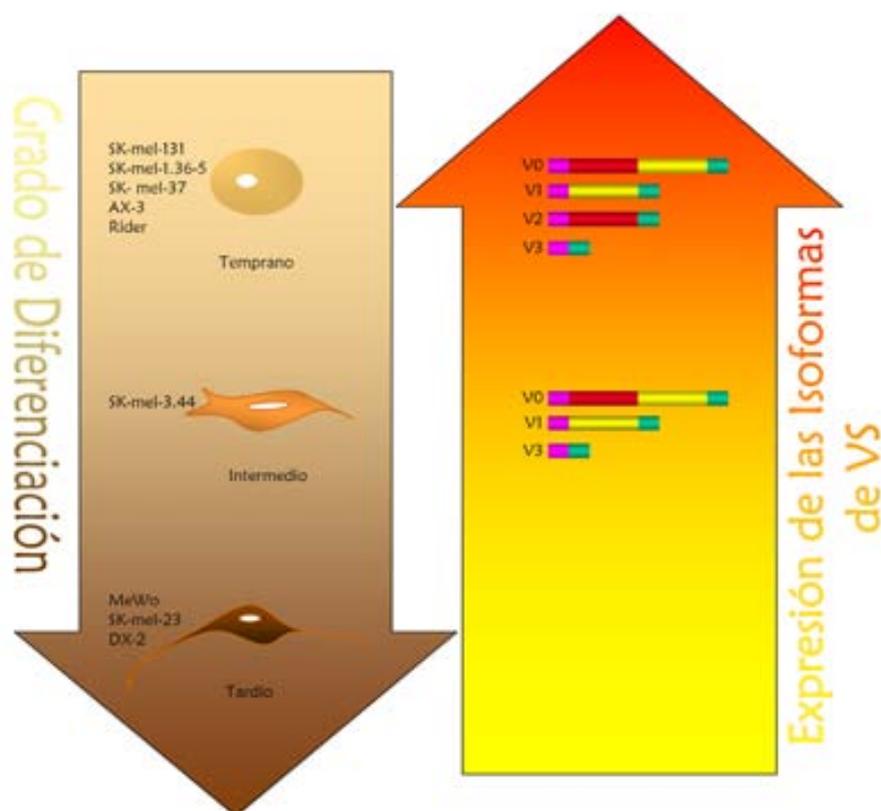


Figura 47: El grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma correlaciona de manera inversa con el patrón de expresión de las isoformas de VS. Modelo propuesto de la relación entre la expresión de las isoformas de VS en nuestro panel de líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación. Las líneas celulares de diferenciación tardía no expresan ninguna de las isoformas de VS, mientras que las líneas celulares más indiferenciadas expresan todas las isoformas de este proteoglicano.

Estos resultados nos permiten concluir que la pérdida del estado diferenciado por parte de las células de melanoma, y su subsiguiente transición hacia un grado de indiferenciación mayor durante el proceso de progresión tumoral, se ve acompañado de la inducción de la

expresión de las diferentes isoformas de VS. De las diferencias observadas entre las líneas de diferenciación intermedia o temprana, podría sugerirse que en este proceso de diferenciación las isoformas V0, V1 y V3 se expresan primero en el tiempo, mientras que la isoforma V2 lo haría posteriormente (Fig. 47).

En el desarrollo embrionario la expresión de VS es regulada de manera exquisita, ya que durante este proceso las isoformas de VS se expresan de forma diferencial. Por ello se ha propuesto que cada isoforma jugaría un papel específico en cada una de las fases de este proceso. Así, en la fase temprana del desarrollo del sistema nervioso central (SNC) se expresa principalmente la isoforma V0, mientras que en el adulto la isoforma más abundante es V2 (Milev *et al.*, 1998; Bandtlow and Zimmermann, 2000). Nosotros hemos podido detectar, en las líneas celulares de melanoma humano indiferenciadas, la presencia de ambas isoformas.

Nuestros resultados acerca de la expresión de las isoformas de VS sugieren la existencia de un camino de regresión en el patrón de expresión, ya que las células vuelven a expresar la isoforma V2, la cual se relaciona casi exclusivamente con el SNC adulto, y las isoformas V0 y V1, relacionadas con el estado más temprano del desarrollo del SNC. Hay que recordar que los melanocitos se originan en la cresta neural.

Todas las isoformas de VS comparten los mismos dominios N- y C-terminales. Sin embargo, la región central o dominio G2, portadora de las cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), es sometida a *splicing* alternativo diferencial. En consecuencia, el número de cadenas GAG que contienen las distintas isoformas también es diferente. De esta manera, mientras que la isoforma V0 contiene la mayor cantidad de cadenas GAG, siendo por tanto la isoforma más negativamente cargada, V1 y V2 portan un menor número de cadenas GAG y poseen una menor carga negativa. Por último, la isoforma V3 carece por completo de cadenas GAG y es la más pequeña de las isoformas. El *splicing* alternativo diferencial de la región central también determina la distancia existente entre los dominios G1 y G3; ésto también es importante, ya que los dominios G1 y G3 son los responsables de la unión de VS a diversas moléculas como el ácido hialurónico o de su posible interacción con el receptor de EGF o con CD44 (Sheng *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006; Miquel-Serra *et al.*, 2006), por lo que la distancia que separa a un dominio del otro también influirá en la actividad de cada una de las isoformas.

Las diferencias en la expresión de las isoformas de VS podrían tener implicaciones funcionales, también debido a que las cadenas GAG modulan el grado de hidrofobicidad de la molécula, y contribuyen así al grado de viscosidad o contenido de agua de la matriz de la que forma parte y que circunda a las células. Por lo tanto, la expresión de cada una de las isoformas y la concentración a la cual se encuentren en la MEC afectará seguramente la capacidad del versicano para interactuar con sus ligandos y, en consecuencia, a sus propiedades fisiológicas

(Zimmermann, 2000). Se ha propuesto que la función de V1 en el cerebro sería regular su desarrollo, mientras que la función de V2 sería probablemente mantener la homeostasis de este tejido (Wu *et al.*, 2004).

Se ha descrito la expresión diferencial de las isoformas de VS en una amplia variedad de tejidos. Por ejemplo, en cerebro humano fetal se puede detectar la expresión de todas las isoformas de VS, mientras que en cerebro humano adulto está presente de forma casi exclusiva la isoforma V2 (Schmalfeldt *et al.*, 1998). En este sentido, se ha descrito que el tamaño del dominio de unión a cadenas GAG podría modular acciones como la inhibición del crecimiento axonal en el sistema nervioso (Schmalfeldt *et al.*, 2000) o la migración de las células de la cresta neural (Perissinotto *et al.*, 2000). De hecho, recientemente se ha descrito el papel activo de V0 y V1 en la migración de las células de la cresta neural como moléculas guía, en conjunto con otros proteoglicanos y proteínas de la MEC (Dutt *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el de la expresión diferencial de las isoformas de VS en los vasos sanguíneos; en las lesiones escleróticas se ha descrito el acúmulo de las isoformas V0 y V1 y este acúmulo se relaciona con la mala prognosis de la lesión (Wight and Merrilees, 2004). La sobreexpresión de V3 en estas mismas células promueve la adhesión, incrementa los contactos entre las células e inhibe el crecimiento y la migración (Lemire *et al.*, 2002).

En nuestro laboratorio hemos descrito cómo la adición al medio de VS, sobre todo de las isoformas V0 y V1, inducía un aumento en la proliferación celular y una disminución de la adhesión de las células de melanoma (Touab *et al.*, 2002). Al sobreexpresar experimentalmente la isoforma V3 en estas mismas células, somos capaces de antagonizar algunos de los efectos de la expresión o adición al medio de V0 y V1, ya que observamos una disminución en el crecimiento de las mismas, además de una disminución en la migración y un incremento en la adhesión sobre determinados sustratos (Serra *et al.*, 2005; Miquel-Serra *et al.*, 2006). Con esto queremos hacer notar que la regulación de las isoformas de VS es muy importante para el comportamiento celular y que la diferencia en la expresión de cada una de ellas determina el efecto que éstas tengan en el comportamiento celular.

LA INDUCCIÓN IN VITRO DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA CONDUCE A LA DESAPARICIÓN GRADUAL DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE VERSICANO.

Para determinar si el proceso de desdiferenciación que siguen las células tumorales es reversible, nos preguntamos si mediante la inducción de la diferenciación, en células de melanoma no diferenciadas (SK-mel-3.44 y SK-mel-1.36-1-5), podríamos inducir la desaparición de la expresión de las isoformas de VS. El proceso de diferenciación ha sido caracterizado

específicamente en estas líneas celulares (Herndon and Lander, 1990), y por ello es aceptado comúnmente que el TPA suprime el crecimiento de las células de melanoma y que dicho proceso es acompañado por una diferenciación terminal (Heredia *et al.*, 1996a; Houghton *et al.*, 1987). Nuestros resultados demuestran que la expresión de versicano disminuye en estas condiciones, ligando así una vez más el estado de diferenciación con la expresión de versicano (Fig. 47). En ambos casos utilizamos como marcadores del proceso de diferenciación a mel-PG, un antígeno asociado al melanoma presente en líneas celulares no diferenciadas y que no se presenta en células diferenciadas, y M111, un antígeno presente en la diferenciación tardía del melanoma (Houghton *et al.*, 1982; Touab *et al.*, 2002). La expresión de V0 y V1, las dos isoformas detectadas por Western Blot en estas líneas celulares, disminuye de forma paralela durante el proceso de diferenciación *in vitro*, aunque es posible detectar tanto V0 como V3 mediante RT-PCR en células SK-mel-1.36-5. Existen datos en la literatura que relacionan la expresión de versicano con la proliferación y diferenciación celular, aunque no existen estudios con isoformas particulares; por ejemplo, los queratinocitos murinos expresan grandes cantidades de V5 en condiciones proliferativas, mientras que estos mismos queratinocitos, cuando llegan a confluencia y por lo tanto se encuentran quiescentes, disminuyen la expresión de este proteoglicano (Zimmermann *et al.*, 1994). A pesar de que no se conoce el mecanismo molecular para la regulación de versicano durante la diferenciación celular, se ha demostrado que tanto la expresión como el *splicing* de las isoformas está regulado durante el desarrollo, especialmente en el sistema nervioso y durante la migración y diferenciación de la cresta neural (Iwata *et al.*, 1993; Dours-Zimmermann and Zimmermann, 1994; Milev *et al.*, 1998; Bandtlow and Zimmermann, 2000), y nuestros datos nos indican que esta regulación también es importante durante la progresión tumoral del melanoma.

Por último, es interesante notar que todas las líneas celulares producen la isoforma corta V3. Esta isoforma no tiene cadenas GAG y por tanto se ha dicho que podría cumplir funciones opuestas a las de las isoformas largas (al competir funcionalmente con ellas) (Perris *et al.*, 1996; Serra *et al.*, 2005). Se ha reportado la expresión de V3 en distintas células y tejidos del cerebro adulto, hígado fetal y células de músculo liso (Lemire *et al.*, 1999), entre otras (Cattaruzza *et al.*, 2002). En las células endoteliales V3 se expresa específicamente tras la activación con citoquinas tales como TNF- α o VEGF, por lo que se asocia con los procesos de neoangiogénesis y cicatrización de heridas. Para el caso que nos ocupa, es posible detectar V3 tras la diferenciación de las células de melanoma, lo que indica la posibilidad de un rol específico para esta isoforma.

Ha sido descrito que el V5 podría ser regulado por Pax3, un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de la cresta neural. Pax3 es expresado diferencialmente de manera espacio-temporal durante la embriogénesis (Goulding *et al.* 1991) y ha sido relacionado con la expresión de genes reguladores de la movilidad y adhesión celular, influyendo así en la migración de las células de la cresta neural, en la cual se originan los melanocitos (Pla *et al.*, 2001). Se ha

descrito la sobreexpresión de Pax3 en el melanoma y no en el nevus benigno (Scholl *et al.*, 2001), así como el aumento en la expresión de V2 en células transfectadas con Pax3 (Mayanil *et al.*, 2001). Sin embargo, el efecto de Pax3 sobre la expresión de VS podría no ser directo, ya que no hemos identificado ningún sitio de unión para este factor en el promotor de VS.

En conclusión, proponemos que la producción de versicano por las células de melanoma es señal de la regresión a un estado no diferenciado durante la progresión tumoral, y que existe un patrón temporal para la expresión de cada isoforma de versicano.

EXPRESIÓN DE VERSICANO EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ASTROCITOMA Y NEUROBLASTOMA.

Hemos podido determinar la relación entre la expresión de VS y el grado de diferenciación de las células de melanoma. Estamos hablando por lo tanto de un proceso de regresión celular. Los melanocitos, como ya sabemos, derivan de la cresta neural, desde la cual migran hasta su localización final. Por esta razón hemos querido determinar la expresión de VS en tumores de células con el mismo origen que el de los melanocitos, para así poder verificar si el proceso de desdiferenciación de estas células sigue el mismo camino que el que hemos descrito para las células de melanoma.

Hemos caracterizado por lo tanto la expresión de VS en células humanas de astrocitoma y de neuroblastoma. La presencia de versicano ha sido descrita en el cerebro normal (Schmalfeldt *et al.*, 1998) y se presume que es un componente de la matriz pericelular especial que rodea a algunas neuronas en el cerebro (Bignami *et al.*, 1993). Asimismo, su transcripción se encuentra regulada durante el desarrollo del cerebro en ratas (Zuo *et al.*, 1998). También se ha descrito una baja expresión de esta molécula en diferentes tumores cerebrales y gliomas (Paulus *et al.*, 1996). Aunque podría ser que lo que realmente este sucediendo en este caso sea un cambio en la expresión de las isoformas de este proteoglicano de modo que la isoforma V2 es remplazada por las isoformas V0/V1. Nuestro trabajo muestra que el versicano es expresado tanto por células de origen glial como neuronal.

Las principales isoformas de versicano producidas por las líneas celulares de glioma y neuroblastoma son las V0 y V1, tal como se puede ver en los análisis de Western Blot, Northern Blot y RT-PCR. Estos resultados indican que dichas líneas celulares tumorigénicas han revertido a un estado indiferenciado, puesto que se ha descrito que la expresión de V0 y V1 es alta durante los períodos embrionarios y postnatal en rata, en tanto que la isoforma V2 está presente principalmente en el cerebro de rata adulto. Como hemos comentado anteriormente, el cerebro maduro es particularmente rico en la isoforma V2 (Margolis and Margolis, 1997).

En este caso podemos observar un patrón similar al que hemos podido describir en las líneas celulares de melanoma humano. La transformación de estos dos tipos celulares, con un origen embrionario común, induce un proceso de regresión caracterizado por la inducción de la expresión de VS. Como ya hemos dicho anteriormente, esta expresión le confiere a la célula capacidades tumorigénicas como el aumento en la capacidad de migrar o el aumento en la tasa de proliferación.

EL PROMOTOR DE VERSICANO ES REGULADO A VARIOS NIVELES Y EN ELLO INTERVIENEN LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SPI, AP-1 Y TCF-4.

Hasta este punto hemos podido relacionar la expresión de VS con el grado de diferenciación de las células de melanoma. Esta relación no es trivial, ya que el grado de diferenciación también está relacionado con características importantes para la progresión tumoral. Es por ello que conocer los factores de transcripción y las vías de señalización involucradas en la regulación de este proteoglicano resulta de gran importancia en las células de melanoma humano.

La sobreexpresión en el estroma tumoral de VS está relacionada con la mala prognosis de una gran cantidad de neoplasias (carcinoma pancreático, osteosarcoma, tumores cerebrales, cáncer de laringe, etc.), ya que esta sobreexpresión (sobre todo de las isoformas V0 y V1) le confiere a las células características como proliferación elevada, migración celular aumentada, disminución de la adhesión, etc. Resultados anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que en el melanoma también existe dicha correlación, donde la adición de VS al medio induce una mayor proliferación y migración celular (Touab *et al.*, 2002).

Asimismo, desde un punto de vista metodológico, contábamos con la ventaja de tener varias líneas celulares de melanoma productoras y no productoras de VS, lo que nos permitía estudiar las diferencias entre estas dos situaciones, y así poder diferenciar los factores involucrados en la expresión del proteoglicano en unas y otras células. El hecho, muy importante, de no haber tenido que recurrir a un contexto diferente a la hora de evaluar los resultados, les confiere una gran validez.

En 1994 se publicó por primera vez la secuencia del promotor de VS, la cual fue aislada de una biblioteca genómica humana (Naso *et al.*, 1994). La secuencia del promotor de VS obtenida para nuestro trabajo la aislamos a partir de ADN cromosomal de la línea celular de melanoma humano SK-mel-1.36-1-5. Esta secuencia se diferencia de la descrita anteriormente en 6

cambios: dos cambios de base en las posiciones -279 (T>G) y -357 (A>G) y cuatro adiciones de base; en las posiciones -159, -309 y -406, donde se añadió una G en cada posición, y en la posición -270, donde se añadió una C. Al realizar el análisis *in silico* de ambas secuencias, tan sólo el cambio en la posición -357 mostró relevancia, ya que al añadir estas G se genera un sitio de unión para Sp1, el cual no existía anteriormente. Nuestros resultados muestran que a este nuevo sitio se une, de manera específica, el factor de transcripción Sp1 (Fig. 39 y 40).

A lo largo de este trabajo hemos demostrado de forma clara la participación de los factores de transcripción TCF-4, Sp1 y AP-1 en la regulación de la expresión de VS en las líneas celulares de melanoma humano. Asimismo, planteamos que la diferencia entre la expresión o falta de expresión de VS en la línea celular MeWo no se debe a la acción de un represor sobre la actividad del promotor, sino a diferencias en el estado de activación de alguna vía de señalización específica. Como resultado de nuestro trabajo, proponemos como posibles vías, la vía de MAPK, JNK y/o la vía de activación TCF-4/ β -catenina. El cambio en la activación de dichas vías podría ser debida a que esta línea celular no presente mutaciones en los componentes de estas vías. Análisis citogenéticos realizados en ambas líneas celulares (SK-mel-131 y MeWo), analizando mutaciones comúnmente presentes en los melanomas, como por ejemplo deleciones o mutaciones en el locus CDKN2A, estarían en concordancia con esta hipótesis. Las mutaciones activadoras de B-Raf o mutaciones en APC en la línea celular MeWo están siendo analizadas en la actualidad.

Como se muestra en los resultados (Fig. 23), después del análisis *in silico* identificamos diversas secuencias de unión para los factores de transcripción TCF-4, Sp1, AP-2 y AP-1. Aún así, es importante señalar que existen otras secuencias de reconocimiento para la unión de factores de transcripción que no hemos analizado en profundidad en el presente trabajo, como NF- κ B o Smad, los cuales han sido también relacionados con la progresión del melanoma (Hussein, 2005; Ueda and Richmond, 2006).

Por ejemplo, el tratamiento con TGF- β en la línea celular SK-mel-131 induce la actividad del promotor de VS (Fig. 45). Esta acción podría estar mediada por la secuencia de reconocimiento de Smad3/4 del promotor de VS (-366), pero para saber el papel real de esta secuencia harían falta más experimentos al respecto. La relación entre TGF- β y la expresión de VS ha sido descrita anteriormente en diversos contextos celulares incluyendo el melanoma (Schmidt *et al.*, 2006; Heredia *et al.*, 1996b; Serra *et al.*, 2005). Recientemente se ha descrito en células de músculo liso la relación entre TGF- β y la sobreexpresión de VS (Schmidt *et al.*, 2006), pero no la participación directa de los efectores clásicos de la señalización de TGF- β , los Smads, en esta regulación. Es por ello que consideramos de gran importancia poder establecer, en el futuro, el papel que jugarían las secuencias de reconocimiento a Smad en la regulación de la expresión de VS.

Al transfectar el promotor de versicano en las células SK-mel-131 productoras de versicano y MeWo no productoras, se encontró que la actividad del promotor era 8 veces más alta en las primeras que en las segundas. Esto indica que la aproximación experimental elegida es válida para estudiar adecuadamente los factores de transcripción involucrados en la regulación del versicano en las células de melanoma.

Nosotros hemos podido demostrar, mediante experimentos de EMSA y ensayos de transfección, que TCF-4 juega un papel importante en la regulación de la expresión de este proteoglicano en las células de melanoma SK-mel-131. Al hacer el análisis *in silico*, identificamos en el extremo 5' del promotor de versicano dos cajas de reconocimiento para TCF-4 en las posiciones -546 y -467 en la línea celular SK-mel-131. Mediante la transfección de las mutantes de delección de la región que contenía ambas cajas de reconocimiento pudimos determinar la importancia de éstas en la actividad del promotor ya que se pierde el 50% de la actividad total del mismo, mientras que prácticamente no se observó ninguna diferencia en la actividad del promotor en la línea celular MeWo (que no produce versicano). Para confirmar que la pérdida de este 50% de actividad era debida a la pérdida de las zonas de reconocimiento para TCF-4, y dado que la delección en ambas cajas involucró a un fragmento de 159pb donde podría haber diferentes sitios de reconocimiento para otros factores de transcripción, se sobrepresaron tanto activadores como inhibidores de la vía TCF-4/ β -catenina sin que se observara ningún efecto sobre la actividad de las mutantes de delección (Fig. 29). Además, en los ensayos de EMSA, fuimos capaces de determinar la unión específica del complejo TCF-4/ β -catenina a las dos cajas del reconocimiento para este factor de transcripción al promotor de VS. Los únicos datos publicados previamente donde se relacione la expresión de VS con la vía TCF-4/ β -catenina han sido en células de músculo liso (Rahmani *et al.*, 2005). En este trabajo describen el papel de PDGF, y más específicamente de la vía de la PI3K/PKB a través de la inhibición de la acción de GSK3 β , como el responsable de la regulación de VS en estas células.

Todos estos datos implican claramente a TCF-4 en la regulación de la expresión de VS. Nos preguntamos entonces si la diferencia entre ambas líneas celulares era debida a que la vía de TCF4/ β -catenina estuviese más activa en la línea celular SK-mel-131: mediante los ensayos de la actividad TOP/FOP hemos podido determinar que esta premisa era cierta, ya que la línea celular SK-mel-131 tiene una actividad basal TOP/FOP dos veces más elevada que la de la línea celular MeWo. Además, la actividad en la línea celular MeWo no respondía al estímulo cuando sobrepresábamos tanto β -catenina como TCF-4, lo que nos indica que la vía TCF-4/ β -catenina en estas células no se encuentra activa. Es posible que en las células de la línea MeWo haya algún defecto en el transporte al núcleo de estos factores o falte o sea inactivo algún otro componente del sistema (Gordon and Nusse, 2006).

Gracias a una colaboración con la Unidad de Genética del Hospital Clínic de Barcelona hemos realizado análisis citogenéticos de todo el panel de líneas celulares de melanoma humano con las que hemos trabajado. Mediante éste análisis hemos podido determinar la presencia de una mutación en APC en la línea celular SK-mel-131 (Tabla 1).

Grado de diferenciación	Línea Celular	B-RAF	N-RAS	APC exón 15	exón 2 del locus CDKN2A	
					p14 ARF	p16 INK4A
Temprano	SK-mel-131	V600E	Wild-type	T1493T/ G1678E (Hetero)	codón 72 y Stop después de 18 aa	codón 57 y Stop después de 60 aa
Temprano	SK-mel-1.36-1-5	V600E	Wild-type	T1493T/ G1678E (Hetero)	codón 72 y Stop después de 18 aa	codón 57 y Stop después de 60 aa
Temprano	RIDER	Wild-type	Q61L	T1493T/ G1678E (Homo)	P94L	R80X
Temprano	AXIII	ND	ND	ND	wild type	ND
Temprano	SK-mel-37	V600E	Wild-type	T1493T/ G1678E (Homo)	deleción exón 1 β (Homo)	wild type
Intermedio	SK-mel-3.44	V600E	Wild-type	T1493T/ G1678E (Hetero)	codón 72 y Stop después de 18 aa	codón 57 y Stop después de 60 aa
Tardío	MeWo	ND	ND	ND	P94L	T79T+R80X
Tardío	DX2	Wild-type	Wild-type	Wild-type	P94L	T79T+R80X

Tabla 1: **Mutaciones de las líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de diferenciación.** Análisis de las mutaciones en: el exón 2 del locus CDKN2A, B-Raf, N-ras y el exón 15 de APC. ND: No determinado.

En la vía de degradación de β -catenina, ésta es fosforilada por un complejo en el cual participan APC-GSK3 β -Axina; dicha fosforilación dirige a esta proteína a su posterior degradación vía proteosoma. Cuando se encuentra mutada la proteína APC, esta regulación negativa no se lleva a cabo, provocando la acumulación de β -catenina en el citoplasma y finalmente su translocación al núcleo, donde activaría mediante su unión con TCF-4 la transcripción de los genes dependientes de esta activación (Fig. 48). Mutaciones en APC han sido descritas principalmente en cáncer de colon, donde su presencia correlaciona con la mala prognosis de la enfermedad (Gordon and Nusse, 2006). En el melanoma se ha descrito la mutación en APC en aproximadamente el 10% de los tumores malignos. La correlación exacta de esta mutación con la prognosis de la enfermedad no se conoce, ya que existen datos contradictorios entre la presencia o no de β -catenina en los melanomas metastáticos. Se ha descrito la acumulación de β -catenina nuclear en el 30% de los tumores de melanoma (Larue and Delmas, 2006), lo que provocaría la activación de la transcripción de los genes regulados por TCF-4, e indicaría un papel importante de esta vía en la progresión tumoral; pero otros grupos de investigación han descrito en los melanomas metastáticos la ausencia de β -catenina.

Aún así, en nuestro caso parece claro que la presencia de dicha mutación confiere a las células SK-mel-131 una activación de la vía TCF-4/ β -catenina, y que esta sobreactivación afecta la expresión de VS, según se esquematiza en la figura 48.

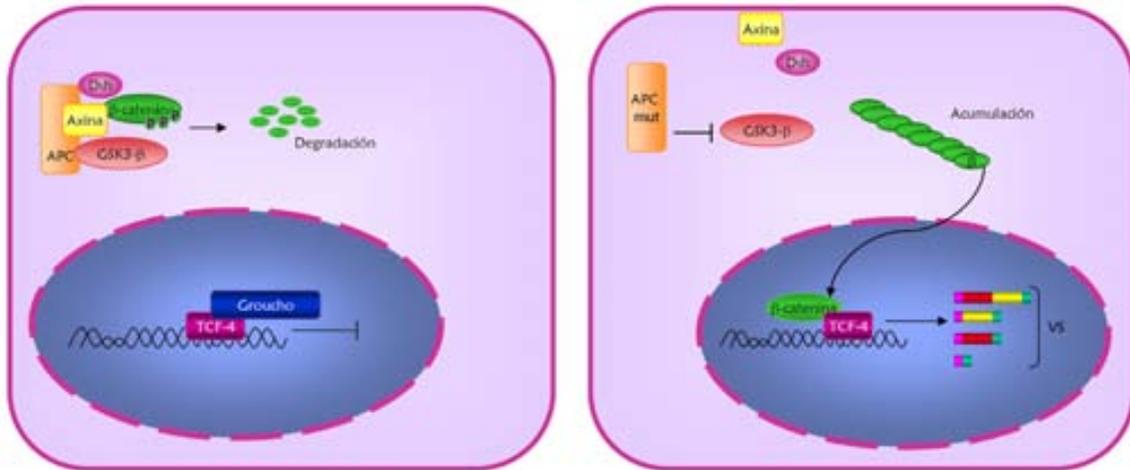


Figura 48: **Modelo del papel de la mutación en APC en las células SK-mel-131 sobre la regulación del promotor de VS.** La mutación de APC bloquea la vía de degradación de β -catenina, conduciendo a su acumulación en el citoplasma y posterior translocación al núcleo, con lo que activaría la transcripción del gen de VS entre otros (adaptado de Reya and Clevers, 2005).

Hemos identificado un sitio de unión para AP-1 (-36) en la región más proximal del promotor. Ya que está ampliamente aceptada la importancia de AP-1 (c-Fos, c-Jun) en la progresión tumoral (Milde-Langosch, 2005), decidimos ampliar el estudio del mismo en la regulación de VS.

La transfección, en la línea SK-mel-131, de la construcción más pequeña del promotor de VS (pGL2-pVS-120) presentaba una actividad luciferasa del 40% respecto a la del promotor entero. Para analizar el papel específico de la secuencia de unión a AP-1, llevamos a cabo la mutagénesis dirigida de la caja de reconocimiento localizada en el sitio -36 del promotor. Transfectamos dicha construcción en las células SK-mel-131 y el resultado de la mutación fue la pérdida casi total de la actividad, por lo que concluimos que esta secuencia es indispensable para la activación basal del promotor.

Utilizamos el inhibidor específico de la quinasa JNK (SP 600125) en la transfección de la construcción más pequeña del promotor (pGL2-pVS-120) y fuimos capaces de inhibir el 50% de la actividad basal del promotor. Hasta el momento, nunca antes se había relacionado la expresión de VS con AP-1. Nuestros resultados obtenidos a partir de los ensayos de inhibidores demuestran que esta proteína desempeña un papel, al menos parcial, en la regulación basal de VS. Hemos de mencionar que en los ensayos de EMSA, nuestro anticuerpo anti c-Jun es incapaz de desplazar la unión al oligo de la secuencia -36 del promotor. Este hecho puede deberse a la incapacidad del anticuerpo que utilizamos de unirse a esta proteína en las condiciones en las

cuales realizamos el experimento o a que c-Jun no se encuentra presente en el complejo formado para esta secuencia; son necesarios más datos para confirmar cualquiera de las dos hipótesis. En cuanto a los datos existentes en la literatura referentes a c-Jun y melanoma, éstos son contradictorios. Estudios *in vitro* han demostrado una reducción en la expresión de c-Jun en células de melanoma metastáticas y de melanoma primario en fase tardía, con respecto al melanocito normal y a células de melanoma primario en fase temprana, sugiriendo una pérdida del mismo a lo largo de la progresión (Yang *et al.*, 2004). Sin embargo, otros estudios relacionan el aumento de c-Jun con la transformación maligna de melanocitos murinos (Govindarajan *et al.*, 2003). Como ya hemos mencionado en la introducción, la modificación de la expresión de otros miembros de la familia Jun también ha sido descrita en la progresión del melanoma.

Los resultados anteriores determinan la participación de JNK en la regulación del 50% de la actividad basal de VS. Este resultado sugiere la participación de una vía adicional en la regulación de la actividad basal de este promotor. Mediante la utilización de una batería de inhibidores de distintas vías de señalización, hemos podido determinar la participación de la vía MAPK en la regulación de la actividad del promotor de VS. Al inducir la inactivación de esta vía mediante el inhibidor específico de MAPK, PD 098059, somos capaces de inhibir en un 70% la actividad total del promotor (pGL2-pVS-626) y un 50% la actividad basal (pGL2-pVS-120). Estos datos otorgan gran relevancia a la presencia de la mutación B-Raf en la línea SK-mel-131. La mutación en B-Raf es una mutación activadora, como ya habíamos mencionado, por lo tanto la vía de MAPK se encuentra sobreactivada en estas células. Esta vía de señalización ha sido relacionada con la activación de c-Fos y CREB (van Dam and Castellazzi, 2001; Monje *et al.*, 2005). La importancia de c-Fos en el melanoma ha sido descrita por Urabe *et al.* (1992) en un trabajo donde muestran mediante cortes histológicos de melanomas, un incremento de c-Fos sobre todo en el frente invasivo.

Otros miembros de AP-1 que han mostrado tener gran relevancia en la progresión del melanoma son ATF-2 y CREB. Se ha demostrado un papel importante de ATF-2 en la adquisición de la resistencia a la apoptosis en las células de melanoma (Ronai *et al.*, 1998), y como la inhibición de la acción de ATF-2 ayuda a la sensibilización de las células de melanoma hacia la apoptosis y a la inhibición de la tumorigénesis (Bhousmik *et al.*, 2004). En cuanto a CREB, se ha demostrado que el dominante negativo de ésta revierte el fenotipo maligno de las células de melanoma y favorece la apoptosis de las mismas (Jean *et al.*, 1998b). Tomando todo esto en conjunto, podríamos postular que la actividad basal del promotor de VS viene dada por la acción de c-Jun o ATF-2, vía JNK y la vía de MAPK, de cuyo efector no sabemos, pero podría ser CREB o c-Fos.

Por lo tanto podríamos plantear una cooperación de TCF-4 y AP-1 en la regulación de la actividad del promotor de VS (Fig. 49). Este papel cooperativo ya se ha descrito con anterioridad

en la regulación de c-Jun en cáncer de colon, en el cual la progresión del tumor está relacionada con la interacción cooperativa entre c-Jun y TCF-4 (Nateri *et al.*, 2005).

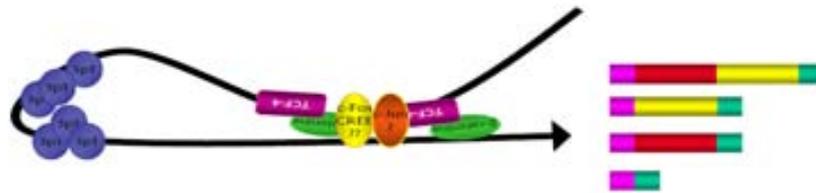


Figura 49: Posible cooperación entre TCF-4/β-catenina y AP-1 en la regulación del promotor de VS.

Un dato interesante es la relación que se ha establecido entre la sobreexpresión de c-Jun y c-Fos y el aumento de expresión de CD44 (Lamb *et al.*, 1997). Este proteoglicano formaría parte de la red extracelular de CD44-HA-VS. CD44 también se encuentra sobreexpresado en el melanoma y ha sido relacionado con una mala prognosis de esta neoplasia. Estos datos sugieren que ambos PGs podrían estar regulados de manera coordinada por la vía Jun/Fos durante la progresión del melanoma.

Como hemos presentado en el apartado Resultados, en la regulación del promotor de VS en las líneas celulares de melanoma humano no sólo intervienen TCF-4 y AP-1, sino también Sp1. Cuando realizamos el análisis *in silico* del promotor de VS observamos que en la zona central del promotor había una región de aproximadamente 300pb rica en GC y en la cual encontrábamos una gran cantidad de secuencias de reconocimiento para Sp1 y AP-2.

Al realizar los análisis de esta región mediante las transfecciones de las mutantes de delección en las líneas celulares SK-mel-131 y MeWo, pudimos determinar que en esta región residía el 10% de la actividad del promotor de VS. Además, mediante el análisis de EMSA de las secuencias, pudimos determinar la unión específica del factor de transcripción Sp1 al promotor de VS.

Por lo tanto, pensamos que la regulación por Sp1 puede ser ejercida a nivel de respuesta rápida y moduladora de este proteoglicano, tal como se ha visto en la regulación que ejerce sobre MMP-9. En las células epiteliales MDCK, el promotor de MMP-9 está regulado de forma fina por la unión de Sp1 y Ets, donde juntos ejercen un efecto cooperativo en la activación de este promotor mediante diferentes vías de señalización como MAPK y PI3K (Jordà *et al.*, 2005).

La presencia de numerosas secuencias reguladoras de unión a AP-2 sugiere un posible papel de este factor en la regulación de versicano. Además, ya hemos comentado anteriormente las evidencias que existen en la literatura sobre su papel en la progresión del melanoma. Así pues, AP-2 y Sp1 podrían estar compitiendo por el mismo sitio de unión, y sería la ratio Sp1/AP-2

presente en la célula, así como el grado de activación de éstos, determinaría quien actúa sobre el promotor de *VS* y en qué sentido. Una situación similar ha sido descrita anteriormente para el promotor de *PAR-1* (*Protease-activated Receptor-1*), donde la ratio entre ambos factores determina la expresión o represión de la proteína (Tellez *et al.*, 2003). En nuestro caso sabemos que la vía de MAPK está sobreactivada y que Sp1 puede ser fosforilado por esta vía. Por tanto, podemos plantear que la ratio en estas células se decantaría a favor de Sp1, no por cantidad del mismo, sino por su grado de activación.

En la literatura se ha descrito la pérdida de expresión de AP-2 durante la progresión del melanoma y cómo la reexpresión de este factor de transcripción disminuye la proliferación y migración de las células, además de disminuir la expresión de moléculas características de la progresión del melanoma como MUC18 (Jean *et al.* 1998; Nyoromoi and Bar-Eli, 2003). En nuestro caso la situación es distinta, ya que en las dos líneas celulares estudiadas encontramos una expresión similar de AP-2 (Fig. 37 y 38). Por tanto, no es la ausencia de AP-2 lo que impide la unión de éste al promotor de *VS*.

Aunque en nuestro caso AP-2 no parece ser un factor esencial en la regulación de la expresión de *VS*, la situación podría ser distinta en otros tipos celulares. Nuestros resultados preliminares obtenidos al transfectar las distintas construcciones del promotor de *VS* en líneas celulares con diversos orígenes sugieren que los patrones de regulación pueden ser diferentes según el contexto celular en que se encuentre.

MODELO DE REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE VSICANO PROPUESTO PARA LA LÍNEA CELULAR SK-MEL-131 DE MELANOMA HUMANO.

Por lo tanto, proponemos un modelo para el promotor de VS en la línea SK-mel-131, basado en 3 niveles de regulación (Fig. 50):

En primer lugar, mediante el sitio de unión situado en la posición -36 del promotor de VS, el cual contiene la región AP-1 y que sería necesario para la expresión basal. La unión de c-Jun a este sitio estaría modulando el 30% de la actividad basal del promotor y correspondería a la inhibición causada por el inhibidor de JNK (SP 600125). El resto de la actividad estaría regulada mediante la activación de la vía de las MAPK, ya que es bloqueada por la inhibición de esta vía. Este hecho correlacionaría a la perfección con la mutación que presentan estas células en B-Raf. Además, al final de la vía de B-Raf encontramos a c-Fos, miembro de la familia de AP-1, que podría interactuar con c-Jun para la actividad basal, o CREB, del cual se ha demostrado que juega un papel relevante en la progresión del melanoma y además se ha descrito que durante los procesos neoplásicos puede formar dímeros con miembros de la familia AP-1, dando lugar así a la transactivación de muchos genes dependientes de AP-1. El papel que jueguen en la regulación de la expresión de VS está por demostrar. Nosotros estamos muy interesados en seguir este camino para así poder describir con exactitud el papel que juegan estos tres participantes en la regulación de VS en las células de melanoma.

El segundo nivel de regulación se daría a nivel de TCF-4, que sumaría sus efectos a los de AP-1 y así serían responsables de la activación un 50% por encima de la actividad basal. Como hemos dicho anteriormente, la actividad de TCF-4 está regulada por β -catenina, de manera que el estado de activación y la localización intracelular de la misma es determinante para la transcripción de los genes regulados por TCF-4. En este sentido, hemos determinado que: a) la actividad β -catenina/TCF-4 se encuentra aumentada en las células productoras de VS; b) el promotor de VS responde selectivamente a este estímulo mediante reguladores de esta misma vía, y c) en estas mismas células se encuentra mutada la proteína APC, que sería uno de los participantes clave de la regulación de β -catenina: por lo tanto, al estar mutada esta proteína se produciría una acumulación de β -catenina en el citoplasma que conllevaría la activación de la transcripción de VS.

El último nivel de regulación sería proporcionado por Sp1, que podría servir como un estabilizador y como un factor de respuesta rápida a la modulación de la expresión de VS.

Es importante hacer notar que en todo el proceso de búsqueda de los elementos reguladores de la expresión de VS en las células de melanoma, la línea celular MeWo no productora de VS no respondió, lo cual indica que estas células podrían carecer de algún regulador positivo. Nuestra meta será poder hacer que esta línea celular exprese VS y así poder determinar exactamente cual es el desencadenante de la expresión del proteoglicano. Este hecho sería de gran importancia para plantear estrategias dirigidas a la inhibición de los efectos que VS tiene sobre la progresión de los procesos neoplásicos y en especial del melanoma.

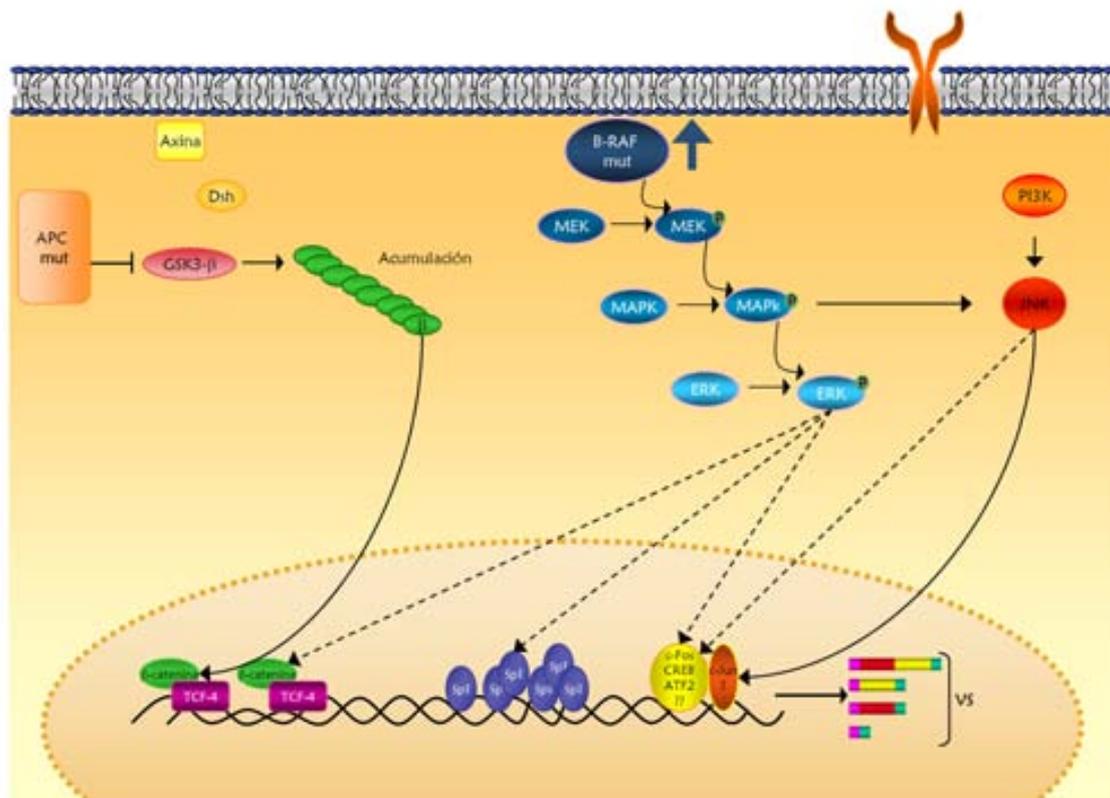


Fig. 50: **Modelo de regulación de la expresión de VS en la línea celular SK-mel-131.** La regulación de la actividad del promotor de VS se da a tres niveles: la regulación de la actividad basal, debida a la secuencia AP-1 del promotor en la posición -36; la activación y estabilización gracias a la acción de Sp1, y la activación fuerte de vía mediante la acción de TCF-4/β-catenina. Estas acciones se encuentran sobreactivadas por las mutaciones en B-Raf y APC que presenta esta línea celular.

Conclusiones

-
- 1 → El grado de diferenciación de las líneas celulares de melanoma humano correlaciona de manera inversa con la expresión de versicano.
 - 1.1 → Las líneas celulares con grado de diferenciación tardío, MeWo, SK-mel-23, y DX2, no expresan ninguna de las isoformas de versicano.
 - 1.2 → La línea celular con grado de diferenciación intermedio, SK-mel-3.44, expresa las isoformas V0, V1 y V3 de versicano, pero no la isoforma V2.
 - 1.3 → Las líneas celulares con grado de diferenciación temprano, SK-mel-1.36-1-5, Rider, AX-3, y SK-mel-37, expresan en proporciones diferentes todas las isoformas de versicano: V0, V1, V2 y V3.
 - 1.4 → Las líneas celulares con grado de diferenciación temprano o intermedio expresan el marcador mel-PG.

 - 2 → Los ensayos de diferenciación *in vitro* de las líneas SK-mel-1.36-1-5 y SK-mel-3.44 mediante tratamiento prolongado con TPA muestran que la expresión de versicano está ligada a este proceso. En los estudios realizados se observa la desaparición de versicano en los estadios más tardíos de diferenciación. Este evento va acompañado de la disminución de la expresión de mel-PG y la aparición de la expresión del marcador de diferenciación tardío M111.

 - 3 → El versicano es un proteoglicano indicador de desdiferenciación celular en células de melanoma humano y podría ser un buen marcador en el diagnóstico y clasificación del melanoma humano.

 - 4 → Las isoformas V0 y V1 de versicano se expresan en todas las líneas celulares ensayadas de astrocitoma y neuroblastoma humano.

 - 5 → Hemos aislado y analizado la secuencia del promotor de versicano de la línea celular de melanoma humano SK-mel-1.36-5. El análisis *in silico* de dicha secuencia reveló como posibles reguladores de este promotor a los factores de transcripción, TCF-4, AP-2, Sp1 y AP-1, entre otros.

 - 6 → Los sitios de unión para TCF-4, -546 y -467, son activadores importantes de la actividad del promotor de VS en las líneas celulares de VS con grado de diferenciación temprano.
 - 6.1 → La delección de estos sitios de unión reduce en más del 50% la actividad del promotor de versicano en las células SK-mel-131 (productoras de versicano) y no tiene ningún efecto sobre la actividad de este mismo promotor en las células MeWo, las cuales no producen versicano.

- 6.2 → La activación del promotor de versicano en las células de melanoma fue demostrada mediante la sobreexpresión de activadores e inhibidores de la vía TCF-4/ β -catenina.
- 6.3 → TCF-4 y β -catenina se unen de manera específica a las secuencias -546 y -492 del promotor de versicano. La unión de estos factores de transcripción es más fuerte en la línea SK-mel-131 que en la línea MeWo.
- 6.4 → La vía TCF-4/ β -catenina se encuentra menos activa en las células MeWo que en las células SK-mel-131, debido posiblemente a la mutación en APC encontrada en esta línea celular.
- 7 → La caja de reconocimiento para AP-1, -36, tiene un papel preponderante en la activación, todo o nada, de la expresión de versicano en las células de melanoma humano.
- 7.1 → La mutación específica de esta caja de reconocimiento disminuye la actividad del promotor de versicano en más de un 80% en la línea celular SK-mel-131.
- 7.2 → La inhibición de la vía de las JNK mediante la adición del inhibidor SP600125, disminuye la actividad del promotor de versicano en más de un 30% en la línea celular SK-mel-131.
- 7.3 → La inhibición de la vía de las MAPK mediante la adición del inhibidor PD098059, disminuye en más de un 70% la actividad del promotor de versicano en la línea celular SKmel-131.
- 7.4 → c-jun no se une de manera específica a la caja de reconocimiento -36 del promotor de versicano en las células SK-mel-131.
- 8 → Sp1 y AP-2 modulan la expresión de versicano en la línea SK-mel-131.
- 8.1 → En la región central del promotor de versicano se encuentran un gran número de cajas de reconocimiento para Sp1 y AP-2.
- 8.2 → Sólo el 10% de la actividad del promotor de versicano es regulada por esta región.
- 8.3 → El factor de transcripción Sp1 se une de manera específica a las secuencias de reconocimiento -428, -352 y -225 del promotor de versicano en la línea celular SK-mel-131.
- 9 → El patrón de regulación del promotor de versicano varía según el contexto celular en el cual se trabaje.

Materiales y Métodos

CULTIVOS Y LÍNEAS CELULARES.

La manipulación de células siempre se ha realizado bajo condiciones de estricta esterilidad para evitar contaminaciones, además de realizarse pruebas de PCR periódicas para la detección de contaminaciones por *Mycoplasma* en los cultivos.

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

Líneas originalmente derivadas de melanomas humanos (Houghton *et al.*, 1987):

SK-mel-131 (estado de diferenciación temprano)
SK-mel-131(clon 1.36-1-5) (estado de diferenciación temprano)
Rider (estado de diferenciación temprano)
SK-mel-37 (estado de diferenciación temprano)
SK-mel-131 (clon 3.44) (estado de diferenciación intermedio)
SK-mel-23 (estado de diferenciación tardío)
MeWo (estado de diferenciación tardío)
DX-2 (estado de diferenciación tardío)

Líneas de astrocitoma humano:

U-251
U-373
SW-1088

Líneas de neuroblastoma humano:

SK-NSH
SH-SY5Y

Una línea de carcinoma hepático humano deficiente en el factor de transcripción AP2 α (Johnson *et al.*, 1997):

Hep G2

Una línea celular epitelial derivada de un carcinoma pancreático humano (Dexter *et al.*, 1982; Pujal *et al.*, 2006):

RWP-1

La línea SK-mel-131 fue amablemente cedida por el Dr. Houghton (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA). El resto de las líneas celulares de melanoma utilizadas y las líneas SK-NSH y U-251, fueron amablemente cedidas por el Dr. F. X. Real (IMIM, Barcelona). La línea Hep G2 fue amablemente cedida por la Dra. Àngels Fabra (Institut de Recerca Oncològica, IRO). La línea RWP-1 fue amablemente cedida por el Dr. García de Herreros (IMIM, Barcelona). Las líneas SW-1088 y U-373 fueron amablemente cedidas por la Dra. A. García (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Barcelona). La línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano fue amablemente cedida por la Dra. M. Unzeta (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, UAB).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en cultivos en monocapa a 37°C en atmósfera humidificada y con 5% de CO₂ en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100U/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomina y 1% de glutamina.

ANTICUERPOS.

Anticuerpos Primarios

Anticuerpo policlonal contra Versicano preparado en el laboratorio (Touab *et al.*, 2002).

Anticuerpo monoclonal B5 dirigido contra la proteína mel-PG cedido por el Dr. F. X. Real (Heredia *et al.*, 1996a).

Anticuerpo monoclonal MIII dirigido contra la proteína gp110 cedido por el Dr. F. X. Real (Houghton *et al.*, 1982).

Anticuerpo policlonal contra los aminoácidos 130 al 209 del factor de transcripción AP-2 α (H-79): *sc-8975* de Santa Cruz Biotechnolgy, Inc.

Anticuerpo policlonal contra la región N-terminal del factor de transcripción TCF4 (N-20): *sc-8637* de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Anticuerpo monoclonal contra los aminoácidos 530 al 538 del factor de transcripción SP1 (554129) de BD Biosciences Pharmigen.

Anticuerpo monoclonal contra la región C-terminal de la proteína β -catenina (610153) de BD Biosciences Pharmigen.

Anticuerpo policlonal contra los aminoácidos 1-79 de la región N-terminal de c-Jun (H-79): *sc-1694* de Santa CruzBiotechnology, Inc.

Anticuerpos Secundarios

Utilizados para los ensayos de Western Blot: Anticuerpos conjugados con peroxidasa anti conejo, cabra y ratón de Amersham Biosciences.

Utilizados para los ensayos de Inmunocitoquímica: Anticuerpos marcados con fluorocromo: anti conejo-FITC de Southern Biotechnology Association y anti ratón-TRITC de Sigma.

MEDIOS CONDICIONADOS Y DIGESTIONES ENZIMÁTICAS.

Para la obtención de medios condicionados se utilizaron cultivos celulares subconfluentes. Las

células se lavaron con PBS y se mantuvieron con medio DMEM sin SFB durante 4 horas, después se incubaron durante 24 horas con el mismo medio y éste se recogió y se le añadió: 1mM EDTA, pH 8, 1mM PMSF y 5mM Benzamidina como inhibidores de proteasas. Las muestras se congelaron hasta su posterior utilización.

Para las digestiones enzimáticas de los medios condicionados de las diferentes líneas celulares los medios se trataron con 50mU/ml de condroitinasa ABC en tampón 33mM Tris-HCl pH 8 y 33mM acetato sódico a 37°C durante 16 horas. Los medios condicionados fueron estandarizados por el número de células.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES.

Se lavaron las células con PBS, se añadieron 200µl de tampón de lisis (1% TritónX-100, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM β-glicerofosfato sódico, 50mM NaF, 5mM pirofosfato sódico, 0.27M sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM Benzamidina, 0.1% β-Mercaptoetanol, 2mM PMSF), se incubaron durante 15 minutos en hielo y se centrifugaron para obtener el sobrenadante.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES.

Los extractos nucleares se obtuvieron mediante el método de Schreiber *et al.* (1989) el cual se basa en una primera lisis hipotónica, seguida de una extracción de núcleos por medio de altas concentraciones de sales. Cultivos subconfluentes de las distintas líneas celulares se lavaron con TBS y se tripsinizaron. Se contaron las células, se centrifugaron a 1000rpm durante 5 minutos y se lavaron con 1ml de TBS. Se volvieron a centrifugar 15 segundos a 14000rpm. Se resuspendieron en 400µl de Buffer A frío (10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT y 0.5mM PMSF) por cada 5x10⁶ células. Después de 15 minutos en hielo, se les añadieron 25µl de NP-40 al 10%. Se agitaron vigorosamente durante 10 segundos y los núcleos fueron recuperados por centrifugación durante 30 segundos a 14000rpm. Los *pellets* se resuspendieron en 50µl de Buffer C frío (20mM HEPES, pH7.9, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT y 1mM PMSF) por cada 5x10⁶ células. Las células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en agitación constante. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 14000rpm durante 5 minutos a 4°C.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

La determinación de proteína de los extractos nucleares y los medios condicionados se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial del kit *Micro™ BCA Protein Assay Reagent Kit* (PIERCE).

La determinación de proteína de los extractos totales se realizó mediante el método de Bradford siguiendo el protocolo de la casa comercial Bio-Rad.

EXTRACCIÓN DE ARN.

La extracción de ARN total se realizó a partir de cultivos subconfluentes de las distintas líneas celulares con el *RNeasy kit* de QIAGEN, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

La obtención de ADN plasmídico de cada una de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas se realizó con el *GFX Micro Plasmid Prep Kit* de Amersham Bioscience, siguiendo el protocolo de la casa comercial a partir de 3ml de cultivo de cada cepa.

Para la obtención de una mayor cantidad y pureza de ADN plasmídico, para los ensayos de transfección se realizó la purificación a partir de 500ml de cultivo, utilizando el *Plasmid Maxi Purification Kit* de QIAGEN.

OBTENCIÓN DE ADN CROMOSOMAL.

La obtención de ADN cromosomal de cultivos celulares se realizó a partir de 5×10^6 células mediante el protocolo de extracción Fenol:Cloroformo según Sambrook (1989).

INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT.

Para la detección de proteínas en medios condicionados o extractos tanto celulares como nucleicos,

las muestras fueron separadas mediante electroforesis, en geles de gradiente de 3-10% o al 8% de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones reductoras.

Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P (mÅ 250, Millipore), durante 2 horas a 400mAmp/113Volts.

Las membranas fueron bloqueadas con TBS con 0.05% Tween-20 y 5% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con un primer anticuerpo específico para cada proteína a identificar, diluido en el mismo buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

La inmunodetección se realizó por medio de quimioluminiscencia mediante un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, con el kit *ECL Western Blotting detection assay* de Amersham Pharmacia Biotech.

Para una descripción más detallada ver Anexo.

ANÁLISIS POR INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA.

Las células fueron crecidas, en las condiciones requeridas en cada caso, sobre portaobjetos de vidrio circulares (1cm de Ø) previamente esterilizados. Después se realizó una fijación con 3% paraformaldehído/ 2% sacarosa en PBS, durante 25 minutos a 37°C. Se permeabilizaron las células con 0.1% de Triton X-100 en PBS, durante 10 minutos y se bloquearon con 10% de suero de cabra no inmunizado (NGS) y 1% BSA en PBS, a temperatura ambiente durante 30 minutos. La detección se realizó con anticuerpos específicos para cada proteína incubando durante toda la noche a 4°C. Se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo a una dilución 1:30 durante 1 hora, en oscuridad. Se lavaron y se tiñeron los núcleos con Hoechst #33342 100µg/ml en PBS. Finalmente, se montaron las preparaciones en medio de montaje VECTASHIELD para su posterior observación.

ANÁLISIS RT-PCR.

El análisis por RT-PCR (Retro Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa) se realizó a partir de 1µg de ARN total de células en cultivo. Para la fase de Retro Transcripción (RT) se utilizó oligo-dT como oligonucleótido de transcripción y la enzima *Expand™ Reverse Transcriptase* de Roche siguiendo el protocolo específico para esta enzima de Roche. La reacción se realizó a 39°C durante 50 minutos en un volumen final de 20µl.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron 2.5µl de la reacción de RT en un volumen final de 25µl con 10U de la enzima *Expand™ High Fidelity PCR System* de Roche, Buffer 1X, dNTPs 200µM y un par de oligonucleótidos específicos para cada PCR a una concentración final de 1µM, la concentración final de magnesio se varió dependiendo de cada reacción.

La siguiente tabla (Tabla 2) muestra las secuencias de cada uno de los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de RT-PCR.

Nombre	Secuencia	Proteína que identifica
A-UP	5'- GCG CCA CCC TGT GAC -3'	Isoforma de versicano V1
A-UP*	5'- TGG AGG TGG TCT ACT TGG -3'	Isoforma de versicano V3
B-UP	5'- GAC CTC AGG CGC TTT C -3'	Isoformas de versicano V0 y V2
B-LOW	5'- CAG TGG TAA CGA GAT GCT TC -3'	Isoformas de versicano V0 y V1
C-LOW	5'- TAG CAC TGC CCT TGG A -3'	Isoforma de versicano V2
C-LOW*	5'- TCA CAT GTC TCG GTA TCT TG -3'	Isoforma de versicano V3
GAPDH-UP	5'- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG G -3'	GAPDH
GAPDH-LOW	5'- ACC CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG -3'	GAPDH

Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los diferentes ensayos de RT-PCR.

Los tamaños de fragmentos esperados para cada una de las reacciones son los siguientes:

Producto	Tamaño
Isoforma V0	351pb.
Isoforma V1	386pb.
Isoforma V2	373pb.
Isoforma V3	342pb.
GAPDH	960pb.

Para una descripción más detallada ver Anexo.

ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN ARN-ADN (NORTHERN BLOT).

Todo el material utilizado para ARN fue esterilizado para evitar la degradación del mismo, y se trabajó con guantes.

Fueron separados 15µg de ARN total mediante una electroforesis desnaturizante en geles de agarosa 1.5% y 2.2M formaldehído en MOPS 1X pH 7. Se transfirieron las muestras por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia).

El protocolo para la prehibridación e hibridación de la membrana se realizó siguiendo lo descrito por Amersham Pharmacia Biotech. La detección se realizó en placas fotográficas.

Para una descripción más detallada ver Anexo.

OBTENCIÓN DE LAS SONDAS PARA NORTHERN BLOT.

Las sondas utilizadas para los ensayos de Northern Blot se obtuvieron a partir de las digestiones enzimáticas de los plásmidos pBSC-SK/D7 para la sonda HABR, pBSC-KS/Genomic-PCR y pBSC-KS/C4 para las sondas GAG- α y GAG- β respectivamente, cedidos amablemente por el Dr. D. R. Zimmermann (Univ. Zúrich, Suiza).

Los fragmentos se obtuvieron por digestiones enzimáticas según Sambrook (1989). En el caso de la sonda D7 la digestión se realizó con la enzima *EcoR I* y se obtuvo un fragmento de 1Kb, para Genomic-PCR las enzimas utilizadas fueron *Eco R II/Xba I* y para C4 *Eco R II/Hind III*, los fragmentos obtenidos fueron de 1.5Kb y 2.1Kb respectivamente.

En el caso de GAPDH, se utilizó como sonda el fragmento de 960pb obtenido de la reacción de RT-PCR partiendo de ARN total de células en cultivo (ver Análisis RT-PCR en Materiales y Métodos).

Todos los fragmentos fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y purificados utilizando el sistema *QIAquick® Gel Extraction Kit* de QIAGEN, siguiendo el procedimiento para microcentrífugas del mismo kit.

Marcaje de la sonda y purificación

25ng de sonda fueron marcadas con dCTP [α^{32} P] por medio de *Random Primed DNA Labeling Kit* de Roche y purificadas por columna con *Probe QuantTM G-50 Micro Columns* de Amersham Biosciences.

CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE VERSICANO.

Un fragmento de 620pb correspondiente al promotor de versicano fue obtenido mediante PCR con ADN cromosomal de la línea celular de melanoma humano SK-mel-1.36-1-5 y oligonucleótidos específicos para la región -618 a +2 del promotor, según la secuencia reportada para dicho promotor (referencia GenBank U15963). La reacción fue clonada en el vector pCR2.1 mediante el *kit TA-Cloning* de Invitrogen. Se comprobó la inserción y el sentido de este mediante PCR y digestiones comprobativas.

La reacción de PCR se realizó a partir de 500ng de ADN cromosomal, la reacción se llevó a cabo con 10U de la enzima *ExpandTM High Fidelity PCR System* de Roche, Buffer 1X, dNTPs 200 μ M, 2.5mM de Mg⁺⁺, 1% DMSO y los oligonucleótidos: prVS-Fw 5'-ACTTTCCTCTAGGTCCCCGA-3' y prVS-Rv 5'-CGGTACAGTGATATAATGATGATGGGT-3'. El programa utilizado fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
94°C	5m	30ciclos
94°C	1m	
50°C	1m	
70°C	1:30m	
70°C	5m	

El sistema de clonación TA-cloning se basa en la actividad de ciertas polimerasas termoestables utilizadas para PCR que añaden una deoxiadenosina en el extremo 3' de las moléculas amplificadas. Estas adeninas dirigen la ligación directa de los productos de PCR al vector pCR2.1, el cual también contiene una adenina en extremo 3', facilitando así la unión de ambos fragmentos (vector-inserto). Además contiene un fragmento del gen de lacZ para facilitar la visualización de las colonias positivas.

Una vez obtenido el primer plásmido el inserto se subclonó en el vector pGL2basic de Promega, mediante la digestión con las enzimas *Kpn I* y *Xho I* y purificación del mismo. Una vez comprobada la existencia del inserto mediante PCR comprobativas con oligonucleótidos específicos, se secuenció el fragmento.

El vector PGL2-basic contiene la región codificante para la Firefly Luciferasa, que se utiliza como reportero de la actividad del promotor clonado en las células transfectadas.

MUTANTES DE DELECIÓN.

Para las construcciones de delección derivadas del promotor de versicano se realizaron PCR específicas a partir del plásmido pGL2/prVS-626 y se repitió el procedimiento anterior con cada una de los mutantes obtenidos. En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación del promotor de versicano y los mutantes de delección.

Nombre	Secuencia
Fw- pVS -626	5'- ACTTCCCTCTAGGTCCCCGA -3'
Rv- pVS -626	5'- CGGTACAGTGATATAATGATGATGGGT -3'
Fw- pVS -533	5'- GCGCGTAAACACGCTGTA -3'
Fw- pVS -467	5'- GCTCCCGAGAAGAAGTGATCG -3'
Fw- pVS -361	5'- GAAATGGGGGTGGGAAGGAG -3'
Fw- pVS -256	5'- GTA CT TCTTGTCAGGAAGAAACGCC -3'
Fw- pVS -178	5'- GAGCTGCCTTTCCGCCCT -3'
Fw- pVS -120	5'- AAGCTGCGGAGCGCTTTTG -3'

Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la clonación del promotor de versicano y cada uno de los mutantes de delección del mismo.

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

Para las construcciones con mutaciones puntuales realizamos una mutagénesis dirigida, que consiste en introducir mutaciones en nucleótidos específicos por medio de la utilización de oligonucleótidos mutados. Para esto realizamos una reacción de PCR. Esta reacción se realizó con una polimerasa de alta fidelidad y capaz de amplificar fragmentos de gran tamaño, oligonucleótidos mutados, y como ADN molde utilizamos el plásmido de la construcción que queremos mutar.

En nuestro caso la reacción de PCR se realizó con la siguiente mezcla:

Compuestos	Concentración final
dNTPs	40 μ M
oligo 1	1 μ M
oligo 2	1 μ M
Buffer	1X
Taq polimerasa	3.47U
ADN	10ng

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
95°C	30s	3 ciclos
98°C	30s	
50°C	1m	
68°C	13m	15 ciclos
95°C	30s	
50°C	1m	
68°C	13m	
68°C	20m	

El producto de PCR lo tratamos con la enzima de restricción *Dpn I* a 37°C durante 2 horas. De esta forma digerimos todo el ADN metilado o semimetilado y así seleccionamos sólo el ADN sintetizado durante la PCR, el cual contiene la mutación deseada.

Los oligonucleótidos utilizados para obtener las secuencias promotoras mutadas se muestran en la Tabla 4.

Nombre	Secuencia
Fw-pGL2basic	5'- GGTACGTGGAGGTTTTACTTGC -3'
Rv-pGL2basic	5'- ATAGCTTCTGCCAACCGAAC -3'
Fw-pVS-120 <i>API</i> mut	5'- CGGCTCT AAC GGTACAGTG ATA ATAATGATG -3'
Rv-pVS-120 <i>API</i> mut	5'- CTGTACC CT TAGAGCCGAGGAGGAGACTCA -3'

Tabla 4: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para obtener los mutantes puntuales del promotor de versicano.

TRANSFECCIÓN TRANSITORIA Y ENSAYO LUCIFERASA/RENILLA.

Se sembraron 30×10^4 células por pozo en placas de 6 pozos al menos 18 horas antes de realizar la transfección. Las células se transfectaron de forma transitoria utilizando lipofectamina-Reagent PLUS de Invitrogen. Cada transfección se realizó con $1 \mu\text{g}$ de ADN plasmídico y 100ng del plásmido pRL-TK (Promega) como control de transfección en cada pozo; en caso de transfecciones dobles, se pone también $1 \mu\text{g}$ del segundo plásmido. Después de 24 horas, se lavan las células y se obtienen los extractos según el protocolo de congelación y descongelación de Promega. La lectura se realiza según el protocolo del *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System* de Promega en un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold Technologies), para determinar los ratios de luciferasa/renilla de cada transfección.

El vector pRL-TK Promega, el cual expresa renilla, es utilizado como control interno de transfección en combinación con los vectores reporteros experimentales. Este vector contiene el cADN rluc que codifica para la Renilla Luciferasa, dirigido por un promotor HSV-TK que proporciona una expresión moderada y estable de la Renilla Luciferasa en las células transfectadas. Esto permite la medición simultánea de dos enzimas reporteras independientes en un mismo sistema. La Firefly Luciferasa es medida primero, añadiendo el reactivo específico que genera la estabilización de la señal luminiscente. Después de cuantificar la señal de la luciferasa, esta reacción se bloquea, al mismo tiempo que se añade el reactivo para medir y estabilizar la señal lumínica de la Renilla Luciferasa.

Los valores de actividad relativa se obtienen al final mediante el cociente de la actividad luciferasa partida en la actividad de la Luciferasa Renilla.

Los plásmidos utilizados en estos ensayos fueron los que se muestran en la tabla siguiente (Tabla 5):

Uso	Plásmido	Vector de clonación
Vectores reporteros de la actividad luciferasa	pGL2basic	
	pGL2-pVS -626	pGL2basic
	pGL2-pVS -518	pGL2basic
	pGL2-pVS -467	pGL2basic
	pGL2-pVS -361	pGL2basic
	pGL2-pVS -256	pGL2basic
	pGL2-pVS -178	pGL2basic
	pGL2-pVS -120	pGL2basic
	pGL2-pVS -120 ^{AP-1 mut}	pGL2basic
	pGL2-pVS -626 ^{AP-1 mut}	pGL2basic
	TOP-FLASH*	
FOP-FLASH*		
Vectores de expresión en células eucariotas	pcDNA3-TCF4-His-HA*	pcDNA3
	pcDNA3-TCF4- Δ N*	pcDNA3
	pcDNA3-TCF4-VP16*	pcDNA3
	pcDNA3- β -catenina*	pcDNA3
	pcDNA3- β -catenina S37Y*	pcDNA3
	pcDNA3	
pRL-TK		

Tabla 5: Plásmidos utilizados para las transfecciones transitorias. *Plásmidos amablemente cedidos por el Dr. García de Herreros (IMIM, Barcelona).

TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES.

Para ver el efecto del tratamiento con inhibidores específicos sobre la actividad del promotor de VS realizamos el siguiente procedimiento: Transfectamos de forma transiente las células SK-mel-131 con los plásmidos con las diferentes construcciones del promotor de VS y pRL-TK, como se ha descrito anteriormente. Seis horas antes de recoger los extractos celulares, para su posterior lectura, añadimos el inhibidor correspondiente disuelto en DMEM sin FCS. Las concentraciones e inhibidores utilizados se detallan en la siguiente tabla.

Inhibidor	Vía que inhibe	Concentración final utilizada
SP 600125	Inhibidor específico de la quinasa JNK	50 μ M
Mithramycina	Inhibidor específico de la fosforilación de Sp1	100nM
SB 203580	Inhibidor de la p38	20 μ M
Wortmannina	Inhibidor específico de la PI3K	210nM
PD 098059	Inhibidor específico de la MAPKK p42/44	40mM

Tabla 6: Inhibidores utilizados. Se detalla la concentración final a la cual fueron utilizados cada uno de ellos y su función específica.

Después del tiempo indicado los extractos celulares se recogieron como se describió anteriormente.

EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).

Esta técnica es ampliamente utilizada para detectar la especificidad de ciertos nucleótidos o secuencias nucleotídicas necesarias para la interacción proteínas-ADN. El ensayo se basa en la observación de complejos de proteínas-ADN que migran de manera distinta a los fragmentos de ADN de doble cadena en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. El análisis se lleva a cabo incubando extractos nucleares puros o proteínas purificadas con oligonucleótidos de ADN de doble hebra marcados en los extremos con fósforo radioactivo. Las muestras son analizadas en geles no desnaturizantes y detectadas por autoradiografía.

La especificidad de cada complejo se determina a través de la competición de los complejos formados con oligonucleótidos no marcados silvestres, consensos y mutados. Para determinar la presencia de una proteína específica en el complejo proteína-ADN realizamos competiciones con anticuerpos específicos para la proteína a identificar, a este ensayo se le denomina *Super Shift*.

100000cpm de oligonucleótidos de ADN de doble cadena marcados en el nucleótido terminal con γ^{32} ATP y purificados por medio de columnas *MicroSpin S-200 HR Columns* de Amersham Biosciences, fueron incubados 20 minutos a temperatura ambiente con 10 μ g de extracto nucleico en un buffer que contenía: 20mM Hepes pH7.9, 100mM KCl, 10% Glicerol, 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.4mM

ZnSO₄, 40µM ZnCl₂ y 1µg de Poly (dl-dC) (Amersham Biosciences). En el caso de las competiciones y super shifts añadimos a la mezcla oligonucleótidos no marcados a una concentración 50 veces mayor que la utilizada con el oligonucleótido marcado o 2µg de anticuerpo específico.

Los complejos fueron separados en geles nativos al 5% de poliacrilamida en TBE 1X. Una vez separados los complejos ADN-proteína, el gel se secó al vacío y se expuso en placas fotográficas para la visualización de los complejos formados.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para este ensayo se muestran en la tabla 7.

Nombre	Secuencia
Fw- Bsh TCF consenso	5'- CCCTTTGATCTTACC -3'
Rv- Bsh TCF consenso	5'- GGTAAGATCAAAGGG -3'
Fw- Bsh AP2 consenso	5'- GATCGAACTGACCGCCCCGCGGCC -3'
Rv- Bsh AP2 consenso	5'- ACCGGCCCCGCGGGCGGTCAGTTTCGATC -3'
Fw- Bsh SP1 consenso	5'- ATTCCGATCGGGGCGGGCAGC -3'
Rv- Bsh SP1 consenso	5'- GCTGCCCCGCCCCGATCGAAT -3'
Fw- Bsh AP-1 consenso	5'- CGCTTGATGATGAGTCAGCCGAA -3'
Rv- Bsh AP-1 consenso	5'- TTCCGGCTGACTCATCAATCAAGCG -3'
Fw- Bsh -544	5'- CACTTCCCTTTGATGGGACAG -3'
Rv- Bsh -544	5'- CTGTCCCATCAAAGGGAAGTG -3'
Fw- Bsh -491	5'- AAGTTCTTTGCTGATTTTAC -3'
Rv- Bsh -491	5'- GTAAAATCAGCAAAGAACTT -3'
Fw- Bsh -428	5'- GTCTATTGCTGGCCTGCCCCCTA -3'
Rv- Bsh -428	5'- TAGGGGGCAGGCCAGCAATAGAC -3'
Fw- Bsh -352	5'- AATGGGGGTGGGGAAGGAGTGGGAGGGCAGTG -3'
Rv- Bsh -352	5'- CACTGCCCTCCCCTCCTTCCCCACCCCCATT -3'
Fw- Bsh -225	5'- AAGAGGTGGGAGTGCCTGGGGAGGGAGG -3'
Rv- Bsh -225	5'- CCTCCCTCCCCAGGCACTCCCACCTCTT -3'
Fw- Bsh -36	5'- GGCTCTGACGGTACAGTGAT -3'
Rv- Bsh -36	5'- ATCACTGTACCGTCAGAGCC -3'
Fw- Bsh -552 ^{mut-548 t/c}	5'- CACTTCCCTCTGATGGGACAG -3'
Rv- Bsh -552 ^{mut-548 t/c}	5'- CTGTCCCATCAGAGGGAAGTG -3'
Fw- Bsh -497 ^{mut-495 t/c}	5'- AAGTTCTCTGCTGATTTTAC -3'
Rv- Bsh -497 ^{mut-495 t/c}	5'- GTAAAATCAGCAGAGAACTT -3'
Fw- Bsh -36 ^{mut g/a}	5'- GGCTCTAAGGGTACAGTGAT -3'
Rv- Bsh -36 ^{mut g/a}	5'- ATCACTGTACCCTTAGAGCC -3'

Tabla 7: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA

Anexo

INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT.

Los medios condicionados, extractos totales o nucleares de las diferentes líneas celulares fueron separados mediante electroforesis en geles del 3-10% o al 8% de poliacrilamida en presencia de SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P (250mÅ, Millipore), durante 2 horas a 400mAmp/ 113Volts.

Se realizó el boqueo de la membrana durante una hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo: 1X TBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20 y 5% leche desnatada

Inmunodetección:

1. Se retira la solución de bloqueo.
2. Se incuba la membrana toda la noche a 4°C en agitación continua, con el anticuerpo primario disuelto en TBS pH 7.4 1X, 0.05% Tween-20 y 5% leche desnatada. La dilución del anticuerpo primario varía según el tipo de anticuerpo utilizado (ver Resultados).
3. La membrana se lava cinco veces con TBS 1X y 0.05% Tween-20 (dos lavados rápidos, dos de 5 minutos y uno de 10 minutos), a temperatura ambiente y en agitación.
4. Se incuba la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa disuelto en TBS pH 7.4 1X, 0.05% Tween-20 y 5% leche. La incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 hora y en agitación constante.
5. Se repite la serie de lavados indicada en el paso 3.
6. Finalmente se realiza la detección del anticuerpo secundario. Utilizamos el *kit* ECL™ *western blotting* (Amersham) y siguiendo el protocolo del mismo.
7. La luminiscencia producida fue detectada por la exposición de las membranas a películas autoradiográficas sensibles a la luz. Esta exposición se prolonga desde un mínimo de 15 segundos hasta un máximo de 30 minutos. Las películas autoradiográficas utilizadas son Hyperfilm™-ECL (Amersham).

ANÁLISIS RT-PCR.

El análisis por RT-PCR (Retro Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa) se hizo a partir de ARN total de células en cultivo. Para la fase de Retro transcripción (RT) se utilizó la enzima *Expand™ Reverse Transcriptase* de Roche siguiendo el siguiente protocolo:

En tubos previamente enfriados y mantenidos en hielo se ponen los siguientes compuestos para un volumen final de 20µl:

Oligo dT	→	1µl
dNTPs [10mM]	→	4µl
ARN	→	1µg
H ₂ O	→	suficiente para aforar al volumen final.

Se mezcla y se calienta a 65°C durante 5 minutos y se coloca de nuevo en hielo. Se añade a la mezcla:

Tampón 5X	→	4µl
DTT, 0.1M	→	2µl
Inhibidor de RNAsa, 40 U/ml	→	1µl

Se mezcla y se calienta durante 2 minutos a 42°C. Se añade por último:

La enzima "Expand™ Reverse Transcriptase"	→	1µl
---	---	-----

Se mezcla con cuidado y se incuba en un termociclador a 39°C durante 50 minutos y a 70°C durante 15 minutos.

De esta reacción se toman 10µl para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un par de cebadores específicos para cada PCR a realizar.

Nombre	Secuencia	Proteína que identifica
A-UP:	5'- GCG CCA CCC TGT GAC -3'	Isoformas de versicano; V1
A-UP*:	5'- TGG AGG TGG TCT ACT TGG -3'	Isoformas de versicano; V3
B-UP:	5'- GAC CTC AGG CGC TTT C -3'	Isoformas de versicano; V0 y V2
B-LOW:	5'- CAG TGG TAA CGA GAT GCT TC -3'	Isoformas de versicano; V0 y V1
C-LOW:	5'- TAG CAC TGC CCT TGG A -3'	Isoformas de versicano; V2
C-LOW*:	5'- TCA CAT GTC TCG GTA TCT TG -3'	Isoformas de versicano; V3
GAPDH-UP:	5'- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG G -3'	GAPDH
GAPDH-LOW:	5'- ACC CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG -3'	GAPDH
Fw-AP2α:	5'- AAG TAC GAG GAC TGC GAG GA -3'	AP2α
Rv-AP2α:	5'- ACG TTG GCA GCT TTA CGT CT -3'	AP2α

Para realizar la PCR se utilizó la *enzima Expand™ High Fidelity PCR System* de Roche siguiendo el protocolo marcado por el comercial. Para la reacción en un volumen final de 25µl se utilizaron:

Compuesto	Concentración de la solución madre	Volumen
H ₂ O		17.65µl
Buffer	10X	2µl
Mg ⁺⁺	50mM	Xµl*
<i>Oligo 1</i>	20pmoles/ml	0.5µl
<i>Oligo 2</i>	20pmoles/ml	0.5µl
dNTPs	2mM	1.7µl
ADN		2.5µl
Enzima Expand™ High Fidelity PCR System		0.25µl

Se colocó el tubo con la mezcla en la máquina de PCR bajo las siguientes condiciones:

1. 2 minutos a 94°C
2. 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a una temperatura de hibridación X°C** y 1 minuto a 72°C
3. 10 minutos a 72°C
4. 4°C

* Las concentraciones de Mg⁺⁺ varían de la siguiente forma:

GAPDH, V1, V2, AP2	2μl	[1.2mM]
V0, V3, AP2α	4μl	[2.5mM]

** Las temperaturas de hibridación también varían siendo éstas:

GAPDH, V0 y V1	55°C
V2 y V3	53°C,
AP2α	50°C

Los tamaños de fragmentos esperados para cada una de las reacciones son los siguientes:

Isoforma V0,	351pb.
Isoforma V1:	386pb.
Isoforma V2:	373pb.
Isoforma V3:	342pb.
GAPDH:	960pb.
AP2α:	816pb

Los fragmentos fueron separados y visualizado sen en geles de agarosa al 2% y teñidos posteriormente con Bromuro de Etidio.

ANÁLISIS POR HIBRIDACIÓN ARN-ADN (NORTHERN BLOT).

Todo el material utilizado para ARN fue esterilizado para evitar la degradación del mismo, y se trabajó con guantes.

Para separar las muestras de ARN se realiza una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y formaldehído 2.2M en MOPS 1X, pH 7:

- 1.- **Gel:** El agua y la agarosa se ponen en un matraz y se calienta hasta que se deshaga la agarosa.
- 2.- Se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 65°C, se le añade MOPS 10X y se agita.
- 3.- Una vez bien agitado se le añade el formaldehído al 37% y se deja enfriar un poco más.
- 4.- Se vacía en el soporte de la cámara de electroforesis, la cual fue previamente lavada con NaOH 100mM por una hora y lavado con abundante agua estéril.
- 5.- Una vez que esté gelificado se coloca en la cubeta de electroforesis la cual se llena con MOPS 10X hasta que cubra por completo el gel.
- 6.- Se toman 15μg de ARN total y se les añade el tampón de carga en una proporción 1:5.
- 7.- Se desnaturalizan las muestras dejándolas a 70°C durante 10 minutos y en hielo durante 5 minutos.
- 8.- Se cargan las muestras en los pozos.
- 9.- Se pone a correr el gel a 80Volts hasta que las muestras entren, para después bajar el voltaje a 40Volts para una mejor separación de las bandas.
- 10.- Terminada la separación se tiñe el gel con una solución de Bromuro de Etidio durante 10 minutos.
- 11.- Se lava el gel con agua estéril 10minutos o hasta que sea visible el ARN en el transiluminador de UV.
- 12.- **Desnaturalización alcalina:** Se coloca el gel en 5 volúmenes de una solución 50mM NaOH, 10mM

NaCl durante 45 minutos en agitación suave.

13.- Se quita esta solución y se lava dos veces con agua.

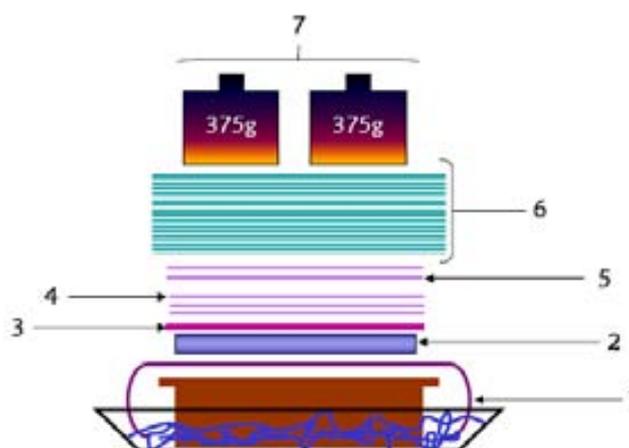
14.- Se neutraliza la reacción con Tris (pH7.5) 0.1M durante 45 minutos en agitación suave.

15.- Después se coloca el gel en SSC 20X por 45 minutos más.

16.- **Transferencia:** Se realiza la transferencia por capilaridad. Se cortan: un papel Whatman 3M, 3cm más ancho que el gel y de largo lo suficiente para que toque el tampón de transferencia; cinco papeles Whatman 3M un poco más grandes que el gel y la membrana de nylon (Hybond-XL, Amersham Pharmacia) del tamaño del gel que se pone en SSC 2X.

17.- Para montar la transferencia se coloca un soporte en una bandeja con SSC 20X sobre la cual se colocan en el siguiente orden los papeles, teniendo cuidado de no dejar burbujas:

1. Papel Whatman 3M largo mojado en SSC20X
2. El gel al cual previamente se le cortaron los pozos.
3. Membrana mojada en SSC2X
4. 3 papeles Whatman 3M mojados en SSC 20X
5. 2 papeles Whatman 3M secos
6. Papel absorbente
7. Peso 750g



18.- Se cubre todo para que no haya evaporación y se deja toda la noche.

19.- La fijación del ARN en la membrana se hace con luz UV (1200μJoules).

20.- **Prehibridación:** Se coloca en el tubo de hibridación la membrana con 20ml de la solución de prehibridación a 42°C durante 2 horas.

Para 20ml de solución de prehibridación:

Volumen	Solución madre
10ml	100% Formamida
6ml	20X SSC
1ml	100X Denhardt's
1ml	10% SDS
2ml	50% Dextran-SO ₄
200μl	10mg/ml SSADN

El SSDNA (ADN de esperma de salmón, por sus siglas en inglés) se debe desnaturalizar antes de verterlo en la solución de prehibridación, para ello se hierve durante 10 minutos y se deja en hielo durante 5 minutos.

21.- **Hibridación:** Se le añade al tubo la sonda marcada (ver Materiales y Métodos) y desnaturalizada (hervir durante 10 minutos y dejar en hielo durante 5 minutos) y se deja a 42°C toda la noche en agitación suave.

22.-Lavados: Se realizan en los tubos en agitación fuerte. El volumen ha de ser de por lo menos la tercera parte del tubo.

1.- Lavar 5 minutos dos veces con 50ml de 2X SSC, 0.1% SDS a 42°C.

2.- 20 minutos con 50ml de 2X SSC, 0.1% SDS a 42°C

3.- 20 minutos con 50ml de 0.3X SSC, 0.1% SDS a 65°C

23.- Se seca un poco la membrana y se expone a una placa fotográfica por el tiempo necesario. Se deja durante ese tiempo a -80°C.

Soluciones:

NaOH 100mM

MOPS 10X (pH 7)

Compuesto	peso para 1l
MOPS	41.8g
Acetato de sodio	6.8g
EDTA	3.7g

Tampón de carga 5X

Compuesto	volumen para 10ml.
Solución saturada de Azul de Bromofenol.	16ml
EDTA 500mM, pH 8	80ml
Formaldehído 37%	720ml
Glicerol 100%	2ml
Formamida	3.084ml
MOPS 10X	4ml

Aforar a 10ml con agua estéril. (Guardar a 4°C)

SSC 20X

Compuesto	Concentración final.
NaCl	3M
Acetato tri-sódico	0.3M

Solución desnaturalizante

Compuesto	Concentración final.
NaOH	50mM
NaCl	10mM

Solución neutralizante.

<u>Compuesto</u>	<u>concentración final.</u>
Tris-HCl	0.1M (pH 7.4)

Bibliografía

- Albino, A.P., Lloyd, K.O., Houghton, A.N., Oettgen, H.F. and Old, L.J. (1981) *Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient. Implications for the study of tumor antigens.* J. Exp. Med., 154, 1764-1778.
- Albino, A.P., Le, S.R., Oliff, A.I., Furth, M.E. and Old, L.J. (1984) *Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity?* Nature, 308, 69-72.
- Albino, A.P. and Houghton, A.N. (1985) *Cell surface antigens of melanocytes and melanoma.* Cancer Surv., 4, 185-211.
- 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.* J. Neuropathol. Exp. Neurol., 58, 597-605.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. and Seed, B. (1990) *CD44 Is the Principal Cell-Surface Receptor for Hyaluronate.* Cell, 61, 1303-1313.
- Bandtlow, C.E. and Zimmermann, D.R. (2000) *Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins.* Physiol Rev., 80, 1267-1290.
- Bar-Eli, M. (1999) *Role of AP-2 in Tumor Growth and Metastasis of Human Melanoma.* Cancer and Metastasis Reviews, 18, 377-385.
- Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B.S. and Murphy, J.M. (2001) *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components.* Experimental Cell Research, 268, 189-200.
- Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. and Stamenkovic, I. (1994) *Interaction Between CD44 and Hyaluronate Is Directly Implicated in the Regulation of Tumor-Development.* Journal of Experimental Medicine, 180, 53-66.
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidt, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P. and Herlyn, M. (2001) *Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling.* Cancer Res., 61, 8306-8316.
- Bhoomik, A., Gangi, L. and Ronai, Z. (2004) *Inhibition of melanoma growth and metastasis by ATF2-derived peptides.* Cancer Res, 64, 8222-8230.
- Bignami, A., Perides, G. and Rahemtulla, F. (1993) *Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain.* J. Neurosci. Res., 34, 97-106.
- Black, A.R., Black, J.D. and Zikhan-Clifford, J. (2001) *Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer.* J. Cell Physiol, 188, 143-160.
- Burg, M.A., Tillet, E., Timpl, R. and Stallcup, W.B. (1996) *Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules.* J. Biol. Chem., 271, 26110-26116.
- Burg, M.A., Nishiyama, A. and Stallcup, W.B. (1997) *A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen.* Exp. Cell Res., 235, 254-264.
- Burg, M.A., Grako, K.A. and Stallcup, W.B. (1998) *Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells.* J. Cell Physiol, 177, 299-312.
- Cattaruzza, S., Schiappacassi, M., Ljungberg-Rose, A., Spessotto, P., Perissinotto, D., Morgelin, M., Mucignat, M.T., Colombatti, A. and Perris, R. (2002) *Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neangiogenesis in vitro.* J. Biol. Chem., 277, 47626-47635.
- Chin, L. (2003) *The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man.* Nat. Rev. Cancer, 3, 559-570.

- Chudnovsky,Y., Khavari,P.A. and Adams,A.E. (2005) *Melanoma genetics and the development of rational therapeutics*. J. Clin. Invest, 115, 813-824.
- de,V.E. and Coebergh,J.W. (2004) *Cutaneous malignant melanoma in Europe*. Eur. J. Cancer, 40, 2355-2366.
- Deniaud,E., Baguet,J., Mathieu,A.L., Pages,G., Marvel,J. and Leverrier,Y. (2006) *Overexpression of Sp1 transcription factor induces apoptosis*. Oncogene.
- Dexter,D.L., Matook,G.M., Meitner,P.A., Bogaars,H.A., Jolly,G.A., Turner,M.D. and Calabresi,P. (1982) *Establishment and characterization of two human pancreatic cancer cell lines tumorigenic in athymic mice*. Cancer Res, 42, 2705-2714.
- 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-Molecular Cell Research, 1642, 107-114.
- Dours-Zimmermann,M.T. and Zimmermann,D.R. (1994) *A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican*. J. Biol. Chem., 269, 32992-32998.
- Dutt,S., Kleber,M., Matasci,M., Sommer,L. and Zimmermann,D.R. (2006) *Versican V0 and V1 guide migratory neural crest cells*. J. Biol. Chem., 281, 12123-12131.
- East,J.A., Mitchell,S.D. and Hart,I.R. (1993) *Expression and function of the CD44 glycoprotein in melanoma cell lines*. Melanoma Res., 3, 341-346.
- Evanko,S.P., Johnson,P.Y., Braun,K.R., Underhill,C.B., Dudhia,J. and Wight,T.N. (2001) *Platelet-derived growth factor stimulates the formation of Versican-Hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 394, 29-38.
- Faassen,A.E., Schragar,J.A., Klein,D.J., Oegema,T.R., Couchman,J.R. and McCarthy,J.B. (1992) *A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion*. J. Cell Biol., 116, 521-531.
- Fidler,P.S., Schuette,K., Asher,R.A., Dobbertin,A., Thornton,S.R., Calle-Patino,Y., Muir,E., Levine,J.M., Geller,H.M., Rogers,J.H., Faissner,A. and Fawcett,J.W. (1999) *Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2*. Journal of Neuroscience, 19, 8778-8788.
- Garrigues,H.J., Lark,M.W., Lara,S., Hellstrom,I., Hellstrom,K.E. and Wight,T.N. (1986) *The melanoma proteoglycan: restricted expression on microspikes, a specific microdomain of the cell surface*. J. Cell Biol., 103, 1699-1710.
- Gershenwald,J.E., Sumner,W., Calderone,T., Wang,Z., Huang,S. and Bar-Eli,M. (2001) *Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo*. Oncogene, 20, 3363-3375.
- Goodison,S., Urquidi,V. and Tarin,D. (1999) *CD44 cell adhesion molecules*. Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology, 52, 189-196.
- Gorden,A., Osman,I., Gai,W., He,D., Huang,W., Davidson,A., Houghton,A.N., Busam,K. and Polsky,D. (2003) *Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues*. Cancer Res., 63, 3955-3957.
- Gordon,M.D. and Nusse,R. (2006) *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. J. Biol. Chem., 281, 22429-22433.
- Goretzki,L., Burg,M.A., Grako,K.A. and Stallcup,W.B. (1999) *High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan*. J. Biol. Chem., 274, 16831-16837.
- Goretzki,L., Lombardo,C.R. and Stallcup,W.B. (2000) *Binding of the NG2 proteoglycan to krigle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasmin(ogen)*. J. Biol. Chem., 275, 28625-28633.

- Goulding,M.D., Chalepakis,G., Deutsch,U., Erselius,J.R. and Gruss,P. (1991) *Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis*. EMBO J., 10, 1135-1147.
- Govindarajan,B., Bai,X., Cohen,C., Zhong,H., Kilroy,S., Louis,G., Moses,M. and Arbiser,J.L. (2003) *Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling*. J. Biol. Chem., 278, 9790-9795.
- Grako,K.A. and Stallcup,W.B. (1995) *Participation of the NG2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor*. Exp. Cell Res., 221, 231-240.
- Gruss,C. and Herlyn,M. (2001) *Role of cadherins and matrixins in melanoma*. Curr. Opin. Oncol., 13, 117-123.
- Gunthert,U., Stauder,R., Mayer,B., Terpe,H.J., Finke,L. and Friedrichs,K. (1995) *Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression?* Cancer Surv., 24, 19-42.
- Haass,N.K., Smalley,K.S., Li,L. and Herlyn,M. (2005) *Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma*. Pigment Cell Res., 18, 150-159.
- Haluska,F.G., Tsao,H., Wu,H., Haluska,F.S., Lazar,A. and Goel,V. (2006) *Genetic alterations in signaling pathways in melanoma*. Clin. Cancer Res., 12, 2301s-2307s.
- Haqq,C., Nosrati,M., Sudilovsky,D., Crothers,J., Khodabakhsh,D., Pulliam,B.L., Federman,S., Miller,J.R., Allen,R.E., Singer,M.I., Leong,S.P.L., Ljung,B.M., Sagebiel,R.W. and Kashani-Sabet,M. (2005) *The gene expression signatures of melanoma progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 6092-6097.
- Harper,J.R. and Reisfeld,R.A. (1983) *Inhibition of anchorage-independent growth of human melanoma cells by a monoclonal antibody to a chondroitin sulfate proteoglycan*. J. Natl. Cancer Inst., 71, 259-263.
- Heredia,A., Villena,J., Romaris,M., Molist,A. and Bassols,A. (1996) *Transforming growth factor beta 1 increases the synthesis and shedding of the melanoma-specific proteoglycan in human melanoma cells*. Arch. Biochem. Biophys., 333, 198-206.
- Heredia,A., Villena,J., Romaris,M., Molist,A. and Bassols,A. (1996) *The effect of TGF-beta 1 on cell proliferation and proteoglycan production in human melanoma cells depends on the degree of cell differentiation*. Cancer Letters, 109, 39-47.
- Herndon,M.E. and Lander,A.D. (1990) *A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system*. Neuron, 4, 949-961.
- Hilger-Eversheim,K., Moser,M., Schorle,H. and Buettner,R. (2000) *Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control*. Gene, 260, 1-12.
- Hirose,J., Kawashima,H., Yoshie,O., Tashiro,K. and Miyasaka,M. (2001) *Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses*. J. Biol. Chem., 276, 5228-5234.
- Hofmann,U.B., Houben,R., Brocker,E.B. and Becker,J.C. (2005) *Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion*. Biochimie, 87, 307-314.
- Houghton,A.N., Eisinger,M., Albino,A.P., Cairncross,J.G. and Old,L.J. (1982) *Surface antigens of melanocytes and melanomas. Markers of melanocyte differentiation and melanoma subsets*. J. Exp. Med., 156, 1755-1766.
- Houghton,A.N., Real,F.X., Davis,L.J., Cordon-Cardo,C. and Old,L.J. (1987) *Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells*. J. Exp. Med., 165, 812-829.
- Hsu,M.Y., Shih,D.T., Meier,F.E., Van,B.P., Hsu,J.Y., Elder,D.E., Buck,C.A. and Herlyn,M. (1998) *Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma*. Am. J. Pathol., 153, 1435-1442.

- Hsu,M.Y., Meier,F.E., Nesbit,M., Hsu,J.Y., Van,B.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*. Am. J. Pathol., 156, 1515-1525.
- Hsu,M.Y., Meier,F. and Herlyn,M. (2002) *Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host*. Differentiation, 70, 522-536.
- Hussein,M.R. (2005) *Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms*. J. Cutan. Pathol., 32, 389-395.
- Iida,J., Skubitz,A.P., Furcht,L.T., Wayner,E.A. and McCarthy,J.B. (1992) *Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 4 beta 1 integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin*. J. Cell Biol., 118, 431-444.
- Iida,J., Meijne,A.M., Spiro,R.C., Roos,E., Furcht,L.T. and McCarthy,J.B. (1995) *Spreading and focal contact formation of human melanoma cells in response to the stimulation of both melanoma-associated proteoglycan (NG2) and alpha 4 beta 1 integrin*. Cancer Res., 55, 2177-2185.
- Iozzo,R.V., Naso,M.F., Cannizzaro,L.A., Wasmuth,J.J. and McPherson,J.D. (1992) *Mapping of the versican proteoglycan gene (CSPG2) to the long arm of human chromosome 5 (5q12-5q14)*. Genomics, 14, 845-851.
- Ishitani,T., Ninomiya-Tsuji,J., Nagai,S., Nishita,M., Meneghini,M., Barker,N., Waterman,M., Bowerman,B., Clevers,H., Shibuya,H. and Matsumoto,K. (1999) *The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF*. Nature, 399, 798-802.
- Iwata,M., Wight,T.N. and Carlson,S.S. (1993) *A brain extracellular matrix proteoglycan forms aggregates with hyaluronan*. J. Biol. Chem., 268, 15061-15069.
- Jalkanen,S., Wu,N., Bargatze,R.F. and Butcher,E.C. (1987) *Human lymphocyte and lymphoma homing receptors*. Annu. Rev. Med., 38, 467-476.
- Jean,D., Gershenwald,J.E., Huang,S., Luca,M., Hudson,M.J., Tainsky,M.A. and Bar-Eli,M. (1998) *Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells*. J. Biol. Chem., 273, 16501-16508.
- Jean,D., Harbison,M., McConkey,D.J., Ronai,Z. and Bar-Eli,M. (1998) *CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells*. J. Biol. Chem., 273, 24884-24890.
- Johnson,W., Albanese,C., Handwerker,S., Williams,T., Pestell,R.G. and Jameson,J.L. (1997) *Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2*. J. Biol. Chem., 272, 15405-15412.
- Jorda,M., Olmeda,D., Vinyals,A., Valero,E., Cubillo,E., Llorens,A., Cano,A. and Fabra,A. (2005) *Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor*. J. Cell Sci., 118, 3371-3385.
- Kabbarah,O. and Chin,L. (2005) *Revealing the genomic heterogeneity of melanoma*. Cancer Cell, 8, 439-441.
- Kaminska,B., Wesolowska,A. and Danilkiewicz,M. (2005) *TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis*. Acta Biochim. Pol., 52, 329-337.
- Kamiya,N., Watanabe,H., Habuchi,H., Takagi,H., Shinomura,T., Shimizu,K. and Kimata,K. (2006) *Versican/PDGF-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation*. J. Biol. Chem., 281, 2390-2400.
- Karin,M., Liu,Z. and Zandi,E. (1997) *AP-1 function and regulation*. Curr. Opin. Cell Biol., 9, 240-246.
- Kawashima,H., Li,Y.F., Watanabe,N., Hirose,J., Hirose,M. and Miyasaka,M. (1999) *Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin*. International Immunology, 11, 393-405.

- Kimata,K., Oike,Y., Tani,K., Shinomura,T., Yamagata,M., Uritani,M. and Suzuki,S. (1986) *A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo.* J. Biol. Chem., 261, 13517-13525.
- Klymkowsky,M.W. (2005) *beta-catenin and its regulatory network.* Hum. Pathol., 36, 225-227.
- Knutson,J.R., Iida,J., Fields,G.B. and McCarthy,J.B. (1996) *CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes.* Mol. Biol. Cell, 7, 383-396.
- Kolligs,F.T., Bommer,G. and Goke,B. (2002) *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis.* Digestion, 66, 131-144.
- Korabiowska,M., Schlott,T., Siems,N., Muller,A., Cordon-Cardo,C., Fischer,G. and Brinck,U. (2004) *Analysis of adenomatous polyposis coli gene expression, APC locus-microsatellite instability and APC promoter methylation in the progression of melanocytic tumours.* Mod. Pathol., 17, 1539-1544.
- Korinek,V., Barker,N., Willert,K., Molenaar,M., Roose,J., Wagenaar,G., Markman,M., Lamers,W., Destree,O. and Clevers,H. (1998) *Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse.* Mol. Cell Biol., 18, 1248-1256.
- Krusius,T., Gehlsen,K.R. and Ruoslahti,E. (1987) *A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences.* J. Biol. Chem., 262, 13120-13125.
- Lamb,R.F., Hennigan,R.F., Turnbull,K., Katsanakis,K.D., MacKenzie,E.D., Birnie,G.D. and Ozanne,B.W. (1997) *AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44.* Mol. Cell Biol., 17, 963-976.
- Larue,L. and Delmas,V. (2006) *The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma.* Front Biosci., 11, 733-742.
- Lemire,J.M., Braun,K.R., Maurel,P., Kaplan,E.D., Schwartz,S.M. and Wight,T.N. (1999) *Versican/Pg-M isoforms in vascular smooth muscle cells.* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 19, 1630-1639.
- Levine,J.M. (1994) *Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury.* J. Neurosci., 14, 4716-4730.
- Li,G., Satyamoorthy,K. and Herlyn,M. (2001) *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells.* Cancer Res., 61, 3819-3825.
- Margolis,R.U. and Margolis,R.K. (1997) *Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding.* Cell and Tissue Research, 290, 343-348.
- Matsumoto,K., Kamiya,N., Suwan,K., Atsumi,F., Shimizu,K., Shinomura,T., Yamada,Y., Kimata,K. and Watanabe,H. (2006) *Identification and characterization of versican/Pg-M aggregates in cartilage.* J. Biol. Chem., 281, 18257-18263.
- Mayanil,C.S., George,D., Freilich,L., Miljan,E.J., Mania-Farnell,B., McLone,D.G. and Bremer,E.G. (2001) *Microarray analysis detects novel Pax3 downstream target genes.* J. Biol. Chem., 276, 49299-49309.
- Meier,F., Satyamoorthy,K., Nesbit,M., Hsu,M.Y., Schitteck,B., Garbe,C. and Herlyn,M. (1998) *Molecular events in melanoma development and progression.* Front Biosci., 3, D1005-D1010.
- Meier,F., Nesbit,M., Hsu,M.Y., Martin,B., Van,B.P., Elder,D.E., Schaumburg-Lever,G., Garbe,C., Walz,T.M., Donatien,P., Crombleholme,T.M. and Herlyn,M. (2000) *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF.* Am. J. Pathol., 156, 193-200.
- Merrill,B.J., Gat,U., DasGupta,R. and Fuchs,E. (2001) *Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin.* Genes Dev., 15, 1688-1705.
- Meyer,T.E. and Habener,J.F. (1993) *Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid- binding proteins.* Endocr Rev, 14, 269-290.

- Milde-Langosch, K. (2005) *The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis*. Eur. J. Cancer, 41, 2449-2461.
- Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., Margolis, R.K. and Margolis, R.U. (1998) *Differential Regulation of Expression of Hyaluronan-Binding Proteoglycans in Developing Brain: Aggrecan, Versican, Neurocan, and Brevican*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 247, 207-212.
- Miquel-Serra, L., Serra, M., Hernandez, D., Domenzain, C., Docampo, M.J., Rabanal, R.M., de, T., 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*. Lab Invest, 86, 889-901.
- Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R.J., Castellone, M.D. and Gutkind, J.S. (2005) *Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1*. J. Biol. Chem., 280, 35081-35084.
- Murakami, T., Toda, S., Fujimoto, M., Ohtsuki, M., Byers, H.R., Etoh, T. and Nakagawa, H. (2001) *Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 288, 8-15.
- Nakamura, M., Sone, S., Takahashi, I., Mizoguchi, I., Echigo, S. and Sasano, Y. (2005) *Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb*. J. Histochem. Cytochem., 53, 1553-1562.
- 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*. J. Biol. Chem., 269, 32999-33008.
- Nateri, A.S., Spencer-Dene, B. and Behrens, A. (2005) *Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development*. Nature, 437, 281-285.
- Nikitovic, D., Zafiroopoulos, A., Katonis, P., Tsatsakis, A., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K. and Tzanakakis, G.N. (2006) *Transforming growth factor-beta as a key molecule triggering the expression of versican isoforms v0 and v1, hyaluronan synthase-2 and synthesis of hyaluronan in malignant osteosarcoma cells*. IUBMB. Life, 58, 47-53.
- Nishiyama, A., Dahlin, K.J., Prince, J.T., Johnstone, S.R. and Stallcup, W.B. (1991) *The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan*. J. Cell Biol., 114, 359-371.
- Nishiyama, A. and Stallcup, W.B. (1993) *Expression of NG2 proteoglycan causes retention of type VI collagen on the cell surface*. Mol. Biol. Cell, 4, 1097-1108.
- Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. and Williams, T. (1998) *AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 13714-13719.
- Nyormoi, O. and Bar-Eli, M. (2003) *Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma*. Clinical and Experimental Metastasis, 20, 251-263.
- 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*. Curr. Biol., 15, 249-254.
- Paulus, W., Baur, I., Dours-Zimmermann, M.T. and Zimmermann, D.R. (1996) *Differential expression of versican isoforms in brain tumors*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55, 528-533.
- 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, 127, 2823-2842.
- Perlis, C. and Herlyn, M. (2004) *Recent advances in melanoma biology*. Oncologist., 9, 182-187.

- Perris,R., Perissinotto,D., Pettway,Z., Bronner-Fraser,M., Morgelin,M. and Kimata,K. (1996) *Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration*. FASEB J., 10, 293-301.
- Philipsen,S. and Suske,G. (1999) *A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors*. Nucleic Acids Res., 27, 2991-3000.
- Piedra,J., Martinez,D., Castano,J., Miravet,S., Dunach,M. and de Herreros,A.G. (2001) *Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation*. J. Biol. Chem., 276, 20436-20443.
- Pla,P., Moore,R., Morali,O.G., Grille,S., Martinozzi,S., Delmas,V. and Larue,L. (2001) *Cadherins in neural crest cell development and transformation*. J. Cell Physiol, 189, 121-132.
- Pluschke,G., Vanek,M., Evans,A., Dittmar,T., Schmid,P., Itin,P., Filardo,E.J. and Reisfeld,R.A. (1996) *Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 9710-9715.
- Pollock,P.M., Harper,U.L., Hansen,K.S., Yudt,L.M., Stark,M., Robbins,C.M., Moses,T.Y., Hostetter,G., Wagner,U., Kakareka,J., Salem,G., Pohida,T., Heenan,P., Duray,P., Kallioniemi,O., Hayward,N.K., Trent,J.M. and Meltzer,P.S. (2003) *High frequency of BRAF mutations in nevi*. Nat. Genet., 33, 19-20.
- Poser,I. and Bosserhoff,A.K. (2004) *Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma*. Histol. Histopathol., 19, 173-188.
- Pujal,J., Capella,G. and Real,F.X. (2006) *The Wnt pathway is active in a small subset of pancreas cancer cell lines*. Biochim. Biophys. Acta, 1762, 73-79.
- Rahmani,M., Read,J.T., Carthy,J.M., McDonald,P.C., Wong,B.W., Esfandiarei,M., Si,X.N., Luo,Z.S., Luo,H.L., Rennie,P.S. and McManus,B.M. (2005) *Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells*. J. Biol. Chem., 280, 13019-13028.
- Real,F.X., Houghton,A.N., Albino,A.P., Cordon-Cardo,C., Melamed,M.R., Oettgen,H.F. and Old,L.J. (1985) *Surface antigens of melanomas and melanocytes defined by mouse monoclonal antibodies: specificity analysis and comparison of antigen expression in cultured cells and tissues*. Cancer Res., 45, 4401-4411.
- Reichardt L.F. (1999) *Extracellular matrix molecules*. En "Extracellular matrix, anchor, and adhesion molecules". Kreis T Vale R. (ed). Oxford, 2^a ed, 335-356.
- Rettig,W.J., Real,F.X., Spengler,B.A., Biedler,J.L. and Old,L.J. (1986) *Human melanoma proteoglycan: expression in hybrids controlled by intrinsic and extrinsic signals*. Science, 231, 1281-1284.
- Reya,T. and Clevers,H. (2005) *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 434, 843-850.
- Ricciardelli,C., Mayne,K., Sykes,P.J., Raymond,W.A., McCaul,K., Marshall,V.R., Tilley,W.D., Skinner,J.M. and Horsfall,D.J. (1997) *Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer*. Clin. Cancer Res., 3, 983-992.
- Rimm,D.L., Caca,K., Hu,G., Harrison,F.B. and Fearon,E.R. (1999) *Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma*. Am. J. Pathol., 154, 325-329.
- Robbins,P.F., El-Gamil,M., Li,Y.F., Kawakami,Y., Loftus,D., Appella,E. and Rosenberg,S.A. (1996) *A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes*. J. Exp. Med., 183, 1185-1192.
- Rockmann,H. and Schadendorf,D. (2003) *Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities*. Onkologie., 26, 581-587.
- Ronai,Z., Yang,Y.M., Fuchs,S.Y., Adler,V., Sardana,M. and Herlyn,M. (1998) *ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells*. Oncogene, 16, 523-531.
- Ross,A.H., Cossu,G., Herlyn,M., Bell,J.R., Steplewski,Z. and Koprowski,H. (1983) *Isolation and chemical characterization of a melanoma-associated proteoglycan antigen*. Arch. Biochem. Biophys., 225, 370-383.

- Rubinfeld,B., Robbins,P., El-Gamil,M., Albert,I., Porfiri,E. and Polakis,P. (1997) *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines*. Science, 275, 1790-1792.
- Ruiter,D., Bogenrieder,T., Elder,D. and Herlyn,M. (2002) *Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects*. Lancet Oncol., 3, 35-43.
- Rutberg,S.E., Goldstein,I.M., Yang,Y.M., Stackpole,C.W. and Ronai,Z. (1994) *Expression and transcriptional activity of AP-1, CRE, and URE binding proteins in B16 mouse melanoma subclones*. Mol. Carcinog., 10, 82-87.
- Safe,S. (2001) *Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions*. Vitam. Horm., 62, 231-252.
- Safe,S. and Abdelrahim,M. (2005) *Sp transcription factor family and its role in cancer*. Eur. J. Cancer, 41, 2438-2448.
- Satyamoorthy,K., Muyrers,J., Meier,F., Patel,D. and Herlyn,M. (2001) *Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication*. Oncogene, 20, 4676-4684.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmalfeldt,M., Dours-Zimmermann,M.T., Winterhalter,K.H. and Zimmermann,D.R. (1998) *Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain*. J. Biol. Chem., 273, 15758-15764.
- Schmalfeldt,M., Bandtlow,C.E., Dours-Zimmermann,M.T., Winterhalter,K.H. and Zimmermann,D.R. (2000) *Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth*. J Cell Sci, 113, 807-816.
- Schmidt,A., Lorkowski,S., Seidler,D., Breithardt,G. and Buddecke,E. (2006) *TGF-beta1 generates a specific multicomponent extracellular matrix in human coronary SMC*. Eur. J. Clin. Invest, 36, 473-482.
- Scholl,F.A., Kamarashev,J., Murmann,O.V., Geertsen,R., Dummer,R. and Schafer,B.W. (2001) *PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival*. Cancer Res., 61, 823-826.
- Schonherr,E., Jarvelainen,H.T., Sandell,L.J. and Wight,T.N. (1991) *Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells*. J. Biol. Chem., 266, 17640-17647.
- Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M. and Schaffner,W. (1989) *Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells*. Nucleic Acids Res, 17, 6419.
- Screaton,G.R., Bell,M.V., Jackson,D.G., Cornelis,F.B., Gerth,U. and Bell,J.L. (1992) *Genomic Structure of DNA Encoding the Lymphocyte Homing Receptor CD44 Reveals at Least 12 Alternatively Spliced Exons*. PNAS, 89, 12160-12164.
- 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, 114, 879-886.
- 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*. Mol. Biol. Cell, 16, 1330-1340.
- Singh,R.K., Varney,M.L., Bucana,C.D. and Johansson,S.L. (1999) *Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin*. Melanoma Res., 9, 383-387.
- Slominski,A., Paus,R. and Mihm,M.C. (1998) *Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis*. Anticancer Res., 18, 3709-3715.
- Smalley,K.S. and Herlyn,M. (2005) *Targeting intracellular signaling pathways as a novel strategy in melanoma therapeutics*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1059, 16-25.

- Stallcup,W.B. (2002) *The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects*. J. Neurocytol., 31, 423-435.
- Sturm,R.A., Satyamoorthy,K., Meier,F., Gardiner,B.B., Smit,D.J., Vaidya,B. and Herlyn,M. (2002) *Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells*. Cancer Res., 62, 226-232.
- Sy,M.S., Guo,Y.J. and Stamenkovic,I. (1991) *Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo*. J. Exp. Med., 174, 859-866.
- Tellez,C., McCarty,M., Ruiz,M. and Bar-Eli,M. (2003) *Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma*. J. Biol. Chem., 278, 46632-46642.
- Thompson,J.F., Scolyer,R.A. and Kefford,R.F. (2005) *Cutaneous melanoma*. Lancet, 365, 687-701.
- Toole B.P. (2000) *Hyaluronan*. En "Proteoglycans. Structure, Biology, and Molecular Interactions". Iozzo R.V. (ed). 1ª ed. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 4, pp:61-92.
- Touab,M., Villena,J., Barranco,C., rumi-Uria,M. and Bassols,A. (2002) *Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development*. Am. J. Pathol., 160, 549-557.
- Touab,M., rumi-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, 587-593.
- Trisciuglio,D., Iervolino,A., Candiloro,A., Fibbi,G., Fanciulli,M., Zangemeister-Wittke,U., Zupi,G. and Del,B.D. (2004) *bcl-2 induction of urokinase plasminogen activator receptor expression in human cancer cells through Sp1 activation: involvement of ERK1/ERK2 activity*. J. Biol. Chem., 279, 6737-6745.
- Ueda,Y. and Richmond,A. (2006) *NF-kappaB activation in melanoma*. Pigment Cell Res., 19, 112-124.
- Urabe,K., Nakayama,J., Urabe,A., Taniguchi,S. and Hori,Y. (1992) *In situ hybridization for the analysis of fos oncogene in melanoma cells*. Pigment Cell Res., Suppl 2, 191-192.
- van de,W.M., Oosterwegel,M., Dooijes,D. and Clevers,H. (1991) *Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box*. EMBO J., 10, 123-132.
- Van Muijen,G.N., Danen,E.H., Veerkamp,J.H., Ruiten,D.J., Lesley,J. and van den Heuvel,L.P. (1995) *Glycoconjugate profile and CD44 expression in human melanoma cell lines with different metastatic capacity*. Int. J. Cancer, 61, 241-248.
- van,B.M., Dooijes,D., van de,W.M., Kjaerulff,S., Bonvin,A., Nielsen,O. and Clevers,H. (2000) *Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs*. J. Biol. Chem., 275, 27266-27273.
- van,D.H. and Castellazzi,M. (2001) *Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis*. Oncogene, 20, 2453-2464.
- Westling,J., Gottschall,P.E., Thompson,V.P., Cockburn,A., Perides,G., Zimmermann,D.R. and Sandy,J.D. (2004) *ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu(405)-Gln(406) to generate glial hyaluronate binding protein*. Biochemical Journal , 377, 787-795.
- Wight,T.N. and Merrilees,M.J. (2004) *Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis - Key roles for versican*. Circulation Research, 94, 1158-1167.
- Worm,J., Christensen,C., Gronbaek,K., Tulchinsky,E. and Guldborg,P. (2004) *Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma*. Oncogene, 23, 5215-5226.
- Wu,J., Saint-Jeannet,J.P. and Klein,P.S. (2003) *Wnt-frizzled signaling in neural crest formation*. Trends Neurosci., 26, 40-45.

- Wu,Y.J., Sheng,W., Chen,L.W., Dong,H.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, 2093-2104.
- Xiang,Y.Y., Dong,H., Wan,Y., Li,J., Yee,A., Yang,B.B. and Lu,W.Y. (2006) *Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor*. *J. Biol. Chem.*, 281, 19358-19368.
- Yamagata,M., Saga,S., Kato,M., Bernfield,M. and Kimata,K. (1993) *Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion*. *J. Cell Sci.*, 106 (Pt 1), 55-65.
- Yamanishi,D.T., Buckmeier,J.A. and Meyskens,F.L., Jr. (1991) *Expression of c-jun, jun-B, and c-fos proto-oncogenes in human primary melanocytes and metastatic melanomas*. *J. Invest Dermatol.*, 97, 349-353.
- Yang,S., McNulty,S. and Meyskens,F.L., Jr. (2004) *During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro*. *Pigment Cell Res.*, 17, 74-83.
- Yang,S. and Meyskens,F.L., Jr. (2005) *Alterations in activating protein 1 composition correlate with phenotypic differentiation changes induced by resveratrol in human melanoma*. *Mol. Pharmacol.*, 67, 298-308.
- Yoon,H., Liyanarachchi,S., Wright,F.A., Davuluri,R., Lockman,J.C., de la,C.A. and Pellegata,N.S. (2002) *Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 15632-15637.
- Zenz,R. and Wagner,E.F. (2006) *Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 1043-1049.
- Zerp,S.F., van,E.A., Peltenburg,L.T. and Schrier,P.I. (1999) *p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis*. *Br. J. Cancer*, 79, 921-926.
- Zhang,Y., Cao,L., Kiani,C., Yang,B.L., Hu,W. and Yang,B.B. (1999) *Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by G1 domain and EGF-like motifs*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73, 445-457.
- Zhang,Y., Wu,Y.J., Cao,L., Lee,V., Chen,L.W., Lin,Z.S., Kiani,C., Adams,M.E. and Yang,B.B. (2001) *Versican modulates embryonic chondrocyte morphology via the epidermal growth factor-like motifs in G3*. *Experimental Cell Research*, 263, 33-42.
- Zhou,X.H., Brakebusch,C., Matthies,H., Oohashi,T., Hirsch,E., Moser,M., Krug,M., Seidenbecher,C.I., Boeckers,T.M., Rauch,U., Buettner,R., Gundelfinger,E.D. and Fassler,R. (2001) *Neurocan is dispensable for brain development*. *Mol. Cell Biol.*, 21, 5970-5978.
- Zimmermann,D.R. and Ruoslahti,E. (1989) *Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican*. *EMBO J.*, 8, 2975-2981.
- Zimmermann,D.R., Dours-Zimmermann,M.T., Schubert,M. and Bruckner-Tuderman,L. (1994) *Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis*. *J. Cell Biol.*, 124, 817-825.
- Zimmermann D.R. (2000) *Versican*. En "Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions". Iozzo R.V. (ed). 1ª ed. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 13, pp: 327-340.
- Zuo,J., Hernandez,Y.J. and Muir,D. (1998) *Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury*. *J. Neurobiol.*, 34, 41-54.